

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Ústav chemických léčiv

Cvičení z analytické chemie 2  
Analytická chemie kvantitativní

Jiří Pazourek  
Iva Kapustíková  
Klára Odehnalová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato výuková opora vznikla v rámci řešení projektu:  
„Zvyšování pedagogických, manažerských a odborných dovedností pracovníků VFU“  
s registračním číslem CZ.1.07/2.2.00/28.0110.  
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky.



# Cvičení z Analytické chemie 2

Analytická chemie  
kvantitativní

Jiří Pazourek, Iva Kapustíková, Klára Odehnalová  
Ústav chemických léčiv  
Farmaceutická fakulta VFU Brno

# Obsah

SLOVO AUTORŮ .....	3
LABORATORNÍ CVIČENÍ 1 – GRAVIMETRIE. STANOVENÍ ŽELEZITÉ SOLI JAKO OXIDU ŽELEZITÉHO .....	4
Úvod.....	4
Stanovení železité soli jako $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	6
LABORATORNÍ CVIČENÍ 2 – NEUTRALIZAČNÍ TITRACE. STANOVENÍ NEROZPUSTNÉHO UHLIČITANU ZPĚTNOU TITRACÍ .....	8
Úvod.....	8
Stanovení nerozpustného uhličitanu zpětnou titrací .....	9
LABORATORNÍ CVIČENÍ 3 – CHELATOMETRIE. STANOVENÍ DVOU KATIONTŮ VEDLE SEBE .....	10
Úvod.....	10
Chelatometrické stanovení dvou kationtů vedle sebe .....	10
LABORATORNÍ CVIČENÍ 4 – FOTOMETRIE. METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY ....	12
Úvod.....	12
Fotometrie .....	12
4A. Stanovení $\text{Cu}^{2+}$ Chelatonem III .....	14
Optimalizace podmínek stanovení.....	14
Fotometrické stanovení $\text{Cu}^{2+}$ Chelatonem III pomocí kalibrační křivky .	15
4B. Stanovení fenazonu v Antipyrinu železitými ionty .....	17
Fenazon .....	17
Fotometrické stanovení fenazonu v Antipyrinu železitými ionty pomocí kalibrační křivky .....	17
Optimalizace podmínek stanovení.....	18
LABORATORNÍ CVIČENÍ 5 – POTENCIOMETRICKÁ TITRACE .....	19
Úvod.....	19

Vyhodnocení bodu ekvivalence (BE).....	21
5A. Argentometrické stanovení halogenidů ve směsi s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence .....	22
Úvod.....	22
Potenciometrická titrace.....	23
5B. Alkalimetrické stanovení kyseliny fosforečné s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence .....	25
Úvod.....	25
Potenciometrická titrace.....	26
LABORATORNÍ CVIČENÍ 6 – VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	28
Úvod - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	28
Chromatogram .....	29
Stanovení kofeinu v Acifeinu .....	32
A. Přístroj HPLC YL9100.....	35
B. Přístroj HPLC Agilent, System 1200.....	38
LABORATORNÍ CVIČENÍ 7 – KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA .....	41
Úvod - Kapilární elektroforéza (CE).....	41
Teorie .....	41
Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) ..	42
Stanovení kyseliny acetylsalicylové v Acifeinu.....	44
A. Přístroj CE3D Agilent.....	49
B. Přístroj PrinCE 500 .....	54
LITERATURA A ZDROJE .....	58

## SLOVO AUTORŮ

Tato skripta navazují na „Cvičení z Analytické chemie 1, analytická chemie kvalitativní“. Jsou určena pro magisterský studijní program Farmacie vyučovaný na Farmaceutické fakultě VFU Brno.

Skladba úloh vychází z původních skript „R. Opatřilová, J. Jampílek, I. Liška, Návodů do cvičení z analytické chemie. Kvantitativní analýza, VFU Brno, 2007“, ale jsou modernizované (instrumentální úlohy) a zaměřené na konkrétní analyty i instrumentaci tak, aby odpovídaly možnostem a potřebám výuky.

Proto bychom chtěli zdůraznit, že tato skripta v žádném případě nenahrazují učebnici analytické chemie; jedná se pouze o praktické návody na provedení konkrétních laboratorních cvičení, vždy s nezbytným minimem teorie v úvodu. Navíc v úlohách, kde se používají složitější přístroje (HPLC, CE), jsou také nezbytné informace k pochopení příslušného softwaru.

Studentům FaF VFU Brno doporučujeme jako přípravu na cvičení i zkoušku materiály nacházející se v e-learningovém systému MOODLE, <https://amos.vfu.cz/moodle> v předmětu „Analytická chemie II (cvičení)“, případně „Analytická chemie II“. Pro hlubší náhled do problematiky lze doporučit učebnici „Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 2005“.

Autoři

červenec 2014

J.P., K.O., červenec 2018

J.P., K.O., leden 2020

## LABORATORNÍ CVIČENÍ 1 – GRAVIMETRIE. STANOVENÍ ŽELEZITÉ SOLI JAKO OXIDU ŽELEZITÉHO

### ÚVOD

Vázková analýza neboli gravimetrie patří k nejstarším kvantitativním analytickým technikám. Vázková analýza zahrnuje všechny analytické techniky, při nichž se z měření hmotnosti (nebo jejich změn) stanovuje přímo hmotnost analytu ve vzorku (proto je to absolutní metoda). Tato metoda, ač je časově náročná, je technicky velice jednoduchá, není zatížena systematickou chybou (je správná), a proto mnohdy slouží jako referenční.

Začátkem gravimetrické analýzy je převedení stanovovaného analytu na formu vhodnou pro vážení. Využívá se typicky srážecí reakce (nebo reakce za vzniku komplexu), která se provádí ve vodném roztoku. Vzniklou pevnou fází pak oddělujeme filtrací. V řadě případů je však nezbytné adjustovat odfiltrovanou sraženinu na stechiometricky přesně definovanou formu; pokud nestačí vysušení (odpaření vody), nejčastěji se využívá žihání. Pak se teprve měří hmotnost vzniklé sloučeniny (váží se).

Po převedení analytu do roztoku a úpravě reakčních podmínek (objem, teplota, pH..) je stanovovaná látka srážena pomocí nejrůznějších činidel, přičemž je třeba dbát na vhodné podmínky (zředěné roztoky, pomalé přidávání činidla), aby nedošlo ke ztrátám nebo znečištění sraženiny (srážení musí být kvantitativní). Sraženinu je nutné promýt, vysušit, případně vyžítat - převést na definovaný produkt. Je nutné dbát na optimální vlastnosti sraženiny, nesmí vznikat koloid. Vyloučenou sraženinu zbavíme nečistot a matečného louhu sérií operací, z nichž nejběžnější je zrání, dekantace, filtrace, promývání na filtru. K filtraci lze použít papírový filtr nebo filtrační kelímek (porcelánový, skleněný).

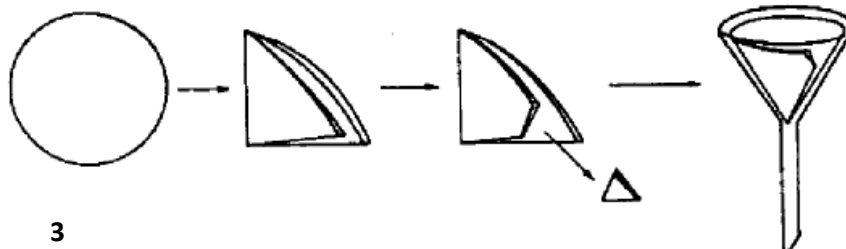
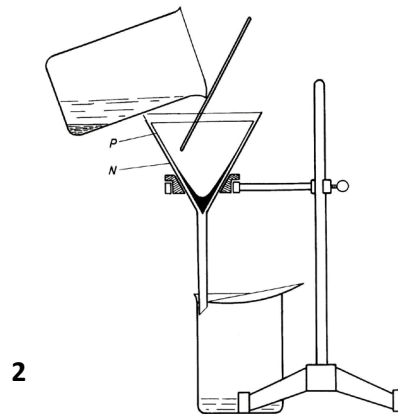
Izolovanou sraženinu převedeme na sloučeninu přesně definovanou, jednotného složení, odolnou proti vlhkosti, pokud možno s vysokou molekulovou hmotností, a to sušením nebo žiháním.

Gravimetricky lze v podstatě stanovit každý prvek nebo část sloučeniny (a to i sloučeniny organické), které lze převést na chemicky definovatelnou sraženinu. Stanovení může být buď přímé, při němž se sráží a váží stanovovaný analyt, nebo nepřímé, při němž se analyt z roztoku nevyklučuje, ale oddělí se od něj všechny nečistoty a zůstane pouze stanovovaná látka – popel, který se váží.

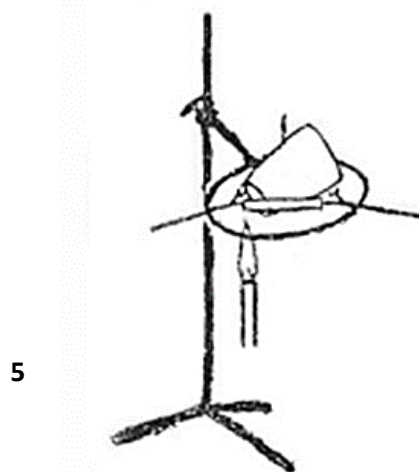
**Pokud má gravimetrie přinášet přesné a správné výsledky, je důležitá velká pečlivost a správná technika provedení celého postupu stanovení.**

### Schematické znázornění důležitých kroků při srážecí gravimetrii

- 1/ Správný postup srážení
- 2/ Správná filtrace
- 3/ Skládání filtračního papíru pro filtraci
- 4/ Skládání filtračního papíru do kelímku
- 5/ Správná poloha kelímku při žihání nad kahanem



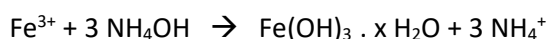
4



5

## STANOVENÍ ŽELEZITÉ SOLI JAKO Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Roztok železité soli se za horka a za přítomnosti NH<sub>4</sub>Cl (zvýšení iontové síly) sráží zředěným hydroxidem amonným (čpavkovou vodou). Vyloučená rezavá sraženina se odfiltruje a **žiháním** převede na Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který se **vází**.



Sraženina, která je v první rovnici zjednodušeně zapsána jako hydroxid železitý, je ve skutečnosti ve vodném prostředí nestechiometrická sloučenina hydratovaného hydroxidu železitého Fe(OH)<sub>3</sub> · x H<sub>2</sub>O, jejíž složení závisí na podmínkách srážení (zvláště pH, iontové síle roztoku, ale i na počáteční koncentraci Fe<sup>3+</sup> atd.). Proto nestačí pouhé vysušení sraženiny, nýbrž abychom dostali stechiometrickou sloučeninu, je sraženinu nutné žiháním převést na Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (druhá rovnice). V průběhu spalování na filtru se může Fe<sup>3+</sup> částečně redukovat na Fe<sup>2+</sup>, který je nutné převést zpátky na Fe<sup>3+</sup> (jinak dochází k negativní chybě). Toho lze dosáhnout delším žiháním za přístupu vzduchu (kyslíku).

**Pomůcky:** kleště, stojan, kruh, kelímek porcelánový, kahan, exsikátor, 400ml kádinka, skleněná tyčinka, filtrační papír, gravimetrická filtrační nálevka

**Chemikálie:** 5% NH<sub>4</sub>OH, 1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, pevný NH<sub>4</sub>Cl

### *Pracovní postup*

Vzorek Fe<sup>3+</sup> soli kvantitativně přeneste do kádinky přiměřeného objemu (400 ml). Zředte čistou vodou na objem cca 150 ml. Pro zvýšení iontové síly, které později vede k rychlejšímu srážení, přidejte 1 g pevného NH<sub>4</sub>Cl a zahřejte k varu. Za stálého míchání přidávejte po kapkách 5% roztok amoniaku ve vodě tak dlouho, až ucítíte zřetelný zápach unikajícího amoniaku. Po vyloučení hydroxidu železitého roztok se sraženinou zahřívejte (téměř k varu nebo na vodní lázni), až dojde ke „sbalení“ sraženiny. Poté opakovaně dekantujte (asi 3x) 1% roztokem NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; (vyšší teplota a přítomnost dusičnanu amonného zabraňují přechodu sraženiny na koloidní formu).



Sraženinu začněte filtrovat přes filtrační papír. Sraženinu na filtru promývejte roztokem 1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Sraženina je promyta tehdy, jestliže v kapce filtrátu slabě okyseleného kyselinou dusičnou po přidavku  $\text{AgNO}_3$  nevzniká bílá sraženina (tj. neobsahuje ionty  $\text{Cl}^-$ ).

Filtrační papír se sraženinou vyjměte z nálevky, sbalte a vložte do porcelánového kelímku, který byl předtím vyžihán do konstantní hmotnosti a zvážen. Konstantní hmotnosti se dosáhne, pokud tři poslední změřené hmotnosti vykazují změnu v rámci přesnosti analytických vah (na posledním zobrazovaném místě), tzn. desetiny mg. Kelímek vždy před vážením nechte vychladnout v exsikátoru!

Stanovovaný analyt i s filtračním papírem v kelímku opatrně spalte a vyžihajte do konstantní hmotnosti. Po ukončení žihání dejte vždy kelímek vychladnout (asi půl hodiny) do exsikátoru (pozor - špičky kleští je třeba před manipulací s kelímkem nahřát, aby kelímek nepraskl).

Po vychladnutí kelímek zvažte na stejných vahách, na kterých jste vážili kelímek prázdný, a **vypočtete obsah Fe nebo železité soli v g.**

---

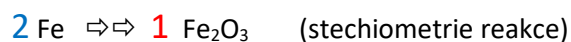
pozn.:

#### Gravimetrický faktor (GF)

- Udává poměrné zastoupení hledaného prvku (nebo sloučeniny) ve vážené sloučenině
- Může být menší i větší než 1
- Používá se pro přímý výpočet obsahu stanovovaného prvku z hmotnosti vážené sloučeniny:  $x = GF * m$

#### příklad:

Gravimetrický faktor pro Fe stanovované jako  $\text{Fe}_2\text{O}_3$



$M(\text{Fe}) = 55,85 \text{ g/mol}$

$M(\text{Fe}_2\text{O}_3) = 159,70 \text{ g/mol}$

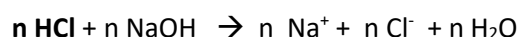
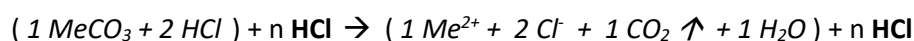
výpočet:

$$GF = \frac{2 * 55,85}{1 * 159,70} = 0,6994$$

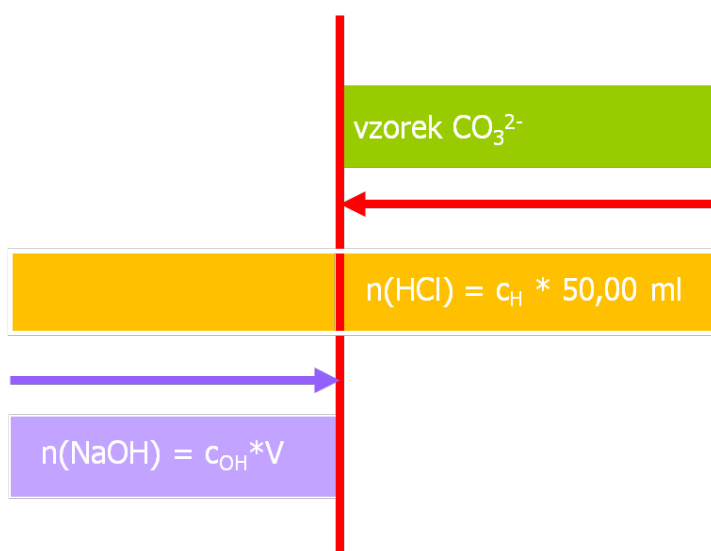
## LABORATORNÍ CVIČENÍ 2 – NEUTRALIZAČNÍ TITRACE. STANOVENÍ NEROZPUSTNÉHO UHLIČITANU ZPĚTNOU TITRACÍ

### ÚVOD

**Zpětná titrace** představuje titrační stanovení se dvěma odměrnými roztoky: nejprve se přidá k roztoku stanovované látky přesný objem prvního odměrného roztoku **v nadbytku** a analyt se nechá kvantitativně zreagovat. Poté se nezreagovaný přebytek prvního odměrného činidla titruje druhým odměrným činidlem. Vypočítá se nezreagované množství prvního odměrného roztoku a pak jemu odpovídající zreagované množství, které je ekvivalentní stanovovanému analytu ( $n$  označuje přebytek činidla):



Smyslem takového postupu je odstranění problémů, které by vznikly při jednoduché přímé titraci: v tomto případě fakt, že stanovované uhličitany jsou nerozpustné ve vodě (nemůžeme tak připravit homogenní roztok) a také fakt, že při přímé acidimetrii by vznikala další kyselina ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), která snížením pH zkresluje určení správného bodu ekvivalence acidobazickým indikátorem.



*Vysvětlení principu zpětné titrace při stanovení nerozpustných uhličitánů. Červená svíslá čára představuje bod ekvivalence, obdelníky množství analytu resp. činidel.*

## STANOVENÍ NEROZPUSTNÉHO UHLIČITANU ZPĚTNOU TITRACÍ

**Pomůcky:** byreta 25/50 ml; pipeta 10/20 ml, 250ml titrační baňky; 250ml kádinka, nálevka, lžička

**Chemikálie:** odměrné roztoky HCl a NaOH, indikátor methylooranž

### *Pracovní postup*

Na analytických vahách odvažte třikrát asi 0,4 g přesně (tzn. na 4 desetinná místa) vzorku a kvantitativně spláchněte do tří titračních baněk. Přidejte byretou 50 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové o přesně známé koncentraci (0,1M; standardizace – viz níže). Roztok povařte. Po rozpuštění uhličitany a vychladnutí přidejte 2 – 3 kapky methylooranže. Titrujte odměrným roztokem hydroxidu sodného o přesně známé koncentraci (0,1M; standardizace – viz níže) do oranžového zbarvení. Provádí se 3x.

### **Výsledek**

Z rozdílu spotřeb vypočítejte látkového množství resp. hmotnost nerozpuštěného uhličitany ve vzorku a stanovte jeho obsah %(m/m) vztažený na navážku vzorku (čistotu). **Výsledek uveďte v gramech na čtyři desetinná místa resp. v procentech na dvě desetinná místa.**

### **Standardizace odměrného roztoku 0,1M HCl na navážku základní látky**

Na analytických vahách odvažte tolik hydrogenuhličitany sodného, aby po rozpuštění byla spotřeba kyseliny asi 20 ml. Tři takové navážky spláchněte do tří titračních baněk. Do každé baňky po rozpuštění uhličitany přidejte 2 – 3 kapky methylooranže, dále 50 – 100 ml vody a titrujte odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové ze žlutého do oranžového zbarvení. Roztok v titrační baňce krátce povařte (unikne CO<sub>2</sub>) a dotitrujte do oranžového zbarvení.

### **Standardizace odměrného roztoku 0,1M NaOH na roztok kyseliny chlorovodíkové o známé koncentraci**

Do tří titračních baněk napipetujte tolik odměrného roztoku kyseliny o známé koncentraci, aby byla spotřeba standardizovaného roztoku asi 10 nebo 20 ml. Přidejte 2-3 kapky indikátoru, zředte na 50-100 ml a titrujte do změny barvy z červené do oranžové.

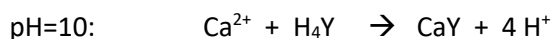
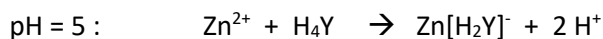
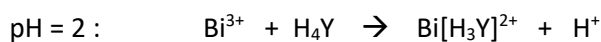
## LABORATORNÍ CVIČENÍ 3 – CHELATOMETRIE. STANOVENÍ DVOU KATIONTŮ VEDLE SEBE

### ÚVOD

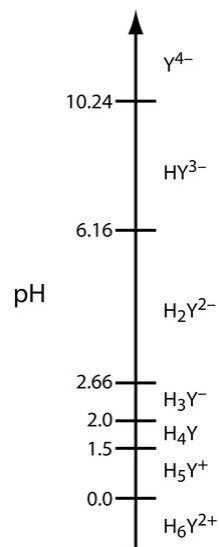
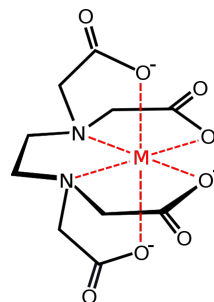
Tato volumetrická metoda je založena na rozdílné stabilitě chelátů stanovených kationů s Chelatonem III, což je dihydrát disodné soli EDTA zjednodušeně zapisovaný jako  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  ( $M=372,24 \text{ g/mol}$ ). Protože EDTA je vícesytnou karboxylovou (tj. slabou) kyselinou  $\text{H}_4\text{Y}$ , její stupeň disociace je silně ovlivněn pH prostředí ( $\text{pK}_{a1} = 2,0$ ;  $\text{pK}_{a2} = 2,7$ ;  $\text{pK}_{a3} = 6,2$ ;  $\text{pK}_{a4} = 10,3$ ).

Z toho je zřejmé, že stabilita chelátů roste se stupněm disociace kyseliny a tedy s rostoucím pH. Některé kovové ionty tvoří stabilní komplexy již v kyselém prostředí ( $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ), většina kationtů v prostředí neutrálním a některé kationty k tomu potřebují pH až silně alkalické ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Vždy se ale tvoří komplexy 1:1 (faktor titrace je vždy  $F_t = 1$ ).

Titrační stanovení více kovových iontů vedle sebe lze provést, pokud se konstanty stability jejich chelátů výrazně liší. Principem tohoto laboratorního cvičení je postupná titrace dvou iontů, z nichž první ( $\text{Bi}^{3+}$ ) tvoří stabilní komplexy s EDTA (a s indikátorem) již v kyselém prostředí ( $\text{pH} = 2$ ), zatímco druhý ( $\text{Zn}^{2+}$ ) až v prostředí slabě kyselém ( $\text{pH} = 5$ ). Pokud jsou konstanty stabilit podobné ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), je nutno použít selektivní indikátor(y) a titrovat nadvakrát.



*Komplex Chelatonu III s kovovým kationtem v alkalickém prostředí; vždy vznikají komplexy 1:1*



### Chelatometrické stanovení dvou kationtů vedle sebe

**Pomůcky:** 250ml odměrná baňka; byreta; pipeta 10/20 ml, 250ml titrační baňky; nálevka, lžička

**Chemikálie:** Chelaton III p.a.  $M(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 372,24 \text{ g/mol}$ , konc.  $\text{HNO}_3$ , urotropin (pevný pufr); indikátory: xylenolová oranž, Eriochromčern T, Fluorexon (směsi s pevným  $\text{KNO}_3$  v poměru 1:100)

## Pracovní postup

### Příprava 0,02M odměrného roztoku Chelatonu III ( $M=372,24 \text{ g/mol}$ )

Vypočítané množství Chelatonu III odvažte na analytických vahách, spláchněte do 250ml odměrné baňky a dokonale rozpusťte. Podle skutečné navážky vypočítáte přesnou koncentraci odměrného roztoku (na čtyři platné číslice)! Koncentrace tohoto roztoku se již nesmí měnit např. ředěním vodou.

### Stanovení kationtů $\text{Bi}^{3+}$ a $\text{Zn}^{2+}$ vedle sebe

Roztok vzorku převedte kvantitativně do 100 ml odměrné baňky – **pozor!** Při ředění vodou se může objevit bílý hydrolyzát  $\text{Bi}(\text{OH})_3$ , v tom případě zaplňte pouze širokou část baňky, přidejte několik kapek konc.  $\text{HNO}_3$  (pH asi 1–2), aby se hydrolyzát rozpustil, a pak teprve doplňte po značku a důkladně promíchejte. K titraci odpipetujte 20,00 ml do titrační baňky, přidejte MALÉ množství **xylenolové oranže** (prášek ve směsi s  $\text{KNO}_3$  1:100), až se roztok zabarví slabě červenofialově. Červenofialový roztok titrujte odměrným roztokem Chelatonu III do žluté barvy v bodě ekvivalence. Tato spotřeba odpovídá množství  $\text{Bi}^{3+}$ .

Ke ztitrovanému roztoku přidejte tuhý urotropin, aby se roztok opět zabarvil červenofialově (pH roztoku se upraví na 5). Znovu se titruje Chelatonem III do žlutého zbarvení; tato spotřeba odpovídá množství  $\text{Zn}^{2+}$ . Pozor! Velké množství volné XO může změnit barvu volné XO na jahodovou.

### Stanovení celkové tvrdosti vody ( $\text{Mg}^{2+}$ a $\text{Ca}^{2+}$ ) v mmol/l

50,00 ml vzorku vody odpipetujte do titrační baňky. Přidejte špetku indikátoru **Eriochromčerní T** a asi 5 ml amoniakálního pufru (pH=10). Vznikne vínově červený roztok. Titrujte do jasně modrého zbarvení. Spotřeba odpovídá součtu hořečnatých a vápenatých iontů. Sumu vyjádříme jako **mmol v 1 litru vody**. Voda s tvrdostí do 0,70 mmol/l se považuje za velmi měkkou, nad 3,75 mmol/l za velmi tvrdou.

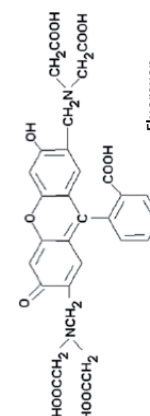
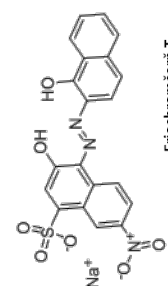
### Stanovení $\text{Ca}^{2+}$ ve vodě na fluorescenční indikátor

50,00 ml vzorku vody odpipetujte do titrační baňky, přidejte špetku indikátoru **Fluorexon** a asi 5 ml 2M KOH. Vznikne žlutý roztok se žlutozelenou fluorescencí (komplex  $\text{Ca}^{2+}$ —Fluorexon). Titrujte do růžového zbarvení, kdy se uvolní Fluorexon a zároveň vymizí fluorescence. Spotřeba odpovídá pouze množství  $\text{Ca}^{2+}$ , z rozdílu od předchozího stanovení lze vypočítat množství  $\text{Mg}^{2+}$  (v mg/l).

**Titrace provedte vždy nejméně 3x.**

**Výsledek uveďte v gramech  $\text{Bi}^{3+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  nebo jejich solí.**

**Celkovou tvrdost vody uvádějte v mmol/l, množství Ca a Mg v mg/l.**

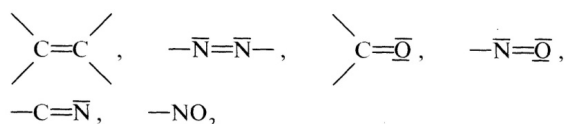
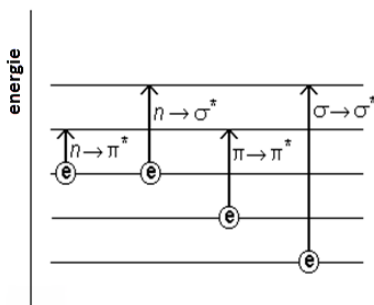


## LABORATORNÍ CVIČENÍ 4 – FOTOMETRIE. METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY

### ÚVOD

#### FOTOMETRIE

Molekuly vzorku absorbují z dopadajícího záření fotony vhodné vlnové délky  $\lambda$  (tj. ty, které odpovídají rozdílu jejich energetických hladin). V UV-Vis oblasti (190 – 850 nm) mají fotony energii dostatečnou k tomu, aby jejich absorpce způsobila přechod vnějších elektronů (200–600 kJ/mol). Skupiny, v kterých se realizuje takový elektronový přechod, se nazývají *chromofory*. U koordinačně kovalentních sloučenin (vazba donor-akceptor) se jedná o energetické přechody v *d* a *f* orbitalech.



*Některé běžné chromofory*

Spektrofotometrie je metoda, která umožňuje stanovit velikost absorpce záření v určitém prostředí – v našem případě kapalině. Výsledkem spektrofotometrického měření může být např. závislost velikosti absorpce záření na vlnové délce světla. Velikost absorpce se hodnotí pomocí veličiny **absorbance**. Absorbance (*A*) je dekadický logaritmus poměru intenzity záření, které na vzorek dopadá ( $I_0$ ) a intenzity záření, které vzorkem prochází ( $I$ ).

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Absorbance *A* se zjišťuje pomocí spektrofotometru. Protože před měřením vždy k analytu přidáváme rozpouštědla a činidla, pozorovaná absorbance je součtem absorpací všech složek. Abychom získali absorbanci pouze analytu, je nutno absorpenci tzv. blanku (slepý vzorek) odečítat. U jednopaprskových přístrojů se to realizuje změřením spektra blanku coby prvního roztoku.

Absorbance závisí přímo úměrně na obsahu (koncentraci) absorbující látky ve vzorku (*c*) a na délce optické dráhy (*d*),  $\epsilon$  je absorpční koeficient.

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c$$

Podle těchto rovnic se fotometrie užívá jako metoda kvantitativní chemické analýzy, tzn. ke stanovení koncentrace  $c$ . Absorpční koeficient je pro určité absorbující prostředí charakteristický a bývá tabelován. Častěji však, stejně jako v našem případě, se určuje pro konkrétní experimentální podmínky z kalibračních roztoků, tedy roztoků o známé  $c$ , připravených za konkrétních experimentálních podmínek.

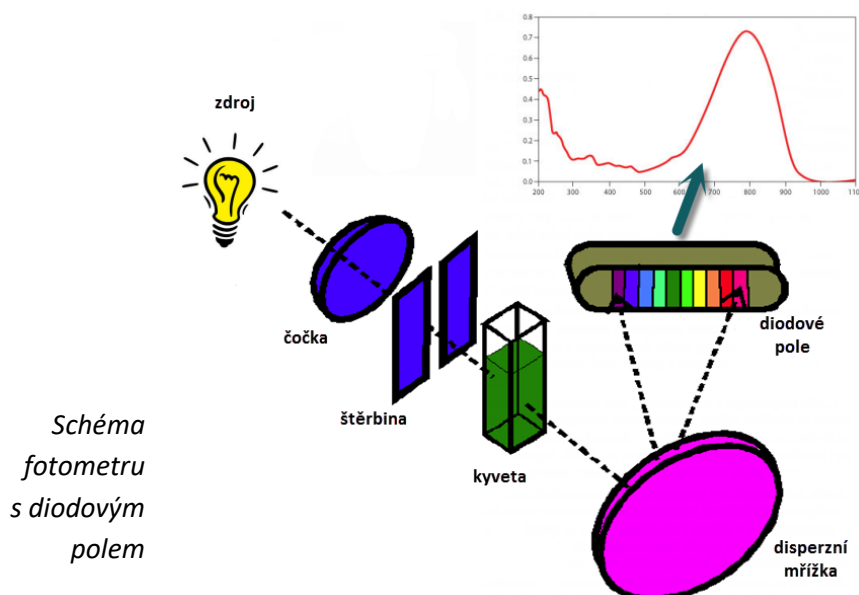
### Specifická absorbance (ČL 2009)

Český lékopis používá namísto molárního absorpčního koeficientu z praktických důvodů (u látek, jejichž molekulová hmotnost nelze určit) i veličinu zvanou „specifická absorbance“, která udává absorbanci 1% roztoku v 1cm kyvetě při dané vlnové délce. Přepočet mezi touto veličinou je možný podle vzorce:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{10 * \epsilon}{M_r}$$

### *Spektrofotometr s diodovým polem (DAD)*

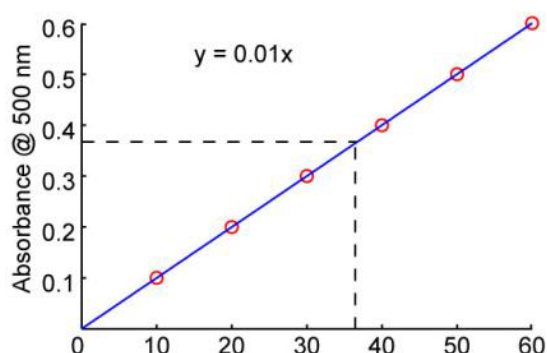
U fotometru s diodovým polem, který se používá ve cvičení, je kyveta ozařována polychromatickým zářením. Toto záření pak dopadá na mřížku, které jej rozkládá, a v přesných pozicích dispergovaných vlnových délek jsou umístěny fotodiody. V jednom okamžiku tedy prakticky získáváme informaci o celém absorpčním spektru.



### Metoda kalibrační křivky

Tímto běžným způsobem se zjišťuje odezva detektoru (analytický signál), kterou v systému vyvolá určitá koncentrace (množství) analytu. V ideálním případě je tato závislost lineární a zjišťuje se měření tzv. kalibračních standardů čili vzorků s přesně známým množstvím analytu. Znalost této závislosti umožňuje nakonec zjistit (vypočítat) ze signálu neznámého vzorku množství analytu.

Potřebné roztoky o různých koncentracích (minimálně 4 – 5) se připravují z jednoho zásobního roztoku ředěním (přesnou pipetou) do odměrných baněk. Koncentrace (množství) v kalibračních roztocích se volí podle očekávané hodnoty

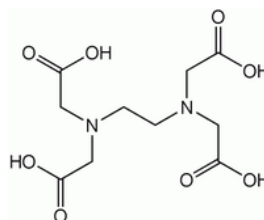


Nejlépeším odhadem lineární kalibrační závislosti je přímka, kterou lze nalézt graficky (milimetrový papír nebo matematicky lineární regresi  $y = a \cdot x$  nebo  $y = a \cdot x + b$  v tabulkovém procesoru, např. Gnumeric, MS Excel).

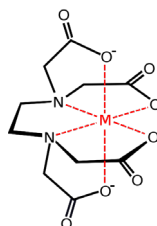
## 4A. STANOVENÍ $\text{Cu}^{2+}$ CHELATONEM III

### OPTIMALIZACE PODMÍNEK STANOVENÍ

Komplexace kovových iontů je pro kvantitativní analýzu významná především u kyseliny ethylen-diamin-tetraoctové (EDTA). Protože se jedná o čtyřsytnou karboxylovou (tj. slabou) kyselinu  $\text{H}_4\text{Y}$ , její stupeň disociace je silně ovlivněn pH prostředí.

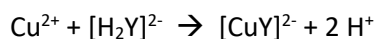


U chelátů [kationt kovu – EDTA] je typické koordinační číslo 6 (viz obrázek), čili kationt kovu interaguje s činidlem na šesti místech: se dvěma volnými elektronovými páry na dusících a se čtyřmi kyslíky karboxylových skupin. Je tedy zřejmé, že stabilita komplexu roste se stupněm disociace





kyseliny a tedy s rostoucím pH. Některé kovové ionty tvoří stabilní komplexy již v kyselém prostředí ( $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ), většina kationtů v prostředí neutrálním a některé kationty k tomu potřebují pH až silně alkalické ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Vždy se ale tvoří komplexy 1:1, např.



V našem případě komplex  $[\text{CuY}]^{2-}$  absorbuje ve viditelné oblasti spektra (je tmavě modrý), a proto lze s výhodou měřit jeho absorbanci v oblasti kolem 710 nm, kde už prakticky neabsorbují ani ostatní složky roztoku (především činidla), ani samotný  $\text{Cu}^{2+}$ , protože je kvantitativně vázán. Absorpční maximum komplexu  $[\text{CuY}]^{2-}$  zjistíme z naměřených spekter (graficky).

Zjištění vhodného pH a koncentrace činidel (Chelaton III i pufr v nadbytku) je nezbytné pro **kvantitativní vytvoření komplexu** – v opačném případě bychom nemohli usuzovat z absorbance komplexu na koncentraci analytu ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

#### FOTOMETRICKÉ STANOVENÍ $\text{Cu}^{2+}$ CHELATONEM III POMOCÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

**Chemikálie:** 0,05M  $\text{CuSO}_4$ , Chelaton III, pufr

Kroky pracovního postupu:

- změření absorpčního spektra komplexu ve viditelné oblasti spektra – výběr  $\lambda(\text{max})$
- změření závislosti absorbance na pH – výběr pH (graficky)
- změření závislosti absorbance na koncentraci Chelatonu III – výběr koncentrace Chelatonu III (graficky)
- změření kalibrační závislosti A vs. c(Cu) za optimálních podmínek
- stanovení  $\text{Cu}^{2+}$  v neznámém vzorku (lineární regrese)

Vyhodnocení:

koncentraci roztoku vzorku mědi stanovte odečtením z kalibrační závislosti (pomocí rovnice lineární regrese)

*pozn.:*

měřte absorbanci vždy proti slepému vzorku!

grafy vynášejte PRŮBĚŽNĚ na milimetrový papír nebo zobrazujte v MS Excelu

**výsledek uveďte jako hmotnost (mg) Cu ve 100 ml vzorku**

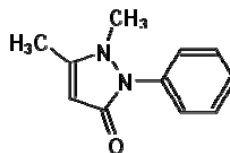
## Pracovní postup

1. Závislost  $A = f(\lambda)$ : do 50ml odměrné baňky odpipetujte 5,00 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$ , 10,00 ml roztoku Chelatonu III, baňku doplňte po rysku puřrem pH 6,0 a promíchejte. Porovnávací roztok (blank) připravte stejným způsobem, pouze místo 5,0 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$  použijte 5,00 ml vody. Změřte absorpenci připraveného roztoku v oblasti 400 – 900 nm (absorpční spektrum). Vlnová délka  $\lambda(\text{max})$ , při které se nachází vrchol křivky (kolem 700 nm), udává absorpční maximum vytvořeného chelátu.
2. Závislost  $A = f(\text{pH})$ : do pěti 50ml odměrných baněk odpipetujte po 5,00 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$  a 10,00 ml roztoku Chelatonu III. Odměrné baňky doplňte po rysku jednotlivými připravenými puřry a promíchejte. Ke každému vzorku připravte odpovídajícím způsobem i porovnávací roztok (blank). Změřte absorpenci všech pěti roztoků proti příslušným slepým vzorkům (blankům) při vlnové délce  $\lambda_{\text{max}}$ . Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.
3. Závislost  $A = f(\text{koncentrace Chelatonu III})$ : do pěti 50ml odměrných baněk napipetujte po 5,00 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$ . Do první baňky přidejte pomocí byřety 2,00 ml roztoku Chelatonu III, do druhé 2,50 ml, do třetí 5,00 ml, do čtvřté 8,00 ml a do páté 10,00 ml. Odměrné baňky doplňte po rysku puřrem zvoleným podle výsledku předcházejícího měřením a promíchejte. Ke každému vzorku připravte odpovídajícím způsobem porovnávací roztok (blank). Změřte absorpenci všech pěti roztoků proti příslušným slepým vzorkům při vlnové délce  $\lambda_{\text{max}}$ . Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.
4. Závislost  $A = f(\text{koncentrace Cu})$  - kalibrační závislost: do pěti 50ml odměrných baněk odměřte byřetou 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 a 5,00 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$  a přidejte dvojnásobek potřebného množství Chelatonu III zjištěného v předchozím měřením. Odměrné baňky doplňte po rysku puřrem (z bodu 2) a promíchejte. Porovnávací roztok připravte stejným způsobem, pouze místo 5,00 ml základního roztoku  $\text{CuSO}_4$  použijte 5,00 ml vody. Změřte absorpenci všech pěti roztoků proti slepému roztoku při vlnové délce  $\lambda(\text{max})$ . Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.
5. Stanovení obsahu  $\text{Cu}^{2+}$  v neznámém vzorku: odpipetujte 5,00 ml z roztoku vzorku do 50ml odměrné baňky, přidejte dvojnásobek potřebného množství Chelatonu III, doplňte po rysku puřrem a promíchejte. Změřte absorpenci připraveného roztoku proti slepému roztoku při vlnové délce  $\lambda(\text{max})$ .

#### 4B. STANOVENÍ FENAZONU V ANTIPYRINU ŽELEZITÝMI IONTY

##### FENAZON

Fenazon byl syntetizován L. Knorrem r. 1883 jako antipyretikum a prodáván pod názvem Antipyrin (proto se často tyto názvy zaměňují). Tato syntéza byla historicky velmi významná, protože potvrdila možnost syntetické přípravy zjednodušeného analoga chininu s antipyretickým účinkem.



Fenazon (1,5-dimethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-pyrazol-3-on,  $M=188,23$  g/mol) tvoří se železitými ionty v kyselém prostředí oranžově červený komplex, který poskytuje charakteristické absorpční spektrum s maximem okolo 460 nm a který lze využít pro identifikaci i stanovení fenazonu.

Fotometrické stanovení analytů v barevném komplexu je typickou aplikací fotometrie. Pro stanovení kovových kationtů je často barevná změna způsobena vytvořením donor-akceptorové vazby. Ovšem běžná je situace, kdy kationt kovu je analyt a vybíráme činidlo, které bude ligandem. V našem případě je situace obrácená: stanovujeme ligand a kovový kationt je činidlem.

##### FOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FENAZONU V ANTIPYRINU ŽELEZITÝMI IONTY POMOCÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Chemikálie: čištěná voda, okyselený základní roztok  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ( $c = 0,0125$  M).

Kroky pracovního postupu:

- změření absorpčního spektra komplexu ve viditelné oblasti spektra – výběr  $\lambda_{\text{max}}$
- optimalizace koncentrace činidla
- zjištění kalibrační závislosti  $A$  vs.  $c(\text{fenazon})$  (lineární regrese)
- stanovení fenazonu v neznámém vzorku Antipyrinu z kalibrační křivky.

Příprava vzorku:

roztok kvantitativně převedeme do 25ml odměrné baňky, přidáme optimalizované množství činidla a doplníme po rysku.

## OPTIMALIZACE PODMÍNEK STANOVENÍ

Protože ligand fenazon nevykazuje ve vodném prostředí významné acidobazické vlastnosti, vznik komplexu není ovlivněn pH přímo. Pouze je nutno vyhnout se alkalickému pH, aby  $\text{Fe}^{3+}$  nehydrolyzoval, protože pak by nebyl zajištěn přebytek činidla pro komplexaci. Je pouze nutné nalézt takovou koncentraci (množství) činidla, aby byl zajištěn jeho přebytek.

Roztok činidla: 0.05 M  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  odbarvený  $\text{HNO}_3$

Vyhodnocení: Koncentraci neznámého roztoku vzorku fenazonu stanovte odečtením z lineární kalibrační závislosti.

**Výsledek uveďte jako hmotnost (mg) fenazonu ve vzorku**

### *Pracovní postup*

Příprava zásobního roztoku: do 50ml odměrné baňky navažte na analytických vahách přibližně **0,1 g** fenazonu a rozpustěte asi ve 30 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění doplňte vodou po rysku a promíchejte.

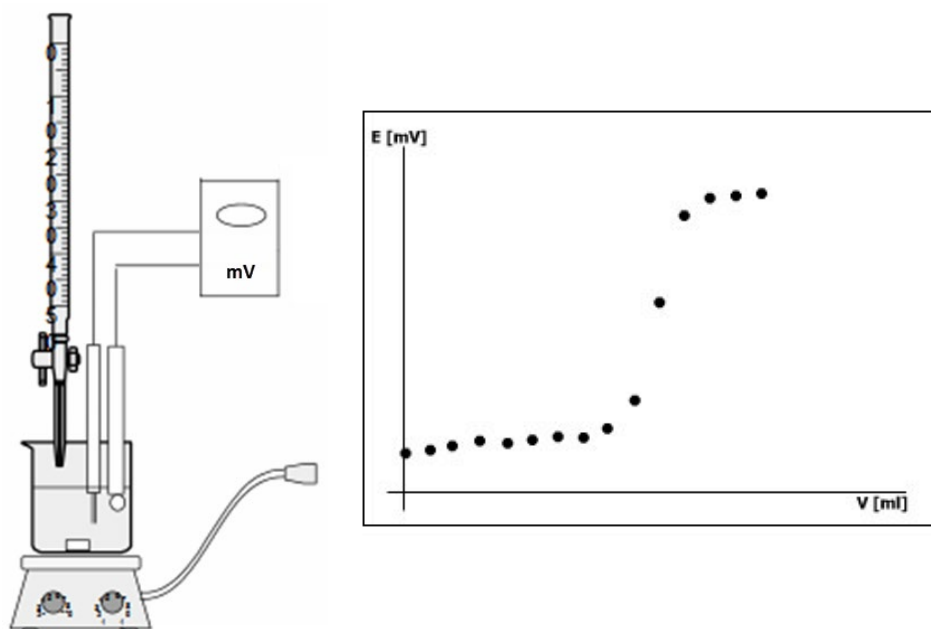
- **Výběr vlnové délky**  
do 25ml odměrné baňky odpipetujte 1,00 ml zásobního roztoku fenazonu a 5,00 ml roztoku  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  a doplňte po rysku. Změřte absorpční spektrum vytvořeného komplexu a vyberte vhodnou vlnovou délku.
- **Optimalizace koncentrace činidla**  
přesně odpipetujte do pěti 25ml odměrných baněk 1,00 ml zásobního roztoku fenazonu a pak postupně 5,00; 7,00; 10,00; 12,00 a 15,00 ml roztoku  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ . Doplňte po rysku vodou. Ze získané grafické závislosti odečtěte optimální objem činidla pro následnou konstrukci kalibrační křivky.
- **Kalibrační závislost**  
Z připraveného základního roztoku fenazonu přesně odpipetujte postupně do pěti 25ml odměrných baněk 0,20; 0,30; 0,50; 0,70 a 1,00 ml. Přidejte nalezený optimální objem roztoku  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , doplňte vodou po rysku a promíchejte. Porovnávací roztok připravte doplněním roztoku  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ve 25ml odměrné baňce vodou. Změřte absorbanci všech pěti roztoků proti slepému roztoku při vybrané vlnové délce. Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.

## LABORATORNÍ CVIČENÍ 5 – POTENCIOMETRICKÁ TITRACE

### ÚVOD

Potenciometrická titrace (někdy označovaná jako potenciometrie) není zvláštní analytickou metodou – pouze modifikuje klasické volumetrické metody, kdy měření elektrochemického potenciálu v průběhu titrace **slouží k objektivnímu stanovení bodu ekvivalence**. Při titraci se sleduje závislost elektrochemického potenciálu v závislosti na přidaném množství titračního činidla, konstruujeme titrační křivku a bod ekvivalence pak nacházíme v inflexním bodu křivky. Typicky potenciometrii používáme k určení bodu ekvivalence u acidobazických, srážecích nebo oxidačně redukčních reakcí.

K měření elektrochemického potenciálu je zapotřebí dvou elektrod, elektrody měrné (např. stříbrné, skleněné) a srovnávací (referentní, např. argentchloridové, kalomelové). Potenciál měrné elektrody musí záviset na koncentraci sledovaného iontu při titraci a naopak potenciál referentní elektrody se během titrace nesmí měnit; jako referentní elektrody se nejčastěji využívají nasycená kalomelová elektroda nebo argentchloridová elektroda. K měření potenciálu mezi těmito elektrodami se používá potenciometr, což je v podstatě voltmetr s vysokou hodnotou vnitřního odporu. Typické uspořádání při acidobazických titracích obsahuje skleněnou elektrodu (citlivou na pH) a nasycenou kalomelovou elektrodu. Tento systém dvou elektrod bývá spojen do tzv. kombinované pH elektrody.



*Typická sestava pro potenciometrickou titraci a titrační křivka s potenciálovým skokem*

### **Obecný postup při potenciometrické titraci:**

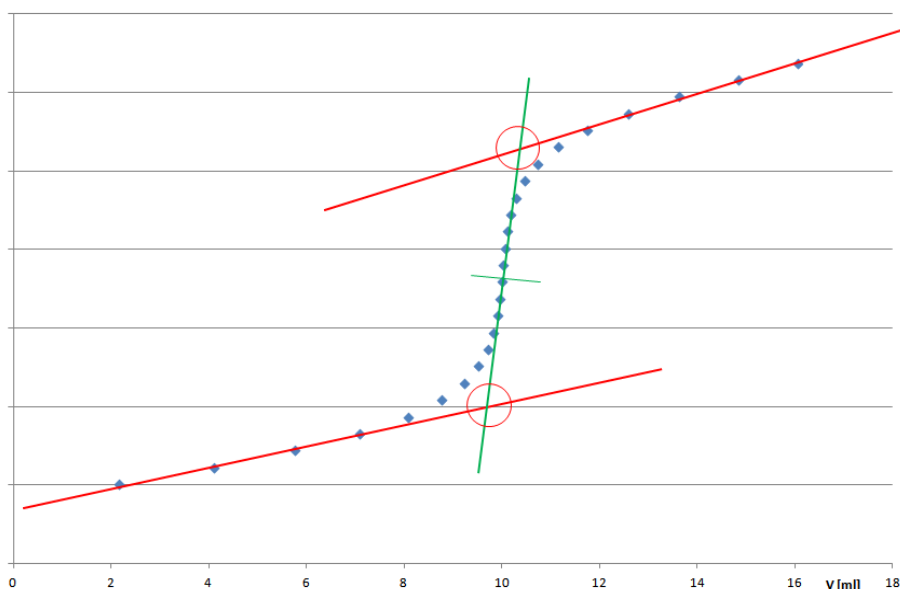
- Do kádinky odměřte část roztoku vzorku (aliquot).
- Do kádinky vložte čisté (omyté a osušené) míchadlo, kádinku umístěte na elektromagnetickou míchačku.
- Elektrody připojené k přístroji, opláchnuté čistou vodou a osušené ponořte do roztoku a zapněte/nastavte míchání. Pozor, u kombinované elektrody musí být ponořena i diafragma!
- Odměrný roztok z byrety přidávejte po určitých stejných objemech (při první orientační titraci po 0,5 ml; při vlastní titraci (2 – 3 x) v okolí ekvivalenčního bodu po 0,2 ml). Po každém přidavku odměrného roztoku vyčkejte do ustálení měřených hodnot a výslednou hodnotu (mV) s příslušným objemem zapisujte do tabulky.

<b>spotřeba (ml)</b>	<b>potenciál (mV)</b>
0,00	
0,50	
2,00	
2,50	
...	
10,50	
10,70	<i>Oblast bodu ekvivalence</i>
10,90	
11,10	
...	

Po skončení titrace vypněte míchání, vyjměte elektrody a opláchněte. Ze získaných hodnot sestrojte titrační křivku a určete bod(y) ekvivalence.

## VYHODNOCENÍ BODU EKUIVALENCY (BE)

### Graficky



### Numericky podle Hahna

(diferenční metoda, **konstantní** přidavek titračního činidla  $\Delta V$ )

označíme  $\Delta E_{max}$ , aby platilo:

$$|\Delta E_{max}| > |\Delta E_1| > |\Delta E_2|$$

$V_{AgNO_3}$ [cm <sup>3</sup> ]	$E_{Ag}$ [mV]	$\Delta E$ [mV]	
0.6	173.5		
0.7	186.5	13	
0.8	200	13.5	
0.9	260	60	$\Delta E_1$
1.0	355	95	$\Delta E_{max}$
1.1	376	21	$\Delta E_2$
1.2	385	9	
1.3	392		

$$a = \Delta V \cdot \frac{\Delta E_2}{2 \cdot \Delta E_1}$$

$\Delta V$  - volume of titrant portion

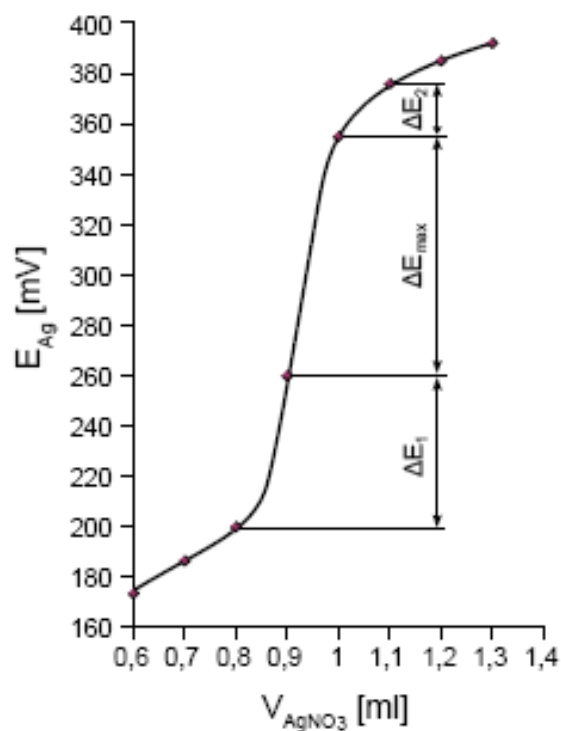
$V$  = spotřeba mezi  $\Delta E_1$  a  $\Delta E_{max}$

$BE = V + a$ ; když  $\Delta E_1$  předchází  $\Delta E_{max}$

$BE = V - a$ ; když  $\Delta E_1$  následuje po  $\Delta E_{max}$

Příklad z tabulky 2:  $\Delta E_1$  je na titr. křivce před  $\Delta E_{max}$

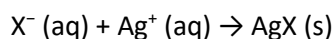
$BE = 0,9 + 0,0175 = 0,9175$  ml



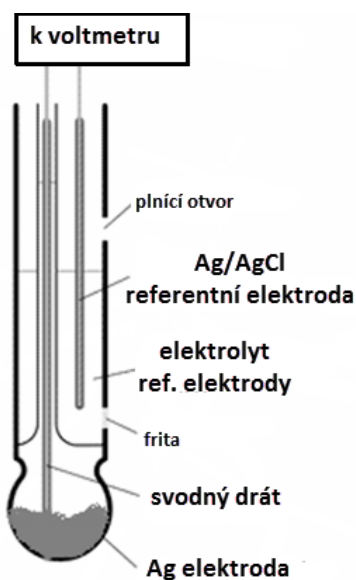
## 5A. ARGENTOMETRICKÉ STANOVENÍ HALOGENIDŮ VE SMĚSI S POTENCIOMETRICKOU INDIKACÍ BODU EKVIVALENCE

### ÚVOD

Halogenidy ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) se stanovují argentometrickou srážecí titrací, body ekvivalence se indikují potenciometricky stříbrnou elektrodou.



Titrace je založena na postupném sražení halogenidů stříbrných v důsledku jejich rozdílné rozpustnosti ( $\text{pKs}(\text{AgCl}) = 9,75$ ;  $\text{pKs}(\text{AgBr}) = 12,31$ ;  $\text{pKs}(\text{AgI}) = 16,08$ ). Registrujeme titrační křivku, na které budou tři potenciálové skoky. Nejdříve se kvantitativně sráží nejméně rozpustný AgI, potom AgBr, nakonec AgCl. Objem spotřebovaného odměrného roztoku v inflexním bodě prvního skoku odpovídá množství  $\text{I}^-$ , rozdíl mezi prvním a druhým skokem odpovídá množství  $\text{Br}^-$  a rozdíl mezi druhým a třetím skokem odpovídá množství  $\text{Cl}^-$ . V roztoku měříme potenciál iontově selektivní elektrody stříbrné, neboť koncentrace iontů  $\text{Ag}^+$  je díky součinům rozpustnosti závislá na koncentraci halogenidů:  $K_s = [\text{Ag}^+][\text{X}^-]$ .



*Kombinovaná Ag-elektroda*



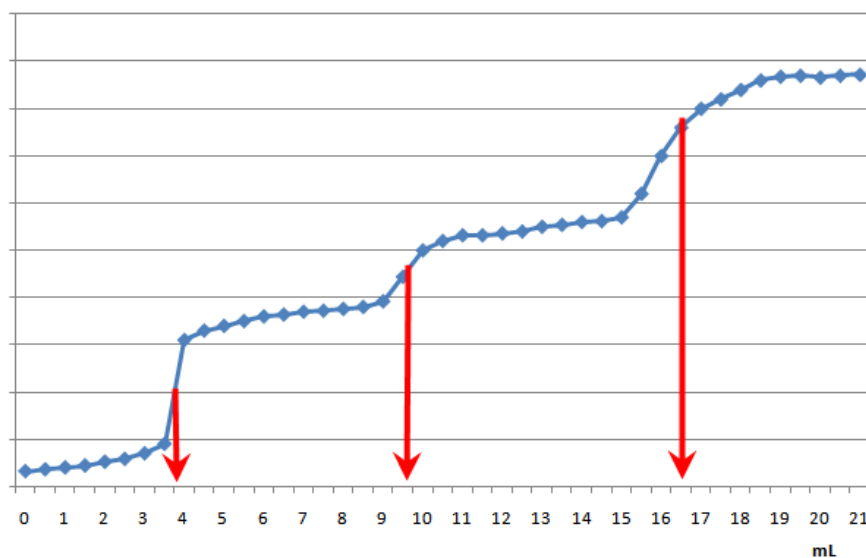
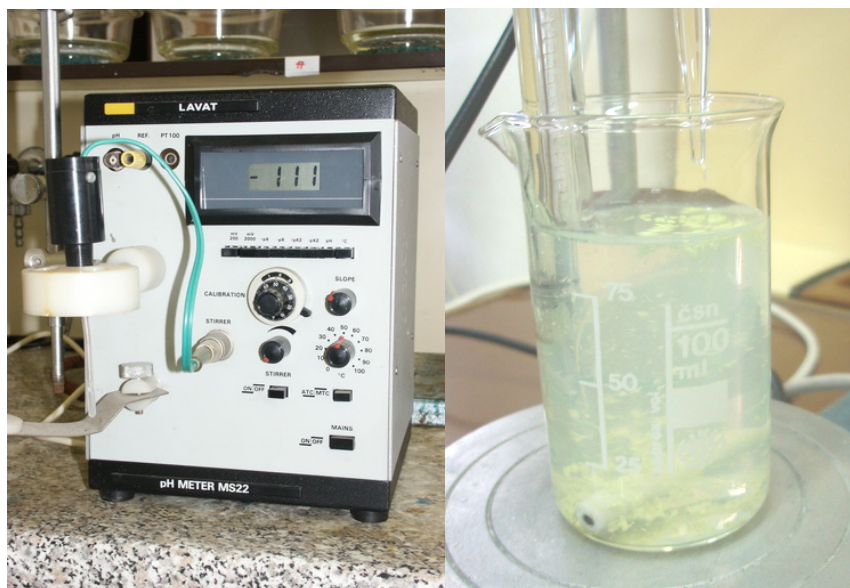
## POTENCIOMETRICKÁ TITRACE

### PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Potenciometrická titrace je prováděna pomocí přístroje pH metr MS22 (Laboratorní přístroje Praha)

**Pomůcky:** kádinky, 100ml odměrná baňka, pipety, byreta, titrační baňky

**Chemikálie:** 5% dusičnan barnatý, 0,05M odměrný roztok dusičnanu stříbrného, pevný NaCl, roztok chromanu draselného



*Potenciometr, titrační nádobka a titrační křivka. Šipky ukazují 3 body ekvivalence odpovídající obsahu 3 halogenidů.*

### **Obsluha přístroje:**

Zkontrolujte, zda jsou elektrody zapojeny do přístroje, přístroj je zapojen do elektrické sítě a jistič na zásuvce v poloze zapnuto. Stlačením tlačítka „ON“ zapněte přístroj. Zkontrolujte, zda červená kontrolka svítí u měření mV, příp. stlačte příslušné tlačítko. Proveďte vlastní titraci (na displeji odečítejte hodnotu napětí). Po skončení měření elektrody omyjte.

### **Pracovní postup**

- Vzorek kvantitativně převedte do 100ml odměrné baňky a doplňte po značku vodou
- Odpipetujte 20,00 ml do 250ml kádinky a přidejte 80 ml vody
- Odměrným válcem přidejte 5 ml 5% roztoku  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ . Dusičnan barnatý se přidává kvůli zvýšení iontové síly roztoku, aby sraženina vznikala rychleji
- Do roztoku vložte elektromagnetické míchadlo a zapněte míchačku
- Ponořte do roztoku kombinovanou elektrodu
- Zapněte míchání a přístroj na měření
- Do tabulky si запиšte počáteční hodnotu napětí (mV)
- Titrujte odměrným roztokem dusičnanu stříbrného o přesně známé koncentraci  $c(\text{AgNO}_3)$
- Po každém přidavku zaznamenejte do tabulky příslušnou spotřebu odměrného roztoku (na 2 desetinná místa) a napětí (mV) roztoku
- Titraci zopakujte 3 x
- Vyhodnocení: ze získaných hodnot sestrojte titrační křivku a určete body ekvivalence graficky nebo numericky (matematickým způsobem dle Hahna) – viz str. 21
- Přesnou koncentraci odměrného roztoku určete titrací podle Mohra
- Pomocí přesné koncentrace titračního činidla vyjádřete výsledek jako **hmotnost (g)  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  a  $\text{I}^-$  ve vzorku**

### **Standardizace 0,05M odměrného roztoku $\text{AgNO}_3$ na chlorid sodný podle Mohra**

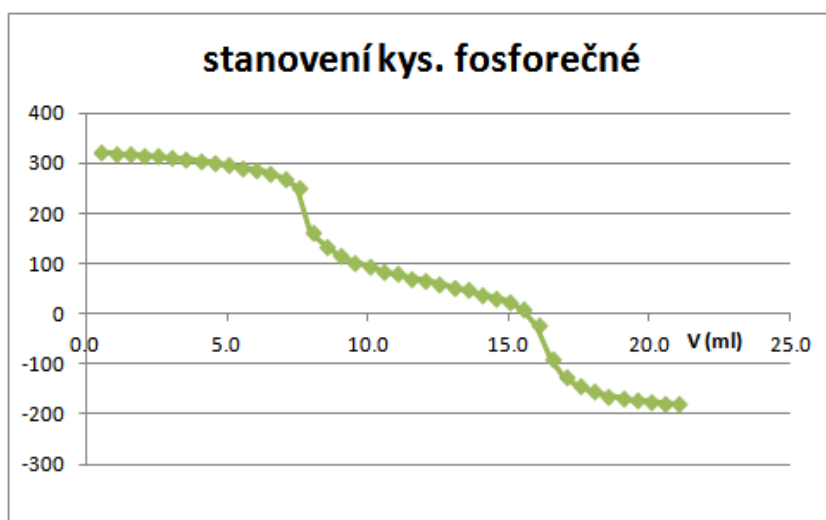
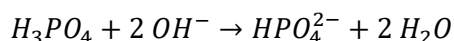
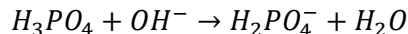
Na analytických vahách odvažte tolik pevného NaCl, aby po rozpuštění a doplnění na 100,0 ml byla látková koncentrace NaCl obdobná jako koncentrace odměrného roztoku  $\text{AgNO}_3$ . Odvážené množství rozpustíte v kádince. Kvantitativně spláchněte do 100ml odměrné baňky, doplňte po rysku. Po promíchání odpipetujte 10,00 / 20,00 ml do titrační baňky, přidejte 1 ml 5% roztoku chromanu draselného. Titrujte odměrným roztokem dusičnanu stříbrného do trvalého, ale slabého červenohnědého zbarvení chromanu stříbrného. Standardizaci opakujte nejméně 3 x.

## 5B. ALKALIMETRICKÉ STANOVENÍ KYSELINY FOSFOREČNÉ S POTENCIOMETRICKOU INDIKACÍ BODU EKVIVALENCE

### ÚVOD

Kyselina fosforečná je silná trojsytná kyselina, proto ji lze stanovit alkalimetry. K indikaci bodu ekvivalence by se dala použít vizuální indikace (acidobazický indikátor, např. methyloranž, fenolftalein atd.). V tomto cvičení však využijeme přesnější způsob odečtení spotřeby v ekvivalenčním bodě z titrační křivky získané zaznamenáváním potenciálu skleněné elektrody, která je citlivá na pH roztoku.

Hodnoty  $pK_a$  jednotlivých stupňů jsou dostatečně rozdílné ( $pK_{a1} = 2,0$ ;  $pK_{a2} = 6,7$ ;  $pK_{a3} = 12,7$ ); proto bychom čekali na titrační křivce tři oddělené skoky (tři disociační stupně kyseliny). Protože však jako odměrný roztok bude sloužit vodný roztok hydroxidu sodného o přibližné koncentraci 0,1M, titrace do třetího stupně nebude proveditelná (nelze dosáhnout dostatečně vysoké pH, abychom kvantitativně vytvořili  $PO_4^{3-}$ ). Na titrační křivce tedy budou pouze dva potenciálové skoky, které odpovídají neutralizaci do prvního a druhého stupně. Z obou bodů ekvivalence lze vypočítat analytickou koncentraci kyseliny:



Potenciometrická titrační křivka stanovení kyseliny fosforečné. Skoky označují body ekvivalence pro první resp. druhý disociační stupeň.

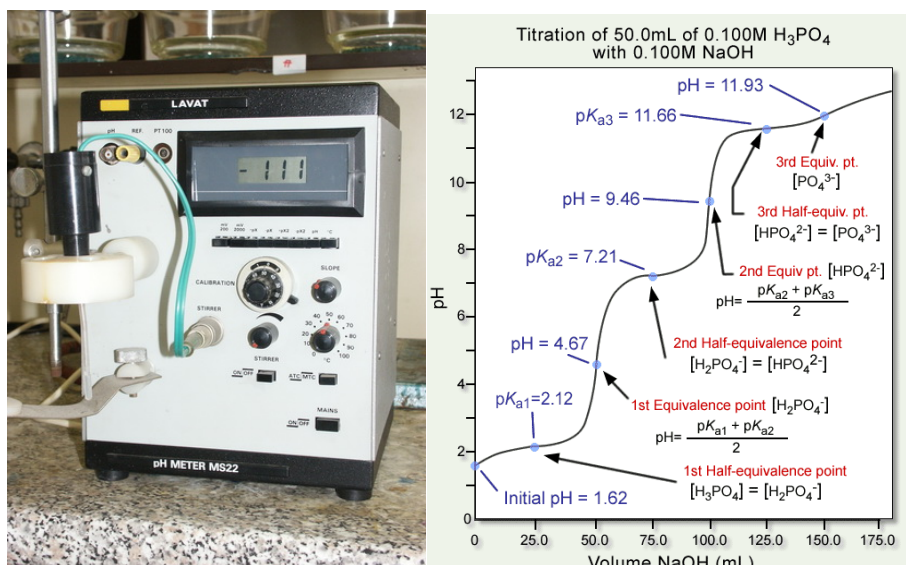
## POTENCIOMETRICKÁ TITRACE

### PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Potenciometrická titrace je prováděna pomocí přístroje pH-metr MS22 (Laboratorní přístroje Praha)

**Chemikálie:** 0,1M odměrný roztok hydroxidu sodného, kyselina šťavelová, methylořanž, roztok CaCl<sub>2</sub>

**Pomůcky:** Kádinky, 100ml odměrná baňka, pipety, byreta, titrační baňky



Potenciometr MS22 a pH titrační křivka kyseliny fosforečné

### Obsluha přístroje:

Zkontrolujte, zda jsou elektrody zapojeny do přístroje a přístroj je zapojen do elektrické sítě (jistič na zásuvce v poloze zapnuto).

### Pracovní postup

- Vzorek kvantitativně převedte do 100ml odměrné baňky a dolijte po rysku vodou.
- Odpipetujte 20,00 ml naředěného vzorku do 150ml kádinky a přidejte asi 80 ml destilované vody.
- Zapněte přístroj, zkontrolujte, zda červená kontrolka svítí u měření mV, příp. stlačte příslušné tlačítko.

- Do roztoku vložte elektromagnetické míchadlo, kádinku postavte na elektromagnetickou míchačku.
- Ponořte do roztoku kombinovanou skleněnou elektrodu a zapněte míchání.
- Do tabulky si запиšte počáteční hodnotu napětí (mV). Titrujte 0,1M odměrným roztokem hydroxidu sodného o přesně známé koncentraci.
- Provedte vlastní titraci – byretou přidávejte odměrný roztok a po každém přidavku zaznamenejte do tabulky příslušnou spotřebu (2 desetinná místa) a hodnotu napětí (mV) roztoku.
- Po skončení měření vypněte přístroj stlačením tlačítka „OFF“. Elektrody omyjte.
- Postup opakujte 3 x.
- Vyhodnocení: ze získaných hodnot sestrojte titrační křivku a určete body ekvivalence graficky nebo numericky (matematickým způsobem dle Hahna) – viz str. 21.
- Přesnou koncentraci odměrného roztoku určete standardizací na kyselinu šťavelovou
- Pomocí přesné koncentrace odměrného roztoku výsledek vyjádřete jako **hmotnost (g) kyseliny fosforečné ve vzorku**.

#### ***Standardizace 0,1M odměrného roztoku hydroxidu sodného na kyselinu šťavelovou***

Na analytických vahách odvažte tolik kyseliny šťavelové, aby po rozpuštění a doplnění na 100,0 ml byla látková koncentrace  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  poloviční než koncentrace odměrného roztoku NaOH. Odvážené množství rozpustíte v kádince ve vodě (za zvýšené teploty). Kvantitativně přelijte do odměrné baňky na 100,0 ml a doplňte po rysku; po promíchání odpipetujte 3 x 20,0 ml do tří titračních baněk a přidejte 2 kapky methylované. Titrujte odměrným roztokem hydroxidu sodného z červeného do oranžového (cibulového) zbarvení. Potom přidejte asi 10 ml 20% roztoku chloridu vápenatého (vysráží se bílá sraženina). Roztok se opět zbarví červeně. Ten pak dotitrujte hydroxidem do oranžového zbarvení a odečtěte spotřebu. Standardizaci opakujte nejméně 3 x.

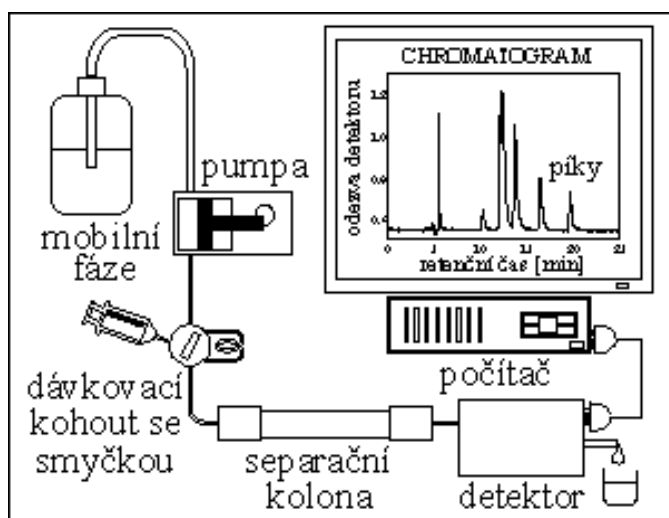
## LABORATORNÍ CVIČENÍ 6 – VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

### ÚVOD - VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

HPLC je **separační** metoda založená na dynamickém (= v toku) rozdělování analytu mezi dvě (nesmíselné) fáze – **fázi mobilní** (obvykle směs rozpouštědel) a **fázi stacionární** (zakotvená kapalina na nosiči nebo tuhá fáze, sorbent).

Analyt, který v tomto systému vykazuje větší afinitu ke stacionární fázi, je v koloně více zadržován, a proto přichází na detektor později než analyt jiný, který má ke stacionární fázi afinitu menší a je z kolony rychleji unášen mobilní fází – takto dochází k jejich oddělení, separaci. Příčinou chemické afinity jsou 4 typy interakcí: elektrostatické, dipólové, van der Waalsovy a vodíkových vazeb.

Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá **kapalinový chromatograf**. Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor.



*Schématický náčrt kapalinového chromatografu*

*([web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html))*

#### Reverzní stacionární fáze

Stacionární fáze je obvykle tvořena nosičem (částicemi **silikagelu 3** – 10  $\mu\text{m}$ ), na který je chemicky navázána vlastní stacionární fáze. Reverzní stacionární fáze může být tvořena například vrstvou **nepolárních uhlovodíků** (C8 = silyl+oktyl, **C18** = silyl+oktadecyl), nebo polárnějších uhlovodíků s vhodnou funkční skupinou (např. -CN).

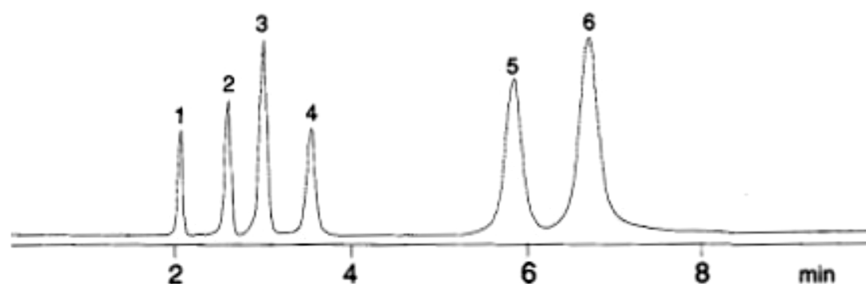
## Mobilní fáze

Mobilní fázi v RP HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (separaci).

Klíčovým pojmem pro výběr vhodných podmínek separace (tzn. směsi analytů) je proto **eluční síla** mobilní fáze. Tato síla je vždy vztažena na konkrétní systém (konkrétní stacionární fázi) a ukazuje schopnost eluovat analyt ze stacionární fáze („soupeřit“ se stacionární fází o analyt) v procesu kontinuálního transportu mobilní fáze kolonou. Dobrým odhadem eluční síly je (v našem případě neionizovaných analytů tzn., když můžeme zanedbat iontové interakce) polárnost - jak analytu, tak obou fází. Podle distribuce parciálních nábojů (z posouzení elektronegativity a polohy přítomných atomů) dané molekuly můžeme pak usuzovat na jejich vzájemnou afinitu: polární analyt bude mít vysokou afinitu k polární fázi a nepolární analyt k fázi nepolární.

## CHROMATOGRAM

**Chromatogram** je časový záznam odezvy detektoru chromatografu; typicky je tvořen píky, které mají různou plochu a výšku. V ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.



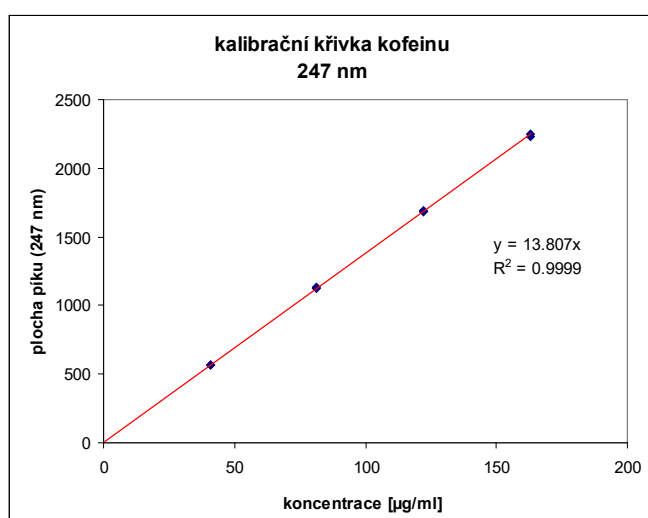
*Ukázka chromatogramu. Každý pík (č. 1 – 6) odpovídá jedné složce analyzované směsi. Vodorovná osa znázorňuje čas. Čas, který odpovídá vrcholu píku, je tzv. **retenční čas**, který je na dané koloně a za daných experimentálních podmínek pro každou látku charakteristický.*

Pokud je zkoumaná směs ideálně rozdělena, pak každý pík na chromatogramu odpovídá **jedné ze složek** směsi. Poloha píku na ose x uváděná pomocí **retenčního času** (určeno podle polohy vrcholu=maxima)

určuje, o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), **plocha píku** (nebo jeho výška) určuje množství látky ve směsi (kvantitativní analýza).

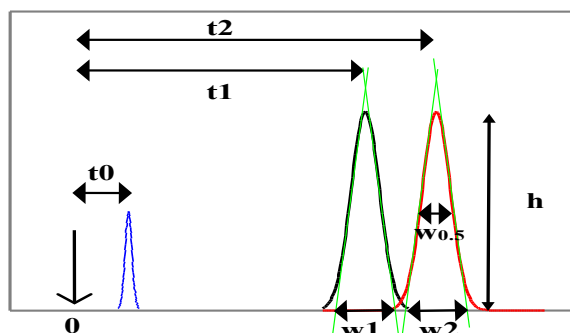
Identifikace píků (látek) se nejčastěji provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede nástřik ověřovaného standardu. Pokud se retenční čas píku na chromatogramu neznámé směsi shoduje s retenčním časem píku známého standardu, pak se jedná velmi pravděpodobně o stejnou látku. Pokud náš detektor je schopen spektra snímat (*diode-array detector*, DAD), další identifikační možností je srovnání spektra píku, který prochází detektorem, se spektrem standardu. Používáme-li MS detektor, lze identifikovat látku podle MS spektra, aniž bychom disponovali čistým standardem analytu.

Koncentrace látek ve směsi se určuje z ploch píků **metodou kalibrační křivky** (viz str. 14).



### Vyhodnocení chromatogramu

Jak bylo řečeno, kvalitativní charakteristikou látky je retenční čas píku  $t_r$ . Pokud jsou navíc píky symetrické, jako kvantitativní ukazatel obvykle používáme plochu píku. Pro zjištění plochy nejjednodušeji postupujeme tak, že pík aproximujeme trojúhelníkem (viz obrázek), protože pak pro odhad plochy lze použít vztah  $\text{plocha} = 0,5 \cdot h \cdot w$ , kde  $w$  je příslušná délka základny trojúhelníka.





Moderní software (*Chemstation, Clarity, Chromeleon...*) dokáží provést numerickou integraci v graficky přívětivém prostředí; v zásadě však vždy musíme definovat začátek a konec píku.

Namísto  $w$  je ale většinou jednodušší z chromatogramu odečítat šířku píku v polovině výšky  $w_{0.5}$  (pozor!  $t_r$  a  $w$  musí být vyjadřovány ve stejných jednotkách např. minutách, příp. v milimetrech!!!).

Retenční chování (=míra afinity ke stacionární fázi) daného analytu se v chromatografii charakterizuje kapacitním poměrem (faktorem)

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

kde  $t_0$  je čas analytu nezadržovaného kolonou (mrtvý čas),  $t$  je retenční čas analytu. Při vyhodnocování chromatogramu dále obvykle počítáme počet teoretických pater  $N$  a rozlišení  $R_s$ .

Počet teoretických pater  $N$  neboli účinnost kolony ukazuje kinetickou kvalitu separačního systému:

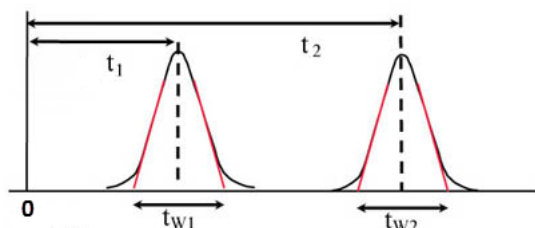
$$N = 16 \frac{t^2}{w^2} \qquad N = 5,545 \frac{t^2}{w_{0.5}^2}$$

Pro srovnání účinnosti různě dlouhých kolon (běžné délky  $L$  jsou 5 – 25 cm) se zavádí výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ . Je to délka kolony, na které dojde k jednomu rozdělení analytu mezi stacionární a mobilní fázi:

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

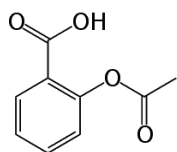
Rozlišení  $R_s$  je mírou separace dvou píků:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2} \qquad R_s = 1,17 * \frac{t_2 - t_1}{(w_{0.5,2} + w_{0.5,1})}$$



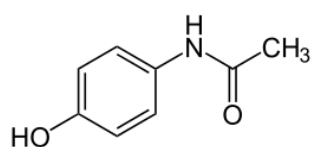
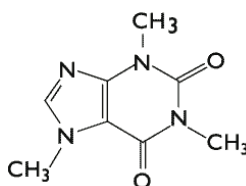
Např. hodnota  $R_s = 1,00$  udává, že dva sousední píky vykazují jen 2%-ní překryv, při  $R_s = 1,50$  považujeme píky za kvantitativně oddělené (odseparované), hodnoty  $>2,0$  se již nesnažíme úpravou podmínek zvyšovat.

## STANOVENÍ KOFEINU V ACIFEINU



**Kyselina acetylsalicylová** (*acetylsalicylic acid*, *Aspirin™*, *Acylpyrin™*) je široce používané léčivo s např. antipyretickými účinky.

**Kofein** (*caffeine*) (podle rostliny *Coffea arabica*, česky kávovník) je alkaloid, který příznivě stimuluje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost. Kofein patří do skupiny purinových bází, methylových derivátů xanthinu, která zahrnuje theobromin (kakao) a theofylin (bronchodilatans). V této práci bude stanovován obsah kofeinu v komerčně vyráběném léčivu ACIFEIN (HERBACOS-BOFARMA, s.r.o).



**Paracetamol** je léčivo, jež působí proti bolestem a zvýšené tělesné teplotě, není však protizánětlivé. Patří do indikačních skupin analgetikum a antipyretikum.

## Popis výrobku ACIFEIN 10 Tablety

### Co obsahuje Váš lék?

Acidum acetylsalicylicum 250 mg, Paracetamolum 200 mg, Coffeinum 50 mg v 1 tabletě.

### Další látky obsažené v léku

Glycin, kukuřičný škrob, mastek, hypolóza.

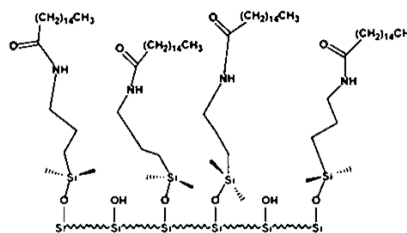
<http://www.farmaceutika.info/acifein#spc>



## Pracovní postup

**Chemikálie:** voda pro HPLC, octan amonný, kyselina octová, standard kofeinu

**Stacionární fáze (SF):** reverzní, amid-C18 (Supelcosil ABZ+plus, 150 x 4,6 mm), částice 3  $\mu\text{m}$



**Mobilní fáze (MF):** 70% octan amonný 50mM (pH=4), 30% methanol; izokratická eluce; průtok 1 ml/min,  $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$

## Příprava vzorku

Zvažte **10 tablet** a spočítejte průměrnou hmotnost jedné tablety. Vyberte **jednu tabletu**, zvažte ji, dokonale rozetřete na prášek a **300 mg** spláchněte vodou do **250ml** odměrné baňky a doplňte po rysku. Asi na 1 minutu dejte odměrnou baňku do ultrazvukové lázně. Přítomnost aditiv **znemožňuje dokonalé** rozpuštění tablety. Avšak kofein je dobře rozpustný a kvantitativně se rozpustí. Do vialky přefiltrujte přes násadkový filtr.

## Kalibrační roztoky

Kalibrační roztoky je nutno připravit pečlivě! Pipetovat by měla jediná osoba a používat při tom stejnou (skleněnou) pipetu! Zásobní roztok standardu (kofein) připravte do 100ml odměrné baňky, přibližná koncentrace  $c \approx$  **1,6** mg/ml, ve **vodě**. Z tohoto roztoku naředte kalibrační roztoky (do **10ml** odměrné baňky) o následujících koncentracích:

**40, 80, 120, 160**  $\mu\text{g/ml}$

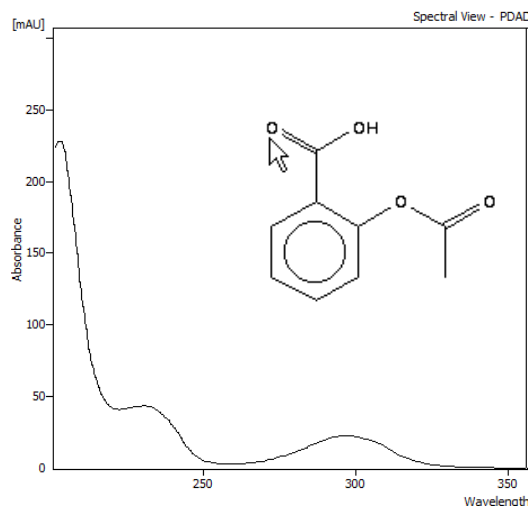
Provedte opakovaný nástřik každého standardu i vzorku (3 x)

## Vyhodnocení

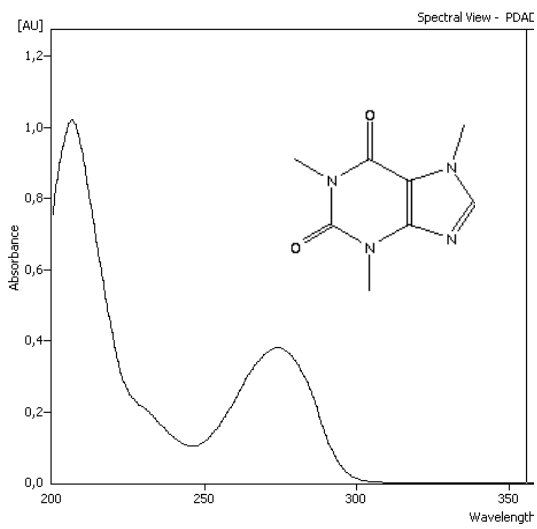
- Identifikujte podle spekter jednotlivé píky v chromatogramu vzorku (knihovna spekter nebo obrázek spekter standardů na str. 34)!
- Ze získaných dat zkonstruujte lineární kalibrační křivku (lineární regresí) a vypočítejte hmotnost kofeinu v **průměrné** tabletě (mg). Srovnejte tuto hodnotu s deklarovaným obsahem 50 mg/tabletu.
- Spočítejte kapacitní faktor kofeinu  $k'$ , počet teoretických pater  $N$  pro pík kofeinu a rozlišení  $R_s$  paracetamol - kofein.

*Pozn.: lze použít i ELS detektor, v tom případě se musí změnit hodnoty v rámečcích - Příprava vzorku: celou tabletu do 100ml baňky; Kalibrační roztoky: zásobní roztok  $c \approx$  8,0 mg/ml, ředění na 200, 400, 600, 800  $\mu\text{g/ml}$ . V tomto případě nelze identifikovat píky podle spekter, jediné podle retenčních časů standardů.*

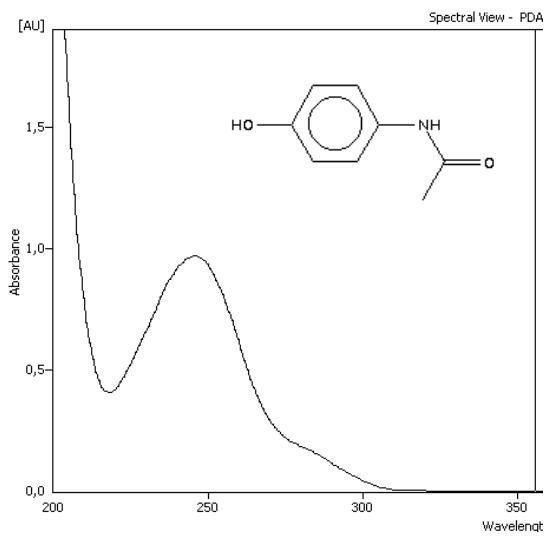
## Spektra standardů, c = 200 mg/L



kys.acetylsalicylová 231/296 nm



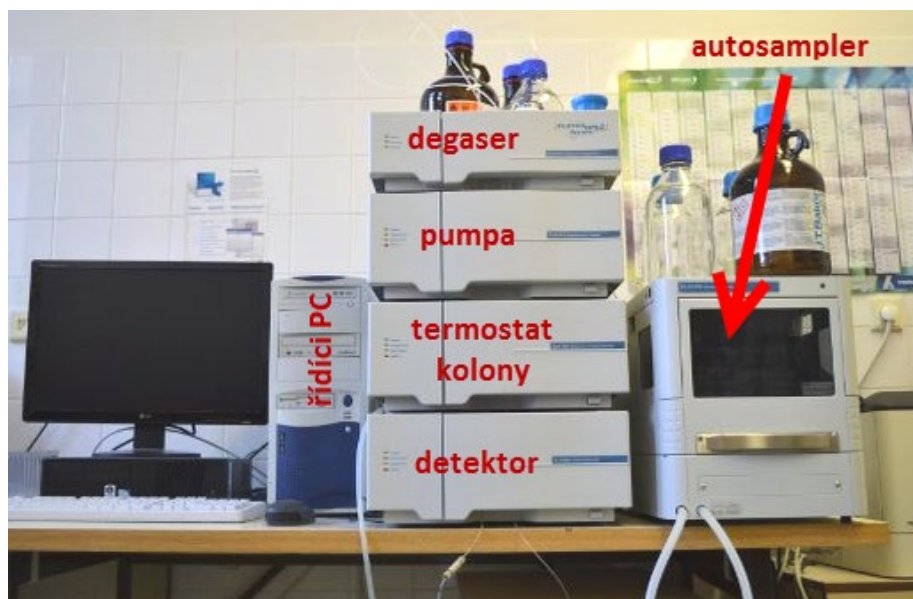
kofein (206) 274 nm



paracetamol 246 nm

## A. PŘÍSTROJ HPLC YL9100

YL9100 Young Lin Instrument Co., Ltd.,  
Soul, Jižní Korea je plně ovládán  
softwarem Clarity (DataApex, CZ).

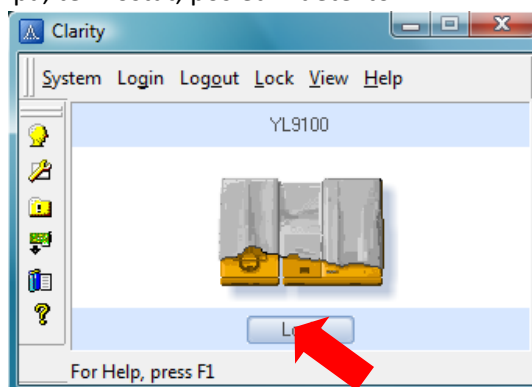


### SOFTWARE CLARITY

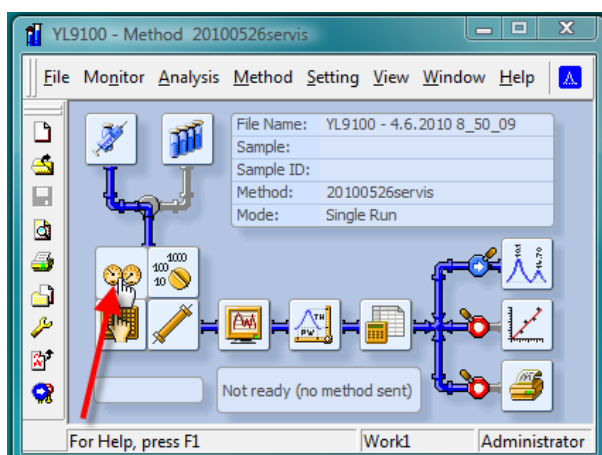
Pořadí zapínání: autosampler, degaser, pumpa, termostat, poslední detektor (PDA), pak software Clarity:



ikonka je na Ploše  
vybíráme „Project Acifein“

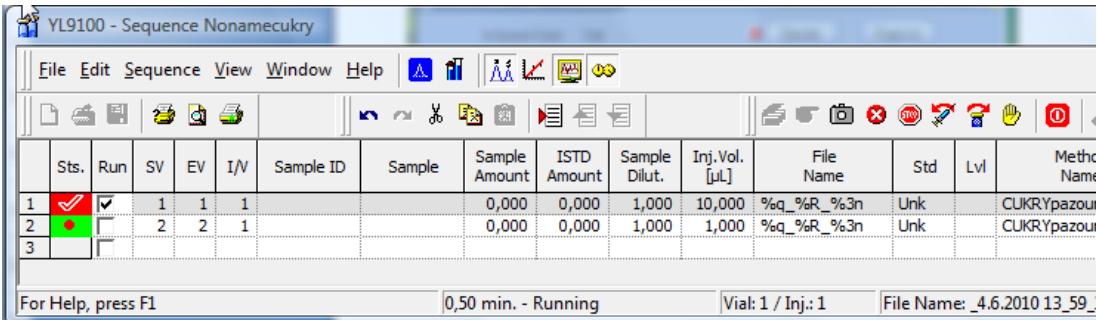


Přímé ovládání systému vyvolá ovládací panely systému:



## PROVEDENÍ EXPERIMENTU

I v případě spuštění jediného experimentu se používá tzv. mód sekvenční – např. s jediným aktivním řádkem. Označení v kolonce *Run* tento řádek aktivuje:

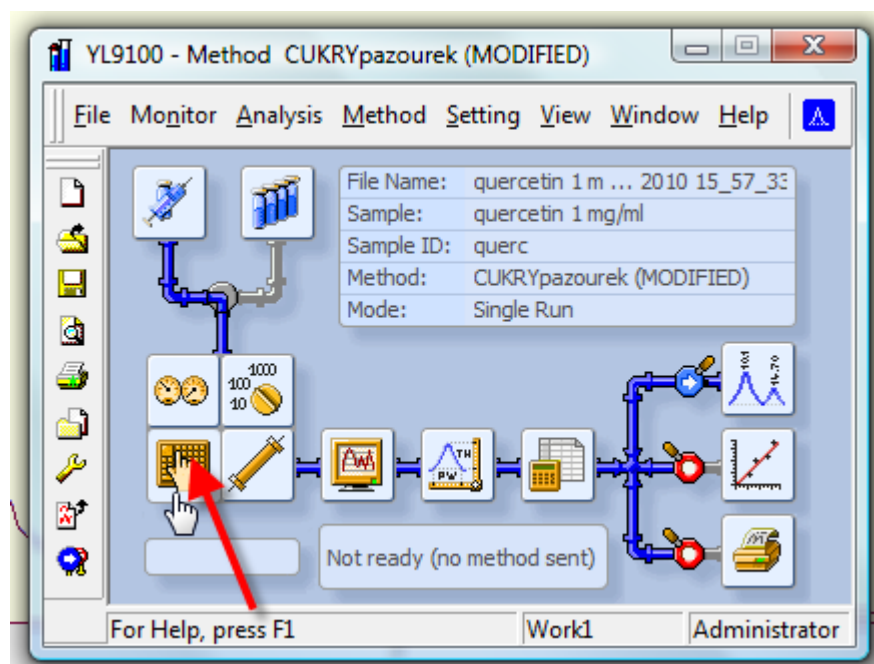


	Sts.	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD Amount	Sample Dilut.	Inj. Vol. [μL]	File Name	Std	Lvl	Methc Name
1	✓	✓	1	1	1			0,000	0,000	1,000	10,000	%q_%R_%3n	Unk		CUKRYpazou
2			2	2	1			0,000	0,000	1,000	1,000	%q_%R_%3n	Unk		CUKRYpazou
3															

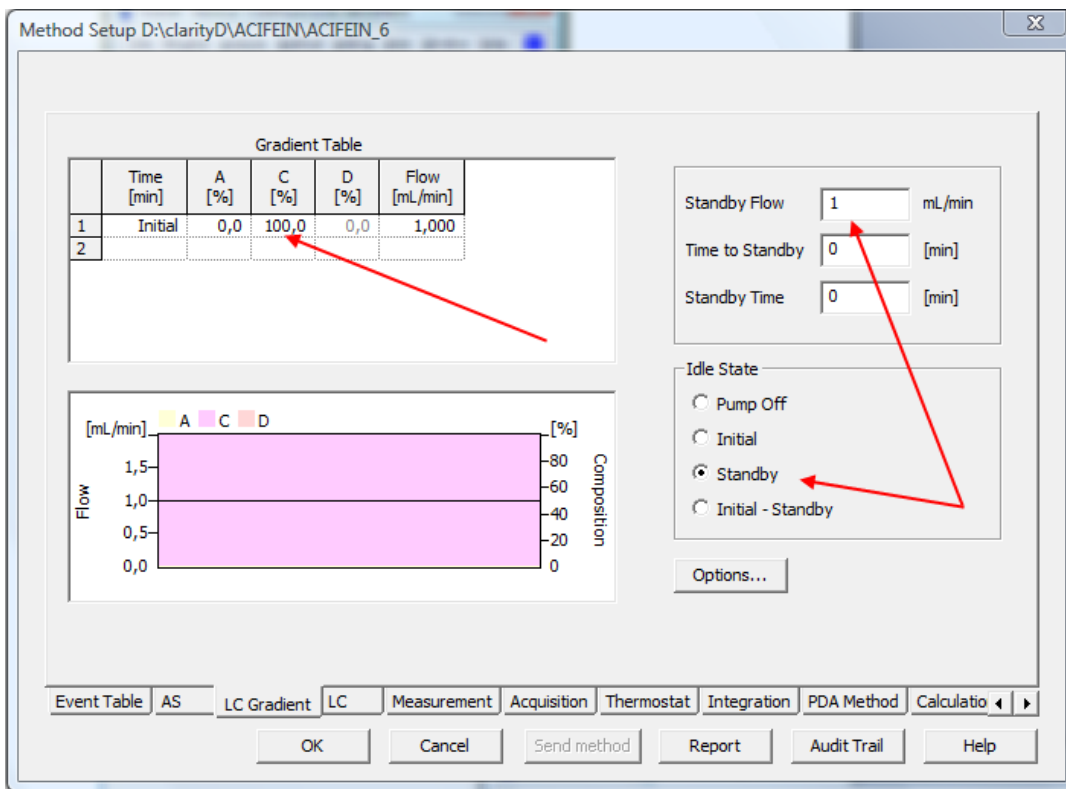
For Help, press F1      0,50 min. - Running      Vial: 1 / Inj.: 1      File Name: \_4.6.2010 13\_59\_

Nejdůležitější při zadání experimentu je definice „metody“, tj. souboru parametrů, podle kterých pracuje celý systém při realizaci experimentu.

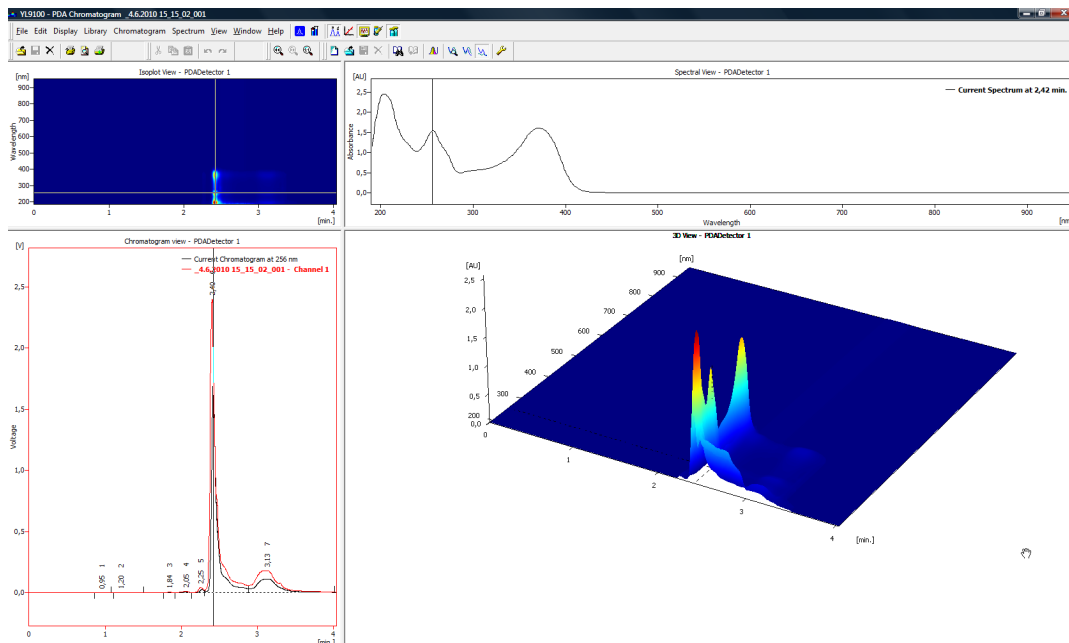
*Příprava metody:*



V jednotlivých kartách je nutno definovat parametry alespoň pro pumpu (*LC Gradient*), kolonu (*LC, Measurement*) a detektor (*Acquisition*).



Panel vysokotlaké pumpy



Okno detektoru. Detektor sbírá informace o signálu i vlnových délkách v reálném čase, takže lze zobrazit izoplot (vlnová délka vs. čas), spektrum (signál vs. vlnová délka), chromatogram (signál vs. čas) i 3D chromatogram (signál vs. čas a vlnová délka)

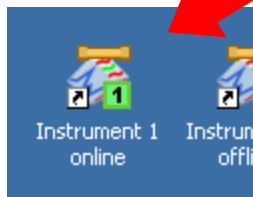
## B. PŘÍSTROJ HPLC AGILENT, SYSTEM 1200

HPLC Agilent, System 1200 (Waldbron, Německo) je plně ovládán softwarem *CHEMSTATION* for LC, rev. B.03.02.

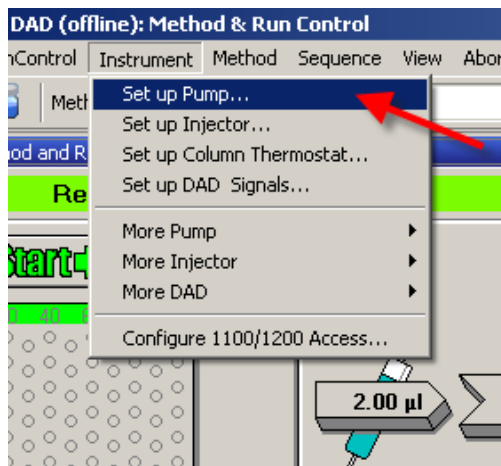
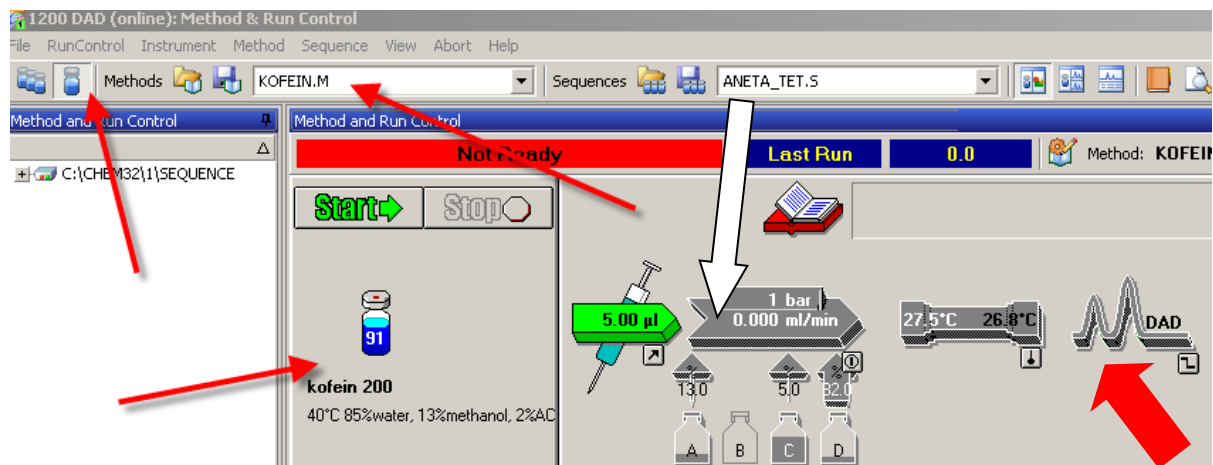
### SOFTWARE *CHEMSTATION*

Pořadí zapínání systému HPLC (shora dolů): degaser, pumpa, autosampler, termostat, jako poslední detektor, pak spouštíme software *CHEMSTATION*:

ikonka je na ploše



Po inicializaci se otevře grafické rozhraní, kde lze ovládat znázorněné prvky, včetně blokového diagramu: autosampler, pumpu (bílá šipka), termostat kolony, detektor (DAD – červená šipka).



Kondicionace kolony - zapnutí gradientové pumpy



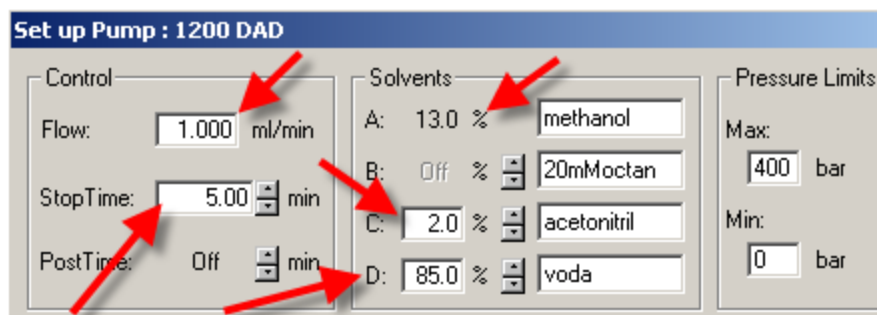
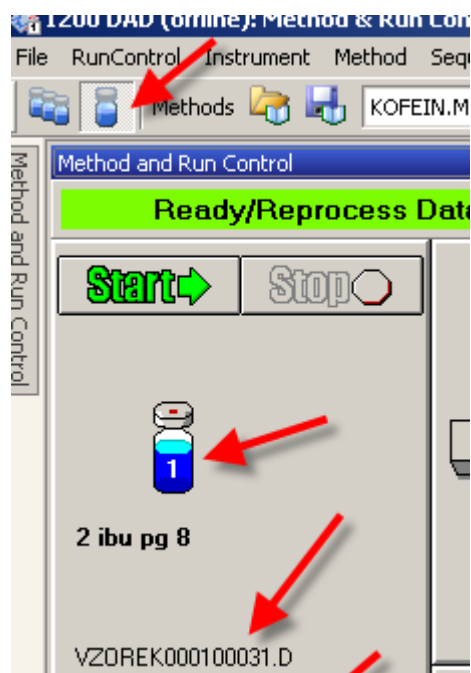
## PROVEDENÍ EXPERIMENTU

zvolíme mód **Single run**. Číslo jednotlivé vialky, ze které bude prováděno dávkování, bude zobrazeno pod tlačítkem **START**. Jméno souboru, který bude vytvořen, spolu s příslušnou cestou na pevném disku, je zobrazeno pod ní (koncovka .D)

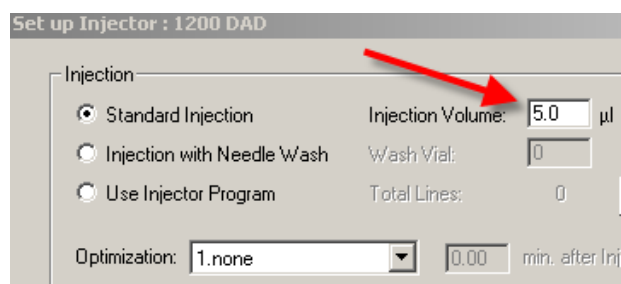
Nejdůležitějším pro zadání experimentu je definice metody, tj. souboru parametrů, podle kterých pracuje celý systém při realizaci experimentu (koncovka .M):

Metoda KOFEIN.M:

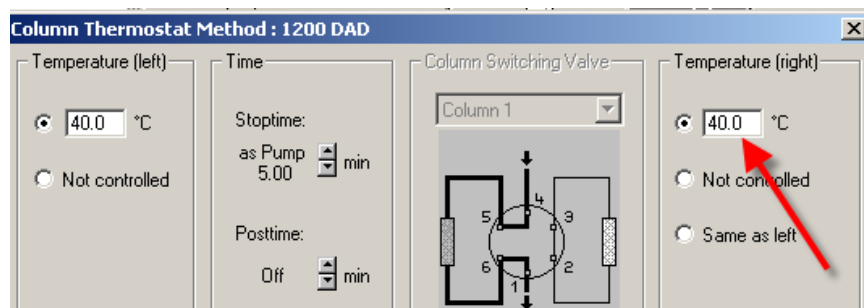
u metody nastavujeme pumpu:



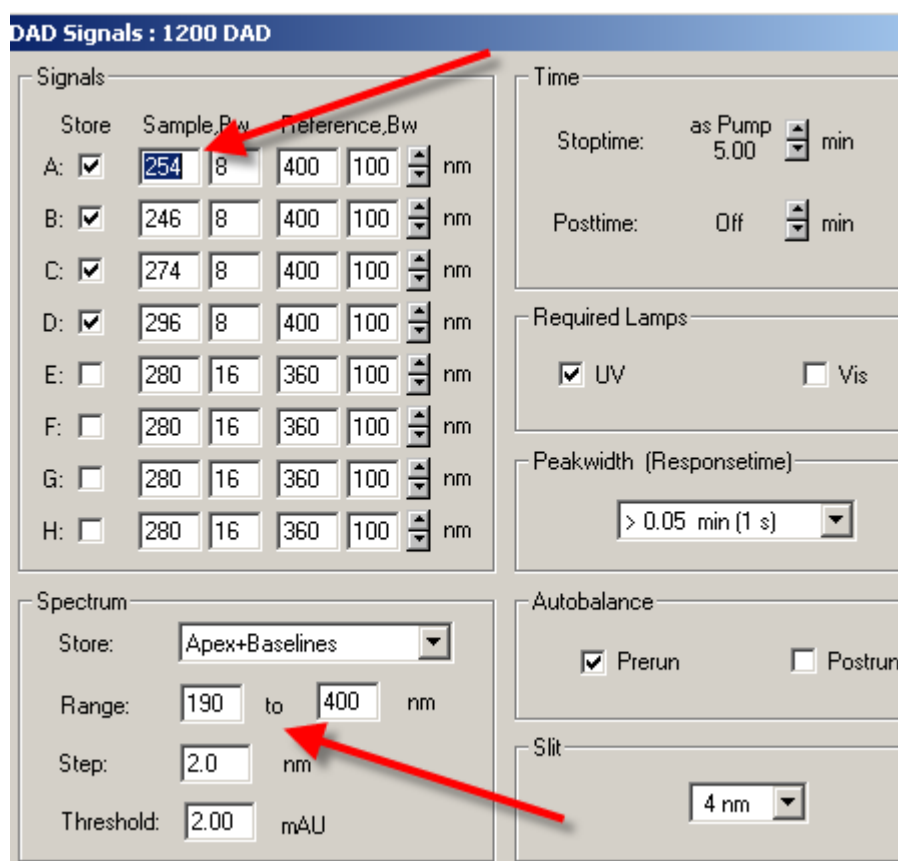
objem, který se bude dávkovat autosamplrem:



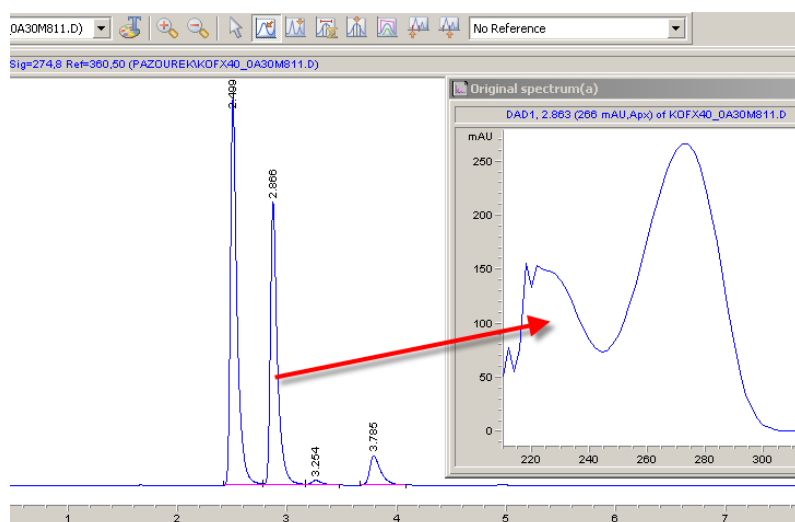
teplotu termostatu kolony:



U detektoru vybereme vlnové délky, které se budou ukládat:



Absorbance v měřící cele je nepřetržitě monitorována. Protože je používán *diode-array* detektor, lze v reálném čase snímat i spektra a ty použít k identifikaci:



Identifikace kofeinu podle spektra

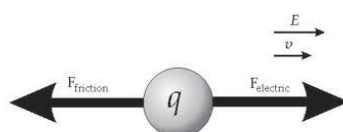
## LABORATORNÍ CVIČENÍ 7 – KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

### ÚVOD - KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE)

Kapilární elektroforéza je moderní vysoce účinná analytická separační metoda. Principem je pohyb analytů v elektrolytu mezi dvěma elektrodami vysokého napětí, obvykle realizovaný v kapiláře průměru 25 – 75  $\mu\text{m}$  s on-column detekcí.

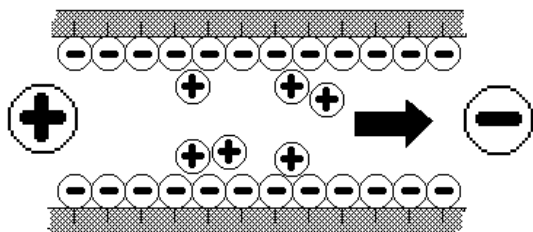
#### Teorie

Elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem náboje částice a orientací pole (kladně nabitá částice k zápornému pólu a naopak). V kapalině je rychlost tohoto pohybu přímo úměrná **náboji částice  $q$**  ( $F = q * E$ ) a nepřímo úměrná hydrodynamické (Stokesově) **velikosti částice  $d$**  (síla odporu prostředí  $F = -3\pi\eta dv$ , kde  $\eta$  je viskozita kapaliny). Tyto dvě síly se rychle po aplikaci elektrického pole vyrovnají a částice se dále pohybuje konstantní rychlostí



$$v = q * E / 3 \pi \eta d \quad \mu = q / 3 \pi \eta d$$

kde  $\mu = v/E$  elektroforetická mobilita. Pokud se tedy částice vzorku liší alespoň v efektivním náboji  $q$  či hydrodynamické velikosti  $d$ , mohou se pohybovat **rozdílnými rychlostmi**, což je nutnou podmínkou separace. Při použití kapiláry (typicky křemenné, *fused silica*) jako separačního prostoru je prostá elektromigrace **nezanedbatelně** snižována/zvyšována tokem **nezávislým na náboji analytu** (elektroosmotický tok, *electroosmotic flow = EOF*), který může zcela obrátit směr pohybu očekávaný podle nábojů analytů.



Vysvětlení elektroosmotického toku v nemodifikované křemenné kapiláře: povrch kapiláry nese nepohyblivý negativní náboj (silanolové skupiny). V důsledku zachování elektroneutrality se proto u stěn nachází přebytek (pohyblivých) pozitivních iontů z roztoku, které po aplikaci napětí unášejí celou kapalinu ke katodě.

## KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS, CZE)

### Vyhodnocení elektroforeogramu

Jedním z módů CE je **kapilární zónová elektroforéza**, pro kterou je charakteristické použití jednoho pracovního elektrolytu (*background electrolyte*, BGE). V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé zóny putují různými konstantními rychlostmi, jsou oddělené BGE a odezva detektoru na konci kapiláry (typicky UV-Vis detektor) má Gaussovský profil (tj. pík). Obdobně jako u chromatografie, migrační čas píku  $t_m$  charakterizuje analyt kvalitativně, kvantitativní charakteristikou **elektroforeogramu** je plocha píku.

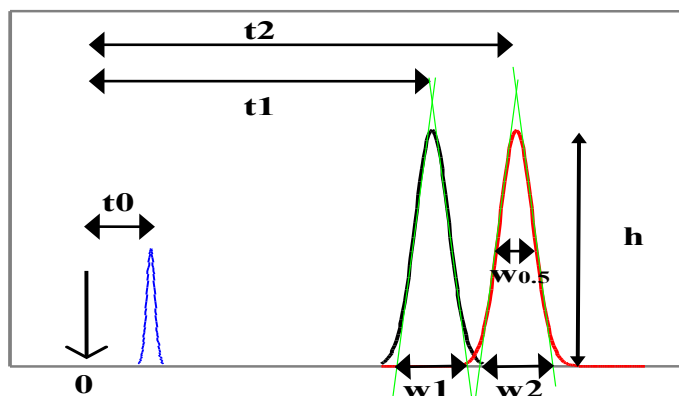
Počet teoretických pater  $N$  je mírou účinnosti podobně jako u HPLC

$$N = 16 \frac{t_m^2}{w^2} \quad \left( \text{pro elektroforézu také} = \frac{\mu U}{2D} \right) \quad N = 5,545 \frac{t^2}{w_{0.5}^2}$$

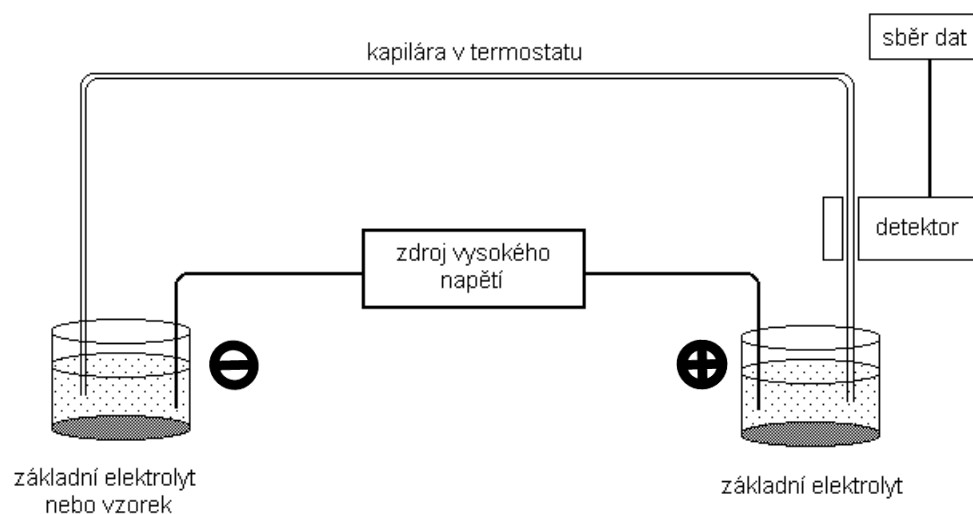
$\mu$  je mobilita,  $U$  napětí,  $D$  difúzní koeficient. (pozn.  $t_m$  a  $w$  nebo  $w_{0.5}$  musí být vyjadřovány ve stejných jednotkách např. sekundách nebo milimetrech !!!).  $N$  je vysoké pro „úzké“ (základna píku  $w \rightarrow 0$ ) a zadržované ( $t_m \rightarrow \infty$ ) píky. Nejjednodušší odečtení  $w$  je nahrazení píku trojúhelníkem (viz obrázek ↓)

Rozlišení  $R_s$  je mírou separace dvou píků. Např. hodnota  $R_s = 1,0$  udává, že dva píky vykazují jen 2 %-ní překryv, při  $R_s = 1,5$  považujeme píky za kvantitativně oddělené, hodnoty  $>2,0$  se již nesnažíme úpravou podmínek zvyšovat.

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1) / 2} \quad R_s = 1,17 \frac{t_2 - t_1}{(w_{0.5,2} + w_{0.5,1})}$$



## Instrumentace CE



Experimentální uspořádání u přístrojů CZE je prakticky vždy stejné, liší se jen v jednotlivostech, vždy obsahuje nejméně: separační kapiláru, zdroj napětí, (dávkoč vzorku), detektor, zařízení pro záznam analytického signálu (viz obrázek).

Typické **napětí** je 5 – 30 kV, elektrolyt o koncentraci 5 – 200 mM.

Analýza se obvykle provádí v **křemenných kapilárách**, zřídka v kapilárách teflonových nebo skleněných. Běžné křemenné kapiláry jsou z vnější strany chráněny tenkou vrstvou polyimidu, čímž se omezí jejich křehkost. Typický vnitřní průměr kapiláry je 25 – 75  $\mu\text{m}$ , délka 30 – 80 cm, objem 1 – 3  $\mu\text{l}$ .

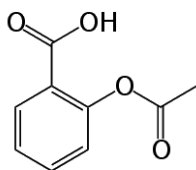
**Detekce** se nejčastěji provádí UV-Vis detektorem, konduktometricky, fluorescenčně (laserem indukovaná fluorescence), ampérometricky, hmotovým spektrometrem (absolutní).

**Dávkování** (řádově nanolitry) se provádí buď hydrodynamicky (přetlakem na začátku či podtlakem na konci kapiláry) nebo elektromigračně (po krátkou dobu se aplikuje dávkovací napětí).

### *Klíčové parametry separačních podmínek*

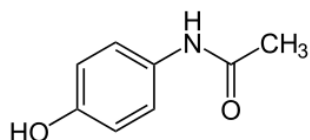
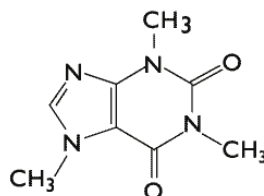
Elektroforéza je určena především pro separaci slabých bází nebo slabých kyselin, abychom při znalosti  $\text{pK}_a$  a volbou pH (pufru) měnili elektroforetickou rychlost jednotlivých analytů. Pravidlo  $\text{pK}_a \pm 2$  říká, že např. kyselina octová ( $\text{pK}_a=4,75$ ) je prakticky neionizovaná při  $\text{pH}<2,75$  (nulová mobilita) a plně ionizovaná při  $\text{pH} >6,75$  (maximální=tabulková mobilita).

## STANOVENÍ KYSELINY ACETYLSALICYLOVÉ V ACIFEINU

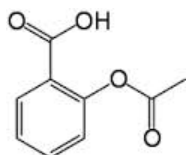


**Kyselina acetylosalicylová** (ASA, *acetylsalicylic acid*, *Aspirin™*, *Acylypyrin™*) je široce používané léčivo s např. antipyretickými účinky. V této práci bude stanovován její obsah v komerčně vyráběném léčivu ACIFEIN (HERBACOS-RECORDATI, s.r.o) metodou CZE.

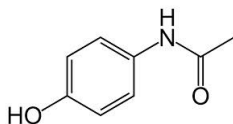
**Kofein** (*caffeine*) (podle rostliny *Coffea arabica*, česky kávovník) je alkaloid, který příznivě stimuluje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost. Kofein je pravděpodobně nejrozšířenější stimulant na světě nacházející se v mnoha nápojích, např. kávě, který se užíváním ve větším množství stává drogou. Kofein patří do skupiny purinových bází, methylových derivátů xanthinu, která zahrnuje theobromin (kakao) a theofylin (bronchodilatans).



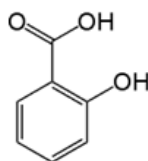
**Paracetamol** je léčivo, jež působí proti bolestem a zvýšené tělesné teplotě, není však protizánětlivé. Patří do indikačních skupin analgetikum a antipyretikum.



$pK_{a1}=3,5$



$pK_{a1}=9,9$



$pK_{a1}=3,0$   $pK_{a2}=8,3$

## Popis výrobku ACIFEIN 10 Tablety

### Co obsahuje Váš lék?

Acidum acetylsalicylicum 250 mg, Paracetamolum 200 mg, Coffeinum 50 mg v 1 tabletě.

### Další látky obsažené v léku

Glycin, kukuřičný škrob, mastek, hyprolóza.

<http://www.farmaceutika.info/acifein#spc>



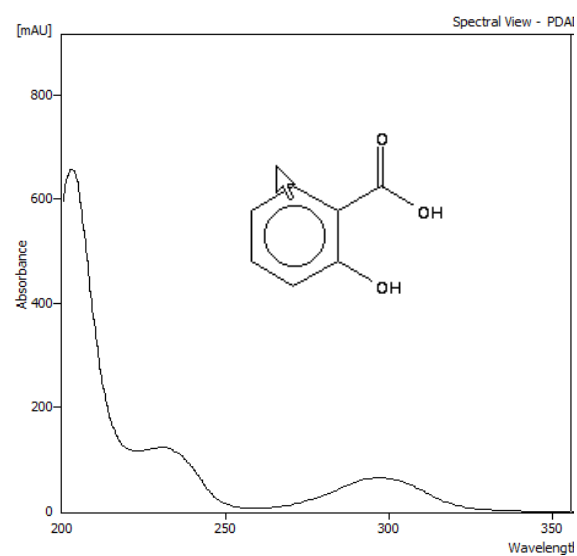
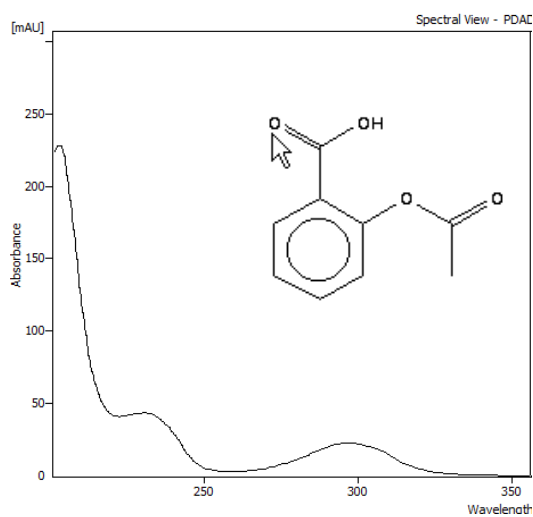
## Chemikálie

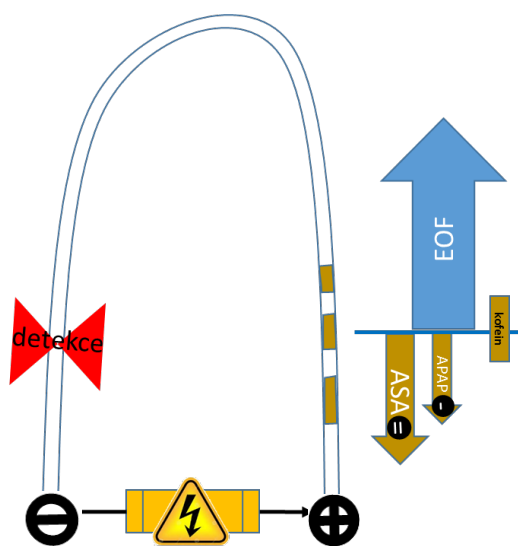
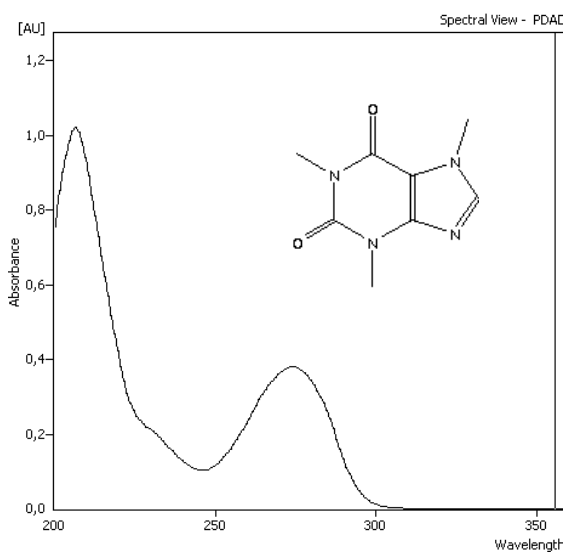
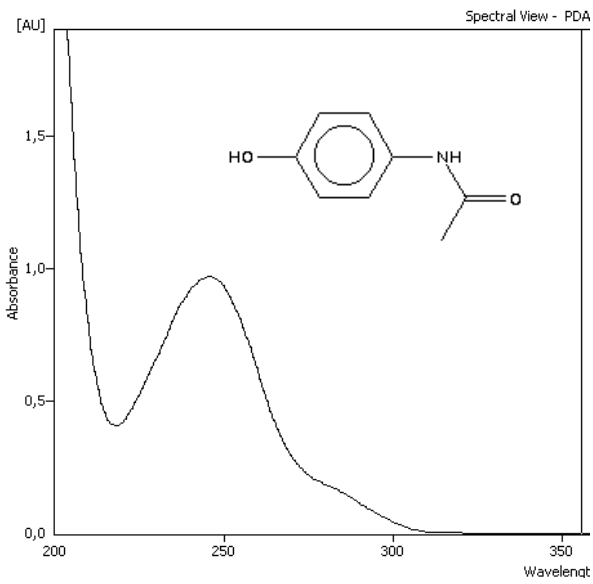
Tetraboritan disodný (dekahydrát),  $M = 381,37 \text{ g/mol}$ , hydroxid sodný, kyselina acetylsalicylová, kofein, methanol, voda pro HPLC.

## Systém

- nemodifikovaná křemenná kapilára, vnitřní průměr 75/50  $\mu\text{m}$
- borátový pufr (tetraboritan sodný),  $\text{pH} = 9,25$
- napětí = +16 /+30 kV, dávkování = 40 mbar \* 3 s / 50 mbar \* 0.5 min
- teplota = 25 °C, detekce UV 200 nm

Spektra analytů,  $c=200 \text{ mg/ml}$





Vysvětlení pohybu analytů v kapiláře.  
 Délka šipek vyjadřuje velikost rychlostí.



### Pracovní postup

**Roztok pufrujícího elektrolytu (BGE):** 100 ml 12,5 mM (Agilent) resp. 5 mM (PrinCE) tetraboritanu sodného, pH = 9,25; **ve vodě.**

**Zásobní roztok standardu (kyselina acetylsalicylová, ASA):** navážku spláchněte 5 ml methanolu do 100 ml odměrky, po dokonalém rozpuštění doplňte vodou, koncentrace  $c \approx 2,4$  mg/ml.

#### METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY (EXTERNÍHO STANDARDU)

##### **Příprava vzorku**

Zvažte **10 tablet** a spočítejte průměrnou hmotnost jedné tablety. Vyberte **jednu tabletu**, zvažte ji, dokonale rozetřete na prášek a **100 mg** spláchněte 10 mL methanolu a doplňte na **200,00 ml** (vodou). Přítomnost aditiv **znemožňuje úplné** rozpuštění tabletky. Všechny stanovované komponenty (analyty) se však kvantitativně rozpustí **do 2 minut**. Do ampulky **filtrujte!**

##### **Kalibrační roztoky**

Ze zásobního roztoku standardu ASA naředte (do **10,00 ml, doplnit vodou**) kalibrační roztoky tak, že odpipetujete:

0,25 / 0,50 / 0,75 / 1,00 ml

#### METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU (PŘÍDAVKU STANDARDU)

Tato metoda je doporučována pro vzorky se složitou maticí

##### **Příprava vzorku a vzorků s přídatkem standardu**

Zvažte **10 tablet** a spočítejte průměrnou hmotnost jedné tablety. Vyberte **jednu tabletu**, zvažte ji, dokonale rozetřete na prášek a navážku 100 mg spláchněte do 50 ml odměrné baňky a doplňte po značku. Přefiltrujte cca 10 ml do kádinky a do 4 odměrných baněk 10 ml odměřte vždy 1,00 ml filtrátu. Do 2., 3. a 4. baňky ještě přidejte postupně ze zásobního roztoku standardu ASA:

0,20 / 0,40 / 0,60 ml

- Všechny roztoky je nutno připravit pečlivě! Pipetovat by měla jediná osoba a používat při tom stejnou pipetu! PIPETUJEME od značky 0 dolů! Nemáme sérologické vyfukovací pipety!

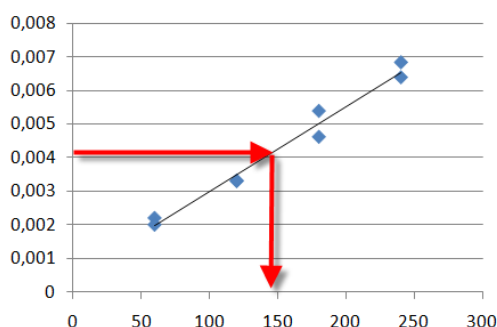
- napište si do pracovního sešitu tabulku, jak umístíte jednotlivé roztoky do karuselu (podle nastavení metody), **naplňte** ampulky a označte je fixem

### Vyhodnocení

- Spočítejte průměrné migrační časy  $t_m$ , průměrný počet teoretických pater  $N$  a průměrné rozlišení  $R_s$  paracetamol – kyselina acetylsalicylová pro píky ve vzorku (hodnoty  $t_m$  a  $w$  odečtete ze softwaru *Chemstation/Clarity*).
- Spočítejte elektroforetickou rychlost a mobility ASA
- vypočítejte **průměrnou hmotnost** [mg] ASA **v tabletě**, kterou jste analyzovali. Spočítejte také hmotnost ASA [mg] v **průměrné tabletě**

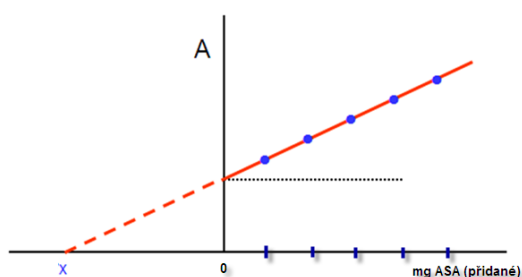
#### METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY (M. EXTERNÍHO STANDARDU)

- Zkonstruuje **lineární** kalibrační graf: plocha vs. koncentrace standardu, otestujete významnost úseku, vypočtete **korelační koeficient  $r$** . Z průměrné plochy píků analytu ve vzorku odečtete koncentraci **ASA** (buď grafickou interpolací nebo použitím regresní kalibrační rovnice)



#### METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU (M. PŘÍDAVKU STANDARDU)

- Zkonstruuje **lineární** kalibrační graf: plocha vs. koncentrace/množství přídatku standardu, vypočtete **korelační koeficient  $r$** . Z průměrné plochy píků analytu ve vzorku odečtete koncentraci ASA (buď grafickou extrapolací pro  $Y=0$  nebo použitím regresní kalibrační rovnice)



## A. PŘÍSTROJ CE3D AGILENT

*Kazeta (cartridge) = držák kapiláry s detekčním okénkem, slouží i jako vzduchový chladič*



### *Příslušenství přístroje CE3D AGILENT*



*skleněné vialky 1,8 ml*



*víčka vialek*

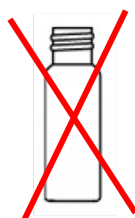


*PP vialky 0,9 ml a 0,25 ml*

V případě přístroje Agilent CE3D je délka kapiláry 33 cm (objem kapiláry o průměru 75  $\mu\text{m}$  je tedy asi 1,5  $\mu\text{l}$ ), přičemž efektivní délka (k detekčnímu okénku, viz obrázek na str. 43) je 23,5 cm. Maximální tlak na promývání je 1000 mbar.



*elektrolyty  
vzorek*

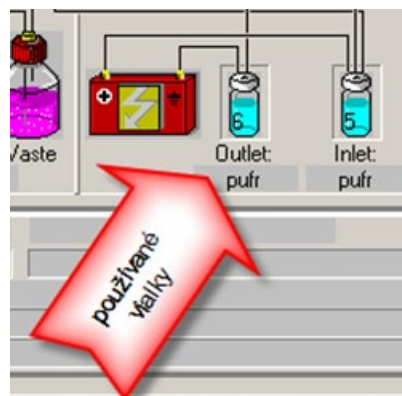


*tyto vialky  
jsou pro HPLC*

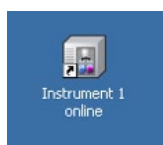
*Správné plnění vialek*

## Provedení experimentu

Vedoucí cvičení vysvětlí obsluhu přístroje určenému zodpovědnému studentovi. Před posláním jakéhokoli příkazu (software Chemstation) zkontrolujte, **zda nejsou ke kapiláře zvednuté vialky a jejich pozice zároveň obsazeny v karuselu!!!**



→ ikona na ploše:



→ jako první je nutno spustit „SYSTEM INIT“ (viz obrázky dále)

→ vložte do přístroje kazetu s kapilárou

→ ověřte funkčnost systému střídavým promýváním do vialky  $\boxed{8}$  = odpad z  $\boxed{3}$  = voda /  $\boxed{2}$  = hydroxid. Zkontrolujte, zda po cca 6 sekundách dochází ke skokové změně absorbance. Pokud ne, oznamte to neprodleně vedoucími cvičení; bez nápravy tohoto stavu by bylo další měření zbytečné

→ Zkontrolujte parametry softwaru (metoda ACIFEIN.M)

25 °C, *preconditioning* 1 min BGE

*polarity positive* 16 kV

*postconditioning* = 1 min hydroxid + 1 min voda

*injection* 3s \* 40 mbar

*stoptime* 2,5 min

DAD: 200/231/246 nm

→ proveďte analýzu kalibračních roztoků (3 x)

→ za stejných podmínek 3x analyzujte vzorek

Software Chemstation:

schéma systému Agilent

Method and Run Control

Ready Last Run 5.0 Method: ACIFEIN.M Sequence: ACYLKOFIN.S

Start Stop

asa

TESTY000008.D

D::\data\Pazourek

D: >10 GB free

CE-State Ready

27.5 °C

0.00 min

Mode CE

Detector DAD

	Signal	Reference
A:	200 4 550 20	
B:	265 4 450 80	
C:	254 16 550 80	
D:	280 4 550 80	
E:	320 16 450 80	

Energy

	0.0 kV
	0.2 µA
	0.0 W

Electrolyte @clean needle Waste Outlet pufr Inlet pufr

DAD

mAU

200 300 400 500 nm

-10.00 to 100.00

online spektra

použité metody

parametry zobrazeného signálu

Online Plot

DAD A, Sig=200,4 Ref=550,20

Pressure

mAU

150

100

50

0

První krok: systém INIT

Instrument 1 (online): Method & Run Control

File RunControl Instrument Method Sequence View

- System Vialtable...
- Select CE Mode...
- Set up CE Method...
- Set up CE Homevalues...
- Set up CE Conditioning...
- Set up CE Injection...
- Set up CE Electric...
- Set up CE TimeTable...
- Set up CE Fraction Collection...
- Set up DAD Signals...
- Simulation...
- More CE Control
- More CE Electric
- More CE Pressure
- More CE Vials
- More DAD
- Snapshot
- NotReady Info...
- System Reset
- System INIT
- Maintenance
- Revisions & Serial#'s...
- Capillaries...

Method and Run Control

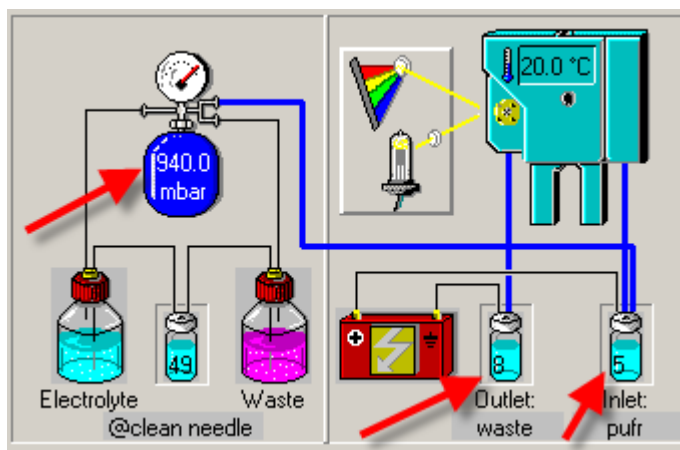
Not Ready

Start Stop

CE-State Not initial.

Detector DAD


A:	200 4 55
B:	265 4 45
C:	254 16 55




*Druhý krok: promývání (flush)*

*Nastavení metody:*


**CE: Method**

Capillary vials and temperature settings. 


---

Replenish, Pre- and Postconditioning setup. 


---

All parameters for the injection. 

---

Electrical parameters for separation. 

---

Stoptime, Posttime, Rawdata and Timetable. 

---


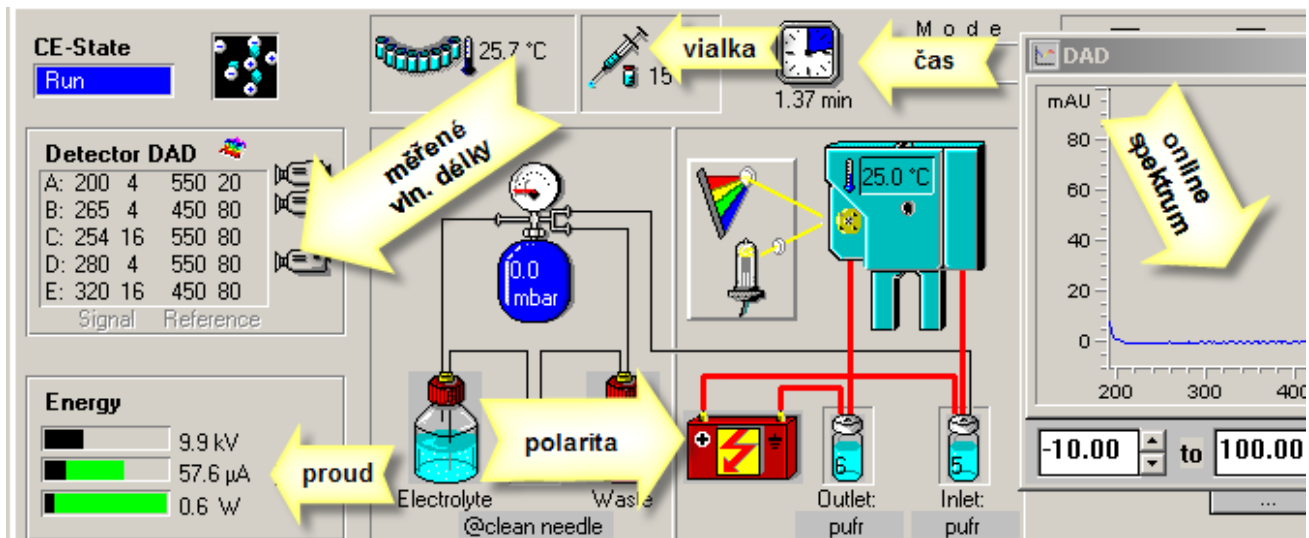
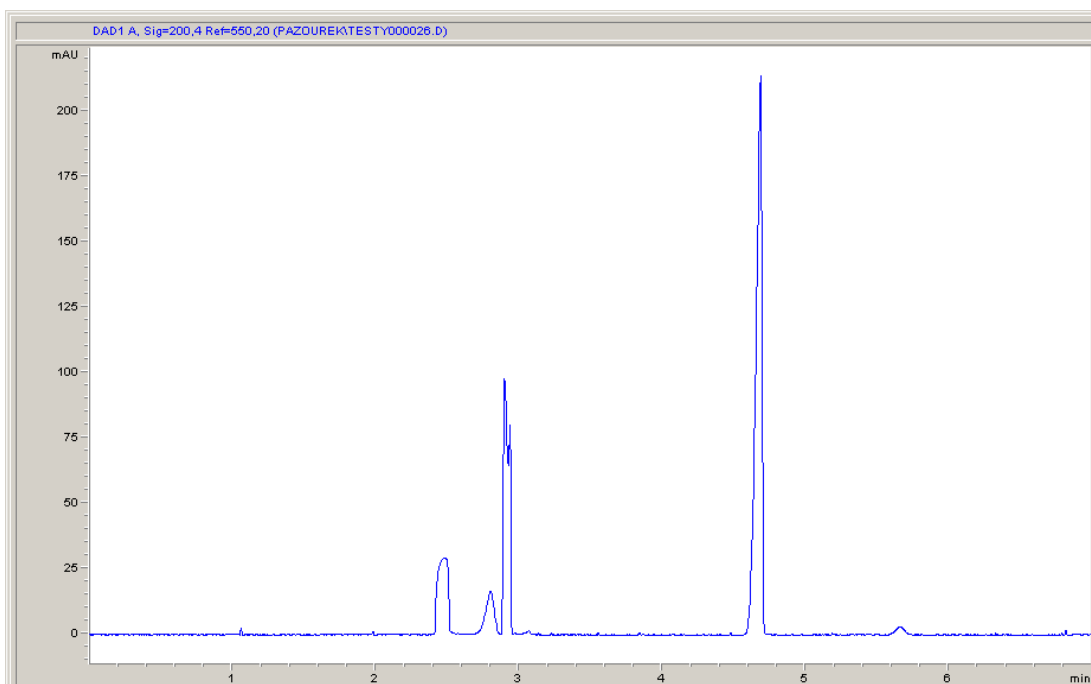
Wavelength, Stoptime and detector Timetable. 

diagram systému při měření:



typický elektroforeogram



## B. PŘÍSTROJ PrinCE 500

**PrinCE 500** (Prince Technologies, Emmen, Nizozemí) vybavený průtokovým spektrofotometrickým detektorem **Lambda 1010** (Bischoff, Leonberg, Německo):



V případě PrinCE 500 je minimální délka kapiláry 82 cm (objem 50 $\mu$ m kapiláry je tedy 1,6  $\mu$ l), přičemž vzdálenost k okénku z kratší strany je **32 cm**.

Protože kapilára je dosti dlouhá, prakticky vždy se používá maximální napětí zdroje 30 kV a dávkování se provádí až desítky sekund (30 s \* 50 mbar). Pneumatický systém dokáže vyvinout tlak až 2200 mbar.



## Provedení experimentu

Vedoucí cvičení vysvětlí obsluhu přístroje určenému zodpovědnému studentovi.

→ jako první je nutno zapínat detektor (*Lambda 1010*), až po té *PrinCE*, nakonec řídicí software

→ ikona na ploše:



→ ověřte funkčnost systému střídavým promýváním do vialky 101= odpad z vialek 133=voda / 102=hydroxid. Zkontrolujte, zda po asi 15 sekundách dochází ke skokové změně absorbance (200 nm). Pokud ne, oznamte to neprodleně vedoucími cvičení; bez nápravy tohoto stavu by bylo další měření zbytečné

→ Zkontrolujte parametry softwaru (metoda *shortNaOH*, viz obrázky) *oven* 25 °C

*prewash* 2000 mbar 1 min NaOH, 0.5 min voda, 1 min BGE

*voltage* +30 kV

*injection* 0.5 min \* 50 mbar

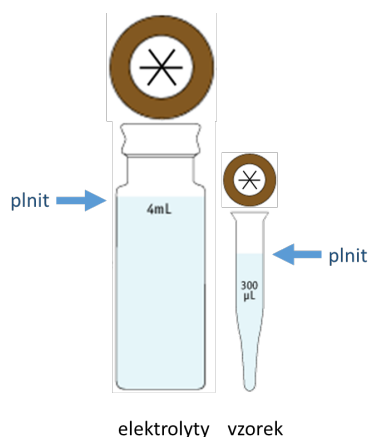
*duration* 4 min

*postwash* 1 min voda

*wavelength* 200 nm

→ proveďte analýzu kalibračních roztoků (3 x)

→ za stejných podmínek 3x analyzujte vzorek



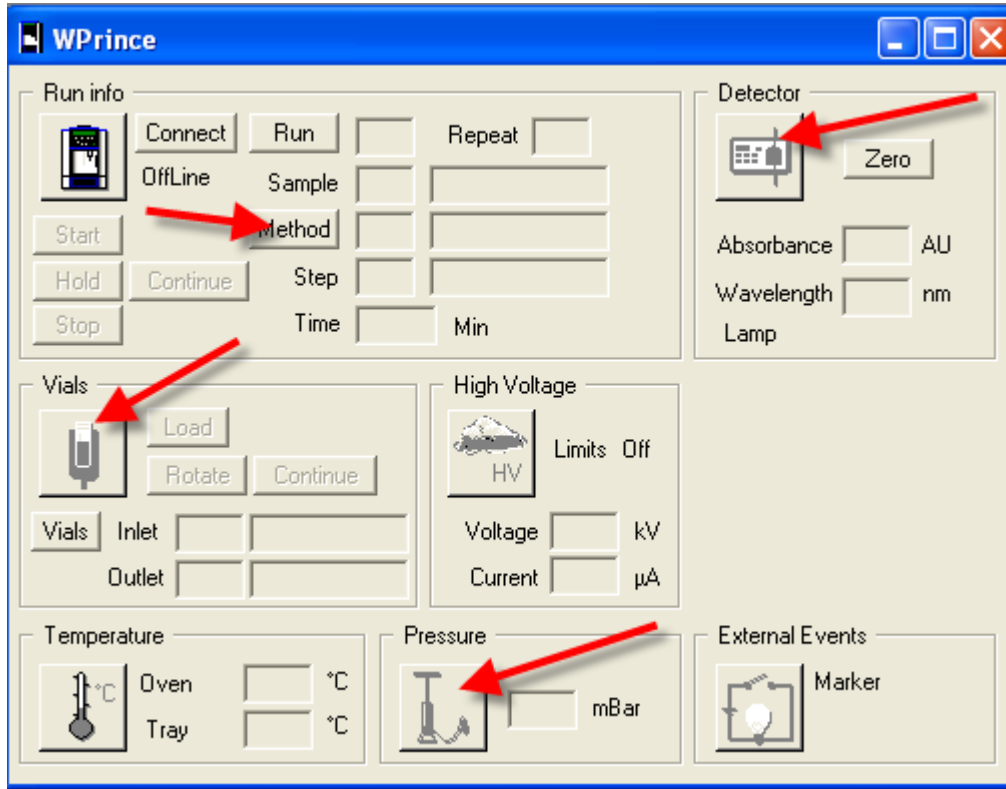
*Správné plnění vialek*

Software DaX:

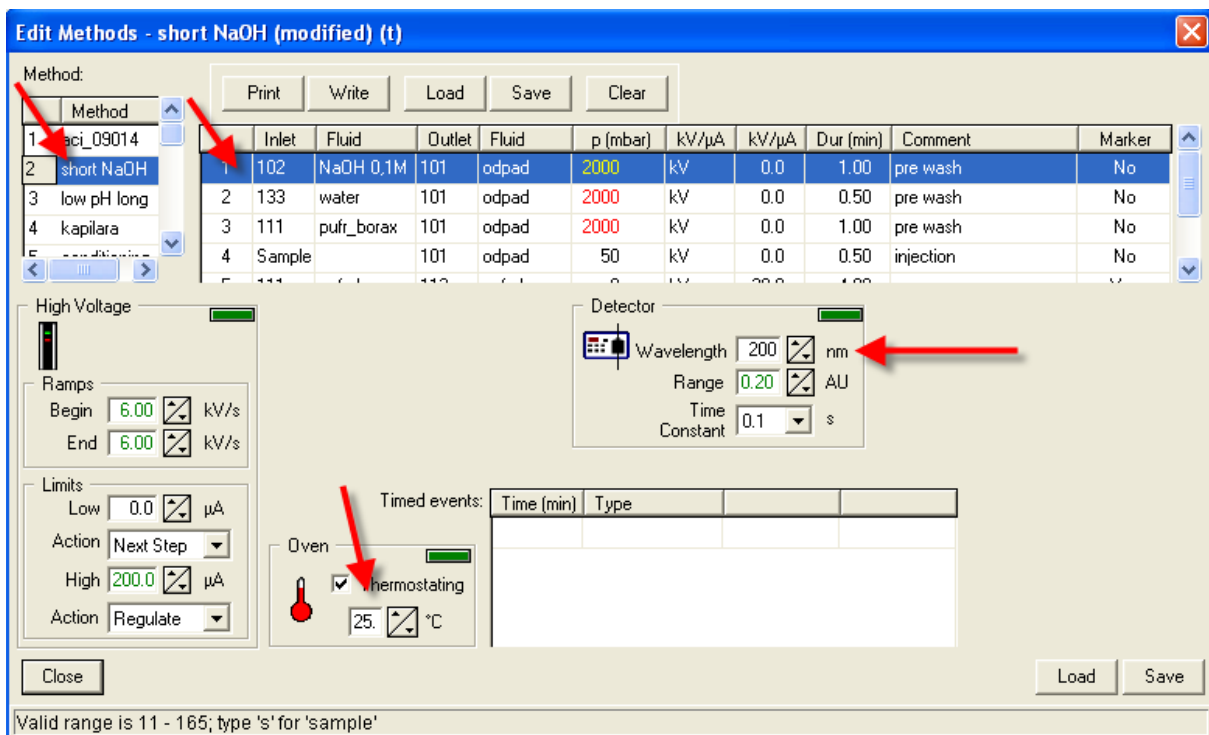


Spouštěcí ikonka na ploše:

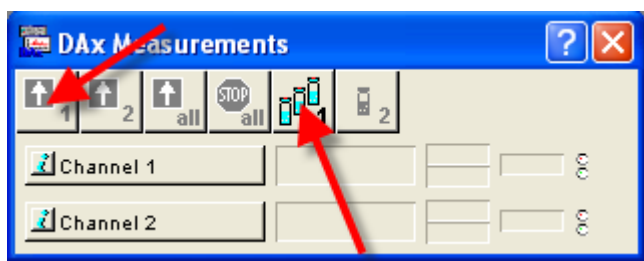
Základní ovládací panel (šipky označují tlačítka ovládání)



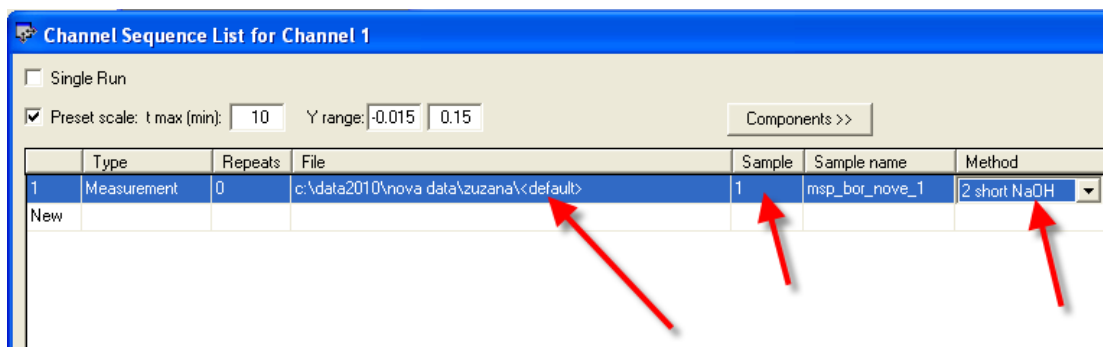
metoda (sled příkazů při experimentu)



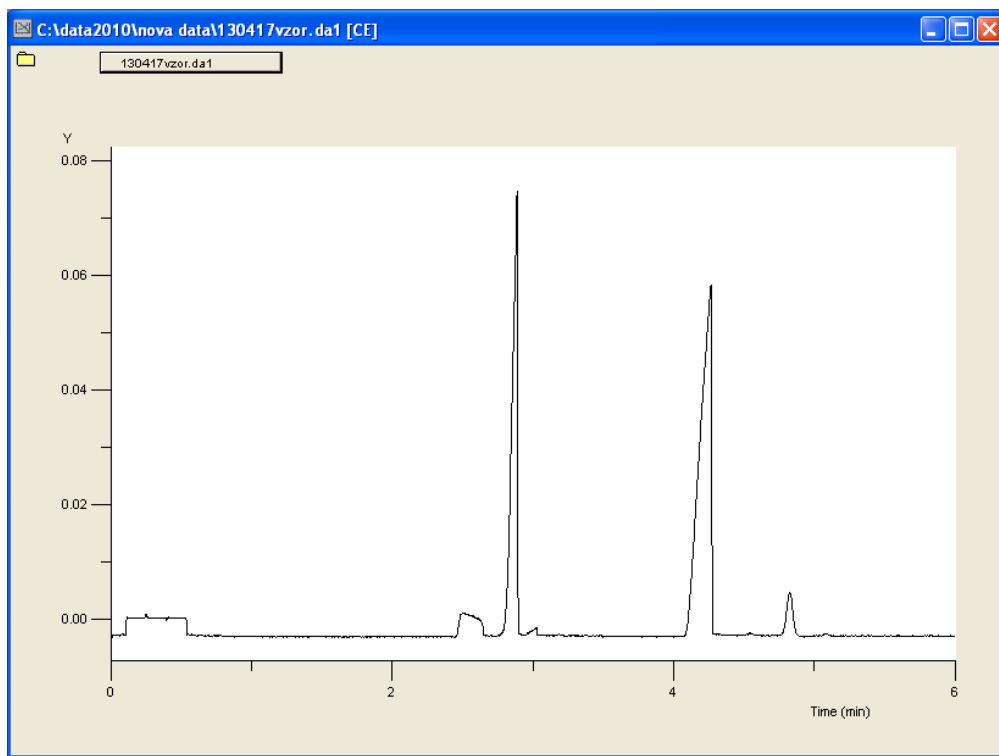
ovládací okno sběru dat (experimentu)



zadávání jednotlivého experimentu:



Typický elektroforeogram



## LITERATURA A ZDROJE

Český Lékopis 2009

R. Opatřilová, J. Jampílek, I. Liška, Návody do cvičení z analytické chemie. Kvantitativní analýza, VFU Brno, 2007

R. Karlíček a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 2005

J. Šenkýř, P. Lubal, Vybrané postupy pro základní cvičení z analytické chemie, Kvalitativní a kvantitativní analýza, Masarykova Univerzita, Brno 2004

Multimediální učebnice PŘF UPOL (procvičování výpočtů):

<https://ach.upol.cz/multimedialni-ucebnice>

L. Jančář, Odměrná analýza

<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pdf/js10/chemie/web/index.html>

I. Nikolova, Chromatografické metody, ČHÚ

[http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke\\_metody\\_2014.pdf](http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf)

Příručka pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie,

<https://docplayer.cz/20193876-Prirucka-pro-zacinajici-vyucujici-predmetu-cviceni-z-analyticke-chemie.html>

pracovní listy:

<https://amos.vfu.cz/moodle>

Autoři:	Jiří Pazourek, Iva Kapustíková, Klára Odehnalová
Název:	Cvičení z analytické chemie 2. Analytická chemie kvantitativní.
Ústav:	Ústav chemických léčiv
Počet stran:	58
Vydání:	1. vydání
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

**ISBN 978-80-7305-735-0**