Miloš Bartušek a Jiří Pazourek

ZÁKLADY METOD ANALYTICKÉ CHEMIE

pro
bakalářské
studijní programy

Obsah

ÚVOD. Co je to analytická chemie? 4

1. ACIDOBAZICKÉ REAKCE 6
   1.1 Síla kyselin a bází 7
   1.2 Výpočty pH vodných roztoků 9
   1.3 Pufry 12
   1.4 Distribuční diagramy 13

2. REAKCE TVORBY KOMPLEXŮ 16
   2.1 Vliv acidity na tvorbu komplexů 18
   2.2 Rovnovážné konstanty komplexů 19
   2.3 Komplexy s organickými činidly 21

3. REDOXNÍ REAKCE 24
   3.1 Závislost redoxního potenciálu na pH 27
   3.2 Redoxní interakce. Výpočty koeficientů redoxních reakcí 28
   3.3 Redoxní rovnováhy 31

4. KINETIKA ANALYTICKÝCH REAKCÍ 33
   4.1 Katalýza 35

5. SPECIÁLNÍ METODY 36
   5.1 Srážecí reakce 36
   5.2 Analýza plynů 37
   5.3 Substechiometrická analýza 38
   5.4 Průtoková analýza 39
   5.5 Stopová analýza 40
   5.6 Organická analýza 41
      5.6.1 Organická elementární analýza 42
      5.6.2 Třídění organických látek podle rozpustnosti 44

6. SEPARAČNÍ METODY 46
6.1 Kapalinová extrakce 46
6.2 Extrakce s pevným sorbentem 48
6.2.1 Záchyt adsorpcí 49
6.2.2 Iontová výměna 49
6.3 Chromatografie 50
6.4 Elektroforéza 54
6.4.1 Zónová elektroforéza 55
6.4.2 Izotachoforéza 55
6.4.3 Izoelektrická fokuzace 58

7. ELEKTROANALYTICKÉ METODY 59
7.1 Potenciometrie 59
7.2 Elektrolytické metody 62
7.3 Konduktometrie 67

8. SPEKTRÁLNÍ METODY 70
8.1 Absorpce záření UV-VIS 70
8.2 Emisní spektrometrie v UV-VIS 76
8.3 Infračervená spektrometrie 77
8.4 Spektrometrie v oblasti rentgenova záření 79
8.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR) 80
8.6 Hmotnostní spektrometrie (MS) 81

9. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU 83
9.1 Odběr vzorku 83
9.2 Rozpouštění vzorku 84
9.3 Separace analytu z matrice 95

10. CHYBY. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY 86
10.1 Chyby měření 86
10.2 Statistické zpracování výsledků 86
10.3 Kalibrace. Regresní křivka 91
10.4 Správná laboratorní praxe 92
10.5 Standardní materiály 92

PŘEDMLUVA

Tento učební text je určen pro ty, kteří studují analytickou (odbornou) chemii, typicky pro bakalářský studijní program. Podle autorů představuje nezávislé minimum teoretických znalostí, kterými by se měl s jistotou vykázat každý absolvent oboru analytické chemie. Vycházeli jsme z látky, která byla tradičně přednášena na naší katedře analytické chemie Masarykovy univerzity, takže vedle stručného popisu instrumentálních analytických metod zde najde čtenář např. vysvětlení acidobazických i komplexotvorných reakcí, které jsou podle našeho názoru stejně důležité – analytický chemik nemá být pouze zručný operátor přístrojů, ale především osoba schopna pochopit analytický problém a navrhnout analytický postup, případně jeho vylepšení či alternativu.

SLOVA AUTORŮ

Autor každého textu by měl hodně vědět o čtenářích, pro které píše. Působím ve funkci učitele na katedře analytické chemie již 40 let, někdy si myslím, že studenty znám dobře, avšak oni mne dovedou překvapit vždy znovu a znovu. Tak třeba tvrzením, že při disociaci molekul vody vzniká větší počet iontů vodíkových než hydroxidových anebo vysvětlením principu měření teploty: "při zvýšení teploty rtuť v teploměru vzlíná a její viskozita se zvětšuje". Podobné zážitky mne vedly k tomu, že do učebního textu jsem zařadil i několik pasáží, které podle některých mých kolegů představují profanaci vědy a které prý studenty urážejí, protože studenti takovéto primitivnosti už dávno znají. Moji kolegové mají pravdu a já bych byl velmi šťasten, kdyby měli úplnou pravdu.

V Brně v červnu 1997. M.B.

Záměrná stručnost (heslovitost) textu už předpokládá, že text bude číst chemik (třebaže začátečník). Na závěr tedy omluva chemikům–profesionálům: víme, že každé zjednodušení jde na úkor úplnosti (pravdy). Smyslem tohoto skripta je ale ***cesta*** *k pochopení podstaty, nikoli vyčerpávající popis problému. Stále narůstající objem faktů i odborná specializace pedagogů nezřídka vede k situaci, kdy student zná detaily jednoho tématu, bohužel ale na úkor podstatných věcí všeobecných. Věřím, že toto skriptum přehled toho pro analytickou chemii podstatného přináší.*

V Brně v květnu 2002. J.P.

Doplňující literatura:

L. Sommer a kol., *Základy analytické chemie*, Vutium Brno, 1998/2000.

P. Klouda, *Moderní analytické metody*, Nakl. P. Klouda 1996.

H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean, *Instrumental methods of analysis*, VNR, různá vydání.

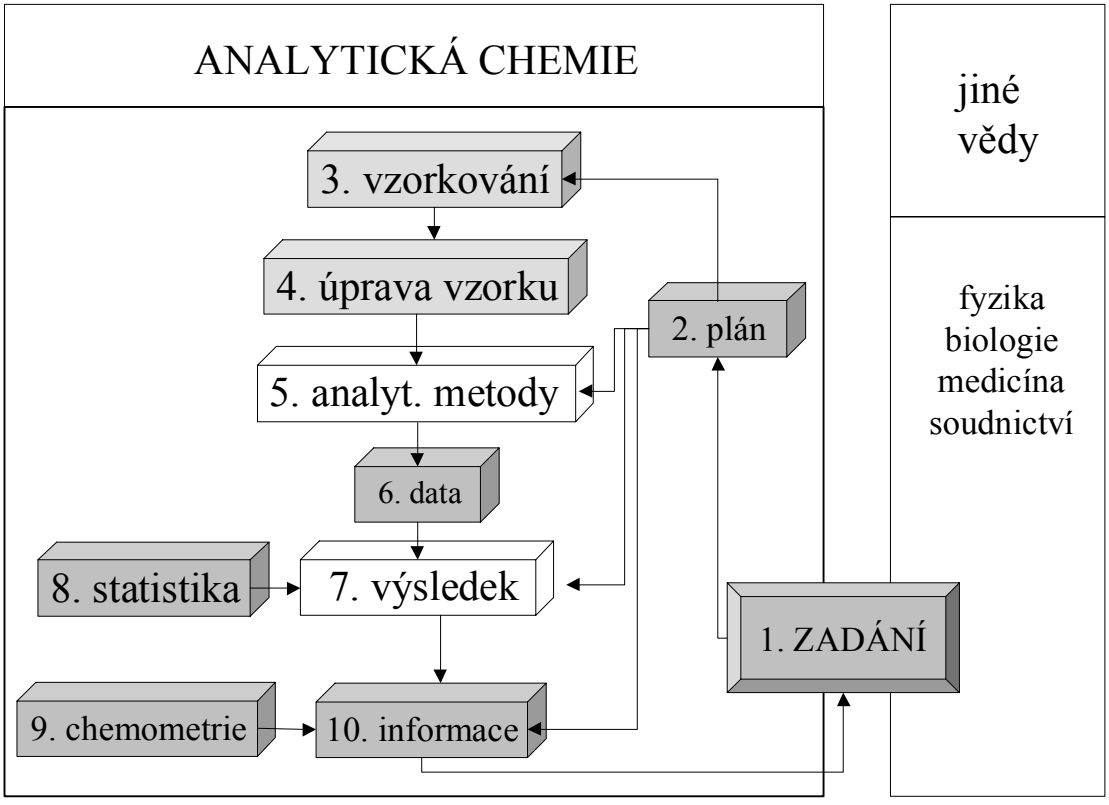
D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Analytical Chemistry*, Saunder College Publ., 2000.

ÚVOD - CO JE TO ANALYTICKÁ CH#EMIE?

Začátky chemické analýzy najdeme už ve středověku, tehdy jako zcela empirický postup cestou pokusů a omylů. Dnes dovedeme velkou většinu operací prováděných v chemické analýze vysvětlit a vědecky zdůvodnit. *Analytická chemie* je pak vědecká disciplína, která se zabývá procesy (převážně chemickými) využívanými v chemické analýze.

V současnosti Federace evropských chemických společností (1993) definuje obsah analytické chemie jako získání informací o složení, časových změnách a prostorové distribuci chemického složení v rámci vymezené části reality. Získání informací je podmíněno pozorováním (měřením) a analytická chemie je v tomto konceptu nezávislým oborem měření, který je ve stupni zadáni úkolu interakčně spojen s jinými obory (matematika, fyzika, medicína, právo). Mohli bychom vymezit následující části analytické chemie (1.-10.) s jejich vzájemnými vazbami:

Tento studijní materiál se bude věnovat stručnému popisu bodů 5, 7, stručně pojedná i o bodech 3 a 4.



Prakticky každý obor přírodních věd používá chemické analytické metody – z druhé strany se dá říci, že analytická chemie zasahuje do všech oborů přírodních věd. Hranice mezi fyzikálními a chemickými, resp. chemickými a biologickými metodami je často nejasná (formální), takže mnohé moderní analytické metody se nazývají fyzikálně chemické nebo biochemické.

Chemická analýza je postup, jímž se zjišťuje chemické složení vzorku. Používáme k tomu experimentální *metody chemické* (např. vyizolujeme určitou sloučeninu ze směsi a její množství změříme), *fyzikální* (např. zaznamenáme emisní spektrum kovového vzorku a ze vztahu mezi intenzitou spektrální čáry a množstvím prvku, kterému ona čára přísluší, vyhodnotíme obsah prvku ve vzorku) a také *biologické* (např. sledujeme krysy poté, co jim byl podán potenciálně toxický preparát). K vyhodnocení číselných údajů získaných chemickou analýzou se používají *matematické metody* (statistické, ...).

Kvalitativní analýza dává informaci o tom jaké složky (prvky, funkční skupiny, sloučeniny) obsahuje analyzovaný vzorek. *Kvantitativní analýza* vypovídá o množství jednotlivých složek ve vzorku. *Analyt* je ta složka (ty složky) vzorku, o které chemická analýza má podat informaci, zbytek vzorku je označován jako *matrice*. Matrice není předmětem analýzy, avšak její přítomnost ve vzorku velmi často komplikuje provedení analýzy. *Důkaz* je postup používaný v kvalitativní analýze, jím zjišťujeme přítomnost či nepřítomnost analytu ve vzorku. V kvantitativní analýze provádíme *stanovení*, měříme množství analytu ve vzorku. Praxe někdy vyžaduje stanovit celkový obsah analytu (např. stanovení Fe v železné rudě), jindy je třeba stanovit vedle sebe různé formy téhož analytu (např. stanovení kovového Fe, Fe(II) a Fe(III) vedle sebe). *Elementární analýzou* stanovíme obsah jednotlivých prvků v analyzovaném materiálu. U organických vzorků výsledek elementární analýzy obvykle představuje nedostatečnou informaci, proto stanovujeme obsah určité skupiny látek (např. suma kyselin) anebo obsah určitých sloučenin (např. kyseliny octové, acetonu, anilinu ...), viz kapitola 5.6.

1. ACIDOBAZICKÉ REAKCE

http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/ph/ph2/ph2.htm

Pojmy KYSELINY a ZÁSADY charakterizuje řada teorií. Věnujme pozornost třem nejvýznačnějším:

1/ Podle Arrhenia je kyselinou látka, která odštěpuje vodíkové kationty H^+ (tj. vodíkový atom bez elektronu - pozor!, nejsou to ale žádné jaderné reakce s protony!) a zásada (báze) odštěpuje hydroxylové anionty (OH^-). Teorie je aplikovatelná pouze ve vodných roztocích a dovoluje měřit aciditu (pH) potenciometricky anebo pomocí barevných indikátorů fotometricky.

2/ Broenstedtova teorie zahrnuje představy Arrheniovy, ale není omezena jen na vodná prostředí: KYSELINA ODŠTĚPUJE VODÍKOVÝ KATIONT A BÁZE VODÍKOVÝ KATIONT VÁŽE. Acidita se měří potenciometricky i fotometricky, vyjadřujeme ji pomocí stupnice pH ve vodě a pomocí funkcí analogických funkci pH v jiných rozpouštědlech.

3/ Lewisova teorie je nejobecnější, podle ní je bází částice (molekula, ion) s nevazebným (volným) elektronovým párem (=**donor** elektronu, např. NH_3, CH_3COO^-, pyridin). Kyselina je částice s volným orbitalem schopným vázat volný elektronový pár (= **akceptor**, např. BF_3, Cu^{2+}, H^+, $SbCl_5$ I_2 ...). Tato teorie neumožňuje jednoduše potenciometricky měřit kvantitativní údaje o kyselosti, dovoluje pouze porovnávat aciditu roztoků pomocí barevných indikátorů. Mezi acidobazické reakce zahrnuje i procesy vedoucí ke vzniku komplexů, např. kyselina Cu^{2+} reaguje s bází NH_3 za vzniku produktu $Cu[(NH_3)]^{2+}$.

Některé nesprávně zjednodušené vývody z Arrheniovy teorie mohou vést k mylným závěrům, např. bazicita vodného roztoku NaOH nebo octanu sodného bývá připisována iontům Na^+ avšak skutečnými bázemi v těchto roztocích jsou OH^- a CH_3COO^-, kdežto kationty alkalických kovů nejsou ani kyselinami, ani bázemi. V dalším se budeme zabývat výlučně teorií Broenstedtovou. Je třeba uvažovat reakce částic v roztoku skutečně existujících. Např. mluvíme o vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové, avšak v roztoku nejsou molekuly HCl, ale pouze ionty H_3O^+ a Cl^- a ty reagují, podobně v roztoku hydroxidu sodného nejsou molekuly NaOH, ale pouze ionty Na^+ a OH^-.

Při acidobazických reakcích JE VODÍKOVÝ KATIONT VYMĚŇOVANOU ČÁSTICÍ, uvolní se z jedné kyseliny (kys_1) a je ihned vázán druhou bází (bas_2); dvě báze (B, A^-) soutěží o hydratovaný vodíkový kationt.

$$kys_1 + bas_2 \rightarrow bas_1 + kys_2 \qquad HA + B \rightarrow A^- + HB^+$$

Izolovaný vodíkový kationt není schopen existence v roztoku, váže se ihned na protofilní částice. Ve vodném roztoku existují pouze HYDRATOVANÉ VODÍKOVÉ IONTY (H_3O^+, na které jsou vázány další molekuly vody vodíkovými vazbami) a analogicky solvatované H^+ nacházíme i v jiných protofilních rozpouštědlech ($CH_3COOH_2^+$, $CH_3OH_2^+$, CH_3CNH^+). PROTOFILNÍ částice může vázat H^+ a PROTOGENNÍ odštěpit H^+, prvá je tedy bází a druhá kyselinou. Existují AMFIPROTNÍ částice, které mohou vodíkový kationt odštěpit i vázat:

$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$, ale také $H_2O + H^+ \rightarrow H_3O^+$

$HPO_4^{2-} \rightarrow H^+ + PO_4^{3-}$, ale také $HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow H_2PO_4^-$

Příklad amfiprotních rozpouštědel:

$2\ H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^-$

$2\ CH_3COOH \rightarrow CH_3COOH_2^+ + CH_3COO^-$ (*bezvodá kys. octová)*

$2\ NH_3 \rightarrow NH_4^+ + NH_2^-$ *(kapalný amoniak při cca -50^o C)*

$2\ C_2H_5OH \rightarrow C_2H_5OH_2^+ + C_2H_5O^-$

1.1 SÍLA KYSELIN A BAZÍ

Síla kyseliny se posuzuje podle toho, do jaké míry odštěpila své vodíkové kationty, čili do jaké míry je disociovaná. SILNÁ KYSELINA (HCl ve vodném roztoku) je disociovaná úplně, SLABÁ KYSELINA (octová) je disociovaná neúplně. Pouze při velikém (nekonečném) zředění se předpokládá úplná (100%) disociace všech (i slabých) kyselin. Kvantitativní charakteristikou síly slabé kyseliny (HA) je její DISOCIAČNÍ KONSTANTA: $K_A = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$ resp. veličina pK_A = -log K_A. Hodnota K_A silné kyseliny (100% disociované) není definovaná, blíží se nekonečnu. Čím menší K_A má slabá kyselina, tím větší je její pK_A, tím méně je disociovaná, tím slabší je kyselinou. Hodnoty pK_A některých kyselin:

Kyselina	pK_A
NH_4^+	9,3
kys. boritá $H\{B(OH)_4\}$	9,3
CH_3COOH	4,7
H_3PO_4	2,2
$H_2PO_4^-$	7,2
HPO_4^{2-}	12,3
H_2CO_3	6,3

HCO_3^-	10,3
H_2S	7,1
HS^-	12,2
HSO_4^-	1,9
HCN	9,2
pyridinium(+)	5,2
anilinium(+)	4,6

Existuje konvence neuvádět solvatované molekuly rozpouštědla v chemických vzorcích, např. pro amoniak ve vodných roztocích píšeme vzorec NH_3, ikdyž se jedná o hydratované molekuly (NH_4OH respektive NH_4OH x H_2O). Veličiny v hranatých závorkách ve vzorci pro K_A by měly být **aktivity** solvatovaných částic, často však místo aktivit zjednodušeně dosazujeme koncentrace. Vzhledem k závislosti hodnoty aktivitních koeficientů na složení roztoku (zejména na iontové síle, teplotě a použitém rozpouštědle), pro přesná měření musíme experimentální hodnoty korigovat.

Konjugovaný acidobazický pár

Dvojici kyselina a báze, jejichž složení se liší o jeden vodíkový kationt, (např. HA a A^- nebo HB^+ a B) nazýváme KONJUGOVANÝ ACIDOBAZICKÝ PÁR. Liší-li se členy konjugovaného acidobazického páru zbarvením, lze jej použít jako vizuální acidobazický indikátor.

Rovnováhu $HA \rightarrow H^+ + A^-$, pro kterou platí konstanta K_A, lze ovlivnit přidáním látky, která reaguje s některou z komponent. Tak např. za přítomnosti Ca^{2+} kyselina šťavelová více disociuje, uvolní se větší koncentrace H^+ než za nepřítomnosti Ca^{2+}. To proto, že produkt disociace - šťavelanový anion - je spotřebováván do sraženiny šťavelanu vápenatého.

Významná je reakce vodíkového iontu s rozpouštědlem (solvatace). Čím pevněji váže rozpouštědlo vodíkové kationty, čím je více protofilní, tím snadněji v onom rozpouštědle probíhá disociace kyseliny. Ve slabě protofilních rozpouštědlech (např. v CH_3COOH) disociuje méně kyselin než v silně protofilních (např. v ethylendiaminu). **Protonované rozpouštědlo je nejsilnější kyselinou schopnou existence v protofilním rozpouštědle (např. H_3O^+ ve vodě).** Silnější kyseliny než protonované rozpouštědlo zreagují s rozpouštědlem-bází a podobně silnější báze než deprotonované rozpouštědlo zreagují s rozpouštědlem-kyselinou, např. amidový anion NH_2^- ve vodě dává OH^- a NH_3. Mluvíme o NIVELIZACI KYSELIN v silně bazických rozpouštědlech: všechny kyseliny jsou skoro stejně disociovány, stírá se tu rozdíl mezi silnějšími a slabšími kyselinami. Nivelizaci bází pozorujeme v silně kyselých rozpouštědlech. Analogicky DIFERENCIACI KYSELIN pozorujeme v silně kyselých rozpouštědlech, protože pouze ty nejsilnější kyseliny jsou disociovány. Diferenciaci bází pozorujeme v silně bazických rozpouštědlech.

$HClO_4$ je nejsilnější z běžně dostupných kyselin. Její zředěné roztoky o stejné koncentraci v různých rozpouštědlech mají různou aciditu: v bezvodé octové větší než ve vodě a ve vodě větší než v kapalném amoniaku. To proto, že srovnáváme stejně koncentrované roztoky různých kyselin: v málo protofilní kyselině octové kyselost roztoku $HClO_4$ způsobují ionty $CH_3COOH_2^+$, ve středně protofilní vodě ionty H_3O^+ a v silně protofilním amoniaku ionty NH_4^+. Kyselina chlorovodíková je silnou kyselinou ve vodě a v amoniaku, ale slabou v bezvodé kyselině octové. Močovina $(NH_2)_2CO$ je slabou bází v bezvodé kyselině octové, slabou kyselinou v kapalném amoniaku a ve vodě není ani kyselinou, ani bází.

V literatuře uváděné hodnoty disociačních konstant kyselin byly stanoveny většinou ve vodných roztocích, protože kyselost a bazicitu rozpouštědel vztahujeme běžně k amfiprotní vodě. Konstanty kyselin pro jiná rozpouštědla než vodu najdeme ve speciální literatuře.

Disociační konstanty bazí

Vedle disociačních konstant kyselin K_A užíváme (řidčeji) i disociační kyseliny bazí K_B.

Pro konjugovaný acidobazický pár NH_4^+/NH_3 můžeme např. psát:

$K_A = [H^+].[NH_3]/[NH_4^+]$ $\quad$ $K_B = [NH_4^+]/[H^+][NH_3]$ $\quad$ platí, že $K_A.K_B=1$

Logicky tedy platí, že čím silnější je kyselina, tím slabší je její konjugovaná báze.

Z Arrheniovy teorie jsme převzali konstantu disociační konstantu K_B^*

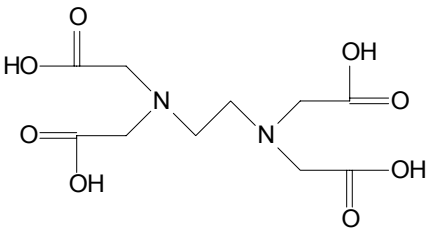
$K_B^* = [NH_4^+][OH^-]/[NH_4OH]$ $\quad$ $K_A.K_B^* = [H^+][OH^-] = K_w = 10^{-14}$

pozn.

Vedle jednosytných kyselin (HCl, CH_3COOH, C_6H_5COOH ...) máme dvojsytné (H_2SO_4, kys. šťavelová HOOC-COOH, H_2CrO_4 ...), trojsytné (H_3PO_4, $N(CH_2COOH)_3$...) a i vícesytné ($H_4P_2O_7$, ethylendiamintetraoctová). Vícesytná kyselina (H_3PO_4) může být zneutralizována do prvého stupně ($H_2PO_4^-$), do druhého (HPO_4^{2-}) i do třetího stupně (PO_4^{3-}). Disociační konstanty kyselin označujeme K_A. U vícesytných kyselin K_{An} obvykle přísluší rovnováze v níž se odštěpuje n-tý vodíkový kationt z molekuly kyseliny. Problém s označením nastane v případě, kdy molekula kyseliny může vodíkové kationty nejen odštěpovat, ale i vázat. Např. aminokarboxylová kyselina EDTA (H_4Y) poskytuje ionty H_6Y^{2+}, H_5Y^+, H_3Y^-, H_2Y^{2-}, HY^{3-} a Y^{4-}. Rovnováha $H_5Y^+ = H_4Y + H^+$ přísluší

přijetí prvého vodíkového kationtu k molekule (u EDTA je to obojaký ion), tedy odštěpení mínus prvého vodíkového kationtu, konstanta K_{A-1}. Anebo je to přijetí pátého vodíkového kationtu ke zcela deprotonované bazi (Y^{4-}), konstantu označíme K_{A5} a tak se vyhneme záporným hodnotám v indexu u konstanty.

kyselina ethylendiamin-tetraoctová, EDTA, H_4Y



1.2 VÝPOČTY pH VODNÝCH ROZTOKŮ

ACIDITNÍ ŠKÁLA pH ve vodných roztocích

$$pH = -\log a(H^+) = -\log [c(H^+).f(H^+)]$$

c značí koncentraci, f aktivitní koeficient, a aktivitu. Protože dovedeme změřit pouze průměrný aktivitní koeficient f (±), nikoli koeficient určitého iontu, např. $f(H^+)$, je škála pH definována pomocí roztoku pufrů, jejich přesné složení a hodnoty pH byly schváleny mezinárodní unií IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Obvykle se udává ROZSAH ACIDITY ve vodných roztocích 0-14 pH. Při potenciometrickém měření pH může přístroj indikovat hodnoty pH menší než 0 (v silných kyselinách při koncentraci větší než 1 mol/l) anebo větší než 14 (více než jednomolární silné báze). V tak koncentrovaných roztocích značná část molekul rozpouštědla je vázána v solvatačních obalech iontů, aktivita vody je výrazně menší než v roztocích zředěných a proto pK_W má hodnotu odlišnou od 14,0. Konstantní je $K = [H^+][OH^-]/[H_2O] = K_W/[H_2O]$. Pouze ve zředěných vodných roztocích platí

$$pH + pOH = 14{,}0$$

Příklady výpočtu pH

1/ pH vodného ROZTOKU SILNÉ jednosytné KYSELINY (HA).

Celková (totální) koncentrace vodíkových iontů $[H^+]$ je rovna součtu koncentrací vodíkových iontů z kyseliny $[H^+]_k$ a vodíkových iontů vzniklých disociací vody $[H^+]_W$. $[H^+]_k$ je rovna celkové, analytické koncentraci silné kyseliny c_k.

$$pH = -\log([H^+]_k + [H^+]_W) - \log f(H^+)$$

Pokud neznáme hodnotu aktivitního koeficientu, volíme $f(H^+)=1$, tato aproximace přijatelně vyhovuje pro velmi malé koncentrace elektrolytu, log (1) = 0. Ve vodných roztocích HCl o c_k 0,001; 0,01; 0,1 a 1 mol/l mají f (±) hodnoty 0,97; 0,90; 0,80 a 0,81.

Pro roztoky o koncentraci kyseliny větší než 10^{-6} mol/l je $[H^+]_k >> [H^+]_W$. Roztoky 0,1; 0,02; 0,01 a 0,001 M HCl mají pH 1,0; 1,7; 2,0 a 3,0 (předpokládáme $f(H^+)=1{,}0$). Aciditu pH=6,0 má $9{,}9.10^{-7}$ M HCl. Roztok 10^{-8} M HCl nemá pH=8, protože ředěním roztoku kyseliny neutrálním

rozpouštědlem nemůžeme dostat alkalický roztok, zde je $[H^+]_W > [H^+]_K$ a vypočtené pH tohoto roztoku je cca 6,98. Pro výpočet použijeme rovnosti koncentrací H^+ a OH^- vzniklých disociací vody a iontový produkt vody (autoprotolytickou konstantu vody) $K_W = [H^+].[OH^-] = 10^{-14}$

$$(c_k + [OH^-]_W) \,.\, [OH^-]_W = K_W$$

Je-li $c_k > 10^{-6}$mol/l, pak $c_k >> [OH^-]_W$ a potom platí

$c_k \, K_W / [H^+] = K_W$ čili **$pH = -\log c_k$**

Poznámka: 1/ pro velmi zředěné roztoky, např. $l0^{-7}$ M HCl už neplatí $c_k >> [OH^-]_W$, proto nelze použít tento zjednodušený vzorec. 2/ reálný roztok $l0^{-8}$ M HCl má pH < 6 je-li v rovnováze se vzdušným oxidem uhličitým (obsahuje kyselinu uhličitou).

2/ k*oncentrace hydroxidových iontů v ROZTOKU SILNÉ BÁZE*

Na stejném principu jako u roztoků silné kyseliny vypočteme koncentraci hydroxidových iontů v ROZTOKU SILNÉ BÁZE. Vodným roztokem silné báze rozumíme roztok obsahující hydratované ionty OH^-. Takový roztok připravíme buď rozpuštěním hydroxidu, ve kterém jsou OH^- vázány pouze iontovou vazbou (NaOH, $(CH_3)_4NOH$...) anebo rozpuštěním látky obsahující bázi silnější (silněji váže vodíkové kationty) než OH^- (např. CH_3CH_2ONa). Tato báze zreaguje s kyselinou H_2O a v reakci rezultují ionty OH^-: $CH_3CH_2O^- + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + OH^-$

Koncentrace hydroxidových iontů vnesených do roztoku přidanou látkou je c_B. Disociací rozpouštědla vody vzniká $[OH^-]_W$ a stejně veliká $[H^+]$. Platí:

$$[OH^-] = c_B + [OH^-]_W = c_B + [H^+]$$

$$K_W = [H^+][OH^-] = [H^+](c_B + [H^+]) = 10^{-14}$$

Je-li $c_B > 10^{-6}$mol/l je $c_B >> [OH^-]_W$ a potom

$[H^+] = 10^{-14} / c_B$ čili **$pH = 14 + \log c_B$**

3/ *pH vodných ROZTOKŮ SLABÉ jednosytné KYSELINY HA*.

Např. roztok kyseliny octové anebo chloridu amonného, kyselinou v druhém příkladu je NH_4^+. Chlorid ve vodě není kyselinou ani bazí. Chlorid je báze konjugovaná se silnou kyselinou HCl, má $K_B = 0$. Vycházíme z disociační konstanty K_A respektive z logaritmického vztahu

$$K_A = [H^+].[A^-] / [HA] \qquad pH = pK_A + \log ([A^-] / [HA])$$

Celková koncentrace všech forem kyseliny c_A

$$c_A = [HA] + [A^-]$$

Dosazujeme: $[H^+]_K = [A^-]$ $\qquad [HA] = c_A - [A^-] = c_A - [H^+]_K$

$$K_A = ([H^+]_K + [H^+]_W)[H^+]_K / (c_A - [A^-])$$

Pro aproximaci předpokládáme: $[H^+]_K >> [H^+]_W$ odtud $[H^+] = [H^+]_K$ a také $[HA] >> [A^-]$ odtud $c_A = [HA]$

$K_A = [H^+]^2 / c_A$, proto **$pH = 1/2pK_A - 1/2\log (c_A)$**

poznámka: uváděné náboje iontů platí pro kyselinu bez náboje (octová), nikoli pro kyselinu-ion (NH_4^+). Zde uvedená zjednodušení výpočtu nejsou obecně platná. Nevyhovují pro velmi disociované slabé kyseliny (např. $H_2SO_3 = H^+ + HSO_3^-$, $pK_A = 1,7$) kde pro menší c_A neplatí $c_A = [HA]$ a také pro extrémně slabé kyseliny, kde nelze zanedbat příspěvek disociace vody. Obecně platí: zanedbáme-li během výpočtu příspěvek některé veličiny, měli bychom po skončení výpočtu ověřit, zda použité aproximace byly oprávněné. Uvedená přibližná formulka vyhovuje dobře pro výpočty pH zředěných roztoků kyseliny octové ($pK_A = 4,7$) a srovnatelně disociovaných slabých kyselin. Nezapomeňme, že v extrémně zředěných roztocích jsou i slabé kyseliny totálně disociovány, a proto uvedený aproximativní vzorec nevyhovuje.

4/ *pH vodných ROZTOKŮ SLABÉ BÁZE*

např. NH_3 anebo CH_3COO^-.

Báze (B), molekuly čpavku anebo ionty octanu reagují s vodou, probíhá hydrolýza

$B + H_2O \rightarrow BH^+ + OH^-$ $\qquad K_A = [BH^+]/[B][H^+]$

$K_B^* = [BH^+]\,[OH^-] / [B] = [H^+]\,[OH^-].[BH^+] / [B]\,[H^+] = K_W/K_A$

$c_B=[B]+[BH^+]$ $\qquad [OH^-]=[OH^-]_B+[OH^-]_W$ $\qquad [BH^+]=[OH^-]_B$

Velmi často platí: $[B]>>[HB^+]$ a také $[OH^-]_B>>[OH^-]_W$. Z toho vyplývá běžně používaný zjednodušený vztah,

$K_B^* = [BH^+][OH^-]/[B] = [OH^-]^2/c_B$ $\qquad$ **$pOH = ½\,pK_W - ½ \log c_B = pK_W - pH$**

který vyhovuje pro roztoky bazí disociovaných v podobném rozsahu jako amoniak ($pK_B^*=4,7$). Tento vztah nevyhovuje pro velmi silně a velmi málo disociované slabé báze a také pro extrémně zředěné roztoky slabých bazí (porovnej s výpočtem pH roztoku slabé kyseliny).

pozn.: V roztoku octanu sodného není ion Na^+ kyselinou ani zásadou, protože není schopen hydratace. Pokud kationty mohou být hydratované, jsou kyselinami jen pokud hydrolýzují: $Fe(OH_2)_x^{3+} = H^+ + Fe(OH_2)_{x-1}(OH)^{2+}$.

5/ *Výpočet pH ROZTOKU PUFRU* (=regulátor pH, tlumič, ústoj) obsahujícího slabou kyselinu (HA) a její konjugovanou bazi (A^-), např. roztok $NH_4^+ + NH_3$ anebo $CH_3COOH + CH_3COO^-$. V takovém roztoku probíhá disociace kyseliny i hydrolýza báze.

$HA \rightarrow H^+ + A^-$ $\qquad A^- + H_2O \rightarrow HA + OH^-$

Protože v roztoku jsou přítomny značné koncentrace HA i A^-, obě reakce probíhají v zanedbatelně malé míře a původní koncentrace kyseliny a báze (c_K a c_B) prakticky neovlivní.

$K_A = [H^+][A^-]/[HA] = [H^+]c_B/c_K$ $\qquad$ **$pH = pK_A + \log c_B - \log c_K$**

Výsledné pH je tím větší, čím větší je koncentrace báze a čím menší je koncentrace kyseliny.

6/ *Výpočet pH ROZTOKU slabé DVOJSYTNÉ KYSELINY H_2A ZNEUTRALIZOVANÉ do prvého stupně.*

Při rozpouštění soli NaHA podléhá ion HA^- částečné disproporcionaci (disociaci na A^{2-} a současně protonaci na H_2A), rovnováhy:

$HA^- + H^+ \rightarrow H_2A$ $\qquad K_{A1} = [H^+][HA^-] / [H_2A]$

$HA^- \rightarrow H^+ + A^{2-}$ $\qquad K_{A2} = [H^+][A^{2-}] / [HA^-]$

a také probíhá protonace a deprotonace rozpouštědla vody. Pokud je výsledný roztok málo kyselý či zásaditý, pH asi mezi 4 až 10, jsou obvykle zanedbatelně malé koncentrace H^+ i OH^- a lze akceptovat aproximaci $[H_2A]=[A^{2-}]$.

$[HA^-] = K_{A1}[H_2A] / [H^+]=[H^+][A^{2-}] / K_{A2}$ $\qquad [H^+]^2 = K_{A1}K_{A2}[H_2A]/[A^{2-}]=K_{A1}K_{A2}$

Zlogaritmováním dostaneme rovnici používanou též k výpočtu pH ekvivalence při stanovení dvojsytné kyseliny H_2A titrací do prvého stupně **$pH = ½ (pK_{A1} + pK_{A2})$.**

Pozn.:Nejsou-li koncentrace H^+ nebo OH^- dostatečně malé, abychom je mohli zanedbat v bilanci přítomných nábojů, dostaneme složitější výraz zahrnující i iontový produkt vody K_w:

$$[H^+] = [A^{2-}]+[OH^-]-[H_2A] = K_{A2}[HA^-]/[H^+] + K_w/[H^+] - [H^+][HA^-] / K_{A1}$$

$$[H^+]^2 = (K_{A2}[HA^-]+K_w)/(1+[HA^-]K_{A1}^{-1})$$

1.3 PUFRY

PUFR neboli tlumič, regulátor pH, ústoj. Tímto názvem označujeme roztok, který po přidání silné kyseliny anebo silné zásady podstatně nezmění svoje pH. Pufrační vlastnosti mají roztoky obsahující konjugovaný acidobazický pár, směs slabé kyseliny a její konjugované zásady, např. kyselina octová/octan nebo amonná sůl/amoniak nebo kyselina boritá/boritan. Přídavek silné kyseliny nebo zásady do *nepufrovaného* prostředí (voda, roztok NaCl ...) vyvolá výraznou změnu acidity, pH se změní o několik jednotek. Přidáme-li silnou kyselinu (v rozumném množství) k pufru, reakcí silné kyseliny s přítomnou bazí vznikne slabá kyselina, acidita roztoku se změní jen málo, obvykle o desetiny jednotky pH. Podobně přidaná silná báze zreaguje se slabou kyselinou z pufru a převede tuto na její konjugovanou (slabou) bázi.

KAPACITA PUFRU je definována jako množství silné kyseliny anebo silné báze, které vyvolá změnu o jednotku pH v 1 litru roztoku pufru. Neutralizujeme-li slabou kyselinu, dosáhne roztok maximální pufrační kapacity při 50%ním zneutralizování, to je za stavu, kdy koncentrace kyseliny je rovna koncentraci s ní konjugované báze, tedy při [kys] = [báze]. Acidita pufru tvořeného konjugovaným acidobazickým párem je určena konstantou acidity a poměrem koncentrací složek konjugovaného páru $pH = pK_A - \log([kys] / [báze])$. **Acidita (pH) pufru záleží pouze na poměru koncentrací kyseliny a báze, nikoli na jejich koncentracích. Ovšem kapacita pufru je tím větší, čím větší jsou koncentrace složek konjugovaného páru tvořících pufr.**

Regulace pH v přibližně neutrálních roztocích (pH 3-11) je založena na acidobazické rovnováze: $HA = H^+ + A^-$. V roztoku jsou makrokoncentrace (10^{-1}mol/l) kyseliny a báze a s nimi je v rovnováze mikrokoncentrace (10^{-5}mol/l) vodíkových iontů. Změny v makrokoncentracích složek pufru vyvolají jen malou změnu mikrokoncentrace iontů vodíku. Směrnice titrační křivky pH=f(v) pro slabou kyselinu udává převrácenou hodnotu pufrační kapacity.

Analogie pufrů:

- Na podobném principu je založena i redoxní pufrace: v roztoku jsou makrokoncentrace konjugovaného redoxního páru (např $Fe^{3+} + e^- = Fe^{2+}$) a s nimi je v rovnováze jakási mikrokoncentrace elektronů, jejímž projevem je redoxní potenciál. Přídavek silného oxidovadla (v rozumném množství) zoxiduje část redukovadla, Fe(II) přejde na Fe(III) a podobně přídavek

silného redukovadla zreaguje s oxidovanou formou pufračního systému; výsledkem těchto reakcí jsou jen malé změny redoxního potenciálu.

- Na základě komplexotvorné rovnováhy M+L=ML (náboje iontů jsou pro zjednodušení vynechány) fungují pufry ligandové (makrokoncentrace ML a M jsou v rovnováze s mikrokoncentrací ligandu) a také pufrace kovových iontů (makrokoncentrace ML a L v rovnováze s mikrokoncentrací M).
- Ve spektrografii pracujeme při vysokých teplotách (>1000^{o}C), tam přidáváme jako pufr poměrně snadno těkavou sůl snadno ionizovatelného kovu. Termickou disociací (NaCl=Na+Cl, vznikají atomy, ionty se tvoří při elektrolytické disociaci) a následnou ionizací atomů ($Na = Na^{+} + e^{-}$) se generuje značná koncentrace elektronů jejichž přítomnost potlačí ionizaci atomů stanovovaného kovu ($M = M^{+} + e^{-}$).

1.4 DISTRIBUČNÍ DIAGRAMY

DISTRIBUČNÍ KOEFICIENTY (δ) udávají poměrná zastoupení jednotlivých forem acidobazického systému.

Distribučni koeficienty pro jednosytnou kyselinu HA.

víme, že : $K_A = [H^+][A^-] / [HA]$ a také, že : $c_A = [HA] + [A^-]$

$\delta_{HA} = [HA] / c_A = [HA] / ([HA]+[A^-]) = 1 / (1+K_A/[H^+])$

$\delta_A = [A^-] / c_A = [A^-] / ([HA]+[A^-]) = 1 / (1+[H^+]/K_A) = \delta_{HA} K_A / [H^+]$

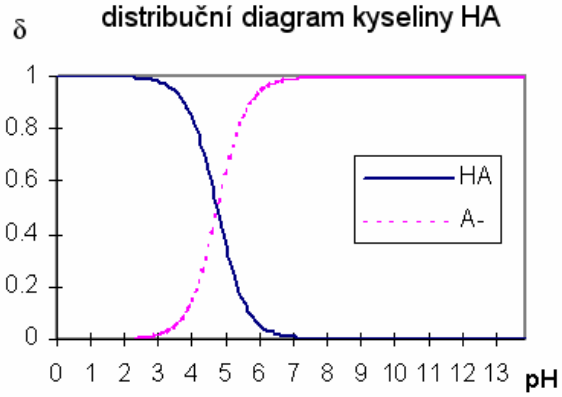
Vztah mezi KOEFICIENTEM VEDLEJŠÍCH REAKCÍ α, který se používá při popisu komplexů, a distribučním koeficientem δ vyplývá z následujících rovnic.

$c_A = [HA]+[A^-] = [HA].(1+K_A / [H^+]) = [HA].\alpha_{HA} = [HA] / \delta_{HA}$

$c_A = [A^-]+[HA] = [A^-].(1+[H^+] / K_A) = [A^-].\alpha_A = [A^-] / \delta_A$

čili $\alpha_A = 1 / \delta_A$

Distribuční koeficient δ_{HA} dosahuje hodnot přibližně 1 a 99% při poměru $[A^-] / [HA]$ 0,01 a 100, to je při $pH=pK_A - 2$ a $pH=pK_A + 2$. Mimo oblast $pH=K_A \pm 2$ je hodnota δ_{HA} prakticky jednotková (v kyselých prostředích) anebo prakticky nulová (v alkalické oblasti). Součet $\delta_{HA} + \delta_A$ při konstantním pH je vždy roven jedné (anebo 100%).

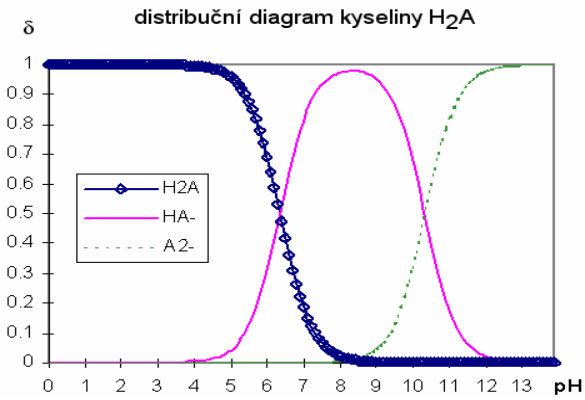


Závislost distribučního koeficientu jednosytné kyseliny δ(HA) a její konjugované báze δ(A$^-$) na pH. Průsečík křivek má souřadnice δ=0,5 a $pH=pK_A$

Distribuční koeficienty pro dvojsytnou kyselinu H_2A

Při konstantním pH platí $\delta(H_2A)+\delta(HA)+\delta(A)=1$. Je-li rozdíl hodnot pK_{A2} — pK_{A1} > 4, probíhá disociace do každého stupně v jiné oblasti kyselosti. Distribuční diagram takové dvojsytné kyseliny je shodný se „součtovým“ distribučním diagramem dvou jednosytných kyselin (H_2A a HA^-).

Závislost distribučních koeficientů dvojsytné kyseliny $\delta(H_2A)$, $\delta(HA^-)$ a $\delta(A^{2-})$ na pH; $pK_{A1}=6,3$; $pK_{A2}=10,3$; rozdíl $pK_{A2}-pK_{A1}$ má hodnotu 4. Křivky se protínají při pH rovném pK_{A1}, pK_{A2} a také při $pH=(pK_{A1}+pK_{A2})/2$.



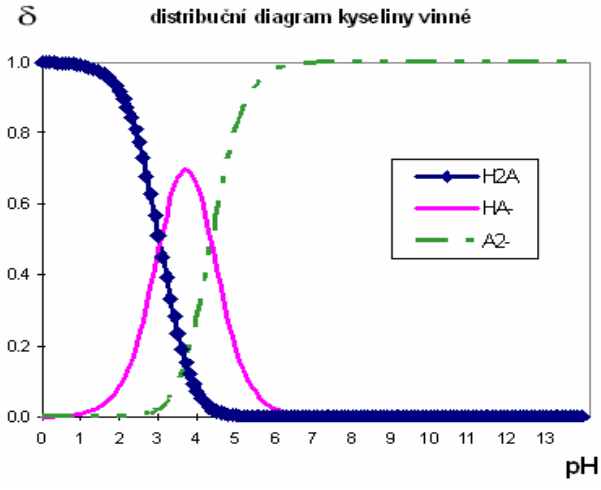
$$K_{A1}=[H^+][HA^-]/[H_2A] \qquad K_{A2}=[H^+][A^{2-}]/[HA^-] \qquad c_A=[H_2A]+[HA^-]+[A^{2-}]$$

$$\delta(H_2A)=[H_2A]/c_A = 1/(1+K_{A1}/[H^+]+K_{A1}K_{A2}/[H^+]^2)$$

$$\delta(HA)=[HA^-]/c_A = 1/([H^+]/K_{A1}+1+K_{A2}/[H^+]) = \delta(H_2A)\,K_{A1}/[H^+]$$

$$\delta(A)=[A^{2-}]/c_A = 1/([H^+]^2/K_{A1}K_{A2}+K_{A2}/[H^+]+1) = \delta(H_2A)\,K_{A1}K_{A2}/[H^+]^2$$

Tento obrázek ukazuje závislost distribučních koeficientů na pH pro dvojsytné kyseliny, je-li pK_{A2} - $pK_{A1}<4$: v takovém případě se oblasti disociace do jednotlivých stupňů překrývají.



LOGARITMICKÉ DISTRIBUČNÍ DIAGRAMY

Kyselina octová (pK_A=4,7) je prakticky zneutralizovaná (z 99%) při pH=6,7. Avšak i v silně alkalickém prostředí např. při pH=12,7 je v roztoku určitá, nepatrná rovnovážná koncentrace nedisociovaných molekul kyseliny. Z disociační konstanty vyplývá, že při pH=12,7 je v tomto případě poměr $[HA]/[A^-]=10^{-8}$.

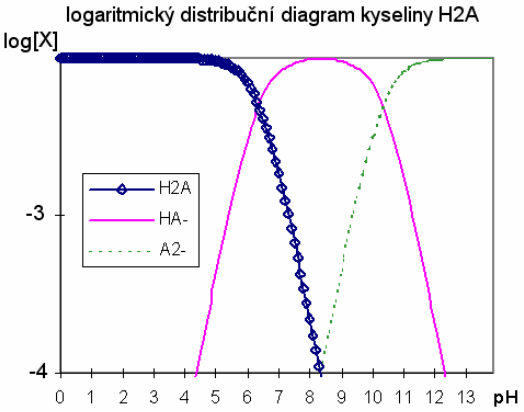
Distribuční diagramy δ=f(pH) dávají užitečnou informaci o poměrném zastoupení složek konjugovaného páru kyselina/zásada v oblasti pH=pK_A±2. Mimo tuto oblast je poměrné zastoupení jedné z komponent větší než 99% a pro druhou je menší než 1%. Hodnoty δ menší než 1% nelze odečíst z grafu δ=f(pH), **a proto používáme logaritmické závislosti** logδ=f(pH), častěji log[X]=pH, ze kterých je možno odečíst i velmi malé (např. 10^{-8}) hodnoty δ resp. [X], ([X] je koncentrace některé z komponent). Je-li δ>99% pro jednu komponentu v systému HA/A^-, můžeme považovat její koncentraci za rovnu celkové (=analytické) koncentraci, tj. součtu $[HA]+[A^-]$ a logaritmus koncentrace druhé složky vypočteme z rovnice

$$pK_A = \mathbf{1}\ pH - \log[A^-] + \log[HA]$$

V systému s dvojsytnou kyselinou, kde se vyskytuje prakticky jen H_2A nebo A^{2-} (tj. pH<pK_{A1}-2 nebo pH>pK_{A2}+2), použijeme vztahu

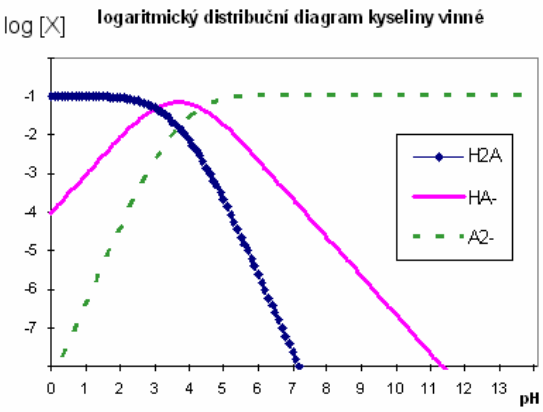
$$pK_{A1} + pK_{A2} = \mathbf{2}\ pH - \log[A^{2-}] + \log[H_2A]$$

Z uvedených rovnic vyplývá, že závislosti log[X]=f(pH) jsou přímkové a mají směrnice +1 nebo -1 pro systém s HA^- a +2 nebo -2 pro H_2A/A^{2-} v těch oblastech acidity, ve kterých je δ=99% pro jednu z komponent. V oblastech pro pH=pK_A±2 je závislost log[X]= f(pH) nelineární, pro výpočty v takových oblastech využijeme rovnice uvedené v odstavci "distribuční diagramy".



Logaritmický distribuční diagram log[δ] jako funkce pH pro dvojsytnou kyselinu (H_2A) o pK_{A1}=6 a pK_{A2}=10. Směrnice přímkových úseků dlog[δ]/dpH mají hodnoty 0 a ±1.

Logaritmický distribuční diagram log[δ] jako funkce pH pro dvojsytnou kyselinu (H_2A) o pK_{A1}=3 a pK_{A2}=4.3. Směrnice přímkových úseků dlog[δ]/dpH mají hodnoty 0, ±1 a ±2 (viz předchozí dvě rovnice).



2. REAKCE TVORBY KOMPLEXŮ

V chemii označujeme jako komplexy např. meziprodukty vznikající v průběhu katalyzovaných reakcí a také produkt immunochemické reakce protilátky s antigenem. V této kapitole jsou termínem komplex označovány pouze sloučeniny ve kterých je CENTRÁLNÍ ATOM (M) vázaný kovalentní vazbou na LIGAND (ligandy). Ligandem (L) rozumíme částici (ion nebo molekulu), která má volný elektronový pár, tj. elektronový pár nezapojený do žádné vazby (výjimky jsou u π-komplexů). Tento pár elektronů lze využít na vytvoření kovalentní vazby (dativní, koordinační vazba) ligandu na centrální atom. Centrální atom je obvykle kation, má volné elektronové orbitaly a ty jsou účastny na vytvoření kovalentní vazby s ligandy. Podle Lewisovy acidobazické teorie je centrální atom kyselinou a ligand zásadou.

DONOROVÝ ATOM je ten atom v ligandu, na kterém je lokalizován volný elektronový pár. Donorovým atomem v ligandu Cl^- je chlór. V oxalátovém ligandu $\{OOC\text{-}COO\}^{2-}$ jsou dva kyslíky donorovými atomy. Známe jedno-, několika- a mnohojaderné komplexy (MONO-, OLIGO- a POLYNUKLEÁRNÍ) ve kterých je jeden, několik málo anebo velmi mnoho centrálních atomů. Dosti často se setkáváme s nesprávnými termíny monomerní a polymerní komplex označující jednojaderné a polynukleární komplexy. Vzájemné propojení jednotlivých centrálních atomů ve vícejaderných komplexech obvykle realizují MŮSTKOVÉ LIGANDY, tj. ligandy mající minimálně 2 volné elektronové páry, které vytvoří vazby na dva centrální atomy. Můstkovým ligandem je např. hydroxidový ion OH^- (př. M-OH-M). Na centrální atom se váže n ligandů, platí $0 \le n \le N$ kde N je KOORDINAČNÍ ČÍSLO pro Centrální atom, tj. maximální počet donorových atomů, které může vázat centrální atom. Koordinační číslo určitého centrálního atomu nemusí být konstantou, pro konkrétní kombinace jednoho centrálního atomu s různými ligandy byly nalezeny odlišné hodnoty N. Za nejčastěji se vyskytující koordinační číslo u prvků ze skupiny přechodných kovů lze považovat N=6, časté je i N=4.

Rovnováhu mezi složkami acidobazického systému charakterizuje disociační konstanta K_A. O analogické rovnováze mezi složkami tvořícími komplex vypovídá (formační, asociační) KONSTANTA STABILITY β_n.

$$kys = zás + H^+ \qquad K_A=[H^+][zás] / [kys]$$

$$\text{Centrální atom} + n \text{ ligandů} = \text{komplex} \qquad \beta_n=[komplex]/[\text{Centrální atom}][ligand]^n$$

V tabulkách uváděné disociační konstanty slabých kyselin K_A jsou obvykle menší než 1, konstanty stability komplexů β jsou asociační konstanty, ty jsou převážně větší než 1. Ve starší literatuře najdeme i disociační konstanty komplexů (=1/β), ty jsou obvykle menší než 1. Formální podobnost konstant K_A a β_n dovoluje stejný způsob výpočtů pro acidobazické i komplexotvorné rovnováhy. U komplexů používáme KONSTANTY DÍLČÍ K_n a CELKOVÉ (globální) β_n. Dílčí konstanta K_n charakterizuje přijetí n-tého ligandu do komplexu, celková konstanta β_n vznik komplexu z centrálního atomu a n ligandů (označujeme M a L).

$$ML_{n-1} + L = ML_n \qquad K_n = [ML_n]/[ML_{n-1}][L]$$

$$M + n\,L = ML_n \qquad \beta_n = [ML_n]/[M][L]^n$$

$$\beta_n = K_1K_2K_3\ldots..K_{n-1}K_n$$

$$K_1 = \beta_1 \qquad K_0 = \beta_0 = [ML_0]/[M][L]^0 = 1$$

DISTRIBUČNÍ KOEFICIENTY δ, se kterými jsme se seznámili u acidobazických reakcí, se

používají i pro reakce tvorby komplexů. Uvažujme případ, kdy po smísení roztoků obsahujících centrální atom M s roztokem ligandu L výsledný roztok obsahuje volné (rozuměj solvatované) M a L a komplexy ML, ML_2 a ML_3, jejichž konstanty stability jsou K_1, K_2 a K_3. Částice M, L i komplexy mohou být ionty, jejich náboje jsou v tomto textu vynechávány. Distribuční koeficient δ(M) vyjadřuje podíl koncentrace volných M (tj. do komplexu s L nevázaných) na celkové (totální) koncentraci M ve všech v roztoku přítomných sloučeninách.

$$\delta(M) = [M]/c_M = [M] / ([M]+[ML]+[ML_2]+[ML_3])$$

$$\delta(M) = [M] / ([M]+[M]K_1[L]+[M]K_1K_2[L]^2+[M]K_1K_2K_3[L]^3)$$

$$\delta(M) = 1 / (1+\beta_1[L]+\beta_2[L]^2+\beta_3[L]^3) = 1 / \Sigma \beta_n [L]^n$$

sumarizujeme pro n=0 až N

Vznikají-li výlučně jednojaderné komplexy, distribuční koeficient závisí pouze na hodnotách konstant stability a na koncentraci volného ligandu, je nezávislý na koncentraci centrálního atomu. Pokud v roztoku vznikají vedle jednojaderných komplexů i vícejaderné, ve vzorci pro δ(M) jsou veličiny [M] v různých mocninách a v takovém případě je distribuční koeficient δ(M) také funkcí [M], tj. mění se se změnou celkové koncentrace M.

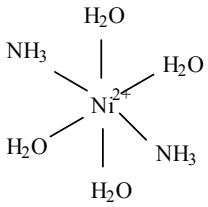
DISTRIBUČNÍ DIAGRAMY jsou grafy funkce δ(M)=f(log[L]) mají podobný tvar i podobný způsob interpretace jako známé distribuční diagramy acidobazických rovnováh δ(HA)=f(pH). Koncentrace volného ligandu [L], respektive log[L], má podobný význam pro tvorbu komplexů jako acidita (pH) pro disociaci slabých kyselin. V roztoku obsahujícím M, L a komplex ML (konstanta stability K_1) je δ(ML)=0,0l při log[L]= -logK_1-2, δ(ML)=0,5 při log[L]= -logK_1 a δ(ML)=0,99 při log[L]= -logK_1+2. Je to analogie s disociací slabé kyseliny, jejíž podstatná část (98%) probíhá v rozpětí 4 jednotek pH. Podobně 98% koordinace ligandu na centrální atom proběhne v rozsahu 4 jednotek log[L]. Je-li rozdíl logK_2 - logK_1 ± 4 nepřekrývají se oblasti tvorby komplexů ML a ML_2. Menší překrývání oblastí pro tvorbu jednotlivých komplexů obvykle pozorujeme u postupné tvorby chelátů, větší překryv bývá u komplexů s monodonorovými ligandy.

V acidobazických i komplexních rovnováhách se uplatňuje jakási "nabídka a poptávka". Čím větší je nabídka volných ligandů (vodíkových kationtů), tím více ligandů se váže na centrální atom (tím více vodíkových kationtů se váže na bazi). V roztocích s malou koncentrací volných ligandů převládají komplexy ve kterých je vázán malý počet ligandů na centrální atom. Zvyšujeme-li koncentraci [L], zvyšujeme-li nabídku ligandů, zvyšuje se počet ligandů vázaných do komplexů, tvoří se vyšší komplexy, tj. komplexy s větším počtem ligandů vázaných na jeden centrální atom. Podobně v roztocích s malou celkovou koncentrací centrálního atomu jsou optimální podmínky pro tvorbu mononukleárních komplexů. Se zvyšováním c_M vzrůstá nikoli nutnost, ale pouze pravděpodobnost tvorby vícejaderných sloučenin.

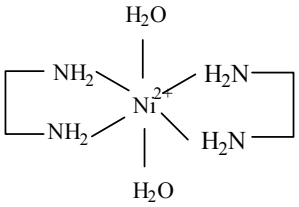
POSTUPNÁ (stupňovitá) TVORBA KOMPLEXŮ: Koordinuje-li centrální atom několik ligandů, obvykle se prvý z nich přidruží nejsnadněji a ty další postupně méně a méně snadno, to znamená $K_1>K_2>K_3>...>K_{N-1}>K_N$. Pro komplexní systém Ni^{2+}/NH_3 byly nalezeny hodnoty logK_1 až logK_6: 2,7; 2,2; 1,7; 1,1; 0,6 a 0,0. Je znám jen malý počet vyjímek u tohoto pravidla, např. u $Fe(CN)_6^{3-}$ a $Fe(CN)_6^{4-}$ všech 6 ligandů se koordinuje současně a v roztoku prakticky nejsou komplexy s menším počtem ligandů než 6.

CHELÁTY jsou komplexy, ve kterých se centrální atom váže na jeden ligand prostřednictvím 2 anebo více donorových atomů. Centrální atom je součástí CHELÁTOVÉHO KRUHU (cyklu). Je-li tento cyklus tvořen 5 anebo 6 atomy, vznikají stabilní 5- nebo 6-členné chelátové kruhy a jejich vytvoření značně přispívá ke zvětšení stability komplexu. Cheláty se 3-, 4-, 7- a vícečlennými cykly jsou také známy, ale jejich stabilita je malá. Příkladem dvojdonorového (BIDENTÁLNÍHO) LIGANDU je ethylendiamin $H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$ který se váže na centrální

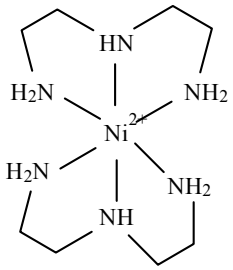
atom přes oba dusíky a vytváří jeden 5-členný kruh. Tridentální H_2N-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH_2 diethylentriamin je vázán přes všechny 3 dusíkové donorové atomy, vytváří tak 2 chelátové 5-členné cykly a jeho komplexy jsou stabilnější než ty s ethylendiaminem. Větší počet uzavřených chelátových kruhu vede ke zvýšení stabilty chelátu. Ligand označovaný jako "penten" $(H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N(CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2)_2$ se může vázat na jeden centrální atom všemi 6 donorovými atomy dusíku, vznikne velmi stabilní komplex, ve kterém je 5 pětičlenných chelátových cyklů. Jeden z těchto cyklů je uzavřen přes oba dusíky uprostřed řetězce a v dalších 4 cyklech je vždy jeden dusík zprostředka řetězce a jeden dusík z konce řetězce. Ethylendiamintetraacetátový (EDTA) ligand $(OOC\text{-}CH_2)_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N(CH_2\text{-}COO)_2^{4-}$ má podobnou strukturu jako penten, prostřednictvím svých 6 donorových atomů (2 N a 4 O) v chelátu uzavírá 5 pětičlenných cyklů a proto jsou komplexy EDTA s ionty velké většiny kovů velmi stabilní.



komplex diamin (tetraaqua) nikelnatý



chelát bisethylendiamin nikelnatý



bisdiethylentriamin-nikelnatý chelát

KOMPLEXY Ni^{2+} VE VODNÉM PROSTŘEDÍ

Zvýšenou stabilitu chelátů oproti komplexům s jednodonorovými ligandy charakterizuje CHELÁTOVÝ EFEKT, to je rozdíl $\log\beta_{chelát}$ - $\log\beta_{komplex}$. Obě tyto konstanty příslušejí komplexům, ve kterých je obsazen stejný počet koordinačních míst donorovými atomy a donorové atomy v chelátu i komplexu jsou stejné a mají co nejméně odlišný charakter, např. dusík z amoniaku a z alifatického aminu. Kation Ni^{2+} má koordinační číslo N=6 v komplexech s monodentálním NH_3 (konstanty označené β) i v chelátech s bidentálním ethylendiaminem (konstanty β^*). Při saturaci 2 koordinančích míst je $\log\beta^*_1$ - $\log\beta_2$ = 7,3-4,9 = 2,4, při obsazení 4 koordinančních míst $\log\beta^*_2$ - $\log\beta_4$ = 13,5 - 7,7 = 5,8 a při nasycení ligandy $\log\beta^*_3$ - $\log\beta_6$ =17,6-8,3= 9,3.

2.1 VLIV ACIDITY NA TVORBU KOMPLEXŮ

Centrální atom i ligand jsou v roztoku solvatovány. Ligand L je Báze, může vázat vodíkový ion a být přítomen v roztoku ve formě ligandové kyseliny HL (náboje iontů budou často pro zjednodušení vynechávány). Hydratovaný centrální atom je kyselinou, může hydrolýzovat za vzniku hydroxidových komplexů.

$$Fe(OH_2)_x^{3+} = Fe(OH_2)_{x-1}(OH)^{2+} + H^+$$

Má-li se vytvořit vazba mezi centrálním atomem a ligandem, musí se uvolnit na obou částicích koordinační místa pro tuto vazbu. To znamená, že pro přijetí jednodonorového ligandu musí se odštěpit z centrálního atomu jedna molekula koordinovaného rozpouštědla a z ligandové kyseliny HL se odštěpí H^+, který blokoval elektronový pár potřebný pro vytvoření koordinační vazby. Uvolnění molekuly koordinovaného rozpouštědla v prostředí s velkým nadbytkem tohoto rozpouštědla prakticky není možné postřehnout, avšak uvolnění vodíkových iontů dovedeme kvantitativně změřit (pH).

Kationty Fe^{3+} dávají s kyselinou salicylovou (H_2L) a s thiokyanátem NCS^- charakteristická červená zbarvení.

$Fe^{3+} + H_2L = FeL^+ + 2\ H^+$

$Fe^{3+} + NCS^- = FeNCS^{2+}$

V silně kyselém prostředí se netvoří červený chelát s kyselinou salicylovou, velká nabídka iontů H^+ vytěsní kation Fe^{3+} z barevného komplexu. Červený chelát FeL^+ vzniká až v mírně kyselém roztoku, kde Fe^{3+} "obstojí" v konkurenci s menší koncentrací iontů H^+ v soutěži o vazbu na salicylanový ligand. Při dalším snižování kyselosti vzrůstá nabídka volného salicylanového ligandu L^{2-} a jsou tak dány podmínky pro postupný vznik vyšších komplexů FeL_2^- a FeL_3^{3-}. V extrémně alkalickém prostředí vysoká koncentrace ligandů OH^- postupně vytěsňuje ligandy L^{2-} za vzniku SMĚSNÝCH KOMPLEXŮ (mixed ligands complex) typu $ML_x(OH)_y$, může i zcela rozložit salicylanový chelát a převést jej na hydroxidový komplex. Vedle "normálních" komplexů ML, ML_2 a ML_3 mohou vznikat i protonované komplexy M(HL), ML(HL) a $ML_2(HL)$, např. $Fe(HL)^{2+}$. Ligandem v těchto PROTONOVANÝCH KOMPLEXECH je neúplně deprotonovaná ligandová kyselina. Tyto protonované komplexy se tvoří v prostředích kyselejších než komplexy normální. Protonovaný komplex (MHL) je kyselinou konjugovanou s bází, kterou je komplex normální (ML).

Ligand NCS^- ve vodném roztoku neváže H^+, ve vodném prostředí není bází a proto jeho komplex s Fe^{3+} se tvoří i v silně kyselých roztocích. Komplex $FeNCS^{2+}$ je málo stabilní a proto v neutrálním a dokonce i slaboučce kyselém prostředí probíhá jeho hydrolytický rozklad za vzniku rezavě zbarvených hydroxidových komplexů Fe(III), vznikají hydrolytické produkty.

$FeNCS^{2+} + H_2O = Fe(OH)^{2+} + NCS^- + H^+$

2.2 ROVNOVÁŽNÉ KONSTANTY KOMPLEXŮ

Rovnovážnou konstantu pro reakci centrálního atomu M s ligandovou kyselinou HL (K_1^*) dostaneme kombinací konstant pro reakci komplexotvornou (K_1) a acidobazickou (K_A).

$M + HL = ML + H^+$ $\qquad K_1^* = [ML][H^+]/[M][HL]$

$M + L = ML$ $\qquad K_1 = [ML]/[M][L]$

$HL = H^+ + L$ $\qquad K_A = [H^+][L]/[HL]$

$$K_1^* = K_1K_A = [ML][M]^{-1}[L]^{-1}.[H^+][L][HL]^{-1} = \frac{[ML][H+]}{[M][HL]}$$

Symboly konstant K_n a β_n byly doporučeny mezinárodní chemickou unií IUPAC pro jednoznačně specifikované rovnováhy, u těchto symbolů není třeba vysvětlovat jejich význam. Potřebujeme-li konstantu pro jinou rovnováhu (viz K_1^*), musíme pro ni použít odlišný symbol a je třeba vysvětlit, jakou rovnováhu takto označená konstanta popisuje.

PODMÍNĚNÉ KONSTANTY STABILITY

Konstanta stability bez další specifikace by měla být KONSTANTA TERMODYNAMICKÁ, při výpočtu její hodnoty výrazy v hranatých závorkách [M], [L] a $[ML_n]$ představují aktivity jednotlivých

komponent. Taková termodynamická konstanta je pravou konstantou, je závislá pouze na teplotě. Protože aktivitní koeficienty jednotlivých iontů a molekul nejsou experimentálně dostupné a protože teoretický výpočet aktivitních koeficientů nedává vždy spolehlivé údaje, používáme velmi často KONCENTRAČNÍ KONSTANTY stability vypočtené z exeprimentálně dostupných koncentrací komponent. Setkáváme se i se SMÍŠENÝMI KONSTANTAMI stability, k jejich výpočtu se braly koncentrace některých složek (např. [M], [HL] a $[ML_n]$) a aktivity jiných komponent (např. $[H^+]$ změřená potenciometricky). Různé typy konstant pro jednu a touž rovnováhu mají poněkud odlišné hodnoty. Změna iontové síly roztoku vyvolá změnu aktivitních koeficientů a to vede ke změně hodnoty koncentrační konstanty. Koncentrační a smíšené konstanty jsou konstantami podmíněnými (dříve se se označovaly jako zdánlivé), protože charakterizují rovnováhu ustavenou v roztoku za určitých podmínek. Těmi podmínkami může být určitá iontová síla a také přítomnost určitých koncentrací nějakých dalších látek, které reagují (jde o vedlejší reakce) s komponentami účastnými v rovnováze popisované konstantou (v hlavní reakci).

Probíhá-li reakce mezi M a HL za vzniku ML_n ve vodném roztoku za přítomnosti pufru obsahujícího ligand X, probíhá hlavní reakce

$$M + n\,L = ML_n \qquad \beta_n = [ML_n]/[M][L]^n$$

a mohou probíhat i vedlejší reakce zahrnující hydrolýzu M, tvorbu komplexu MX se složkou pufru, disociaci ligandové kyseliny HL a buď protonaci anebo hydrolýzu komplexu ML_n (současný průběh hydrolýzy a protonace je nepravděpodobný), např.

$$M + H_2O = MOH + H^+ \qquad K_{MOH} = [MOH][H^+]/[M]$$

$$M + X = MX \qquad K_{MX} = [MX]/[M][X]$$

$$HL = L + H^+ \qquad K_{HL} = [H^+][L]/[HL]$$

$$ML_n + H^+ = ML_{n-1}(HL) \qquad K_{MLH} = [ML_{n-1}(HL)]/[ML_n][H^+]$$

$$ML_n + H_2O = ML_n(OH) + H^+ \qquad K_{MLOH} = [ML_n(OH)][H^+]/[ML_n]$$

Poznámka: Výrazy pro hydrolytické konstanty K_{MOH} a K_{MLOH} by měly zahrnovat aktivitu (nebo koncentraci) vody. Ve zředěných vodných roztocích je $[H_2O]$ prakticky konstantní a proto tuto veličinu obvykle zahrnujeme do konstanty. Dostaneme tak podmíněnou konstantu charakterizující rovnováhu pouze v roztoku s velikou koncentrací volné vody, tj. vody nevázané do solvatačních obalů iontů a molekul.

Veličina $[M]^*$ představuje součet koncentrací všech částic obsahujících centrální atom M nevázaný na ligand L, $[L]^*$ je součet všech koncentrací částic obsahujích ligand L, který není vázán na M a konečně $[ML_n]^*$ znamená součet koncentrací všech částic zahrnujích seskupení ML_n.

$$[M]^* = [M]+[MOH]+[MX] = [M](1+K_{MOH}[H^+]^{-1}+K_{MX}[X]) = [M]\,\alpha(M)$$

$$[L]^* = [L]+[HL] = [L](1+[H^+]K_{HL}^{-1}) = [L]\,\alpha(L)$$

$$[ML_n]^*=[ML_n]+[ML_{n-1}(HL)]+[ML_n(OH)]=[ML](1+K_{MLH}[H^+]+K_{MLOH}[H^+]^{-1})$$

$$[ML_n]^* = [ML_n]\,\alpha(ML_n)$$

$\alpha(H)$, $\alpha(L)$ a $\alpha(ML_n)$ jsou koeficienty vedlejších reakcí, viz kapitolu 1.4 - distribuční diagramy. Vztah mezi konstantou stability β_n a podmíněnou konstantou β_n^* pro rovnováhu hlavní

reakce v prostředí, ve kterém probíhají i vedlejší reakce, je dán rovnicí:

$$\beta_n^* = [ML_n]^* / [M]^*[L]^{*n} = \beta_n \alpha(ML_n) / \alpha(M)\{\alpha(L)\}^n$$

2.3 KOMPLEXY S ORGANICKÝMI ČINIDLY

Při analýze anorganických analytů používáme řadu organických sloučenin. Ikdyž tato činidla představují zvýšené nároky na přípravu, bezpečnost práce a likvidaci odpadů (menší chemická stálost, práce s těkavými organickými rozpouštědly a často jinak nebezpečnými chemikáliemi), mnohdy jsou selektivní až specifické anebo alespoň provedení reakce je jednoduché a rychlé. Podle způsobu jak reagují s analytem, lze je rozdělit do několika typů:

1/ Činidlo reaguje s analytem a vzniká produkt o výrazných vlastnostech (barva, fluorescence, rozpustnost, těkavost ...), ale tento produkt není komplex. Např. reakcí naftylaminu s kyselinou dusitou se tvoří azobarvivo anebo esterifikací kyseliny borité v nadbytku ethanolu dostaneme těkavý ester, který zbarví zeleně plamen hořícího alkoholu.

2/ Neutralizační indikátor barevný (fluorescenční) je složkou acidobazického páru, ve kterém kyselina a konjugovaná Báze mají odlišná zbarvení (fluorescenci). Podobně redoxní indikátory přecházejí oxidací na odlišné zbarvení (např. difenylamin) anebo oxidací se barvivo (methyloranž) rozloží a roztok se odbarví.

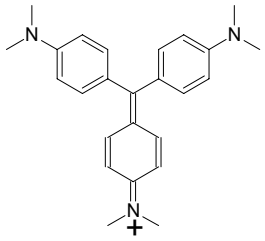
3/ Organickými činidly v užším slova smyslu rozumíme ligandy (ligandové kyseliny) tvořící s ionty kovů komplexy (často jsou to cheláty) analyticky významných vlastností. Molekula ogranického činidla zahrnuje jednu nebo více FUNKČNÍCH SKUPIN. V každé z těchto skupin je donorový atom, jehož volný (nevazebný) elektronový pár vytvoří vazbu na centrální atom. Analytické funkční skupiny mají nejčastěji donorové atomy O a N, méně často S a spíš vyjímečně P nebo As či jiné. Pouze halogenidy (nikoli organicky vázané halogeny) jsou donorovými atomy pro řadu kationtů těžkých kovů. Donorový atom kyslíku a také kombinace O a N donorů na chelatotvorném ligandu je neselektivní - taková činidla reagují takřka se všemi kationty kovů. SELEKTIVITA ostatních donorových atomů (N, S,...) spočívá v tom, že tvoří jen nestabilní vazby s kationty majícími elektronovou konfiguraci inertního plynu. To znamená, že pro kationty jako Na^+, Ca^{2+}, Al^{3+},... máme jen O-donorová a O, N-donorová činidla (crownethery, alizarin, EDTA). Uvedená činidla ale také N- a S-donorová reagují s ionty těžkých kovů; některá s velikým počtem iontů (SKUPINOVÁ REAKCE), jiná činidla jen s malým počtem iontů (SELEKTIVNÍ REAKCE). Volbou prostředí, ve kterém interakce analytu s činidlem probíhá, nastavíme podmínky pro SPECIFICKOU REAKCI, tj. reakci s jediným analytem. Např. diacetyldioxim (starší název dimethylglyoxim) ve zředěné HCl dává žlutou sraženinu jen s Pd(II) a ve slabě alkalickém roztoku stejné činidlo tvoří červenou sraženinu pouze s Ni(II).

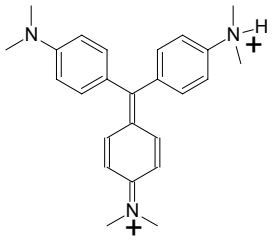
Funkční skupiny, jejichž donorové atomy se váží na centrální atom, můžeme označit jako aktivní část molekuly organického činidla. Zbytek molekuly, který se přímo neúčastní vazby na centrální atom, je pasivní část molekuly činidla. V této pasivní části lze provést substituce a ty celkem málo ovlivní průběh komplexace, ale mohou výrazně změnit vlastnosti vytvořeného komplexu. Např. kyselina o-aminobenzoová (=anthranilová) reaguje s řadou kationtů těžkých kovů za vzniku ve vodě nerozpustných chelátů. Zvětšíme-li hydrofobní pasivní část molekuly činidla (použijeme-li místo kyseliny o-aminobenzoové kyselinu o-aminonaftoovou), vytvoří se cheláty ve vodě ještě méně rozpustné než anthranilany. Vneseme-li do pasivní části činidla hydrofilní skupinu (nasulfonujeme-li kyselinu anthranilovou), vzniklé cheláty jsou značně rozpustné ve vodě. Nanitrováním činidla dostaneme sloučeninu, která je elektrochemicky aktivní a to umožní např. polarografické slednování průběhu srážení. Zařazením o-aminokarboxylového seskupení (tj. funkčně analytické skupiny kyseliny anthranilové) do struktury barviva dostaneme barevné činidlo a barevné komplexy, ty můžeme fotometrovat. Podle toho, čeho potřebujeme dosáhnout, je možné provádět nejrůznější úpravy v pasivní části struktury činidla.

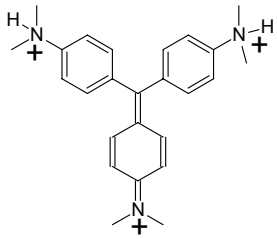
Změny v molekule/iontu acidobazického indikátoru, které vyvolají změnu barvy, lze ukázat na příkladu trifenylmethanového barviva krystalová violeť (KV). Fialové zbarvení přísluší kationtu

KV^+, určitá část viditelného záření je absorbována systémem "volnějších" elektronů. Tento systém zahrnuje π-elektrony 3 benzenových jader a nevazebné elektronové páry 3 dusíků z dimethylaminových skupin v kationtu KV^+. Přibráním jednoho vodíkového kationtu k fialovému KV^+ vzniká zelený KV^{2+}. Absorbující elektronový systém fialového KV^+ zahrnuje o jeden elektronový pár, lokalizovaný na dusíku, více než systém elektronů zeleného KV^{2+}. Zelený KV^{2+} má prakticky stejný systém volnějších elektronů jako zelený kation barviva malachitová zeleň. Protonací iontu KV^+ se eliminoval příspěvek jedné dimethylaminové skupiny na absorpci záření. Skupina $-N^+H(CH_3)_2$ nepřispívá k absorpci viditelného světla, a proto jsou zelené oba ionty lišící se v jediném substituentu, v malachitové zeleni je jím -H a v KV^{2+} je to $-N^+H(CH_3)_2$. Protonací všech 3 dusíků v KV dostaneme žlutý KV^{3+} a jeho absorpce je velmi podobná absorpci kationtu trifenylmethanového, v obou iontech absorbují pouze π-elektrony benzenových jader.

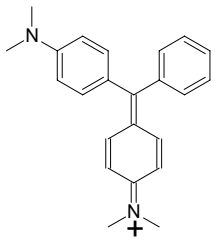
krystalová violeť: fialový KV^+ *zelený KV^{2+}* *žlutý KV^{3+}: žlutý trifenylmethan*







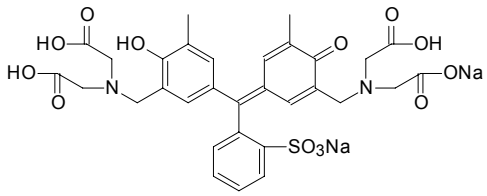
malachitová zeleň



Metalochromní indikátor xylenolová oranž představuje kombinaci acidobazického indikátoru a chelatotvorného činidla. Je určen pro chelatometrické titrace, ale lze jej použít i pro titrace neutralizační. Odštěpení vodíkového iontu z fenolické skupiny sulfonftaleinového barviva je spojeno se změnou barvy. Na benzenovém jádře v o-poloze k této fenolické skupině je chelatotvorný substituent $-CH_2-N(CH_2COO^-)_2$. Tento o-substituent představuje "polovinu" molekuly EDTA. Kation vázaný na chelatotvorný substituent se ocitá v blízkosti fenolické skupiny a tak snadno vytvoří další (6-členný) chelátový cyklus ve kterém je zapojen fenolický kyslík. Uzavření tohoto cyklu je spojeno s odštěpením fenolického vodíku, tj. se změnou barvy. Při uvedené chelataci se odštěpí H^+ ve značně kyselejším (méně alkalickém) prostředí než by se odštěpil za nepřítomnosti kovového iontu tvořícího chelát. Čím stabilnější je chelát s kovem, tím snadněji ion kovu vytěsní H^+ a tedy odštěpení

vodíkového kationtu probíhá v kyselejším prostředí. Chceme-li pozorovat barevnou změnu vyvolanou chelatací, musíme reakci provést v málo kyselém prostředí aby se vytvořil chelát (viz konkurence kationtů M a H) avšak roztok musí být dostatečně kyselý na to, aby za nepřítomnosti kationtu kovu nedisociovala fenolická skupina. Obecně platí, že reakce kationtů s barvivy, která mají charakter acidobazického indikátoru, provádíme za kontrolované acidity roztoku, nejčastěji v pufrovaném prostředí.

Xylenolová oranž



3. REDOXNÍ REAKCE

Při redukci částice elektrony přijímají, při oxidaci částice elektrony odštěpují. Příklad: $Fe^{3+} + e^- = Fe^{2+}$. Kation železitý se redukuje na kation železnatý, probíhá redukce Fe^{3+} na Fe^{2+}. Obrácený pochod je oxidace, Fe^{2+} je oxidován na Fe^{3+}. Oxidovadlem (= oxidovanou formou) je Fe^{3+} a redukovadlem (redukovanou formou) je Fe^{2+}. Oxidovadlo může oxidovat jinou látku, převezme od ní elektron a tím se samo zredukuje. Redukovadlo (redukovaná forma např. Fe^{2+}) odevzdává elektron, tím se samo oxiduje, přechází na oxidovanou formu (oxidovadlo, např. Fe^{3+}). Elektron uvolněný z redukovadla (Fe^{2+}) není schopen samostatné existence ve vodném prostředí a je okamžitě vázán na nějakou v roztoku přítomnou látku a tím ji zredukuje. Ona látka, je-li schopna přijmout elektron, je oxidovadlem a reakcí s redukovadlem Fe^{2+} byla zredukována.

REDUKOVADLO REDUKUJE jinou látku a tím SE SAMO OXIDUJE. OXIDOVADLO OXIDUJE jinou látku a SAMO SE REDUKUJE. Konjugovaný redoxní pár např. Fe^{3+} a Fe^{2+} je dvojice, která se liší počtem elektronů v oxidovadle a redukovadle (liší se nábojem, oxidačním stupněm ...).

V redoxních reakcích organických sloučenin účast elektronů není vždy přímo zřejmá. Acetaldehyd se může redukovat na ethanol, CH_3-CHO → CH_3-CH_2OH anebo se může oxidovat na kyselinu octovou, CH_2-CHO → CH_3-COOH. Oxidace organických molekul často znamená přijímání kyslíku anebo ztrátu vodíku. Redukce je děj opačný, je to příjem H anebo ztráta O. Uvedené reakce acetaldehydu lze provést i elektrochemicky v prostředí vodného roztoku. Anoda má kladný náboj, můžeme si představit, že je na ní málo elektronů, a proto tam probíhá oxidace, elektroda anoda přebírá od látky v roztoku elektrony a tím látku oxiduje. Katoda, která má dostatek elektronů, tyto elektrony předává látce v roztoku, redukuje látku.

oxidace: CH_3-CHO + H_2O → CH_3-COOH + 2 H^+ + 2 e

redukce: CH_3-CHO + 2 H^+ + 2 e → CH_3-CH_2OH

Elektrodové reakce ukazují účast elektronů v redoxních dějích. Např. příjem 1 atomu vodíku do organické látky je spojen se spotřebou jednoho elektronu a příjem 1 atomu kyslíku je doprovázen uvolněním 2 elektronů. Pro redoxní reakce potřebný vodík a také kyslík jsou získávány z rozpouštědla vody. Při elektrochemické oxidaci anebo redukci vody probíhají reakce:

H_2O → ½ O_2 + 2 H^+ + 2 e^-

2 H_2O + 2e^- → H_2 + 2 OH^-

Spotřeba anebo uvolnění vodíkových iontů (úbytek anebo vznik kyseliny) při těchto reakcích byly prokázány experimentálně.

Po formální stránce si jsou acidobazické a redoxní reakce podobné. Vyměňovanou (uvolňovanou anebo spotřebovávanou) částicí je vodíkový (hydroxoniový) kation v neutralizačních dějích a elektron v redoxních reakcích. Elektron, podobně jako proton, je velmi malá částice s velkou hustotou elektrického náboje na svém povrchu, je velmi reaktivní a proto volné elektrony (nevázané na atomy, ionty nebo molekuly) v roztocích neexistují. Vodíkové kationty se váží na protofilní molekuly rozpouštědla a vytvářejí rozpouštědlové kyseliny (např. H_3O^+). Rozpouštědlem solvatované elektrony byly pozorovány jen za velmi neobvyklých podmínek. Lze říci, že v běžných roztocích solvatované elektrony neexistují. Elektrony, které uvolnilo jedno redukovadlo (red_1) se okamžitě váží na jiné oxidovadlo (ox_2). Podobně jako v acidobazických reakcích 2 Báze (bas_1 a bas_2) soutěží o vodíkový

kationt, v redoxním ději soutěží o elektrony 2 oxidovadla (ox_1 a ox_2). Konjugované páry jsou: kys_1/bas_1, kys_2/bas_2, red_1/ox_1 a red_2/ox_2.

$kys_1 + bas_2 \rightarrow bas_1 + kys_2$

$red_1 + ox_2 \rightarrow ox_1 + red_2$

Dovedeme stanovit hodnotu acidobazické konstanty K_A za předpokladu, že v ní obsažený výraz $[H^+]$ představuje aktivitu (koncentraci) solvatovaných vodíkových kationtů. Vzhledem k tomu, že v roztoku nejsou solvatované elektrony, nemůžeme vyčíslit hodnotu K_{redox}. (Náboje iontů jsou vynechávány.)

$HA \rightarrow H + A$	$red \rightarrow e + ox$
$K_A = [H][A]/[HA]$	$K_{redox} = [e][ox]/[red]$
$[H] = K_A[HA]/[A]$	$[e] = K_{redox}[red]/[ox]$
$pH = pK_A + \log([bas]/[kys])$	$E = E^o + RT(nF)^{-1}\ln([ox]/[red])$

Experimentálně měřitelný potenciál E je jakousi mírou aktivity elektronů v roztoku, čím negativnější je potenciál, tím větší je aktivita elektronů. Čím negativnější je redoxní potenciál, tím silnější redukovadlo je v roztoku, tím ochotněji redukovadlo přítomné v roztoku předává své elektrony. Pro redoxní potenciál známe Nernstovu rovnici. Z porovnání Nernstovy rovnice s rovnicí pro výpočet pH pufru vyplývá, že veličina E odpovídá logaritmu jakési aktivity elektronů a E^o odpovídá logaritmu rovnovážné konstanty konjugovaného redoxního páru K_{redox}. Zavedení veličin R, T a F umožňuje vyjádřit vztah mezi E (ve Voltech) a koncentracemi [red] a [ox] (jednotka mol/l).

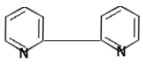
V acidobazických reakcích disociační konstanta kyseliny charakterizuje snadnost s jakou kyselina odštěpí svůj vodíkový kation a platí pravidlo: čím silnější kyselina, tím slabší je s ní konjugovaná zásada. Pro redoxní děje je analogickou konstantou standardní (nebo podmíněný) redoxní potenciál E^o, který charakterizuje buď snadnost, s jakou redukovadlo odštěpuje svůj elektron anebo ochotu konjugovaného oxidovadla elektrony přijímat. Redoxní potenciál E^o přísluší konjugované dvojici redukovadlo/oxidovadlo a nikoli samotnému redukovadlu anebo oxidovadlu. Čím negativnější je hodnota E^o, tím snadněji odštěpí redukovadlo své elektrony, tím silnější je to redukovadlo. Čím negativnější je E^o, tím silnější je redukovadlo a tím slabší je s ním konjugované oxidovadlo.

Redukovadla s negativnějším E^o předávají své elektrony oxidovadlům s pozitivnějším E^o.

$Co^{3+} + e \rightarrow Co^{2+}$ $E^o = +1{,}95$ V (+0,31 V v 2, 2´- bipyridylu)

$Fe^{3+} + e \rightarrow Fe^{2+}$ $E^o = +0{,}77$ V (+1,12 V v 2, 2´- bipyridylu)

$Ti^{4+} + e \rightarrow Ti^{3+}$ $E^o = +0{,}12$ V



Zde uvedené standardní redoxní potenciály pro 3 redoxní páry indikují, že probíhají reakce mezi $Ti^{3+} + Fe^{3+}$, $Ti^{3+} + Co^{3+}$ a $Fe^{2+} + Co^{3+}$ avšak nereagují Ti^{4+} s Fe^{2+}, Ti^{4+} s Co^{2+} a Fe^{3+} s Co^{2+}. Velmi silným redukovadlem je Ti^{3+}, jeho roztoky uchováváme v inertní atmosféře (CO_2, N_2, ...) abychom zabránili oxidaci vzdušným kyslíkem:

$2\ Ti^{3+} + 2\ H^+ + O_2 \rightarrow 2\ Ti^{4+} + H_2O$

Ti(IV) je tak slabým oxidovadlem, že v praxi nemá jako oxidovadlo použití. Hydratovaný Co^{3+} je tak silným oxidovadlem, že oxiduje vodu na kyslík (tato reakce v prostředí zředěné kyseliny

sírové probíhá velmi pomalu):

$$2\ Co^{3+} + H_2O \rightarrow 2\ Co^{2+} + 2\ H^+ + O_2$$

Extrémně silná oxidovadla (F_2) a redukovadla (kovový Na) reagují s rozpouštědlem vodou (rozkládají vodu), a proto se nehodí k použití pro reakce ve vodném prostředí.

Redoxní potenciál roztoku obsahujícího ionty železnaté a železité je dán Nernstovou rovnicí

$$E = E^o + 0{,}06 \log([Fe^{3+}]/[Fe^{2+}])$$

Výrazy v hranatých závorkách představují aktivity (často koncentrace) hydratovaných iontů. V nekomplexujícím prostředí, tedy v kyselém roztoku, ve kterém neprobíhá hydrolýza, a za přítomnosti prakticky nekomplexujících látek (např. ClO_4^- nebo NO_3^-) je $[Fe^{3+}]=c_{ox}$ a $[Fe^{2+}]=c_{red}$ tj. celkové koncentrace troj- a dvojmocného železa jsou rovny koncentracím jejich hydratovaných iontů. Za přítomnosti látek s charakterem ligandů vznikají komplexy (probíhají vedlejší reakce) a zmenší se rovnovážné koncentrace volných (=hydratovaných) iontů

$$c_{red} = [Fe^{2+}]\ \alpha_{red}$$

$$c_{ox} = [Fe^{3+}]\ \alpha_{ox}$$

α_{red} a α_{ox} jsou koeficienty vedlejších reakcí. Ligand bipy (=2, 2´-bipyridyl) tvoří komplexy ML_3 s Fe(II) i Fe(III), ty s Fe(II) jsou mnohem stabilnější než s Fe(III), to znamená $\alpha_{red}>\alpha_{ox}$. Roztok „redoxního pufru“ tvořený roztokem obsahujícím hydratované ionty Fe^{3+} a Fe^{2+} má potenciál E. Přidáme-li k tomuto roztoku 2, 2‘-bipyridyl, vytvoří se komplexy, hodnota $[Fe^{2+}]$ se zmenší mnohem více než $[Fe^{3+}]$ a to má za následek výrazné zvětšení potenciálu E. Hodnotu potenciálu E v komplexujícím prostředí vypočteme po dosazení koeficientů vedlejších reakcí do Nernstovy rovnice.

$$E = E^o + 0{,}06 \log([Fe^{3+}]/[Fe^{2+}])$$

$$E = E^o + 0{,}06 \log (c_{ox}\ \alpha_{red} / c_{red}\ \alpha_{ox})$$

$$E = E^o + 0{,}06 \log (\alpha_{red}/\alpha_{ox}) + 0{,}06 \log (c_{ox}/c_{red})$$

$$E = E^{o/} + 0{,}06 \log (c_{ox}/c_{red})$$

Hodnotu podmíněného redoxního potenciálu $E^{o/}$ jsme dostali zahrnutím koeficientů vedlejších reakcí ke standardnímu redoxpotenciálu E^o. Čím větší je rozdíl ve stabilitě komplexů redukované a oxidované formy, tím větší je rozdíl mezi hodnotami standardního a podmíněného potenciálu.

Poznámka: Cheláty s 2,2´-bipyridylem ML_3 dávají také Co(II) a Co(III), v tomto případě je stabilnější komplex oxidované formy, tedy $\alpha_{ox} > \alpha_{red}$. V prostředí bipyridylu je $E^{o/}$ pro systém Co(III)/Co(II) +0,31 V a pro Fe(III)/Fe(II) +1,12 V. V komplexujícím prostředí bipyridylu oxidují železité soli Co(II) na Co(III). Reakce hydratovaných iontů v nekomplexujícím prostředí za standardních podmínek probíhá opačným směrem než v komplexech s bipyridylem. Vyplývá to z porovnání hodnot standardních (E^o) a podmíněných ($E^{o/}$) redoxních potenciálů.

Redoxní systém může tvořit konjugovaný pár (redukovadlo a oxidovadlo), dvojice iontů, která si vyměňuje 1 elektron (viz reakce Ce) nebo více elektronů (Sn). Redox systém může zahrnovat i více než 2 ionty (I), také molekuly (Cl), komponenty v plynném (Cl_2) a v pevném skupenství (S)

anebo vodu a produkty její disociace (sulfát). Redoxní systém může zahrnovat i syntézu nebo rozklad sloučeniny (tetrathionan, poslední reakce).

$Ce^{4+} + e \rightarrow Ce^{3+}$ $E^o = + 1,74$ V

$Sn^{4+} + 2\ e \rightarrow Sn^{2+}$ $E^o = + 0,14$ V

$I_3^- + 2\ e \rightarrow 3\ I^-$ $E^o = + 0,54$ V

$Cl_2(gas) + e \rightarrow Cl^-$ $E^o = + 1,39$ V

$S(solid) + 2\ e \rightarrow S^{2-}$ $E^o = + 0,14$ V

$SO_4^{2-} + 4\ H^+ + 2\ e \rightarrow H_2SO_3 + H_2O$ $E^o = + 0,17$ V

$O_3S\text{-}S\text{-}S\text{-}SO_3^{2-} + 2\ e \rightarrow 2\ S\text{-}SO_3^{2-}$ $E^o = + 0,09$ V

Poznámka: oxidace siřičitanu na síran probíhá bez problémů, avšak síran ve vodném prostředí nelze zredukovat na siřičitan; je to příklad nereverzibilní reakce. Rovněž redukce tetrathionanu na thiosulfát nebo síry na sulfan probíhají složitěji než oxidace thiosulfátu nebo sulfanu.

Konjugovaným oxidovadlem a redukovadlem může být dvojice kyselin v různém stupni neutralizace probíhá-li reakce při určité aciditě (viz reakce As), oxidovaná a redukovaná forma mohou vázat stejný (Fe) anebo různý počet ligandů (Pt) a mohou se lišit v nuklearitě (Cr).

$H_2AsO_4^- + 3\ H^+ + 2\ e \rightarrow H_3AsO_3 + H_2O$ pro pH=4,6 je $E^{o/}$=+0,19V

$Fe(CN)_6^{3-} + e \rightarrow Fe(CN)_6^{4-}$ $E^o = + 0,36$ V

$PtCl_6^{2-} + 2\ e \rightarrow PtCl_4^{2-} + 2\ Cl^-$ $E^o = + 0,73$ V

$Cr_2O_7^{2-} + 7\ H^+ + 3\ e \rightarrow Cr^{3+} + 7/2\ H_2O$ $E^o = + 1,33$ V

3.1 ZÁVISLOST REDOXNÍHO POTENCIÁLU NA ACIDITĚ

Redoxní potenciál E^o charakterizuje rovnováhu mezi všemi složkami redoxního systému, nikoli rovnováhu pouze mezi oxidovadlem a konjugovaným redukovadlem. Redoxní systém As(V)/As(III) představuje rovnováha

$H_3AsO_4 + 2\ H^+ + 2\ e \rightarrow H_3AsO_3 + H_2O$ E^o=+0,56V

Nernstova rovnice pro tento systém zahrnuje i aktivitu (koncentraci) vodíkových iontů, měla by mít tvar

$$E = E^o + 0,03 \log([H_3AsO_4][H^+]^2/[H_3AsO_3][H_2O])$$

avšak ve zředěných vodných roztocích je $[H_2O]$ konstantní, zahrnujeme ji do výrazu pro E^o a běžně píšeme Nernstovu rovnici ve tvaru

$$E = E^o + 0,03 \log([H_3AsO_4][H^+]^2/[H_3AsO_3])$$

Pracujeme-li při konstantní aciditě, lze do konstanty zahrnout i $[H^+]$ a dostaneme podmíněnou konstantu $E^{o/}$. Odlišná acidita vyvolá odlišný stupeň disociace trojsytné kyseliny arseničné (K_A) a

jednosytné arsenité (K_a), pro celkové koncentrace As(V) a As (III), c_{ox} a c_{red} platí:

$$c_{ox} = [H_3AsO_4] (1 + K_{A1}[H^+]^{-1} + K_{A1}K_{A2}[H^+]^{-2} + K_{A1}K_{A2}K_{A3}[H^+]^{-3})$$

$$c_{ox} = [H_3AsO_4] \alpha_{ox}$$

$$c_{red} = [H_3AsO_3](1 + K_{a1}[H^+]^{-1}) = [H_3AsO_3] \alpha_{red}$$

$$E^{o/} = E^o + 0{,}03 \log([H^+]^2 \alpha_{red}/\alpha_{ox})$$

$$E = E^{o/} + 0{,}03 \log(c_{ox}/c_{red})$$

Poslední rovnice představuje tu formu, kterou běžně používáme, zahrnuje celkové koncentrace oxidovadla i redukovadla a podmíněmý redoxní potenciál $E^{o/}$ (nikoli standardní potenciál E^o !!). Při zmenšování kyselosti v systému arseničnan/arsenitan nabývá $E^{o/}$ menších (negativnějších) hodnot, pH/$E^{o/}$: 0,0/+0,56V; 3,0/+0,35V; 6,0/+0,08V; 9,0/-0,24V a 12,0/-0,62V.

Redoxní potenciály $E^{o/}$ jsou závislé na aciditě roztoku pokud ionty H^+ anebo OH^- figurují v rovnici pro redoxní systém {viz As(V)/As(III) anebo S(VI)/S(IV)}. A také v případech, kdy oxidovadlo anebo redukovadlo se účastní acidobazického děje (např. hydrolýza v systému Fe^{3+}/Fe^{2+}). Obvykle v kyselých roztocích jsou hodnoty $E^{o/}$ pozitivnější než v méně kyselých (neutrálních či alkalických). To znamená, že oxidovadlo má větší oxidační schopnost v kyselém něž v neutrálním či alkalickém prostředí. Složky systému $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ nejsou účastny v acidobazických dějích, redoxní potenciál $E^{o/}$ (přibližně +0,4 V) se prakticky nemění s pH a v prostředí 10% NaOH je hexakyanoželezitan jedním z nejsilnějších oxidovadel vhodných pro titraci v tomto pro analýzu velmi neobvyklém reakčním prostředí.

3.2 REDOXNÍ INTERAKCE. VÝPOČTY KOEFICIENTŮ REDOXNÍCH REAKCÍ

Oxidovadlo ox_1 reaguje s redukovadlem z jiného redoxního systému red_2. Probíhá výměna elektronů, kolik elektronů se uvolní z redukovadla, tolik jich přijme oxidovadlo.

$ox_1 + p\ e \rightarrow red_1$ $\qquad E_1^{o/}$

$ox_2 + q\ e \rightarrow red_2$ $\qquad E_2^{o/}$

$q\ ox_1 + p\ red_2 \rightarrow q\ red_1 + p\ ox_2$

Rovnici pro redoxní reakci získáme součtem rovnic pro redoxní systémy. Sečítané rovnice násobíme vhodnými koeficienty tak, aby ve výsledné součtové rovnici redoxní reakce nevystupovaly žádné elektrony. Do reakce vstupující oxidovadlo (ox_1) by mělo patřit do redoxního systému s větším (positivnějším) $E^{o/}$ a redukovadlo vstupující do reakce by mělo být součástí redoxního systému s negativnějším (menším) $E^{o/}$. Výtěžek této reakce (koncentrace produktů v rovnováze) bude tím větší, čím větší je rozdíl $E_1^{o/} - E_2^{o/}$.

Příkladem redoxní reakce je oxidace kyseliny šťavelové manganistanem v roztoku silné kyseliny (sírové). Při sestavovnání rovnice pro tuto reakci můžeme postupovat tak, že si napíšeme rovnice pro oba děje, pro redukci MnO_4^- a pro oxidaci $H_2C_2O_4$.

<u>*redukční reakce:*</u>

Je třeba vědět, že manganistan v tomto prostředí se redukuje na Mn^{2+}.

$MnO_4^- \rightarrow Mn^{2+}$

Na obou stranách chemické rovnice musí být stejný počet atomů a nábojů. Naše schéma má zatím stejný počet atomů Mn ale různý počet atomů O. Tam, kde kyslík chybí, jej dopíšeme ve formě vody:

$MnO_4^- \rightarrow Mn^{2+} + 4\ H_2O$

Počet atomů H na obou stranách vyrovnáme tak, že chybějící vodíky připíšeme ve formě vodíkových iontů:

$MnO_4^- + 8\ H^+ \rightarrow Mn^{2+} + 4\ H_2O$

Dostali jsme reakční schéma, ve kterém na obou stranách je stejně atomů. Dopsáním elektronů tak, aby byla splněna i rovnost nábojů dostaneme rovnici redoxního systému Mn(VII)/Mn(II).

$MnO_4^- + 8\ H^+ + 5\ e \rightarrow Mn^{2+} + 4\ H_2O$

<u>*oxidační reakce:*</u>

Víme, že kyselina šťavelová se oxiduje na oxid uhličitý:

$H_2C_2O_4 \rightarrow CO_2$

Vyrovnáme na obou stranách budoucí rovnice počet atomů jiných než O a H:

$H_2C_2O_4 \rightarrow 2\ CO_2$

Na obou stranách je stejný počet atomů C a také O, zbývá vyrovnat vodíky:

$H_2C_2O_4 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ H^+$

Po dopsání elektronů máme rovnici:

$H_2C_2O_4 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ H^+ + 2\ e$

Poznámka: Kyselina šťavelová je jednak dvojsytná kyselina a také její oxidace je dvouelektronový děj. Mol chemických ekvivalentů kyseliny šťavelové v neutralizačních reakcích (= mol dělený počtem odštěpených H^+) i v redoxních reakcích (= mol dělený počtem vyměňovaných elektronů) je v obou případech stejný. Tato totožnost molů chemických ekvivalentů jedné látky pro neutralizační a pro redoxní reakce je pouhou náhodou. Obecně platí, že sytnost kyseliny žádným způsobem nesouvisí s počtem elektronů účastných na její oxidaci.

Obecně lze charakterizovat postup při sestavení chemické rovnice pro redoxní systém ve vodném prostředí takto:

1/ Napíšeme chemické vzorce oxidovadla i konjugovaného redukovadla.

2/ Upravíme obě strany budoucí rovnice tak, aby na obou stranách byl stejný počet atomů jiných prvků než O a H.

3/ Vyrovnáme počet atomů O na obou stranách tak, že na jednu stranu připíšeme potřebný počet molekul vody.

4/ Na onu stranu, kde chybějí atomy vodíku, přidáme potřebný počet vodíkových iontů. Tím jsme dosáhli rovnosti v počtech atomů na obou stranách budoucí rovnice.

5/ Přípíšeme potřebný počet elektronů tak, aby byla splněna i rovnost v počtu nábojů na obou stranách rovnice.

Pozn.: tento postup sestavování rovnic je čistě formální a naprosto nesouvisí s mechanismem reálně probíhajících dějů. Avšak výsledná rovnice charakterizuje reálnou rovnováhu tak, jak ji odráží Nernstova rovnice a experimentálně lze ověřit i počet H^+ iontů účastných v redoxní reakci.

spojení redukční a oxidační reakce:

Jeden mol manganistanu uvolní 5 molů elektronů a jeden mol kyseliny šťavelové spotřebuje 2 moly elektronů. Manganistan reaguje s kyselinou šťavelovou ve stechiometrickém poměru 2:5. Rovnici pro redox systém Mn(VII)/Mn(II) vynásobíme koeficientem 2 a rovnici pro systém $CO_2/H_2C_2O_4$ koeficientem 5. Takto vynásobené rovnice sečteme, výsledkem je rovnice pro redoxní chemickou reakci.

$2\ MnO_4^- + 16\ H^+ + 10\ e \rightarrow 2\ Mn^{2+} + 8\ H_2O$

$5\ H_2C_2O_4 \rightarrow 10\ CO_2 + 10\ H^+ + 10\ e$

$2\ MnO_4^- + 5\ H_2C_2O_4 + 6\ H^+ \rightarrow 2\ Mn^{2+} + 10\ CO_2 + 8\ H_2O$

REDUKCE NĚKTERÝCH OXIDOVADEL

$IO_3^- + 6\ H^+ + 6\ e \rightarrow I^- + 3\ H_2O$	v kys. roztoku, I(+V)->I(-I)
$IO_3^- + 6\ H^+ + 4\ e \rightarrow I^+ + 3\ H_2O$	v kys. roztoku, I(+V)->I(+I)
$IO_4^- + 2\ H^+ + 2 \rightarrow IO_3^- + H_2O$	v neutr. roztoku, I(VII)->I(V)
$I_3^- + 2\ e \rightarrow 3\ I^-$	
$MnO_4^- + 8\ H^+ + 5\ e \rightarrow Mn^{2+} + 4\ H_2O$	ve zřed. kys. sírové
$MnO_4^- + 4\ H^+ + 3\ e \rightarrow MnO_2 + 2\ H_2O$	v neutr.až slabě kys. roztoku
$MnO_4^- + e \rightarrow MnO_4^{2-}$	v alkal. roztoku

$NO_3^- + 9\ H^+ + 8\ e \rightarrow NH_3 + 3\ H_2O$

$C_6H_5NO_2$ (nitrobenzen) $+ 6\ H^+ + 6\ e \rightarrow C_6H_5NH_2 + 2\ H_2O$

$O_2 + 4\ H^+ + 4\ e \rightarrow 2\ H_2O$

$H_2O_2 + 2\ H^+ + 2\ e \rightarrow 2\ H_2O$

OXIDACE NĚKTERÝCH REDUKOVADEL

$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H^+ + 2\ e$

$H_2N\text{-}NH_2$ (hydrazin) $\rightarrow N_2 + 4\ H^+ + 4\ e$

$SO_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2\ H^+ + 2\ e$

$H_2S \rightarrow S + 2H^+ + 2e$ v kyselém roztoku

$S^{2-} + 4\ OH^- \rightarrow SO_4^{2-} + 4\ H^+ + 8\ e$ nadbytek oxidovadla, pH=14

$HNO_2 + H_2O \rightarrow NO_3^- + 3\ H^+ + 2\ e$

C_6H_5OH (fenol) $+ 11\ H_2O \rightarrow 6\ CO_2 + 28\ H^+ + 28\ e$

3.3 REDOXNÍ ROVNOVÁHY

Ustaví-li se v roztoku rovnováha

$$q\ ox_1 + p\ red_2 \rightarrow q\ red_1 + p\ ox_2$$

$$K_{r/o} = [red_1]^q[ox_2]^p / [ox_1]^q[red_2]^p$$

a jsou-li podmíněné redoxní potenciály $E_1^{o/}$ a $E_2^{o/}$, naměříme v tom roztoku redoxní potenciál E, který dovedeme vypočítat dosazením do Nernstovy rovnice. V roztoku jsou sice 2 redoxní systémy ox_1/red_1 a ox_2/red_2 , ale v rovnovážném stavu může být v roztoku pouze jediný potenciál E.

$$E = E_1^{o/} + 0{,}06\ p^{-1}\log([ox_1]/[red_1])$$

$$E = E_2^{o/} + 0{,}06\ q^{-1}\log([ox_2]/[red_2])$$

$$\log([ox_1]^q/[red_1]^q) = (E - E_1^{o/})pq/0{,}06$$

$$\log([ox_2]^p/[red_2]^p) = (E - E_2^{o/})qp/0{,}06$$

$$\log K_{r/o} = \log([ox_2]^p/[red_2]^p) - \log([ox_1]^q/[red_1]^q) = qp(E_2^{o/}+E_1^{o/})\ /0{,}06$$

Podmíněnou rovnovážnou konstantu redoxní reakce $K_{r/o}$ lze vyjádřit pomocí parametrů redoxní rovnice p a q a podmíněných redoxních potenciálů $E_1^{o/}$ a $E_2^{o/}$.

Poznámka: pokud někomu připadá málo přehledné operovat s obecně formulovanou reakcí mezi q ox_1 a p red_2 lze doporučit náhradu reakcí 2 $Ce^{4+} + Sn^{2+} = 2\ Ce^{3+} + Sn^{4+}$, ve které ox_1 je Ce^{4+}, p=1 a q=2.

Při titračním stanovení založeném na redoxní reakci požadujeme, aby na konci titrace zreagovalo 99,9% analytu, to znamená poměr [ox]/[red] je roven 1000 (je-li analyt oxidován) anebo 0,001 (analyt je redukován). Za těchto podmínek

$$E_{konec} = E^{o/} \pm 0{,}06\ p^{-1}\ \log([ox]/[red]) = E^{o/} \pm 0{,}18\ p^{-1}$$

znaménko plus platí pro oxidaci analytu a mínus pro jeho redukci. Zároveň vyžadujeme, aby titrační činidlo na konci titrace rovněž zreagovalo aspoň z 99,9%. To znamená, že dostaneme stejné Nernstovy rovnice jak pro analyt, tak i pro titrační činidlo. Je-li v rovnici pro analyt mínus, je v rovnici pro činidlo plus a obráceně. Aby byl splněn požadavek zreagování aspoň z 99,9% je třeba, aby rozdíl podmíněných redoxních potenciálů $E^{o/}$ pro analyt a pro titrační činidlo byl minimálně 0,36 V pro případ p=q=1, běžně se uvádí zaokrouhlená hodnota 0,4 V. Je-li jeden z parametrů q a p (anebo oba)

větší než 1, je splněna podmínka 99,9% ztitrování i při rozdílu hodnot $E^{o/}$ menším než 0,36 V. Pokud bychom se spokojili se zreagováním pouze z 99%, stačil by nám rozdíl hodnot $E^{o/}$ 0,24V pro p=q=1 a 0,12 V pro p=q=2.

V ekvivalenci titračního stanovení, tj. v situaci, kdy reagující komponenty byly smíseny ve stechiometrickém poměru, tj. do reakce vstoupilo q molů ox_1 na p molů red_2, při dosažení rovnováhy platí

$[red_1] = [ox_2]\ p/q$

$[ox_1] = [red_2]\ p/q$

$[ox_1]/[red_1] = [red_2]/[ox_2]$

$E = E_1^{o/} + 0{,}06\ p^{-1} \log([ox_1]/[red_1])$

$E = E_2^{o/} + 0{,}06\ q^{-1} \log([red_1]/[ox_1])$

$\log([ox_1]/[red_2]) = (E - E_1^{o/})\ p\ /0{,}06 = (E_2^{o/} - E)\ q\ /0{,}06$

$(E - E_1^{o/})\ p\ /0{,}06 = (E_2^{o/} - E)\ q\ /0{,}06$

$E = (\ q\ E_2^{o/} + p\ E_1^{o/})/(\ p+q\ )$

V ekvivalenci je rovnovážný potenciál roven aritmetickému průměru podmíněných redoxních potenciálů $E_1^{o/}$ a $E_2^{o/}$ v případě že p=q. Při nerovnosti hodnot p a q je rovnovážný potenciál v ekvivalenci blíže hodnoty $E^{o/}$ toho redoxního systému, který vyměňuje větší počet elektronů.

4. KINETIKA ANALYTICKÝCH REAKCÍ

V předchozích kapitolách byly diskutovány reakční rovnováhy a nebyl brán zřetel na to, jak rychle se tyto rovnováhy ustavují, byly tedy rozebírány *termodynamické a nikoli kinetické* aspekty chemických reakcí. Řada reakcí mezi ionty ve vodném prostředí probíhá velmi rychle, a proto jejich kinetika je obtížně měřitelná. Vetšina reakcí organických molekul, také reakce v prostředí viskoznějším než voda (např. v glycerolu) a hlavně reakce katalyzované probíhají s rychlostí omezenou, reakční rychlost můžeme měřit a naměřená data využít pro kvantitativní analýzu. Je známo orientační pravidlo, že reakční rychlost většiny reakcí vzroste na dvojnásobek, zvýšíme-li teplotu o cca 20^{o}C. Tato závislost reakční rychlosti na teplotě vyžaduje práci s termostatovanými roztoky a samozřejmě musíme též sledovat čas.

Uvažujme reakci analytu A který reaguje s činidlem B za vzniku produktu C.

$$A + 2\,B \rightarrow C \qquad\qquad K = [C]/[A][B]^2$$

Pro změření reakční rychlosti (v) vzniku produktu C ze složek A a B vyjdeme ze vztahu

$$v = -d[A]/dt = -\tfrac{1}{2}\, d[B]/dt = d[C]/dt$$

Pro analytické účely měříme buď narůstání koncentrace produktu C (vzrůst hodnoty v čase t=0 nulové) anebo úbytek činidla B (pokles na počátku poměrně veliké koncentrace) v závislosti na čase. Obecně je výhodnější (přesnější) měřit malý nárůst nepatrné hodnoty než měřit malý pokles hodnoty velké. Bylo by možné měřit též pokles koncentrace analytu A, avšak dovedeme-li změřit [A] přímo, nepoužijeme pro stanovení A kinetickou metodu.

Pro okamžitou rychlost (v_1) tvorby C (reakce 3. řádu) platí

$$v_1 = k_1[A][B]^2$$

a pro současně probíhající rozklad C, reakci 1. řádu

$$v_2 = -k_2[C]$$

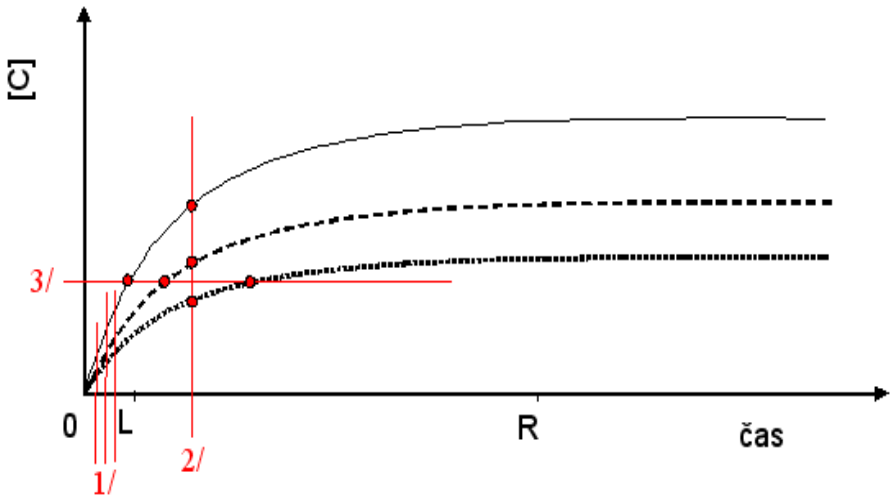
k_1 a k_2 jsou rychlostní konstanty uvedených reakcí a celková rychlost v je dána součtem protichůdně probíhajících reakcí, $v = v_1+v_2$. V okamžiku smísení roztoků A a B, v čase t=0 platí [C]=0, $[A]=[A]_0$, $[B]=[B]_0$ a $v=v_1$. V okamžiku převedení C do čistého rozpouštědla jsou [A]=[B]=0 a $v=v_2$. Při dosažení dynamické rovnováhy je v=0 protože $v_1=v_2$ a to znamená, že rychlostí v_1 vzniká za určitou dobu stejné množství C jaké se rozloží rychlostí v_2 v identickém časovém úseku.

$$v_1=v_2 \qquad\qquad k_1[A][B]^2 = k_2[C] \qquad\qquad K = k_1/k_2 = [C]/[A][B]^2$$

Termodynamickou rovnovážnou konstantu lze vyjádřit poměrem rychlostních konstant pro reakce probíhající jedním a druhým směrem (zleva doprava a zprava doleva). Reakce třetího a vyšších řádů vyžadují, aby v určitém okamžiku došlo ke srážce 3 nebo více určitých molekul a to je málo pravděpodobné. U složitějších reakcí (např. redukce MnO_4^{2-} na Mn^{2+}) ve skutečnosti se tvoří meziprodukty, ty vznikají nejčastěji reakcemi 2. řádu a každá z těchto reakcí má svoji konstantu k (může probíhat jinou rychlostí).

Zjednodušení interpretace kinetického měření dosáhneme použitím tak velikého nadbytku činidla, aby v průběhu reakce hodnota [B] se měnila jen nepatrně. Potom můžeme [B] zahrnout do podmíněné konstanty $k^{/}$ a dostaneme reakci pseudoprvního řádu.

$$v_1= k_1[A][B]^2 = k_1^{/}\,[A]$$



Časová závislost koncentrace produktu C v reakci pseudoprvního řádu A+2B=C. Čas smíchání komponent je označen 0, v čase L končí úsek, pro který akceptujeme lineární průběh [C]=f(t) a R je čas dosažení rovnovážného stavu. Přerušované čáry platí pro menší $[A]_0$.

V této reakci pseudoprvního řádu měříme závislost koncentrace produktu C na čase t, [C]=f(t). V okamžiku smísení komponent A a B je [C]=0 a s postupujícím časem [C] vzrůstá. Tento vzrůst je lineární v počátku a prakticky lineární po určitou dobu, během které [A] zůstává prakticky beze změny, např. akceptujme, že je tomu tak až do zreagování 10% z počáteční koncentrace $[A]_0$. Potom rychlost časového přírůstku [C] se zmenšuje a po dostatečně dlouhé době je dosaženo rovnovážného stavu, kdy [C] dosáhne konstantní, tj. na čase nezávislé hodnoty.

Při provádění analýzy neměříme přímo koncentraci [C], ale signál S, který je obvykle přímo úměrný hledané koncentraci. Velmi často (ve fotometrii, polarografii, chromatografii ...) platí S=a+b[C] kde a, b jsou konstanty. Měření v kinetických metodách můžeme provádět třemi způsoby, jak je vyznačeno v obrázku:

1/ Z několika změřených bodů ležících v lineární části (čas blízký t_0) závislosti S=f(t) vyhodnotíme směrnici lineárního úseku (tg α) a jako kalibrační křivku použijeme funkci $tg(\alpha)=f([A]_0)$ (viz obrázek, body z průsečíků 1/).

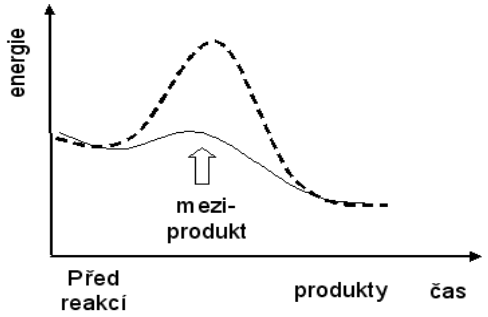
2/ Změříme signál S_t v určitém (vždy stejném) čase po smísení roztoků, kalibrační křivkou je $S_t=f([A]_0)$ (viz obrázek, body z průsečíků 2/).

3/ Změříme čas t_S, při kterém signál dosáhl určité (vždy stejné) hodnoty a vyhodnocujeme pomocí kalibrační funkce $1/t_S=f([A]_0)$ (viz obrázek, body z průsečíků 3/).

Ve všech 3 případech se doporučuje měřit v oblasti přímkové závislosti [C]=f(t), tehdy dostaneme přibližně lineární kalibrační funkce. Je samozřejmě také možné vyčkat ustavení rovnovány, změřit signál odpovídající rovnovážné [C] a korelovat jej s $[A]_0$, avšak to je už metoda rovnovážná, nikoli kinetická.

4.1 KATALÝZA

KATALYZÁTOR mění rychlost reakce tím, že vytváří s některou z reagujících komponent (nebo s oběma) přechodný meziprodukt a ten snadno přejde na další (konečný) produkt reakce. Postup s katalyzátorovým meziproduktem vyžaduje dodání menší energie pro nastartování reakce než postup bez katalyzátoru, proto je průběh reakce s katalyzátorem snazší a rychlejší. Finální produkt vznikne rozpadem přechodného meziproduktu, tím je katalyzátor uvolněn a připraven k opakovanému cyklu (vytvoření přechodného meziproduktu atd...). Vzhledem k mnohonásobnému opakování katalytického cyklu stačí nepatrné množství katalyzátoru k tomu, aby zreagovalo veliké množství látky. Tato skutečnost předurčuje tyto reakce pro stanovení velmi malých, stopových množství katalyzátorů. Vysoká ciltivost je výhodou takových stanovení, možnost katalyzovat jednu reakci několika rozdílnými katalyzátory (nespecifičnost této reakce) je nevýhodou.



Katalýza. Přerušovaná čára znázorňuje průběh reakce bez katalyzátoru (energetická bariéra), plná s katalyzátorem.

Význačnou skupinou vysoce selektivních (specifických) a účinných katalyzátorů jsou ENZYMY. Jsou to látky původně biologického původu, mají obrovskou molekulu a nešetrným zacházením (teplota, pH, katalytické jedy ...) se snadno deaktivují.

Činnosti katalyzátoru brání INHIBITORY, katalytické jedy, látky blokující katalyzátor tak, aby nemohl (resp. mohl jen v omezené míře) vznikat přechodný meziprodukt, např. katalytickému působení iontů Ag^+ zabráníme jejich vysrážením přídavkem halogenidů. Inhibitory snižují aktivitu katalyzátoru a PROMOTORY ji zvyšují, například převedením některých katalyzárů-kationtů z aquakomplexu do komplexu s jiným ligandem zvýšíme aktivitu toho katalyzátoru.

Katalytické reakce používáme pro stanovení (řidčeji pro důkaz):

1/ Stanovení jedné z reagujících látek (komponenty A)

1a/ přidáme konstantní velký nadbytek činidla (B) a měříme koncentraci (nebo množství) vznikajícího produktu (C).

1b/ měříme spotřebu přidaného činidla B, tohoto činidla musíme přidat konstantní, ale jen tak malý nadbytek abychom byli schopni měřit jeho (malou) spotřebu. To znamená, že jsou jen v malé míře splněny podmínky pro reakci pseudoprvního řádu a že závislost signálu na čase má kratší lineární úsek než v případě 1a/.

2/ Stanovení katalyzátoru: přidáme konstantní veliká množství reagujích složek (A a B) a měříme vzniklý produkt (C). Méně výhodné je přidání konstantního velkého nadbytku jedné (A) a konstantního menšího monožství druhé složky (B) jejíž spotřebu měříme.

3/ Stanovení inhibitoru nebo promotoru: přidáváme konstantní, spíše větší množství reagujících (složek A a B) a konstantní (malé) množství katalyzátoru. Výhodnější je měřit vznikající produkt než sledovat spotřebu jedné z komponent (B) stejně jako v předchozím případě.

REAKCE INDUKOVANÉ jsou někdy přiřazovány k reakcím katalytickým. Příkladem indukované reakce je oxidace arsenitanu vzdušným kyslíkem ve vodném roztoku podmíněná přítomností siřičitanu. Roztok samotného siřičitanu při kontaktu se vzduchem se oxiduje, samotný roztok arsenitanu za stejných podmínek nikoli. Při reakci kyslíku se siřičitanem vzniká nejprve nestálý produkt SO_5^{2-}, tento produkt reaguje se siřičitanem anebo s arsenitanem (podle toho se kterým se srazí, při srážce jim předává kyslík = oxiduje je) a sám přechází na síran.

5. SPECIÁLNÍ METODY

5.1. SRÁŽECÍ REAKCE

Vznik sraženiny (zákalu) v roztoku a také její rozpuštění jsou výraznými projevy analytických reakcí. Běžné využití vzniku sraženin je při kvalitativních reakcích – důkazech, nejčastěji anorganických kationtů a aniontů (např. celé sirovodíkové dělení je založeno na vzniku sraženin). I v organické kvalitativní analýze je vznik sraženiny (nejlépe barevné) běžné – slouží jako důkaz přítomnosti charakteristických funkčních skupin.

V chemické analýze kvantitativní jsou sraženiny velmi důležité ve vážkovým metodách stanovení, která bývají často referentními metodami, protože jde o stanovení absolutní – měříme skutečně analyt (hmotnost sraženiny) resp. přesně známou sloučeninu analytu, na rozdíl od většiny moderních instrumentálních metod, kde pouze vztahujeme signál (nejčastěji elektrický) k obsahu stanovovaného analytu přes kalibrační funkci.

Rozlišujeme sraženiny krystalické a amorfní. Do krystalické mříže sraženiny se snadno seřadí částice malé pravidelného tvaru (např. Ag^+ a Cl^- nebo Ba^{2+} a SO_4^{2-}, kyselina salicylová, cukry $C_{12}H_{22}O_{11}$ ...), velmi obtížné je seřazení částic velikých obsahujících nepravidelně větvené řetězce (např. polynukleární hydroxidy těžkých kovů). Krystalické sulfidy těžkých kovů vznikají při chladnutí taveniny ale z vodných roztoků se vylučují amorfní sraženiny těchto sulfidů, ty obsahují polyjaderné nepravidelně větvené molekuly. Přechodem mezi roztokem a sraženinou je koloidní roztok. Koloidní částice má rozměr mezi 1 až 1000 nm, může to být jediná makromolekula anebo malý krystalek, jehož krystalovou mřížku tvoří více iontů nebo molekul (pro srovnání: jednoatomový ion má rozměr cca 0,1 nm). Koloidní roztok, na rozdíl od roztoku pravého, vykazuje Tyndallův efekt (okem pozorovatelný rozptyl světla na koloidních částicích). Je-li sraženina v kontaktu s roztokem, ustaví se dymanická rovnováha: sraženina se rozpouští a současně ionty nebo molekuly z roztoku se vylučují do sraženiny. V rovnovážném stavu probíhají stejnou rychlostí obě reakce, rozpouštění i vylučování, a proto množství sraženiny i koncentrace roztoku zůstávají beze změny. Nasycený roztok je v rovnováze se sraženinou, přesycený roztok je v metastabilním stavu. Vnějším impulsem poměrně snadno převedeme přesycený roztok na roztok nasycený, tj. z roztoku se vyloučí přebytečná rozpuštená látka ve formě pevné fáze, sraženiny. Vneseme-li do rozpouštědla dostatečné množství látky ve skupenství pevném, látka se rozpouští až do ustavení rovnováhy mezi oběma fázemi, až do vytvoření nasyceného roztoku. Povrch sraženiny v roztoku je rozhraním mezi dvěma fázemi a na tomto rozhraní se mohou hromadit (strhovat, sorbovat) některé látky z roztoku.

Pro převedení látky z pevné fáze do roztoku je třeba dodat energii, která rozruší soudržnost částic v pevné fázi (např. v krystalové mřížce). Převodem do roztoku jsou částice solvatovány, uvolní se solvatační energie. Čím více molekul rozpouštědla váže částice v roztoku, tím větší energie se uvolní. Pokud je solvatační energie větší než energie rozrušení soudržnosti pevné fáze, látka se rozpustí. Je-li solvatační energie rozpuštěných částic menší než energie uvolněná vznikem pevné fáze, dojde k vysrážení.

K solubilizaci (převedení hydrofobních látek do vodného roztoku) využíváme tenzidy, povrchově aktivní látky (např. mýdlo, kde aktivní složkou je palmitanový anion). Tenzid nepolární (hydrofobní) částí své molekuly (v palmitanu je to uhlovodíkový retězec) přiřadí se van der Waalsovými silami k hydrofobní látce (např. k tuku) a obalí ji takovým způsobem, že polární (hydrofilní) skupiny (v palmitanu karboxyly se záporným nábojem) směřují do roztoku a jsou solvatovány. Takové útvary nazýváme micelami, obvykle tvoří koloidní roztoky.

Rozpustnost (solubilita, tj. koncentrace v nasyceném roztoku) látek se mění s teplotou, obvykle ohřátím roztoku zvýšíme rozpustnost. Rozpustnost většiny organických látek látek přítomných ve vodném roztoku ve formě molekul snížíme přídavkem VYSOLOVACÍHO ČINIDLA, které váže do svého solvatačního obalu molekuly vody a tím se sníží aktivita volného rozpouštědla. Jinými slovy vysolovací činidlo spotřebuje rozpouštědlo pro sebe a z roztoku vypadne látka, pro ni už nezbylo žádné rozpouštědlo.

5.2 ANALÝZA PLYNŮ

Při analýze plynů vycházíme ze stavové rovnice

$$pv = nRT$$

Chceme-li určit molární množství n, musíme změřit veličiny p, v a T. Objem plynu měříme plynovou byretou. Ta, na rozdíl od byrety pro roztoky, je nahoře uzavřena kohoutem. Objem v byretě uzavřeného plynu odečítáme z polohy hladiny kapaliny která uzavírá plyn v dolní části byrety. Teplotu ani tlak plynu uvnitř byrety nedovede přímo změřit, proto vyčkáme, až teplota měřícího zařízení se vyrovná s teplotou okolí a potom změříme teplotu vně byrety, nejlépe v její bezprostřední blízkosti. Kapalina uzavírající plyn v byretě (obvykle voda anebo rtuť) je spojena přes ohebnou hadičku s vyrovnávací nádobkou. Zdviháním anebo snižováním vyrovnávací nádobky dosáhneme stavu ve kterém hladiny uzavírací kapaliny v byretě i ve vyrovnávací nádržce jsou ve stejné výši a v tom případě je stejný tlak plynu uvnitř i vně byrety, je roven tlaku atmosferickému a ten změříme. Objem plynu v byretě odečítáme po vyrovnání teploty s okolím a při stejné výšce obou hladin, to je při atmosferickém tlaku.

Při klasickém postupu analýzy směsi plynů postupně absorbujeme jednotlivé analyty ve vhodné absorpční kapalině a určujeme množství analytu z rozdílu objemů před a po absorpci. Plyn z byrety se přečerpává do absorpčního prostředí vhodným nastavením uzavírajících kohoutů a změnami tlaku vyvolanými pozvedáváním či snižováním vyrovnávací nádobky. Absorpční kapalina je v trubici naplněné např. skleněnými kuličkami. Tato trubice je nahoře opatřena kohoutem a dole spojena hadičkou se svojí vyrovnávací nádobkou. Podtlak v absorpční trubici vyvolaný snížením vyrovnávací nádobky s absorbující kapalinou vtáhne část analyzovaného plynu z plynové byrety do absorpční trubice, nastává absorpce na zbytcích kapaliny utkvělých na náplni absorpční trubice. Zvednutím nádobky s absorbující kapalinou přetlačíme plyn zpět do plynové byrety a tuto operaci několikrát opakujeme, tak dlouho až po přetlačení do absorpčního prostoru nezjistíme další úbytek objemu. Absorpci opakujeme až do dosažení konstantního objemu podobně jako ve vážkové analýze žíháme až do dosažení konstantní hmotnosti.

ABSORPČNÍ SYSTÉMY. Pro absorpci CO_2 (obecně kyselinotvorných plynů např SO_2) používáme vodný roztok NaOH (vznikají soli) a pro plyny bazického charakteru (např. NH_3) roztok kyseliny. Pro absorpci kyslíku je vhodný alkalický roztok pyrogallolu (oxiduje se na černé produkty). Dusík (a vzácné plyny) představují zbytek po absorpci ostatních složek. Po přídavku nadbytku kyslíku zážehem elektrickou jiskrou se spálí uhlovodíky (např. zemní plyn) a stanovuje se množství CO_2. Spálením uhlovodíků vzniká též voda, ale ta se kondenzuje na kapalinu a její objem je zanedbatelně malý, porovnej objem jednoho molu plynu 22400 ml a jednoho molu kapalné vody 18 ml, oba údaje platí pro standardní podmínky (teplota 298 K, tlak 101.325 kPa).

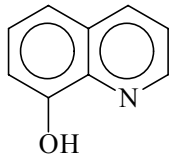
Plynné složky z proudu plynu můžeme absorbovat probubláváním kapalinou, adsorpcí na pevném sorbentu a také vymrazováním, částice pevné fáze (prach) zachytí filtr. Při absorpci v kapalině je žádoucí co největší povrch pro kontakt kapalina-plyn (co nejmenší bublinky) a je třeba aby kapalina nebyla těkavá. Také při adsorpci je výhodná veliká plocha pro kontakt plyn-pevný sorbent (jemné zrnění sorbentu). Uvedené typy sorpce využíváme pro analýzu, po průchodu odměřeného mmnožství plynu stanovujeme zachycenou sloučeninu. Na stejném principu můžeme protékající plyn čistit, tj. zbavit nežádoucích příměsí.

Pro detekci a stanovení SO_2 využíváme jeho fluorecenci iniciovanou UV zářením. Tato flouorescence umožňuje analýzu i na velké vzdálenosti, např: pozemní vysílač UV záření zaměříme na kouř vycházející z komínu a na zemi registrujeme fluorescenční záření. Eventuální záření o stejné vlnové délce z jiných zdrojů eliminujeme tím, že záření primární je přerušováno v určité frekvenci. Měříme pouze střídavý proud o této frekvenci generovaný na detektoru převádějícím světelnou energii na elektrický signál.

Nejúčinnější technikou pro analýzu směsi plynů je plynová chromatografie (kapitola 6.3)

5.3 SUBSTECHIOMETRICKÁ ANALÝZA

8-hydroxychinolin



Příkladem substechiometrického stanovení může být extrakce kationtů těžkého kovu z vodného roztoku do organického rozpouštědla ve formě 8-hydroxychinolátového komplexu. K roztoku s analytem (neznámé množství mA) přidáme známé nepatrné množství (mI) indikátorové formy téhož kovu (např. radioisotopu), platí mA >> mI. Stav (oxidační stupeň, vazba do komplexu) analytu i indikátoru musí být stejné, aby byla identická pravděpodobnost tvorby extrahovatelných 8-hydroxychinolátů s analytem i s indikátorem. K extrakci z vodného roztoku použijeme známé množství činidla (odměříme vždy stejný objem organického roztoku o určité koncentraci 8-hydroxychinolinu). Množství činidla volíme tak, aby extrahovalo jen část analytu, známé množství ma. Po extrakci změříme množství indikátoru v organické fázi (mi). Stejná pravděpodobnost extrakce obou forem stanovovaného kovu podmiňuje platnost rovnice

mA:ma = mI:mi

Je-li splněn lineární vztah mezi signálem indikátoru a jeho množstvím, sI=konstanta.mI, použijeme výraz

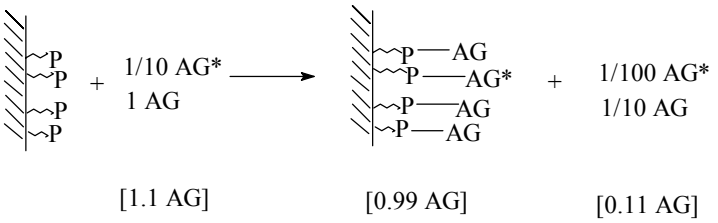
mA:ma = sI:si

ve kterém sI je signál celého přidaného množství indikátoru a si signál extrahovaného indikátoru. Po extrakci častěji se měří radioaktivita organické fáze, avšak je možno změřit i aktivitu vodného roztoku a tak vypočíst veličinu mA.

V substechiometrické analýze změřením signálu indikátoru před a po extrakci jsme zjistili, jaká část indikátoru (kolik procent) se extrahovalo a stejný počet procent celkového množství analytu je jeho extrahované množství ma, které známe, protože je určeno známým množstvím použitého činidla. Název substechiometrická analýza vystihuje skutečnost, že činidlo používáme v menším množství než jaké vyžaduje stechiometrie pro úplné zreagování činidla s analytem.

Principu substechiometrické analýzy využívají metody IMMUNOCHEMICKÉ ANALÝZY. Immunochemie studuje metodu obrany živého organizmu proti vniknutí cizorodých nežádoucích makromolekul, např. cizích bílkovin, kterým říkáme ANTIGEN. Organizmus vytváří PROTILÁTKU, ta váže antigen do komplexu (to je počátek eliminace vlivu cizorodé látky v organizmu). To je podstatou celé řady metod immunochemické analýzy, kde stanovujeme buď antigen nebo protilátku. Antigen i protilátka jsou makromolekuly s navzájem specifickou afinitou, na jejichž vazbě do komplexu participují jen určité části těchto molekul a ostatní části molekul je možno modifikovat, tj. susbstituovat dle potřeby, např vázat na pevný nosič anebo zavést indikující substituent (barevný, fluoreskující, enzymaticky aktivní, radioaktivní). Immunochemické reakce vykazují vysokou selektivitu až specifičnost pro stanovení řady makromolekul. Tímto způsobem je možné stanovit i HAPTENY (jejich molekuly jsou menší než makromolekuly antigenů, může to být hormon nebo pesticid), pokud pro ně máme patřičnou protilátku.

Princip immunochemické analýzy: ke známému množství (substechiometrickému) protilátky vázanému na pevném nosiči přidáme roztok obsahující vzorek s analytem (tím je neznačený antigen) a také přídavek známého stopového množství indikátorem značeného antigenu. Po vytvoření komplexu protilátky s antigenem oddělíme pevnou fázi (ta obsahuje antigen vázaný do komplexu, část značeného i část neznačeného) od roztoku, tam zůstal antigen, pro který už nebyla k dispozici protilátka. Ze stejné pravděpodobnosti vazby antigenu s indikátorem i bez indikátoru na protilátku vychází výpočet množství analytu. Stanovujeme množství značeného antigenu v jedné z izolovaných fází (kapalné anebo pevné).



Immunochemická analýza

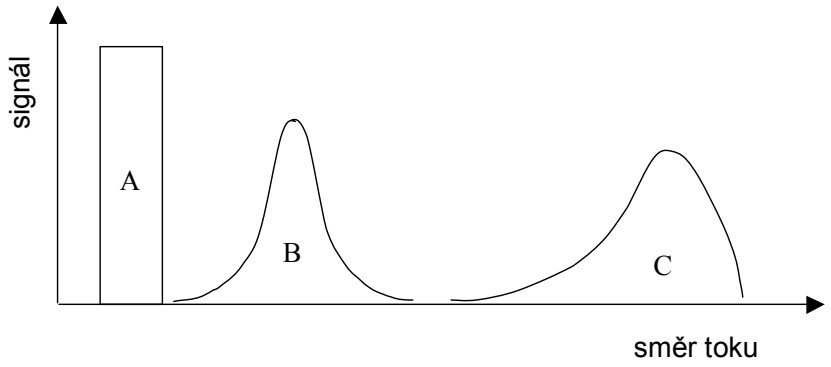
P je protilátka na nosiči, AG je antigen, AG je značený antigen, koeficienty v reakci označují relativní množství, údaje [v závorce] označují celkovou koncentraci antigenu*

5.4 PRŮTOKOVÁ ANALÝZA = FIA (Flow Injection Analysis)

Při běžném způsobu fotometrické analýzy odpipetujeme do odměrky roztok vzorku, pak roztok činidla a roztoky upravující prostředí (pufr), potom doplníme objem rozpouštědlem, promícháme, barevný roztok nalijeme do kyvety a měříme. Takovou analýzu lze uskutečnit i v proudu nosného media (nejčastěji je to voda) tekoucího tenkou trubicí (průměr 1 mm nebo menší). Proud media obvykle zajistí pumpa, ale také můžeme postavit na skříň nádobku, ze které medium vytéká. Analyt se vnáší do proudu ve formě pravoúhlého koncentračního pulzu (viz chromatografie). Do tohoto proudu přivádíme bočními trubičkami potřebná činidla, jejich přívod může být kontinuální (jednoduché zařízení s velkou spotřebou roztoku činidel) anebo koordinovaně přerušovaný tak, aby činidlo se právě setkalo s analytem (dražší přístroj, ale menší spotřeba činidel). Směs analytu s činidly unáší proud média dále přes reakční cívku k detektoru (viz chromatrografický detektor). V reakční cívce dojde k promísení a zreagování komponent, tam je možno zahřát, redukovat, extrahovat nebo sorbovat nežádoucí komponenty. Průtoková analýza FIA pracuje za dokonale reprodukovatelných podmínek. Není nutné, aby došlo k dokonalému promísení roztoku analytu a činidla a k ustavení reakční rovnováhy, kalibrační křivka měřená za identických podmínek jako při stanovení umožňuje stanovení.

Aparatura FIA se zapisovačem signálu detektoru umožní stanovit 6 i více roztoků vzorku za minutu, to je 360 (anebo více) vzorků za hodinu. Je tedy FIA vhodná pro stanovení velkých serií vzorků stejného typu (např. extrakty zemědělských půd) a její zařízení je zbytečně složité pro analýzu malého souboru vzorků. Rychlá produkce velkého počtu výsledků může vyvolat nepříjemný zmatek pokud dojde k poruše zařízení. Proto u tak výkonných zařízení pro seriovou analýzu zařazujeme pravidelně (např. jako každý desátý) kontrolní vzorek o známém složení a pokud jeho signál nemá požadovanou hodnotu, přerušíme práci a hledáme příčinu poruchy. Tím vyloučíme nahromadění velkého množství výsledků, jejichž spolehlivost je pochybná.

Profily v kapalině proudící potrubím. Proudící kapalina tře o stěnu nehybného potrubí a to způsobuje, že v blízkosti stěny je rychlost proudící kapaliny menší než ve středu potrubí. Roztok vzorku vnášíme do nosné kapaliny (obecně nosného media) obvykle ve formě pravoúhlého koncentračního pulzu (křivka A). Pokud by se nosné medium nepohybovalo, vlivem difúze tento původně pravoúhlý koncentrační pulz by se pomalu rozmýval a koncentrační profil by postupně dostával tvar podobný Gaussově křivce (křivka B). V pohybujícím se mediu probíhá zároveň difúze i zbrzdění toku při stěnách, výsledný koncentrační profil ukazuje křivka C, takový je obvykle koncentrační profil registrovaný koncentračním detektorem v průtokové analýze.



Signál (úměrný koncentraci) registrovaný detektorem pohybujícím se podél potrubí pro neproudící (křivky A a B) a pro proudící (křivka C) nosné medium. Křika A registrována bezprostředně po zavedení vzorku, křivky B a C později.

5.5 STOPOVÁ ANALÝZA

Vzorek můžeme považovat za analyt zředěný matricí. Jednotkou zředění je procento (%), starší, dnes již nepoužívaná jednotka je miligramprocento (mg%). Obsah 1% znamená 1 g analytu ve 100 g vzorku a 1mg% je 1mg analytu ve 100g vzorku. Procenta nejčastěji vyjadřují poměr hmotností (m/m), pouze pro kapaliny anebo plyny používáme někdy objemová procenta (v/v) respektive smíšená (m/v anebo v/m). Nepatrné (stopové) obsahy vyjadřujeme v jednotkách ppm (parts per million, 1 díl analytu v 10^6 dílů vzorku), ppb (parts per billion, 1 díl v 10^9 dílů, jedná se o "americký" bilion) a ppt (parts per trilion, 1 v 10^{12}, opět "americký" trilion). 10^{-4}% = 1 ppm = 10^3 ppb = 10^6 ppt.

Je-li obsah analytu ve vzorku minimálně 10%, mluvíme o HLAVNÍ KOMPONENTĚ (hlavní složce). Při méně než 10 % obsahu je analyt VEDLEJŠÍ KOMPONENTOU. Jako STOPOVÁ MNOŽSTVÍ (=stopy) byly dříve označovány obsahy menší než 10^{-2} %, dnes je to spíše pod 10^{-4} %. Termín ULTRASTOPY se používá pro obsahy ještě menší (cca od 10^{-6} %). Někteří autoři používali termín stopová množství pro takové obsahy analytu, při jejichž stanovení je nutno oddělit podstatnou část matrice.

Zatím co v mikroanalýze bývá k dispozici nepatrné množství vzorku, ve kterém stanovujeme hlavní, řidčeji vedlejší komponenty, ve stopové analýze máme většinou dostatek vzorku, ve kterém stanovujeme nepatrné příměsi. Hlavním problémem stopové analýzy je ZAMEZIT KONTAMINACÍM A ZTRÁTÁM. Kontaminace, tj. zavlečení analytu do vzorku, je možné přídavkem činidel, ze stěn používaných nádob a také z prostředí laboratoře. Ztráty mohou nastat záchytem analytu na pevné fázi (stěny nádobek, sraženina) a těkáním analytu. Tyto kontaminace a ztráty obvykle představují nepatrná množství analytu, proto bývají bezvýznamné při stanovení větších kvant, avšak mohou vyvolat chybu výsledku i o celý řád stanovujeme-li nepatrná stopová množství. Představa, že ztráty a kontaminace se vzájemně vykompenzují a dostaneme správný výsledek, je lákavá, je však velmi nepravděpodobná.

Nádoby pro stopovou analýzu. Každý roztok poněkud (nepatrně) rozpouští stěny nádob, se kterými je v kontaktu. Budeme-li chtít stanovit stopy křemíku ve vodném roztoku, dáme přednost nádobí z organických plastů před skleněným. Pro stanovení stop organických látek ve vodě, je vhodnější skleněné nádobí než nádobky z polyethylenu. Zásadně nepoužíváme staré nádobky, na jejichž stěnách ulpěly po předchozích operacích zbytky různých látek. Problém je volba lázně pro umytí použitého nádobí, ze skla umytého v kyselině chromsírové se uvolňují do roztoku dokazatelná množství sloučenin chromu. Optimální k vymývání použitých skleněných i plastových zařízení je HNO_3 vysoké čistoty, zředěná rovněž vysoce čistou vodou. Optimální jsou zařízení na jedno použití, např. nástavce z plastů k pipetorům. Pro stopové stanovení určitého analytu si vyčleníme nádobky, které nebudeme používat pro jiné analýzy, jejich stěny se saturují ("nasytí") určitým typem roztoků, a proto jsou jen minimálním zdrojem kontaminace analytem anebo jeho ztráty. Záchyt analytu na stěnách bývá zanedbatelně malý v roztocích o koncentraci 10^{-3} mol/l anebo větší, může ale výrazně ovlivnit složení zředěnějších roztoků. S tím souvisí problémy při přípravě roztoků o extrémně malých koncentracích zřeďováním roztoků koncentrovaných. Roztoky 10^{-6}mol/l a zředěnější nepřipravujeme do zásoby, použijeme je ihned po zředění (za krátký čas v nemíchaném systému je sorpce na stěnách neúplná) a pro pozdější použití si čerstvě připravíme nový roztok.

Srážení ve stopové analýze se používá spíše vyjímečně. Sraženina složek matrice představuje větší množství s velkým povrchem, na kterém se může (někdy i kvantitativně!) zachytit, tedy ztratit, stopový analyt. Zanedbatelně malá je sorpce cizích látek při elektrolytickém vylučování kovových povlaků na elektrodě. Nepatrné množství sraženiny stopového analytu často vytvoří koloidní roztok, pro jeho lepší oddělení (filtrací, centrifugací) přidáváme vhodný nosič, ten se sráží zároveň s analytem a na jeho sraženině se zachytí analyt.

Laboratoř pro stopovou analýzu. Usilujeme o maximální čistotu prostředí, ve kterém provádíme stopová stanovení proto, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Požadavky na stopovou laboratoř jsou v mnohém podobné požadavkům na čistotu chirurgických operačních sálů. V laboratoři jsou nežádoucí okna, malými škvírami mezi vlastním oknem a okenním rámem může vnikat do místnosti prach. Kvalitně filtrovaný vzduch je naháněn do místnosti kompresorem, vzniká tam přetlak. Netěsnostmi okolo dveří proudí vzduch ven z laboratoře a tak zamezuje vnikání nečistot z vnějšku do laboratoře. Do laboratoře se vchází přes šatnu, kde se pracovníci převlékají do čistého. I po převlečení je člověk objektem málo vyhovujícím pro stopovou analýzu. Dýchání je zdrojem prachových částic (z

povrchu dýchacích cest se uvolňují jakési "lupy"), člověk v klidu jich produkuje výrazně méně než při fyzické námaze. Místnost má omyvatelnou podlahu, jsou v ní zaoblené rohy pro snadnější čistění, stěny a strop jsou pokryty nedrolivým, neopadávajícím nátěrem. V laboratoři omezíme na minimum používání plynových hořáků protože plyn z městské sítě i z tlakových láhví obsahuje prachové částice (např. rez) kontaminující prostředí. Používáme elektrický ohřev. Do laboratoře má přístup omezený počet pracovníků, ti sami provádějí i úklid a čistící práce v laboratoři. Úklidové pomůcky, prachovka, hadr na zem i smeták, nesmějí být zdrojem kontaminace laboratoře.

Čistota chemikálií. Na trhu jsou dostupné chemikálie o různém stupni čistoty. Jako technický produkt se označují preparáty obsahující i desítku (desítky) procent cizí látky. Chemicky čisté preparáty by mohly obsahovat asi tak jednotky % příměsí. Preparáty pro analysi (p.a., anglicky reagent grade) mají obvykle na obalu uvedený obsah cizích látek, nejčastěji to bývá méně než 0,01% u látek jednoduše isolovatelných (např. KCl, kys. octová, močovina, KH_2PO_4 apod.). U barevných indikátorů (acidobazických nebo metalochromních) na obalu p.a. preparátu bývá uvedeno: obsah deklarované látky odpovídá předpisu. Jakým způsobem se zjišťuje, zda preparát odpovídá předpisu, to najdeme v podnikové normě výrobce. Obvykle je předepsáno smíšení roztoků předepsaného složení, které musí vyvolat určitou barevnou změnu. Takovému předpisu vyhovují nejen chromatograficky čisté preparáty indikátoru, ale také preparáty ve kterých je třeba jen 60% indikátoru a zbytek bývají při synteze nezreagované výchozí látky či meziprodukty a také anorganické soli použité k vysolení barviva z roztoku. Látky používané pro medicinální účely musí vyhovovat požadavkům uvedeným v lékopisu. Lékopis (anglicky pharmacopoeia) obsahuje seznam látek používaných pro medicinální účely a také požadavky na jejich čistotu. V humánní medicíně je povoleno používat pouze látky lékopisné čistoty, ty nesou označení ČSL X (československý lékopis X-té vydání) nebo DAB X (Deutsches ArtzneiBuch), USP X (United States Pharmacopoeia), BP X (British Pharmacopoeia). Vždy po několika letech vychází nové vydání lékopisu, v něm se objeví některá nová léčiva a jiná (zastaralá) jsou zase vyřazena a také se tam popisují nové analytické metody pro zjišťování lékopisné čistoty. Chemikálie pro stopovou analýzu musí mít maximální dostupnou čistotu, označují se p.p. (pro polovodiče) a na obalu se uvádějí maximální přípustné obsahy nečistot. Je nesnadné chemikálii tak vysoké čistoty vyrobit (to se projeví v její ceně), avšak stejně náročné je takový výrobek rozdělit (do komerčního balení např. po 50 g) a přitom neznečistit. Problém je s uchováváním korozívních kapalin (např. kyselin) vysoké čistoty, ty se časem pomalu kontaminují vyluhováním stěn nádoby.

Ve stopové analýze vždy provádíme slepý pokus a snažíme se dosáhnout co nejmenší hodnoty signálu pro tento blank. Hlavní komponenty dokážeme obvykle stanovit s malou relativní směrodatnou odchylkou cca 1%, pro stanovení stop tolerujeme mnohem větší relativní směrodatné odchylky (třeba 20 % pro obsah 1 ppt) a u ještě menších obsahů někdy dokážeme určit jen řád koncentrace analytu.

5.6 ORGANICKÁ NALÝZA

Důkazem přítomnosti některých a nepřítomnosti jiných prvků bývá vyřešena podstatná část kvalitativní analýzy anorganických materiálů a pro zjištění přítomnosti různých prvků v anorganickém vzorku nepotřebujeme vždy provádět dělení. Naopak, v organických molekulách je omezený sortiment prvků: C, H, O, N, S, halogeny a jen vyjímečně i některé jiné a tento omezený sortiment atomů je vzájemně různě propojen. Proto obvykle nejprve izolujeme jednotlivé sloučeniny pomocí separačních metod (viz kapitola 6). Mezi charakteristiky nejčastěji používané pro identifikaci organických sloučenin patří body tání (sloučeniny samotné anebo jejího derivátu), bod varu, spektra (ultrafialová, infračervená, hmotová, NMR, Ramanova ...), eluční parametry v chromatografii, může to být index lomu, optická otáčivost, struktura krystalů a další. V optimálním případě máme k dispozici preparát dokazované látky (standard) a ověříme shodnost parametrů izolovaného individua s parametry známého standardu.

Bod tání

Bod tání je klasická, snadno naměřitelná charakteristika organického individua. Ovšem bod

tání je ovlivňován (snižován) přítomností příměsí - tou může být např. neúplně odpařené rozpouštědlo po překrystalování. Bod tání je významným kriteriem pro čistotu preparátů, maximum informací v tomto směru poskytuje diferenciální skanovací kalorimetrie, která sleduje spotřebu tepla vzorkem v závislosti na jeho teplotě v průběhu procesu ohřívání v okolí bodu tání.

Směsný bod tání: Totožnost izolovaného analytu se známým standardem (mají stejný bod tání) ověřujeme tak, že obě látky smísíme a stanovíme bod tání této směsi. Pokud jsou obě látky tvořící směs identické, je bod tání této směsi stejný jako body tání složek před smísením. Směs dvou různých látek má bod tání nižší než její složky, jedna složka je "znečistěna" přítomností složky druhé.

Snížení bodu tání je přímo úměrné koncentraci příměsi v látce, toho využíváme při KRYOSKOPICKÉM stanovení molekulové hmoty příměsi. Dobrým rozpouštědlem řady organických sloučenin je např. kafr: roztavením odváženého množství kafru a rovněž odváženého malého přídavku analytu připravíme směs a tu necháme ztuhnout. Z rozdílu bodů tání samotného kafru a směsi určíme koncentraci analytu ve směsi a tím i relativní molekulovou hmotnost.

5.6.1 ORGANICKÁ ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA

Nejčastěji provádíme oxidativní rozklad organické látky, např. spalováním v kyslíkové atmosféře anebo v roztoku působením oxidačních činidel (kys. chromsírová ...). Méně běžný je redukční rozklad zahříváním za přítomnosti vodíku anebo alkalického kovu. Vzniklé anorganické produkty dokazujeme či stanovíme.

produkty redukce	prvek	produkty oxidace
CH_4	uhlík	CO_2
--	vodík	H_2O
H_2O	kyslík	--
NH_3	dusík	NO_x (N_2)
H_2S	síra	SO_2 (H_2SO_4)
HX	halogeny	X_2 (HCl)

Ačkoli následně popisované metody jsou principiálně velmi jednoduché, jsou stále analyticky využívány, v podstatě se modernizuje pouze detekční koncovka celého postupu: např. místo plynové byrety je použita detekce plynovou chromatografií nebo IČ.

Kvalitativní reakce

Reakce s rozkladným produktem $AgMnO_4$. Manganistan stříbrný se při ohřevu explozívně rozkládá. Rozkladný produkt je oxidovadlo, obsahuje MnO_2 a oxidaci katalyzující formy stříbra. Pro kvalitativní reakce smísíme vzorek s rozkladným produktem manganistanu stříbrného a zahřejeme nad plamenem. Dusičnan a síran stříbrný vyloužíme vodou, chlorid a bromid stříbrný roztokem čpavku. V roztoku hledáme uvedené anionty.

Reakce s kovovým sodíkem: Do zúženého konce skleněné trubičky umístíme vzorek, kousek nad ním zrnko kovového sodíku. Po zahřátí páry ze vzorku přicházejí na horký sodík a tam reagují. Vznikají Na_2S, NaCl, NaBr, NaI a za přítomnosti dusíku NaCN, anionty těchto solí dokazujeme ve vodném roztoku.

Reakce na měděném drátku: vzorek umístěný na měděném drátku (rozklepaném do lopatičky) vneseme do plamene. Za přítomnosti halogenů vznikají těkavé soli mědi a ty barví plamen zeleně.

Stanovení uhlíku a vodíku

Látku v lodičce (porcelánové anebo platinové) spalujeme v uzavřené trubici v proudu kyslíku.

Klasická metoda nejprve zachytí vzniklou vodu v absorpčním aparátku (trubičce) plněném chloristanem hořečnatým ("anhydron") anebo chloridem vápenatým, potom sorbuje oxid uhličitý v aparátku plněném asbestovými vlákny potaženými NaOH ("askarit"). Rozdíl hmotností aparátků před a po absorpci udává množství zachycených oxidů. Novější metody stanovují obsahy H_2O a CO_2 po spálení látky plynovou chromatografií (nebo IČ spektrometrií), komerčně jsou dodávána zařízení provádějící tuto celou analýzu zcela automaticky.

Dokonalou oxidaci látky docílíme jednak přídavkem oxidovadla k látce ve spalovací lodičce a také vedením plynu se spalnými produkty přes horkou vrstvu oxidovadla. Jako oxidovadlo se používá např. rozkladný produkt manganistanu stříbrného a také oxidy manganičitý, chromový a olovičitý. Na vláknech kovového stříbra (stříbrná vata) se zachytí Ag_2SO_4 a halogenidy stříbrné a tak se eliminují produkty spalovaní rušící stanovení C a H.

Stanovení dusíku

Metodou podle Dumase spalujeme organickou látku v trubici v proudu oxidu uhličitého a v plynové byretě měříme množství vzniklého N_2. Oxid uhličitý generujeme např. v Kippově přístroji reakcí $CaCO_3$ s HCl anebo ohřevem zkumavky s $NaHCO_3$. Stanovovanou látku smísíme s netěkavým oxidovadlem (práškový CuO) a neúplně zoxidované pyrolytické produkty vedeme přes horký drátkovitý CuO. Pokud při spalování vzniknou oxidy dusíku, jsou redukovány na horkých drátcích kovové Cu na N_2. Plynová byreta (v tomto případě zvaná azotometr nebo nitrometr) je naplněna vodným 50% roztokem KOH, nosný plyn CO_2 je absorbován alkalickým roztokem a zůstává plynný dusík. Pro toto stanovení dusíku, podobně jako pro stanovení uhlíku a vodíku, jsou v prodeji automatické aparatury s plynově chromatografickou koncovkou.

Kjeldahlova metoda rozkládá analyzovanou látku varem s kyselinou sírovou. Dusík je převáděn redukcí na amoniový kation a ostatní složky vzorku se oxidují (viz též kapitola 9.3). Po skončeném rozkladu roztok zalkalizujeme, v proudu nosného plynu (nejčastěji se používá vodní pára) vydestilujeme amoniak, ten zachycujeme v přebytku kyseliny a alkalimetricky stanovíme, kolik kyseliny nezreagovalo. Kjeldahlova metoda je výhodná pro paralelní provádění analýzy velkých sérií vzorků. Avšak z některých sloučenin se nedaří tímto způsobem kvantitativně převést dusík na amoniak, pozorujeme to u látek s nízkým obsahem vodíku a také u sloučenin, kde na dusík je vázán kyslík (nitrosloučeniny).

Stanovené síry a halogenů

Látku zabalenou do papíru spálíme v uzavřené baňce naplněné kyslíkem. Plyny vzniklé spálením sorbujeme do roztoku na dně baňky. Pro stanovení síry v tomto roztoku zoxidujeme (peroxidem vodíku) kyselinu siřičitou na sírovou a tu stanovíme (neselektivní titrací louhem, selektivní titrací roztokem barnaté soli na indikátor sulfonazo ve směsném rozpouštědle voda-aceton anebo vážkově jako $BaSO_4$). Pro stanovení halogenů roztok zredukujeme (např. siřičitanem) a stanovujeme titrací (argentometricky, merkurimetricky) nebo vážkově jako AgX.

Stanovení kyslíku

Pyrolýzou látky v nosném inertním plynu vznikají oxidy, ty při kontaktu s rozžhaveným uhlíkem přecházejí na oxid uhelnatý. CO za zvýšené teploty reaguje s netěkavým I_2O_5, vznikají jodové páry a ty jsou unášeny nosným plynem.

$$2\ I_2O_5 + 10\ CO \rightarrow 2\ I_2 + 10\ CO_2$$

Ve vodě zachycený jod můžeme přímo stanovit titrací roztokem thiosulfátu anebo před jeho stanovením provedeme amplifikační reakci: nadbytkem těkavého oxidovadla (chlorem) zoxidujeme jod na netěkavý jodičnan a nadbytek oxidovadla z roztoku odstraníme varem. Ke kyselému roztoku jodičnanu přidáme nadbytek jodidu a takto vzniklý (zmnožený) jod stanovíme.

$I_2 + 5\ Cl_2 + 6\ H_2O \rightarrow 2\ IO_3^- + 10\ Cl^- + 12\ H^+$

$2\ IO_3^- + 10\ I^- + 12\ H^+ \rightarrow 6\ I_2 + 6\ H_2O$

Tímto způsobem jsme dostali z jedné molekuly jodu 6 molekul. To je výhodné při stanovení malých množství analytu, po amplifikaci dostaneme větší signál. Tento postup lze opakovat a každým opakováním amplifikace dostaneme šestinásobek výchozího množství jódu. Ovšem obecně platí, že každá operace (zde vydestilování chlóru a potom izolace jódu od nadbytku jodidu před další amplifikací) přispívá ke zvětšení chyby výsledku, proto nelze doporučit větší počet opakování. Amplifikací získáme výhodnější koeficient pro přepočet hodnoty naměřeného signálu na hledaný obsah analytu. Bez amplifikační reakce 1 mol atomů kyslíku O odpovídá 1/5 molu molekul jodu I_2, po jedenkrát provedené amplifikaci 1 atom O dává 6/5 molekul I_2 anebo 12/5 atomů I.

5.6.2 TŘÍDĚNÍ ORGANICKÝCH LÁTEK PODLE ROZPUSTNOSTI

Pro kvalitativní analýzu vodných roztoků anorganických kationtů byl navržen tzv. sirovodíkový systém dělení, přesně předepsaný návod pro postupné srážení a rozpouštění. Postupujeme-li tímto předepsaným systémem, dostaneme postupně roztoky, ve kterých může být jen jeden jediný druh kationtů (buď ve vzorku je anebo není). Podobný systém v organické analýze nemáme, používané zkoušky rozpustnosti nám pouze umožňují usuzovat na to, kterou **skupinu** látek ve vzorku máme či nemáme.

Látky rozpustné ve vodě jsou hydratovány (= solvatovány molekulami rozpouštědla vody). Nesubstituované uhlovodíky jsou hydrofobní, ve vodě nerozpustné. Jejich rozpustnost a také polárnost se zvětší po zavedení vhodných funkčních skupin, např. -OH nebo =O. Propylalkohol i aceton jsou neomezeně mísitelné s vodou avšak hexanon a oktanol jsou jen velmi málo rozpustné ve vodě. Stařičké empirické pravidlo říká, že jedna skupina -OH "vtáhne do vody" jen 3 uhlíky (porovnej např. špatně rozpustný monohydroxybenzen a dobře rozpustné dihydroxybenzeny). Molekuly s větším počtem atomů uhlíku pro rozpuštění ve vodě potřebují větší počet hydrofilních funkčních skupin (např. cukry). Ve vodě nerozpustné jsou obrovské makromolekuly jako celulóza, i když je v nich veliký počet hydrofilních alkoholických skupin. Ve vodě rozpustné organické látky jsou polární, avšak polárnost sama nestačí pro rozpustnost látky, porovnej nepatrně rozpustný, ale značně polární nitrobenzen o permitivitě 35 s vodou mísitelným nepatrně polárním dioxanem, jehož permitivita je pouze 2. Mezi molekulami rozpustné látky a rozpouštědla vody musí dojít k interakci, jsou např. propojeny vodíkovými vazbami. Etherické kyslíky dioxanu tyto vodíkové vazby vytvářejí, kdežto kyslíky nitroskupiny nikoli, v nitroskupině jsou nevazebné elektrony delokalizovány, a proto nejsou k disposici pro tvorbu vodíkových vazeb. Ionty X^- a S^{2-} ve vodných roztocích jsou hydratovány avšak kovalentně vázané halogeny, ale také thiofenová síra se neúčastní tvorby vodíkových můstků, nepřispívají k rozpustnosti látky. Vodíkový ion je silně hydratován, z kovalentně vázaných vodíků tvoří vodíkové můstky ve větší míře jen vodíky ze skupin -OH.

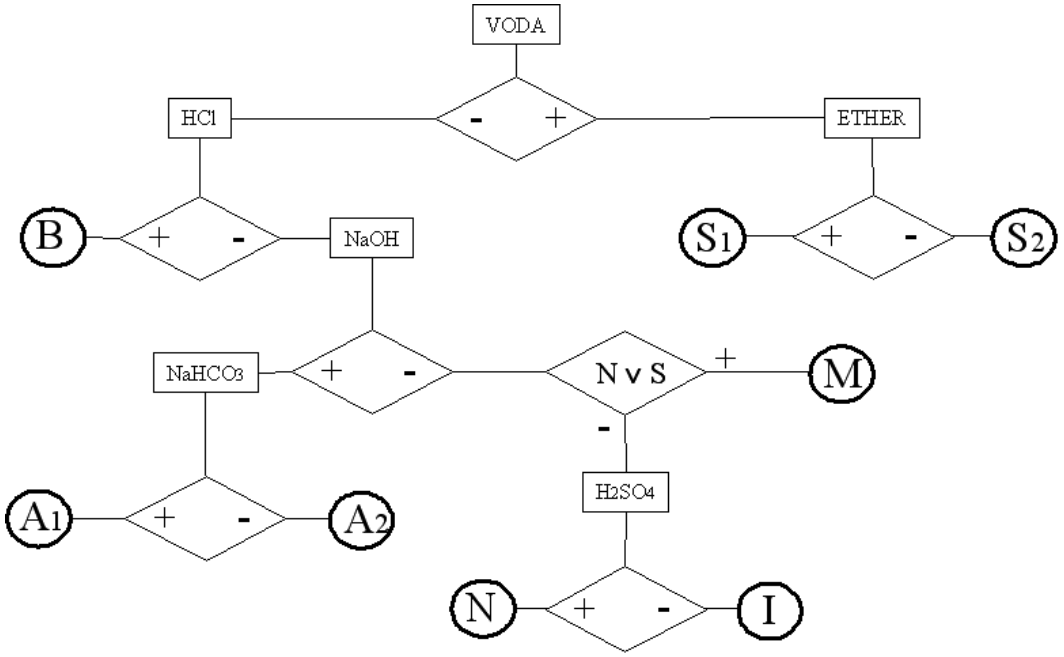
Při rozpouštění organických (také anorganických) iontů ve vodě se uplatňuje interakce iontu s dipólem vody. Ion k sobě přitahuje části dipólů vody s opačným dílčím nábojem. Tento hydratační obal iontu je potom vázám vodíkovými vazbami s dalšími molekulami vody a tím je ion vtažen do struktury rozpouštědla pokud ovšem jeho hydrofobní část není mnohem větší než ta hydratovaná. Ve vodě rozpustné jsou soli organických iontů ve kterých protiiontem (iontem s opačným nábojem) je silně hydratovaný anorganický ion, z kationtů volíme např. Na^+ nebo Li^+ a Cl^- nebo SO_4^{2-} z aniontů. Jako příklad poslouží soli tetrabutylamonia, chlorid je ve vodě rozpustný, hexachloroantimoničnan jen velmi málo (kovalentní vazba mezi centrálním atomem Sb a ligandy Cl souvisí s hydrofobností aniontu $SbCl_6^-$).

Látky ve vodě nerozpustné mohou přejít do roztoku po převedení na soli. Pro rozpouštění bází použijeme vodný roztok zředěné HCl. Pro rozpuštění velmi slabých kyselin (např. fenolů) použijeme vodný roztok alkalického hydroxidu, na rozpuštění více disociovaných kyselin (s karboxylovou skupinou) stačí i slaboučce bazický roztok $NaHCO_3$.

Pro rozpouštění převážně hydrofobních málo polárních látek (uhlovodíky, jejich

halogenderiváty, naftylamin ...) používáme rozpouštědlo diethylether (podobné se rozpouští v podobném). Ale jak ve vodě tak v etheru jsou rozpustné i některé nízkomolekulární sloučeniny s jednou polární skupinou (např. aceton a ethanol). V etheru nerozpustné jsou malé molekuly obsahující více hydrofilních skupin (např. glycerin) a také sulfonové kyseliny. Do etheru se extrahují nejen hydrofobní molekuly, ale i soli typu iontových párů jejichž obě složky, kation i anion, jsou hydrofobní (např. $(C_2H_5)_2OH^+$ a $FeCl_4^-$).

KLASIFIKACE ROZPUSTNOSTI



skupiny rozpustnosti:

S1	Látky rozpustné ve vodě i v etheru (monofunkční sloučeniny, obvykle do C5)
S2	Látky rozpustné ve vodě a nerozpustné v etheru (difunkční a polyfunkční sloučeniny)
B	Zásadité látky - nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v HCl
A2	Slabě kyselé látky - nerozpustné ve vodě i v hydrogenuhličitanu, ale rozpustné v NaOH.
A1	Silně kyselé látky - nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v hydrogenuhličitanu
N	Neutrální látky obsahující C, H, případně také O a halogeny, které nepatří do předcházejících skupin a jsou rozpustné v konc. kyselině sírové (aromatické a nenasycené uhlovodíky).
M	Neutrální látky obsahující také N, případně S a jiné prvky, které nepatří do předcházejících skupin.
I	Inertní látky - obsahující jen C, H, případně O a halogeny, které nepatří do předcházejících skupin a jsou nerozpustné v konc. kyselině sírové (např. nasycené uhlovodíky).

6. SEPARAČNÍ METODY

Pro dělení (separaci) látek, nejčastěji v roztocích, je k dispozici řada metod, např. srážení, extrakce, destilace a sublimace, elektroforéza, elektrolýza, výměna iontů, vymrazování....V této kapitole budou stručně diskutovány extrakce, iontová výměna, chromatografie a elektroforéza.

6.1 KAPALINOVÁ EXTRAKCE

Při promíchání (protřepání) dvou spolu se nemísících kapalin látka původně rozpuštěná v jedné z fází přejde částečně i do druhé. V rovnovážném stavu platí

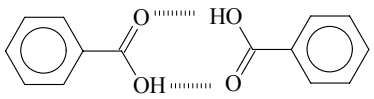
$K_d = [X]_o/[X]_w$

K_d je rozdělovací (=distribuční) konstanta, [X] jsou aktivity (často koncentrace) určité látky a indexy označují fázi méně (o) a více polarní (w), tou polárnější je obvykle voda.

Kyselina benzoová C_6H_5COOH se rozdělí mezi benzen a vodu

$K_d = [C_6H_5COOH]_o/[C_6H_5COOH]_w$

Kyselina benzoová ve vodné fázi může disociovat a v organické fázi je možná tvorba dimerů:



ve kterých 2 karboxylové skupiny jsou propojeny vodíkovými můstky. Tím se navzájem blokují polární karboxylové skupiny a vzniklé dimery (mohou to být i oligomery) mají méně polární charakter než monomery, a proto jsou lépe rozpustné v nepolárním prostředí (snadněji přecházejí do nepolární fáze).

$RCOOH = RCOO^- + H^+$ $\qquad K_A = [RCOO^-]_w[H^+]_w/[RCOOH]_w$

$2\ RCOOH = (RCOOH)_2$ $\qquad K_{dim} = [(RCOOH)_2]_o/[RCOOH]_o^2$

Distribuční poměr D je podmíněná distribuční konstanta.

$$D = c_o/c_w = ([RCOOH]_o + 2\,[(RCOOH)_2]_o)/([RCOOH]_w + [RCOO^-]_w)$$

$$D = K_d\,\alpha_o / \alpha_w$$

Symboly c_o a c_w představují celkovou (=analytickou) koncentraci kyseliny benzoové, tj. koncentraci všech forem kyseliny benzoové, v organické a ve vodné fázi, α_o a α_w jsou koeficienty vedlejších reakcí (viz kapitola 1.4).

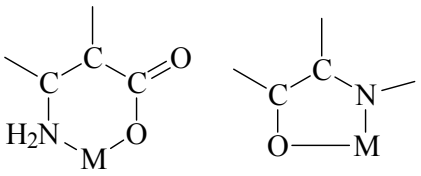
Distribuční poměr D pro kyselinu benzoovou je funkcí celkové koncentrace (čím větší c_o tím větší $[(RCOOH)_2]_o$) a acidity vodné fáze (ta ovlivňuje disociaci karboxylové skupiny). V praxi měříme obvykle distribuční poměr, protože bývá jednodušší stanovit celkovou koncentraci než koncentraci jedné z forem. Za určitých podmínek, kdy koeficienty $\alpha_o = \alpha_w = 1$, platí K_d=D. U kyseliny benzoové tyto podmínky představují dostečně kyselý vodný roztok, ve kterém kyselina nedisociuje a tak malou koncentraci c_o, při které prakticky nenastává dimerace.

Již alchymisté věděli, že "podobné se rozpouští v podobném". Nepolární (málo polární) sloučeniny rozpustíme v málo polárních organických rozpouštědlech. Polární a iontové sloučeniny se rozpouštějí ve vodě a také v polárních organických rozpouštědlech (např. glycerol, dimethylformamid

...). Molekuly karboxylových kyselin vytřepeme z organického rozpouštědla do alkalické vodné fáze, pro extrakci molekul organických aminů z organického rozpouštědla použijeme kyselý vodný roztok; v obou případech vzniknou ionty kterým lépe vyhovuje rozpouštědlo voda.

Pro extrakci kovových iontů z vody do organické fáze je třeba odstranit hydratační obal iontu protože koordinované molekuly vody jsou spojeny vodíkovými vazbami s molekulami vody-rozpouštědla a tak drženy ve vodné fázi. Dostane-li ion "obal" který je málo polární, je takový ion spíše vytlačován z polární fáze rozpouštědla vody. Aby mohl přejít do málo polární organické fáze je třeba ještě kompenzovat náboj takto nepolárně obaleného iontu. Do organických rozpouštědel se extrahují kationty kovů:

1/ ve formě elektroneutrálních chelátů. Často se používají dvojdonorové ligandy s jedním záporným nábojem (o-aminobenzoan =antranilan, 8-hydroxychinolát ...), ty tvoří elektroneutrální útvary ML_2 s bipozitivními kationty (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}...) a ML_3 s tripozitivními (Fe^{3+}, Al^{3+}, ...). V takových komplexech ligandy obsazují 4 anebo 6 koordinačních míst na centrálním atomu.



Vazba kovového iontu M na funkční skupiny chelatovorných ligandů: o-aminobenzoanu a 8-hydroxychinolátu. Uhlíky s naznačenými vazbami na další atomy jsou součástí aromatických kruhů.

2/ ve formě iontových asociátů (viz kapitola 4.1), např. CdI_4^{2-} s $Fe(bipy)_3^{2+}$ nebo $FeCl_4^-$ s $(C_2H_5)OH^+$ a $SbCl_6^-$ s kationtem krystalové violeti.

Přechod z jedné fáze do druhé probíhá na fázovém rozhraní. Pro rychlé ustavení extrakční rovnováhy je třeba, aby toto fázové rozhraní mělo co největší plochu a aby z každého místa v roztoku bylo blízko k tomuto rozhraní. Tyto podmínky nejsnadněji splníme při protřepání směsi obou fází v uzavřené nádobce. Protřepáváme sice 2 rozpouštědla vzájemně nemísitelná, ale vždy jsou jedno v druhém poněkud rozpustná. To znamená, že fáze po protřepání mohou mít jiné objemy než před protřepáním. Objemových rozdílů před a po extrakci se vystříháme pokud používáme rozpouštědla předem nasycená protřepáním s druhou fází.

Polárnost rozpouštědla jako prostředí pro reakce charakterizuje snadno změřitelná veličina permitivita ε. Polárnost jednotlivých molekul charakterizuje dipolový moment. Příklad rozpouštědel nemísitelných s vodou (permitivita 78): nitrobenzen (35), amylalkohol, ethylacetát (6), methyl-isobutylketon (13), chloroform (5), benzen (2,2) a hexan (1,9). Příklad rozpouštědel mísitelných s vodou: methanol (32), 1-propanol (20), aceton (21), pyridin (12) a také nepatrně polární dioxan (2,2). Polární rozpouštědla podporují ionizaci molekul, dipóly rozpouštědla vstupují mezi opačně nabité ionty, zamezují jejich přiblížení a tím snižují vzájemnou přitažlivost. Na rozpustnost látky v určitém rozpouštědle má význačný vliv schopnost rozpouštědla solvatovat rozpouštěné částice. Solvatované molekuly nebo ionty přijímá rozpouštědlo do své struktury. Modrá skalice se rozpouští ve vodě, protože se solvatuje kation (akvokomplex měďnatý) i anion (vodíkové vazby mezi síranovými oxidy a vodou). V tomto případě rozpouštědlo uplatnilo své donorové i akceptorové schopnosti (poskytuje elektronový pár anebo neobsazený orbital pro vazbu s rozpouštěnými částicemi).

POZNÁMKA: Při práci s organickými rozpouštědly je třeba postupovat obezřetně, většina z nich (prakticky všechna) mají toxické respektive ekologicky nežádoucí účinky.

Kapalinová extrakce se používá též k zakoncentrování velmi zředěných roztoků. Princip zakoncentrování spočívá v tom, že z velkého vodného objemu „vytřepeme“ do menšího organického. Je-li tato extrakce neúplná, můžeme ji jednou i vícekrát opakovat a spojit organické roztoky. Běžně používáme poměr až $v_o:v_w=1:10$, při menším objemu organické fáze už mohou nastat problémy se vzájemnou rozpustností kapalin a oddělením jedné fáze od druhé. Vycházíme-li z vodného roztoku o koncentraci c a objemu v_w, protřepeme-li objemem v_o rozpouštědla, platí vztah kde c_{w-1} a c_{o-1} jsou koncentrace ve vodné a organické fázi po prvé extrakci. Množství látky původně přítomné ve vodě se extrakcí rozdělilo mezi obě fáze.

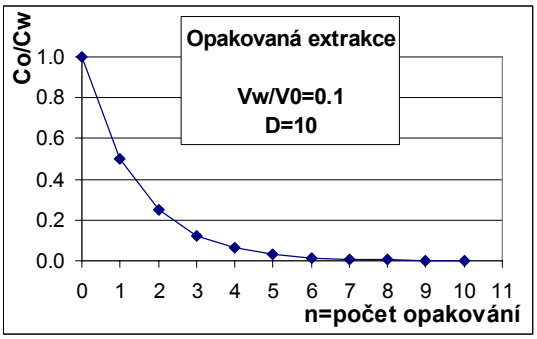
$$c\,v_w = c_{w-1}v_w + c_{o-1}v_o = c_{w-1}v_w + c_{w-1}Dv_o$$

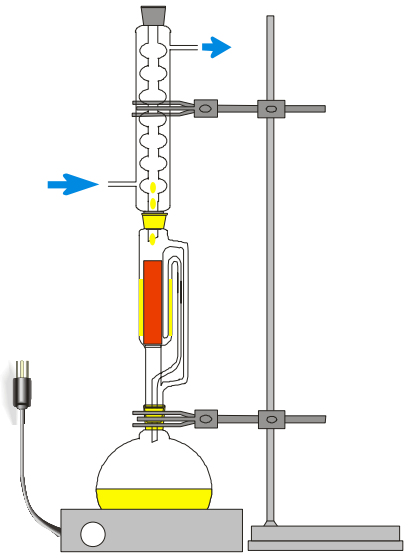
$$c_{w-1} = c\,v_w / (v_w + Dv_o)$$

Opakujeme-li extrakci n-krát vždy se stejným objemem organické fáze, poklesne koncentrace ve vodě na c_{w-n}.

$$c_{w-n} = c\,v_w^n / (v_w + Dv_o)^n =$$

$$= c / (1 + Dv_0 / v_w)^n$$

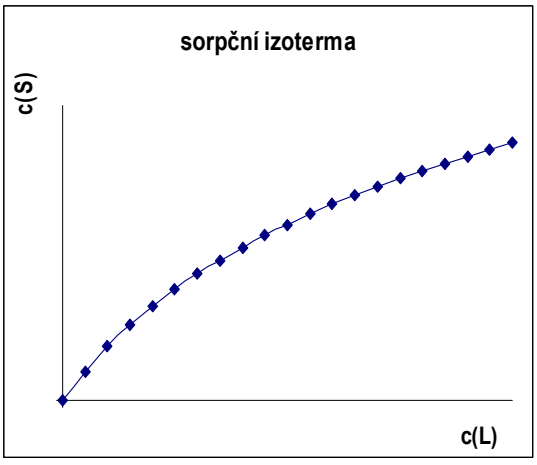




Kontinuální extraktor dle Soxhleta pro extrakci z tuhé fáze:

V dolní varné baňce se vaří rozpouštědlo, které vystupuje boční trubicí do horního chladiče. Tam kondenzuje a dopadá na papírovou patronu s tuhým vzorkem, z kterého extrahuje analyt. Jakmile je střední část aparatury s patronou naplněná, samospádnou trubičkou se celý tento objem přečerpá do varné baňky, kde se analyt shromažďuje. Rozpouštědlo se znovu ohřívá a celý děj se opakuje. Opakovaná extrakce tak může probíhat i několik hodin, prakticky s neměnným objemem rozpouštědla.

6.2 EXTRAKCE S PEVNÝM SORBENTEM



Rovnováhu mezi koncentrací látky v roztoku a koncentrací téže látky na povrchu pevné fáze charakterizuje sorpční izoterma. Při malé koncentraci látky v roztoku (malé nabídce) je na sorbentu dostatek volných sorpčních center (velká poptávka) a proto se zvyšováním koncentrace v roztoku (c_L) pozorujeme přibližně lineární nárust koncentrace na sorbentu (c_S). Při velké koncentraci látky v roztoku (velké nabídce) je sorbent z větší části saturován (malá poptávka) a proto zvyšování koncentrace v roztoklu ovlivní jen nepatrně (nebo vůbec neovlivní) koncentraci na sorbentu. Koncentraci na sorbentu vyjadřujeme jako poměr množství nebo hmotnosti látky na jednotku hmotnosti nebo objemu sorbentu (objem skutečný nebo objem násypný).

6.2.1 ADSORPCE

Při adsopci zůstává sorbovaná látka na povrchu (nezaměňujte s absorpcí, kdy se zachytí rozpuštěním na povrchu a difunduje dovnitř, absorce se uplatní jen v kapalných sorbentech, např. CO_2 v roztoku NaOH). Používáme sorbenty o jemném zrnění (s velkým povrchem) a také sorbenty porezní, u kterých se uplatní i vnitřní povrch. Adsorbovaná látka je vázána k sorbentu Van-der-Waalsovými silami. Stejně jako v kapalinové extrakci i v tomto případě platí: podobné tíhne k podobnému. Polární sorbenty (SiO_2, Al_2O_3, ...) zachycují z málo polárního rozpouštědla polárnější molekuly. Nepolární sorbent (aktivní uhlí, silikagel C-18, ...) sorbují málo polární látky z polárnějšího rozpouštědla. V systému roztok (obsahuje rozpouštědlo HS a rozpuštěnou látku X) a sorbent se ustavuje rovnováha

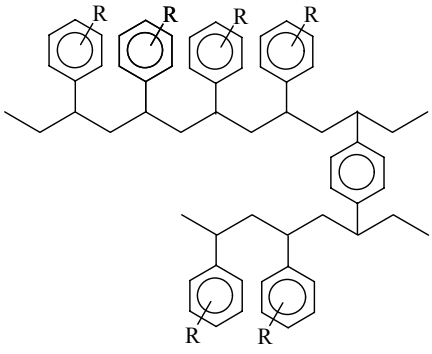
$$(HS)_S + X = (X)_S + HS \qquad K = [X]_S[HS]/[HS]_S[X]$$

Indexem $_S$ je označena koncentrace na sorbentu, koncentrace v roztoku jsou bez indexu. Rozpouštědlo není jen pasivní složka, rozpouštědlem vhodné polarity můžeme vytěsnit sorbované látky, toho se využívá při eluci (reextrakci) na sorbentu zachycených látek.

Povrch sorbentů lze modifikovat, tj. upravit dle potřeby. Při reakcí mezi silanolovou skupinou (-OH) na silikagelu a chlorovaným uhlovodíkem (RCl) kondenzuje HCl a na silikagel je navázána (pevnou) kovalentní vazbou skupina -OR. Je-li R zbytek alkanu s 18 uhlíky, vznikl silikagel C-18 (v praxi se používají výhodnější postupy na výrobu "cé-osmnáctky"). Tak získáme sorbent s mechanickými vlastnostmi silikagelu (nedeformuje se tlakem) a s povrchem majícím vlastnosti parafinu, sorbuje málo polární látky. Modifikovaný sorbent má odlišné sorpční vlastnosti od původního materiálu, ten zastává funkci nosiče a není (takřka není) v kontaktu s roztokem. Je možná též dynamická modifikace sorbentu, to na jeho povrch zachytíme sorpcí vhodný modifikátor. V tomto případě je modifikátor vázán na sorbent jen méně pevnými silami Van-der-Waalsovými a je možno jej ze sorbentu vymýt.

6.2.2 IONTOVÁ VÝMĚNA

Klasické vyměňovače iontů (ION EXchanger = ionex, katex nebo anex) jsou tuhé polyelektrolyty, ve kterých jeden druh iontů (kation nebo anion) je součástí nepohyblivé (omezeně pohyblivé) makromolekuly. Protiionty vázané elektrostatickou vazbou jsou na povrchu v roztoku volně pohyblivé a také v pórech makromolekuly, lze je snadno vyměnit za jiné ionty o souhlasném náboji. Vyměňovače iontů jsou např. látky na bazi polystyrénu zesíťovaného malým přídavkem divinylbenzenu.



Struktura polystyrenového ionexu.
V katexech je R anion skupiny sulfonové nebo karboxylové, v anexu kation skupiny aminové.

Měničem kationtů jsou i silikagel a povrch skla v nekyselém prostředí, ve kterém jsou disociovány silanolové skupiny. Jako kapalný měnič iontů funguje např. dodecylamin v organickém roztoku (může být i dynamicky sorbován na silikagelu C-18).

Málo hydrofilní dodecylamin reaguje s hydrofobními kyselinami za vzniku solí, iontových asociátů, které jsou špatně rozpustné ve vodě a mohou být extrahovány do méně polárních rozpouštědel.

V dosud zmíněných měničích iontů jsou kationty a anionty vázány výhradně elektrostatickou vazbou, tj. málo selektivně. Jistá selektivita je dána závislostí na velikosti náboje vyměňovaného iontu, ion s větším nábojem je přitahován větší silou než ion s nábojem menším. Dále tu hraje roli velikost

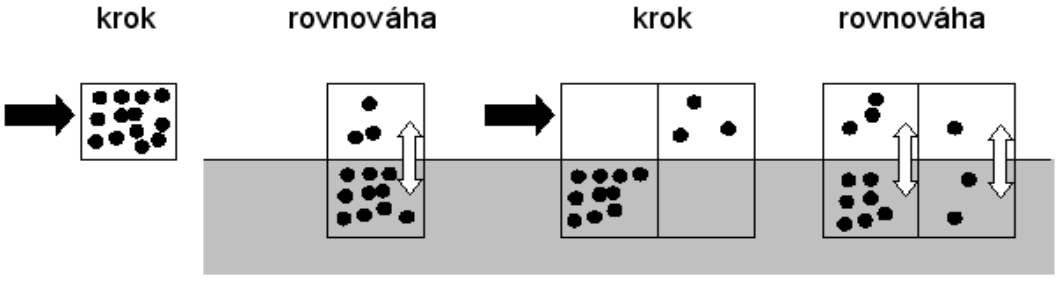
iontů (včetně solvatačních obalů), čím více se k sobě přiblíží opačně nabité ionty, tím silněji působí elektrostatická přitažlivost.

Chelatační ionexy mají ve struktuře makromolekuly zabudovány chelatotvorné funkční skupiny známé z organických analytických činidel (např. $-CH_2-N(CH_2-COOH)_2$ z EDTA, o-fenolkarboxylovou z kyseliny salicylové, ...). Vytvářejí cheláty, ve kterých je kovový kation vázán kovalentní vazbou. Stabilita vazby kovového iontu na chelatační ionex je závislá na aciditě roztoku, v optimálních podmínkách je větší než u ionexů fungujících výlučně na bázi elektrostatického záchytu. Vhodné funkční skupiny v chelatotvorném ionexu umožní selektivní sorpci iontů. Afinitní chromatografie zahrnuje nejen použití chelatačních ionexů, ale také sorpce na bázi imunochemických komplexů, ty jsou tvořeny dvojicí antigen a protilátka. Sorbent modifikovaný jednou z těchto komponent sorbuje druhou komponentu z roztoku. Používá se k separacím makromolekul typu bílkovin.

I pevné sorbenty se používají k zakoncentrování stopových množství analytu z velkého objemu roztoku. Oddělení nepatrného množství pevného sorbentu z velkého objemu roztoku působí menší problémy než oddělení nepatrného objemu jedné kapalné fáze od velkého objemu jiné kapalné fáze. Proto s pevnými sorbenty lze dosáhnout většího zakoncentrování. Sorpci (adsorpci či iontovou výměnu) můžeme realizovat protřepáním roztoku se sorbentem, dostaneme sorbent homogeně kontaminovaný sorbovanou látkou. Nebo můžeme sorbent umístit do kolonky a prolít jí roztok. Dojde-li v tomto případě k záchytu podstatné části látky z roztoku, je její koncentrace na sorbentu maximální v horní části kolonky a minimální na sorbentu z dolní části kolonky. I kapalinovou extrakci můžeme realizovat na kolonce: tenoučkou vrstvičkou extrakční kapaliny modifikujeme pevný nosič který je náplní kolony. Při tomto uspořádání zejména v horní části kolonky hrozí nebezpečí rozpouštění (vymývání) nepatrného množství extrakční kapaliny jíž je nosič povlečen, pro tento jev se používá termín "krvácení (bleeding) kolony".

6.3 CHROMATOGRAFIE

V chromatografii protéká pomalu mobilní fáze (kapalina nebo plyn) okolo stacionární fáze (pevná látka anebo tenká vrstva kapaliny na pevném nosiči). Plocha kontaktu obou fází je co možná největší, na ní probíhá záchyt (retence) látek unášených mobilní fází a desorpce zachycené látky ze stacionární fáze zpět do proudícího média. V praxi to znamená, že kapalina teče mezi droboučkými zrnky (řádově 0,01 mm) sorbentu v trubici (kolonové uspořádání) anebo teče mezi celulózovými vlákny např. v papíru (plošné uspořádání). Chromatografujeme převážně ve zředěných roztocích, v lineární oblasti sorpční izotermy.



Vysvětlení chromatografického procesu, pojmu chromatografické patro

Směs látek určených k rozdělení eluční chromatografií vneseme ve formě úzké zóny do proudu mobilní fáze (vnášíme úzký koncentrační pulz). Průběh chromatografického dělení lze zjednodušeně popsat asi takto: 1/ Jakmile přiteče směs analytů do kontaktu se stacionární fází, s jejím prvním patrem, rozdělí se každý z analytů mezi fázi stacionární a mobilní stejným způsobem jako při protřepání roztoku s pevným sorbentem. 2/ Mobilní fáze teče dále a unáší s sebou nesorbovaný zbytek analytů ke 2. patru stacionární fáze, kde nastane opět rozdělení mezi obě fáze. Současně do prvého patra přitekla čistá mobilní fáze a desorpcí částí analytů, které byly zachyceny na stacionární fázi v 1.

patře, se ustavuje v tomto patře nová rovnováha. V každém patře (může jich být i 100 na délku 1 cm) ustaví se rovnováha mezi koncentracemi každého analytu uvnitř fáze mobilní a na povrchu fáze stacionární. Čím více je látka sorbována, čím delší dobu je na nepohybující se stacionární fázi, tím pomaleji postupuje ve směru toku. Látky s nulovou retencí, které se vůbec nesorbují, pohybují se stejně rychle jako teče mobilní fáze. Látky zachycované se více či méně opozdí za těmi nesorbovanými. Nepatrné rozdíly ve velikosti sorpce dvou analytů, takové jaké sotva postřehneme při jednorázovém protřepání, stačí pro jejich dokonalé rozdělení a to je výsledkem mnohonásobně opakovaného ustavení rovnováhy v chromatografii.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) představuje nejúčinější metodu dělení eluční chromatografií spojenou se stanovením i velmi malých množství (nebo koncentrací) analytů, zejména organických, v komplikovaných matricích. Hlavní součásti moderního chromatografu (HPLC nebo i plynového) seřazené za sebou tak, jak jimi postupně protéká mobilní fáze:

- zásobník mobilní fáze
- pumpa
- zařízení pro dávkování vzorku
- kolona
- detektor spojený se zapisovačem

Pumpa protlačuje kapalinu (tlakem několik MPa) kolonou, jejíž odpor je veliký (je plněna částicemi o rozměru řádově setiny mm). Je nežádoucí, aby pumpa generovala tlakové rázy. Nejjednodušší pumpa pracuje na principu injekční stříkačky, jejíž píst je posunován elektromotorkem.

Nejjednodušší dávkovací zařízení představuje gumová nebo plastová část stěny (septum) trubice, jíž proudí mobilní fáze. Toto septum propíchneme dutou jehlou napojenou na pístovou pipetu a z pipety vytlačíme roztok vzorku (řádově mikrolitry) do proudu mobilní fáze. Podstatně reprodukovatelnější dávkování je pomocí dávkovacího (vícecestného) ventilu. Protékajícím roztokem vzorku naplníme dávkovací smyčku o známém objemu a potom otočením ventilu tuto smyčku zařadíme do proudu mobilní fáze a ta s sebou unáší vzorek na kolonu.

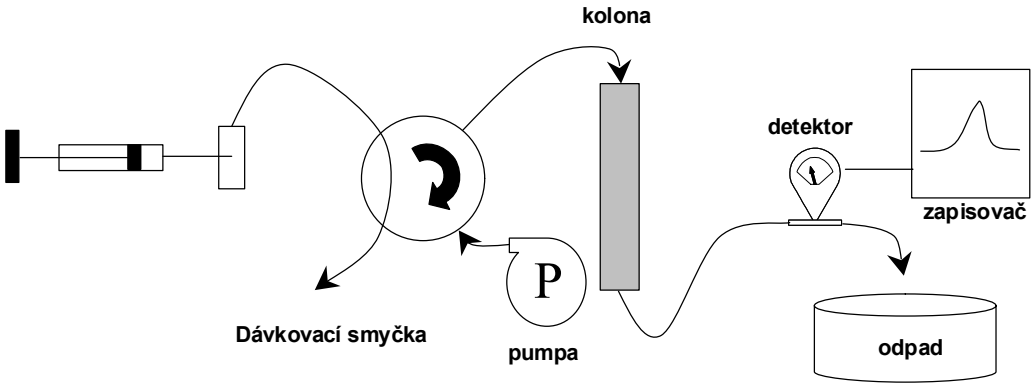


Schéma zařízení pro HPLC

Kolona je trubice plněná stacionární fází o velikém povrchu (velmi malé částečky 5-10 μm), v koloně probíhá chromatografické dělení. Prázdná kolona používaná v plynové chromatografii je bez náplně, stacionární fázi tvoří modifikovaný materiál stěny trubice. Prázdná kolona musí mít velmi malý průměr, aby ze všech možných pozic analytu v mobilní fázi bylo blízko ke stacionární fázi, to umožní rychlé ustavování rovnováhy.

Detektor podává informaci o složení mobilní fáze na výstupu z kolony. Přítomnost analytů v mobilní fázi se projeví píky v chromatogramu, tj. na zapisovačem registrované závislosti signál detektoru versus čas. Nejčastěji užíváme detektory neselektivní, ty indikují přítomnost kterékoli (skoro kterékoli) cizí látky (=analytu) v mobilní fázi. Detektory selektivní indikují přítomnost jen úzkého okruhu analytů. Příkladem neselektivního (univerzálního) detektoru je fotometrický detektor pracující při vlnové délce 254 nm (tj. při jedné ze spektrálních čar rtuťové výbojky), při této vlnové délce absorbuje většina organických molekul. Fotometrická absorpční cela v takovém průtokovém detektoru

má objem pouze několik mikrolitrů (porovnej s objemem kapky uváděným většinou kolem 30 mikrolitrů). Konduktometrický detektor je selektivní pro indikaci iontů, dává nulový signál za přítomnosti pouze nenabitých částic. Byly zkonstruovány detektory užívající nejrůznější principy měření (potenciometrie s iontově selektivními elektrodami, polarografie, infračervená spektrometrie, měření indexu lomu, měření elektrické vodivosti v plynu ...). Hmotnostně spektrální detektor dovoluje identifikaci analytů tím, že v oblasti každého chromatografického píku odebírá vzorek mobilní fáze s analytem a zaregistruje hmotnostní spektrum.

Činnost moderního chromatografu je řízena počítačem, ten může obstarávat dávkování vzorku, řízení průtokové rychlosti, časový průběh gradientu teploty i složení mobilní fáze, postkolonovou derivatizaci, záznam a vyhodnocení chromatogramu (integrace plochy pod píkem, porovnání s kalibrační křivkou ...) a konečně i napsání protokolu o chromatografické analýze.

Některé pojmy z chromatografie:

- Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC), mobilní fází je plyn. Rozlišujeme GLC kde stacionární fází je kapalina (Liquid) a GSC s pevnou stacionární fází (Solid). Plynovou chromatografii používáme pro vzorky plynů a za zvýšené teploty i pro snadno těkavé kapaliny.

- Kapalinová chromatografie (LC) užívá kapalinu jako mobilní fázi. Rozlišujeme LSC a LLC, LLC se nazývá též rozdělovací chromatografií.

- V superkritické fluidní chromatografii (SFC) je mobilní fází superkritické fluidum. Pracuje se při nadkritické teplotě a nadkritickém tlaku a vlastnosti mobilní fáze jsou přechodem mezi vlastnostmi plynu a kapaliny: vysoký difúzní koeficient, nízká viskozita a vysoká teplota zvyšuje eluční sílu mobilní fáze.

- Iontová chromatografie (IC). Stacionární fází je vyměňovač iontů, eluující mobilní fáze je roztok obsahující ionty.

- Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC). Práškovitý sorbent (např. silikagel, celulozu, ...), smícháme v roztoku s malým množstvím pojiva (např. s 5% sádry) a roztok nalijeme na podložku (např. skleněná deska nebo hliníková folie). Po vysušení se používá jako stacionární fáze v chromatografii s plošným uspořádáním. Používá se nejvíce pro rychlou kontrolu čistoty organických látek.

- Gelová chromatografie (Size Exclusion Chromatography, SEC). Stacionární fáze má póry o konstantním průměru (např. molekulová síta, některé přírodní dextriny, ...), do těchto pórů se dostanou jen dostatečně malé molekuly. Větší molekuly se do pórů nevejdou, ty jsou stále v mobilní fázi a pohybují se rychlostí stejnou jako má mobilní fáze. Molekuly určité střední velikosti se nedostanou hluboko do póru, jsou zadrženy kratší dobu a zpožděny méně než molekuly zcela malé. Gelová chromtaografie se uplatňuje při separaci různě velikých makromolekul a pro stanovení molekulových hmotností bílkovín a polymerů.

- Gradientová eluce probíhá za během experimentu měněných podmínek. Můžeme jednoduše realizovat změny teploty (zvýšená teplota obvykle usnadňuje desorpci), ale hlavně složení mobilní fáze. Změny v stacionární fázi lze uskutečnit např. zařazením za sebe dvou kolon s různou náplní. Eluci za konstantních, neměnných podmínek označujeme jako izokratickou.

- Derivatizace v chromatografii. Látky nestálé (např. těkavé, snadno oxidovatelné, reagující s mobilní nebo stacionární fází, ...) převádíme na stabilní deriváty a ty potom chromatograficky dělíme – toto je derivatizace předkolonová (před separací). Někdy také potřebujeme převést separovaný analyt na detekovatelný derivát (bezbarvé kvarterní organické aminosloučeniny na tenké vrstvě potřebujeme zviditelnit postřikem činidla, žlutým roztokem BiI_4^-, kdy vzniknou oranžové skvrny solí). Pak hovoříme o derivatizaci postkolonové (po separaci). Po provedené separaci jednotlivé analyty detekujeme (vizuálně nebo pomocí přístroje).

- Reverzní fáze (RP). Za normální polaritu fází se považuje málo polární mobilní fáze a polární stacionární fáze. Dnes se častěji pracuje s obrácenou polaritou fází, polární mobilní (např. voda) a nepolární stacionární (např. C-18).

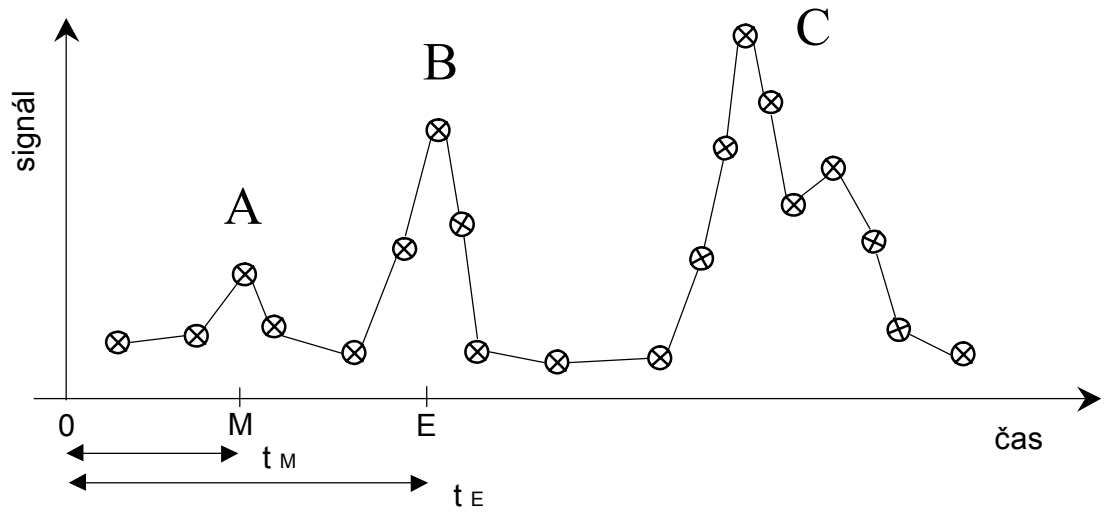
- Chromatograficky čistá látka v eluční chromatografii dává jediný pík (jedinou skvrnu).

Protože však v jednom chromatografickém systému, tj. při použití určité mobilní v kombinaci s určitou stacionární fází, nelze vyloučit, že 2 rozdílné látky se pohybují identickou („identickou“ v rámci naší přesnosti) rychlostí, chromatografujeme ještě jednou a použijeme při tom výrazně odlišný chromatografický systém. Dostaneme-li i v druhém případě jediný pík, označíme látku za chromatograficky čistou. Je velmi nepravděpodobné, že dvě rozdílné látky se pohybují stejnou rychlostí při chromatografii ve dvou velmi odlišných chromatografických systémech. Při detekci UV lze ke kontrole čistoty použít analýzu absorpčních spekter píků.

- Retenční faktor R_F je poměrem rychlostí pohybu analytu ku rychlosti pohybu látky stacionární fází vůbec nezadržované (např. rozpouštědla). V chromatografii na tenké vrstvě je to poměr vzdáleností skvrny analytu a čela rozpouštědla (kam až doteklo rozpouštědlo) od startu. V HPLC je to poměr objemů V_M/V_E. Mrtvý objem V_M je objem kapalné fáze uvnitř kolony, tj. objem, kterým by byl vymyt z kolony do detektoru nezadržovaný analyt.

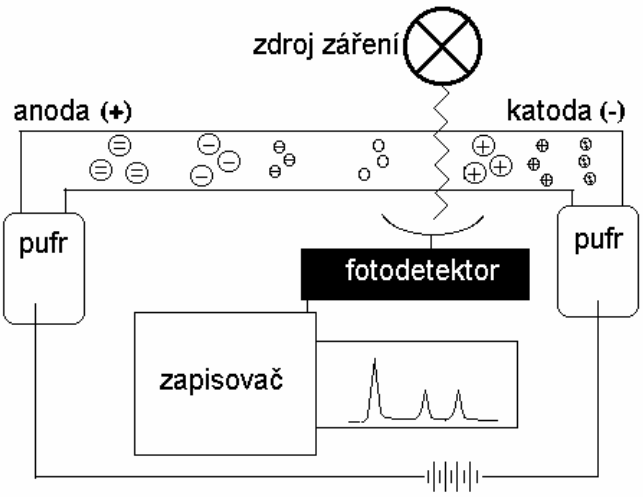
- Eluční objem V_E je objem mobilní fáze potřebný k vymytí analytu s nenulovou retencí z kolony. Je to objem proteklý kolonou od okamžiku nástřiku vzorku až do objevení se analytu v cele detektoru. Při konstantní průtokové rychlosti je mrtvý (eluční) objem přímo úměrný mrtvému (elučnímu) času.

- Vyhodnocení chromatogramu. Veličina R_F anebo eluční čas t_E vypovídá o kvalitě analytu, výška píku anebo jeho plocha o množství analytu. Experimentálně, pomocí standardů zjistíme závislost velikosti signálu na množství analytu.



Chromatogram. A je pík látky nezadržované stacionární fází, B pík jednoho analytu, C pík dvou jen částečně rozdělených analytů. 0 je okamžik nástřiku, M čas ve kterém opouští kolonu složka vzorku nezadržovaná stacionární fází, E čas eluce analytu. Úsečka t_M znázorňuje mrtvý čas, t_E eluční čas (někdy také t_R). Nedeformované píky by měly tvar Gaussových křivek, v tomto obrázku použitá technika neumožnila vystihnout lépe skutečný tvar píků.

6.4 ELEKTROFORÉZA



Chromatografické dělení spočívá na různé rychlosti putování analytů dvoufázovým systémem. Elektroforéza v principu nepotřebuje pro dosažení separace chemickou afinitu - dělí na základě různé rychlosti putování analytů jednofázovým systémem (roztokem) v elektrickém poli. Je ale možné zkombinovat oba principy dělení a provádět elektroforézu v koloně plněné stacionární fází se sorpčními vlastnostmi (kapilární elektrochromatografie, CEC).

Při elektroforéze vkládáme stejnosměrné napětí na elektrody z inertního materiálu (Pt, C, ...) ponořené do roztoku. Kationty (s pozitivním nábojem) jsou přitahovány k záporně nabité katodě a anionty k anodě. Přitažlivá síla je tím větší, čím větší je náboj iontu a čím větší je spád napětí (gradient voltáže, V/cm) v roztoku. Výsledný rovnoměrný (nezrychlený) elektroforetický pohyb je dále ovlivněn odporem prostředí, kterým se ionty protlačují. Ion o velikém průměru (včetně solvatačního obalu) je brzděn více než ion malý. Tato velikost iontů obvykle vzrůstá s jejich relativní molekulovou hmotou. Pohyb iontů při elektroforéze může ovlivnit i tok kapaliny (viz elektroosmotický tok) kterým jsou unášeny jak nabité, tak i nenabité složky roztoku. Elektroforetická separace je založena na rozdílech ve směru a v rychlosti pohybu (pohyblivosti) iontů. Elektroforézu provádíme v prostředí, které omezuje pohyb v jiném směru než ve směru elektrické přitažlivosti (v uzoučké kapiláře nebo mezi převážně jedním směrem orientovanými vlákny papíru) anebo v prostředí omezujícím volnou pohyblivost (přelévání) kapaliny, v gelu.

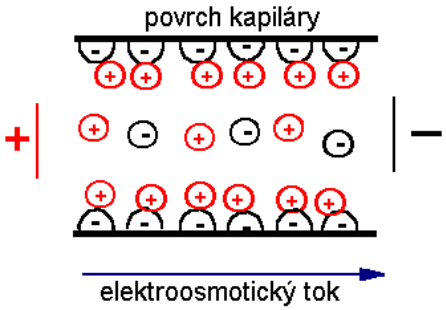
Při průchodu elektrického proudu roztokem probíhají na elektrodách elektrodové reakce. Produkty těchto reakcí jsou obvykle nežádoucí, proto oddělujeme vhodnou membránou prostory elektrod od prostoru, kde probíhá separace. Tato membrána musí být průchodná pro ionty (aby mohl protékat elektrický proud) a musí brzdit difúzi produktů elektrolýzy. Také lze přidat do roztoku u elektrody vhodné činidlo, které reaguje s elektrodovým produktem a tak eliminuje jeho vliv na separaci (např. tvoří-li se na anodě chlór, redukujeme jej v prostoru anody přídavkem hydrazinu).

Svorkové napětí U vložené na elektrody je rovno součtu potenciálů obou elektrod (E_{kat} a E_{an}) a potenciálu ustaveného na odporu roztoku, tento je roven iR, jak vyplývá z Ohmova zákona.

$$U = E_{kat} + E_{an} + iR$$

Při elektroforéze vkládáme U řádově 10^2 až 10^4 V. Potenciál elektrod je řádově v jednotkách voltů, podstatná část vloženého napětí vytváří potenciálový spád v roztoku. Průtokem proudu se roztok zahřívá (ohmický ohřev), je tedy nutné zajistit chlazení termostatováním systému.

Provádíme-li elektroforézu ve skleněné nebo křemené kapiláře, na její stěně jsou nepohyblivé negativní náboje (silanolové skupiny $Si\text{-}O^-$). Na tuto stěnu je elektrostaticky přitažena vrstva kationtů z kapaliny. Po aplikaci elektrického pole se tato vrstva pohybuje ke katodě a v důsledku viskozity strhuje i další molekuly okolní kapaliny a tak posunuje roztok jako celek (molekuly i anionty) stejným směrem, kterým putují kationty – tomu říkáme ELEKTROOSMOTICKÝ TOK.



6.4.1 ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

Zónovou (též zónální) elektroforézu provádíme buď v plošném uspořádání, na papíře (nasáklém roztokem základního elektrolytu) či ve vrstvě gelu (ten se připravuje nalitím např. na skleněnou desku) anebo v kolonovém uspořádání, v kapiláře. Detekce při plošném uspořádání se provádí po ukončení separace postřikem vhodnými činidly. V tomto případě dáváme přednost činidlům neselektivním, reagujícím s velkým počtem analytů, protože separaci zajistila elektroforéza a postřikové činidlo pouze informuje, zda na určitém místě je či není i jiná látka než jenom složky základního elektrolytu. Při elektroforéze v kapiláře užíváme detektory podobně jako v chromatografii, nejčastěji je to fotometrický detektor pracující ve viditelné a ultrafialové oblasti. Detektor je v tomto případě umístěn přímo na kapiláře.

Základní elektrolyt má v celém systému stejnou koncentraci (např. 0,02 M NaCl) a zaručuje konstantní hodnotu proudu v celém dělícím systému. Na start nanášíme roztok vzorku ve formě úzkého koncentračního pulzu a sledujeme pohyb složek analytu v roztoku základního elektrolytu. Koncentrace (objem) analytů by měla být značně menší než koncentrace (objem) základního elektrolytu. Vliv produktů elektrodových reakcí na separaci je obvykle nežádoucí. Pro dělení iontů s M_r řádově 10^2 postačí gradient voltáže řádu 10 V/cm, pro dělení iontů makromolekul (peptidů, ...) je vhodné 10^2 až 10^3 V/cm.

Přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu podobně jako chromatograf pro HPLC, obsahuje kolonu (separační jednotku) a detektor (detekční jednotku), příp. zapisovač. Během průchodu kapilárou se rozdělí ionty pohybující se různou rychlostí. Vzhledem ke kapilárním rozměrům kolony (celkový objem 1-10 μl), je zařízení pro dávkování vzorku v elektroforéze jiné než v HPLC, nemůžeme používat dávkovací smyčky, protože dávkovaný objem musí být řádově procenta celkového objemu (typicky tedy 10 nl). To realizujeme ponořením injektážního konce do roztoku vzorku a následnou aplikací přetlaku resp. podtlaku na jednom konci kapiláry na přesně definovanou dobu.

Na tomto přístroji obvykle rozdělíme a stanovíme jen jeden druh iontů, kationty nebo anionty, avšak je-li dostatečně veliký elektroosmotický tok, detektor může zaznamenat i elektroneutrální molekuly a dokonce také některé velmi málo pohyblivé ionty opačného náboje, ty které elektrické pole tlačí směrem pryč od detektoru. Zaregistrovaný elektroforeogram má podobný nejen tvar, ale i způsob vyhodnocení jako chromatogram. Kvalitu analytu určíme podle času, ve kterém byl pík zaregistrován, a jeho množství je úměrné ploše pod píkem anebo výšce píku.

Ovlivňování rychlosti pohybu částic je základem optimalizace jejich separace ze směsi. Tato rychlost pohybu závisí na A/ velikosti náboje částice – tu můžeme změnit úpravou acidity (vodíkový kationt se odštěpí anebo váže), na B/ hydrodynamické velikosti částice – tu můžeme měnit tvorbou komplexu iontu s ligandem, který nepřináší náboj (např. pyridin), tím se změní velikost solvatovaného iontu. Tvorbou komplexů s ligandy majícími náboj (např. $Cd^{2+} + 4I^- = CdI_4^{2-}$) měníme velikost i náboj. I uzavřením nenabité molekuly do micely ionogeního tenzidu se tato molekula stane součástí elektricky nabitého seskupení pohybující se v elektrickém poli (=Micelární elektrokinetická chromatografie, MEKC).

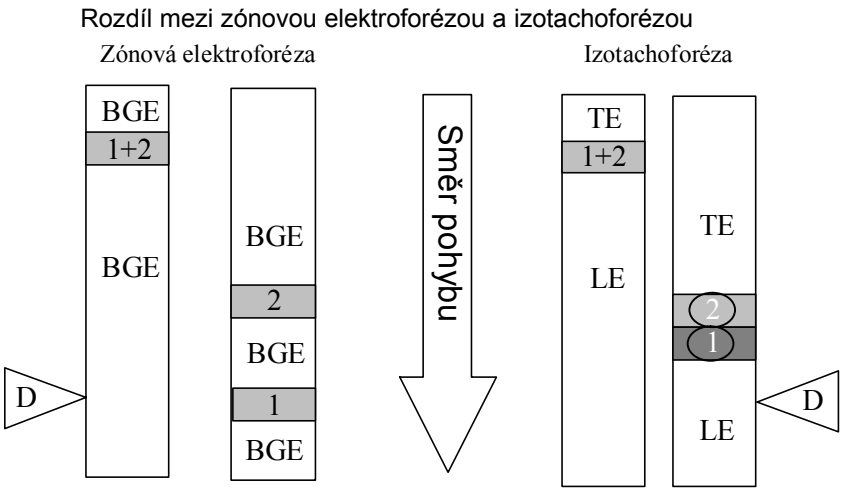
6.4.2 IZOTACHOFORÉZA

IZO znamená stejný, výraz TACHO známe z tachometru, měřiče rychlosti a FORÉZA připomíná elektroforézu. Izotachoforéza je elektroforéza, při níž se ionty pohybují stejnou rychlostí. Při zónální elektroforéze je v celém systému roztok základního elektrolytu o stejné koncentraci, o stejné vodivosti. To určuje, že v celém systému je konstantní gradient voltáže a ten uděluje větší rychlost iontům analytu o větší pohyblivosti než iontům o pohyblivosti menší. Stejná rychlost pohybu iontů s různou pohyblivostí v izotachoforéze znamená, že každý z iontů se pohybuje v prostředí s jiným spádem napětí.

Přístroj pro izotachforézu je prakticky stejný jako pro kapilární zónovou elektroforézu. Kolonu naplníme vedoucím elektrolytem (leading electrolyte, LE) a do prostoru druhé elektrody umístíme zakončující elektrolyt (terminating electrolyte, TE). Pomocí dávkovacího ventilu vneseme

roztok vzorku mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Protékající elektrický proud je veden v různých místech roztoky odlišného složení, tedy s odlišnou vodivostí. Nicméně v každém místě kapiláry, v každém jejím průřezu, **protéká stejně veliký proud**. Změny vodivosti roztoku v různých částech izotachoforetické kolony o konstantním průměru při průtoku všude stejně velikého proudu tedy znamenají, že gradient voltáže (intenzita elektrického pole, také elektrický odpor a teplota) je v různých částech kolony různý.

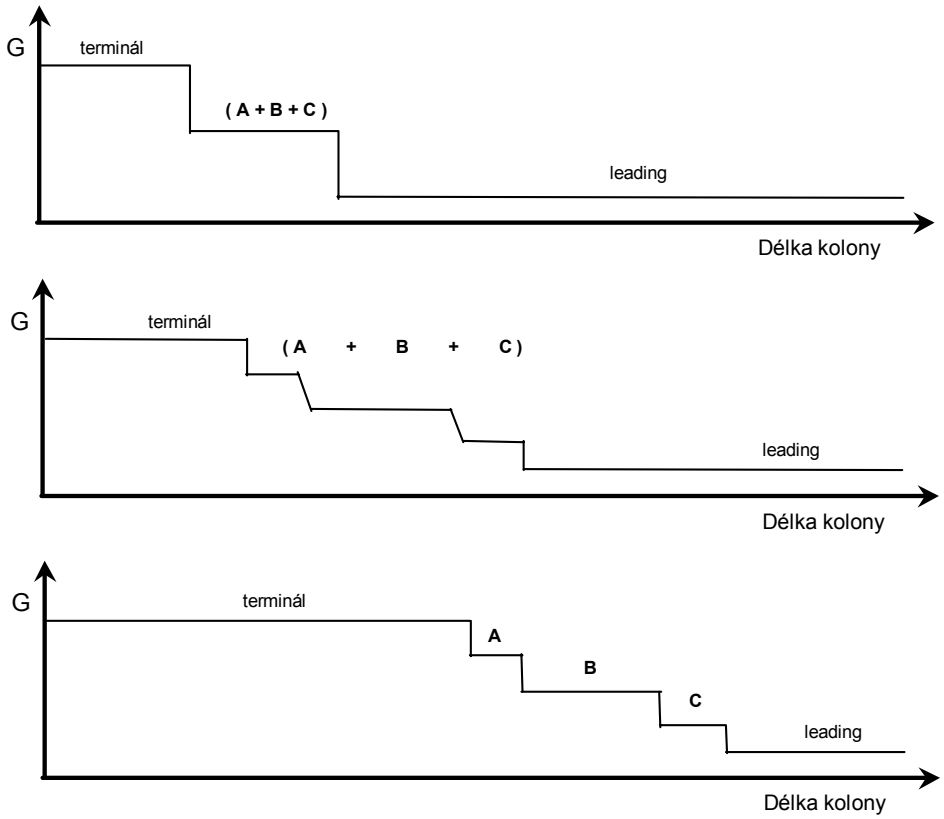
Izotachoforézou dělíme a stanovujeme ionty stejného náboje. Protiionty, tj. ionty opačného náboje jak ve vzorku, tak i v leadingu a terminálu nejsou analyticky významné, pokud se nějakým způsobem neváží na ionty analytu. Ihned po zahájení průchodu proudu jsou protionty vzorku unášeny opačným směrem, proti pohybu iontů-analytů; ionty analytů se posunují do kolony a tam jejich protiionty se stávají ionty z leadingu, které často fungují jako pufr.



BGE = background electrolyte, TE = terminating electrolyte, LE = leading electrolyte

Jako modelový příklad pro vysvětlení dějů při izotachoforéze použijeme dělení a stanovení kationtů Na^+ a K^+. Nahlédnutím do tabulek zjistíme, že vodivost ekvimolárních roztoků se zmenšuje v řadě HCl>KCl>NaCl>LiCl. Příspěvek vodivosti iontů Cl^- je ve všech případech stejný a to znamená, že pohyblivost kationtů klesá v řadě $H^+>K^+>Na^+>Li^+$. Jako vedoucí elektrolyt zvolíme HCl, jehož kation musí mít maximální pohyblivost. Terminalem bude roztok LiCl s kationtem o minimální pohyblivosti. Průtok konstantního proudu vyvolá v leadingu o maximální vodivosti nejmenší gradient voltáže a v terminalu, který má minimální vodivost, je gradient největší. Takovým způsobem se ionty o různé pohyblivosti uvedou do stejně rychlého pohybu. Pohyblivosti kationtů ze vzorku jsou menší než kationtu v leadingu a větší než kationtu v terminalu. Tedy gradient voltáže v zóně vzorku je menší než v terminálu a větší než v leadingu. Zapojením elektrického proudu se vytvoří zóny s různým spádem napětí a v nich se pohybují ionty analytu. V zóně vzorku je směs rychlejších K^+ a pomalejších Na^+. Celá zóna se pohybuje směrem ke katodě a uvnitř zóny se hromadí pohyblivější K^+ v čele zóny a pomalejší Na^+ na konci zóny a postupně se vytvářejí dvě samostatné zóny: vpředu ve směru pohybu zóna K^+ a za ní zóna Na^+. Rychlejším iontům K^+ stačí menší gradient voltáže než vyžadují pomalejší Na^+ pro dosažení stejné rychlosti pohybu.

Samozaostřovací efekt. Dostane-li se kation K^+ do zóny, která putuje před „jeho“ zónou, tj. do zóny H^+, v této zóně vodíkových iontů je menší spád napětí a ten neudělí méně pohyblivým K^+ dostatečnou rychlost, ty se zpomalí a vrátí zpět do "své" zóny. Podobně, jestli se některý z iontů K^+ zpozdí a dostane se do zóny Na^+, tamní větší spád napětí jej urychlí zpět do zóny K^+.



Gradient voltáže G (nebo elektrický odpor) v průběhu izotachoforetického dělení iontů A, B a C. Ionty analytů se pohybují ve směru šipky -->. Horní obrázek platí pro start, dolní pro stacionární stav po rozdělení.

Izotachoforézou lze dělit a stanovit ionty. Možnosti ovlivnit pohyblivost iontů byly diskutovány v kapitole o zónální elektroforéze. I v izotachoforéze lze využít elektroosmotického toku, ale ten se obvykle potlačuje přídavkem neionogenního tenzidu (polyethylen glykol), který se adsorbuje na stěny teflonové kapiláry.

Vyhodnocení izotachoforegramu

V izotachoforéze můžeme použít fotometrický detektor UV-VIS, pokud analyt absorbuje, běžný je ale univerzální způsob detekce měřením gradientu voltáže (resp. vodivosti nebo odporu). Záznam gradientu voltáže (G) versus čas ukazuje vodorovné úseky charakterizující jednotlivé zóny. Obdobnou informaci poskytne detektor teplotní, odporový nebo vodivostní. Vyhodnocení záznamu je pro ITP specifické, podstatně se liší od vyhodnocení chromatogramu: *výška* zóny (relativní intezita signálu 0,05-0,95 mezi leadingem =0 a terminátorem =1) určuje *kvalitu* analytu, délka zóny (v sekundách nebo milimetrech záznamu) pak kvantitu. Čím delší zóna, čím déle prochází detektorem, tím více analytu je ve vzorku. Tento fakt je důsledkem toho, že koncentrace všech zón se bez ohledu na jejich počáteční koncentraci upraví podle koncentrace vedoucího elektrolytu (toho se často využívá pro zakoncentrovávání analytů).

6.4.3. IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE

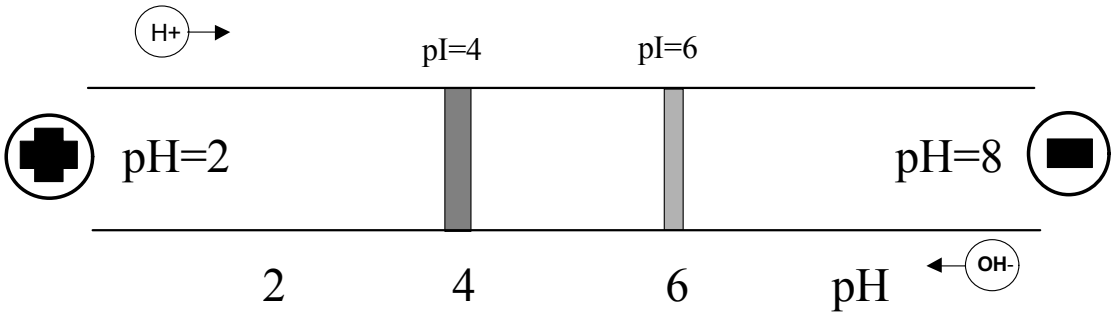
Je to metoda využívající produkty elektrodových reakcí k dosažení změn kyselosti v prostředí, ve kterém probíhá elektroforetický pohyb. Katodický děj generuje ionty OH^- a anodický H^+.

katoda: $H_2O + e^- = 1/2\ H_2 + OH^-$

anoda: $H_2O = 1/2\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^-$

Při průchodu proudu od katody proniká báze OH- a od anody kyselina H+ do roztoku základního elektrolytu-pufru. Roztok pro oblast pH 2 až 8 na obrázku by mohl obsahovat např. Na_2HPO_4 a kyselinu fenyloctovou. Po určité době pronikání H+ z jedné a OH- z druhé strany se dosáhne rovnovážného vztahu a tak vzniká gradient kyselosti (pH gradient) mezi katodou a anodou. Toto prostředí určuje chování analytu: u aminokyselin a peptidů převládá v alkalickém prostředí záporný (skupiny $-NH_2$ a $-COO^-$) a v kyselém kladný náboj ($-NH_3^+$ a -COOH). Mají tedy anodickou pohyblivost v alkalickém a katodickou v kyselém prostředí a pohybují se v elektrickém poli tak dlouho, až doputují do prostředí svého izoelektrického bodu. Jejich pohyblivost při pH izoelektrického bodu je nulová (obojaký ion se skupinami $-COO^-$ a $-NH_3^+$). Jednotlivé sloučeniny se rozdělí a zakoncentrují, každá v prostoru svého pH_{ISO} (pI).

Princip izoelektrické fokuzace



7. ELEKTROANALYTICKÉ METODY

Mezi nejdůležitější elektroanalytické metody patří:

- potenciometrie. Při prakticky nulovém proudu naměřené svorkové napětí vhodně sestaveného článku dává informaci o složení roztoku.

- elektrolýza. Napětí přivedené ze stejnosměrného zdroje na vhodné elektrody ponořené do zkoumaného roztoku vyvolá na elektrodě reakce. V elektrogravimetrii zvážíme produkt elektrodového děje. Ve voltametrii a polarografii registrovaná závislost proudu na napětí vloženém na elektrodu podává informaci o složení analyzovaného roztoku.

- konduktometrie. Měříme elektrickou vodivost analyzovaných roztoků, pouze roztoky obsahující ionty jsou vodivé (ve vodičích druhého druhu je průchod elektrického proudu podmíněn pohybem iontů).

Vedle přímé potenciometrie a konduktometrie (koncentraci analytu zjišťujeme z naměřené hodnoty pomocí kalibrační křivky) se uplatňují též potenciometrické a konduktometrické titrace, ve kterých naměřené hodnoty potenciálů nebo vodivostí slouží k indikaci bodu ekvivalence při titraci.

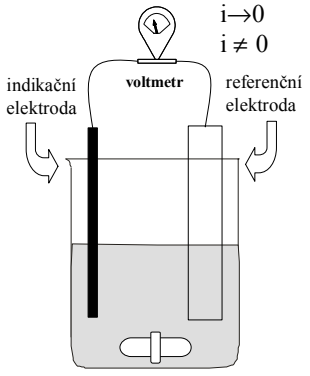
Zařadit elektroforézu mezi elektroanalytické postupy je sice možné, ale málo obvyklé.

7.1 POTENCIOMETRIE

Potenciál indikační elektrody ponořené do roztoku se mění v závislosti na aktivitě iontů analytu v roztoku. Tuto závislost vystihuje Nernstova rovnice. Chceme-li potenciometricky změřit koncentraci analytu, je třeba dodržovat konstantní iontovou sílu (konstantnost aktivitních koeficientů) v kalibračních i měřených roztocích. Protože nedovedeme změřit potenciál jedné elektrody, dáváme do roztoku ještě druhou, referenční (vztažnou) elektrodu která má neměnný, konstantní potenciál a měříme rozdíl potenciálů indikační a referenční elektrody. Jako potenciál indikační elektrody označujeme svorkové napětí článku tvořeného onou indikační elektrodou a standardní vodíkovou elektrodou. Podle konvence je potenciál standardní vodíkové elektrody nulový. Tedy nulový potenciál je jeden z potenciálů, který byl "hlasováním" označen jako nulový. **Nulový elektrodový potenciál (na rozdíl od nulové absolutní teploty, nulového proudu, nulové koncentrace) se neliší v ničem podstatném od jiných, nenulových elektrodových potenciálů.**

Pro změření svorkového napětí elektrického článku připojíme k elektrodám měřící přístroj; tím je uzavřen elektrický obvod a systémem protéká proud (nepatrný, prakticky nulový, ale protéká). Veličina kterou chceme změřit – napětí – se rozloží po odporu celého obvodu (Ohmův zákon) tvořeného elektrodami a roztokem a dráty vedoucími od elektrod k měřáku a měřákem. Měřák musí mít veliký odpor, chceme-li na něj dostat podstatnou část napětí z elektrod článku; odpor měřáku musí být tak veliký, aby odpor zbytku obvodu byl proti němu zanedbatelně malý. Protože některé elektrody (např. skleněná) mohou mít odpor řádově 10^6 Ω, užíváme potenciometry a pH metry s vnitřním odporem $>10^{10}$ Ω.

Vznik potenciálu na elektrodě: Stříbrný drátek je ponořen do roztoku obsahujícího $AgNO_3$. Elektroda z kovového stříbra obsahuje ionty Ag^+ seřazené do krystalové mřížky a volné elektrony ("elektronový plyn" volně se pohybující v kovu, tyto elektrony umožňují vedení elektrického proudu ve vodičích prvého druhu). Elektroda dává potenciálovou odezvu na aktivitu "svých" iontů (v tomto případě Ag^+) v roztoku. Ionty z fáze elektrody přecházejí do fáze roztoku a ionty z fáze roztoku přecházejí do fáze elektrody. Tato dynamická výměna iontů mezi fázemi probíhá pouze tehdy, jestli ionty přešedší do druhé fáze v této fázi mohou existovat. V diskutovaném příkladě probíhá dynamická výměna pouze iontů Ag^+. Protiion stříbrných iontů ve



Potenciometrie

fázi roztoku, anion NO_3^-, nemůže přejít do fáze elektrody, nezařadí se do krystalové mřížky kovového stříbra. Elektrony, protiionty ve fázi elektrody, přecházejí do fáze roztoku pouze pokud je v ní vhodný akceptor, redukovatelná látka. Rychlost přechodu iontů z jedné (první) fáze do druhé je přímo úměrná aktivitě iontů v první fázi. Aktivita Ag^+ v kovové elektrodě je konstantní, ve fázi roztoku může nabývat různé hodnoty. Rozdíl v rychlostech přechodu iontu Ag^+ z jedné a z druhé fáze vede k přebytku (nahromadění) kationtů na jedné straně fázového rozhraní a k nedostatku kladných nábojů na druhé straně fázového rozhraní. **Vznikne elektrická dvojvrstva a její potenciál přispěje ke srovnání rychlostí přechodů iontů z jedné i z druhé fáze, ustaví se dynamická rovnováha.** Tento potenciál měříme a dovedeme jej vypočíst s pomocí Nernstovy rovnice, ve které dosazujeme jako *n* náboj iontu, n má kladnou hodnotu u kationtů a zápornou u aniontů. Vkládáme-li tuto elektrodu do roztoků vzorku (roztoků o různé koncentraci iontů analytu), označujeme ji jako elektrodu indikační. Vkládáme-li tutéž elektrodu do roztoku o konstantní koncentraci iontů, jejichž aktivita určuje potenciál elektrody, je to elektroda s konstantním potenciálem, referenční (referentní) elektroda.

Příkladem elektrody druhého druhu je elektroda kalomelová. Vlastní elektrodou, vodičem, ze kterého odvádíme potenciál do měřáku, je rtuť. Potenciál kovové Hg se mění (elektroda dává odezvu) v závislosti na aktivitě iontů Hg_2^{2+} v roztoku při povrchu elektrody (elektroda "neví" jaké má složení roztok někde daleko od jejího povrchu), dává odezvu pouze na aktivitu iontů v roztoku v blízkosti fázového rozhraní, oné části roztoku, která se účastní dymanické rovnováhy výměny iontů).

$$E = E_{Hg}^0 + RT(nF)^{-1} \ln [Hg_2^{2+}]$$

Povrch rtuti v kalomelové elektrodě je v kontaktu s nepatrně rozpustným kalomelem. Na povrchu elektrody se vytvoří nasycený roztok chloridu rtuťného a v něm koncentrace určuje součin rozpustnosti:

$$S_{Hg2Cl2} = [Hg_2^{2+}][Cl^-]^2$$

Dosazením ze součinu rozpustnosti do Nernstovy rovnice dostaneme výraz charakterizující odezvu kalomelové elektrody na aktivitu chloridových iontů:

$$E = E_{kal}^0 - RT\, F^{-1} \ln[Cl^-] \qquad (n = -1)$$

Kalomelovou elektrodu (Hg_2Cl_2 na povrchu Hg) můžeme použít pro měření aktivity iontů Hg_2^{2+}, Hg^{2+} (Hg^{2+} zreaguje na povrchu elektrody s Hg na Hg_2^{2+}) a Cl^-. Nejčastější použití kalomelové elektrody je ve funkci referenční elektrody, v tom případě je ponořena do roztoku o konstantní koncentraci chloridu, je-li to nasycený KCl mluvíme o nasycené kalomelové elektrodě (Saturated Calomel Electrode, SCE). Referenční kalomelová elektroda není pouhou elektrodou, je to elektroda plus roztok, správně bychom měli mluvit o **poločlánku s kalomelovou elektrodou**.

Chloridostříbrná elektroda druhého druhu je tvořena stříbrným drátkem potaženým (obvykle elektrolyticky) chloridem stříbrným. Dává odezvu na ionty Ag^+ a Cl^- a je ji možno použít jako elektrodu vztažnou za podmínek podobných jako u elektrody kalomelové.

Skleněná elektroda běžně používaná k měření pH roztoku je příkladem elektrody membránové. Po loužení v roztoku zředěné HCl je na povrchu speciálního skla vrstvička hydratované kyseliny křemičité. Dynamická výměna vodíkových iontů mezi touto vrstvičkou na povrchu skla a roztokem vede k ustavení potenciálu. Skleněná elektroda má tvar baňky, uvnitř je vnitřní referenční elektroda a roztok pufru. Na vnitřní stěně baňky (membrány) se ustaví konstantní hodnota potenciálu (výměnou H^+ mezi vrstvičkou na vnitřním povrchu skleněné baňky a roztokem pufru o konstantním pH uvnitř baňky). Potenciál na vnější stěně baňky se mění s aciditou roztoků vzorků, jejichž pH měříme. Na měřák přivádíme napětí z vnitřní (uvnitř baňky) a vnější referenční elektrody (také ponořené do měřeného roztoku) . Toto napětí je dáno součtem 5 potenciálů: E1(vnitřní referenční elektrody) + E2(na vnitřním povrchu baňky) + E3(na vnějším povrchu baňky) + E4(kapalinového rozhraní mezi měřeným roztokem a roztokem uvnitř vnější SCE) + E5(vnější SCE té, která je ponořena do měřeného roztoku). E5(vnějšího povrchu) záleží na pH měřeného roztoku, všechny ostatní potenciály jsou konstantní, lze je zahrnout do konstanty E^0 - viz další odstavec o nedokonalé konstantnosti E(kapalinového rozhraní). Pro potenciál skleněné elektrody tedy platí Nerstova rovnice:

$E = E^0 + RT\,F^{-1}\ln[H^+]$ ($n = +1$)

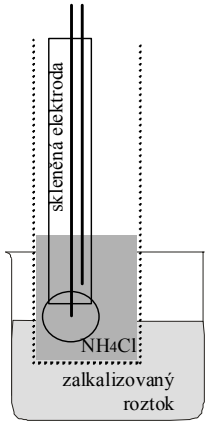
Vzhledem k tomu, že struktura hydratované kyseliny křemičité na různých skleněných elektrodách není tak dokonale stejná a neproměnná jako např. krystalová mřížka stříbra v různých stříbrných drátcích, nemají všechny skleněné elektrody totožnou hodnotu veličiny E^0. Proto před každým měřením (každou serií měření) pH nastavujeme (kalibrujeme pH metr) pomocí pufru o známém pH. Změna acidity roztoku o 0,1 jednotky pH vyvolá změnu potenciálu skleněné elektrody o 6 mV (čili směrnice fungující sklenění elektrody je 59 mV/1 pH).

Potenciál kapalinového rozhraní se ustavuje v oblasti kontaktu dvou různých roztoků elektrolytů, pokud jejich kationty a anionty nemají stejnou pohyblivost. Např. přes rozhraní roztoků 0,1M HCl a 0,1M NaCl difundují ionty chloridů stejnou rychlostí z obou stran: mají stejnou pohyblivost a na obou stranách jsou jejich koncentrace stejné. Ionty Na^+ na jedné straně a ionty H^+ na straně druhé mají sice stejné koncentrace, ale ionty H^+ mají větší pohyblivost než ionty Na^+, proto H^+ pronikají rychleji do zóny NaCl než sodné ionty do zóny HCl. Na rozhraní se vytvoří nadbytek kationtů na straně NaCl a nedostatek kationtů na straně HCl, vytvoří se elektrická dvojvrstva a její potenciál způsobí vyrovnání rychlostí přechodu iontů rozhraním. S hodnotami kapalinového potenciálu značně většími než 1 mV se setkáváme v roztocích s koncentrací $>10^{-3}$M těch iontů, na které disociuje rozpouštědlo, ve vodě jsou to H^+ a OH^- ionty a acidity pH<3 a pH>11.

Potenciál kapalinového rozhraní na kontaktu určitého roztoku se zředěným roztokem KCl je větší než na rozhraní stejného roztoku s koncentrovaným KCl. V kalomelových elektrodách používáme roztok KCl (pohyblivosti obou iontů mají nepatrně odlišnou absolutní hodnotu) a nikoli NaCl, ve kterém je značný rozdíl mezi pohyblivostmi kationtu a aniontu.

Membránová chloridostříbrná elektroda. Mebrána z polovodiče AgCl (monokrystal anebo sraženina AgCl spojená pojivem, např. polyvinylchloridem, zrnka AgCl se navzájem dotýkají a tak umožňují průchod elektrického proudu) odděluje vnější roztok vzorku od roztoku uvnitř elektrody s konstantní koncentrací Ag^+. Ustavení potenciálu je na stejném principu jako u skleněné elektrody. Membránová AgCl dává stejně jako chloridostříbrná elektroda druhého druhu (Ag+AgCl) odezvu na ionty stříbrné a chloridové. Při měření membránovou elektrodou neruší kyseliny a oxidovadla, jejichž působením se rozpouští kovové stříbro v elektrodě druhého druhu. U obou elektrod ruší látky které vyredukují kov z AgCl a komplexotvorná činidla rozpouštějící AgCl, obecně řečeno ruší látky reagující s Ag^+ nebo s Cl^-.

V kapalinové elektrodě na dusičnany mebrána, tvořená roztokem dusičnanu krystalové violeti ionizovaného v polárním rozpouštědle nitrobenzenu, odděluje vodný roztok vzorku od vnitřního vodného roztoku s konstantní koncentrací dusičnanu. Rozdíl potenciálů na obou stranách membrány se odvádí na měřák pomocí 2 referenčních elektrod (vnější a vnitřní), tak jako je to při měření se všemi membránovými elektrodami. Nitrobenzenový roztok může být fixován v polymeru (např. v polyvinylchloridu) analogicky jako změkčovadlo anebo umístěn ve vhodně uzpůsobené nádobce. Tato elektroda je iontově selektivní elektroda (Ion Selective Electrode, ISE), dává odezvu nejen na ionty NO_3^- ale i na jiné málo hydrofilní anionty jako SCN^-, ClO_4^-, $C_6H_5COO^-$... Tyto hydrofobní anionty z vodného roztoku se vyměňují s dusičnanovými ionty z organického roztoku, výměna až do ustavení rovnováhy probíhá pomalu a jejím důsledkem je potenciálový drift (časová změna potenciálu elektrody).



Plynová elektroda na NH_3

Plynová elektroda na amoniak. Skleněná elektroda je v kontaktu s roztokem chloridu amonného, ten je oddělen membránou od roztoku vzorku zalkalizovaného přídavkem NaOH, který zabraňuje protonizaci amoniaku. Membrána (např. z polyethylenu) je propustná pouze pro plyny, v tomto případě čpavek, nikoli pro ionty. Přes membránu pronikající NH_3 vytvoří v roztoku s NH_4Cl pufr, jehož pH změříme podle reakce: $NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$. Má-li elektroda reagovat brzy po ponoření do vzorku, musí vrstva roztoku NH_4Cl mezi polyethylenovou membránou a skleněnou membránou být velmi tenká. Na podobném principu fungují elektrody na plyny kyselého

anebo zásaditého charakteru (SO_2, CO_2, ...).

Přehled použití některých indikačních elektrod

Elektroda	dává odezvu na	použití
Ag kov	Ag^+	argentometrická titrace
chloridostříbrná	Ag^+, Cl^-	argentometrická titrace
skleněná	H^+	měření pH i titrace
vodíková	H^+	málo používaná
Pt nebo grafit	redoxní potenciál	redoxní titrace
LaF_3 membrána	F^-, (La^{3+})	chelatometrická titrace

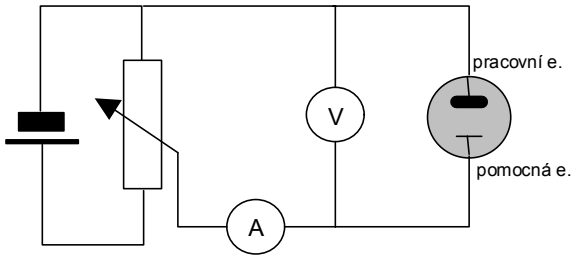
7.2 ELEKTROLYTICKÉ METODY

Elektrolýza

Elektrolýza je působení elektrického proudu na roztok elektrolytu, při němž dochází ke změnám složení systému elektroda1-elektrolyt-elektroda2, protože na elektrodách probíhají elektrodové reakce. Do roztoku obvykle přidáváme základní elektrolyt, aby roztok byl dosti vodivý. Při použití stejnosměrného proudu (ten používáme nejčastěji) se u elektrody hromadí produkty elektrodového děje a mění se složení roztoku v okolí elektrody (kdybychom použili střídavý proud, produkty elektrodové oxidace z jednoho časového úseku se redukují na téže elektrodě v následujícím časovém úseku a složení roztoku by se výrazně neměnilo). Elektrodových reakcí se mohou zúčastnit: rozpouštědlo, látky v něm rozpuštěné a materiál elektrody. Elektrolytické metody se používají nejčastěji pro stanovení na bázi redukce kationtů těžkých kovů (z nich se snadněji stanovují ty ušlechtilejší), ale i pro redukce nebo oxidace anorganických nebo organických látek. Na katodě se nejprve redukuje ta z přítomných redukovatelných látek, které přísluší v daném prostředí nejméně negativní podmíněný redoxní potenciál $E^{0/}$ (pozor, nikoli standardní potenciál E^0).

Elektroda "se snaží", aby její potenciál byl rovnovážným potenciálem odpovídajícím aktivitám redukované a konjugované oxidované složky redoxního systému v roztoku u elektrody, tento rovnovážný potenciál známe z Nernstovy rovnice. Pokud potenciál elektrody není v rovnováze se složením roztoku, probíhá elektrodový děj a to tak dlouho, až je rovnováhy dosaženo. Má-li tedy probíhat redukce na katodě, musí být potenciál katody negativnější než rovnovážný potenciál roztoku v okolí elektrody. Čím větší je rozdíl mezi potenciálem elektrody a rovnovážným potenciálem, tím větší je protékající proud, který "se snaží" rozdíl potenciálů (skutečného a rovnovážného) odstranit. Velikost proudu je omezena počtem částic v okolí elektrody, které se mohou zúčastnit elektrodové reakce za jednotkový čas. Tyto částice jsou do blízkosti elektrody transportovány difúzí, konvekcí (mícháním) a migrací iontů v elektrickém poli. Pokud katodě vnutíme větší proud než jaký stačí zajistit transport redukovatelné látky s nejméně negativním $E^{0/}$, zvýší se potenciál katody a do elektrodového děje se zapojí i látka, jíž přísluší druhý nejméně negativní $E^{0/}$. Zvětšováním negativního potenciálu vloženého na katodu anebo zvětšováním vnuceného proudu protékajícího katodou dosáhneme postupně redukce všech přítomných redukce schopných látek.

Schéma elektrogravimetrie

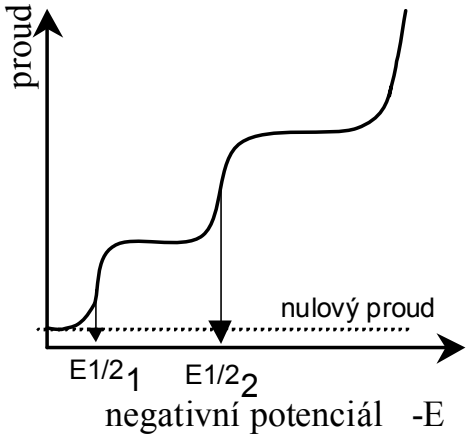


Elektrogravimetrie

Analyt kvantitativně vyloučíme na platinové elektrodě (konec elektrolýzy ověříme negativní kvalitativní reakcí s kapkou roztoku), přírůstek hmotnosti elektrody představuje hmotnost analytu. Nejčastěji se vylučují kovy na katodě, ušlechtilé kovy (Ag, Cu, Hg, ...) z kyselých roztoků. Méně ušlechtilé kovy jako Zn, Ni, Co, Mn pro své vyloučení potřebují negativnější potenciál než redukce H^+ v kyselém prostředí, ty vylučujeme z alkalického komplexujícího roztoku (NH_3, vínan, citran ...). Stříbrnou elektrodu můžeme anodicky povléci halogenidem stříbra, vyžaduje to nastavení dostatečně pozitivního potenciálu, aby se rozpouštělo stříbro jako Ag^+ nutné pro vznik AgX. Avšak potenciál nesmí být příliš pozitivní, aby po skončeném vylučování AgX do roztoku přešlo jen zanedbatelně malé množství iontů Ag^+. Na anodě se mohou vylučovat také některé oxidy kovů ve vyšším mocenství (MnO_2, PbO_2, ...). Selektivní elektrolýzu provádíme při konstantním napětí, ale pracovat můžeme také neselektivně při konstantním (vnuceném) proudu přiváděném na elektrody, pak se redukují postupně všechny redukce schopné látky v roztoku.

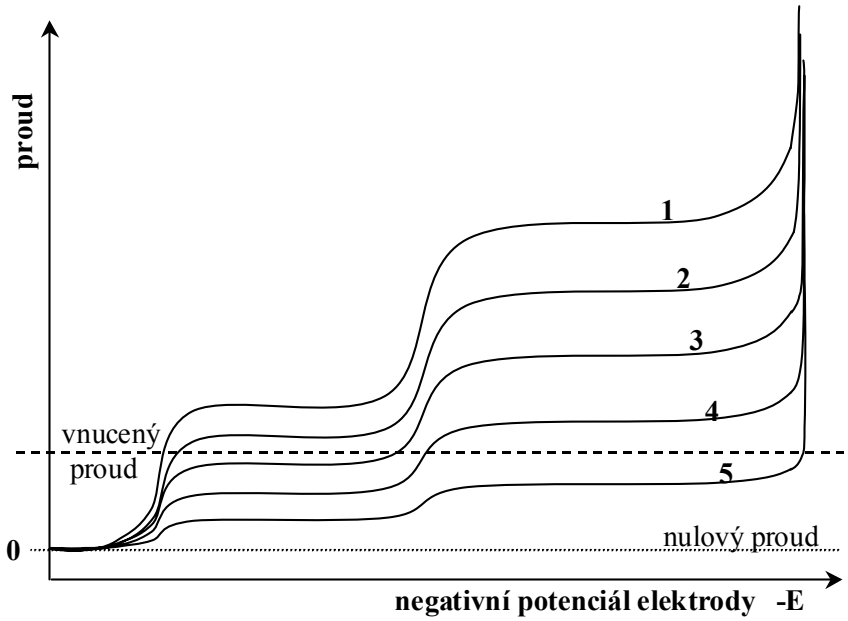
Polarizační křivka

Vedle katody je v roztoku i druhá elektroda anoda a na ní probíhají anodické oxidace. Kolik elektronů předá katoda do roztoku, tolik jich od částic z roztoku ve stejném čase převezme anoda. Na anodě se nejprve oxiduje látka s nejméně pozitivním redoxním potenciálem. Pokud to vyžaduje vnucený proud anebo je-li potenciál anody dostatečně pozitivní, oxidují se i látky, jejichž redoxní potenciály $E^{0/}$ jsou více kladné. Redoxní potenciál charakterizuje systém oxidovadlo + redukovadlo, správně bychom měli říci, že se redukuje látka, která je složkou redoxního systému s nejméně negativním $E^{0/}$. Polarizační křivka je závislost proudu na potenciálu elektrody za daných experimentálních podmínek. Mezi tyto podmínky patří: materiál a tvar elektrody, složení a míchání roztoku. Nejznámějším typem polarizační křivky je polarogram (viz obrázek).



Kvalitu analytu indikuje půlvlnový potenciál $E_{1/2}$, tj. potenciál, při kterém dosáhl proud pro určitou elektrodovou reakci poloviny své maximální hodnoty (inflexní bod esovité křivky). Půlvlnový potenciál je podmíněná konstanta (ovlivnění tvorbou komplexů, disociací kyselin ...), pro jednu a touž látku nabývá různých hodnot v různých prostředích. Např. půlvlnový potenciál pro redukci Fe^{3+} je totožný s podmíněným redoxním potenciálem $E^{o/}$ pro systém Fe(III)/Fe(II) ve stejném prostředí: při tomto potenciálu polovina přítomného Fe(III) se zredukovala na Fe(II), je tedy rovnost koncentrací $c_{Fe(III)}$ a $c_{Fe(II)}$ v těsné blízkosti polarizovatelné elektrody. Hodnoty půlvlnových potenciálů pro redukci nebo oxidaci anorganických i organických elektroaktivních látek (depolarizátorů) v různých prostředích a na různých polarizovatelných elektrodách najdeme v elektrochemických (polarografických) tabulkách. Z polarizační křivky lze např. odečíst podmínky pro elektrolýzu (elektrogravimetrii): protože selektivní elektrolýza probíhá při konstantním potenciálu elektrody, volíme jej z polarizační křivky tam, kde proud ukazuje, že probíhá elektrodová reakce, a kde při dalším zvětšení potenciálu tento proud už nevzrůstá (v začátku vodorovného úseku polarizační křivky).

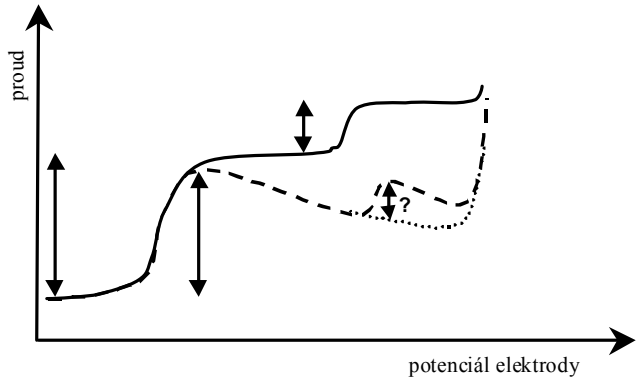
Kdybychom nasnímali polarizační křivky roztoku dvou kovových kationtů v průběhu elektrolytického vylučování při konstantním (vnuceném) proudu, dostali bychom následující obrázek:



Monitorování průběh elektrolýzy. Polarizační křivky i(E) snímané v při vnuceném proudu (např. redukce Cu^{2+} a Cd^{2+} z vodného prostředí kyseliny octové). Vlna při nejméně negativním potenciálu ukazuje redukci látky s nejméně negativním $E^{0/}$ (Cu^{2+}), další vlna přísluší látce s více negativním redox potenciálem (Cd^{2+}) a vzestup proudu při nejvíce negativním potenciálu indikuje redukci složky základního elektrolytu anebo rozpouštědla (v tomto případě H^{+}). Čísla křivek udávají čas registrace křivky, 1 je počátek, 5 konec elektrolýzy. V intervalu mezi 1 a 2 se vylučuje pouze Cu, mezi 2 a 3 pokračuje vylučování Cu a začíná se vylučovat i Cd, mezi 3 a 4 se redukuje Cd^{2+} a zbytek Cu^{2+}. V čase 5 je skoro všechna Cu a velká část Cd vyloučena, na elektrodě se redukují ionty H^{+}. Potenciál elektrody pro určitý čas, který odečteme z těchto polarizačních křivek, je souřadnicí průsečíku přímky vnuceného proudu s polarizační křivkou.

Chceme-li získat informace o ději na jedné elektrodě, tzn. informace nerušené ději na elektrodě druhé, použijeme jako druhou elektrodu referenční, např. kalomelovou. Je-li SCE zapojena jako anoda, probíhá oxidace kovové ruti na ionty Hg_2^{2+} a tyto zreagují s nadbytkem přítomných chloridů na sraženinu kalomele. Při zapojení SCE jako katoda se redukují ionty Hg_2^{2+} (na kovovu rtuť) a jejich úbytek je nahrazen rozpouštěním sraženiny kalomele. Při obou způsobech zapojení aktivita Hg_2^{2+} v roztoku a tedy i potenciál SCE zůstávají beze změny. Konstantnost potenciálu je tím dokonalejší, čím menší je proudová hustota (A/cm^2) na povrchu kovové rtuti (je to dáno omezenou rychlostí srážení a rozpouštění kalomele). Obecně platí: čím menší je proudová hustota na povrchu elektrody, tedy čím větší je plocha kontaktu elektrody s roztokem, tím obtížněji se navodí změna jejího potenciálu.

Voltamperometrie (=voltametrie) a polarografie. Měříme závislost proudu na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu (=registrujeme polarizační křivku). Polarizovatelná elektroda o malém povrchu nabývá různých hodnot potenciálu tak, jak přivádíme napětí z externího zdroje (postupně s časem vzrůstající potenciál). Termín polarografie se používá je-li polarizovatelná elektroda rtuťová s obnovovaným povrchem (kapající), o voltametrii mluvíme při použití elektrody jiné (Pt, C, neodkapávající Hg). Pomocnou, nepolarizovatelnou elektrodou bývá velkoplošná elektroda referenční. V elektrolyzovaném roztoku je základní elektrolyt v koncentraci aspoň 100krát větší než depolarizátory (elektroaktivní analyty). Při sledování redukčních dějů odstraňujeme z roztoku kyslík. V polarografii a voltametrii se zúčastní elektrodové reakce obvykle **méně než 1% přítomného analytu**, to je rozdíl od dříve uvedených metod. V elektrogravimetrii a coulometrii je třeba, aby zreagoval veškerý analyt.



*Polarizační křivky dvou elektroaktivních látek registrované za míchání (___) a bez míchání (- - - -). Táž polarizační křivka bez míchání za nepřítomnosti druhého analytu (.....). Svislé úsečky představují velikost proudu (= výšku vlny), symbol **?** ukazuje na neurčitost od jaké hladiny měřit výšku druhé vlny (a dalších vln) v nemíchaném prostředí.*

Jak bylo řečeno, množství (kvantitu) analytu určuje velikost proudu označovaná jako výška vlny, běžně ji uvádíme v milimetrech tak, jak jsme ji změřili na záznamu polarizační křivky (v polarografii na polarogramu). Výška vlny je přímo úměrná koncentraci analytu. Voltametrické vlny, části polarizační křivky, ve kterých se vzrůstem potenciálu se zvětšuje proud (tvar připomíná spíše schod nežli vlnu), pro jednotlivé elektrodové reakce bývají odděleny vodorovnými úseky (úseky limitního proudu) na polarizační křivce pokud pracujeme v prostředí míchaneném anebo úseky s malým, nelineárním poklesem proudu v nemíchaných roztocích. Velikost registrovaného proudu je limitována velikostí náboje, který za jednotku času si předají polarizovatelná elektroda a částice v roztoku. Stejně veliký náboj za čas je vyměňován i na velkoplošné nepolarizovatelné elektrodě, ale ta je konstruována tak, aby mohla zprostředkovat i mnohem větší protékající proud. Výška vlny je dána počtem částic depolarizátoru (=analytu), který doputuje k elektrodě za jednotku času a počtem elektronů, které každá částice vymění s elektrodou. V nemíchaném roztoku se postupně spotřebovává depolarizátor z okolí elektrody a další je přiváděn difúzí z postupně vzdálenějších a vzdálenějších míst, přísun se zpomaluje a výška vlny se zmenšuje s časem (viz obrázek). V konstantně míchaném roztoku má výška vlny konstantní hodnotu, při nedokonale konstantním míchání výška vlny kolísá. Konstantní míchání dosáhneme na poměrně složitém zařízení s rotující pevnou elektrodou. Při posuzování v delších časových úsecích (nikoli okamžitého proudu) konstantní míchání zaručí i kapající ruť v jinak nemíchaném roztoku.

Ve voltametrii měříme proud, který je součtem proudu faradayického (je zprostředkován elektrodovými ději, vypovídá o složení roztoku) a nabíjecího (=kapacitního, elektroda představuje kondenzátor, který je třeba nabít na potenciál elektrody, tento proud informuje o stavu elektrody). Kapacitní proud je při koncentracích depolaritátoru $>10^{-4}$ mol/l obvykle dostatečně malý oproti faradayickému. Pro stanovení menší koncentrace depolarizátorů kapacitní proud ruší, pro koncentrace až do10^{-8} mol/l použijeme *stripovací voltametrii* (část analytu zachytíme, nahromadíme na elektrodě sorpcí anebo elektrolýzou a potom ji stanovíme voltametricky) anebo *diferenční pulzní voltametrií* (na elektrodu vkládáme časově krátké napěťové pulzy a měříme proud pouze v určitých časových úsecích, ve kterých je kapacitní složka proudu minimální).

Závislost potenciálu pro vylučování vodíku na aciditě roztoku.

Uvažujme rovnovážný potenciál elektrody, který vyžaduje, aby poměr aktivit oxidované a redukované formy (H^+ a H_2) byl 1:1. V kyselém roztoku, např. pH=1, to vyžaduje vyredukovat značné množství plynného vodíku; ten ve formě bublinek těká z roztoku od elektrody a tak pro dosažení rovnováhy je třeba vyvíjet další a další vodík. V alkalickém prostředí (např. pH=9, v amoniakálním pufru) je aktivita H^+ velmi malá a když redukcí se vytvoří rovnovážná aktivita H_2 pro stejný potenciál elektrody jako v předchozím případě, stačí k tomu nepatrný, sotva pozorovatelný proud. Vývoj vodíku při pH=9 bude znatelný až při mnohem negativnějším potenciálu, až při takovém, které odpovídá rovnováze při poměru $[H^+]^2/[H_2]<<1$.

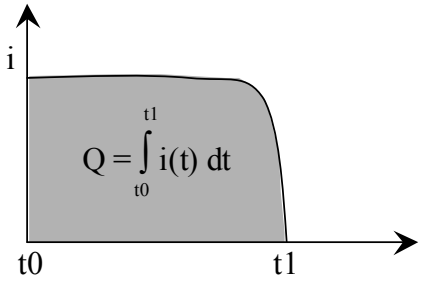
$$E = E^0 + \frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{[H^+]^2}{[H_2]}\right)$$

V roztoku o pH=1 jsou kationty vodíku vázány do málo stabilního (málo pevného) aquakomplexu, v amoniakálním tlumiči o pH=9 jsou mnohem pevněji vázány buď v iontech NH_4^+ a také v molekulách vody. Při elektroredukci je třeba dodat energii na vlastní redukci a také na rozrušení vazby mezi redukovanou částicí a ligandy. Obecně platí: čím pevněji je nějaká látka vázána (např. ion kovu do komplexu, ion vodíku ve slabé kyselině) tím negativnější je potenciál potřebný pro její redukci anebo tím pozitivnější je potenciál pro její oxidaci (porovnej s kapitolou o redoxních reakcích). Proto elektrolýzou v kyselém roztoku se vylučuje vodík při mnohem méně negativním potenciálu než elektrolýzou z prostředí alkalického.

Redukce H^+ na H_2 vyžaduje dodání energie. Energie je dána součinem napětí (U), konstantního proudu (i) a času (t), součin času a konstantního proudu je náboj (Q) (mění-li se velikost proudu v čase, pak integrálu $\int$ i.dt) .

$$\text{Energie} = U.i.t = U.Q$$

Energie dodaná při elektrolýze je součinem potenciálu elektrody (E) a prošlého náboje (Q). Z Faradayových zákonů vyplývá, že potřebujeme stejně veliký náboj pro redukci stejných množství snadno (stačí dodat malou energii) redukovatelných kationtů Ag^+ a mnohem obtížněji redukovatelných Na^+. Rozdíl v potřebné energii se projeví v rozdílu potenciálů potřebných pro tyto redukce. Stříbro vyredukujeme při mnohem méně negativním potenciálu než sodík.



Přímá coulometrie. Pečlivým prozkoumáním průběhu elektrodové reakce zjistíme takové podmínky, za kterých probíhá na elektrodě jedna jediná reakce, oxidace nebo redukce analytu. Elektrodová reakce proběhne kvatitativně při potenciostatem řízeném konstantním potenciálu pracovní elektrody, coulometrem změříme prošlý náboj (Q = integrál proudu dle času) a množství analytu vypočteme pomocí Faradayových zákonů;

$n = Q / z F$

n je látkové množství analytu, *F* je mol elektronů (přibližně 10^5 Coulombů, přesně 96485,3 C) a *z* je počet molů elektronů přijatých od elektrody anebo předaných elektrodě jedním molem analytu.

Konec stanovení indikuje pokles proudu na nulovou hodnotu. Pro ionty propustným (omezeně propustným) přehrazením je třeba oddělit prostor pracovní elektrody (na ní probíhá reakce analytu) od prostoru druhé, pomocné elektrody (tamní produkty by mohly také reagovat na pracovní elektrodě). Při redukcích na pracovní elektrodě je třeba odstranit z roztoku kyslík, jinak by se redukoval zároveň s analytem.

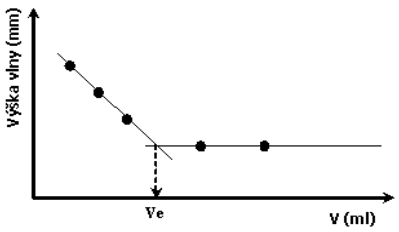
Jodometrické stanovení kyseliny arsenité je příkladem coulometrické titrace. Do roztoku kyseliny arsenité (analytu) přidáme nadbytek jodidu (např. KI) a oxidujeme na anodě při konstantním proudu. Na elektrodě se oxidují As(III) na As(V) a jodid na jod. Roztok je míchán, elektrogenerované titrační činidlo jód je transportováno dále od elektrody a tam reaguje s As(III).

$$H_3AsO_3 + I_2 + H_2O = H_3AsO_4 + 2\ HI$$

Po zoxidování veškerého As(III) první nadbytek jódu v roztoku indikuje konec titrace (indikujeme vizuálně se škrobovým mazem, potenciometricky, ...). Velikost prošlého náboje dostaneme vynásobením hodnoty konstantního proudu časem. Stejně jako v přímé coulometrii oddělujeme od sebe prostory obou elektrod. Kyslík odstraňujeme pouze tehdy, je-li pracovní elektroda elektrodou redukující.

Poznámka: v termínech fotometrická titrace, potenciometrická titrace, konduktometrická titrace, ... přídavné jméno vypovídá o způsobu určení ekvivalence. Při těchto titracích dávkujeme odměrný roztok obvyklým způsobem z byrety. Pouze v termínu coulometrická titrace přídavné jméno upozorňuje, že místo byretou odměřujeme coulometrem, takže toto přídavné jméno nedává žádnou informaci o tom, jak poznáme dosažení ekvivalence.

Amperometrická titrace. Roztok měďnaté soli bychom mohli titrovat činidlem EDTA tak, že po každém přídavku činidla bychom zaregistrovali voltametrickou polarizační křivku a změřili výšku vlny redukce iontů Cu^{2+}. Závislost této výšky vlny (h) na přidaném objemu titračního činidla (v) má lineární sestupný průběh, pro ekvivalenci platí h=0 a h=0 platí též při přetitrování (=za ekvivalencí). Pro určení ekvivalence není třeba registrovat celou polarizační křivku, stačí měřit proud při konstantním potenciálu polarizovatelné elektrody (za podmínek obvyklých ve voltametrii). Z lineární závislosti h=f(v) určíme bod ekvivalence. Potenciál, při kterém měříme proud pro amperometrické titrace volíme na konci voltametrické vlny, tam, kde další zvyšování potenciálu elektrody už nevyvolá růst proudu (tam, kde vlna přechází ve vodorovný lineární úsek limitního proudu). Že při titraci roztok mícháme, snad ani není nutné zdůrazňovat. Amperometrická titrační křivka h=f(v) od počátku do ekvivalence má lineární průběh, proto stačí změřit 2 body (pro kontrolu se doporučuje změřit ještě i třetí bod) a z nich určit ekvivalenci. Výhodou amperometrické indikace při titracích je linearita titrační křivky a skutečnost, že můžeme použít velmi zředěné roztoky (10^{-3}, někdy až 10^{-4}mol/l) odměrného činidla i analytu.



7.3 KONDUKTOMETRIE

Měření vodivosti roztoků je selektivní v tom smyslu, že detekuje ionty za přítomnosti velkého nadbytku elektroneutrálních molekul. Vodivost (1/R, převrácená hodnota odporu, jednotka Siemens je rovna Ohm^{-1}) představuje součet vodivostních příspěvků všech iontů přítomných v roztoku. Vodivost je veličina neselektivní, protože (na rozdíl od potenciometrie) nerozlišuje mezi jednotlivými druhy iontů. Pro měření vodivosti vkládáme do roztoku 2 elektrody z inertního materiálu (Pt, mohl by to být i grafit) a na ně přivádíme střídavý proud (optimální frekvence je 10^3 až 10^4 s^{-1}). Chceme-li porovnávat naměřené hodnoty vodivosti různých roztoků, pracujeme při konstantní teplotě a používáme elektrody se stejným povrchem (pozor na povlečení elektrody sraženinou při srážecích reakcích), o stejné velikosti, konstantní vzdálenosti jak mezi elektrodami tak od okrajů roztoku (co možná nejdále od hladiny, stěn a dna nádobky, mluvíme o konstantní geometrii polohy elektrod v roztoku). Vodivost měříme ve speciálních vodivostních nádobkách, ve kterých jsou pevně zabudovány elektrody. Naměřenou vodivost určitého roztoku můžeme vynásobit konstantou nádobky a dostaneme měrnou vodivost toho roztoku. Konstantu nádobky stanovíme tak, že v ní změříme roztok o známé (v tabulkách uvedené) vodivosti. Míchání nemá vliv na velikost vodivostního signálu.

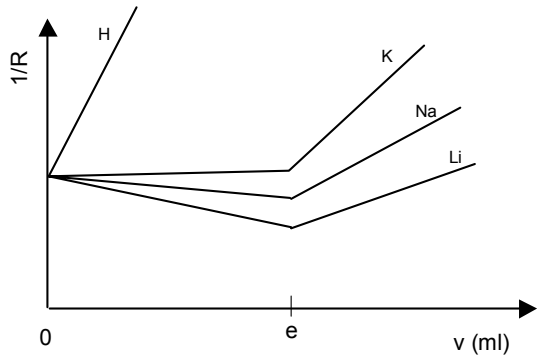
Přímá konduktometrie. Určení koncentrace pomocí kalibrační křivky 1/R=f(c) má velmi omezené použití, lze ji použít pouze pro roztoky obsahující jedinou sůl (viz neselektivnost konduktometrie). V praxi se uplatní pouze při kontrole odsolení vodných roztoků (např. v cukrovarnické výrobě nebo odsolvání mořské vody, kontrola kvality destilované vody).

Konduktometrická titrace určuje bod ekvivalence podle polohy průsečíku 2 lineárních (většinou lineárních) úseků titrační křivky 1/R=f(v). Velikost vodivosti roztoku určují: koncentrace iontů, jejich náboj a jejich pohyblivost (=mobilita: čím je větší, tím je větší i vodivost roztoku). Při titraci roztoku $AgNO_3$ roztoky HCl, KCl, NaCl nebo LiCl mají všechny přítomné ionty jednotkový náboj, anionty mají prakticky stejnou mobilitu a pro pohyblivost kationtů (M) platí $H^+ >> Ag^+ = K^+ > Na^+ > Li^+$.

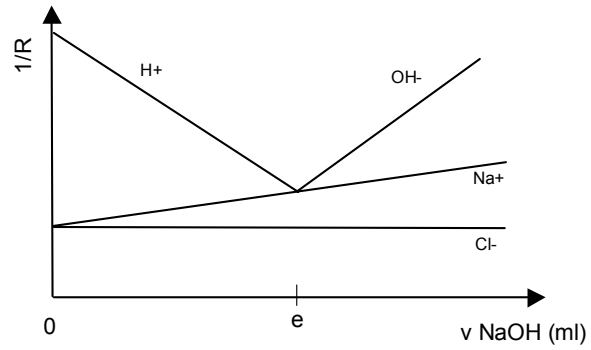
$$AgNO_3 + MCl = AgCl\downarrow + MNO_3$$

$$Ag^+ + NO_3^- + M^+ + Cl^- = AgCl\downarrow + M^+ + NO_3^-$$

V roztoku na počátku přítomné ionty Ag^+ postupně nahrazujeme stejným počtem iontů M^+ při titraci před ekvivalenčním bodem. Celková koncentrace všech iontů v roztoku zůstává beze změny (to platí pouze přibližně, ve skutečnosti dochází ke zředění titrovaného roztoku přídavkem roztoku titračního činidla). Vysrážený AgCl (pevná fáze) nemá vliv na vodivost roztoku. Změny vodivosti před dosažením ekvivalence jsou způsobeny rozdílem mobilit iontů Ag^+ a M^+. Anomálně vysoká pohyblivost vodíkových iontů způsobuje, že při titraci s HCl vodivost hned od počátku se tak prudce zvětšuje, že se nám těžko podaří postřehnout bod ekvivalence. Mobility Ag^+ a K^+ jsou nepatrně odlišné a proto vodivost před dosažením ekvivalence zůstává beze změny. Ionty Na^+ mají menší a Li^+ ještě menší pohyblivost než Ag^+, před ekvivalencí titrační křivka s NaCl klesá pozvolněji než ta s LiCl. Přídavek činidla za bodem ekvivalence zvětšuje množství iontů v roztoku a to vede ke zvýšení vodivosti. Pro vodivost roztoků těchto titračních činidel platí HCl>>KCl>NaCl>LiCl a proto za ekvivalencí směrnice titrační křivky s HCl má největší hodnotu a ta s LiCl hodnotu nejmenší - viz obrázek. Tyto titrační křivky s použitím různých titračních činidel mají odlišný průběh při použití neselektivní konduktometrické indikace (odezva na sumu všech přítomných iontů). Křivky stejných titrací se selektivní potenciometrickou indikací (odezva pouze na Ag^+ a Cl^-) jsou identické bez ohledu na kation v použitém odměrném roztoku.



Titrační křivky 1/R=f(v) při titraci roztoku $AgNO_3$ roztoky HCl (symbol H), KCl (K), NaCl (Na) a LiCl (Li) o stejné koncentraci. Bod ekvivalence je označen e.



Konduktometrická titrace roztoku HCl odměrným roztokem NaOH, ekvivalenční bod je označen e. Přímky se symboly Cl-, Na+ charakterizují velikost příspěvků jednotlivých iontů k celkové vodivosti roztoku.

Na dalším obrázku je konduktometrická křivka titrace silné kyseliny roztokem silné báze. Vodivost před ekvivalencí výrazně klesá, velmi pohyblivý ion H^+ je nahrazován méně pohyblivým Na^+. Za ekvivalencí se vodivost výrazně zvětšuje; to proto, že se jednak zvětšuje celkové množství iontů přítomných v roztoku a také proto, že se přidává roztok obsahující velmi pohyblivé ionty OH^-. Obrázek ukazuje příspěvek vodivosti jednotlivých iontů během titrace. Ionty Cl^- se vůbec neúčastní reakce, jejich vodivostní příspěvek se nemění (za předpokladu, že nedochází ke výraznému zvětšení objemu roztoku během titrace). Lineárně s přídavkem titračního činidla přibývá koncentrace iontů Na^+, jejich vodivostní příspěvek je na počátku nulový (nejsou tam) a potom lineárně vzrůstá. Ionty OH^- před ekvivalencí váží H^+ na vodu, zmenšuje se koncentrace H^+ a také jejich vodivostní příspěvek. Za ekvivalencí ionty OH^- už nemají s čím reagovat a vodivostní příspěvek přidávaného hydroxidu lineárně vzrůstá.

Korekce na objemové změny v průběhu titrace. Přídavkem odměrného roztoku dochází ke zvětšování objemu titrovaného roztoku, pokud je toto zvětšení malé (řekněme do 10%) můžeme je zanedbat (zahrnout do akceptovatelné chyby stanovení). Při větším objemovém nárustu konduktometrické titrační křivky přestanou mít lineární průběh před a za ekvivalencí. Linearizaci těchto křivek dosáhneme korekcí na počáteční objem (V_0). Je-li koncentrace c při objemu V_0+v, odpovídá jí korigovaná koncentrace c_{kor} při objemu V_0. Máme lineární závislost naměřené vodivosti (1/R) na koncentraci a proto platí stejný vztah pro korekci z naměřené vodivosti (1/R) na vodivost korigovanou ($1/R_{kor}$), byla korigována na původní objem (V_0).

$$c\,(V_0+v) = c_{kor}V_0 \qquad c_{kor} = c\,(V_0+v) / V_0$$

$$(V_0+v) / R = V_0 / R_{kor} \qquad 1/R_{kor} = (V_0+v) / V_0R$$

Vodivostní titrační křivka $1 / R_{kor} = f(v)$, ale také závislost $(V_0+v) / R = f(v)$ se sestává z lineárních úseků, i když objem přidaného odměrného roztoku (v) není zanedbatelně malý oproti objemu roztoku titrovaného (V_0) na počátku titrace.

Pokud je splněna lineární závislost měřeného signálu na koncentraci anebo na převrácené hodnotě koncentrace, korekce tohoto typu dávají lineární úseky na titračních křivkách. Takto lze linearizovat i křivky fotometrických a amperometrických titrací. Tato metoda není vhodná pro potenciometrické titrační křivky vzhledem k logaritmické závislosti signálu a koncentrace.

Takzvaná vysokofrekvenční konduktometrie pracuje s frekvencemi cca 10^7 s^{-1}. Velikost signálu je určena jednak vodivostí roztoku diskutovanou v předchozích odstavcích ("nízkofrekvenční" vodivost při 10^3 s^{-1}), vlastnostmi rozpouštědla a také parametry použitého přístroje (zejména frekvencí). Oproti nízkofrekvenční konduktometrií má vysokofrekvenční technika řadu nevýhod, např. nelineární titrační křivky a lineární kalibrační závislost jen v úzkém rozsahu koncentrací. Prakticky jedinou výhodou vysokofrekvenční metody je skutečnost, že při měření elektrody se přikládají vně nádobky: nedojde tedy ke kontaktu elektrod s měřeným roztokem (je vyloučena kontaminace elektrody sraženinou) a můžeme měřit i v uzavřené ampulce (např. injekční roztoky).

8. SPEKTRÁLNÍ METODY

Metody spektrální analýzy jsou založeny na interakci hmoty a energie elektromagnetického záření. Viditelné světlo, stejně jako řada dalších lidským okem nevnímaných záření, patří mezi elektromagnetická záření. Charakter vlnění světla dokazuje jev interference (skládání vln). Charakteristikou určitého záření je jeho vlnová délka nebo vlnočet (počet vln připadající na jeden metr, ale v praxi nejčastěji se používají jednotky Kayser = cm^{-1} udávající počet vln na 1 cm). Při přepočtu vlnové délky na vlnočet vycházíme ze vztahu: rychlost světla (cca 300 000 km/s ve vakuu) je rovna frekvenci (kmitočtu, rozměr s^{-1}) násobené vlnovou délkou. Při přechodu záření do jiného prostředí se může snížit jeho rychlost pohybu, nikoli však jeho frekvence.

Elektromagnetické záření zároveň představuje proud energetických kvant. Čím kratší je vlnová délka (čím větší je vlnočet), tím větší je energie kvanta. Energetické stavy atomů, iontů a molekul jsou kvantovány. To znamená, že tyto částice mohou přijmout jen určitá (nikoli libovolná) kvanta energie a dostat se tak do energeticky bohatších (vyšších) stavů. Podobně při přechodu částice do energeticky nižšího stavu může dojít k uvolnění pouze celistvého kvanta energie.

Při absorpci kvanta energie (zářivé, elektrické, tepelné, chemické ...) přejde částice (atom, ion, molekula) do energeticky bohatšího (excitovaného) stavu. Při průchodu záření absorbujícím prostředím pozorujeme zeslabení původního záření. Absorpční spektrum je závislost tohoto zeslabení na vlnové délce (nebo vlnočtu) použitého záření. Částice absorbuje jen taková kvanta energie (záření takové vlnové délky), která potřebuje na přechod do excitovaného stavu. Částice zůstává v excitovaném stavu jen velmi krátce a vrací se zpět do původního (základního) stavu. Přitom se opět uvolní kvantum energie získané předchozí absorpcí, platí zákon o zachování energie. Takto uvolněná energie je nejčastěji energie tepelná (srážky molekul). Může být ale i zářivá (mluvíme o emisních spektrech). Jedná-li se o jednoduchý přechod mezi dvěma energetickými hladinami, potom energie a také vlnová délka absorbovaného i emitovaného záření jsou stejné. V případě fluorescence je absorbované kvantum emitováno ve formě několika (menších) energetických kvant. Přechod z excitovaného stavu do stavu základního při fluorescenci probíhá postupně přes jeden nebo několik stavů s postupně menším a menším energetickým obsahem. Proto fluorescenční, při fluorescenci emitované (sekundární) záření má větší vlnovou délku (a tedy menší energii) než záření absorbované (=excitující, primární).

Energeticky velmi bohaté rentgenovo záření (vlnová délka 10^{-2} až 10 nm) vyráží elektrony z vnitřních (nikoli vazebných) orbitalů v atomu. Ultrafialové (UV, 200-400 nm) a viditelné záření (VIS, 400-750 nm) má energii dostačující právě pro excitaci elektronů ve vnějších (vazebných) orbitalech atomů anebo pro excitaci vazebných elektronů v molekulách. Energie infračerveného záření (IR, Infra Red) s ještě větší vlnovou délkou (vlnočty 200 až 3 700 cm^{-1}) odpovídá změnám v energii vibračních a rotačních stavů molekul. Radiové vlny používané v NMR mají vlnočty okolo 0,001 cm^{-1}, vlnové délky okolo 10 m (ještě menší energie).

8.1 ABSORPCE ZÁŘENÍ UV-VIS

Princip FOTOMETRIE: Světlo vycházející ze zdroje po nasměrování systémem zrcadel, čoček a štěrbin prochází měřeným absorbujícím prostředím a dopadá na detektor. Obvykle před anebo za měřeným vzorkem je zařazen monochromátor. Čím více je absorbující (barevné) látky v měřeném vzorku, tím větší je zeslabení původního záření.

ZDROJ: pro viditelnou oblast používáme nejčastěji wolframovou nízkonapěťovou žárovku (automobilovou žárovku), pro UV deuteriovou výbojku. Oba tyto zdroje vydávají bílé světlo, tj. záření o prakticky všech vlnových délkách v oblasti VIS anebo UV. Rtuťová výbojka (obecně výbojka s nějakým kovem) je příkladem zdroje s čarovým spektrem, v jejím záření najdeme světlo s několika málo rozlišnými vlnovými délkami. Laser je zdroj monochromatického záření, jeho světlo má jedinou vlnovou délku (existují i laditelné lasery u kterých lze měnit vlnovou délku vysílaného záření). Záření laseru má navíc velkou energii, takže je ideálním zdrojem pro fotometrii.

MONOCHROMÁTOR by měl vybírat z bílého světla záření o jediné vlnové délce, prakticky vymezuje světlo v omezeném (úzkém) rozsahu vlnových délek. Rovnoběžné paprsky bílého světla procházejí útlou štěrbinou a dopadají na hranol nebo mřížku, tam nastane rozdělení, vystupující záření různých barev jsou odlišně směrována. Na stínítku zachytíme barevnou "duhu" a vhodně umístěným otvorem ve stínítku propustíme jen záření v oboru požadovaných vlnových délek. Tato "duha" je vlastně zobrazení vstupní štěrbiny, tvoří ji k sobě nakupené velké množství obrazů štěrbin v různých barvách. Štěrbina má tvar čáry (přibližně úsečky), mluvíme o spektrálních čarách. Kvalitní monochromátory (rozsah řádově ±1 nm) pracují na principu hranolu, mřížky anebo interferometru. Barevné filtry jsou méně kvalitní monochromátory, propouštějí značně široký obor vlnových délek (cca ±50 nm), ale jsou velmi levné. Kombinací interferenčního filtru s barevným vymezíme rozsah vlnových délek asi ±20 nm. Nejkvalitnější monochromatické záření dává výbojka s nějakým kovem (např. Hg, Na, ...) kombinovaná s monochromátorem (mřížkou, filtrem, ...), který odfiltruje nežádoucí spektrální čáry (nežádoucí vlnové délky).

DETEKTOR. Roztok se nám jeví barevný, když absorbuje část vlnových délek bílého viditelného světla (v rozmezí cca 400-750 nm). První spektroskopické detektory měřily absorpci bílého světla (KOLORIMETRY), detektorem bylo lidské oko (subjektivní detekce). Současné fotometry mají monochromátor (SPEKTROFOTOMETRY mají kvalitní monochromátor) a používá se převážně detekce objektivní. Energie dopadajícího světla vyvolá efekt elektrický (např. fotočláněk, fotonásobič, fotoodpor, fotodioda, ...), termický anebo chemický (fotodeska). Podobně jako lidské oko i objektivní detektory jsou různě citlivé na světla různých vlnových délek. Výstup z detektoru (analogový nebo digitální) nazýváme signál a tento signál je v určitém vztahu k hledané veličině (koncentraci, množství analytu).

Roztok měřeného vzorku umísťujeme do KYVETY, je to nádobka s rovnoběžnými stěnami jejichž vzdálenost od sebe je známá. Kyvety jsou z materiálu, který v používané spektrální oblasti neabsorbuje záření, pro viditelnou oblast jsou ze skla obyčejného, organického (plexisklo) anebo křemenného, pro UV vyhovuje pouze sklo křemenné.

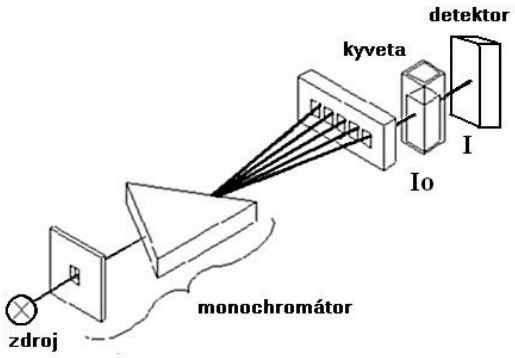
FOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ ve viditelné oblasti. Světlo ze zdroje před dopadem na detektor je zeslabováno absorbcí v roztoku vzorku ale také odrazem při přechodu z jednoho optického prostředí do jiného (vzduch-sklo, sklo-voda, ...). Měříme proto při konstantním uspořádání, kde je také konstantní odraz a světlo prošlé srovnávacím roztokem (blankem) považujeme za nezeslabené (I_0). Roztok blanku a vzorku mají stejné složení a koncentrace (činidla, pufru, ...) až na to, že v roztoku vzorku je navíc analyt, který tvoří barevnou absorbující složku. Roztok blanku může být barevný, pokud používáme barevné činidlo anebo jsou-li zbarvené složky matrice. Intenzitu záření zeslabeného absorbcí označíme I. Propustnost (transmitance) je poměr I/I_0 a veličina $(1 - I/I_0)$ je absorptance. Absorbance je definována vztahem $A = - \log I/I_0$. Vztah mezi absorbací měřeného roztoku a koncentrací barevné látky vystihuje Lambert-Beerův zákon

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \, c \, l$$

kde **l** je délka absorbující vrstvy (tloušťka kyvety), **c** je koncentrace barevné látky v roztoku a ε_λ je molární absorpční koeficient (číselně je to absorbance jednomolárního roztoku absorbující látky v jednocentimetrové kyvetě). ε má rozměr $mol^{-1}.dm^3.cm^{-1}$, je to konstanta pro určitou látku **při určité vlnové délce** λ.

V klasickém Pulfrichově DVOUPAPRSKOVÉM FOTOMETRU záření ze zdroje se rozděluje optickým systémem (zrcadla a čočky) na dva stejně intensivní paprsky. Jeden z nich prochází roztokem vzorku, ten je zeslabován absorpcí v barevné složce. Druhý paprsek prochází "neabsorbujícím" blankem a jeho intenzitu zmenšujeme mechanickou clonou (zmenšením průřezu, kterým prochází světlo). Oba paprsky projdou filtrem (monochromátorem) a v okuláru pozorujeme 2 různě světlá pole, jedno patří paprsku procházejícímu vzorkem a druhé blankem. Úkolem obsluhy je clonou zeslabit paprsek blanku tak, aby obě pole v okuláru byla stejně světlá. Na bubnu, kterým nastavujeme clonu, odečteme absorbanci (nelineární stupnice od 0 do obvykle 1 až 2) anebo propustnost (lineární stupnice od 0 do 100%). Moderní dvoupaprskové fotometry si nastaví "stejnou intenzitu obou polí" automaticky.

JEDNOPAPRSKOVÝ FOTOMETR má detektor převádějící dopadnuvší světlo na elektrický signál a ten je možno kompenzovat (přidat, ubrat) a také zesílit. Pomocí kompenzace nastavíme propustnost 0% za stavu, kdy na detektor nepřichází žádné světlo. Další krok je vhodným zesílením signálu nastavit propustnost na 100% při průchodu světla blankem. Potom zařazujeme roztoky vzorků a odečítáme obvykle absorbanci, zřídka propustnost. Protože detektory jsou různě citlivé na záření různých vlnových délek, je třeba při každé změně používané vlnové délky zopakovat nastavení 100% propustnosti.



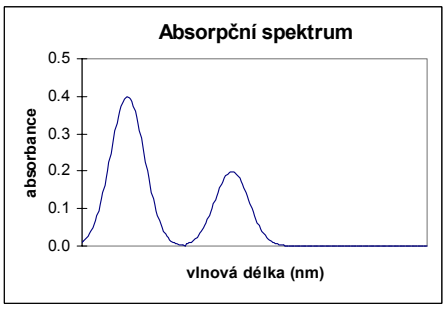
KALIBRAČNÍ KŘIVKA ve fotometrii je závislost absorbance na koncentraci analytu anebo na jeho množství v konstantním objemu. Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že se jedná o lineární závislost. Kalibrační křivku v grafické podobě získáme ze změřených absorbancí pro roztoky o známých koncentracích analytu. Hledanou koncentraci (množství) analytu vyhodnotíme metodou kalibrační křivky anebo metodou STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU, při které nejprve změříme absorbanci roztoku vzorku (A_X), potom do tohoto roztoku přidáme známé množství analytu a změříme absorbanci (A_{X+S}). Platí:

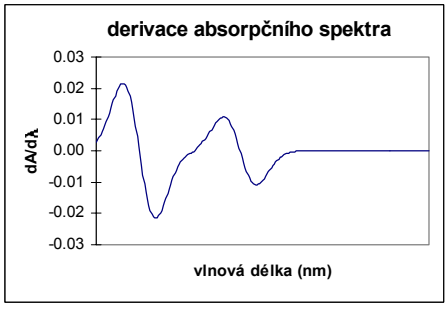
$$A_X = \varepsilon c_X l$$

$$A_{X+S} = \varepsilon (c_X + c_S) l$$

kde c_X a c_S jsou koncentrace analytu v měřeném roztoku pocházející ze vzorku a ze standardu. Takový způsob vyhodnocení lze použít jen tehdy, 1/ prochází-li lineární kalibrační křivka počátkem souřadnic a pokud 2/ použitý přídavek změní jen koncentraci analytu, ale objem a koncentrace ostatních složek v roztoku vzorku po přídavku zůstanou prakticky beze změny. Takový přídavek lze realizovat např. dávkováním několika mikrolitrů standardního roztoku z mikrobyrety do cca 3 ml roztoku vzorku v kyvetě (zanedbatelně malé zvětšení objemu) anebo vezmeme dva stejné objemy (alikvotní části) roztoku vzorku, pouze do jednoho z nich přidáme známé množství analytu, a oba doplníme v odměrných baňkách na stejný objem.

Závislost molárního absorpčního koeficientu na vlnové délce je význačnou charakteristikou každého absorbujícího systému. ABSORPČNÍM SPEKRTEM rozumíme závislost absorbance na vlnové délce. Zcela jednoznačnou, na koncentraci nezávislou charakteristikou barevné látky je závislost jejího absorpčního koeficientu na vlnové délce. Význačné jsou vlnové délky, při kterých absorpce dosahuje maxima, označujeme je lambda max. Měření při lambda max je maximálně citlivé, pro danou koncentraci dostaneme maximální signál a to umožňuje postihnout fotometricky nejmenší koncentrace absorbující látky. Pokud při lambda max analytu absorbují i jiné složky přítomné ve vzorku (matrice), hledáme vlnovou délku při které analyt absorbuje a matrice nikoli. Anebo matrici zahrneme do blanku a tím eliminujeme její příspěvek do výsledné absorbance. DERIVAČNÍ ABSORPČNÍ KŘIVKA je závislost derivace absorbance podle vlnové délky na vlnové délce. Na derivační křivce se objeví více píků než na původní absorpční křivce, tyto píky lze využít pro kvalitativní určení absorbující látky.





VÍCESLOŽKOVÁ ANALÝZA. Absorbance je aditivní veličina. Jsou-li v roztoku 2 absorbující látky (indexy A, B) měříme při 2 odlišných vlných délkách (1, 2) a platí:

$$A_1 = (\varepsilon_{A1}c_A + \varepsilon_{B1}c_B) \cdot l$$

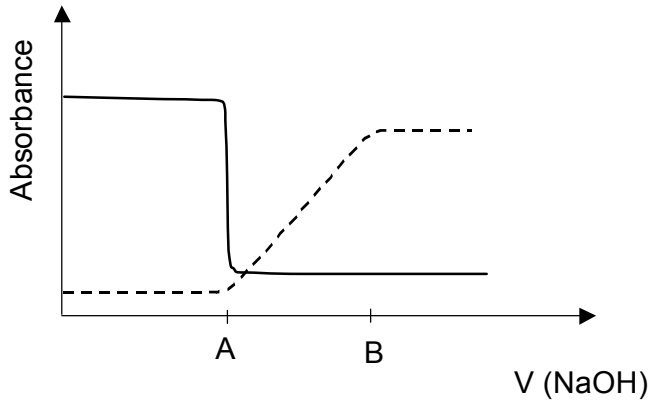
$$A_2 = (\varepsilon_{A2}c_A + \varepsilon_{B2}c_B) \cdot l$$

Známe-li molární absorpční koeficienty vypočteme hledané veličiny cA a cB z naměřených hodnot A_1 a A_2 za předpokladu, že absorpční koeficienty jsou dostatečně rozdílné. Takovým způsobem můžeme stanovit n koncentrací změřením absorbancí při n vlných délkách. Avšak je to nepřímá analýza a v ní obecně platí, že i jen malé chyby naměřené hodnoty (zde absorbance) často vedou ke značným chybám u hodnot hledaných (u koncentrací).

FOTOMETRICKY STANOVUJEME barevné sloučeniny (chroman, manganistan, malachitová zeleň ...) a také látky absorbující v UV (aromatické sloučeniny, dusičnan, ...). Látky nebarevné anebo málo barevné převádíme chemickou reakcí na intenzivně absorbující sloučeniny, např. dusičnan zredukujeme na dusitan a z něj připravíme azobarvivo, slabě modrý roztok síranu měďnatého ve vodě po přidání čpavku přejde v intenzivně modrý (přechod $Cu(H_2O)n^{2+}$ na $Cu(NH_3)n^{2+}$), v bezbarvém roztoku Fe(III) soli po přídavku SCN- vznikne červený komplex $Fe(NCS)^{2+}$. Pokud zreaguje 100% analytu na barevnou sloučeninu, dovolí to stanovit malá množství. Pro fotometrické stanovení je ale bezpodmínečně třeba, aby zreagovala vždy stejná část analytu, mohlo by to být třeba jen 85% anebo 37%, ale muselo by to být dokonale reprodukovatelné. Praxe ukazuje, že je mnohem jednodušší zajistit experimentální podmínky pro úplné (prakticky 100%) zreagování než pro zreagování menší, ale vždy stejné části analytu.

Fotometricky můžeme využít i ODBARVOVACÍ REAKCE, např. barevný chelát zirkonalizarinátu se rozkládá na bezbarvý komplex fluorozirkoničitý; tedy čím více F^- přidáme k barevnému činidlu, tím více se jeho zbarvení zeslabí.

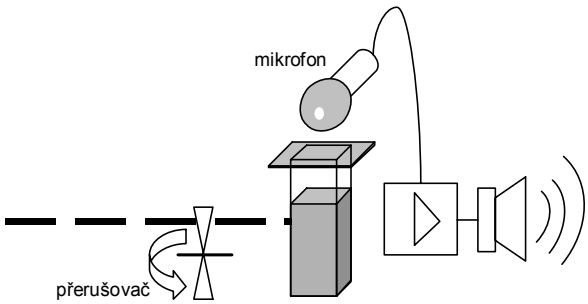
Při fotometrickém stanovení je důležité pracovat při vhodné vlnové délce a dodržet koncentraci analytu v mezích optimálních pro měření absorbance ($0,2<A<0,8$). Je třeba zajistit konstantní podmínky (koncentrace všech složek roztoku zejména kyselost, iontová síla, koncentrace činidel, někdy i teplota a doba potřebná pro zreagování analytu s činidlem) při měření jak neznámých vzorků, tak i standardních roztoků pro konstrukci kalibrační křivky.



Křivka fotometrické titrace kyseliny. Bod ekvivalence je označen A. Plná křivka je pro zanedbatelně malou a přerušovaná pro srovnatelně velkou koncentraci indikátoru vůči koncentraci kyseliny (např. pro mikrotitrace). B je ekvivalence pro ztitrování kyseliny + indikátoru. Měřeno při lambda max kyselé (_____) a bazické formy indikátoru (- - - -).

Při FOTOMETRICKÉ TITRACI sledujeme změnu absorbance v závislosti na objemu přidaného činidla. Např. modrý amoniakální roztok soli Cu(II) přidáváním EDTA se postupně odbarvuje, absorbance se zmenšuje lineárně s objemem přidaného roztoku EDTA až do ekvivalence. Za ekvivalencí absorbance prakticky bezbarvého roztoku obsahujícího komplex Cu(II) s EDTA se už nemění. Ekvivalenci vyhodnotíme graficky ze závislosti A=f(v) jako souřadnici průsečíku 2 lineárních úseků. Pokud změny objemu během titrace nejsou zanedbatelně malé, provedeme korekci na přidaný objem diskutovanou v kapitole o konduktometrických titracích (odstavec 7.3).

FOTOAKUSTICKÁ METODA. Absorpce světelné energie je následována rozptýlením energie většinou ve formě tepla, absorpcí světla dochází k ohřevu (obvykle jen nepatrnému) absorbujícího roztoku. Zařídíme-li přerušování dopadajícího záření a má-li toto přerušování frekvenci akustických signálů, ohřev periodickým přerušovaným zářením vyvolá mechanické tlakové rázy (zvuk) a ty detekujeme citlivým mikrofonem přiloženým k absorbujícímu vzorku. Pouze absorpce, nikoli odraz světla, vyvolá akustický signál. Tímto způsobem můžeme např. zjistit absorpční maximum v zakaleném roztoku; fotoakustický signál není ovlivněn odrazem záření na pevných částicích (sraženině), jeho odezva indikuje jen absorpci. Takto lze detekovat na bílém papíru nepatrné, zrakem nepostřehnutelné skvrny barviva.



Fotoakustická metoda

pozn.: obdobný převod záření na mechanickou energii jako u fotoakustická spektroskopie je využíván brouky krasci. Krasci (čeleď Buprestidae) rodu Melanophila jsou pověstní tím, že se ve velkém počtu slétávají k lesním požárům. Dokážou při tom překonat vzdálenost i 50 km, protože larvy těchto brouků se nejlépe vyvíjejí pouze v čerstvě ohořelém dřevě. Pokusy ukázaly, že při vyhledávání hořících míst nevyužívají ani čichové, ani zvukové podněty. Podráždění senzily infračerveným zářením vede ke škubavým pohybům tykadly brouka. Nejcitlivěji reaguje senzila na teplo o vlnových délkách 2,5 – 4 mm, což odpovídá záření, které vzniká při lesních požárech. Intenzita záření přitom může být velmi malá – 0,06 mW/cm2. Sférické tělísko v senzile je tvořeno organickými molekulami s větším množstvím skupin C—H a O—H. Tyto skupiny rezonují právě v pásmu 3 mm, a proto mohou absorbovat tepelné záření odpovídajících vlnových délek. Teplo způsobuje během několika milisekund změny objemu sférického tělíska a tím deformuje (roztahuje nebo stahuje) jednotlivé úseky dendritů. Přestože deformace se pohybují řádově v nanometrech, stačí to k podráždění mechanických receptorů.

TURBIDIMETRIE používá stejné experimentální zařízení jako fotometrie, ale sleduje zeslabení světla odrazem na částicích zákalu (turbidity) v roztoku. Zatím co ve fotometrii pracujeme s roztoky pravými, jejichž stav je dokonale reprodukovatelný, zachovat reprodukovatelný stav sraženiny (velikost částic, jejich rozptyl a postupná sedimentace) je mnohem složitější, a proto turbidimetrická měření jsou hůře reprodukovatelná než fotometrická.

AAS je běžně používaná zkratka pro ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRII. Měříme (stejně jako ve fotometrii) absorbanci nikoli však v roztoku, ale v plynné fázi. Kyvetou je plamen anebo elektricky vyhřívaná pícka (grafitová kyveta). Analyt za zvýšené teploty přechází do plynné fáze a termickou disociací atomizuje (rozkládá se na atomy). Dopadající záření se zeslabuje excitací valenčních elektronů v atomech. Tyto atomy v plynu jsou daleko od ostatních částic, které by mohly ovlivnit excitační energie, a proto absorpční pík (čára) je extrémně úzký (řádově setiny nanometru).

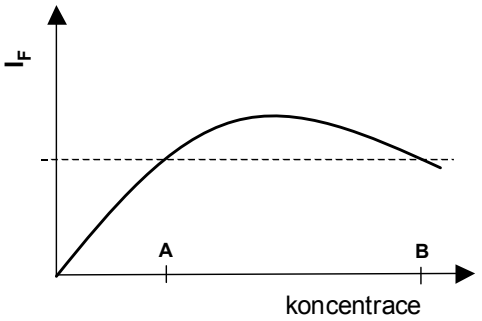
pozn.: Absorbující částice v roztocích jsou víceatomové molekuly anebo ionty, v jejich blízkosti se nacházejí další částice, zejména molekuly rozpouštědla*, excitace "volnějších" elektronů podléhá intermolekulárním a též extramolekulárním vlivům, proto absorpční pásy jsou značně široké (řádově desítky nm).*

Neexistují dostatečně kvalitní monochromátory, které by z polychromatického záření vybraly tak úzký obor vlnových délek, jaký potřebujeme pro AAS. Zdrojem záření pro AAS jsou katodové lampy, výbojky ve kterých je (v plynné fázi) stejný prvek jako analyt. Atomy tohoto prvku ve výbojce vysílají přesně to záření které absorbují atomy stejného druhu ze vzorku. Plamen ve funkci kyvety musí být dokonale reprodukovatelný, je třeba zajistit definovaný přísun paliva (C_2H_2, H_2 ...) i oxidovadla (vzduch, kyslík, N_2O). Roztok vzorku ve formě reprodukovatelné mlhy (používáme zmlžovač = nebulizátor) vnášíme do plamene v proudu jednoho z plynů. AAS je vysoce citlivá metoda pro stanovení kovových prvků, často se používá pro stanovení stopových množství toxických těžkých kovů při kontrole kontaminace životního prostředí. Vlastní spektrální stanovení je velmi selektivní (minimum rušení jinými prvky), problémy mohou být s převodem do plynné fáze a s tendencí atomů

některých prvků tvořit za podmínek stanovení (teploty asi 1500^{O}C i více) termicky stabilní sloučeniny (oxidy, nitridy ...).

FLUORESCENCE. Roztok ozařujeme UV zářením. Částice absorbuje kvantum energie z primárního záření a tuto energii uvolní ve formě několika kvant, jedno z těchto kvant se realizuje ve formě sekundárního záření. Měříme intenzitu sekundárního záření, a aby při tom nerušilo procházející primární světlo, měříme sekundární záření ve směru kolmém na záření dopadající. Pro stanovení nejmenších koncentrací je výhodnější měřit ve fluorometrickém než ve fotometrickém uspořádání. Je totiž technicky snadnější změřit nepatrný rozdíl dvou velmi malých signálů (nulový blank a nenulový vzorek ve fluorometrii), nežli nepatrný rozdíl dvou velikých signálů (např. větší než nulová absorbance blanku i vzorku ve fotometrii).

Pro fluorometrické stanovení vyhledáváme optimální lambda primárního záření, takové, které vybudí maximální intensitu záření sekundárního. Sekundární záření má větší lambda (menší energii) než záření primární. Intenzita sekundárního záření IF by měla být vyjádřena v jednotkách světelného toku, v praxi se obvykle měří elektrický signál vystupující z detektoru a ten bývá přímo úměrný světelnému toku. Kalibrační křivka I_F= f (c) je lineární pouze pro malé koncentrace. Při větších koncentracích fluorescenční látky pozorujeme zeslabení signálu způsobené absorpcí částicemi schopnými fluorescence. To záření, které částice vysílá, může být stejnou částicí i absorbováno; pro nejmenší koncentrace je tato samoabsorbce zanedbatelně malá.



Fluorometrická kalibrační křivka. Určité velikosti signálu odpovídají dvě různé koncentrace: A a B. Po zředění měřeného roztoku na dvojnásobný objem dostaneme poloviční signál při koncentraci A a nevýrazně změněný, někdy i větší signál při koncentraci B.

NEFELOMETRIE měří koncentraci pevných částic (sraženiny) v roztoku. Využívá odrazu světla na částečkách pevné fáze a pracuje se stejným uspořádáním jako ve fluorometrii: měříme odražené světlo (sekundární záření) v kolmém směru na paprsky světla dopadajícího (primárního) záření. Značné problémy s reprodukovatelností stavu sraženiny rozptýlené v roztoku jsou identické jako v turbidimetrii.

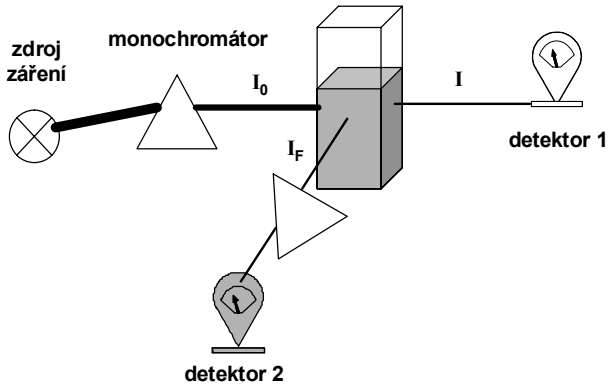


Schéma měření fotometrického (nebo turbidimetrického) (DETEKTOR 1) a fluorometrického (nebo nefelometrického) (DETEKTOR 2). Záření: I_0 dopadající, I po absorpci prošlé a I_F záření kolmé ke vztupujícímu.

8.2 EMISNÍ SPEKTROMETRIE v UV-VIS

Princip metody: analyt převedeme do plynné fáze, atomizujeme, excitujeme elektrony (většinou valenční) do vyšší energetické hladiny a registrujeme čarové spektrum emitovaného záření. Poloha spektrálních čar, jejich vlnová délka, přináší podklady pro kvalitativní analýzu a intenzita těchto čar vypovídá o kvantitativním složení vzorku.

PLAMENOVÁ FOTOMETRIE. Roztok vzorku zmlžíme do proudu plynu přiváděného do hořáku a v plameni probíhá excitace a následná emise záření. Pro kvantitativní analýzu je třeba zajistit definované pomínky hoření (přívod paliva i oxidovadla do plamene). Poměrně nízká teplota plamenu propan-butan/vzduch umožňuje stanovení jen snadno excitovatelných prvků alkalických kovů a alkalických zemin. Vzhledem k malému počtu emitujících prvků postačí i levný barevný filtr ve funkci monochromátoru. Energeticky bohatý plamen acetylen/oxid dusný umožní excitaci, tedy i stanovení většiny prvků kovů, je však nutné použít kvalitní (např. mřížkový) monochromátor.

SPEKTROGRAFIE. Emisní, spektrum excitujeme v elektrickém výboji. Ten může mít chrakter elektrického oblouku kterým protéká konstantní proud, přísun energie do výboje je časově konstantní. Pro elektrickou jiskru zařazujeme paralelně s jiskřištěm kondenzátor. Kondenzátor se postupně nabíjí a jiskra přeskočí teprve až je dosaženo potenciálu potřebného pro tento výboj. Energie nahromaděná v čase nabíjení kondenzátoru se uvolní v kratičkém okamžiku přeskoku jiskry. Jiskra se opakuje po určité časové periodě a v okamžiku výboje v ní bývá nahromaděna mnohem větší energie (=vyšší teplota, až 20.000 ^{O}C) než ve výboji obloukovém. Větší energie dovoluje nejen excitaci elektronů uvnitř atomu, ale stačí i na ionizaci, tj. odštěpení elektronu a převedení atomu na ion. Elektron ve stejném orbitalu v atomu a v kationtu stejného prvku potřebuje různou energii pro svoji excitaci, proto dostáváme odlišná spektra (spektrální čáry) atomová (=oblouková) a iontová (=jiskrová). Při zvětšování energie (teploty) ve výboji pozorujeme zeslabování intensity čar atomových a vzrůst intensity čar iontových. Na tomto jevu je založeno měření teploty výboje. Pro kvantitativní spektrální analýzu vyplývá nutnost dodržovat konstantní podmínky výboje (např. tvar elektrod, vzdálenost mezi nimi, elektrické parametry napájení výboje ...).

Kovové (elektricky vodivé) vzorky pro spektrografickou analýzu upravujeme do tvaru tyčinky a použijeme jako elektrodu. Mezi touto elektrodou a protielektrodou (obvykle grafitovou) probíhá elektrický výboj. Elektricky nevodivé materiály (např. minerály) ve formě prášku smícháme s vodivým grafitovým práškem a umístíme v prohlubni (vždy stejného tvaru a hloubky) jedné z grafitových elektrod. S grafitovým práškem můžeme smíchat i roztok vzorku.

SPEKTROGRAFY fotografují spektrum na černobílou fotografickou desku a potom se vyhodnocuje poloha a intensita zčernání jednotlivých spektrálních čar. Na stejnou fotodesku se zaregistruje i na čáry bohaté spektrum železa. Poloha čar železa, jejichž vlnové délky jsou velmi přesně tabelizovány, slouží jako pomůcka k určení vlnové délky čáry analytu. Nepřítomnost spektrální čáry určitého prvku v místě, kde podle spektrálních tabulek se nachází jeho čára, je jednoznačným důkazem nepřítomnosti tohoto prvku ve vzorku. Přítomnost spektrální čáry na onom místě není ještě důkazem přítomnosti prvku. Spektrální koincidence znamená, že několik prvků může dávat spektrální čáry o stejné (nepatrně odlišné) vlnové délce. Přítomnost prvku jsme dokázali teprve tehdy, pokud jsme našli několik jeho spektrálních čar a posoudili pro každou z nich možné koincidence. Pro důkaz prvku vyhledáváme "poslední čáry", tj. ty, které zůstanou jako poslední při zkracování fotografické expozice spektra, nejintenzivnější čáry onoho prvku. Elektrony jsou excitovány do různých energeticky vyšších hladin s různou pravděpodobností. Poslední čáry odpovídají excitacím s největší pravděpodobností (četností).

KVANTOMETR je spektrograf, ve kterém spektrum nedopadá na fotodesku, ale na stínítko a v něm jsou na vhodných místech otvory. Těmito otvory jsou propouštěny vybrané spektrální čáry na fotoelektrické převodníky (fotocela ...) a zesílení elektrických signálů je nastaveno tak, aby displeje ukazovaly přímo procentický obsah několika analytů ve vzorku. Seřízení kvantometru je časově náročné, vyplatí se pouze pro laboratoře, které analyzují velký počet vzorků o málo odlišném složení. Např. vysoká pec vyrábí jeden typ produktu, kvatometrická analýza je tak rychlá, že dovolí během výroby upravit produkt na požadované složení.

Základem pro kvatitativní spektrografickou analýzu je skutečnost, že spektrální čára je tím intenzivnější, tím více zčerná fotodeska, čím větší je koncentrace analytu ve výboji. Pouze při

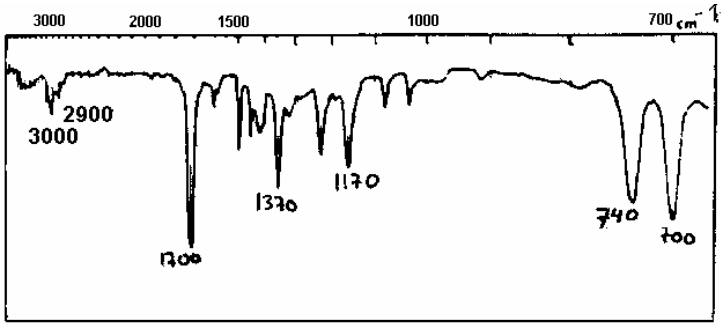
extrémně vysokých koncentracích analytu se může stát, že záření je zřetelně zeslabováno samoabsorbcí v neexcitovaných atomech analytu, které se nacházejí v chladnějších oblastech v okolí elektrického výboje. Množství atomů analytu přítomných ve výboji záleží nejen na koncentraci analytu ve vzorku, ale též na těkavosti té formy analytu, která je přítomna ve vzorku, a těkavost může být ovlivněna i matricí. Např. $CuCl_2$ těká mnohem snadněji než silikát měďnatý, a proto při stejné koncentraci Cu dostaneme větší signál pro vzorek s chloridem. To znamená, že kalibrační křivku je třeba sestrojit s použitím standardních materiálů (materiálů se známým obsahem analytu), které mají složení a strukturu maximálně podobnou analyzovanému vzorku. Spektrografická analýza může být zatížena značnou chybou pokud pro vyhodnocení použijeme kalibrační křivku sestrojenou pomocí standarních materiálů (=standardů) odlišného složení než má analyzovaný vzorek.

Není snadné zachovat konstantní energetické podmínky ve výboji při všech spektrografických měřeních. Analyzujeme-li roztoky, přidáváme do roztoku vzorku INTERNÍ STANDARD a kalibrační křivkou je závislot poměru intenzit čáry analytu a čáry interního standardu na koncentraci analytu ve vzorku. Interní standard i analyt musí mít velmi blízký ionizační potenciál, aby ionizace jejich atomů probíhala ve stejné míře i při kolísání energetických (tepelných) podmínek ve výboji. Dále je třeba, aby interní standard nebyl běžně přítomen ve vzorcích: používáme méně běžné kovy jako Ge, In, Pd, ... Pro srovnávání intensity zčernání spektrálních čar na fotodesce je výhodné, aby srovnávané čáry byly blízko sebe, tj. měly málo rozdílné vlnové délky. U pevných vzorků přídavek roztoku interního standardu není možný (leda bychom vzorek převedli na práškovitou formu), avšak interním standardem pro analýzu železných slitin může být samo Fe, je-li ho ve vzorku více než 90%.

INDUKČNĚ VÁZANÁ PLAZMA, ICP (Inductively Coupled Plasma) je vynikající zdroj pro excitaci emisních spekter (směs atomových a iontových čar). Do proudu argonu rozmlžíme roztok vzorku, vysokofrekvenčním ohřevem vzniká plazma (cca 10.000^{o}C) a můžeme zaregistrovat spektrální čáry prakticky všech prvků. Velká energie v plazmatickém hořáku excituje s vysokým výtěžkem, tato technika se osvědčila pro stanovení stopových množství kovových prvků, ale také pro stanovení nekovů jako např síry.

8.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE

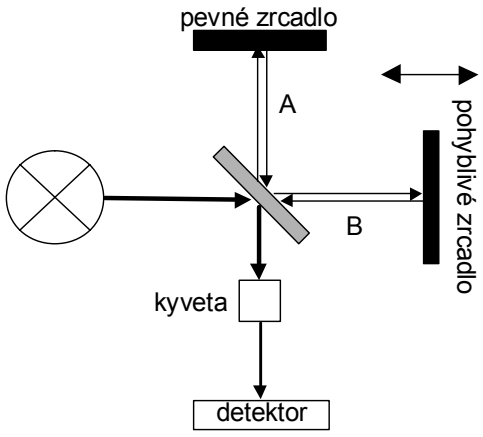
Vibrace dvou kovalentně vázaných atomů a rotace (v případě substituentů na atomech spojených kovalentní vazbou) podél takové vazby přechází do vyšších energetických stavů při absorpci IR (Infra Red) záření. Infračervená absorpční spektra dávají informaci o kovalentních vazbách uvnitř několikaatomové částice (molekuly nebo iontu). IR spektrometrie má velký význam pro studium struktury molekul, její využití pro kvantitativní analýzu (platí Lambert-Beerův zákon) je méně běžné. Soli, ve kterých jsou pouze jednoatomové ionty (KBr, TlCl,...), neabsorbují v IR, používají se jako materiál pro optiku (např. hranol) a pro kyvety. V IR spektrometru bývá zdrojem "bílého" záření žhavená tyčinka z amorfního oxidu hlinitého (globar). Místo kyvety s absorbující látkou může sloužit tableta slisovaná ze směsi KBr a analyzované látky. Typické IČ spektrum je vidět na obrázku.



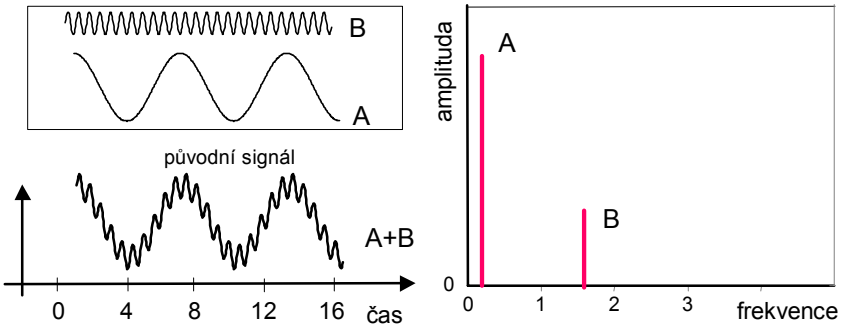
Klasické postupy rozkládají IR záření na hranolu (z KBr) analogicky jako v UV-VIS fotometrii, moderní namísto toho používají Michelsonův interferometr. Princip interferometru (viz obrázek) spočívá v tom, že záření zeslabené absorpcí vzorkem přichází na polopropustné zrcadlo pod úhlem 45^{o}. Část záření (A) se odrazí ve směru kolmém na původní paprsek. Druhá část záření (B) polopropustným zrcadlem projde, narazí na totálně odrážející zrcadlo, vrací se zpět na polopropustné zrcadlo, láme se stejným směrem jako záření A a interferuje se zářením A. Totálně reflektující zrcadlo se pohybuje a přístroj zaznamenává intensitu záření po interferenci v závislosti na rozdílu drah záření A a B. Je-li tento rozdíl drah lichým násobkem poloviny určité vlnové délky, nastane zeslabení a je-li

sudým násobkem oné poloviny vlnové délky, dojde k zesílení signálu. Počítač s použitím Fourierovy transformace vypočte závislost absorpce na vlnočtu a nakreslí absorpční spektrum. Tento interferometr jako disperzní prvek se osvědčil pro IR spektrometrii, nikoli však pro viditelnou oblast. Technicky dostupná přesnost měření rozdílu drah záření A a B je nedostatečná vzhledem k vlnovým délkám ve viditelné oblasti, ty ve VIS jsou mnohem kratší než v IR.

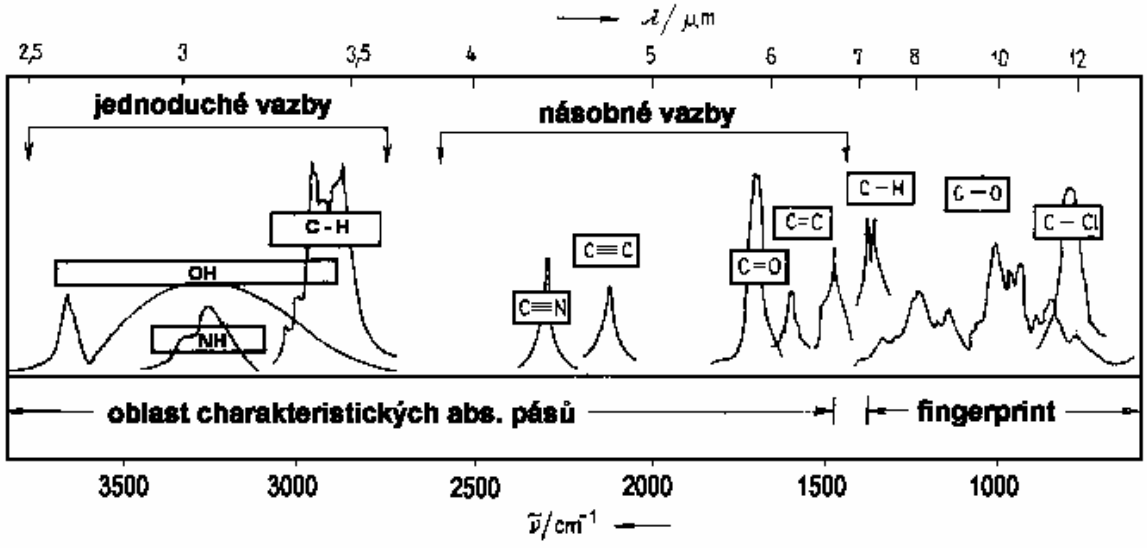
Schéma spektrometru
s Michelsonovým interferometrem



Princip Fourierovy transformace: Záznam signálu detektoru A+B (typicky intenzita vs. čas) se matematickým postupem rozkládá na složky s různými intenzitami a frekvencemi (A, B). Pomocí těchto periodických funkcí by šlo signál rekonstruovat zpětnou (inverzní) Fourierovou transformací. Podstatou Fourierovy transformace je tedy nalezení všech frekvencí (=spektra), které způsobily signál, čili které by vzájemnou kombinací způsobily zpětně vznik signálu. V případě na obrázku (vpravo je reálná složka fourierova spektra) lze navíc některé frekvence (B) označit za šum a při zpětné rekonstrukci neužít – to je úprava signálu filtrací, čili namísto A+B bychom dále používali pouze A.



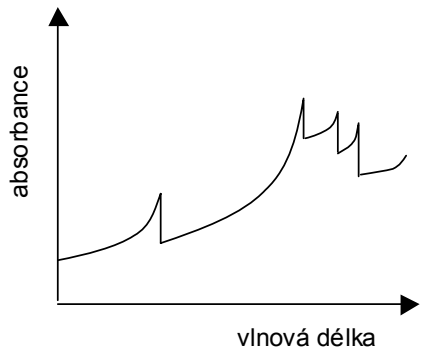
V IR spektru máme oblast kmitočtů, ve kterých se nacházejí absorpční pásy charakteristické pro funkční skupiny (-OH, $-NO_2$, >C=O, $-NH_2$,...) a oblast tzv. "otisků prstů" (fingerprint), ve které má každá sloučenina svoje charakteristrické spektrum (viz obrázek). Pásy funkčních skupin využíváme v organické kvalitativní analýze pro důkaz přítomnosti či nepřítomnosti určité funkční skupiny (analogicky jako skupinové reakce v anorganické analýze). Identita spektra v oblasti finger print u látky izolované ze vzorku a látky známé ověřuje správnost výsledku kvalitativní organické analýzy.



8.4 SPEKTROMETRIE V OBLASTI RENTGENOVA ZÁŘENÍ

Rentgenovy paprsky (anglicky X-rays) mají vlnovou délku řádově desetiny nanometru. Pohlcení kvanta energie vyvolá vyražení elektronu z vnitřního (nikoli vazebného) orbitalu v atomu. Na uvolněné místo ve vnitřním orbitalu spadne elektron z jiného orbitalu více vzdáleného atomovému jádru. Čím je dráha elektronu blíže atomového jádra tím větší energii potřebujeme na jeho uvolnění. Přechodem elektronu z orbitalu vzdálenějšího od jádra na orbital bližší jádru se energie uvolní, pozorujeme ji jako emisi charakteristického záření. Rozdíl energie hladin ve kterých se nacházel elektron před a po přechodu na hladinu blíže jádra určuje vlnovou délku emitovaného charakteristického záření. Rentgenova emisní i absorpční spektra využíváme pro analýzu analogickým způsobem jako v UV-VIS spektrometrii. Pro registraci emisních i absorpčních rentgenových spekter užíváme buď rozlišení podle vlnových délek po difrakci na krystalové mřížce (viz Braggova rovnice) anebo rozlišení podle energie na vícekanálovém (polovodičovém) čítači. Generace rentgenových spekter se odehrává v hloubi atomu, je nezávislá na stavu valenční oblasti, proto tato spektra vypovídají pouze o druhu atomů, nikoli o jejich vztahu k atomům v okolí (např. v molekule). To znamená, že před analýzou není třeba provádět chemickou úpravu vzorku.

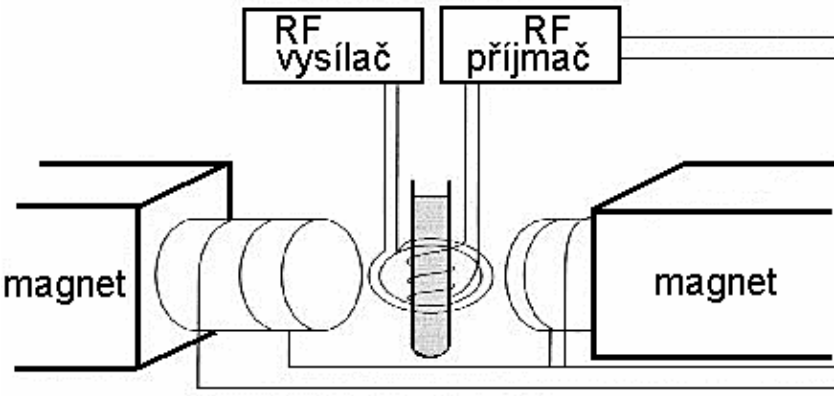
RENTGENOVA EMISNÍ SPEKTRA získáme bombardováním vzorku elektrony v rentgenově trubici. Ve spektru je malý počet čar (méně než v UV-VIS), vztah jejich vlnové délky a atomového čísla emitujícího prvku vystihuje Moseleyův zákon. Záření prvků s menším atomovým číslem než má titan je absorbováno vzduchem, takové měření lze provádět v atmosféře H_2, He nebo CH_4 a také ve vakuu. Modernější přístroj, ELEKTRONOVÁ MIKROSONDA soustředuje svazek elektronů na malou plochu, generace spektra nastává v objemu vzorku asi 10^{-6} mm^3 a rentgenovo emisní spektrum umožňuje kvalitativní i kvantitativní lokální analýzu, např. sledování nehomogenity povrchu materiálů. Místo bombardování elektrony můžeme použít pro excitaci rentgenova emisního záření též ozařování primárním rentgenovým (nebo radioaktivním) zářením, tento způsob analýzy označujeme jako rentgenovskou FLUORESCENCI. Kalibrační křivku tvoří závislost intensity sekundárního záření na koncentraci analytu. Primární záření proniká do hloubi vzorku a je přitom zeslabováno všemi složkami vzorku (analytem i matricí) a podobně je zeslabováno i sekundární záření procházející vzorkem. Proto je třeba intensitu sekundárního záření vynásobit korekčním koeficientem a jeho hodnota závisí na celkovém složení vzorku (včetně matrice). Tyto korekční koeficienty jsou rovny jedné pokud je vzorkem tenký film umístěný kolmo na dopadající primární záření, v takovém případě záření neprochází absorbujícím prostředím. Rentgenova fluorescence se osvědčila pro seriovou kvantitativní analýzu např. geologických materiálů, vzorky se upravují jen mechanicky (např. mletím) a není třeba převádět je do roztoku.



RENTGENOVA ABSORPČNÍ SPEKTRA vykazují anomálii, tak zvané ABSORPČNÍ HRANY. Při zvětšování vlnové délky záření původně malá absorpce vzorku vzrůstá až najednou prudce klesne (=absorpční hrana). Maximum absorpce nastane, je-li energie dopadajícího záření totožná s energií potřebnou pro excitaci emisní spektrální čáry. Prudký pokles absorpce indikuje, že dopadající energie nestačí pro tuto excitaci. Absorpce mimo oblast blízkou absorpční hraně se využívá pro kvantitativní stanovení.

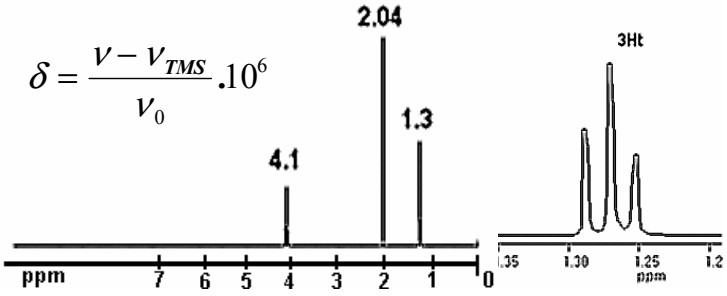
8.5 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)

Izotopy s lichým počtem nukleonů (^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P…), jejichž jádra mají nenulový magnetický moment, lze využít pro analytické účely (typicky pro kvalitativní analýzu organických sloučenin). Vzorek v kapalném stavu se umístí do silného konstantního magnetického pole (viz obrázek) a je ozařován radiovými vlnami ν_0 (frekvence 10-600 MHz). K této základní frekvenci se přidává postupně rostoucí frekvencí řádu 1-100 Hz.

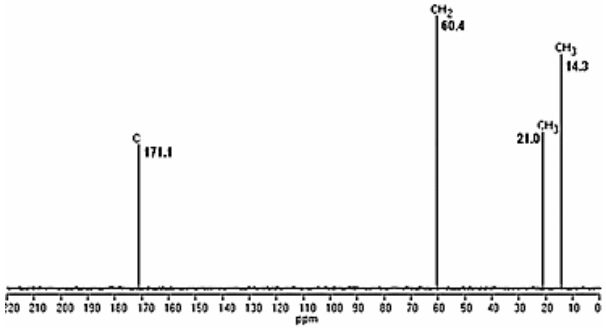


V okamžiku, kdy je energie záření vhodná pro její absorbci jádrem, dojde k rezonanci, tj. příjmání a vysílání kvant energie jádrem. Tuto „poruchu“ elektromagnetického pole detekujeme RF příjmačem a registrujeme. Příslušná energie je charakteristická pro dané jádro (H, C…) a umístění tohoto jádra v celé molekule. Tyto rezonanční frekvence jsou vyjadřovány jako tzv. chemický posun δ v relativní stupnici ppm, 0 je konvenčně přiřazena rezonanci standardní sloučeniny, obvykle je to tetramethylsilan $(CH_3)_4Si$. Protože jádra jsou elektromagneticky „stíněna“ elektrony, přesná rezonanční frekvence je ovlivněna nejen elektrony příslušného atomu, ale i přítomností elektronů nejbližších sousedních atomů (např. elektrofilní atomy zvyšují stínění u svých jader a snižují stínění u okolních), jemná struktura spekter NMR vypovídá právě o sousedních atomech H (viz obrázek – 1H-NMR spektrum ethylacetátu, vpravo detail signálu 1.3 ppm).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu_0}.10^6$$



U NMR uhlíku ^{13}C je stínění jader sousedními atomy C prakticky vyloučeno, protože většina atomů uhlíku je ^{12}C, tzn. neaktivních (přirozené zastoupení ^{13}C je 1%). Interakce s jádry vodíku se dá také technicky jednoduše eliminovat a získáváme tak velmi jednoduchá spektra (viz obrázek – 13C-NMR spektrum ethylacetátu). Na druhou stranu i absolutní intenzita těchto signálu bude velmi nízká, proto potřebujeme citlivější příjmač.



8.6 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Ačkoli se v hmotnostní spektrometrii (mass spectroscopy/spectrometry, MS) nejedná o spektrometrii ve smyslu UV-VIS, IČ, neboť přijímaná energie molekulu ionizuje a rozbíjí, i zde vzniká "spektrum" z fragmentů podle poměru hmotnosti (m) a náboje (z).

Princip: Analyt v plynné fázi (vysokém vakuu) převádíme na ionty nejčastěji bombardováním elektrony. Vznikají ionty a některé molekuly se zároveň rozpadají na menší seskupení atomů. Pohyb elektrickým polem udílí iontům rychlost, při stejném náboji (nejčastěji 1+) jsou lehčí ionty rychlejší a těžší pomalejší. Ionty se pohybují v tak vysokém vakuu, že před jejich dopadem na detektor nedojde ke srážce s jinou molekulou anebo iontem. Nejčastějším způsobem ionizace je Electron Impact (EI+), elektronové dělo s energií elektronů 70 eV, tj. 6 750 kJ/mol (energie chemické vazby v organických sloučeninách = 200-540 kJ/mol). Velmi účinná ionizace je v plasmě (ICP).

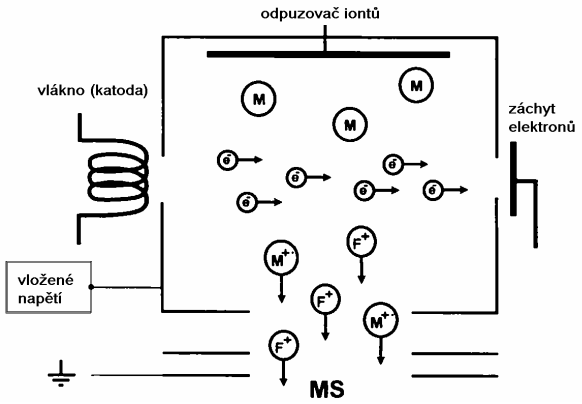
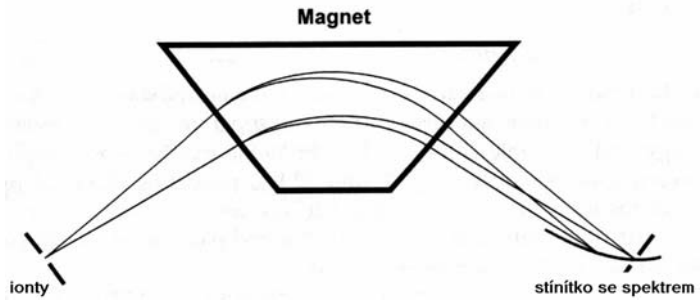
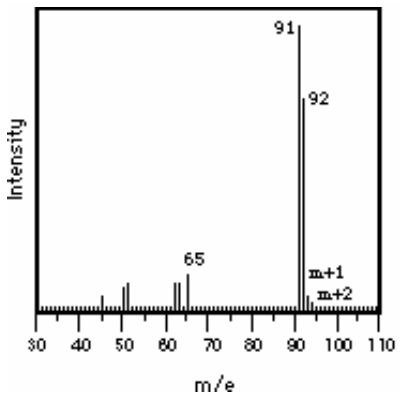
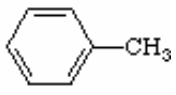


schéma ionizace: $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet}$ (*ionradikál*) $+ 2e^- \rightarrow$ (fragmentace, přesmyky.....)

Nabité fragmenty se klasicky separují v magnetickém poli (viz obrázek) - letící ionty jsou v magnetickém poli různě vychylovány ze svého původního směru letu. Jejich vychýlení závisí na hmotnosti a na rychlosti iontu, to je informací pro kvalitativní analýzu. Zaregistrované množství iontů o stejném m/z vypovídá o kvantitativním složení vzorku (viz spektrum toluenu C7H8, M=92, m+1 jsou fragmenty s izotopy 13C nebo 2H, m+2 fragmenty s oběma). Spektrum se zobrazuje na stínítku detektoru. Technicky nenáročným detektorem je např. fotografická deska.







Hmotové spektrometry s analyzátorem TOF (Time of Flight) zaznamenávají četnost dopadajících iontů v závislosti na době jejich dopadu na (polovodičový) detektor. V kvadrupolovém spektrometru letí ionty mezi 4 tyčemi, protilehlé tyče jsou elektricky spojeny a na tyče je vkládána kombinace vhodného stejnosměrného a střídavého (vysokofrekvenčního) napětí. Měnící se elektrické pole způsobí náraz většiny iontů na kovové tyče a na detektor dopadne jediný druh iontů, ionty o stejném poměru m/z.

V analýze organických molekul jsou nejdůležitější tzv. molekulární ionty, to jsou ionty vzniklé odštěpením elektronu z molekuly analytu (m/z pak ukazuje přímo M); identifikace iontů vzniklých rozpadem molekuly je složitější. Proto byla pro řešení obtížného problému analýzy velkých, lehce fragmentovatelných molekul pomocí MS navržena technika MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization): makromolekuly (např. bílkoviny) ve směsi s pevnou, snadno těkavou matricí se ozáří lejzrovým pulzem. Záření excituje molekuly matrice (převede je do energeticky bohatšího stavu) a ty při srážce s makromolekulou předají energii dostatečnou pro ionizaci, avšak nedostačující pro rozštěpení makromolekuly na fragmenty. Většinu energie lejzru tedy pohltí matrice, ta se v okolí makromolekul vypaří a makromolekuly se tak ocitnou v plynné fázi.

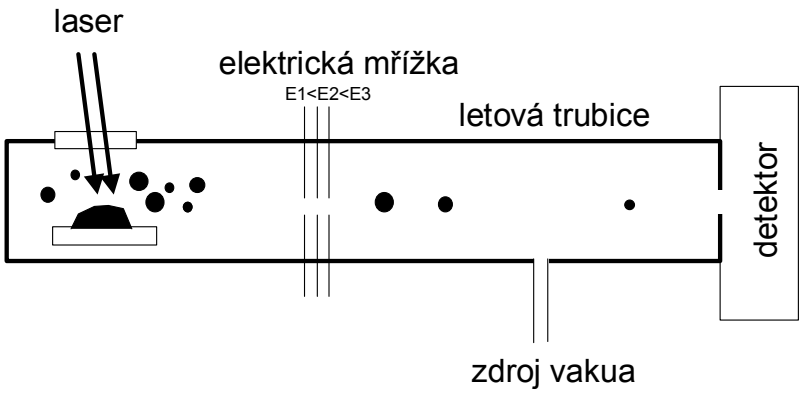


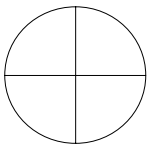
Schéma MALDI s detektorem time-of-flight (TOF)

9. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU

9.1 ODBĚR VZORKU

Z materiálu, jehož chemické složení zjišťujeme, odebíráme malou část (vzorek) a tu analyzujeme. Je třeba, aby složení odebraného vzorku bylo stejné jako celého materiálu o jehož složení má analýza informovat; pouze tehdy poskytne výsledek analýzy požadovanou výpověď. Poměrně zřídka analyzujeme dokonale homogenní materiál, ze kterého stačí odebrat jen malé množství vzorku, jen tolik, kolik je třeba k analýze.

Analyzujeme-li nestejnorodý materiál, je třeba odebrat větší množství vzorku a dbát na to, abychom jsme získali REPREZENTATIVNÍ VZOREK, tzn. aby vzorek měl stejné složení jako materiál určený k analýze. Tak například máme zadáno stanovit obsah železa v železné rudě z jednoho naleziště vzdáleného řádově 1000 km. Ruda byla přivezena k vysoké peci v mnoha železničních vagónech jednoho vlaku. Již v místě těžby nabíraný materiál nemá zcela jednotné složení. Během otřesů při dlouhém transportu nastane rozdrcení křehčích kusů rudy a menší kusy se setřesou na dno vagónu. Je oprávněný předpoklad, že větší, nerozbité (pevnější) kusy rudy, ty které otřesy vynesly do horních vrstev nákladu, mají jiné složení než než drobný štěrk a prach na dně vagónu. Pro vytvoření reprezentativního vzorku je třeba odebírat různě veliké kusy z různých (horních, prostředních, dolních) vrstev nákladu a dbát na to, aby jejich zastoupení v odebraném vzorku bylo stejné jako v celém vagónu. Pro charakteristiku nákladu celého vlaku rudy nestačí odebrat vzorek z jediného vagónu, musíme to udělat z několika vagónů. Výsledkem je vzorek o hmotnosti mnoha desítek kilogramů. KVARTACE je postup, kterým postupně zmenšujeme množství vzorku. Celý vzorek rozprostřeme stejnoměrně (na každém místě je stejné zastoupení různě velikých částic rudy) na plochu, tu rozdělíme na 4 stejně veliké části. Materiál ze 3 částí odvrhneme, ten ze čtvrté části rozemeleme na menší částice a znovu kvartujeme a meleme až zůstane méně než cca 500 g vzorku. Asi 100g takto upraveného vzorku po vysušení (platí se za železo, ne za matrici a vlkost) putuje do laboratoře k analýze a zbytek se uschová pro případ, že by bylo třeba analýzu opakovat.



Příklad: *Pro zjištění obsahu živin v zemědělské půdě odebíráme vzorky z řady míst rozesetých po celém pozemku. Odebíráme půdu jen z takové hloubky pod povrchem, ve které má ona konkretní rostlina své kořeny. Ke vzorkování se používá speciální trubka, tu zabodneme svisle do země a po vytažení z ní vytlačíme materiál ve kterém jsou stejně zastoupeny vrstvy z různých hloubek. Pro takovou analýzu není podstatný celkový obsah analytů, význam má pouze ta část, kterou dovede rostlina získat z půdy. Proto vzorek půdy loužíme vhodným roztokem (modelujeme interakci kořenů s půdou) a v extraktu provádíme stanovení.*

Pro stanovení analytů ve velmi nehomogenních vzorcích bereme k vlastnímu stanovení několikanásobně větší navážku než pro stanovení v homogeních vzorcích. Pro ilustraci této skutečnosti poslouží primitivní představa: náš vzorek je směs černých a bílých kuliček v poměru 1:10. Odebereme-li veliký vzorek (1000 anebo více kuliček), najedeme poměr 1:10. Při odběru menšího vzorku (např. 30 kuliček) nalezneme poměr blízký 1:10 a pro malý vzorek (např. 5 kuliček) není vůbec možné nalézt správnou hodnotu 1:10. Např. materiál na skládce komunálního odpadu je zcela nehomogení, z takového materiálu je prakticky nemožné odebrat skutečně reprezentativní vzorek. Bylo by to možné pouze tehdy, kdybychom celý obsah skládky pořádně promíchali (homogenizovali) a to není v praxi realizovatelné.

Metodika odebírání vzorků pro materiály významné v praxi je podrobně popsána v příslušných normách. Pokud neexistuje norma na odběr vzorku určitého materiálu, hledáme inspiraci v normách pro vzorkování materiálů podobných: např. u tvrdých materiálů je třeba počítat s určitým otěrem mlecího zařízení, u plynných vzorků je nutno vzhledem k difúzi vyloučit dlouhodobé skladování těkavých složek. Vzorky biologického původu při skladování mohou měnit své složení, mohou v nich probíhat různé procesy za účasti (vzniku) bakterií, plísní a pod., skladujeme je při snížené teplotě. U kapalných vzorků (např. pitná voda) ovlivní jejich složení i sorpce stopových příměsí na stěnách nádoby, ve které vzorek uchováváme. Odběr vzorku je součástí procesu analýzy a analytik by měl zhodnotit adekvátnost odběru vzorku a jeho skladování dříve, než začne vlastní analýzu.

9.2 ROZPOUŠTĚNÍ VZORKU

Analýzu vzorku bez jeho poškození (bez narušení povrchu) je možno provésti jen omezeným počtem metod, např. rentgenovou fluorescencí anebo neutronovou aktivační analýzou (NAA). Při aktivační analýze ozařujeme vzorek neutrony, vzniknou radioisotopy a vyhodnocujeme typ (alfa, beta, gama), poločas a intenzitu jejich záření. Pevný jemně rozemletý vzorek ve vodné suspenzi lze přímo vnášet do atomizéru v atomové absorpční analýze. Avšak ve většině případů je třeba vzorek napřed rozpustit a roztok analyzovat. Po rozpuštění vzorku obvykle roztok doplníme po značku v odměrné baňce a pro vlastní stanovení bereme alikvotní část (alikvot, např. 25 ml z odměrky na 250 ml). Proces rozpouštění urychlíme rozmělněním vzorku, zvýšením teploty a mícháním. Rozpustnost většiny látek se zvětší při zvýšení teploty, avšak pozor na zvýšený únik těkavých složek jako CO_2 nebo NH_3 za vyšší teploty. Nejčastěji používané rozpouštědlo je voda. I při rozpouštění ve vodě může dojít ke změně analytu, např.:

$$SO_3 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$$

Pokud se vzorek nerozpustí ve vodě, použijeme vhodné činidlo k jeho převedení na sloučeniny rozpustné ve vodě. Ovšem pozor:

1/ v roztoku vzorku se objeví i složky činidla, které v původním vzorku nemusely být obsaženy

2/ pro stanovení chloridů nebudeme vzorek rouzpouštět v HCl. Teoreticky by bylo možné k rozpuštění použít známé množství HCl a odečíst je od výsledku analýzy, ale toto řešení je naprosto nevýhodné. To proto, že na rozpuštění by bylo třeba nepochybně mnohem větší množství HCl než kolik je chloridu ve vzorku. Výsledek analýzy by v tomto případě byl nepřesný, představoval by malý rozdíl dvou velikých hodnot: sumu chloridů z činidla a ze vzorku mínus chloridy z činidla.

3/ přídavek činidla ke vzorku může způsobit ztrátu některé ze složek vzorku. Např. při rozpouštění $CaCO_3$ ve zředěné HCl vytěká z roztoku CO_2.

4/ při rozpuštění vzorku může nastat změna stavu analytu, např. sloučeniny železa v oxidačním stupni 2+ při rozpuštění v kyselině chlorovodíkové se snadno oxidují (vzdušným kyslíkem) na Fe(III).

Zředěná silná kyselina (HCl) rozpouští oxidy kovů (CuO, ZnO) a soli slabých kyselin ($CaCO_3$, FeS ...), převádí je na ve vodě rozpustné chloridy. Přežíhaný oxid hlinitý se nerozpustí ve vodném roztoku kyseliny, k jeho převodu na sůl rozpustnou ve vodě použijeme kyselé tavení: práškovitý vzorek promícháme s nadbytkem $KHSO_4$ a tavíme v platinovém kelímku. V tavenině za zvýšené teploty vzniká kyselina sírová reakcí

$$2\ KHSO_4 \rightarrow H_2SO_4 + K_2SO_4$$

a tato kyselina při vysoké teplotě (cca 500 ^oC) převádí na síran i ty látky, které s vodným roztokem kyseliny nereagují anebo reagují neúplně.

Sůl slabé kyseliny CuS se nerozpustí ve zředěné HCl protože vazba Cu-S je velmi pevná. Přídavkem oxidovadla (např. Br_2) se zoxiduje sulfidická síra a dojde k rozpuštění v kyselině. Podobně lze provádět i kyselé oxidační tavení např. ve směsi hydrogensulfátu a persulfátu draselných.

Převážně kyselinotvorné oxidy (SiO_2, WO_3 ...) zkoušíme rozpustit v alkalických roztocích (např. NaOH) a pokud neuspějeme, použijeme alkalické tavení se sodou (v Pt kelímku)

$$SiO_2 + Na_2CO_3 \rightarrow Na_2SiO_3 + CO_2$$

při kterém z taveniny uniká CO_2. Tavenina NaOH má vyšší alkalitu (lépe reaguje s kyselinotvornými sloučeninami) než tavenina Na_2CO_3. Avšak v tavenině NaOH dochází ke korozi kovové Pt, proto tavíme v levnějších niklových kelímcích a musíme počítat s korozí niklu, v tavenině se objeví jeho sloučeniny. Alkalické oxidační tavení lze realizovat ve směsi hydroxidu a peroxidu sodných.

Některé ve vodě nerozpustné (špatně rozpustné) organické molekuly přejdou do vodného roztoku po převedení na ionty. Tak např. aminy se rozpouštějí v kyselinách, karboxylové sloučeniny a fenoly v bazickém prostředí. Jiná možnost převodu hydrofobních organických molekul do vodného

roztoku (koloidního roztoku) je jejich solubilizace (viz kapitola 4), uzavření do micel tvořených povrchově aktivními látkami (=tenzidy).

Pro převedení do vodného roztoku používáme i redoxní reakce (kovové železo přejde do roztoku po oxidaci na Fe^{2+} při rozpouštění v H_2SO_4):

$$Fe + 2\ H^+ \rightarrow H_2 + Fe^{2+}$$

a reakce tvorby komplexů, např. $Cu(OH)_2$ se rozpustí ve zředěném amoniaku a AgCl v ustalovači (v roztoku $Na_2S_2O_3$). Při leptání (rozpouštění) skla vodným roztokem HF probíhá reakce

$$SiO_2 + 6\ HF \rightarrow H_2SiF_6 + 3\ H_2O$$

a za zvýšené teploty, pokud zabráníme hydrolýze (vodu vážeme přídavkem konc. H_2SO_4) uniká plyn SiF_4: $SiO_2 + 4\ HF \rightarrow SiF_4 + 2\ H_2O$

9.3 SEPARACE ANALYTU Z MATRICE

Při stanovení řady analytů ruší přítomnost složek matrice, k jejich eliminaci využíváme separační techniky (viz kapitola 6) např. srážení, destilaci, extrakci a sorpci z roztoku na pevné fázi. Zvláštním případem takové separace je mineralizace vzorku při stanovení anorganických komponent v organickém materiálu. Mineralizaci, rozklad organických složek oxidací, provádíme buď spálením na suché cestě anebo oxidací v roztoku. Před spálením je vhodné zvlhčit vzorek roztokem dusičnanu hořečnatého; při spalování vzniká MgO, který zvětšuje svůj objem a tím vytváří póry ve spalovaném materiálu, ten je lépe přístupný vzdušnému kyslíku a rychleji se spálí. Zároveň dusičnan z $MgNO_3$ tepelným rozkladem uvolňuje kyslík. Po takovém spálení zůstane netěkavá pevná fáze (popel) a většina původního organického materiálu přejde do plynné fáze.

Mineralizaci na mokré cestě provádíme obvykle v kyselém prostředí za zvýšené teploty. V koncentrované kyselině sírové (nikoli ve zředěném vodném roztoku) probíhá v omezené míře její redukce na SO_2. Koncentrovaná kyselina sírová je slabé oxidovadlo ale může též odebírat z organické molekuly vodu, roztok zčerná vyloučeným elementárním uhlíkem. Vymizení černé barvy indikuje zoxidování podstatné části organického materiálu. Po tomto odbarvení pokračujeme v zahřívání (5-10 min), aby se zoxidovala i poslední stopová množství uhlíku, ta, která už zrakem nepostřehneme. Oxidace samotnou kyselinou sírovou nemá praktický význam, výhodnější je použít směs kyselin sírové a dusičné. Za vyšší teploty HNO_3 se rozkládá a těká, H_2SO_4 je mnohem stálejší, proto během mineralizace dodatečně přidáváme pouze kyselinu dusičnou.

Mineralizace živočišných tkání (maso, salám) spalováním na suché cestě je nepříjemná a oxidace ve směsi H_2SO_4 + HNO_3 postupuje velmi pomalu. Pro tuto oxidaci byla navržena kyselina chloristá, která však snado vytváří třaskavé organické sloučeniny. Bezpečný postup je tento: vzorek rozemletého masa naložíme přes noc do směsi kyselin dusičné a sírové. Druhý den směs zahřejeme a po kapkách přidáváme koncentrovanou kyselinu chloristou. Pozorujeme místo dopadu těchto kapek a tvoří-li se tam obláčky zeleného chlóru znamená to, že směs má dostatečně vysokou teplotu, při níž se kyselina chloristá rozkládá. V takovém případě pokračujeme v přidávání kyseliny chloristé po kapkách až do úplné mineralizace (odbarvení). Pokud se při dopadu kapky kyseliny chloristé zelený obláček chlóru neobjeví, je směs málo zahřátá, musíme přerušit přidávání kyseliny, dále zahřívat a potom opět zkusíme přidat jedinou kapku $HClO_4$.

Zvláštním případem mineralizace je postup při KHJELDAHLIZACI, používáné pro stanovení dusíku v organických sloučeninách. Při zahřívání organické látky v kyselině sírové (přidáváme katalyzátor, např. selen) oxiduje se uhlík na CO_2 a organicky vázaný dusík se zároveň redukuje na čpavek, v kyselém prostředí vzniká kation NH_4^+. Tímto způsobem přechází na amonium snadněji dusík z aminů než dusík, na který je vázán kyslík např. v nitro skupině. Přídavek sloučeniny obsahující dostatek vodíku (glukóza) umožňuje kvantitativní převod na čpavek i u látek, v jejichž molekule je nedostatek vodíků.

10. CHYBY. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY

10.1 CHYBY MĚŘENÍ

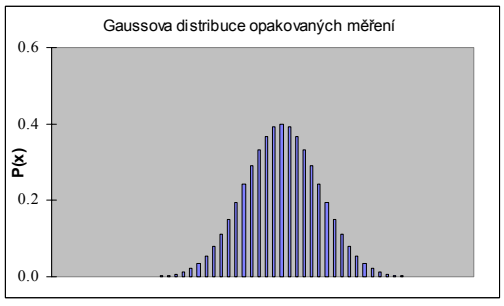
Chyby měření dělíme na chyby hrubé, systematické a náhodné. HRUBÉ CHYBY mají svůj původ v nekvalitním vybavení a podmínkách pro měření, v nedostatečném zaškolení a pečlivosti práce měřících pracovníků. Hrubá chyba může být způsobena třeba nedostatečným promytím sraženiny, nepřesným doplněním odměrné baňky po značku, špatně seřízeným měřícím zařízením, kontaminací vzorku v prostředí laboratoře, záměnou vzorků, chybou v umístění desetinné čárky během výpočtu atd. Hrubé chyby mohou být eliminovány na minimum dodržováním podmínek správné laboratorní praxe (viz kapitola 10.3).

Příkladem SYSTEMATICKÉ CHYBY při titraci je barevný přechod indikátoru, který nenastal přesně v ekvivalenci anebo nikoli zanedbatelná rozpustnost sraženiny ve vážkové analýze. Systematickou chybu eliminujeme použitím kalibrační křivky (graf závislosti naměřeného signálu na známých množstvích analytu). Systematická chyba se projevuje pouze u ABSOLUTNÍCH METOD ANALÝZY (vážková a odměrná analýza, coulometrie), tj. u metod, kde přepočteme naměřený signál na množství (koncentraci) analytu pomocí obecně známých konstant (stechiometrických, Faradayův náboj ...) a vztahů, tedy u metod, kde pro vyhodnocení výsledku analýzy nepoužíváme aktuální kalibrační graf.

NÁHODNÝMI CHYBAMI je zatížen výsledek každého měření. Budeme-li např. opakovaně měřit šířku stolu (60.00 cm) kovovým měřítkem s vyznačenými milimetrovými dílky a budeme-li odhadovat i desetiny milimetru, naměřené hodnoty nebudou identické, budou rozptýleny v nějakém intervalu a budou blízko oněm 60 cm (např. 60.05, 59.92, 59.96, 60.06, 60.02 cm). Náhodnou chybou v chemické analýze je například přetitrování v případě, kdy k dosažení ekvivalence stačila 1/4 poslední kapky, ale přidali jsme kapku celou. Nebo je to náhodná chyba odměrného nádobí, kde má výrobce povolenou toleranci objemu, ta je řádu ± setiny mililitru pro baňku 100 ml (viz tabulka v 10.2). A i při pečlivém doplňování pipety po značku a vypouštění roztoku z pipety se nevyhneme určité chybě v dávkovaném objemu, navíc nepracujeme vždy při teplotě, pro kterou pipeta byla kalibrována. Náhodné chyby vznikají také při odhadu v odečítání desetin nejmenšího dílku na měřidle, zde se může uplatnit i individuálně odlišný přístup různých pracovníků. Statistické zpracování výsledků analýzy představuje snahu o nalezení správného výsledku stanovení, popř. druhu chyb a vyjádření jejich velikosti

10.2 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Opakovaně mnohokrát jsme změřili jednu veličinu a dostali jsme statistický soubor n hodnot Xi. Tyto hodnoty seřadíme podle velikosti, nejmenší označíme X_1 a největší Xn, jejich průměr je ∅. Tento soubor můžeme graficky znázornit tak, že na vodorovnou osu nanášíme naměřené hodnoty Xi a na svislou osu údaj, kolikrát jsme tu kterou hodnotu Xi naměřili. Pro dostatečně veliký počet měření dostaneme Gaussovu křivku s maximem při Xi = ∅. Tato křivka má tvar zvonu a svislá přímka procházející maximem je její osou symetrie.



Význačnou charakteristikou souboru je směrodatná odchylka s. Čím menší je s, tím více hodnot Xi je v těsné blízkosti ∅, tím výše je maximum Gaussovy křivky a tím blíže jsou si body se stejnou ypsilonovou souřadnicí na křivce před a za maximem. SMĚRODATNÁ ODCHYLKA (anglicky standard deviation) je mírou PŘESNOSTI MĚŘENÍ. Čím menší směrodatná odchylka, tím blíže jsou jednotlivé hodnoty Xi průměru ∅, tím přesnější je měření. Přesný v hovorové mluvě představuje opak přibližného, ve statistickém pojetí však přesnost charakterizuje rozptyl naměřených hodnot při opakovaném měření. Svislá osa charakterizuje pravděpodobnost, se kterou naměříme hodnotu Xi. Platí, že v intervalu Xi = ∅ ± 0,67s se nachází 50 %, v intervalech Xi = ∅ ± 1s, Xi = ∅ ±

2s a Xi = ∅ ± 3s se nachází 67, 95,5 a 99,7% ze všech naměřených hodnot Xi. Z této distribuce vychází velká většina statistických metod. Odhad směrodatné odchylky jednotlivého měření vypočteme ze vzorce

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \varnothing\right)^2}$$ (pozn. v MS Excelu je to funkce =*smodchvy*)

sumarizujeme od i=1 až po i=n. Pro výpočet směrodatné odchylky bychom místo ∅ měli použít správnou hodnotu. Protože ve většině případů tato správná hodnota není známa, nahrazujeme ji dostupnou veličinou ∅ (viz standardní materiály, kapitola 10.4). Směrodatnou odchylkou obvykle rozumíme směrodatnou odchylku jednotlivého měření, směrodatná odchylka průměru s(∅) = s / √n

se používá při vyjadřování intervalu spolehlivosti výsledku (viz dále). Relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation, RSD, variační koeficient) je

$$\%\,RSD = \frac{s}{\varnothing}.100$$

Výše uvedený vzorec používáme pro výpočet směrodatné odchylky z velkého (statistického, asi tak více než 20 hodnot) souboru měření. Pro výpočet odhadu směrodatné odchylky z malých souborů (typicky do 7 hodnot) byl navržen vzorec (statistika Dean-Dixonova)

$s_R = k_n R$

kde R je rozpětí, tj. rozdíl mezi největší a nejmenší naměřenou hodnotou, $R=X_n-X_1$, a k_n je konstanta pro n-četný soubor. Hodnoty k_n uvádí tabulka:

Dean-Dixon (a<=7):

n	kn
2	0.8862
3	0.5908
4	0.4857
5	0.4299
6	0.3946
7	0.3698

$$s_R = k_n . R$$

rozpětí R

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$

Při opakovaném měření jsou stejně pravděpodobné kladné i záporné nahodilé chyby, a proto čím více paralelních měření, tím menší nahodilou chybou je zatížen jejich průměr. Tato skutečnost se zobrazí i na závislosti hodnoty k_n na n (viz tabulka). Při zvětšování počtu paralelních měření hodnota k_n se postupně zmenšuje, v oblasti malého počtu měření je tento pokles větší než pro veliká n. V chemické analýze znamená opakování měření provést celou analýzu začínající navážkou, rozpuštěním vzorku, atd. až do zaznamenání signálu opakovaně. Vzhledem k náročnosti (časové, materiálové) opakovaných analýz je považováno za dostatečné provést 3, maximálně 5 paralelních stanovení.

Vylučování odlehlých hodnot

Znalost směrodatné odchylky dovoluje VYLOUČIT ODLEHLÉ HODNOTY z našeho souboru, tedy ty, které jsou zatíženy HRUBOU chybou. Vypočteme veličiny (Grubbsův T-test)

$T_{s,n} = (X_n - \varnothing)/s^*$ $\qquad$ $T_{s,1} = (\varnothing - X_1)/s^*$

kde s*=s.(n-1)/n (pozn. v Excelu je to funkce =*smodch*) a porovnáme je s tabelovanými kritickými hodnotami pro n-četný soubor a určitou pravděpodobnost (např. 95%). Pokud je hodnota $T_{s,1}$ nebo $T_{s,n}$ větší než tabelovaná kritická hodnota T (viz tabulka) pro daný počet měření, potom s

n	T(α=0,05)
3	1.412
4	1.689
5	1.869
6	1.996
7	2.093
8	2.172
9	2.237
10	2.294
11	2.343

uvedenou pravděpodobností (95%) lze označit extrémní hodnotu (X_1 nebo X_n) za odlehlou a vyloučit ji z našeho souboru. Tím dostaneme soubor nový, pro který opět budeme testovat odlehlost největší a nejmenší naměřené hodnoty X_n a X_1. Toto testování lze samozřejmě použít pro soubory o minimálně 3 členech.

Byl navržen i odlišný způsob vylučování odlehlých výsledků (Q-test podle Dean-Dixona):

vypočteme veličiny $Q_n = (X_n - X_{n-1})/R$ a $Q_1 = (X_2 - X_1)/R$

a porovnáme je s tabelovanými hodnotami. V obou případech porovnáváme poměr: v čitateli je v prvém případě rozdíl mezi extremní hodnotou a průměrem, v druhém případě mezi dvěma extremními naměřenými hodnotami, buď největšími anebo nejmenšími. Ve jmenovateli je pak charakteristika přesnosti měření, buď směrodatná odchylka anebo jí úměrné rozpětí (porovnej $s=k_nR$). Na podobném principu můžeme posoudit i shodnost výsledků měření stejné veličiny prováděné: i/ dvěma různými metodami, ii/ dvěma různými pracovníky nebo iii/ na dvou různých pracovištích. Vypočteme hodnotu zlomku, kde v čitateli je rozdíl nalezených výsledků a ve jmenovateli jsou směrodatné odchylky anebo rozpětí, a porovnáme hodnotu vypočtenou s tabelovanou.

Dean-Dixonův Q-test

$$Q_i = \frac{x_i - x_{i-1}}{R}; i = 2, n$$

n	Q(α=0,05)		Q(α=0,05)
3	0.941	7	0.507
4	0.765	8	0.468
5	0.642	9	0.467
6	0.560	10	0.412

Interval spolehlivosti

Vypočetli jsme průměrnou hodnotu ∅ a směrodatnou odchylku *s* ze souboru s omezeným počtem *n* členů, tento průměr nemusí být totožný s průměrem, který bychom získali z velikého počtu měření. INTERVAL SPOLEHLIVOSTI PRŮMĚRU je interval, ve kterém leží s určitou pravděpodobností (nejčastěji používáme 95%) průměr získaný z velikého (statistického) počtu měření. Pro interval spolehlivosti průměru použijeme vzorec (hodnoty t_α jsou tabelovány pro určitou pravděpodobnost)

n	t(α=0.05)
2	12.706
3	4.303
4	3.182
5	2.776
6	2.571
7	2.447
8	2.365
9	2.306
10	2.262
11	2.228

$$L = \varnothing \pm s\frac{t_\alpha}{\sqrt{n}}$$

alternativně lze pro velmi malé n použít statistiku Dean-Dixonovu

$$L = \varnothing \pm K_n R$$

Hodnoty K_n pro n měření a určitou pravděpodobnost jsou také tabelizovány (viz tabulka).

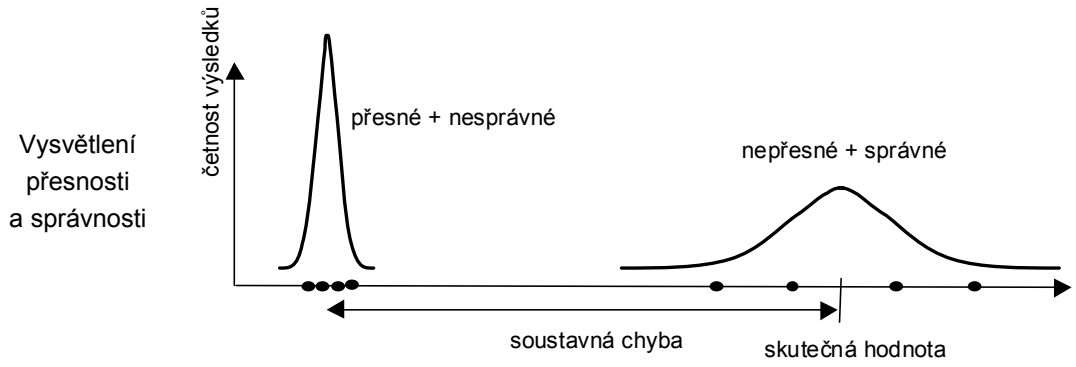
Dean-Dixon (n<7):

$$L = \bar{x} \pm K_n^\alpha . R$$

n	K(α=0.05)
2	6.40
3	1.30
4	0.92
5	0.51
6	0.40
7	0.33

Některé pojmy:

ABSOLUTNÍ CHYBA je rozdíl hodnoty nalezené a hodnoty správné. O kladné chybě mluvíme, je-li nalezená větší než správná. Absolutní chyba charakterizuje SPRÁVNOST výsledku, u správných výsledků je malý rozdíl mezi hodnotami nalezenou a správnou. RELATIVNÍ CHYBA je stonásobek chyby absolutní dělený správnou hodnotou, relativní chyba vychází v procentech. Není-li známa správná hodnota, nahradíme ji průměrem a takto vypočtená chyba vypovídá o jeho PŘESNOSTI, nikoli o správnosti výsledku. Výsledky analýzy mohou být přesné a přitom nesprávné!!



Směrodatná odchylka charakterizující přesnost se může lišit, je-li měření prováděno stejným pracovníkem na stejném zařízení se stejnými roztoky ve stejném dni anebo měřilo-li několik různých pracovníků, měřilo-li se na různých zařízeních anebo v různých laboratořích, anebo na stejném zařízení ve stejné laboratoři, ale v různých dnech a s různými (po vypotřebování nově připravenými) roztoky.

CITLIVOST je poměr změny velikosti signálu ku změně velikosti koncentrace (množství) analytu, kvantitativní charakteristikou citlivosti je směrnice kalibrační křivky. Nejmenší množství, které analýzou ještě postihneme, udává limit detekce (=MEZ DŮKAZU, limit of detection, LOD) pro kvalitativní metody a LIMIT STANOVENÍ (limit of quantitation, LOQ) pro kvantitativní postupy. Limit detekce konkrétní analytické metody můžeme vypočítat z kalibrační křivky a opakovaně naměřeného signálu blanku: vypočítáme takovou koncentraci (množství) analytu, jejíž signál je roven signálu blanku S_B plus 3 směrodatné odchylky tohoto signálu, LOD=S_B+3s_B. Pravděpodobnost, že signál vzorku bez analytu je větší než S_B+3s_B je pouze asi 0,15% (viz charakteristika Gaussovy křivky), je tedy velmi nepravděpodobné, že signál větší než S_B+3s_B by nepatřil analytu. Limit stanovení analytické metody je vždy větší než LOD, obvykle S_B+10s_B. Vyvíjíme-li analytickou metodu pro zadavatele, je (relativní) směrodatná odchylka, případně limit stanovení požadavkem, jehož splnění (nesplnění) takto testujeme.

Přítomnost složek matrice může ovlivnit signál analytu. Naměříme-li větší či menší signál než jaký by dával ve stejném množství samotný analyt za nepřítomnosti matrice, mluvíme o RUŠENÍ. Rozdíl mezi signálem samotného analytu a stejným signálem za přítomnosti rušící komponenty se obvykle zvětšuje se vzrůstem koncentrace rušící složky. Koncentraci (nebo množství) rušící komponenty, která vyvolá maximální (ale pro nás ještě akceptovatelný) rozdíl signálů analytu bez a s matricí, označujeme jako mez rušení.

Číselný výsledek měření se uvádí na několik DESETINNÝCH MÍST. **Na kolik?** Je zřejmé, že každá metoda (vážení, měření objemu nebo elektrického potenciálu atd.) má svou "přesnost" (lépe řečeno nejistotu hodnoty). Právě tato nejistota určuje smysluplnost desetinných míst (platných číslic) výsledků. Nejistotu přístrojů udává výrobce (např. u mechanických analytických vah ±0.2 mg, elektronických ±0.05 mg) nebo ji můžeme *odhadnout* ze zkušenosti (např. v běžné byretě odečítáme s přesností ±0.01 ml). Proto nemá smysl udávat např. výsledky měření objemu v běžné byretě na víc než setiny ml (4.56 ml).

Používame-li při stanovení více metod / kroků a určujeme veličinu Y (např. hmotnost analytu po opakovaném vážení, odměřování alikvotu a následné titraci), můžeme naši nejistotu *kvantifikovat*, protože chyby každého kroku se v konečném výsledku projeví podle tzv. kumulace chyb (s je absolutní, s_r relativní směrodatná odchylka):

$$Y = x_1 \pm x_2 \rightarrow s_Y = \sqrt{s_1^2 + s_2^2} \qquad Y = x_1 . x_2 , Y = \frac{x_1}{x_2} \rightarrow \%\, s_{rY} = \sqrt{\%\, s_{r_1}^2 + \%\, s_{r2}^2}$$

$$Y = x^{\pm a} \rightarrow s_{rY} = a * s_r \qquad obecně \rightarrow s_Y^2 = \sum \left(\frac{\partial Y}{\partial x_i} \right)^2 s_{xi}^2$$

Předem tedy můžeme odhadnout, jakou přibližnou chybu lze u celého analytického postupu (operace) očekávat. Podle toho udáváme konečný výsledek stanovení (**výslednou absolutní směrodatnou odchylku *s* zaokrouhlujeme na 2 platné číslice**). Mezivýpočty (na kalkulačce) ale nezaokrouhlujeme (byla by to další nepřesnost - chyba)! Abychom do udávaných vzorců mohli zahrnout běžně udávanou toleranci nádobí či vah, použijeme vzorec s = udávaná tolerance/√3.

***Příklad**:* Standardizace (určení přesné koncentrace) 10 mM titračního roztoku na navážku v přesné byretě. Postup: 1x diferenčně navažujeme asi 5 mg (m_0 *(lodička)*~5 g), měříme spotřebu roztoku v byretě (asi 5 ml) v bodě ekvivalence podle barevného přechodu indikátoru.

- rel. chyba dvojího vážení vážení ≈ 100* [0.2^2/3 +0.2^2/3]^0.5 /5005 mg=**0.003%** (P=0,20 mg)

- rel. chyba určení spotřeby (1 kapka ≈ 0.02 ml, dále subjektivní chyba určení bodu ekvivalence + chyba indikátoru ≈ 0.02 ml = 0.04 ml) ≈ 100*0.04 ml/5 ml=**0.80 %**

přesnou koncentraci budeme počítat podle vzorce k**m/V* (dělení), očekáváme tedy celkovou rel. chybu [(0.003)^2+(0.8)^2]^0.5 **≈ 0.80%**. Absolutní směrodatná odchylka (přesnost stanovení) je tedy **s=0.080 mmol/l**. Stanovenou průměrnou přesnou koncentraci (=titr) proto uvádíme na **tisíciny** přibližné hodnoty (např. c=10.231 mmol/l, s=0.080 mmol/l), podobně interval spolehlivosti c=(10.231±0.061) mmol/l. **POZOR!** Je-li tato hodnota pouze mezivýpočtem, dále používáme **nezaokrouhlenou** hodnotu, jako např. faktor titračního roztoku f ($c=c_{přibl}.f$), např. f=1.0231 či 0.9871.

Pozn.: V chemické praxi se ovšem často uvádějí všechny hodnoty na dvě desetinná místa (většinou nesprávně) resp. na počet desetinných míst o jedno větší, než ukazuje první platná číslice směrodatné odchylky (rozumné).

Tabulky udávané nejistoty při běžných operacích

vážení:

m [mg]	S [mg]	S-1 [mg]	P [mg]	20	0.014	0.035	0.070
1000	0.054	0.10	0.20	10	0.014	0.030	0.060
500	0.025	0.08	0.16	5	0.014	0.028	0.055
100	0.025	0.05	0.10	3	0.014	0.026	0.052
50	0.014	0.042	0.085	2	0.014	0.025	0.050
30	0.014	0.038	0.075	1	0.014	0.025	0.050

měření objemu:

byrety:

objem (ml)	dílek	chyba (ml)
5	0.01	0.01
10	0.05/0.02	0.02
25	0.1	0.03
50	0.1	0.05
100	0.2	0.1

plastové mikropipety:

0,5-**2** %

Hamiltonky:

1%

pipety:

objem (ml)	chyba (ml)
0.5	0.006
1	0.006
2	0.006
3	0.01
4	0.01
5	0.01
10	0.02
15	0.03
20	0.03
25	0.03
50	0.05
100	0.08

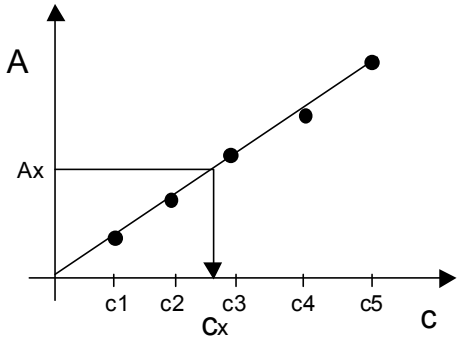
odměrné baňky:

objem (ml)	chyba (ml)
1	0.02
2	0.02
5	0.02
10	0.02
25	0.03
50	0.05
100	0.08
200	0.1
250	0.12
500	0.2
1000	0.3
2000	0.5

10.3 KALIBRACE. REGRESNÍ KŘIVKA

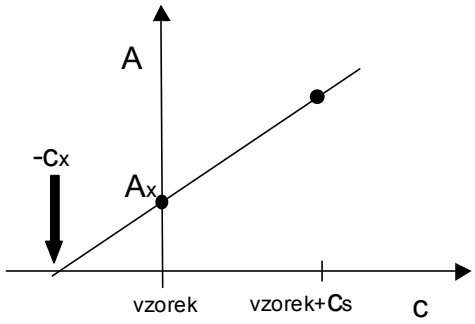
Kalibrace znamená konstrukci závislosti analytického signálu na známém množství analytu (obvykle graficky). Tento postup není nutný vždy: třeba u gravimetrie zvážíme vysušenou sraženinu, jejíž stechiometrický vzorec známe a tudíž víme, že analytu tam je vždy 42.57%, hmotnost sraženiny M přímo říká, že hmotnost analytu bude m=0.4257 x M. Podobně u volumetrické analýzy (titrace) obvykle nejprve určíme přesnou koncentraci odměrného roztoku a pak zjištěný objem odměrného roztoku do bodu ekvivalence určuje přímo množství (koncentraci) analytu: x = k * V, protože přesně víme, jak daná reakce probíhá (výpočtem určíme výsledek stanovení).

U drtivé většiny instrumentálních metod (fotometrie, chromatografie….) se však nespoléháme na tabulkové hodnoty molárních absorpčních koeficientů nebo jiných odezvových faktorů našeho detektoru, abychom hledanou koncentraci z analytického signálu přímo vypočítali, protože pracujeme třeba při jiném pH, v jiném rozpouštědle, při jiné teplotě, přístroj má jinou optickou celu…atd. (anebo taková hodnota prostě ani tabelována není), čili pro kvantitativní analýzu používáme **kalibraci**. Často je používaná metoda kalibrační křivky: musíme mít k dispozici standard, z něhož připravíme roztoky několika různých koncentrací, nejméně 3, obvykle 5 a u nich změříme (opakovaně, bežně 3x) intenzitu analytického signálu (absorbanci, napětí…). Ze signálu vzorku Ax pak odečteme množství analytu cx.



Metoda kalibrační křivky

V případech, kdy matrice ovlivňuje analytický signál, lze s výhodou použít metodu standardního přídavku (viz také kapitola o UV VIS): změříme signál vzorku Ax, přímo do něj přidáme známé množství analytu, jako bychom připravili roztok koncentrace cx, a opět změříme signál (přidávané množství nesmí řádově převyšovat množství stanovované!). Směrnice přímky spojující tyto dva body (bodů může být i více) odpovídá směrnici kalibrační křivky, graficky vlastně hledáme -cx, tj. jakou koncentraci cx bychom museli ze vzorku odstranit, aby vzorek poskytl nulový signál.



Metoda standardního přídavku

LINEÁRNÍ REGRESE

$$Y = mX + b$$

$$m = \frac{\left(\sum x\right).\left(\sum y\right) - n\sum xy}{\left(\sum x\right)^2 - n\sum x^2}$$

$$b = \frac{1}{n}\left(\sum y - m\sum x\right)$$

Metoda regresní analýzy pomáhá proložit **n** kalibračními body **[x, y]** "nejlepší" křivku. Často požadujeme, aby tento graf byl lineární (pokud to lze očekávat nebo splnit). Pak rovnici takovéto přímky (Y = m X + b) lze spočítat. V MS Excelu existuje funkce LINREG, která může poskytnout následující tabulku 2x5 polí:

m	b	**2.7**	**-3.2**
sm	sb	0.2	0.6
R2	syx	0.991837	0.4
F	stupvol	243	2
ssreg	ssres	36.45	0.3

Statistický parametr R (korelační koeficient, pozor! Excel počítá R^2) charakterizuje, jak těsně je přímka proložena kolem experimentálních bodů (hodnota 1 znamené maximální závislost Y na X):

$$R = \frac{n.\sum xy - \left(\sum x\right).\left(\sum y\right)}{\sqrt{\left[n\sum x^2 - \left(\sum x\right)^2\right].\left[n\sum y^2 - \left(\sum y\right)^2\right]}}$$

10.4 SPRÁVNÁ LABORATORNÍ PRAXE

Chceme-li minimalizovat výskyt hrubých chyb v provozu analytické laboratoře, je třeba zavést do veškerého dění pečlivost a pořádek (systematičnost). Každý pracovník dostane přesně vymezené úkoly, za jejichž realizaci nese odpovědnost, a podrobné instrukce pro jejich provádění, musí mít pro tyto úkoly dostatečnou kvalifikaci. Na pracovišti jsou vymezeny prostory pro jednotlivé operace (skladování vzorků, rozklady kyselinami, umývání nádobí atd.), je zajištěna potřebná čistota prostorů s různým určením a je zamezen přístup nepovolaným osobám. V předem stanovených intervalech se provádí kontrola správnosti funkce všech přístrojů, tuto zajišťují buď určení interní pracovníci anebo externí servismani. Systematické chyby minimalizujeme tak, že analýzy se provádějí postupy předepsanými normou. Tyto postupy prošly při schvalování normy přísnou kritikou a byly odsouhlaseny jako optimální za současného stavu technického rozvoje (někdy později se nepochybně objeví metody lepší).

Zápisy o prováděné práci (protokol) se vedou předepsaným způsobem, srozumitelným dalším pracovníkům (viz zástup v době nemoci nebo dovolené). Tyto protokoly jsou též předepsaným způsobem archivovány. Vedoucí pracovníci kontrolují kvalitu práce odváděné jejich podřízenými (zadávají kontrolní vzorky o známém složení). Na základě písemného materiálu o souboru takových opatření a kontrole laboratoře provedené komisí expertů je laboratoři udělen akreditační certifikát platný v České republice a perspektivně i v Evropské unii. Atestovaná laboratoř prokazuje svoji trvale dobrou úroveň analýzou kontrolních vzorků, které jsou jí periodicky zadávány institucí s právem udělovat akreditaci. Výsledky akreditované laboratoře jsou uznávány za správné např. v soudním řízení, tyto výsledky představují maximální přiblížení správným hodnotám, které můžeme dosáhnout současnými běžnými prostředky.

Správná laboratorní praxe (GLP, good laboratory practice) je výhodná nejen v tom, že přináší kvalitnější informace o chemickém složení vzorku, ale vede také k úsporám. Výrobci finálního produktu odpadá nutnost analyzovat výchozí produkt pokud má spolehlivý údaj o jeho složení od subdodavatele. Při převozu pacienta z jedné nemocnice na operaci do druhé se v té druhé mohou spolehnout na výsledky testů klinické laboratoře první nemocnice a je možné operovat bez zbytečných odkladů; tomuto stavu předcházel dlouhý proces unifikace klinických testů na různých pracovištích, během kterého byly analyzovány kontrolní vzorky (rozesílané z centra) tak dlouho, až bylo dosaženo shodných výsledků.

10.5 STANDARDNÍ MATERIÁLY

Standardní materiály, též standardy, jsou materiály **o známém složení**. Používají se ke konstrukci kalibrační křivky pro metody, u kterých nedovedeme jednoduchým způsobem vyjádřit kvantitativní vztah mezi velikostí registrovaného signálu na množství analytu. Tyto standardy mohou být chemická individua vysoké čistoty (např. kovové stříbro, bezvodý Na_2CO_3, dihydrát kyseliny šťavelové, $PbCl_2$, NaCl ...), ty používáme např. pro přípravu odměrných roztoků na titrace. Je žádoucí, aby standard neměnil své složení (nepodléhal vzdušné oxidaci, nebyl hygroskopický ...).

Vedle chemických individuí existují též standardy jako legovaná ocel, žula, sušené javorové listy, krevní pazma s atestovaným obsahem stopového množství Li ... Výroba takových standardů se provádí takto: výrobce shromáždí určité množství materiálu, zajistí jeho homogenizaci a rozešle vzorky k analýze do několika (5 až 15) renomovaných laboratoří, které mají zkušenosti s chemickým rozborem materiálů tohoto druhu. Je předepsáno vzorky analyzovat několika metodami principiálně odlišnými (titrací, polarograficky, spektrograficky, rentgenovou fluorescencí, vážkově, fotometricky po extrakci, aktivační analýzou atd). Tímto způsobem se analyzují ty složky vzorku, jejichž přesný obsah chceme znát a u ostatních komponent se stanoví jejich obsah spíše jen orientačně. Výsledky získané tímto KRUHOVÝM POKUSEM (anglicky inter-laboratory test) po statistickém zpracování představují maximální možné přiblížení správným hodnotám. Spolu se standardním materiálem se dodává atest se všemi výsledky prováděných analýz včetně charakteristik přesnosti jednotlivých stanovení. Pomocí takového (drahého) standardního materiálu si v laboratoři zanalyzujeme náš pomocný standard a ten používáme pro běžnou, méně náročnou práci.