

# 1. ČO SPÔSOBUJE KYSLOSŤ A ZÁSADITOSŤ RÔZNYCH VODNÝCH ROZTOKOV – MERANIE ICH PH HODNÔT

## TEORETICKÁ ČASŤ

Každý vodný roztok obsahuje  $H^+$  ióny, ktoré sa nevyskytujú vo voľnej forme, ale v roztoku sa nachádzajú v hydratovanej forme (najmä  $H_3O^+$  - oxóniový kation). V závislosti od koncentrácie a typu rozpustených zlúčenín, koncentrácia  $H_3O^+$  vo vodných roztokoch sa môže meniť vo veľmi širokom intervale (1 až  $1 \times 10^{-14}$  mol  $l^{-1}$ ). Samotná voda podlieha autoprotolyze podľa rovnice:



Pre túto rovnicu platí rovnovážna konštanta:

$$K = \frac{a_{H_3O^+} \cdot a_{OH^-}}{a_{H_2O}^2} \quad (2)$$

Keďže aktivita (resp. koncentrácia= $55,5$  mol  $l^{-1}$ ) vody v zriedených roztokoch je v porovnaní s aktivitou  $H_3O^+$  a  $OH^-$  iónov oveľa väčšia, je možné koncentráciu vody považovať za konštantnú a vyjadriť iónový súčin vody ( $K_w$ ):

$$K \cdot a_{H_2O}^2 = K_w = a_{H_3O^+} \times a_{OH^-} = [H_3O^+] \times \gamma_{H_3O^+} \times [OH^-] \times \gamma_{OH^-} \quad (3)$$

V zriedených roztokoch (menej ako  $1 \times 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ ) má koncentrácia a aktivita veľmi podobnú hodnotu z dôvodu, že aktivitné koeficienty sa blížia k jednotke, preto

$$K_w = [H_3O^+] \times [OH^-] \quad (4)$$

Iónový súčin vody je veličina závislá od teploty, pri  $0^\circ C$  má hodnotu  $0,11 \times 10^{-14}$ , pri  $25^\circ C$  je to  $1,01 \times 10^{-14}$ , pri  $50^\circ C$  je to  $5,47 \times 10^{-14}$ . Pokiaľ voda neobsahuje, žiadne látky, ktoré sú schopné  $H^+$  uvoľniť (kyseliny) alebo  $H^+$  prijať (zásady), koncentráciu  $H_3O^+$  určuje autoprotolyza vody a platí, že  $[H_3O^+] = [OH^-]$ . V tomto prípade koncentrácia  $H_3O^+$  je daná odmocninou iónového súčinu vody pre aktuálnu teplotu, pri laboratórnej teplote to je cca.  $1 \times 10^{-7}$  mol  $l^{-1}$ . Keďže koncentrácia  $H_3O^+$  sa môže nachádzať vo veľmi širokom intervale, pre zjednodušenie vyjadrovania bola zavedená (Sørensen) pH stupnica. Absolútne čistá voda má pH rovnajúcu sa 7, pri laboratórnej teplote.

$$pH = -\log a_{H_3O^+} \approx -\log[H_3O^+] \quad (5)$$

Podobne je možné definovať aj pOH:

$$pOH = -\log a_{OH^-} \approx -\log[OH^-] \quad (6)$$

Tab. 1 Koncentrácie  $H_3O^+$ ,  $OH^-$  a hodnoty pH.

$[H_3O^+]$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$1,08 \times 10^{-11}$	$1,24 \times 10^{-12}$
pH	2,05	3,02	4	5	6	7	8	9	10	10,98	11,95
$[OH^-]$	$1,24 \times 10^{-12}$	$1,08 \times 10^{-11}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$

Koncentrácie sú vyjadrené v mol/l.

Pri známej hodnote aktivity  $H_3O^+$  je možné vypočítať aktivitu  $OH^-$  podľa vzorca (3), resp. pri známej hodnote pH je možné vypočítať pOH podľa nasledovného vzorca.

$$pK_w = pH + pOH \quad (7)$$

Prídavkom kyseliny pH klesá, prídavkom zásady pH narastá. Vplyv jednotlivých zlúčenín na pH roztoku závisí jednak od koncentrácie látky a jednak od acidobázických vlastností. Z tohto pohľadu je dôležité poznať vplyv silných a slabých kyselín, silných a slabých báz, kyslých, neutrálnych a zásaditých solí a pH tlmivých systémov na aktuálne pH roztokov.

Pre silné kyseliny a zásady je charakteristické, že prakticky pri všetkých koncentráciách je acidobázická rovnováha (8 a 10) úplne posunutá doprava. To znamená, že analytická (celková) koncentrácia priamo udáva koncentráciu  $H_3O^+$  resp.  $OH^-$ .

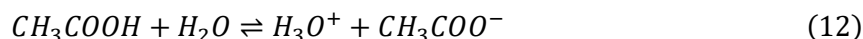


$$pH = -\log a_{HCl} \cong -\log c_{HCl} \quad (9)$$



$$pH = 14 - \log a_{NaOH} \quad (11)$$

Slabé kyseliny sú disociované len čiastočne.



Mieru disociácie udáva disociačná konštanta ( $K_a$ ) – konštanta kyslosti, v zriedených roztokoch má tvar:

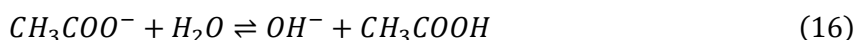
$$K_a = \frac{[H_3O^+] \times [CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} = 1,75 \times 10^{-5} \quad (13)$$

Ak je pomer koncentrácie kyseliny a disociačnej konštanty väčší ako 100, je možné predpokladať, že  $[H_3O^+] = [CH_3COO^-]$  a  $c_{CH_3COOH} = [CH_3COOH]$  a rovnica (13) sa zmení

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \times [H_3O^+]}{c_{CH_3COOH}} = \frac{[H_3O^+]^2}{c_{CH_3COOH}} = 1,75 \times 10^{-5} \quad (14)$$

$$[H_3O^+] = \sqrt{c_{CH_3COOH} \times K_a} \quad (15)$$

V opačnom smere, teda v smere asociácie je to protonizačná konštanta ( $K_b$ ).



$$K_b = \frac{[CH_3COOH] \times [OH^-]}{[CH_3COO^-]} = \frac{[CH_3COOH] \times [OH^-] \times [H_3O^+]}{[CH_3COO^-] \times [H_3O^+]} = \frac{K_w}{K_a} \quad (17)$$

$$K_a \cdot K_b = K_w \quad (18)$$

Slabé zásady (napr. amoniak) sú protonizované len čiastočne. Tabuľková hodnota disociačnej konštanty pre amóniový kation je  $K_a = 5,7 \times 10^{-10}$ .



$$K_b = \frac{K_w}{K_a} = \frac{1 \times 10^{-14}}{5,7 \times 10^{-10}} = \frac{[NH_4^+] \times [OH^-]}{[NH_3]} = 1,75 \times 10^{-5} \quad (20)$$

Ak je pomer koncentrácie bázy a protonizačnej konštanty väčší ako 100, je možné predpokladať, že  $[NH_4^+] = [OH^-]$  a  $c_{NH_3} = [NH_3]$  a rovnica (20) sa zmení

$$K_b = \frac{[OH^-] \times [OH^-]}{c_{NH_3}} = \frac{[OH^-]^2}{c_{NH_3}} = 1,75 \times 10^{-5} \quad (21)$$

$$[OH^-] = \sqrt{c_{NH_3} \times K_b} \quad (22)$$

Dosadením rovnice (22) do rovnice (4) dostaneme koncentráciu  $H_3O^+$  v roztoku slabej bázy.

$$[H_3O^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{K_w}{\sqrt{c_{NH_3} \times K_b}} = \frac{K_w}{\sqrt{c_{NH_3} \times \frac{K_w}{K_a}}} \quad (23)$$

Medzi zásadité soli patria tie, ktoré sú tvorené aniónom slabej kyseliny a kationom silnej zásady, napr. octan sodný. Po ich rozpustení vo vode je pH roztoku spravidla vyššie ako pH čistej vody, kvôli hydrolyze aniónu pri ktorom vznikne  $OH^-$  a nedisociovaná kyselina (16).

Pokiaľ je koncentrácia soli väčšia a 100 násobok  $K_b$  je možné v rovnici (17) nahradiť  $[CH_3COO^-]$  koncentráciou soli ( $c_s$ ) a následne z dôvodu rovnosti  $[CH_3COOH] = [OH^-]$  aj  $[CH_3COOH]$  za  $[OH^-]$ .

$$K_b = \frac{[CH_3COOH] \times [OH^-]}{[CH_3COO^-]} = \frac{[CH_3COOH] \times [OH^-]}{c_s} = \frac{[OH^-] \times [OH^-]}{c_s} = \frac{[OH^-]^2}{c_s} \quad (24)$$

Podobne, ako pri slabých bázach vieme vyjadriť koncentráciu  $H_3O^+$  v roztoku zásaditej soli.

$$[H_3O^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{K_w}{\sqrt{c_s \times K_b}} = \frac{K_w}{\sqrt{c_s \times \frac{K_w}{K_a}}} \quad (25)$$

Katióny slabých báz podliehajú tiež hydrolyze, pri ktorej sa do roztoku uvoľňuje  $H^+$ , preto pH roztoku soli slabej bázy s aniónom silnej kyseliny (napr.  $NH_4Cl$  alebo  $TRIS.HCl$ ) je kyslé.



$$K_a = \frac{[B] \times [H_3O^+]}{[BH^+]} \quad (27)$$

Pokiaľ je koncentrácia soli väčšia ako 100 násobok  $K_a$  je možné nahradiť v rovnici (27)  $[BH^+]$  za  $c_s$  a  $[B]$  za  $[H_3O^+]$ .

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \times [H_3O^+]}{c_s} = \frac{[H_3O^+]^2}{c_s} \quad (28)$$

Tlmivé roztoky sú roztoky, ktoré dokážu eliminovať zmenu pH po prídavku malého množstva kyseliny alebo zásady. Obvykle tlmivé roztoky obsahujú slabú kyselinu a jej soľ alebo slabú bázu a jej soľ. V prípade kyseliny octovej (slabá kyselina) a octanu sodného (soľ) je možné upraviť rovnicu (13) na:

$$[H_3O^+] = K_a \times \frac{[CH_3COOH]}{[CH_3COO^-]} = K_a \times \frac{c_{CH_3COOH}}{c_{CH_3COONa}} \quad (29)$$

$$pH = pK_a - \log \frac{c_{CH_3COOH}}{c_{CH_3COONa}} = pK_a - \log \frac{c_{kydelina}}{c_{sol}} \quad (30)$$

Tlmivý roztok kyseliny octovej – octanu sodného, okrem zmiešania kyseliny a soli, je možné pripraviť aj zmiešaním kyseliny octovej a hydroxidu sodného alebo zmiešaním octanu sodného so silnou kyselinou (napr.  $HCl$ ). Pridaním  $NaOH$  do kyseliny octovej, ekvivalentná časť kyseliny octovej sa zmení na octan, preto  $c_{CH_3COONa} = c_{NaOH}$  a  $c_{CH_3COOH} = c_{CH_3COOH}(\text{počiatočná}) - c_{NaOH}$ . Pridaním  $HCl$  do roztoku octanu sodného, ekvivalentná časť octanu sa zmení na kyselinu octovú, preto  $c_{CH_3COOH} = c_{HCl}$  a  $c_{CH_3COONa} = c_{CH_3COONa}(\text{počiatočná}) - c_{HCl}$ .

V prípade tlmivého roztoku amoniaku (slabá báza) a chloridu amónneho (soľ) je možné upraviť rovnicu (27).

$$[H_3O^+] = K_a \times \frac{[NH_4^+]}{[NH_3]} = K_a \times \frac{c_{NH_4Cl}}{c_{NH_3}} \quad (31)$$

$$pH = pK_a - \log \frac{c_{NH_4Cl}}{c_{NH_3}} = pK_a - \log \frac{c_{sol}}{c_{báza}} \quad (32)$$

Príprava tlmivého roztoku, ktorý obsahuje slabú bázu a jej soľ je možné taktiež tromi spôsobmi. 1) zmiešaním samotnej bázy a soli, 2) zmiešaním bázy a silnej kyseliny (napr. HCl), ktorá časť bázy zmení na soľ a 3) zmiešaním soli a silnej zásady, ktorá časť soli zmení na bázu. Pri postupe č. 2 bude platiť, že  $c_{sol} = c_{HCl}$  a  $c_{báza} = c_{báza}(\text{počiatočná}) - c_{HCl}$ . Pri postupe č.3 bude platiť, že  $c_{báza} = c_{NaOH}$  a  $c_{sol} = c_{sol}(\text{počiatočná}) - c_{NaOH}$ .

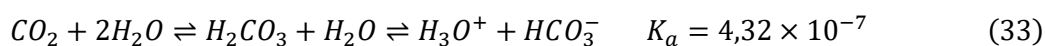
Tlmiaca schopnosť tlmivých roztokov spočíva v tom, že po prídavku kyseliny alebo zásady sa nemení priamo koncentrácia  $H_3O^+$ , ale len pomer disociovej a nedisociovej formy tlmivého systému. Množstvo prídavku kyseliny alebo zásady bez významnej zmeny pH tlmivého roztoku závisí tak od koncentrácie kyseliny a soli tvoriaci tlmivý systém, ako aj od ich pomeru. Tento parameter tlmivého roztoku sa nazýva tlmiaca kapacita. Najväčšia tlmivá kapacita je vtedy, ak je pomer soli a kyseliny, resp. soli a bázy jednotkový, teda ak pH tlmivého roztoku sa rovná  $pK_a$ .

Za určitých podmienok, najmä ak charakter rozpustených látok (napr. neutrálne soli) alebo koncentrácia látok vyvolá v koncentrácií  $H_3O^+$  voči čistej vode len malé zmeny, môže mať veľký vplyv na výsledné pH roztoku  $CO_2$  absorbovaný zo vzduchu do vody použitej pri príprave roztoku. Podľa rovnováhy (33) je možné odhadnúť pH čistej vody, ak vieme koncentráciu kyseliny uhličitej, resp. pomocou experimentálne zistenej hodnoty pH odhadnúť koncentráciu kyseliny uhličitej (34), vid' tabuľku 2.

Tab. 2 pH vody v závislosti od koncentrácie  $H_2CO_3$

$c(H_2CO_3)$ (mol l <sup>-1</sup> )	pH vody
$1 \times 10^{-6}$	6,3
$5 \times 10^{-6}$	5,9
$1 \times 10^{-5}$	5,7
$2,5 \times 10^{-5}$	5,5
$6 \times 10^{-5}$	5,3
$1 \times 10^{-4}$	5,2

Podľa *Henryho zákona*, ak vzduch obsahuje 387 ppm  $CO_2$ , rovnovážna koncentrácia vo vode bude  $1,3 \times 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>.



$$[H_3O^+] = \sqrt{c_{H_2CO_3} \times K_a} \quad (34)$$

Živé organizmy sú založené na báze vody, čo znamená, že do veľkej miery závisia od rôznych rovnováh, najmä od acidobázickej rovnováhy. Dôvody, prečo je dôležité zaujímať sa o pH v biologických systémoch: (1) súvisí s mnohými problémami v bunkovej biológii, (2) funkčné skupiny schopné prijať alebo odovzdať protón sa nachádzajú v makromolekulách (napr. bielkoviny), ako aj v malých molekulách (napr. aminokyseliny, amíny, karboxylové kyseliny), (3) prostredie bunky je vždy pufrované (tlmené) tlmivým roztokom na pH približne 7, (4) rôzne experimenty (napr. enzymatické testy, kultivácie buniek) vyžadujú určité pH, (5) pH vody určuje rozpustnosť (množstvo, ktoré sa môže rozpustiť vo vode) a biologickú dostupnosť (množstvo, ktoré môže vodný život využiť) chemických zložiek, napr. živín (fosfor, dusík a uhlík).

Pri súčasných možnostiach výpočtovej techniky existuje množstvo zdrojov, ktoré pomáhajú pri riešení rôznych úloh súvisiacich s chémiou. V oblasti acidobázických rovnováh takou pomôckou je súbor pre program MS Excel voľne dostupná na stránke [http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot\\_.html](http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html).

V praxi sa najčastejšie používajú dve metódy stanovenia pH roztokov: (1) semikvantitatívne (približné) stanovenie pomocou indikátorov a (2) rovnovážna potenciometria pomocou sklenej elektródy. Indikátory pH sú slabé kyseliny, ktoré majú v disociovanom stave (po odovzdaní protónu) inú farbu, ako v nedisociovanom stave. Môžu sa použiť vo forme roztoku alebo napustené v papierovom prúžku. Kvapalná forma indikátorov pH sa zvyčajne pridáva priamo do roztokov, papierová forma sa na len krátku chvíľu ponorí do roztoku vzorky alebo pomocou pomôcky (napr. sklenej tyčinky, pipety) kvapne 1-2 kvapiek vzorky na papierik. Hodnota pH sa určuje vizuálne porovnaním farby vzorky resp. papierového prúžku s tabuľkou farba/pH. Univerzálne indikátorové papieriky sú impregnované zmesou viacerých indikátorov.

Rovnovážna potenciometria je elektroanalytická metóda, ktorá využíva fakt, že potenciál niektorých indikačných elektród je logaritmicou funkciou aktivity príslušného iónu alebo pomeru aktivít oxidovanej a redukovanej formy konkrétnej látky a to v závislosti od typu použitej indikačnej elektródy. Tento potenciál sa dá vyjadriť pomocou Nerstovej rovnice. Na priame stanovenie koncentrácie látky sa takmer výlučne používajú ión selektívne indikačné elektródy (ISE). Charakteristickou vlastnosťou ISE je, že jej potenciál závisí prakticky len od aktivity konkrétneho iónu. V skutočnosti, potenciál ISE ovplyvňujú aj iné ióny (interferenty) ale v oveľa menšej miere ako ión, pre ktorý je ISE skonštruovaná.

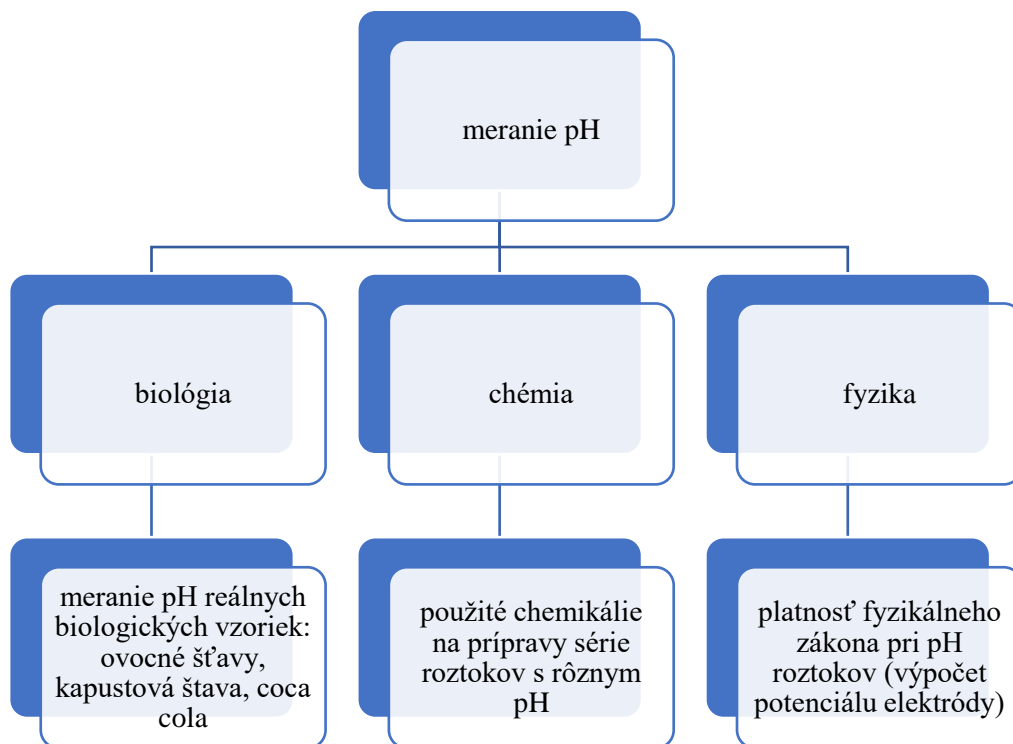
Priame stanovenie koncentrácie  $\text{H}_3\text{O}^+$  rovnovážnou potenciometriou, je založené na meraní rovnovážneho potenciálu cely zloženého zo sklenej (ISE) a argentochloridovej (referenčná) elektródy v bezprúdovom stave. Vyžaduje to špeciálne meracie zariadenie s veľkým vnútorným odporom.

Najdôležitejšia časť sklenej elektródy je sklená membrána zo špeciálneho skla o hrúbke približne 50  $\mu\text{m}$ , ktorá je hydratovaná na oboch stranách v hrúbke niekoľko desiatok nm. Pre potenciál sklenej elektródy platí:

$$E = K' - k \cdot \frac{2,3 \cdot RT}{nF} \cdot \text{pH} \quad (35)$$

Stanovenie  $K'$  (úsek) a  $k$  (korekčný faktor teoretickej smernice) je predmetom kalibrácie, čiže merania potenciálu aspoň dvoch roztokov so známymi hodnotami pH. Moderné prístroje dokážu sami rozpoznať zo zadaného zoznamu roztokov ten, do ktorého je elektróda ponorená a taktiež po dokončení kalibrácie zobrazovať priamo hodnoty pH. Teda, potenciál nameraný v neznámych vzorkách je pomocou zistených kalibračných parametrov v zariadení prepočítaný na pH.

V úlohe je možné vidieť prepojenie medzi biológiou, chémiou a fyzikou. Toto prepojenie môžete vidieť na obrázku nižšie:



## EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### Ciele:

1. Zoznámiť sa princípmi stanovenia pH roztokov indikátorovým papierikom a rovnovážnou potenciometriou.
2. Experimentálne zistiť vplyv koncentrácie rôznych elektrolytov (silné kyseliny, slabé zásady, soli) na pH roztoku.
3. Získať experimentálne skúsenosti s prípravou tlmivých roztokov a tlmiacou kapacitou.

### Úlohy

1. Kalibrovat' pH meter podľa návodu na obsluhu.
2. Stanoviť pH vzoriek (napr. džús, minerálna voda, kaputová šŕava, ...) indikátorovým papierikom a rovnovážnou potenciometriou.
3. Pripraviť roztoky HCl s koncentraciami  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť ich pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
4. Pripraviť roztoky KCl s koncentraciami  $1 \times 10^{-2}$ , a  $1 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť ich pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
5. Pripraviť roztok octanu sodného (NaAc) s koncentraciou  $1 \times 10^{-2}$ , stanoviť jeho pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
6. Pripraviť roztoky TRIS s koncentraciami  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť ich pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
7. Pripraviť roztok zmesi HCl a NaAc, kde koncentrácia HCl bude  $5 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> a NaAc  $1 \times 10^{-2}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť jeho pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
8. Pripraviť roztok zmesi HCl a NaAc, kde koncentrácia HCl bude  $5 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> a NaAc  $1 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť jeho pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
9. Pripraviť roztok zmesi HCl a TRIS, kde koncentrácia HCl bude  $5 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> a TRIS  $1 \times 10^{-2}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť jeho pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.
10. Pripraviť roztok zmesi HCl a TRIS, kde koncentrácia HCl bude  $5 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> a TRIS  $1 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>, stanoviť jeho pH a zistiť vplyv prídavku HCl na pH.

### Postup

Na kalibráciu pH metra použijete kalibračné štandardy s pH = 4 a pH = 7 a postupujte podľa návodu k prístroju.



Zmerajte pH dostupných vzoriek pomocou pH papierika a podľa návodu k pH metru a zapíšte do tabuľky 3.

Tab. 3 Stanovené hodnoty pH vzoriek

vzorka	pH (papierik)	pH (prístroj)

Do 50 ml odmernej banky napipetujte vypočítaný objem príslušného zásobného roztoku s koncentráciou  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  (napr. z  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  HCl, z  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  KCl, z  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  NaAc alebo z  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  TRIS) a doplňte deionizovanou vodou po značku. Potrebný objem vypočítajte pred cvičením pomocou vzorca (36) a zapíšte do tabuľky 4. V úlohách (7 – 10), v ktorých pripravujete zmes roztokov, do 50 ml odmernej banky pipetujte vypočítané objemy z oboch zásobných roztokov a doplňte deionizovanou vodou po značku.

$$V_{\text{zásobný}} = \frac{V_{\text{zriedený}} \times c_{\text{zriedený}}}{c_{\text{zásobný}}} \quad (36)$$

Tab. 4 Príprava roztokov.

Úloha	Roztok	Látka	Czriedený (mol l <sup>-1</sup> )	V <sub>zásobný</sub> (ml)
3	3a	HCl	1×10 <sup>-2</sup>	5
3	3b	HCl	1×10 <sup>-4</sup>	0,05
4	4a	KCl	1×10 <sup>-2</sup>	
4	4b	KCl	1×10 <sup>-4</sup>	
5	5	NaAc	1×10 <sup>-2</sup>	
6	6a	TRIS	1×10 <sup>-2</sup>	
6	6b	TRIS	1×10 <sup>-4</sup>	
7	7	NaAc	1×10 <sup>-2</sup>	5
		HCl	5×10 <sup>-3</sup>	2,5
8	8	NaAc	1×10 <sup>-3</sup>	
		HCl	5×10 <sup>-4</sup>	
9	9	TRIS	1×10 <sup>-2</sup>	
		HCl	5×10 <sup>-3</sup>	
10	10	TRIS	1×10 <sup>-3</sup>	
		HCl	5×10 <sup>-4</sup>	

pH pripravených roztokov stanovte rovnovážnou potenciometriou. Meranie pH môže prebiehať priebežne s prípravou roztokov.

- 1) Na stanovenie pH odmerajte 25 ml roztoku odmerným valcom a prelejte do nádobky na meranie pH. Do roztoku ponorte kombinovanú sklenú elektródu a samotné meranie uskutočnite podľa návodu k pH metru. Výsledok zapíšte do tabuľky 5.
- 2) Vyberte elektródu z meracej nádobky, pridajte do roztoku v meracej nádobke 50 µl (0,05 ml) zásobného roztoku HCl s koncentráciou 0,1 mol l<sup>-1</sup>, čím navýšite koncentráciu HCl v roztoku o 2×10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> (vzorec 37).

$$c_{\text{zriedený}} = \frac{V_{\text{zásobný}} \times c_{\text{zásobný}}}{V_{\text{zriedený}}} \quad (37)$$

Zmiešajte roztok sklenou tyčinkou, ponorte elektródu do roztoku a znova zmerajte pH. Výsledok zapíšte do tabuľky 5.

- 3) Vyberte elektródu z meracej nádobky a opláchnite deionizovanou vodou. Vypláchnite meraciu nádobku pod tečúcou vodovodnou vodou a následne aj deionizovanou vodou. Opláchnite sklenú tyčinku pod tečúcou vodovodnou vodou

a následne aj deionizovanou vodou. Vypláchnite odmerný valec pod tečúcou vodovodnou vodou a následne aj deionizovanou vodou.

4) Opakujte body 1-3 s ďalšími roztokmi.

Teoretické pH uvedené v tabuľke 5 vypočítajte pomocou vzorcov:

i. roztoky 3a, 3b – vzorec (9)

ii. roztok 5 – vzorec (25) a (5)

iii. roztoky 6a, 6b – vzorec (23) a (5)

iv. roztoky 7, 8 – vzorec (30)

v. roztok 9, 10 – vzorec (32)

$K_a(\text{CH}_3\text{COOH})=1,75 \times 10^{-5}$ ,  $pK_a(\text{CH}_3\text{COOH})=4,76$

$K_a(\text{TRIS})=8,41 \times 10^{-9}$ ,  $pK_a(\text{TRIS})=8,08$

Tab. 5

Roztok	Látka	c (mol l <sup>-1</sup> )	pH (teoretické)	pH (stanovené)	pH (po prídavku HCl)	delta pH
3a	HCl	$1 \times 10^{-2}$				
3b	HCl	$1 \times 10^{-4}$				
4a	KCl	$1 \times 10^{-2}$	7			
4b	KCl	$1 \times 10^{-4}$	7			
5	NaAc	$1 \times 10^{-2}$				
6a	TRIS	$1 \times 10^{-2}$				
6b	TRIS	$1 \times 10^{-4}$				
7	NaAc	$1 \times 10^{-2}$				
	HCl	$5 \times 10^{-3}$				
8	NaAc	$1 \times 10^{-3}$				
	HCl	$5 \times 10^{-4}$				
9	TRIS	$1 \times 10^{-2}$				
	HCl	$5 \times 10^{-3}$				
10	TRIS	$1 \times 10^{-3}$				
	HCl	$5 \times 10^{-4}$				

delta pH = pH (po prídavku HCl) - pH (stanovené)

## NÁVOD NA OBSLUHU pH METRA PASCO



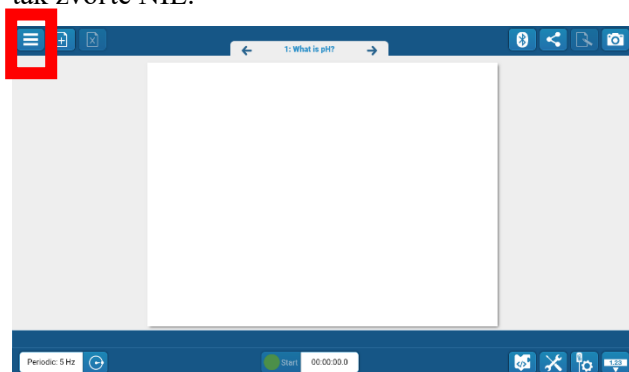
Na vypnutie alebo zapnutie senzora stlačte gombík na zapínanie, na 1-5 s, **podoprite prítom senzor zo zadnej strany, aby nedošlo k poškodeniu**. Senzor je pripravený na Bluetooth párovanie so zariadením (telefón, tablet), na ktorom je nainštalovaný program SPARKvue, ak na indikátore pri symbole s Bluetooth bliká červené svetlo. Úspešné párovanie signalizuje blikajúce zelené svetlo.

### Otvorenie programu SPARKvue a nastavenie modulu na meranie pH



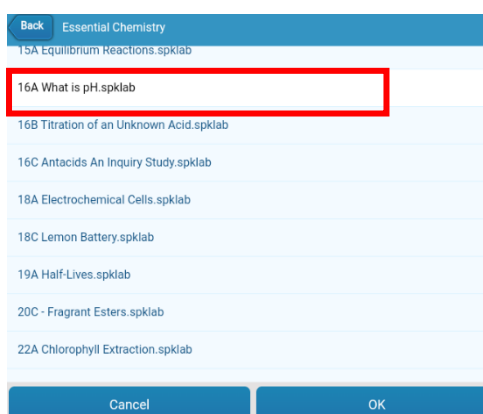
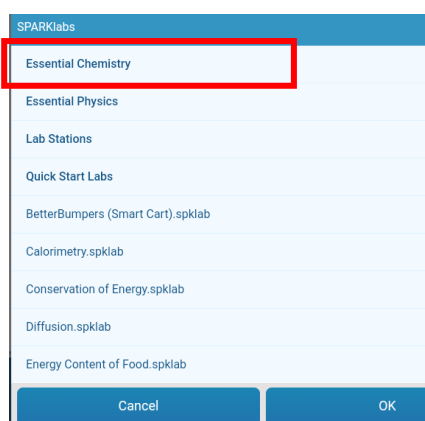
Z pracovnej plochy tabletu otvoríme program SPARKvue kliknutím na ikonu .

Na úvodnej obrazovke (Obr. 2) klikneme na „Menu“ v ľavom hornom rohu a zvolíme si „Experiments ...“ (Obr. 3). Následne si zvolíme „Essential Chemistry“ a potom experiment číslo 16A „What is pH“, ktoré potvrdíme OK (Obr. 4). Pokiaľ sa na displeji objaví dotaz, či chcete uložiť predchádzajúce zmeny tak zvolíte NIE.




Obr. 2. Úvodná obrazovka programu SPARKvue.

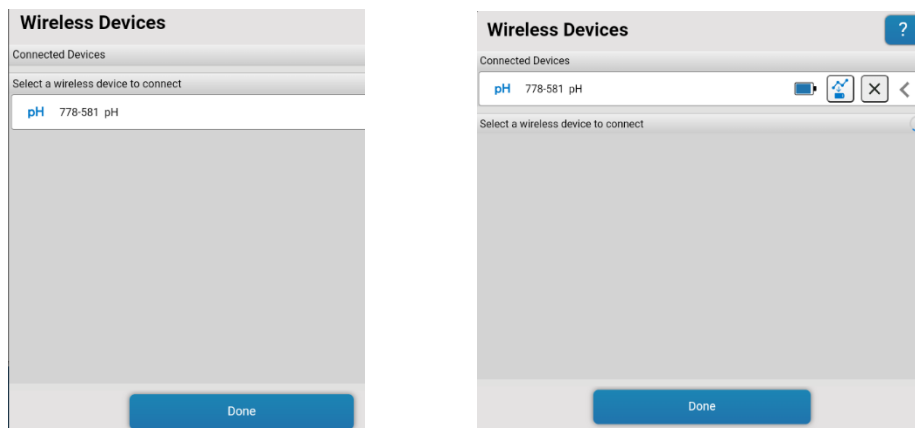
Obr. 3 Menu v programe SPARKvue



Obr. 4 Zvoliteľné experimenty podľa oblasti využitia (vľavo) a experimenty v chémii (vpravo)


## Bezdrôtové pripojenie pH senzoru k tabletu

Po nastavení modulu na meranie pH, v pravom hornom rohu displeja zvolíme ikonu Bluetooth „“ spojenia. Na displeji sa zobrazia senzory pripravené na párovanie cez Bluetooth, dostupné v dosahu tabletu (Obr. 5, vľavo). Vyberieme ten, pri ktorom je rovnaké identifikačné číslo, ako je na senzore, ktoré chceme spárovať. Úspešné pripojenie senzora a tabletu sa zobrazí na displeji (Obr. 5 vpravo).

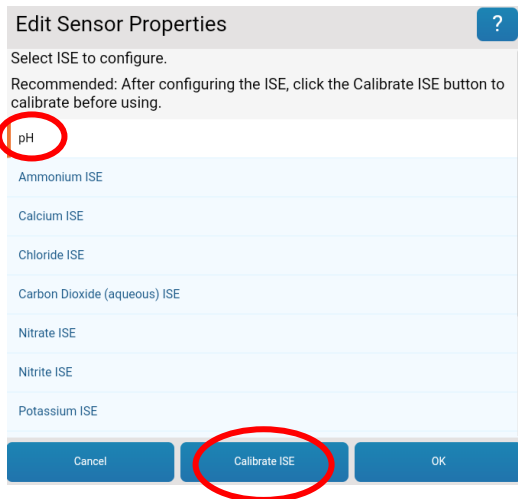


Obr. 5 Bezdrôtové pripojenie Pasco senzoru na meranie pH.

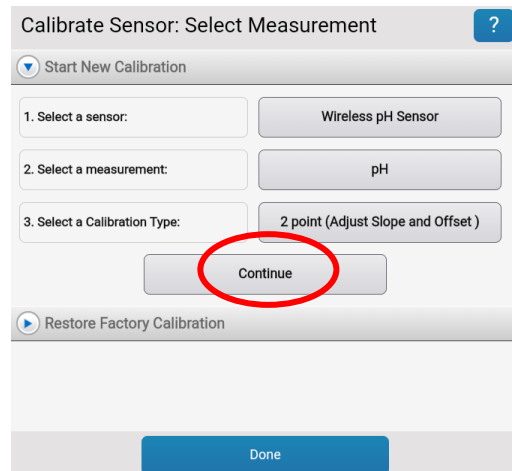
## Kalibrácia pH metra

Modul na kalibráciu pH metra otvoríme ikonou  vpravo dole. Na otvorenej záložke „Hardware Setup“ zvolíme „Configure ISE“, následne „pH“ a „Calibrate ISE“ (Obr. 6). Zobrazí sa okno znázornené na Obr. 7 a keď sú parametre totožné s obrázkom zvolíme „Continue“. Odmontujeme nádobku so skladovacím roztokom z elektródy (odsrutkujeme od vrchnáka), odložíme na bezpečné miesto, aby sa roztok KCl nevyliat. Elektródu opláchneme pomocou stričky deionizovanou vodou. Zľahka odsajeme vodu z elektródy papierovou utierkou a ponoríme elektródu do kalibračného roztoku s pH 4. Skontrolujeme nastavenú hodnotu pH prvého kalibračného bodu, ktorá má byť 4. Počkáme, kým potenciál cely zo senzora bude mať približne stabilnú hodnotu v mV, vtedy zvolíme „Set Calibration“ pre prvý kalibračný bod. Elektródu opäť pomocou stričky opláchneme deionizovanou vodou, zľahka odsajeme vodu z elektródy papierovou utierkou a ponoríme elektródu do kalibračného roztoku s pH 7. Skontrolujeme nastavenú hodnotu pH druhého kalibračného bodu, ktorá má byť 7. Počkáme, kým potenciál cely zo senzora bude mať približne stabilnú hodnotu v mV a zvolíme „Set Calibration“ pre druhý kalibračný bod. Parametre kalibračnej priamky **smernicu (Slope)** a **úsek (Offset)** zistíme kliknutím na šípku pred „New Calibration“. Kalibračný modul opustíme kliknutím na „OK“ a záložku „Hardware Setup“ schováme kliknutím na šípku.

Elektródu vyberieme z kalibračného roztoku, opäť opláchneme deionizovanou. **Elektróda nesmie byť dlho na vzduchu, nesmie sa vysušiť!!**





Obr. 6 Výber modulu na kalibráciu pH



Obr. 7 Výber spôsobu kalibrácie pH metra

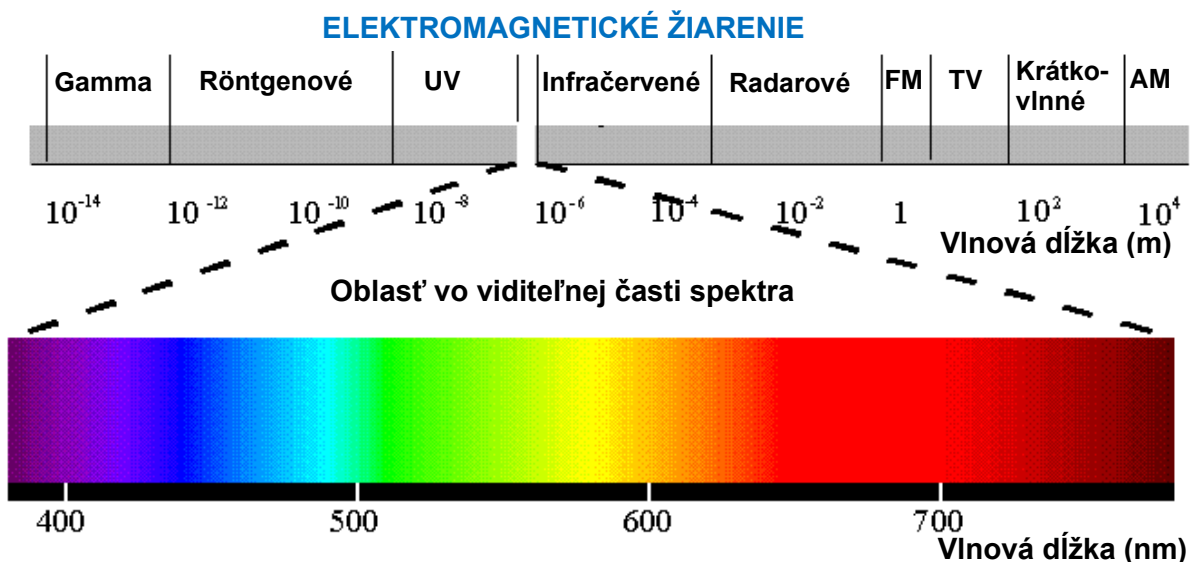
### Meranie pH

Do nádoby na meranie pH nalejeme vzorku. Elektródu vyberieme zo skladovacieho roztoku, do nádoby „odpad“ opláchneme deionizovanou vodou, papierovou utierkou z nej zľahka odsajeme vodu a elektródu ponoríme do roztoku vzorky. Na displeji, dole v strede, zvolíme „Start“ . Po niekoľkých sekundách bude zobrazené pH roztoku v strede displeja. Po ustálení hodnoty pH zvolíme „Stop“  a **zapišeme pH do poznámok**. Po skončení práce s pH metrom opláchneme elektródu deionizovanou vodou, ponoríme do skladovacieho roztoku, nádobku zaskrutkujeme do vrchnáka a vypneme senzor aj tablet.

## 2. FAREBNOSŤ PRÍRODNÝCH LÁTOK A ABSORBANCIA ELEKTROMAGNETICKÉHO ŽIARENIA

### TEORETICKÁ ČASŤ

Pojmom optické metódy sa označuje súbor fyzikálno-chemických metód, ktorých spoločným znakom je sledovanie javov pri interakcii hmoty s elektromagnetickým žiarením. Tento názov pochádza ešte z obdobia, kedy sa v analytickej praxi využívalo prevažne elektromagnetické žiarenie vo viditeľnej časti spektra. V súčasnosti sa súbor optických metód rozrástol o postupy pracujúce s elektromagnetickým žiarením v podstatne širšom rozsahu vlnových dĺžok, a to od žiarenia röntgenového až po rádiovlnové. Na obrázku 1 je znázornené celé spektrum elektromagnetického žiarenia.



Obr. 1. Spektrum elektromagnetického žiarenia

### ROZDELENIE OPTICKÝCH METÓD:

1. **Spektrálne**, ktoré sú založené na výmene energie medzi látkou a žiarením. **Spektrum** je závislosť veličiny, ktorá je mierou intenzity žiarenia vysielaného alebo prejdenného cez vzorku napríklad pri určitej vlnovej dĺžke žiarenia -  $\lambda$ .
2. **Nespektrálne**, kde sa nesleduje výmena energie medzi látkou a žiarením, ale sledujú sa zmeny niektorých vlastností žiarenia (napríklad: zmena rýchlosti žiarenia, otáčanie roviny polarizovaného svetla a rozptyl svetla).

## ROZDELENIE SPEKTRÁLNYCH OPTICKÝCH METÓD:

### 1. podľa typu interakcií elektromagnetického žiarenia:

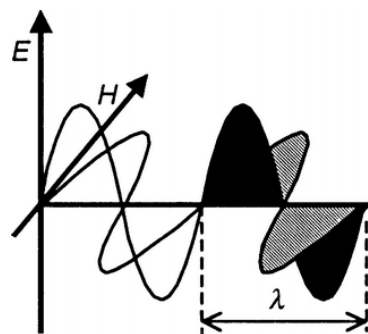
- a) s atómami (atómová absorpčná resp. emisná spektrometria a atď...),
- b) s molekulami (molekulová absorpčná spektrofotometria a atď...).

### 2. podľa pôvodu analytického signálu na metódy:

- a) emisné - atómy, alebo molekuly emitujú (vysielajú) žiarenie,
- b) absorpčné - atómy, alebo molekuly absorbujú (pohlujú) žiarenie,
- c) fluorescenčné - atómy, alebo molekuly absorbujú a vzápätí emitujú žiarenie,
- d) rezonančné - pri vysielaní žiarenia s premenlivou frekvenciou sa niektoré frekvencie zosilnia.

Pre pochopenie základných dejov pri interakcii elektromagnetického žiarenia s látkou je potrebné vedieť, že elektromagnetické žiarenie má **dualistický charakter**.

1. **Vlnový charakter:** je to vlnenie zložené z **elektrického poľa** (oscilácia vektora elektrického poľa  $E$ ) a na neho kolmého **magnetického poľa** (oscilácia vektora magnetického poľa  $H$ ). Kde **vlnová dĺžka**,  $\lambda$  je lineárna vzdialenosť medzi dvomi bezprostredne za sebou idúcimi maximami resp. minimami (obrázok 2).



Obr. 2. Vlnový charakter elektromagnetického žiarenia

Ďalšie parametre vlny sú:

**Amplítúda**,  $A$  je dĺžka elektrického vektora v maxime vlny.

**Frekvencia (kmitočet)**  $\nu$  je počet oscilácií poľa za jednotku času [ $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$ ]:  $\nu = 1/p$

**Vlnové číslo (vlnočet)**  $\bar{\nu}$  je počet vln pripadajúcich na vzdialenosť rovnú 1 cm:  $\bar{\nu} = 1/\lambda$

2. **Korpuskulárny charakter:** je to tok diskretných častíc - fotónov (svetelných kvánt).

**Fotón** je najmenšie množstvo elektromagnetického žiarenia pri danej frekvencii. Jeho pokojová hmotnosť je nulová.

**Energia fotónu** je daná vzťahom: 
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = mc^2$$

kde,  $h$  - Planckova konštanta  $6,6256 \times 10^{-34}$  J s;  $\nu$  - frekvencia žiarenia;  $c$  - rýchlosť svetla vo vákuu  $2,9976 \times 10^8$  m s<sup>-1</sup> a  $m$  je hmotnosť fotónu.



## MOLEKULOVÁ SPEKTROMETRIA

Molekulová spektrometria predstavuje tú časť spektrometrie, ktorá sa zaoberá meraním a interpretáciou spektier molekúl látok.

### MOLEKULOVÁ ABSORPČNÁ SPEKTROMETRIA V ULTRAFIALOVEJ A VIDITEĽNEJ OBLASTI

Molekulová absorpčná spektrometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (UV-VIS) sa zaoberá meraním a vyhodnocovaním elektrónových absorpčných spektier molekúl látok, ktoré absorbujú elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm. Pri absorpcii UV-VIS svetla dochádza v molekulách látok k excitácii vonkajších (väzbových) elektrónov. Látky, ktoré absorbujú UV žiarenie ( $\lambda < 380$  nm), sa javia ľudskému oku ako bezfarebné látky. Látky, ktoré absorbujú biele slnečné žiarenie (VIS, 380 – 780 nm) sa javia ľudskému oku ako farebné látky.

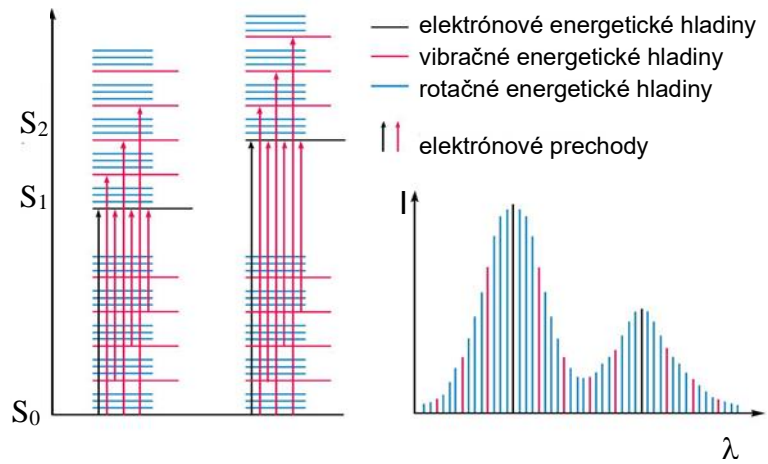
### ELEKTRÓNOVÉ ABSORPČNÉ SPEKTRÁ

Elektrónové absorpčné spektrá zahŕňajú oblasť vlnovej dĺžky žiarenia v rozsahu od 50 do 1000 nm, najmä však UV-VIS oblasť. V UV-VIS oblasti elektrónových spektier sa pracuje so žiarením takej energetickej hodnoty ( $\Delta E \approx 150 - 600 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), ktorá má schopnosť premiestňovať vonkajšie (valenčné) elektróny v molekule. Preskok elektrónov nastáva z energeticky chudobnejších molekulových orbitálov na orbitály energeticky bohatšie. Zotrvanie elektrónov v energeticky bohatšom stave je krátke ( $10^{-9}$  s) a pri prechode do základného stavu elektrón môže prechádzať rôznymi deexcitačnými prechodmi (nežiarivými aj žiarivými). Súčasne nastáva aj excitácia vibračných a rotačných stavov molekuly. Zmena celkovej energie molekuly  $\Delta E_M$  potom zahŕňa zmeny energie elektrónov  $\Delta E_e$ , zmeny vibračnej energie  $\Delta E_v$  a zmeny rotačnej energie  $\Delta E_r$ :

$$\Delta E_M = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r = h\nu$$

Zmeny energie elektrónov ( $\Delta E_e \approx 150 - 600 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) sú však spravidla omnoho väčšie ako vibračnej energie ( $\Delta E_v \approx 2 - 60 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) a rotačnej energie ( $\Delta E_r \approx 3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), takže rozlišovať ich možno len pri špeciálnych podmienkach ako jemnú štruktúru príslušného spektra.

Ako vidieť na obrázku 8, absorpčné prechody látky môžu prebiehať z rôznych vibračných a rotačných stavov základného elektrónového stavu molekuly do rôznych vibračných a rotačných stavov jej excitovaného elektrónového stavu. Všetky zmeny vibračnej a rotačnej energie sa pripočítajú k energii



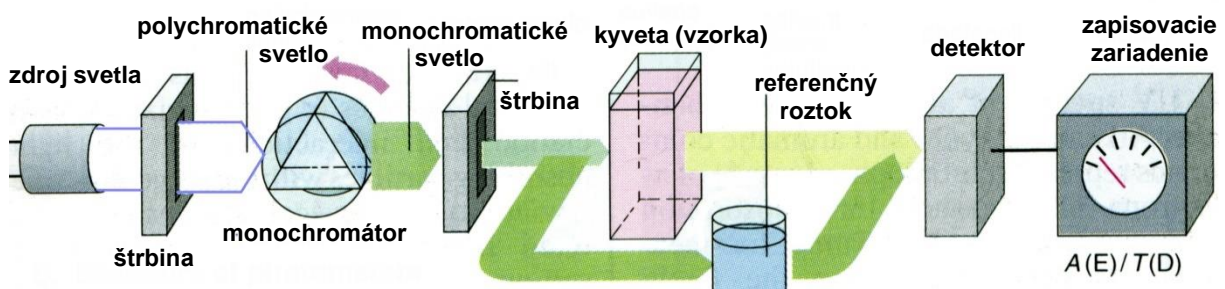
Obr. 8. Vznik molekulového absorpčného pásu

preskoku elektrónov a vzniká celá sústava spektrálnych čiar, ktorých vlnová dĺžka sa líši len v malej miere. Čiarové spektrá (kvantový charakter absorpcie žiarenia) sa prekrývajú a v spektre sa to prejavuje ako **molekulový absorpčný pás**.

## EXPERIMENTÁLNE USPORIADANIE

Meranie absorpcie v UV-VIS oblasti spektier sa vykonáva na rôznych typoch prístrojov, ako kolorimeter, fotometer a spektrofotometer. **Fotometer** je zariadenie na meranie žiarivej energie alebo pomeru žiarivej energie dvoch lúčov.

V súčasnosti najpoužívanejší prístroj je **spektrofotometer**, ktorý umožňuje získať spektra v UV-VIS oblasti. Na obrázku 9 je znázornená základná schéma dvojlúčového spektrofotometra.



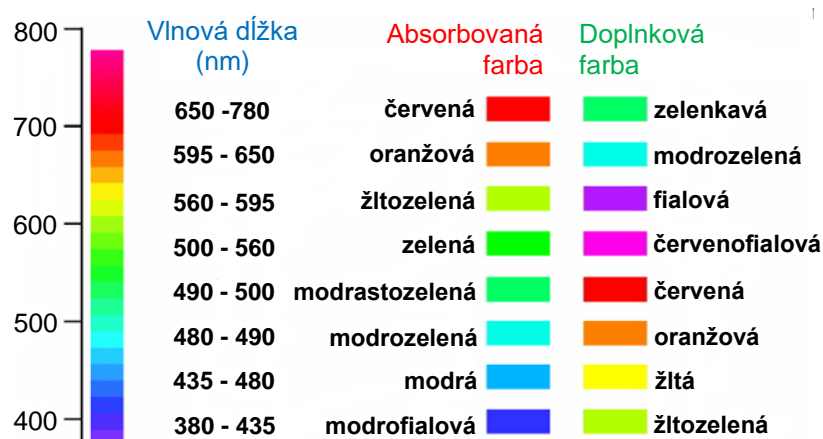
Obr. 9. Schéma dvojlúčového spektrofotometra

**Zdroj žiarenia** vysiela polychromatické žiarenie (pre UV oblasť sa používajú vodíkové resp. deutériové výbojky a pre VIS oblasť sa používajú volfrámové resp. halogénové žiarovky), ktoré sa na difrakčnej mriežke **monochromátora** rozkladá a vzniknuté spektrum sa odráža od zrkadla a premieta sa na zadnú stenu monochromátora. Otáčaním mriežky je možné dosiahnuť, aby cez výstupnú štrbinu monochromátora vychádzal lúč o požadovanej vlnovej dĺžke. Lúč

prechádza cez absorbujúce prostredia, ktoré sú realizované **kyvetami** s konštantnou vnútornou hrúbkou absorbujúcej vrstvy od 0,1 do 10 cm. Do jednej kyvety sa umiestni **referenčný roztok** (zvyčajne je to čisté rozpúšťadlo resp. slepý roztok) a **detektor** registruje žiarenie o intenzite  **$I_0$** . V druhej kyvete je **roztok analyzovanej vzorky** a na detektor potom dopadá žiarenie o intenzite  **$I$** . Objektívne hodnotenie veľkosti absorpcie sa uskutočňuje použitím **fotoelektrických detektorov (fotočlánkov)** citlivých na UV-VIS žiarenie. Signály z detektora sa pomocou analógovo-digitálneho prevodníka prevedú do počítača, ktorý využitím vhodného programu vyhodnotí analýzu. Ak sa zisťuje priebeh krivky priepustnosti difrakčná mriežka sa otáča a cez výstupnú štrbinu monochromátora postupne vystupujú lúče s klesajúcou vlnovou dĺžkou, ktoré zahŕňa celú spektrálnu oblasť. Pre prácu vo VIS oblasti spektra sa využívajú kyvety zo skla a pri práci v UV oblasti sa používajú kyvety z kremeňa ( $\text{SiO}_2$ ).

Absorpciu žiarenia látkami len vo viditeľnej časti spektra (380 – 780 nm) môžeme subjektívne pozorovať aj vlastnými očami. Absorpcia v tejto oblasti spektra sa nám javí ako **farebnosť látky**. Farebná látka absorbuje (pohlcuje) z bieleho (viditeľného) svetla len žiarenie takej vlnovej dĺžky (takej farby), ktorá je doplnkovou (komplementárnou) farbou k farbe látky samotnej. Na tomto jave bola založená najstaršia a najjednoduchšia metodika, **kolorimetria**, kde detekcia veľkosti absorpcie bola robená ľudským okom. Maximálna spektrálna citlivosť ľudského oka je pri vlnovej dĺžke 550 nm. V súčasnosti sa kolorimetria používa ako orientačná metóda, pomocou ktorej je možné relatívne porovnávať intenzitu zafarbenia roztokov vzoriek a štandardov v celom rozsahu VIS spektra (v komparátoroch).

Na obrázku 10 sú uvedené vlnové rozsahy a farby absorbovaného VIS žiarenia a súčasne doplnkové farby, v akých vidíme látky (napr. zafarbenie roztoku) pri pohltení svetla uvedenej vlnovej dĺžky.



**Obr. 10. Farby absorbovaného žiarenia v závislosti od vlnovej dĺžky a ich doplnkové farby**

## ANALYTICKÉ VYUŽITIE

Molekulová absorpčná spektrometria v UV-VIS oblasti sa využíva v organickej a anorganickej kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze.

## KVANTITATÍVNA ANALÝZA

Miera prepusteného, alebo pohlteneho žiarenia sa najčastejšie vyjadruje parametrami ako je **transmitancia** (priepustnosť)  $T$  a **absorbancia** (pohltenie)  $A$ .

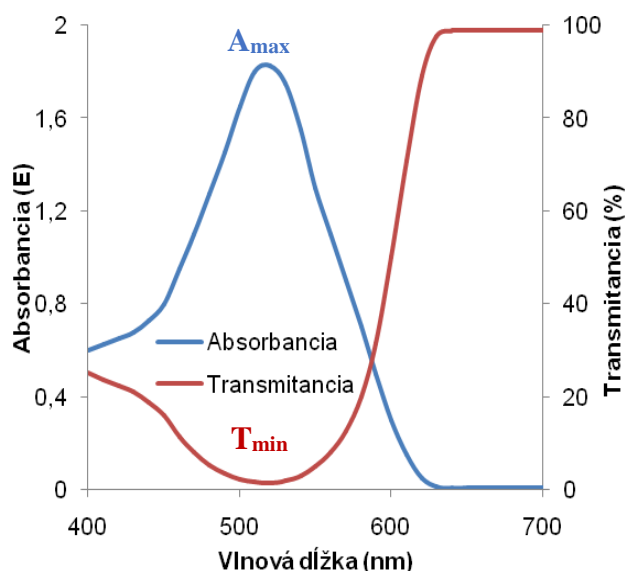
**Transmitancia**  $T$  je pomer intenzity absorbovaného žiarenia  $I$  a intenzity pôvodného žiarenia  $I_0$ :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

**Absorbancia**  $A$  je definovaná ako:

$$A = -\log T = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Závislosť transmitancie na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia  $\lambda$  sa nazýva **krivkou priepustnosti** a závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia  $\lambda$  sa nazýva **absorpčné spektrum**. Na obrázku 11 je znázornené absorpčné spektrum a krivka priepustnosti tej istej látky.



**Obr. 11. Absorbancia vs. transmitancia**

Maximum absorpcie  $A_{\max}$  ( $T_{\min}$ ) zodpovedá vlnovej dĺžke, pri ktorej sa dá vykonať kvantitatívna analýza. Pre kvantitatívnu analýzu platí už spomenutý **Lambertov-Beerov**

**vzťah**, podľa ktorého **absorbancia**  $A$  je úmerná **mólovému absorpčnému koeficientu**  $\varepsilon_\lambda$  (špecifický pre každý druh molekúl a vlnovú dĺžku), **dĺžke absorbujúcej vrstvy**  $l$  a **koncentrácii analyzovanej látky**  $c$ :

$$A = \varepsilon_\lambda \times l \times c$$

Ak sa stanovujú rovnaké druhy látok  $\varepsilon_\lambda$  v rovnakých kvetách  $l$  vzťah sa zjednoduší:

$$A = k \times c$$

V prípade ak analyzovaný roztok obsahuje viacej analytov o rôznych koncentráciách, pri ich stanovení sa využíva **aditívna vlastnosť absorbancie**. V takomto prípade je výsledná absorbancia, pri zvolenej vlnovej dĺžke, súčtom absorbancií všetkých zložiek v roztoku:

$$A = \sum_{i=1}^n \varepsilon_{\lambda_i} \times c_i$$

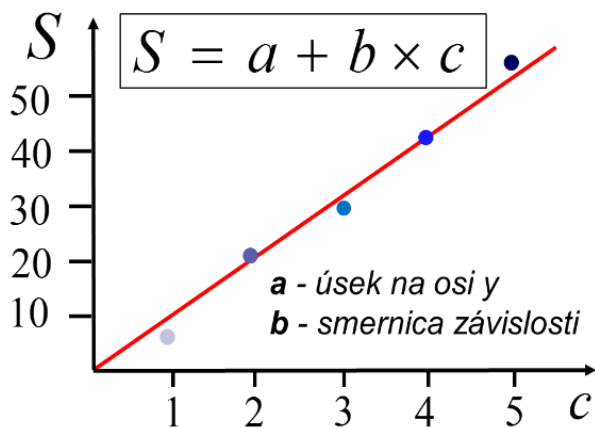
## KVALITATÍVNA ANALÝZA

Poloha absorpčných pásov v UV-VIS spektrofotometrii je daná absorbovanou energiou pri elektrónovom prechode a súvisí so štruktúrou látky. V **kvalitatívnej analýze** sa ultrafialové a viditeľné (UV-VIS) spektrá látok vhodne dopĺňujú informácie pri identifikácii neznámych organických látok a pri riešení štruktúrnych otázok z merania infračervených, NMR a hmotnostných spektier a to porovnávaním zmeraného priebehu UV-VIS spektra so známymi spektrami.

## METÓDA VYHODNOTENIA

**Metóda kalibračnej krivky** je najpoužívanejšia a najvhodnejšia metóda na stanovenie koncentrácie analytu. V prípade analýzy série podobných vzoriek pre každý analyt je potrebné zostrojiť zvláštnu kalibračnú závislosť. Kalibračná závislosť pre analyt sa získava meraním signálov analytu v roztokoch  $S$ , ktoré majú rovnaké priemerné zloženie ako vzorky, ale s odstupňovanou, známou koncentráciou analytu  $c$ . Kalibračné závislosti prechádzajú počiatkom osí a až po určitú koncentráciu majú lineárny charakter. Oblasť nad touto koncentráciou sa obyčajne už nevyužíva pre odčítanie príslušnej koncentrácie, nakoľko odčítanie je zaťažené veľkou neistotou. Preto sa často využíva postup riedenia vzoriek, ktorých signál presiahol bod určený hodnotou  $c$ . Zriedená vzorka musí mať signál, ktorý sa dá vyhodnotiť pomocou lineárnej oblasti kalibračnej závislosti. Priebeh kalibračnej závislosti zahŕňa vplyv maticového efektu na meraný signál.

## Kalibračná krivka



## Výpočet vybraných štatistických parametrov:

ARITMETICKÝ PRIEMER :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

SMERODAJNÁ ODCHÝLKA:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$$

ODHAD SMERODAJNEJ ODCHÝLKY:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

RELATÍVNA SMERODAJNÁ ODCHÝLKA:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

ABSOLÚTNA CHYBA:

$$\Delta = x_i - \mu$$

RELATÍVNA CHYBA:

$$\delta_{\%} = \frac{\Delta}{\mu} \times 100\%$$

kde:  $n$  - počet meraní;  $x_i$  - hodnota merania a  $\mu$  - skutočná hodnota.

## Prírodné farbivá v rastlinách

Prírodné farbivá sú prirodzenou súčasťou prírody okolo nás. V zložitom systéme vzťahov medzi biologickými objektami majú veľa a častokrát aj zvláštnych úloh. Chlorofyly, karotenoidy, xantogény sú súčasťou systémov zachytávajúcej energiu fotónov vo fotosyntetických aparátoch rastlín. Podobnú funkciu v energetickom systéme živočíchov ale zameranú na transport kyslíka v majú hemoglobín a iné krvné farebné látky.

Betanín, je červené glykozidové potravinárske farbivo získavané z červenej repy (*Beta vulgaris*). Aglykón betanínu získaný hydrolýzou a oddelením molekuly glukózy sa nazýva betanidín a ako potravinárske farbivo má značku E162.



Betanín sa obyčajne získava z extraktov šťavy červenej repy. Koncentrácia betanínu v červenej repe sa pohybuje v rozmedzí 300–600 mg kg<sup>-1</sup>. Okrem uvedeného zdroja sa nachádza spolu so sprievodnými betaláninmi aj v plodoch – kaktusových figách opuncii (*Opuntia ficus-indica*), v kvetoch, plodoch a listoch stromov amarant (napríklad *Amaranthus caudatus*) a mnohých iných zo 44 zástupcov tohto druhu.

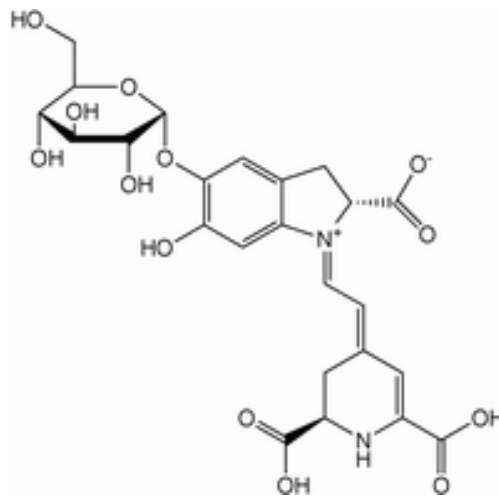
Betanín sa používa hlavne na dofarbovanie mrazených potravín, potravín predávaných v suchom stave a tiež potravín, ktoré majú definovanú krátku dobu od výroby do spotreby. Používa sa tiež na dofarbovanie mäsa a párkov, zmrzlín, cukríkov, krémov, ovocných drení a náplní, paradajkových pretlakov polievok a mnohých iných potravín. Betanín sa neznehodnocuje ani pasteurizáciou, napriek pôsobeniu vysokých teplôt, pokiaľ je v prostredí s vysokým obsahom cukrov. Avšak pri výrobe za vysokej teploty extrudovaných cukríkov sa pridáva až v konečnej fáze ich výroby. Betanín sa v črevách dobre absorbuje a priaznivo pôsobí ako antioxidant. Po jeho konzumácii môžeme pozorovať jeho prítomnosť v moči a stolici na základe ich charakteristického sfarbenia. Betanín nemá prakticky žiadne alergizujúce účinky na organizmus.

Betanín degraduje – chemická štruktúra betanínu sa mení pôsobením svetla, pri zohrievaní a vplyvom vzdušného kyslíka. Jeho citlivosť na oxidáciu kyslíkom je najväčšia pri potravinách s vysokým obsahom vody a v prítomnosti niektorých katiónov kovov (napr., železa a medi). Tento proces tiež spomaľujú antioxidanty, napríklad kyselina askorbová. Betanín je v

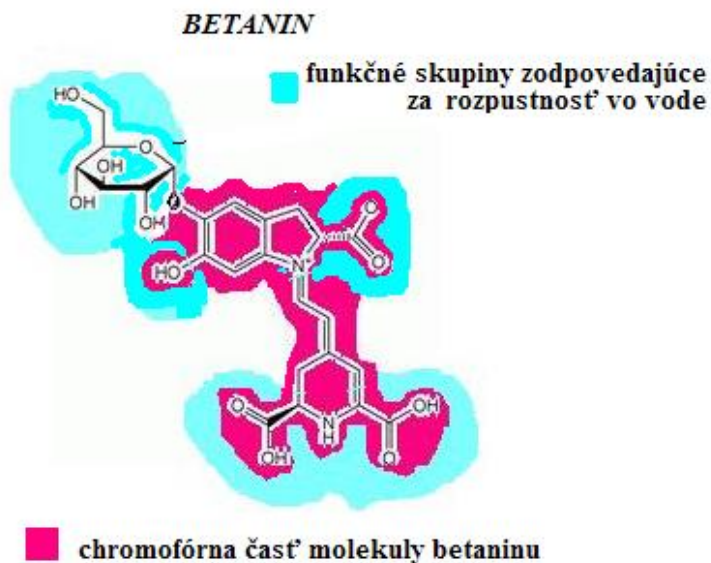
suchom stave odolný aj voči pôsobeniu vzdušného kyslíka. Uvedené skutočnosti jasne poukazujú na potrebu analýzy betanínu v rôznych vzorkách a v rôznorodých súvislostiach.

Sfarbenie roztokov betanínu závisí od pH. Pri hodnotách pH v rozmedzí 4.0 až 5.0 je roztok betanínu jasne modročervený, a pri zvyšovaní hodnoty pH sa stáva modrofialovým. Pri ďalšom zvyšovaní pH do alkalického oblasti betanín začína hydrolyticky degradovať čo má za následok zmenu sfarbenia roztoku na žltú farbu a ďalej na hnedú farbu.

Betanín je betalainové farbivo a v červenej repe sa okrem neho nachádzajú v menšom zastúpení aj izobetanín, probetanín, neobetanín, a farbivá s odlišnou chemickou štruktúrou e indicaxantín a vulgaxantíny.



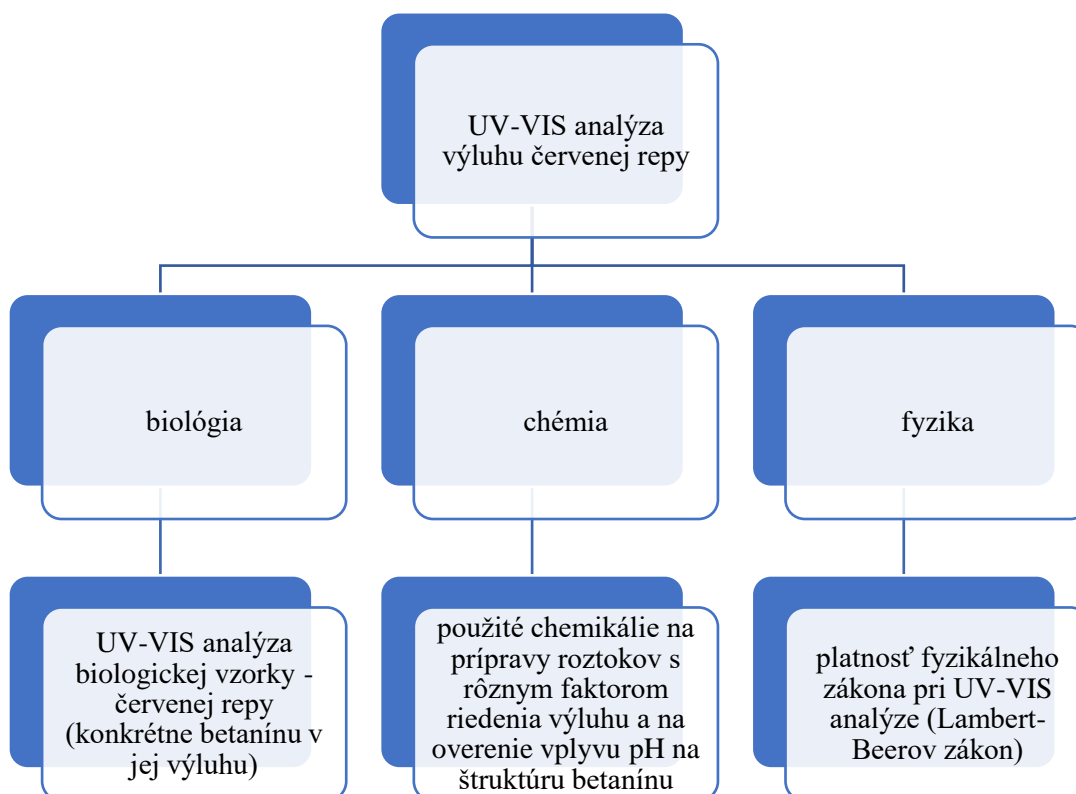
Chemický názov: 4-(2-(2-karboxy-5-(beta-D-glukopyranozyloxy)-2,3-dihydro-6-hydroxy-1H-indol-1-yl)etenyl)-2,3-dihydro-(S-(R\*,R\*)))-2,6-pyridíndikarboxylová kyselina



Sumárny vzorec: C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>,  
Mólová hmotnosť: 551.48 g/mol



Aj v tejto úlohe je možné vidieť veľmi dobre prepojenie chémie, biológie a fyziky. Dané prepojenie môžete vidieť na nasledujúcej schéme:



## EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### Úlohy

1. Zmerajte UV-VIS spektrum vodného extraktu získaného macerovaním vzorky červenej repy (kocka s hranou cca 1 cm) po dobu minimálne 5 minút a určite vlnovú dĺžku absorpčného maxima (maxím)  $\lambda_{\max}$ .
2. Overte platnosť Lambertovho - Beerovho zákona pre daný konkrétny postup zriedňovaním pôvodného extraktu minimálne 3 x vždy na polovicu a zostrojte kalibračnú čiaru  $A = f(\text{zried'ovací faktor})$ .
3. Stanovte neznámu koncentráciu betanínu v extrakte a vyjadrite ju ako pomerné číslo k pôvodnej koncentrácii považovanej za jednotkovú.

### Roztoky, prístroje a zariadenie

Destilovaná voda, roztok HCl  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , roztok NaOH  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , spektrofotometer Shimadzu, sklené a kremenné kvety ( $d = 1 \text{ cm}$ ), kadičky, odmerné valce, pipety

## Pracovný postup


1. Zo zásobníka deionizovanej vody odpipetujeme  $10 \text{ cm}^3$  do kadičky objemu  $25 \text{ cm}^3$ . Pridáme z červenej repy vyrezanú 1 kocku s objemom približne  $1 \text{ cm}^3$  a macerujeme ju po dobu minimálne 5 minút. Po uplynutí tejto doby zlejeme časť červenakasto sfarbenej tekutiny do ďalších 3 kadičiek tak aby v každej bol objem vodného extraktu približne  $3 \text{ cm}^3$ .
2. Z prvej kadičky odlejeme roztok do plastovej alebo sklenej (prípadne kremennej) meracej kyvety tak, aby vyplnil priestor do výšky minimálne 5 mm nad rysku označujúcu minimálnu výšku hladiny meranej tekutiny, ktorá zabezpečí správne meranie.
3. Odmeriame spektrum betanínu vo viditeľnej oblasti spektra od 400 nm do 750 nm.
4. Z kyvety zlejeme extrakt späť do pôvodnej (prvej) kadičky a pridáme k  $3 \text{ cm}^3$  roztoku pipetou presne  $1 \text{ cm}^3$  deionizovanej vody, premiešame a opäť odmeriame spektrum.
5. K druhému podielu vzorky pridáme presný objem  $1 \text{ cm}^3$  roztoku  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl, zamiešame pričom pozorujeme zmenu sfarbenia betanínu v extrakte červenej repy.
6. Z druhej kadičky odlejeme roztok do sklenej (prípadne kremennej) meracej kyvety tak, aby vyplnil priestor do výšky minimálne 5 mm nad rysku označujúcu minimálnu výšku hladiny meranej tekutiny, ktorá zabezpečí správne meranie.
7. K tretiemu podielu vzorky pridáme presný objem  $1 \text{ cm}^3$  roztoku  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH, zamiešame a pričom pozorujeme zmenu sfarbenia betanínu v extrakte červenej repy.
8. Z tretej kadičky odlejeme roztok do plastovej alebo sklenej (prípadne kremennej) meracej kyvety tak, aby vyplnil priestor do výšky minimálne 5 mm nad rysku označujúcu minimálnu výšku hladiny meranej tekutiny, ktorá zabezpečí správne meranie.
9. Poznámka k meraniu spektier: meráciu kyvetu niekoľkokrát vypláchneme meraným roztokom, ktorý vždy zlejeme späť do kadičky. Kyvetu s roztokom vložíme do registračného spektrofotometra a premeriame závislosť  $A = f(\lambda)$  v rozsahu 400 – 750 nm. Ako porovnávací roztok použijeme deionizovanú vodu. Meriame podľa návodu na obsluhu prístroja, prípadne podľa pokynov vyučujúceho. Z nameraného spektra (graf závislosti  $A = f(\lambda)$ ) určíme vlnovú dĺžku maxima  $\lambda_{\text{max}}$ , prípadne maxím.
10. Diskutujte vzťah farebných zmien pri rôznych hodnotách pH. Pokúste sa vysvetliť prečo dochádza k farebným zmenám v súvislosti so zmenami chemickej štruktúry betanínu.
11. Zried'ujte opakovane pôvodný vodný extrakt červenej repy vždy na polovicu a odmerajte spektrum za definovaných podmienok zriedenia. Postup opakujte až pokiaľ nebudete schopní odlíšiť spektrum od nulovej línie. To znamená, keď sú vlastnosti veľmi zriedeného extraktu zdanlivo totožné s vlastnosťami deionizovanej vody v porovnávacjej kyvete.

12. Zostrojte kalibračnú závislosť ako vzťah  $A(\lambda_{\max}) = f(\text{zried'ovací faktor})$ , pričom zried'ovací faktor bude mať hodnotu 1 pre nezriedený extrakt, 0,5 pre pôvodný extrakt zriedený na polovicu, 0,25 pre pôvodný extrakt zriedený na jednu štvrtinu a tak ďalej.
13. Diskutujte platnosť Lambertovho-Beerovho zákona a zostrojenú kalibračnú závislosť použite na zistenie neznámeho zried'ovacieho faktora vo vzorke.




# NÁVOD NA OBSLUHU PRÍSTROJA PASCO SPECTROMETER PS-2600







## ZAPNUTIE PRÍSTROJA:

1. Zapnúť prístroj tlačidlom na pravej bočnej strane prístroja .
2. Pripojiť spektrometer PS-2600 cez **USB kábel** (zelená LED svieti trvale) alebo cez Bluetooth (modrá LED svieti trvale).














## KALIBRÁCIA PRÍSTROJA

1. Kalibrácia spektrometra za použitia Blank rozpúšťadla – vložiť kyvetu (hladkú z dvoch strán) s roztokom rozpúšťadla na doraz tak aby jej hladká stena smerovala k obrázku spektra (detektora).  
Vybrať vľavo dole prvú ikonu tmavej kyvety  (automaticky vypne zdroj svetla), potom stlačiť biely symbol kyvety vpravo od nej  (zapne zdroj svetla) cez referenčný Blank roztok rozpúšťadla. Kalibrácia je hotová a nad obidvomi symbolmi kyviet sú vyznačené odľaknutia .


## MERANIE NA PRÍSTROJI

1. Meranie spustíme stlačením ikony vľavo dole  a ukončíme kliknutím na .
2. Očistenú kyvetu naplnenou prvým kalibračným roztokom (obyčajne s najvyššou koncentráciou analytu, aby sme videli dobre vyvinuté spektrum) vložíme do kyvetového priestoru a odmeriame spektrum analytu.
3. Podľa potreby upravíme spektrum zmenou škály na **osi y** (Absorbancia) aj na **osi x** (Vlnová dĺžka).
4. Nadstavíme vlnovú dĺžku na meranie ďalších kalibračných roztokov v absorpčnom maxime. Z toho dôvodu si zvolíme ikonu  na spodnom okraji.
5. Potiahnutím zvolíte vlnovú dĺžku pri ktorej chcete zmerať absorbancie ostatných kalibračných roztokov potvrdíte . Prístroj je pripravený na konštruovanie kalibračnej krivky.

## MERANIE KALIBRAČNEJ ZÁVISLOSTI

1. Klikneme na ikonu **Koncentrácia**  na hornej lište. Dostaneme sa do okna na meranie bodov kalibračnej krivky.
2. V prvom poli tabuľky vľavo **Koncentrácia** sa sú zadané paušálne hodnota 0,200-0,800 mol/l. Zmeníme ich na správne hodnoty koncentrácií vzoriek štandardov analytov, ktoré sme si pripravili.
3. Odmeriame sadu pripravených kalibračných roztokov podľa hodnôt koncentrácií uvedených v ľavom stĺpci tabuľky nasledujúco: vložíme kyvetu s prvým štandardným roztokom do kyvetového priestoru, označíme okno v pravom stĺpci (Absorbancia) prislúchajúcej koncentrácii a spustíme meranie stlačením ikony vľavo dole , odmeranú hodnotu absorbancie potvrdíme . Prejdeme na ďalší riadok a vložíme kyvetu s nasledujúcim kalibračným roztokom (všetko pri spustenom meraní- stále v režime ). Počkáme pokiaľ sa hodnota absorbancie neustáli a potvrdíme  hodnotu. Takto postupujeme pre všetky kalibračné roztoky. Merania ukončíme stlačením .
4. Podľa potreby upravíme spektrum zmenou škály na **osi y** (Absorbancia) aj na **osi x** (Vlnová dĺžka).
5. Použijeme lineárnu fitovacu funkciu  čiary a Objaví sa fitovaná trendová priamka a rovnica lineárnej funkcie.
6. Softvér je pripravený na vyhodnotenie neznámej koncentrácie analytu vo vzorke. Vložíme kyvetu s roztokom vzorky o neznámej koncentrácii analytu. Klikneme na okienko **Absorbancia** v tabuľke **Stanovenie neznámej koncentrácie** vľavo dole. Stlačíme štart merania  a odsúhlasíme nameranú hodnotu absorbancie . Ak máme viac vzoriek, ich hodnoty absorbancie odmeriame rovnakým postupom. Merania ukončíme stlačením .
7. Z nameranej hodnoty absorbancie a rovnice lineárnej funkcie kalibračnej závislosti vypočítame koncentráciu analytu vo vzorke.
8. Do tabuľky môžeme vložiť aj nami odhadnutú hodnotu koncentrácie z grafu a farebné označenie bodu nám napovie ako dobre sme hádali, alebo hodnotu vypočítali z rovnice:
  -  – výborne,  – uspokojivo,  – zlý odhad. Hodnoty sa môžu meniť až kým máme správnu hodnotu, tesne preloženú trendovou čiarou.

## VYPNUTIE PRÍSTROJA:

1. Na prístroji vypnúť tlačidlo .

### 3. JE MOŽNÉ ODDELIŤ OD SEBA RÔZNE PRÍRODNÉ FARBIVÁ?

#### TEORETICKÝ ÚVOD

*Chromatografia* je separačná metóda, v ktorej sa jednotlivé zložky vzorky počas transportu v chromatografickom prostredí prerozdeľujú (distribuuju) v rôznej miere (podľa vzájomnej afinity) medzi dve fázy, z ktorých jedna je nepohyblivá (stacionárna fáza), zatiaľ čo druhá - pohyblivá (mobilná) fáza sa pohybuje cez stacionárnu fázu definovaným smerom. Všeobecne majú obidve tieto fázy nejednotnú mikroheterogénnu povahu. Svojím určením je chromatografia predovšetkým kvalitatívna a kvantitatívna metóda na analýzu organických aj anorganických látok nepolárnej, polárnej resp. iónovej povahy prítomných vo vzorkách vo vysokých aj nízkych koncentráciách.

*Chromatografický proces* je výsledkom početného opakovania sa základných dejov sorpcie a desorpcie počas pohybu zložiek lôžkom pórovitej stacionárnej fázy, ktoré je v kolónových technikách valcovité a v tenkovrstvových technikách plošné.

*Separáciu* (vzájomné oddelenie) jednotlivých zložiek vzorky spôsobujú rozdiely vo veľkosti distribučných konštánt v systéme zvolených fáz.

#### ROZDELENIE CHROMATOGRAFICKÝCH METÓD

Chromatografické metódy je možné rozdeliť na základe rôznych klasifikačných kritérií:

*1. skupenstvo, v ktorom sa nachádza mobilná fáza*

- Plynová chromatografia (Gas Chromatography, GC); mobilnou fázou je plyn.
- Kvapalinová chromatografia (Liquid Chromatography, LC); mobilnou fázou je kvapalina.
- Superkritická fluidná chromatografia (Supercritical-Fluid Chromatography, SFC); mobilnou fázou je látka v nadkritickom stave.

*2. fyzikálno-chemický dej, ktorý prevláda pri separácii*

- Adsorpčná kvapalinová chromatografia (Liquid-Solid Chromatography, LSC); zložky vzorky sa separujú na základe ich rôznej schopnosti viazať sa (adsorbovať sa) na povrch stacionárnej fázy (tuhá látka).
- Rozdeľovacia kvapalinová chromatografia (Partition Liquid Chromatography resp. Liquid-Liquid Chromatography, LLC); zložky vzorky sa separujú na základe ich odlišnej rozpustnosti v stacionárnej (kvapalina) a mobilnej fáze (kvapalina, resp. plyn).

- Iónovo-výmenná chromatografia (Ion-Exchange Chromatography, IEC); zložky vzorky sa separujú na základe rôzne veľkých elektrostatických príťažlivých síl medzi elektricky nabitými funkčnými skupinami stacionárnej fázy (iónomenič) a iónmi vzorky.
- Afinitná chromatografia (Affinity Chromatography, AC); stacionárna fáza je schopná viazať zo vzorky len určité zložky, ku ktorým má selektívny vzťah (afinitu) daný usporiadaním funkčných skupín v trojrozmernom priestore.
- Gélová chromatografia (Gel Chromatography); zložky vzorky sa separujú podľa svojej veľkosti v pórovitej stacionárnej fáze (gél). Menšie molekuly vzorky sa v póroch gélu zdržiavajú dlhšie (molekulový sieťový efekt) ako makromolekuly.

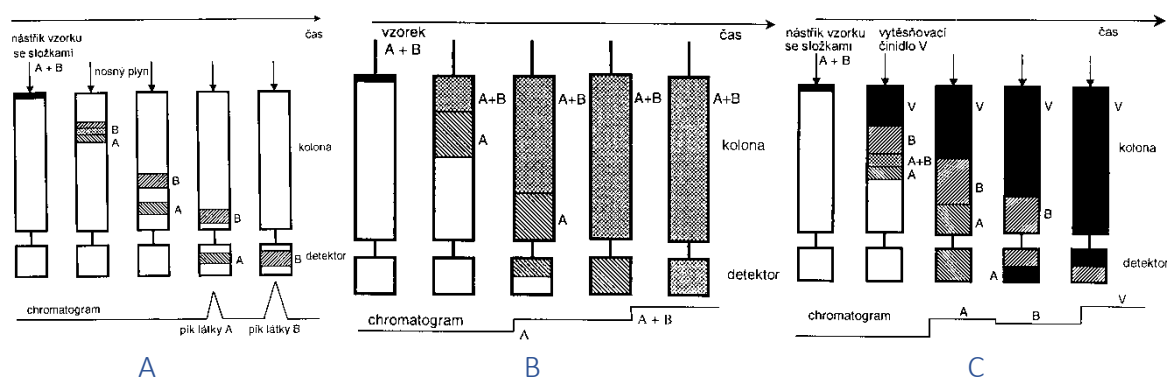
### *3. podľa geometrie usporiadania stacionárnej fázy*

- Kolónová chromatografia; stacionárna fáza je umiestnená v kolóne.
- Plošné techniky
  - Papierová chromatografia (Paper Chromatography, PC); stacionárna fáza je súčasťou chromatografického papiera.
  - Tenkovrstvová chromatografia (Thin Layer Chromatography, TLC); pórovitá stacionárna fáza je umiestnená na pevnom planárnom (plochom) podklade, napr. hliníkovej fólii alebo sklenenej doske.

### *4. podľa spôsobu získania chromatogramu*

- Elučná chromatografia; založená na jednorazovom nadávkovaní vzorky do kolóny a jej následnom vymývaní mobilnou fázou. Objem vzorky dávkovaný na kolónu je cca. do 1 % objemu kolóny. V praxi sa táto technika používa najviac.
- Frontálna chromatografia; založená na kontinuálnom privádzaní vzorky do kolóny v mobilnej fáze. Objem dávkovanej vzorky je mnohonásobne vyšší ako objem kolóny.
- Vytláčacia chromatografia; založená na dávkovaní vzorky do kolóny, podobne ako pri elučnej technike, pričom ako mobilná fáza sa používa roztok vytláčadla v rozpúšťadle. Objem vzorky dávkovaný na kolónu až 50 % objemu kolóny.

Príklady rôznych techník kolónovej chromatografie sú znázornené na obr. 1A-C.



**Obr. 1. Spôsoby získania chromatogramu v kolónovej chromatografii**

A – elučná chromatografia, B – frontálna chromatografia a C – vytlačacia chromatografia

## Papierová chromatografia

Papierová chromatografia patrí usporiadaním experimentu k plošným chromatografickým technikám. Na rozdiel od TLC, pri ktorej je vrstva sorbentu nanosená na vhodnej podložke (sklo, plastová fólia, hliníková fólia), je papier vďaka vláknitej štruktúre celulózy samonosný. Separácia je založená na opakovanom rozdeľovaní chromatografovanej látky medzi dve fázy, z ktorých jedna je nepohyblivá (stacionárna) a druhá sa pohybuje (mobilná fáza). V prípade papierovej chromatografie sa zložky vzorky rozdeľujú medzi dve navzájom nemiešateľné kvapalné fázy (rozdeľovacia chromatografia), z ktorých jedna je kvôli interakciám vnútri pórov stacionárnej fázy tiež nepohyblivá. Na celulóze sa z inak homogénnej mobilnej fázy prednostne zadržiava polárnejšia zložka - obyčajne voda, ktorá takto vnútri pórov celulózy vytvára kvapalné prostredie s odlišným zložením ako má mobilná fáza.

Mobilná fáza sa pohybuje vo vrstve stacionárnej fázy účinkom kapilárnych síl, vztlínanim. Pohybom mobilnej fázy sú zložky vzorky unášané v smere pohybu tejto fázy a opakovane, kontinuálne a v rôznej miere danej ich chemickou a štruktúrnou odlišnosťou sú zachytávané interakciami so stacionárnou fázou. Viacnásobným opakovaním tohto procesu môže dôjsť k vzájomnému odlíšaniu chromatografovaných látok. Pri separácii farebných látok pozorujeme výsledok týchto dejov ako rôzne rýchly postup farebných škvŕn na papieri v oblasti medzi štartom (bodom nanosenia vzorky) a čelom postupujúceho rozpúšťadla. Charakteristickou **kvalitatívnou** črtou každej zložky vzorky je poloha jej škvŕny, jej správanie a vzhľad pri detekcii. Veľkosť a intenzita signálu (farebnosť) škvŕny má vzťah ku množstvu analyzovanej látky v škvŕne (**kvantitatívna** črta).

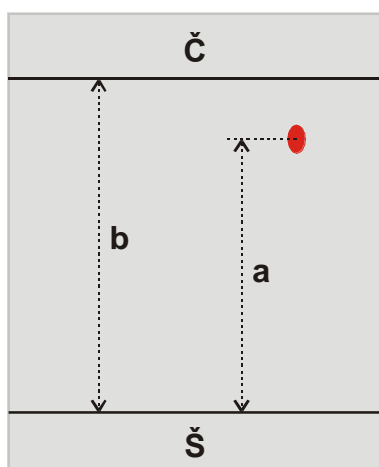


## Technika papierovej chromatografie

Pri vzliňaní - prietoku mobilnej fázy papierom, dochádza k chromatografickému procesu. Vzorka sa naniesie na grafitovú ceruzkou naznačenú čiaru (2 cm od spodného okraja archu papiera) na štart obyčajne v podobe malej škvrny s priemerom 1 mm až 3 mm. Na jednom archu papiera je možné paralelne separovať zložky až 10 vzoriek. Po odparení rozpúšťadla sa papier spodným koncom ponorí do mobilnej fázy tak, aby bol 1 cm spodnej časti papiera ponorený a štartová čiara s nanesenými škvrnami vzoriek bola 1 cm nad hladinou mobilnej fázy. Keď čelo mobilnej fázy dosiahne potrebnú vzdialenosť (minimálne 10cm), papier sa vyberie z vyvíjacej komory, označí sa čelo mobilnej fázy a po vysušení priamo vyhodnotíme výsledok separácie farebných analytov.

Pre každý analyt je na chromatograme charakteristická jeho poloha, ktorá zohľadňuje pôsobenia rozdielov síl cez rozdeľovacie koeficienty a je vyjadrená hodnotou  $R_F$  (retardation factor). Je to pomer vzdialenosti stredu škvrny od štartu (a) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (b):

$$R_F = \frac{a}{b} \quad (1)$$



**Obr. 1:** Znárodnenie výpočtu hodnoty  $R_F$ . Š - (štart) miesto nanosenia vzorky, Č - čelo mobilnej fázy

Hodnoty  $R_F$  sa pohybujú od 0 do 1. Pre látky, ktoré zostávajú blízko štartu, sa  $R_F$  blíži k nule. Pre látky, ktoré sa pohybujú nezadržané stacionárnou fázou takmer s čelom mobilnej fázy sa  $R_F$  blíži k jednej.

## Chromatografický papier

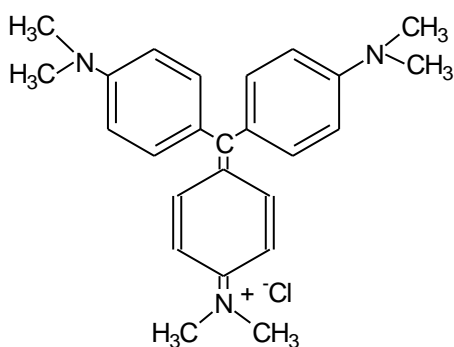
Chromatografický papier je veľmi čistý celulóznový papier, ktorý musí spĺňať viaceré podmienky:

- relatívne rýchly prietok mobilnej fázy umožňujúci rýchlu analýzu,
- dostatočná homogenita, kapacita a mechanická pevnosť,
- malý obsah nečistôt.

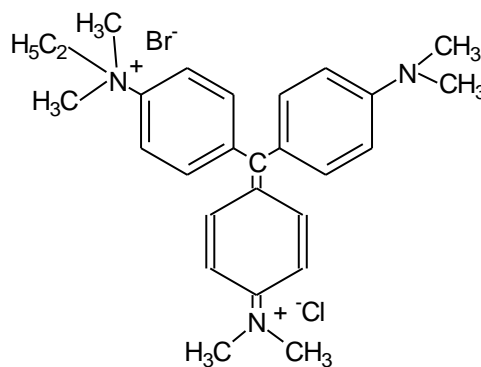
Nedodržanie týchto podmienok môže mať za následok neprimerane dlhú analýzu, nerovnorodý a ťažko vyhodnotiteľný tvar škvŕn, predčasné ukončenie experimentu a problémy s detekciou separovaných látok. Pre účely papierovej chromatografie sa vyrábajú špeciálne chromatografické papiere líšiac sa hrúbkou (0,15 mm až 0,5 mm), hustotou (plošná hmotnosť 85 až 180 g m<sup>-2</sup>), homogenitou kladenia vlákien a čistotou (napr. Whatman, Schleicher-Schull). K ideálnemu chromatografickému papieru sa blížia niektoré druhy filtračného papiera, ktoré je možné tiež použiť po premytí papiera, odstránení prípadných nečistôt a vysušení.

### Analyza vodorozpustných farebných látok (farbív)

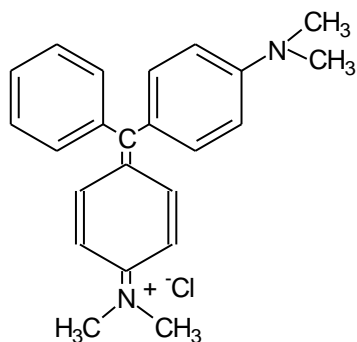
Vodorozpustné farebné látky si v našej spoločnosti našli široké uplatnenie ako farebné zložky napríklad prostriedkov pre vizualizáciu informácií, zlepšenie vzhľadu potravín a z nich hlavne nápojov. Denne sa s nimi stretávame v podobe atramentov do farebných ceruziek – fixiek, atramentov do tlačiarň, zapisovačov a podobne. Z pohľadu ich chemickej štruktúry sa takmer vždy jedná o zložité zlúčeniny, ako je to dokumentované štruktúrnymi vzorcami niekoľkých vybraných farbív. Jednou z podmienok farebnosti látok je prítomnosť aspoň 10 konjugovaných alebo delokalizovaných dvojitých väzieb v ich molekule, alebo prítomnosť kovov prechodných prvkov komplexovaných v podobných štruktúrach farbív.



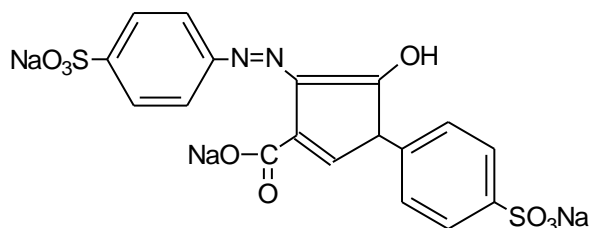
Kryštalová violet



Metylová zelená

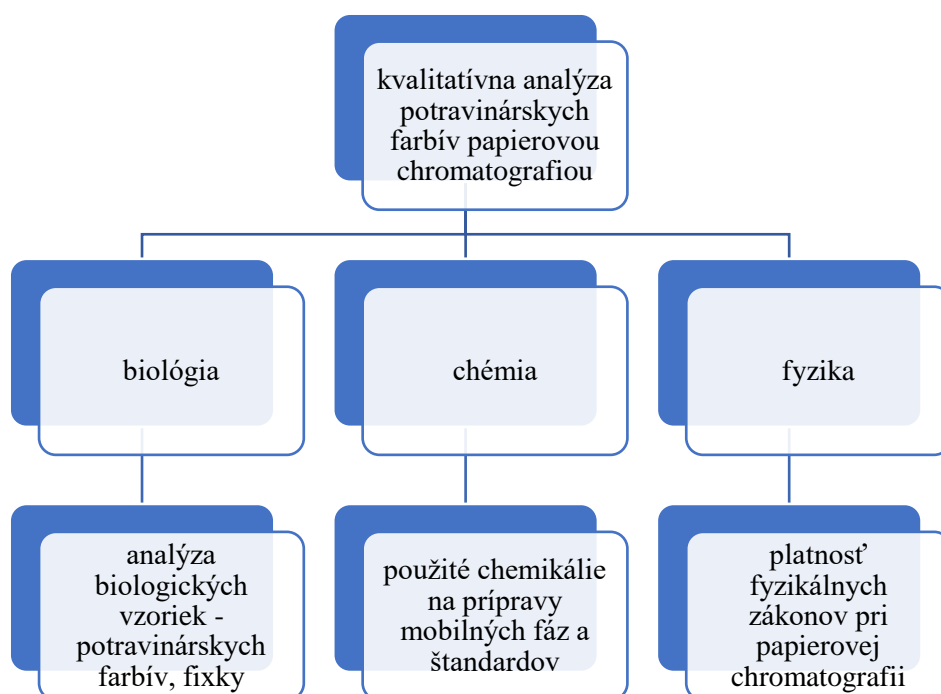


Malachitová zelená



Tartrazín

Aj pri tejto úlohe, konkrétne pri kvalitatívnej analýze potravinárskych farbív pomocou papierovej chromatografie, je možné vidieť prepojenie chémie, biológie a fyziky, ktoré môžete vidieť v nasledujúcej schéme:



## LITERATÚRA

1. Bína J. a kol., Malá encyklopédia chémie, Obzor, Bratislava 1981.
2. Garaj J., Bustín D., Hladký Z.: Analytická chémia, Alfa SNTL, Bratislava 1987.
3. Soják L. a kol.: Separačné metódy v organickej chémii, Vysokoškolské skriptá, PRiFUK, Bratislava, 1985.
4. [www.analytika.sk](http://www.analytika.sk).
5. Pure & Appl. Chem. Vol. 65, No. 4, pp. 819-872, 1993.
6. Klouda P.: Moderní analytické metódy, Pavel Klouda, Ostrava 2003.
7. Čakrt M. a kol.: Praktikum z analytickej chémie, Alfa SNTL, Bratislava 1989.

## EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### Pomôcky a chemikálie

Chromatografický alebo filtračný papier, vyvíjacia nádoba, kadička, deionizovaná voda, chlorid sodný čistý, nanášacia kapilára (2  $\mu$ l), individuálne štandardy farbív, zmes vodorozpustných farbív v roztoku, rôzne farebné fixky.

### Úlohy

1. Porovnať separáciu jednotlivých farbív za použitia rôznych mobilných fáz.
2. Vyhodnotiť  $R_F$  hodnoty separovaných farbív a porovnať ich s  $R_F$  hodnotami vybraných štandardov vodorozpustných farbív. Na základe vyhodnotenia priradiť odpovedajúce štandardy k jednotlivým fixkám.
3. Diskutovať vzťah medzi farbou fixky a počtom a kvalitou farbív v nej obsiahnutých.

### Pracovné podmienky a postup

Na papier (veľkosť papiera prispôsobte vyvíjacej nádobe – cca 18,5 x 15,0 cm) narysujte grafitovou ceruzkou vodorovnú čiaru vo vzdialenosti 2 cm od spodného okraja (Štart) a na ňu vyznačte v 1,5 – 2,0 cm odstupoch od ľavého okraja papiera miesta pre nanášanie vzoriek a štandardov. Na jednotlivé body postupne naneste vzorky fixiek a štandardov farbív tak, aby priemer škvry nebol väčší ako 2 mm. Približne 0,5 cm pod horným okrajom papiera naneste vzorky fixiek a štandardov farbív v identickom poradí ako na spodnej časti papiera a jednotlivé škvry si popíšte. Škvry na hornom okraji papiera sú referenčné škvry umožňujúce diskutovať výsledok delenia s pôvodným vzhľadom farby fixky. Vložte pripravené chromatografické papiere do vyvíjacej nádoby s mobilnou fázou a pozorujte separáciu. Mobilnou fázou je deionizovaná voda resp. 3 % roztok NaCl alebo NaNO<sub>3</sub> (podľa pokynov vyučujúceho). Hladina mobilnej fázy by mala siahať približne 1 cm od spodu nádoby. Keď čelo mobilnej fázy dosiahne potrebnú vzdialenosť (minimálne 10 cm od Štartu), papier z vyvíjacej nádoby vyberte, označte čelo mobilnej fázy a po vysušení priamo vyhodnoťte výsledok separácie farebných analytov.

## 4. KONTROLA KVALITY MLIKA VYUŽITÍM ROZPTYLU ELEKTROMAGNETICKÉHO ŽIARENIA

### Teoretický úvod



Obr. 1 e-protokol v Sparkvue



Obr. 2 Teoretický úvod k experimentu

V jednolúčových prístrojoch vkladáme do dráhy svetelného lúča striedavo kyvetu s porovnávacím a meraným roztokom. Na základe porovnania ich rozptylu svetla určíme koncentráciu, alebo riedenie meranej vzorky. Takýmto spôsobom sa eliminujú všetky negatívne vplyvy, ktoré ovplyvňujú rozptyl svetla spôsobený meranou látkou. Porovnávací roztok

obsahuje všetky zložky meraného roztoku, okrem meranej látky. Niekedy sa v literatúre označuje ako "blank" alebo "slepý roztok".

---

### *Rozširujúce informácie pre učiteľa*

---

**Mlieko** je veľmi významnou potravinou, na ktorej sme hlavne v rannom detstve mimoriadne závislí. To vyjadruje aj názov cicavce (lat. Mammalia), ktoré sú vývojovo pokročilou triedou stavovcov, ktorá sa v súčasnosti vyskytuje takmer všade na Zemi. V súčasnosti je na celom svete zistený výskyt takmer 5500 druhov cicavcov.

Pojem **mlieko** je veľmi rozšírený a mnohovýznamový, môže to byť kvapalina produkovaná prsnými žľazami samíc cicavcov na výživu mláďat, kvapalina alebo šťava podobná mlieku cicavcov (napr.: kokosové mlieko, pleťové mlieko, kaučukové mlieko, cementové mlieko, vápenné mlieko, sójové mlieko, ryžové mlieko, mandľové mlieko a iné mlieka). Významovo a prenesene môže znamenať biele sfarbenie, belosť. Tiež sa vyskytuje v nárečových názvoch niektorých rastlín - žabacie mlieko (mlieč močiarny), vtáčie mlieko (lastovičník väčší).

Viac o mlieku pozri na [https://sk.wikipedia.org/wiki/Mlieko\\_\(cicavce\)](https://sk.wikipedia.org/wiki/Mlieko_(cicavce)).

Mlieko je veľmi zložitou zmesou látok, z ktorých významnú úlohu pre náš vývoj má mliečna bielkovina – kazeín. Kazeín sa vyskytuje len v mlieku cicavcov. Jeho obsah kolíše medzi 70 – 80 % z celkového počtu bielkovín. V sušine mlieka je ho asi 2,5 – 2,6 %. Je to bielkovina syntetizovaná v sekrečných bunkách mliečnej žľazy. Vytvára zložité útvary - nachádza sa vo forme **kazeínových miciel (koloidná fáza – 90 – 95 %) a ako rozpustný (molekulárna fáza – 5 – 10 %)**. Micely sú útvary, ktoré vznikajú vo vodnej fáze mlieka ako dôsledok prítomnosti tukových kvapôčok, ktoré sa neznášajú s vodou (sú hydrofóbne, po grécky je hydor voda a fobein znamená báť sa) a nevedia sa v nej rozpustiť na pravý roztok. Micely v mlieku a ich agregáty vnímame ako biele, pretože majú veľkosť väčšiu (rádovo mikrometre,  $10^{-6}$  metra) ako je vlnová dĺžka červeného svetla (cca 600-700 nm; 0,7 mikrometra) a odrážajú do našich očí všetky fotóny denného svetla (od 400 nm po 750 nm). Pri dostatku Ca prevládajú micely. Ďalším faktorom je teplota. Pod 5 °C (2 – 3 dni)

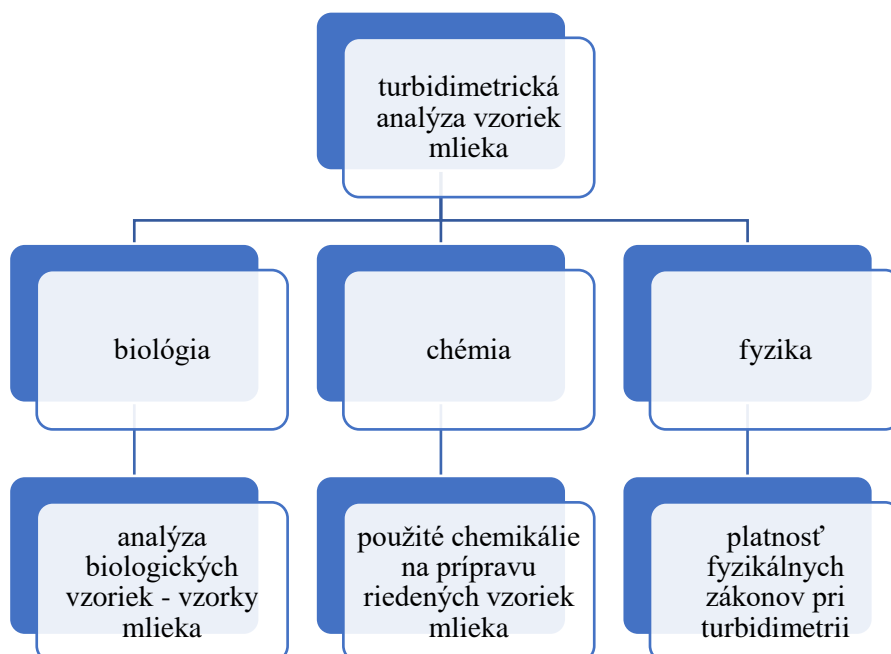


prechádzajú micely na rozpustný kazeín. Nad 70 °C pribúda rozpustný kazeín (vzniká nerozpustný Ca). Pri dlhodobom skladovaní sa uvoľňuje  $\beta$ -kazeín (50 %). Degraduje na  $\gamma$ -kazeín a ten degraduje proteózo-peptónovú frakciu. Veľkosť micíel 80 – 300 nm. Pri ovčom 80 nm. Micely sa skladajú zo submicíel, ktorých je od 300 do 500. Tieto sú pospájané iónmi  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , citrátovými, v malom množstve aj  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ .

Na povrchu submicíel je nerozpustný  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a tiež zabudovaný  $\kappa$ -kazeín. Medzi micelami sa nachádza kapilárna voda. Vodu viažu cukry  $\kappa$  – kazeínu a bielkoviny (aminokyseliny  $\text{COO}^-$ ). Všetky vlastnosti sa odvíjajú od existencie hydratačného obalu. Micely majú na povrchu hydratačný obal, ktorý je tým väčší, čím má micela väčší náboj. V izoelektrickom bode má vody najmenej a rozpustnosť a stabilita micely je najnižšia. Hydratačný obal sa znižuje teplom, sólami (vysoľovanie), dobre rozpustnými látkami vo vode (alkohol), blokovaním polárnych skupín ťažkými kovmi alebo hydrokoloidmi.

Kazeín v čerstvom mlieku sa vyznačuje veľkou termostabilitou, zráža sa pri teplote 150 °C za niekoľko sekúnd a varom po niekoľkých hodinách. Zráža sa syridlom, kyselinami, niektorými soľami ( $\text{CaCl}_2$ , nasýteným roztokom síranu horečnatého alebo amónneho, soľami ťažkých kovov atď.) <https://vsetkomlieko.webnode.sk/news/kazein-v-mlieku-zlozenie-mlieka/>.

Pri tejto úlohe, konkrétne pri turbidimetrickej analýze mlieka je možné vidieť prepojenie biológie, chémie a fyziky, ktoré je znázornené na nasledujúcej schéme:



## Pomôcky a materiály

- Laboratórne pomôcky a materiály:

- 4x 25 ml kadička
- 4 pipety
- plastové kyviety  
d = 1
- sklená tyčinka
- 3 odmerné valce
- destilovaná voda
- laboratórny plášť
- Mlieko (polotučné, plnotučné, nadojené od chovateľa kráv)
- Jednorázové rukavice



- Digitálne pomôcky:
  - PASCO kolorimeter a turbidimeter
  - tablet, iPad
  - Softvér Sparkvue
  - Softvér Word Microsoft Office 365



## Bezpečnosť

Experiment/bádanie je z hľadiska bezpečnosti nenáročný, študenti pracujú s mliekom, s destilovanou vodou.

## Príprava techniky na experimentovanie

### Pred vyučovacou hodinou učiteľ pripraví:

- Tablety (nabije) a nahrá do nich iPL (e-protokoly).
- Pasco kolorimeter a turbidimeter
- Všetky potrebné laboratórne pomôcky
- Dôkladne si naštuduje prácu v softvéri SPARKvue a s Pasco kolorimetrom a turbidometrom, alebo zadajte aj žiakom si naštudovať hlavne kalibráciu senzora pre meranie turbidity roztokov [https://www.youtube.com/watch?v=V\\_v8gfSCFTU](https://www.youtube.com/watch?v=V_v8gfSCFTU)

Dôležité! Kyvety pri meraní turbidity roztokov sa používajú priehľadné zo všetkých strán. Chytajte ich iba za vrchný uzáver, svetelný lúč musí prechádzať čírou časťou zľava doprava

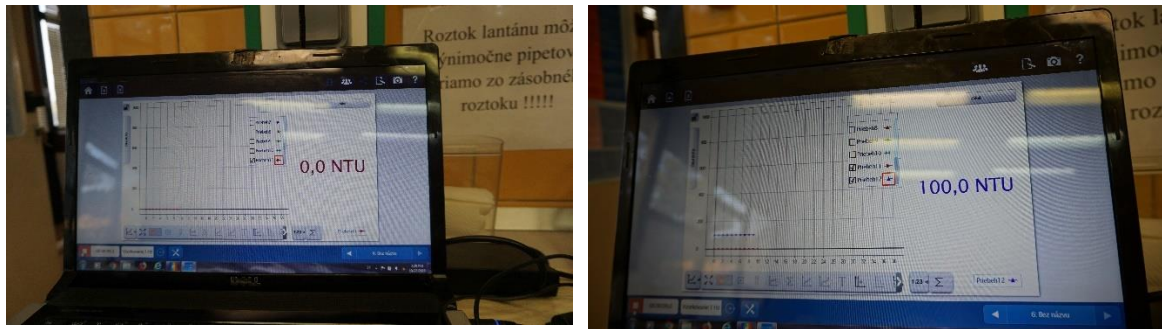


ako je to naznačené na vrchnej doske prístroja, ale aj zhora nadol. Pred každým meraním je potrebné poriadne utrieť kyvetu papierom a potom ju vložte do senzora.

---

### Pracovný postup pre prípravu vzoriek na experimentálne meranie

1. Zapnite wireless senzor kolorimeter a turbidimeter.
2. Zo zásobníka destilovanej vody odpipetujeme 10 mililitrov ( $\text{cm}^3$ ) do kadičky alebo liekovnice objemu  $25 \text{ cm}^3$ . Z nej prelejeme vzorku do plastovej kyvety a odmeriame turbiditu. Turbidita destilovanej vody by mala byť  $0,0 \text{ NTU}$ .
3. Do ďalšej plastovej kyvety nalejte štandardný roztok s hodnotou turbidity  $100 \text{ NTU}$ , (ktorý je súčasťou prístroja), odmerajte turbiditu a tým je nakalibrovaný prístroj na správne meranie.



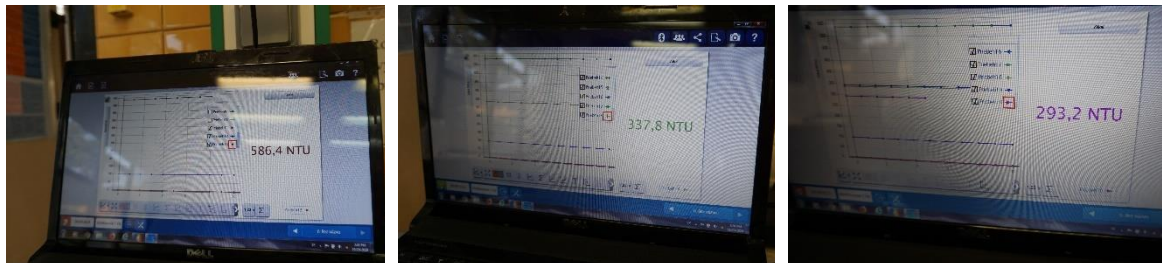
Obr. 1 Kalibrácia turbidimetra

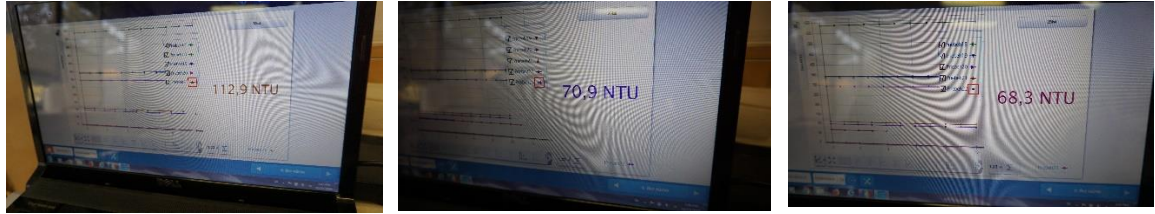
4. Do čistej kadičky odlejeme 10 ml mlieka, prelejeme do kyvety a meriame hodnotu turbidity v plastovej meracej kyvete tak, aby mlieko vyplnilo priestor do výšky minimálne 25 mm, ktorá zabezpečí správne meranie.
5. Do druhej kadičky odlejeme 10 ml mlieka, zriedime na polovinu (destilovanou vodou), prelejeme do kyvety a meriame hodnotu turbidity v plastovej meracej kyvete tak, aby zriedené mlieko vyplnilo priestor do výšky minimálne 25 mm, ktorá zabezpečí správne meranie.
6. Do 3 kadičky prelejeme z 2 kadičky 10 ml už zriedeného mlieka a zriedime ho opäť na polovicu a opäť odmeriame turbiditu roztoku mlieka. Tento postup opakujem až dovtedy pokiaľ nedostaneme hodnotu turbidity zriedeného roztoku mlieka približnú, alebo zhodnú s jej hodnotou nameranou pre destilovanú vodu.



*Dôležitá poznámka pre učiteľa:*

Dôležité je si uvedomiť, že pri nakalibrovaní prístroja pracuje prístroj v oblasti hodnôt 0 až 100 NTU. Preto pri meraní vzoriek riedených na polovicu, štvrtinu, osminu dostávame hodnotu turbidity oveľa vyššie ako je 100 NTU. Tu si musia študenti uvedomiť, že meriame mimo oblasti citlivosti prístroja a teda ak sa chceme dostať do oblasti nakalibrovanej na meranie turbidity vzoriek 0 – 100 NTU, riedenie mlieka destilovanou vodou musí byť oveľa väčšie a to musíme začať 10 ml mlieka zriediť s destilovanou vodou v pomere 1/160, potom ďalšie vzorky z prvej nariedenej vzorky riediť na polovicu a tak postupne nameriame turbidity roztokov v oblasti 0-100 NTU.





Obr. 2 Meranie turbidity 5 zriedených roztokov mlieka, kde len dve posledné vzorky sú v oblasti správneho merania turbidity mlieka

7. Zostrojte kalibračnú závislosť ako vzťah  $\text{Turbidita} = \text{funkcia}(\text{zried'ovací faktor})$ , pričom zried'ovací faktor bude mať hodnotu 1 pre nezriedené mlieko; 0,5 pre mlieko zriedené na polovinu; 0,25 pre pôvodné mlieko zriedené na jednu štvrtinu a tak ďalej.
8. Zostrojenú kalibračnú závislosť použite na zistenie neznámeho zried'ovacieho faktora vo vzorke mlieka s neznámym riedením.
9. Aplikujte tento postup na mlieko s rôznym obsahom tukov a diskutujte aká matematická funkcia najlepšie popisuje nameranú závislosť, ako vypočítame výsledok pomocou rovnice funkcie a podobne.

## Experiment

### Úlohy pre študentov

**Úloha 1**

Zmerajte turbiditu (rozptyl žiarenia) mlieka v pôvodnom stave (plnotučné, polotučné a iné), zaznamenajte si hodnoty nameranej veličiny.

**Úloha 2**

Vzorky mlieka riedte vždy na polovinu pre daný konkrétny postup zried'ovaním pôvodného mlieka minimálne 3-krát paralelne na polovicu a zostrojte kalibračnú čiaru  $\text{Turbidita} = \text{funkcia}(\text{zried'ovacieho faktora})$ .

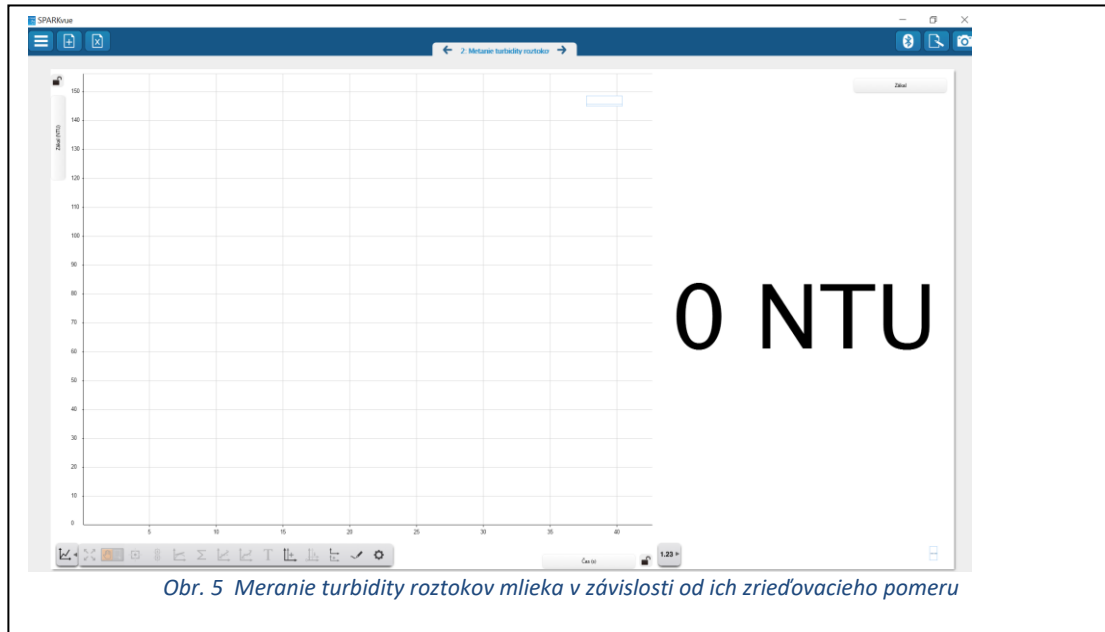
**Úloha 3**

Stanovte neznáme riedenie vzorky mlieka a vyjadrite ho ako pomerné číslo k pôvodnej koncentrácii látok v mlieku považovanej za jednotkovú.

Obrázok 0-3 e-protokol - úlohy pre študentov

## Meranie

### Meranie pomocou Pasco kolorimetra a turbidimetra a softvéru Sparkvue



Obr. 5 Meranie turbidity roztokov mlieka v závislosti od ich zriedňovacieho pomeru

### Analyza získaných výsledkov

Študenti majú v e-protokole pripravenú stranu kde majú zhodnotiť celý experiment a vyvodit' záver zo svojej bádateľskej práce.

### Ukladanie e-Protokolu

Spôsob ako uložit' svoj iProtokol majú študenti k dispozícii na poslednej snímke (xx)

**Na záver si skontroluj celý protokol: svoje merania a vyplnené odpovede na otázky, problémy a hypotézy. Ak potrebuješ niečo zmenit', alebo upraviť, urob to skôr, ako uložit' celý protokol.**

3. Protokoly sa ukladajú do súboru My SPARK Data. Svoj protokol pomenuj (tvoje meno): meno\_Mlieko\_konzentrácia.spklab A ulož ho do priečinku Protokoly

1. Klikni na Menu

2. V rámci ponuky klikni na Uložit' ako...

Obr. 3 Ukladanie protokolov (Brestenská, Beáta; Fadoš, Ivana., 2019)

---

## Formatívne sebahodnotenie

Nakoniec, majú študenti priestor pre sebahodnotenie (**Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj o dkazov.**) – kde vyhodnotia, či správne riešili tri zadané úlohy. Formulujú výstižne svoj kognitívny proces, čo im robilo problémy, čo sa naučili, aké zručnosti nadobudli atď.

---

## Diskusia

### Odporúčané témy pre ďalšie experimenty:

1. Zistite aké sú hodnoty turbidity rôznych druhov mlieka tak že použijete rovnaké zried'ovacie pomery.
2. Zistite aká je kvalita vody, ktorú pijeme. Z vodovodu doma, v škole, zo studne, z obchodu a vyvod'te závery.

Študenti, môžu samostatne navrhnúť ďalšie zaujímavé experimenty pre využitie senzora kolorimenta a turbidimetra.

### LITERATÚRA

1. Labuda J., a kolektív: Analytická chémia, ALFA/SNTL, Bratislava 2019.
2. <https://pasco.com>
3. <https://vsetkomlieko.webnode.sk/news/kazein-v-mlieku-zlozenie-mlieka/>
4. [https://www.youtube.com/watch?v=V\\_v8gfSCFTU](https://www.youtube.com/watch?v=V_v8gfSCFTU)