

<i>Jména</i>	Datum provedení	
<b>Stanovení koncentrace <i>o</i>-nitrobenzaldehydu v neznámém vzorku na HPLC</b>		
	Datum odevzdání	

### Úkol

Naměř a správně zpracuj kalibrační křivku s vnitřním standardem pro *o*-nitrobenzaldehyd. Stanov koncentraci *o*-nitrobenzaldehydu v neznámém vzorku.

### Pracovní postup

Obecný postup pro vypracování kalibrační křivky s vnitřním standardem je popsán v dokumentu Calibration curve 100311.doc a výpočet je připraven v dokumentu CalibrationCurve100317.xls. Prostuduj tyto dokumenty než začneš pracovat.

*o*-nitrobenzaldehyd a methylbenzoát (který je možno použít jako vnitřní standard) se dají rozdělit na chromatografické koloně s reversní fází C18 za použití eluentu směsi methanolu s vodou v poměru 3:2.

1. Zjistí absorpční spektra obou látek a stanov vhodnou vlnovou délku detekce.
2. Chceme, aby kalibrační křivka pokrývala oblast nejméně od  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Příprav vzorek s koncentrací analytu, která bude odpovídat zhruba koncentraci uprostřed kalibrační křivky. Nastříkni tento vzorek na HPLC bez vnitřního standardu, abys zjistil retenční čas *o*-nitrobenzaldehydu a velikost jeho odezvy. Také připrav a nastříkni samostatný vzorek vnitřního standardu. Pokud jsou píky příliš od sebe vzdálené je možno zvýšit průtok eluentu kolonou. Podle velikostí ploch píků nastav vhodnou citlivost detektoru. Plochy píků by měly být řádově srovnatelné – do poměru 1/10 – podle toho zvol vhodně poměry koncentrací analytu a vnitřního standardu.

3. Příprav vhodný vzorek ze středu kalibrační křivky, který bude obsahovat analyt i vnitřní standard a proved' jeho měření. Na tomto vzorku ověř vhodnost zvolené analytické metody a pak již zachovej podmínky pro měření celé kalibrační křivky i neznámého vzorku. Zejména zkontroluj, že dojde k dobré separaci píků – dá se ovlivnit složením eluentu a rychlostí průtoku, že píky mají podobou odezvu a nepřesahují rozsah. Pokud vše vypadá dobře dej se do vlastního měření kalibrační křivku.

4. Každý vzorek změř dvakrát a pokud se poměr ploch liší o více než 5 % měření zopakuj potřetí.

5. Separátním navážením a naředěním analytu i vnitřního standardu připrav 'neznámý vzorek', změř jeho chromatografickou odezvu a srovnej koncentraci získanou z navážky z kalibrační křivky.

### Závěr

*Diskutuj zvolenou vlnovou délku detekce, složení eluentu, přesnost stanovení na HPLC, přesnost kalibrační křivky. PS. Italicou psaný text nahrad'.*