

INSTRUMENTÁLNÍ ANALYTICKÁ CHEMIE – ÚPRAVY A ZMĚNY

ÚLOHA č. 1

CHROMATOGRAFICKÉ DĚLENÍ ANIONTŮ NA IONEXECH

- dle návodu ve skriptech

ÚLOHA č. 2

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

2.1.3. Nastavení podmínek pro metodu 3 – metodu vybereme dle pokynů vyučujícího

2.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ K MĚŘENÍ

1. Připravíme kalibrační roztoky pro methanol o obsahu methanolu 0,02 %, 0,04 %, 0,06 % a 0,08 % (v/v), tj. mikropipetou přesně napipetujeme 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l a 80 μ l methanolu do odměrných baněk na 100 ml a doplníme destilovanou vodou po rysku. Jednotlivé roztoky pro kalibrační závislost umístíme na 5 min do ultrazvukové lázně.
2. Připravíme směs čtyř alkoholů (methanol, ethanol, n-propanol a isobutanol) ve vodě, obsah jednotlivých látek 0,03 % (v/v), tj. do 100 ml odměrné baňky napipetujeme postupně 30 μ l jednotlivých složek a doplníme destilovanou vodou po rysku. Roztok umístíme na 5 min do ultrazvukové lázně.
3. Připravíme směs čtyř alkoholů (methanol, ethanol, isopropanol a isobutanol) s acetonem ve vodě, obsah jednotlivých látek 0,05 % (v/v), tj. do 100 ml odměrné baňky napipetujeme postupně 50 μ l jednotlivých složek a doplníme destilovanou vodou po rysku. Roztok umístíme na 5 min do ultrazvukové lázně.
4. Připravíme vzorek konzumního destilátu o neznámé koncentraci methanolu, do odměrné baňky na 100 ml napipetujeme 1 ml vzorku konzumního destilátu a doplníme destilovanou vodou po rysku (příp. dle množství vzorku do odměrné baňky na 10 ml napipetujeme 0,1 ml vzorku konzumního destilátu a doplníme destilovanou vodou po rysku). Roztok umístíme na 5 min do ultrazvukové lázně.
5. Připravíme vzorek konzumního destilátu o neznámé koncentraci methanolu s přidavkem standardu methanolu do odměrné baňky na 100 ml napipetujeme 1 ml vzorku destilátu a 50 μ l standardu methanolu, doplníme destilovanou vodou po rysku (příp. dle množství vzorku do odměrné baňky na 10 ml napipetujeme 0,1 ml vzorku konzumního destilátu a 25 μ l standardu methanolu, doplníme destilovanou vodou po rysku). Roztok umístíme na 5 min do ultrazvukové lázně.

2.4. METODY STANOVENÍ METHYLALKOHOLU V KONZUMNÍM DESTILÁTU

2.4.1. Metoda kalibrační přímky

Metoda založená na sestavení grafické závislosti měřené veličiny na zvyšující se koncentraci kalibračních roztoků o známé koncentraci. Z této kalibrační křivky se hodnota hledané veličiny neznámého vzorku odečte. Použití metoda kalibrační křivky je oprávněné v případě, že všechny

vzorky a standardy jsou si svými vlastnostmi rovnocenné, tzn. že můžeme zanedbat vliv matrice vzorku.

POSTUP:

Z jednotlivých chromatogramů pro stanovení methanolu si opišeme následující položky pro vytvoření kalibrační závislosti v *Excelu*:

- retenční čas t_R v min,
- plochu píku A v $mV \cdot s$,
- výšku píku h v mV,
- šířku píku w , příp. $w_{0,5}$ je třeba dopočítat

Ze získaných hodnot sestojíme kalibrační závislost pro jednotlivé objemové koncentrace methanolu a z rovnice regrese vypočítáme obsah methanolu ve vzorku konzumního destilátu (je nutné počítat také s ředěním vzorku)

2.4.2. Metoda přidavku standardu

Metoda přidavku standardu předpokládá splnění podmínky linearit kalibrační závislosti mezi plochou píku a stanovovanou koncentrací. Její výhodou je eliminace vlivu matrice. Ke stanovovanému vzorku se přidá známé množství téže látky, u které se má stanovit neznámá koncentrace. Vždy se musí udělat nejméně dva nástříky vzorku – při prvním se dává přesné množství vzorku, při druhém se dává přesné množství směsi.

Koncentraci obsahu methanolu v neznámém vzorku při přidavku jednoho standardu ke vzorku určíme podle následujícího vzorce:

- a) v případě, že, matrice a celkový objem je konstantní – tzv. *metoda dvou roztoků*

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{(A_{vz+st} - A_{vz})} \cdot \frac{V_{st} \cdot c_{st}}{V_{vz}}$$

- b) v případě, že celkový objem není konstantní – tzv. *metoda jednoho roztoku*

$$c_{vz} = \frac{V_{st}}{V_{vz}} \cdot \frac{c_{st}}{\frac{A_{vz+st}}{A_{vz}} \cdot \frac{(V_{vz} + V_{st})}{V_{vz}} - 1}$$

kde: c_{vz} je koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku,
 c_{st} je koncentrace standardu,
 V_{vz} je objem stanovovaného vzorku,
 V_{st} je objem přidaného standardu,
 A_{vz} je plocha píku stanovovaného vzorku,
 A_{vz+st} je plocha píku stanovovaného vzorku a standardu.

ÚLOHA č. 3

RP-HPLC

CÍLE ÚLOHY

- seznámit se s principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie

POUŽITÉ VYBAVENÍ:

Chemikálie:

Mobilní fáze: CH₃OH:voda 70:30 (v/v).

Zásobní roztoky: testovací směs a 0,02% roztok thiomochoviny.

Přístrojové vybavení:

HPLC systém Watrex (1 pumpa DeltaChrom™ P102 pump s průtokem 0,01–9,99 ml min⁻¹ s maximálním pracovním tlakem 42 MPa, chyba 0,2 % na 1 ml min⁻¹, fotometrický detektor DeltaChrom™ UV250 detektor, řídicí software EZStart, chromatografická kolona Watrex 250x4,0 mm Reprosil 100 C18 kolona 5μm (příp. chromatografická kolona Watrex 250x4,0 mm Reprosil 100 C8 kolona 5μm), dávkovač DeltaChrom™ Manual Injection Kit s objemem 20 μl), ultrazvuková lázeň.

SCHÉMA PRACOVNÍHO POSTUPU:

- 3.1. Seznámení s metodou
- 3.2. Popis a základní schéma kapalinového chromatografu
 - 3.2.1. Vyhodnocení chromatografického záznamu
- 3.3. Provedení chromatografického stanovení v chromatografické soustavě s reverzní fází (tzv. reverse phase HPLC)
 - 3.3.1. Příprava chromatografu k měření a sběru dat
 - 3.3.2. Příprava testovací směsi a roztoku thiomochoviny.
 - 3.3.3. Optimalizace podmínek stanovení, ověření funkčnosti a stavu chromatografické kolony.
 - 3.3.4. Stanovení mrtvého objemu kolony V_M pomocí inertní látky (thiomochovina)
 - 3.3.5. Statistické vyhodnocení
- 3.4. Vyhodnocení chromatografické separace

3.3. PROVEDENÍ CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie RP-HPLC je druhem kapalinové chromatografie s reverzní fází, což znamená, že mobilní fází (MF) je většinou organické rozpouštědlo a stacionární fází (SF) je pevná látka. Mobilní fáze je pak tlačena skrz nepohyblivou a nemísitelnou stacionární fází. Principem HPLC je různá afinita vzorku ke stacionární fází. Čím vyšší má vzorek afinitu ke stacionární fází, tím větší je jeho zadrž a pozdější eluce, dochází tedy k separaci látek.

Vzorek je kolonou nuceně transportován postupným přitékáním mobilní fáze. Tento proces se nazývá eluce.

Výsledkem měření pomocí metody HPLC je chromatogram, z něhož zjišťujeme retenční čas jednotlivých analytů, popřípadě koncentraci, atd

Nejdůležitější kvalitativní charakteristikou látek rozdělujících se mezi stacionární a mobilní fází je kapacitní faktor, pro jehož výpočet je nezbytné znát mrtvý čas dané kolony. Mrtvý čas t_0 je čas, za který projde kolonou nezadržovaná látka, tzn. látka, která prakticky neinteraguje se stacionární fází (SF). Je-li tedy SF velmi polární (nemodifikovaný silikagel), můžeme mrtvý čas ztotožnit s retenčním časem velmi nepolární kapaliny, tj. markeru (např. hexanu), je-li SF velmi nepolární (C18), pak markerem může být velmi polární molekula, např. aceton.

Při znalosti průtokové objemové rychlosti (F , ml·min⁻¹), lze vypočítat V_M mrtvý objem kolony z času

t_M .

3.3.1. Příprava chromatografu k měření a sběr dat

- Zapneme zařízení, a to v pořadí detektor, pumpa, počítač (nutné nažhavení detektoru po dobu 30 minut). Veškeré MF je nutné odplynit na ultrazvukové lázni po dobu minimálně 20 minut.
- Jakmile je detektor nažhavený, přistoupíme k ekvilibraci kolony.
- Zkontrolujeme, zda je nasávací hadička s filtrem ponořena pod hladinou MF.
- Vezmeme stříkačku (30 ml se šroubovacím zakončením) a nasadíme na výpustní ventil pumpy. Otevřeme opatrně ventil a pomalu natahujeme mobilní fázi z odměrné baňky, to zajistí odstranění bublin z koloběhu mobilní fáze. Před sejmutím stříkačky z výpustního ventilu vždy ventil opět uzavřeme. Natáhnutí mobilní fáze opakujeme alespoň 2x. Poté ještě hadičku zkontrolujeme pohledem a případné bublinky sklepeme a znovu natáhneme stříkačkou. **!POZOR!** Při vniknutí bublin do kolony může dojít k jejímu poškození.
- Na pumpě nastavíme požadovaný průtok ($0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) pro stanovení a teprve nyní můžeme spustit pumpu tlačítkem "RUN". Počkáme, až je tlak na pumpě konstantní.
- Pak spustíme program EZStart, v úvodní nabídce vybereme metodu test254.met (najdeme ji na cestě c:\Ezstart\Methods\test254.met). Pomocí této metody necháme ekvilibrovat kolonu a také při ní budeme provádět jednotlivá měření.
- Spustíme Preview na horní liště programu, které slouží k ekvilibraci kolony.
- Počkáme, až se ustálí základní linie (base line) po dobu 40 minut, což odpovídá 20 kolonovým objemům.
- Ekvilibraci ukončíme červeným tlačítkem "RUN STOP".

3.3.2. Příprava testovací směsi a roztoku thiomocoviny

Příprava testovací směsi:

Testovací směs připravíme napipetováním 2 ml acetonu, 0,5 ml benzenu a 0,5 ml toluenu do odměrné baňky na 25 ml, doplníme methanolem po rysku. Připravenou směs umístíme na 20 min do ultrazvukové lázně.

Příprava 0,02% roztoku thiomocoviny:

Do odměrné baňky na 100 ml připravíme navážením 0,02% roztok thiomocoviny rozpuštěním ve vodě.

3.3.3. Optimalizace podmínek stanovení, ověření funkčnosti a stavu chromatografické kolony.

Dávkování vzorku dávkovacím kohoutem

- Před zahájením vlastního měření je doporučeno několikrát propláchnout dávkovací kohout destilovanou vodou, methanolem nebo mobilní fází. Promývat dávkovací kohout budeme pomocí injekční stříkačky s nasazovací jehlou. **!POZOR!** Zasunutá jehla nesmí propíchnout septum dávkovacího kohoutu, zasunujeme ji tedy velmi opatrně a poté, co ucítíme odpor, se s jehlou vrátíme o několik mm zpět.
- Vzorek dávkovaný na kolonu musí být čistý, částice nebo zákal mohou nevratně znehodnotit kolonu.
- Vzorky obsahující rozpuštěné plyny (např. metanolicke roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvdzdušnit v ultrazvukové lázni.

Naplnění smyčky dávkovače a nástřik vzorku na kolonu

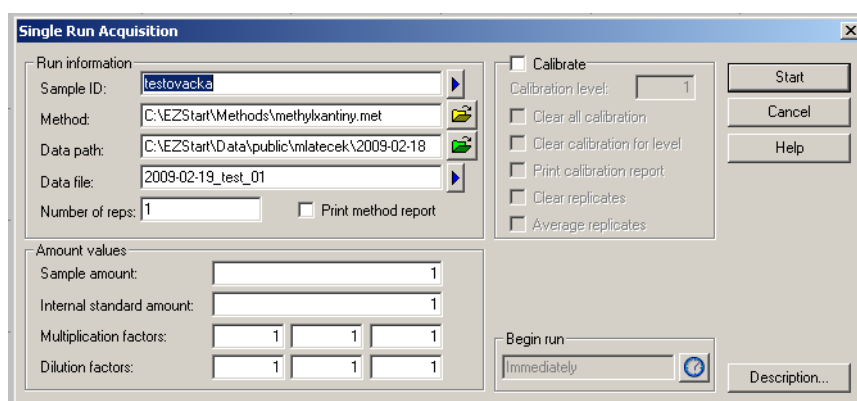
- Po ekvilibraci kolony můžeme nástříknout testovací roztok. Testovací roztok se měří při 254 nm. Aceton má funkci inertního analytu, tudíž se vůbec nezachytává na stacionární fázi, proto se čas jeho eluce bere jako mrtvý retenční čas. Toto slouží k výpočtu kapacitních faktorů. Dávkovací zařízení je opatřeno kohoutem s polohou 1 (load) a 2 (inject). V poloze 1 (levá poloha) plníme smyčku, aniž by docházelo k unášení analytu mobilní fází, v poloze 2 (pravá poloha) je analyt unášen mobilní fází. Než dojde k nástřiku, musí být dávkovací zařízení vždy v poloze 1.
- Při plnění dávkovací smyčky o objemu 20 μl se páčka dávkovače přepne do pohotovostní horní polohy 1 (levé polohy), do dávkovacího otvoru se **jemně** zasune jehla injekční stříkačky (**POZOR!** Nezasouvat násilím na doraz) a tlakem na píst injekční stříkačky se naplní dávkovací smyčka

dávkovače (na konci odpadní kapiláry odkápne 3–5 kapek).

- Páčka se přepne do pravé spodní polohy a jehla se vytáhne. Tím se uvnitř dávkovače přepne směr toku mobilní fáze tak, že prochází smyčkou.

Měření vzorku

- Zkontrolujeme zda je páčka dávkovače v pohotovostní horní poloze 1 (levá poloha)
- Vezmeme stříkačku (např. Hamilton) s obsahem 25 μl a několikrát ji propláchneme destilovanou vodou. Nabereme do stříkačky objem 2.5 μl z testovacího roztoku tak, aby ve stříkačce nebyla žádná bublinka.
- Zasuneme stříkačku rovně do dávkovacího zařízení skrz septum.
- Před nadávkováním vzorku je potřeba spustit program pro sběr naměřených dat.
- Ke spuštění programu použijeme modrou šipku na horní liště, po jejím spuštění se objeví okno, ve kterém musíme vyplnit název vzorku (sample ID), cestu pro uložení naměřených hodnot (data path) a název souboru, pod kterým se jednotlivé měření uloží (data file). V řádku Method také zkontrolujeme, zda máme správně zvolenou metodu.



- Pro další informace slouží Description, kde si můžeme popsat kolik dávkujeme vzorku, na jakou kolonu, jakou mobilní fázi používáme a jaký je průtok
- Měření spustíme tlačítkem Start. Než dojde k nástřiku jakéhokoliv vzorku, musíme počkat, až se na obrazovce objeví *waiting for trigger* což znamená, že je software připraven a čeká na nástřik vzorku.



- Až je na liště vidět nápis *waiting for trigger*, pohybem pístu stříkačky nadávkujeme 2,5 μl testovací směsi. Ihned po nadávkování otočíme páčku dávkovače do polohy 2, teprve poté vytáhneme stříkačku z dávkovacího zařízení.
- Před ukončením analýzy nejprve vrátíme páčku dávkovače do polohy 1 a teprve poté analýzu ukončíme červeným tlačítkem „RUN STOP“.
- Testovací směs proměříme 3x při průtoku 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (pro kolonu C8) nebo 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (pro kolonu C18).

3.3.4. Stanovení mrtvého objemu kolony V_M pomocí inertní látky (thiomočovina)

- Nástřiknutím látky, která není zadržovaná sorbetem, se stanoví tzv. mrtvý čas t_M , tj. doba, za kterou kolonou projde látka zcela inertní vůči sorbetu. Při znalosti průtokové objemové rychlosti (F , ml/min), lze vypočítat mrtvý objem kolony V_M . Odečteme čas t_M a s použitím údaje F vypočteme mrtvý objem kolony V_M .
- Měření thiomočoviny provedeme stejným způsobem jako měření testovací směsi.
- Thiomočovinu proměříme 3x při průtocích 0,25; 0,4; 0,5 a 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, vždy nadávkujeme 5 μl (příp. 10 μl) stanovované látky.

- Sestrojíme van Deemterovu křivku závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H na průměrné lineární rychlosti MF, kde minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které kolona vykazuje největší účinnost a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů. (Délka kolony C18 je 250 mm, délka kolony C8 je 100 mm)

3.4. VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE

1. Provedeme identifikaci látek testovací směsi, zdůvodníme pořadí jednotlivých analytů v chromatogramu.
2. Z chromatogramů určíme pomocí programu EZStart-offline pro jednotlivé látky retenční časy t_R , výšky h a šířky signálů ($w_{0,5}$).
3. Vyhodnotíme chromatografický záznam a stanovíme faktory, které mají vliv na chromatografické stanovení (rozlišení, účinnost kolony, kapacitní poměry separovaných látek, atd.).
4. Vypočítáme mrtvý objem kolony V_M .
5. Sestrojíme van Deemterovu křivku. Vyhodnotíme a zdůvodníme jakým způsobem ovlivňuje zvyšující se průtok zónu analytů.
6. Provedeme statistické vyhodnocení jednotlivých stanovení.
7. Zdůvodnění případných problémů během analýzy.

ÚLOHA č. 4

IZOTACHOFORÉZA

CÍLE ÚLOHY:

- seznámit se s principy s izotachoforézy
- kvantitativně stanovit kyselinu citronovou v ovoci, džusech a potravinářských doplňcích (vitaminových preparátech)

SCHÉMA PRACOVNÍHO POSTUPU:

- 4.1. Seznámení s metodou ITP
 - 4.1.1. Popis a základní schéma instrumentace ITP
 - 4.1.2. Způsoby vyhodnocení ITP
- 4.2. Stanovení kyseliny citronové pomocí metody přidavku standardu (přídavek více standardů)
 - 4.2.1. Obecná charakteristika kyseliny citronové
 - 4.2.2. Příprava zásobního roztoku a úprava vzorku
 - 4.2.3. Měření jednotlivých vzorků
- 4.3. Vyhodnocení analýzy

4.2. STANOVENÍ KYSELINY CITRONOVÉ POMOCÍ METODY PŘÍDAVKU STANDARDU (PŘÍDAVEK VÍCE STANDARDŮ)

4.2.1 Obecná charakteristika kyseliny citronové

Kyselina citrónová je významným konzervačním činidlem, které je přidáváno do potravin z důvodu prodloužení jejich trvanlivosti. Obsah této látky je deklarován státními normami a její použité množství by mělo být uvedeno na obalech výrobků. Pomocí izotachoforetického analyzátoru lze kontrolovat obsahy této konzervační látky.

KYSELINA CITRONOVÁ E 330

- skupina - regulátor kyselosti, antioxidant

- charakteristika - nachází se v ovoci a zelenině (především v citrusových plodech), průmyslově se získává z citrónové šťávy nebo kvašením melasy
- využití - v potravinářství jako konzervační a dochucovací látka, zabraňuje množení bakterií a plísní v ovocných sirupech a nealkoholických nápojích, zpomaluje žluknutí a stabilizuje barvu ovocných výrobků
- účinky na lidský organismus - ve velkém množství brání vstřebávání vápníku

4.2.2. Příprava standardů a úprava vzorku

PŘÍPRAVA VEDOUCÍHO A KONCOVÉHO ELEKTROLYTU

1. VEDOUCÍ ELEKTROLYT: 10 mM HCl + 20 mM β -alanin + 0,1 % HPMC (pH = 3,6) Do kádinky na 100 ml naplněné asi 50 ml destilované vody napipetujeme tolik konc. HCl, aby její výsledná koncentrace po převedení obsahu kádinky do 250 ml odměrné baňky byla 10 mM, přidáme vypočítanou navážku 0,02 M β -alaninu. Po rozpuštění všech látek přidáme 20 ml 0,1 % HPMC a roztok kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 250 ml. V případě nutnosti upravíme elektrolyt před doplněním po rysku odplyněním v ultrazvukové lázni. Doplníme odměrnou baňku po rysku.
2. KONCOVÝ ELEKTROLYT: 5 mM kyselina glutamová. Koncový roztok připravíme navážením kyseliny glutamové do 100 ml odměrné baňky, doplníme po rysku. Důkladného promíchání dosáhneme odplyněním v ultrazvukové lázni. pH neupravujeme, je adjustováno protiiontem z vedoucího elektrolytu.

PŘÍPRAVA ROZTOKŮ KYSELINY CITRONOVÉ

K přípravě roztoků kyseliny citronové použijeme zásobní roztok 10 mM kyseliny citronové, případně vypočítáme navážku zásobního roztoku kyseliny citronové do 100 ml odměrné baňky, kterou navážeme a rozpustíme v přibližně 50 ml destilované vody, kvantitativně převedeme do odměrné baňky na 100 ml a doplníme po rysku.

Z tohoto roztoku připravíme do tří odměrných baněk na 25 ml následující roztoky, které doplníme destilovanou vodou po rysku:

Objem V pipetovaného množství vzorku (ml)	Koncentrace standardu roztoku kys.citronové (mmol/l)
2,5	0,0
2,5	0,3
2,5	0,6
2,5	0,9

4.2.3. Měření jednotlivých vzorků

Podle návodu k obsluze uvedeném v kapitole Přístroje a přístrojové vybavení připravíme přístroj k měření. Zvolíme optimální metodu a pomocí programu ITPWin provedeme analýzu – *dle pokynů vyučujícího*.

Do grafu vynášíme délku zóny v závislosti na koncentraci přídavku kyseliny citronové. Množství neznámého vzorku získáme zpracováním lineární regrese.

Rovnice měření:

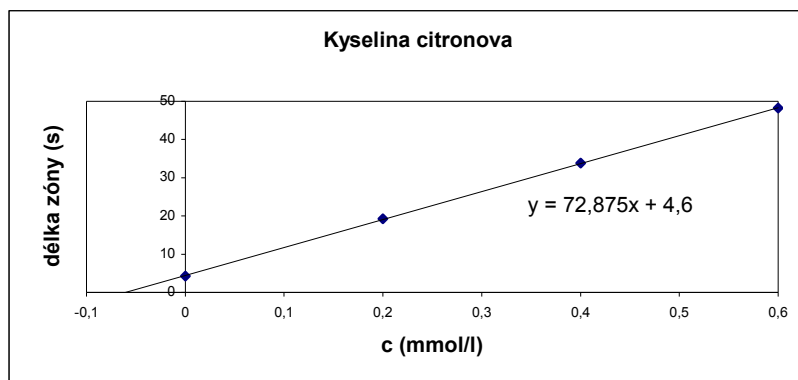
$$c_{vz} = \frac{c_{st}}{V_{vz}} \cdot \frac{b_0}{b_1}$$

Kde: b_0 je úsek,

b_1 je směrnice,

c_{vz} je koncentrace vzorku v mmol/l,

c_{st} je koncentrace standardu v mmol/l.



Obr. 4.3: Příklad sestrojení grafu pro stanovení kyseliny citronové metodou přidavku standardu

4.3. VYHODNOCENÍ ANALÝZY

Do závěru uvedeme:

1. Graf závislosti délky zóny na koncentraci přidavku kyseliny citronové.
2. Množství neznámého vzorku získáme zpracováním lineární regrese. Obsah kyseliny citronové v neznámém vzorku uvedeme zaokrouhlený na platný počet míst.
3. Srovnáme deklarovaný obsah kyseliny citronové v džusu nebo vitamínovém přípravku s obsahem námi zjištěným (pokud není uveden na obalu výrobku, pokusíme se ho zjistit z dostupných zdrojů) a diskuse výsledků uvedeme v závěru.
4. Zdůvodnění možného chybného stanovení, zhodnocení případných problémů během analýzy.

ÚLOHA č. 5

VÍCESLOŽKOVÁ FOTOMETRICKÁ ANALÝZA

- dle návodu ve skriptech

ÚLOHA č. 6

SPEKTROFOTOMETRIE

- dle návodu ve skriptech

ÚLOHA č. 7

EXTRAKČNÍ FOTOMETRIE

- dle návodu ve skriptech

ÚLOHA č. 8

ATOMOVÁ ABSORPČNÍ A EMISNÍ SPEKTROMETRIE

8.1. PŘÍPRAVA VZORKU MULTIVITAMÍNOVÉHO PŘÍPRAVKU

Celou tabletu zalijeme ve 100 ml kádince 10 ml 10% roztoku kyseliny dusičné. Kádinku s multivitaminovým přípravkem mírně zahříváme, až se tableta rozpadne. Poté obsah kádinky zředíme na 60 ml horkou destilovanou vodou a za horka přefiltrujeme přes papírový filtr do odměrné baňky o objemu 100 ml. Do baňky přitom musíme dostat kvantitativně veškerý roztok z kádinky, tzn. kádinku je nutno několikrát vypláchnout malým množstvím vody a přefiltrovat. Filtr následně promyjeme malým množstvím destilované vody ze stříčky. Odměrnou baňku poté doplníme vodou po značku a promícháme

Takto získaný roztok multivitaminového přípravku vhodně naředíme 1% roztokem HNO_3 tak, aby koncentrace analytů (Zn i K) ležely asi uprostřed kalibrační závislosti, tj. pro stanovení draslíku K napipetujeme 5 ml roztoku multivitaminového přípravku do 50 ml odměrné baňky a doplníme 1% HNO_3 po rysku, pro stanovení zinku Zn napipetujeme 1 ml roztoku multivitaminového přípravku do 100 ml odměrné baňky a doplníme po rysku 1% HNO_3 . Důležité je vše řádně promíchat.

Stejným způsobem provádíme i přípravu slepého stanovení (blank), včetně zahřívání (pouze obsah v kádince zředíme studenou destilovanou vodou ze stříčky) a filtrace. Takto získaný roztok blanku naředíme pro stanovení K a Zn stejným způsobem jako multivitaminový přípravek

ÚLOHA č. 9

FOTOMETRICKÁ TITRACE

9.1. STANDARDIZACE 0,01 M ROZTOKU CHELATONU III NA NAVÁŽKU REKRYSALOVANÉHO CHLORIDU OLOVNATÉHO S FOTOMETRICKOU INDIKACÍ BODU EKVIVALENCE

9.1.3. Orientační titrace s vizuální indikací

Účelem této titrace je seznámení s obsluhou mikrobyrety a určení oblasti, kde dochází k barevnému přechodu. Při následné titraci s fotometrickým měřením je možné se soustředit na přesné určení barevné změny a stanovení spotřeby Chelatonu III v ekvivalenčním bodě.

Návod k obsluze mikrobyrety PK2500 je uveden v kapitole Přístroje a přístrojové vybavení.

Příprava roztoku k orientační titraci

Mikrobyretu naplníme odměrným roztokem Chelatonu III podle odstavce pro práci s mikrobyretou PK2500 v kapitole Přístroje a přístrojové vybavení.

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetujeme přesně 10 ml připraveného roztoku standardu, 10 ml destilované vody, špachtlí přidáme malé množství směsi xylenolové oranže s KNO_3 tak, aby roztok byl zřetelně slabě fialový. Kyvetu s roztokem postavíme na ploténku magnetické míchačky, zapneme míchání a obsah mírnými otáčkami dobře promícháme. Po promíchání přidáme tři kapky 10% roztoku urotropinu (tlumivý roztok).

K míchačce přistavíme stojan s naplněnou mikrobyretou.

Titrace

Při vlastní titraci budeme přidávat z mikrobyrety odměrný roztok po 0,2 ml a za stálého míchání vizuálně pozorovat roztok až do přechodu barvy z fialové do čistě žluté. Nadávkovaný objem odečteme na stupnici mikrobyrety.

9.1.4. Fotometrická titrace

Příprava roztoku k fotometrické titraci

Mikrobyretu naplníme odměrným roztokem Chelatonu III.

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetujeme přesně 10 ml připraveného roztoku standardu, 10 ml destilované vody, špachtlí přidáme malé množství směsi xylenolové oranže s KNO_3 tak, aby roztok byl zřetelně slabě fialový. Kyvetu s roztokem postavíme na ploténku magnetické míchačky, zapneme míchání a obsah mírnými otáčkami dobře promícháme. Po promíchání přidáme tři kapky roztoku 10% urotropinu (tlumivý roztok). Pokud jsme přidali správné množství, pak při vlnové délce 580 nm je absorbance roztoku před započítáním titrace v rozmezí 0,5 až 0,7.

Titrace

Při vlastní titraci budeme přidávat z mikrobyrety odměrný roztok nejprve po 0,2 ml a zaznamenávat absorbanci. Jakmile se budeme blížit k předpokládanému bodu ekvivalence, snížíme objem přidávaného činidla dle potřeby až na 0,005 ml a méně (nejmenší objem, který lze dávkovat mikrobyretou je 0,002 ml).

Titraci opakujeme třikrát.

9.2 TITRAČNĚ FOTOMETRICKÉ CHELATOMETRICKÉ STANOVENÍ KATIONTU Cu^{2+} V NEZNÁMÉM VZORKU PŘI 460 nm

9.2.1. Fotometrická titrace neznámého vzorku obsahujícího Cu^{2+}

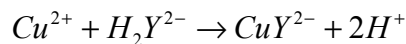
Reakce probíhá při mírně zásaditém pH nepřekračujícím hodnotu 8. Tohoto pH dosáhneme přidávkem amoniakálního tlumiče.

Měď tvoří s murexidem chelát žluté barvy (CuInd). Při titraci roztokem Chelatonu III se nejprve na Chelaton III vážou volné ionty Cu^{2+} , chelát CuY^{2-} je modrý. V okolí bodu ekvivalence dojde k barevné změně způsobené reakcí



Volný indikátor má při daném pH modrofialovou barvu.

STECHEIOMETRIE:



$$1 \text{ mol Na}_2\text{H}_2\text{Y} \approx 1 \text{ mol Cu}^{2+}$$

$$M(\text{Cu}) = 63,546 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Stechiometrické relace pro objemy titračního činidla uvádí následující tabulka:

0,01 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$	Cu^{2+}
1 ml	635,5 μg
0,1 ml	63,55 μg
0,01 ml	6,355 μg
0,001 ml	0,635 μg

Příprava vzorku

Neznámý vzorek ve 100 ml odměrné baňce doplníme po značku destilovanou vodou a dobře promícháme

Orientační titrace s vizuálním pozorováním barevné změny

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetujeme 10 ml roztoku vzorku s neznámým obsahem mědi, 10 ml destilované vody, 2 kapky 2 M HNO_3 a špachtlí přidáme takové množství murexidu, aby se roztok zbarvil do středně syté oranžové barvy. Kyvetu pak umístíme na plotýnku magnetické míchačky a po zapnutí míchání její obsah řádně promícháme. Poté přidáme 5 kapek amoniakálního tlumiče a roztok opět promícháme. Roztok je žlutozelený.

K míchačce přistavíme stojan s mikrobyretou, kterou jsme naplnili roztokem odměrného činidla. Při vlastní titraci budeme přidávat z mikrobyrety odměrný roztok po 0,2 ml a pozorovat za stálého míchání zbarvení roztoku až do přechodu žlutého do čistě fialového. Nadávkovaný objem odečteme na stupnici mikrobyrety. Přesvědčíme se, že za těchto podmínek (malé objemy) vizuálně nelze určit přesně bod ekvivalence.

Nastavení fotometru

Před každou titrací provedeme pro určenou vlnovou délku nastavení fotometru při vložené srovnávací kyvetě s destilovanou vodou.

Příprava roztoku k fotometrické titraci

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetujeme 10 ml roztoku vzorku s neznámým obsahem mědi, 10 ml destilované vody, 2 kapky 2 M HNO_3 a špachtlí přidáme takové množství murexidu, aby se roztok zbarvil do středně syté oranžové barvy. Pokud jsme přidali správné množství, pak při vlnové délce 460 nm je absorbance roztoku před započítáním titrace v rozmezí 0,4 až 0,5. Kyvetu pak umístíme na plotýnku magnetické míchačky a její obsah řádně promícháme. Poté přidáme 5 kapek amoniakálního tlumiče a roztok opět promícháme. Roztok je žlutozelený a měl by vykazovat absorbanci mezi 0,6–0,8.

Fotometrická titrace

Při vlastní titraci budeme přidávat z mikrobyrety odměrný roztok nejprve po 0,2 ml a zaznamenávat absorbanci. Jakmile se budeme blížit k předpokládanému bodu ekvivalence, snížíme objem přidávaného činidla dle potřeby až na 0,005 ml a méně (nejmenší objem, který lze dávkovat mikrobyretou je 0,002 ml).

Titraci opakujeme třikrát.

ÚLOHA č. 10**CHELATOMETRIE A IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODY**

- *dle návodu ve skriptech*

ÚLOHA č. 11**ANALÝZA SLITIN**

- *dle návodu ve skriptech*
- *sestavení aparatury pro elektrogravimetrické stanovení „B“*

ÚLOHA č. 12

MANGANOMETRIE

- dle návodu ve skriptech
- stanovení provádíme s využitím programu LabView, jednotky jsou nastaveny ve V a ne v mV, jak je uvedeno ve skriptech
- **POZOR!** Nezapomínejte na přepínání dávkovaného množství při dávkování 0,02M KMnO₄ (po 1 ml, po 0,1 ml)
- dříve než ukončíte měření, nezapomeňte vždy uložit naměřené hodnoty – je nutné přepsat cestu k uložení výsledků

ÚLOHA č. 13

ALKALIMETRIE A KONDUKTOMETRIE

13.1.1. Potenciometrická standardizace 0,1 M odměrného roztoku NaOH na kyselinu šťavelovou

PŘÍPRAVA TITRÁTORU K MĚŘENÍ - KALIBRACE PŘÍSTROJE

! POZOR Zkontrolujeme zásobní láhev s odměrným roztokem. Ta musí obsahovat nejen dostatečné množství činidla pro práci (na tu postačí přibližně 100 ml), ale je třeba dbát na to, aby nasávací hadička i po skončení práce byla pod hladinou činidla a aby nasávala bez bublinek!

Černým tlačítkem na zadní straně přístroje zapneme automatický titrátor. Pokud jsme práci zahájili výměnou odměrného činidla, umístíme na magnetickou míchačku kádinku, do stojanu nad ni vsuneme titrační špičku a stiskem tlačítka **F1** (rinse) přístroje provedeme propláchnutí.

! POZOR: VELMI OPATRNĚ vyjmeme elektrodu z ochranného obalu.

Podržíme tlačítko **F3** po dobu 3–5 s, dokud se nedostaneme do nabídky nastavení konfigurace. Dalším krátkým stiskem **F3** se dostaneme do nabídky automatických metod titrací. Šípkami nahoru a dolů (**F4** a **F5**) vybereme metodu „**exact weak**“ (titrace slabé kyseliny). Výběr metody potvrdíme stiskem klávesy **F1** a **STOP**.

Krátkým stiskem tlačítka **F3** měníme způsoby titrace (EQ – automatická titrace do bodu ekvivalence, EP – automatická titrace do koncového bodu, MAN – manuální titrace). Vybereme **EP** a pomocí šipek (**F4** a **F5**) nastavíme hodnotu koncového bodu na pH = 8.8 (fenolftalein).

Stiskem tlačítka **F2** se dostaneme do režimu kalibrace. Na displeji se zobrazí hodnota prvního přednastaveného pufru (pH = 7.00). Opláchneme elektrodu destilovanou vodou, opatrně osušíme, vložíme do tohoto pufru a stiskneme **START**. Vyčkáme, dokud se neobjeví hodnota druhého pufru (pH = 4,01). Elektrodu opláchneme, opatrně osušíme a vložíme do tohoto pufru. Opět stiskneme **START** a počkáme do konce kalibrace. Po vyjmutí z pufru elektrodu opět opláchneme a umístíme do kádinky s měřeným roztokem.

STANDARDIZACE 0,1 M NaOH NA KYSELINU ŠŤAVELOVOU - TITRACE

Na vahách odvážíme s přesností na desetinu mg takové množství dihydrátu kyseliny šťavelové, aby po převedení navážky do odměrné baňky na 100 ml, doplnění baňky po značku vodou a odpipetování 10 ml tohoto roztoku kyseliny šťavelové do titrační baňky byla při titraci spotřeba odměrného roztoku 0,1 M NaOH asi 10 ml.

Navážku dihydrátu kyseliny šťavelové rozpustíme v kádince asi v 50 ml destilované vody, převedeme kvantitativně do odměrné baňky na 100 ml a baňku doplníme destilovanou vodou po značku.

Do vysoké kádinky na 150 ml vložíme teflonové míchadlo, odpipetujeme 10,00 ml připraveného roztoku kyseliny šťavelové a odměrným válcem přidáme 90 ml destilované vody. Kádinku umístíme na magnetickou míchačku.

Elektrodu i titrační špičku uchytíme do držáku, který při držení stisknutého kulatého tlačítka opatrně posuneme dolů, a vnoříme elektrodu se špičkou do kádinky s měřeným vzorkem tak, aby elektroda i špička byly dostatečně ponořeny. Elektroda musí být pod hladinou roztoku ponořena cca 2,5 cm tak, aby byla ponořena i její referenční část. Ponoření titrační špičky pak eliminuje kapkovou chybu.

Spustíme míchání a stiskneme **START**. Titraci provedeme třikrát, koncové spotřeby zapisujeme a spočítáme titr NaOH.

13.2. KONDUKTOMETRICKÁ TITRACE

PŘÍPRAVA VZORKU A JEHO TITRACE

Vzorek v odměrné baňce doplníme destilovanou vodou po značku a roztok dobře promícháme. Do titrační kádinky na 250 ml napipetujeme 5,00 ml roztoku vzorku, vložíme míchadélko a přidáme tolik destilované vody, aby objem roztoku v kádince byl přibližně 200 ml. Do roztoku ponoříme titrační špičku a vodivostní elektrodu - teplotní čidlo připojené ke konduktometru, zapneme míchání.

Dle pokynů vyučujícího budeme přidávat odměrný roztok po 0,1 ml přidávkách pomocí programu LabView. Po každém přidávku 0,1 M NaOH se hodnota *měrné vodivosti, konduktivity* κ na konduktometru zaznamená v tomto programu v $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (příp. $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Titraci ukončíme po přidávku trojnásobného množství odměrného roztoku NaOH, než je množství odpovídající V_{ekv} .

ÚLOHA č. 14

PRŮTOKOVÁ CHRONOPOTENCIOMETRIE

14.2.1. Příprava kalibračních roztoků

Předem vypočítanou navážku kyseliny askorbové rozpustíme v destilované vodě tak, abychom získali 500 ml základního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $100 \text{ mg}/\text{dm}^3$.

Z tohoto roztoku připravíme do tří 50 ml odměrných baněk kalibrační roztoky kyseliny askorbové o koncentraci $20 \text{ mg}/\text{dm}^3$, $40 \text{ mg}/\text{dm}^3$ a $60 \text{ mg}/\text{dm}^3$, které doplníme po rysku roztokem elektrolytu R-020T. Jako metodu vyhodnocení použijeme metodu kalibrační křivky.

Jako slepý vzorek (blank) použijeme roztok elektrolytu R-020T.

14.2.2. Příprava vzorku k analýze


Vitamínové preparáty:

Tabletu vitamínového preparátu rozpustíme přibližně ve 30 ml destilované vody a přefiltrujeme do odměrné baňky na 100 ml (doplníme po rysku destilovanou vodou). V případě nutnosti upravíme odplyněním v ultrazvukové lázni.

Do odměrné baňky na 50 ml napipetujeme 10 ml vzorku vitamínového preparátu a doplníme po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku odpipetujeme do odměrné baňky na 50 ml 10 ml roztoku a doplníme elektrolytem R-020T. Roztok je tímto připraven k analýze.

14.2.3. Měření kalibračních roztoků a vzorku obsahujícího vitamín C, sestavení kalibrační závislosti


POZOR - DŮSLEDNĚ DODRŽUJTE VŠECHNY KROKY!**A. PŘÍPRAVA PŘÍSTROJE K MĚŘENÍ**

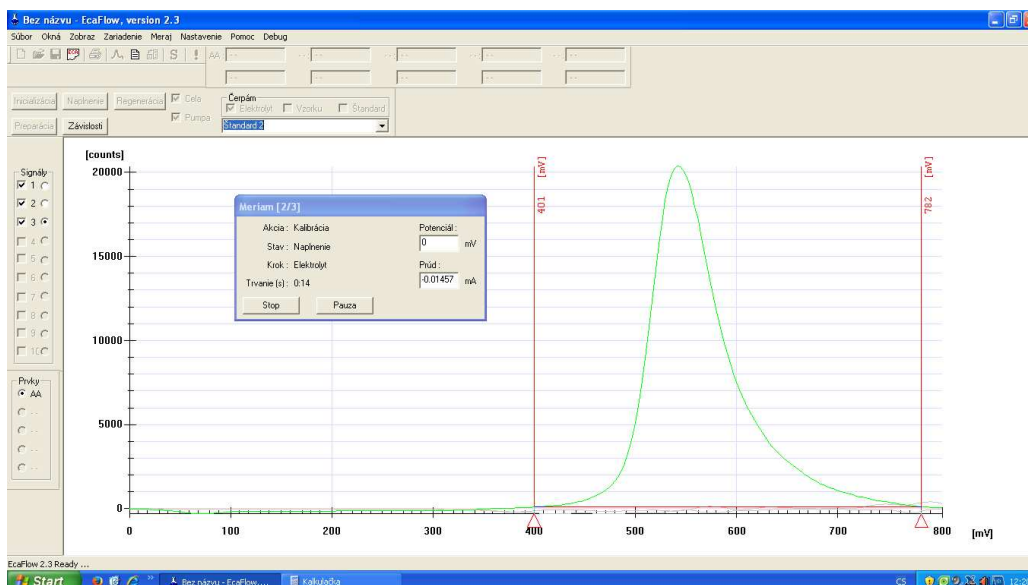
1. Zapneme přístroj EcaFlow 150GLP.
2. Zapneme počítač.
3. Spustíme program EcaFlow Autosampler.
4. V okně **NASTAVENÍ**  zvolíme číslo metody – metodu č. 36 Ascorbic acid (NASTAVENÍ – VŠEOBECNÉ).
5. Změníme hodnotu průtoku na **6 ml/min** (NASTAVENÍ – MĚŘENÍ) a stiskneme „**OK**“.
6. Barevně označené hadičky ponoříme do příslušných roztoků:

MODRÁ	ČERVENÁ	ŽLUTÁ
Roztok elektrolytu R-020T (základní elektrolyt, který najdeme v aplikačním listu metody)	Blank	Standard o známé koncentraci (20 mg/dm ³)

7. Přítlačné ramínko čerpadla zasuneme do pracovní polohy (zacvakne).
8. Zkontrolujeme, zda máme kádinku pod držákem filtru, potom klikneme na možnost **NAPLNĚNÍ**, systém se automaticky naplní příslušnými roztoky.
9. Odstraníme kádinku a zapojíme hadičku cely.
10. Stiskneme možnost „**PREPARÁCIA**“, tím spustíme přípravu elektrody na měření (proces trvá 1–12 minut).

B. PŘÍPRAVNÉ MĚŘENÍ

1. Přepneme na bezkalibrační mód měření (NASTAVENÍ – VŠEOBECNÉ).
2. Přepneme na měření pozadí „**před každým měřením**“ (NASTAVENÍ – VŠEOBECNÉ).
3. Definujeme standardy (20 mg/dm³, 40 mg/dm³ a 60 mg/dm³) na přípravné měření, pojmenujeme. Zadáme 1 opakování a zaškrtneme možnost „**analyzuj**“ (NASTAVENÍ – VZORKY – PŘIDAT).
4. Vše potvrdíme „**OK**“.
5. Stiskneme možnost **SPUSTIT**  a následně **START**.
6. Naměřenou křivku porovnáme se vzorovým záznamem (na obr. 14.1 nebo v aplikačním listě). Pokud záznam vyhovuje, přistoupíme k analýze vzorku.






Obr. 14.1: Vzorový záznam signálu

C. ANALÝZA STANDARDŮ A VZORKU

1. Definujeme připravené vzorky na analýzu (standarty již máme definované), tj. pojmenujeme analyzovaný vzorek (příp. zadáme ředění), zadáme počet opakování 3 a zaškrtneme možnost „**analyzuj**“, příp. odškrtneme pravým tlačítkem myši připravený vzorek, aby se opětovně neanalyzoval (NASTAVENÍ – VZORKY – PŘIDAT).
2. Přepneme na techniku „**kalibrační přímky**“ (NASTAVENÍ – VŠEOBECNÉ).
3. Přepneme na „**s každým novým vzorkem nebo standardem**“ (NASTAVENÍ – VŠEOBECNÉ).
4. V levém prázdném okně nastavíme možnost AA, zadáme jednotky „**mg/l**“ a koncentrace standardních roztoků (dle obr. 14.2 – nastavení parametrů) (NASTAVENÍ – KALIBRACE).

Obr. 14.2: Příklad nastavení parametrů

5. Žlutou hadičku zasuneme do standardu č.1, stiskneme možnost **SPUSTIT**  a následně stiskneme **START**, tímto odstartujeme kalibraci. Přístroj nejprve nasaje elektrolyt a poté se objeví upozornění na výměnu elektrolytu za standard č.1, odklikneme OK a tím spustíme analýzu.

6. Následně se objeví upozornění na výměnu standardu, nejprve provedeme výměnu standardu ponořím žluté hadičky a poté odklikneme OK.
7. Po ukončení kalibrace na grafu vhodně nastavíme kurzory pro jednotlivé standardy.
8. Pokud je vzorek zlehka zakalen, odpojíme hadičku cely, do držáku filtru připojíme filtr a opět připojíme hadičku. Žlutou hadičku ponoříme do analyzovaného vzorku, stiskneme možnost **SPUSTIT**  a následně START.
9. Po ukončení měření na grafu vhodně nastavíme kurzory u analyzovaného vzorku.
10. Označíme možnost ZÁVISLOSTI a zkontrolujeme přesnost měření.
11. V okně „show results“  nalezneme naměřené hodnoty.
12. Dle pokynů vyučujícího si uložíme jednotlivá měření pro vyhodnocení do předem vytvořené složky (*výstupní veličiny*: přechodový čas τ v s, odezva signálu v mV)

D. UKONČENÍ PRÁCE S PŘÍSTROJEM

1. Hadičky vyjmeme z jednotlivých roztoků a zasuneme je do kádinky s destilovanou vodou.
2. Odpojíme hadičky cely a injekční stříkačkou z nich vysajeme zbytek tekutiny.
3. Filtr necháme zapojený v držáku filtru a umístíme pod něj kádinku, klikneme na možnost NAPLNĚNÍ a promyjeme hadičky i filtr.
4. Ukončíme program EcaFlow Autosampler.
5. Hadičky umístíme do prázdné kádinky a odpojíme filtr.
6. Odpojíme ramínko čerpadla (vycvaknout).
7. Pod držák filtru vrátíme prázdnou kádinku.
8. Přístroj vypneme a zavřeme víko.

Poznámka:

Pokud jsou píky symetrické, jako kvantitativní ukazatel obvykle používáme výšku v maximu píku. Pokud chceme pracovat přesněji, měříme plochu píku.. Pro zjištění plochy nejjednodušeji postupujeme tak, že pik aproximujeme trojúhelníkem, protože pak pro výpočet plochy plochy můžeme použít vzorec pro výpočet obsahu trojúhelníku. Přesnější postupy jsou mechanická integrace (planimetrie) nebo vážení vystříhaných píků.

ÚLOHA č. 15 ARGENTOMETRIE

- *dle návodu ve skriptech*