

Imię i nazwisko studenta	Data	Ocena	Podpis prowadzącego

PODSTAWOWE KRYTERIA WYBORU I OCENY PRZYDATNOŚCI METOD ANALITYCZNYCH

Zalecana literatura do tematu znajduje się na końcu instrukcji.

Podstawy analityki

Chemia analityczna (analityka) jest działem chemii zajmującym się uzyskiwaniem informacji o układach materialnych, zwłaszcza o rodzaju i ilości ich składników, włącznie z ich przestrzennym uporządkowaniem i rozmieszczeniem, jak też zmianami zachodzącymi w czasie. Analityka nie ogranicza się więc tylko do badania składu. Jej celem jest zbieranie i interpretowanie informacji chemicznych, które będą przydatne w celu identyfikacji i oznaczania składników materii, a także o dynamice przemian zachodzących w czasie i w przestrzeni w badanych obiektach. Wyniki analiz dostarczają informacji dotyczących zakresów:

1. **Składu układów materialnych.** W tym zakresie uzyskujemy odpowiedź na pytanie – **co?** – w *analizie jakościowej* oraz – **ile?** – w *analizie ilościowej*;
2. **Struktury cząsteczek i ciał stałych.** Wyniki *analizy strukturalnej* informują o konfiguracji i konformacji cząsteczki związku chemicznego. Analiza strukturalna może nieść informacje jakościowe (o rodzaju i sposobie połączeń: atomów, grup funkcyjnych). W wyniku tej analizy uzyskuje się wzory strukturalne badanych związków. Analiza strukturalna ilościowa pozwala określić pełną, przestrzenną strukturę cząsteczki (odległości między atomami i kąty między wiązaniami). Informacja o strukturze ciał stałych i danych o komórkach elementarnych kryształu – analiza krystalograficzna. Uzyskujemy odpowiedź na pytanie – **jaka jest struktura?**;
3. **Przemian zachodzących w czasie i przestrzeni w obrębie analizowanych cząsteczek.** Wyniki *analizy procesowej* lub *dynamicznej* pozwalają na badanie przebiegu przemian chemicznych i fizycznych, procesów biochemicznych i technologicznych zachodzących w próbce w zależności od czasu. Analiza procesowa dwuwymiarowa pozwala na określenie zmiany ilości składników w zależności od czasu. Analiza procesowa trójwymiarowa odpowiada na pytanie, jakie składniki występują w próbce i jak się zmienia ich zawartość w czasie? Uzyskujemy odpowiedź na pytanie ogólne – **jak przebiega?**;
4. **Niejednorodności ciał stałych.** Odpowiedzi na pytanie – **gdzie?** – dostarcza *analiza rozmieszczenia*, poprzez wielowymiarowe informacje analityczne o rozmieszczeniu danego składnika w próbce. Polega ona na kolejnych analizach punktowych (liniowych, powierzchniowych i przestrzennych). Badania dotyczą powierzchni ciał stałych – w *analizie powierzchni* lub objętości – w *analizie mikroobszarów*;
5. **Form występowania pierwiastków w przyrodzie** – *specjacja* odpowiada na pytanie – **w jakiej postaci** (chemicznej) występuje pierwiastek w środowisku lub w organizmie żywym?

Poniżej przytoczono terminy, zdefiniowane przez słownik chemii analitycznej, opisujące definicje i zasady analityki oraz cechy charakteryzujące metody analityczne.

Technika analityczna – zespół metod analitycznych wykorzystujących to samo zjawisko fizyczne.

Metoda analityczna – sposób identyfikacji (wykrywania) lub oznaczania składnika próbki. Metoda analityczna przedstawia strategiczną koncepcję uzyskiwania optymalnych informacji o obiekcie badań przy założonej zasadzie pomiaru. Ustala główny zarys przebiegu analizy. Metoda analityczna to konkretny sposób oznaczania analitu za pomocą danej techniki, poprzez wykonanie określonego postępowania. Metoda analityczna obejmuje proces od pobrania próbki do otrzymania wyniku i jego opracowania.

Strategia-procedura analityczna – sposób postępowania uwzględniający cały proces od pobrania próbki do oceny wyników. Procedura jest opisana w normach i instrukcjach. Procedura analityczna to cały proces metody analitycznej i uzyskana na podstawie opracowanych wyników informacja analityczna.

Zasada pomiaru – opisuje sposób stosowania określonych zjawisk przyrodniczych w celu uzyskania informacji analitycznych. Opis obejmuje wzajemne oddziaływania, jakim musi być poddana próbka celem uzyskania odpowiedzi analitycznej.

Składniki główne – nazywane również matrycą próbki stanowią od 1 do 100% zawartości próbki

Składniki uboczne – nazywane też domieszkowymi stanowią od 0,01 do 1% składu próbki

Składniki śladowe – ich zawartość w próbce nie przekracza 0,01%. Trudność oznaczenia składników śladowych jest tym większa im mniejsze jest stężenie. Wynika również ze składu próbki.

Wykrywalność/granica wykrywalności/limit detekcji (LOD) – najmniejsze stężenie lub ilość analitu w badanej próbce, które można wykryć daną metodą z określonym prawdopodobieństwem.

Oznaczalność/limit oznaczalności/granica oznaczalności (LOQ) – najmniejsze stężenie lub ilość analitu w badanej próbce, które można oznaczyć daną metodą.

Czułość metody analitycznej – stosunek przyrostu sygnału analitycznego do przyrostu zawartości (lub stężenia) oznaczanego analitu.

Precyzja metody – oznacza stopień zgodności między wynikami uzyskanymi w określonych warunkach, przy wykonaniu wielokrotnych pomiarów tej samej wielkości. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe zebranych wyników z serii pomiarów dla tego samego wzorca. Mała wartość odchylenia standardowego oznacza dużą precyzję i powtarzalność wyników.

Dokładność – stopień zgodności wartości rzeczywistej ze średnią arytmetyczną wyników uzyskanych dla oznaczanej wielkości.

Selektywność metody – możliwość zastosowania metody do wykrycia lub oznaczenia tylko pewnej liczby składników.

Specyficzność metody – możliwość zastosowania metody w określonych warunkach do analizy tylko jednego składnika próbki.

Uniwersalność metody – możliwość stosowania jej w dużym zakresie stężeń oznaczanej substancji lub do oznaczania różnych składników.

Niezawodność – uzyskane wyniki zależą w niewielkim stopniu od czynników nie ujętych w opisie metody.

Analiza chemiczna realizowana jest poprzez zastosowanie wielu technik i metod w celu uzyskania i oszacowania informacji o istocie materii. Różnorodność i wielość metod analitycznych nie jest przypadkowa. Przytoczone w dalszej części opracowania przykłady dowodzą, że wskazany analit zbadać można wieloma sposobami. Zwykle jednak wybierana jest jedna konkretna metoda, która pozwala na uzyskanie poprawnego wyniku analizy.

Wyborem metody analitycznej, zastosowanej do rozwiązania konkretnego zadania, kierują różnie potrzeby i ograniczenia. Wybór zależy zarówno od właściwości analizowanej próbki, jak i od postawionego zadania analitycznego:

- a. *Rodzaj oczekiwanej informacji* – jakościowa, ilościowa, strukturalna, wymagana precyzja i dokładność oznaczeń;
- b. *Wielkość próbki i zawartość analitu w próbce* – wybieramy metody wystarczająco czułe oraz z użytecznym zakresem oznaczalności;
- c. *Obecność innych składników próbki (matryca)* – wybieramy metody selektywne lub/i specyficzne, w których sygnał jest generowany tylko przez analit, lub nie występuje interferencja składników towarzyszących;
- d. *Rodzaj, charakter i budowa analitu* – wybieramy te techniki, które oparte są na obserwacji zjawisk fizycznych lub chemicznych, generowanych przez analit w warunkach metody. Prawie każda właściwość fizyczna lub fizykochemiczna charakteryzująca dany pierwiastek lub związek może być podstawą jego analizy metodami klasycznymi lub instrumentalnymi;
- e. *Możliwość zastosowania analizy niszczącej lub konieczność oszczędzenia próbki*;
- f. *Oczekiwany termin wykonania analizy*;
- g. *Koszt analizy*;
- h. *Możliwości techniczne laboratorium, posiadany sprzęt i aparatura*.

Procedury analityczne

Procedura analityczna posiada określone etapy. Realizacja wszystkich przedstawionych etapów niezbędna jest wyłącznie w przypadku kompleksowej analizy próbki nieznaną lub programowania nowej procedury. W kolejności wykonuje się następujące prace:

1. **Określenie zakresu problemu i potrzeb planowanej analizy** – poziom dokładności, dopuszczalny koszt, rodzaj oczekiwanej informacji analitycznej.

2. **Wybór techniki i metody** – (i) wybór techniki odpowiadającej możliwościom próbki i zawartego w niej analitu – najskuteczniejszej dla żądanych potrzeb analizy; (ii) wybór dokładnej instrukcji postępowania, czyli metody, w obrębie wybranej techniki; (iii) decyzja o podjęciu badania wybraną metodą na podstawie oceny wyników wykonanych prób.

3. **Pobieranie próbek** – kolejno przygotowywane są: (i) najmniejsza *próbka reprezentatywna*, której struktura nie różni się zasadniczo, pod względem badanej cechy od populacji generalnej (dobór procedury postępowania z materiałem niejednorodnym dla uzyskanie próbki reprezentatywnej); (ii) próbka laboratoryjna przeznaczona do prowadzenia analizy; (iii) próbka analityczna w całości przeznaczona do jednego oznaczenia lub wykorzystywana bezpośrednio do badania.

4. **Wstępna obróbka i kondycjonowanie próbek** – przekształcenie próbki w postać odpowiednią do zastosowania wybranej techniki i metody: rozpuszczanie, oddzielanie analitu od matrycy, przekształcanie analitu w inną postać chemiczną. Większość metod analitycznych wymaga przeprowadzenia próbki do roztworu (grawimetria, miareczkowanie, spektrofotometria UV-Vis, spektrofluorymetria, fotometria płomieniowa, absorpcyjna spektrometria atomowa, potencjometria, konduktometria, elektrograwimetria, kulometria, polarografia, woltamperometria, metody rozdzielcze, większość metod optycznych). Nieliczne metody pozwalają badać próbki w postaci stałej lub w roztworze (spektrofotometria IR, spektrometria mas, spektrometria NMR, spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej).

Przygotowanie próbki do przeprowadzenia wybranej metody analitycznej może wymagać różnych czynności:

- a) Przeprowadzenia próbki do roztworu. Jest to jedna z najczęściej wykonywanych procedur. Zależnie od rodzaju analitu i wymagań metody może być prowadzone jako: *rozpuszczanie* (w rozpuszczalniku, który nie zakłóci przebiegu analizy i nie zanieczyści analitu); *roztwarzanie*, gdy analit nie jest rozpuszczalny w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych w wystarczającym stopniu; *stapianie próbek*, gdy

substancja nieorganiczna nie ulega działaniu kwasów lub alkaliów; *mineralizacja*, w celu oznaczenia składników nieorganicznych w próbkach organicznych, powoduje usunięcie części organicznej. Wszystkie procesy poza rozpuszczaniem zachodzą z udziałem przemian chemicznych. Próbka ulega rozkładowi.

- b) Wydzielanie, rozdzielanie i zateżanie analitu. Obejmuje wiele różnych, nierzadko złożonych czynności jak: *sączenie, strącanie, wirowanie, ekstrakcja, krystalizacja, chromatografia, destylacja, absorpcja, adsorpcja, filtracja, dializa* i inne.
- c) Maskowanie czynników zakłócających pomiar
- d) Derywatywacja analitu

5. **Analiza jakościowa** – przeprowadzenie prób w określonych, powtarzalnych warunkach i przeprowadzenie analogicznych prób z materiałem odniesienia do celów porównawczych.

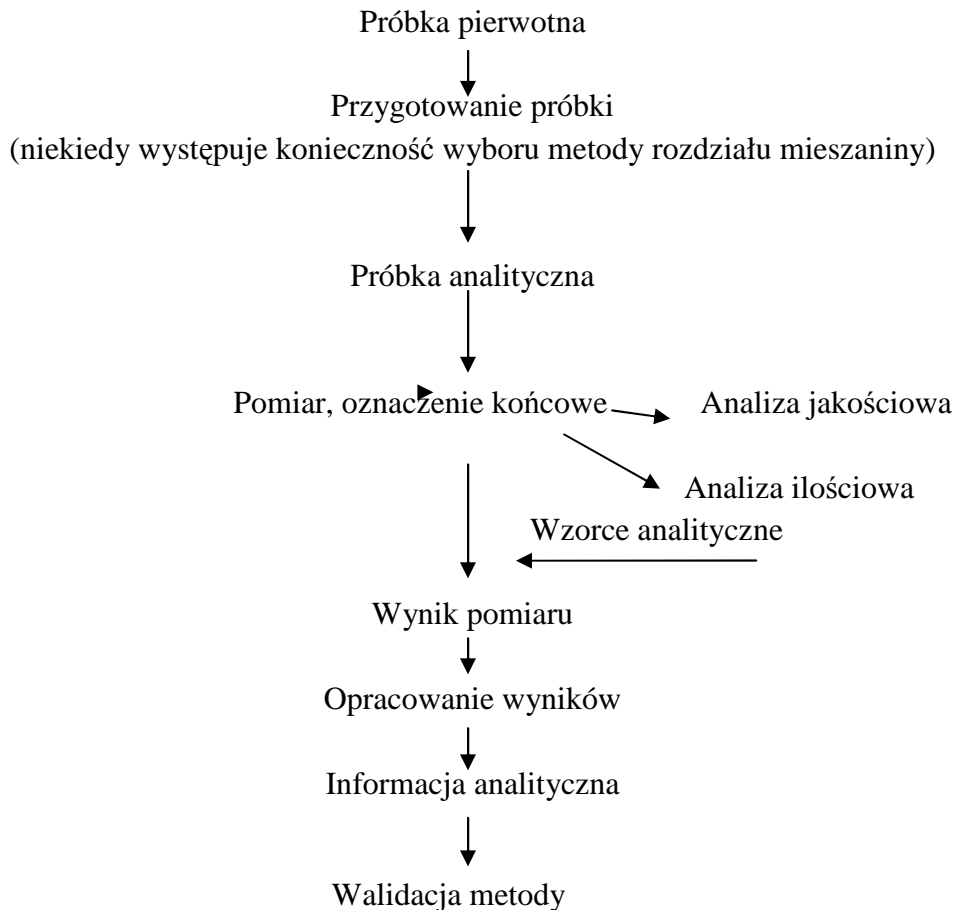
6. **Analiza ilościowa** – przygotowanie wzorców ze znaną ilością analitu lub czystych odczynników, kalibrowanie aparatury w celu określenia wielkości sygnału, pomiar sygnału w warunkach analogicznych do pomiaru wzorca, obliczenie wyników i ich statystyczne opracowanie.

7. **Przygotowanie końcowego sprawozdania** – zawiera opis procedury analitycznej, wyniki i ich opracowanie statystyczne, szczegółowy opis problemów na kolejnych etapach analizy.

8. **Ocena podstawowego problemu** – dyskusja wyników pod kątem ich istotności w rozwiązaniu problemu.

9. **Ocena wiarygodności wyników analizy** – zawiera opis procedury walidacyjnej, potwierdzającej wartość uzyskanych wyników analizy.

Poniżej przedstawiono schemat procedury analitycznej obiektu badanego ogólnie (np. materiał roślinny):



Podział technik i metod analitycznych

Techniki analityczne rozróżniane są najczęściej ze względu na źródło informacji:

Źródło informacji. Istnieje wiele procesów fizycznych i chemicznych, które można wykorzystać w celu uzyskania informacji analitycznej. Procesy te związane są z właściwościami atomów lub cząsteczek. Zastosowanie mają również zjawiska umożliwiające wykrywanie pierwiastków i związków chemicznych, a także ich ilościowe oznaczanie w kontrolowanych warunkach.

Na podstawie tej definicji utworzono zestawienie technik analitycznych o określonym zakresie: obserwowanego zjawiska fizycznego lub/i chemicznego oraz zastosowania.

Technika	Mierzona wielkość	Zastosowanie
Grawimetria	Masa produktów reakcji strącania	Oznaczanie składników głównych i pobocznych
Analiza miareczkowa	Objętość titranta	Oznaczanie składników głównych i pobocznych
Gazometria	Objętość wydzielonego gazu	Oznaczanie składników głównych i pobocznych
Termograwimetria	Fizykochemiczne zmiany analitu pod wpływem chłodzenia lub ogrzewania Ubytek masy	Charakterystyka pojedynczego składnika lub mieszanych głównych/pobocznych składników
Spektroskopia atomowa i cząsteczkowa	Długość fali i natężenie promieniowania elektromagnetycznego zmieniającego kierunek, emitowanego lub absorbowanego przez analit	Analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów
Spektrometria mas	Rozdział na podstawie stosunku masy/ladunku jonów molekularnych i fragmentarycznych	Analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów
Chromatografia i elektroforeza	Różne wielkości fizykochemiczne charakteryzujące rozdzielane anality	Analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów
Analiza elektrochemiczna	Elektryczne właściwości analitu w roztworze	Analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów
Analiza radiochemiczna	Charakterystyczne jonizujące promieniowanie jądrowe emitowane przez analit	Analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów

Wybór sygnału analitycznego (mierzonej wielkości fizycznej lub fizykochemicznej) jest dokonywany w oparciu o znajomość i dostępność metod analitycznych.

Metody analizy chemicznej zwane także klasycznymi wykorzystują odpowiednie **reakcje chemiczne**, które pozwalają wykryć i oznaczyć ilościowo badany składnik.

Metody analizy instrumentalnej wykorzystują charakterystyczne **właściwości fizyczne** lub **fizykochemiczne** substancji do jej identyfikacji i ilościowego oznaczenia.

Podział metod wg sposobu oznaczeń końcowych

I. Metody oparte na chemicznych reakcjach analitycznych, których podstawą są zjawiska chemiczne (reakcje analityczne):

- Metoda wagowa – wymiana jonów (grawimetria)
- Metody objętościowe – wymiana protonów (alkacymetria); wymiana elektronów (redoksymetria); wymiana ligandów (kompleksometria).

II. Metody oparte na właściwościach fizycznych, głównie na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z próbką:

1. Metody spektroskopowe dotyczą one pomiaru zjawisk związanych z niesprężystym oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego z badaną próbką. Oparte są one na technikach: absorpcyjnej i emisyjnej. W wyniku pomiarów powstają widma absorpcyjne lub widma emisyjne.

a) Techniki absorpcyjne.

Wykorzystują fakt zdolności niektórych substancji do pochłaniania światła. Substancje takie pochłaniają zwykle fale świetlne o określonych długościach w sposób charakterystyczny, zależny od budowy. Jeśli nawet pochłanianie zachodzi w tym samym zakresie długości fal, charakterystyczna pozostaje zwykle intensywność pochłaniania. W technikach tych stosuje się pomiar absorbancji (**A**), natężenia światła (**I**) oraz transmitancji (**T**).

Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa.

Spektroskopia cząsteczkowa obejmuje badanie widm cząsteczkowych powstałych w wyniku absorpcji. W ujęciu ogólnym, na każde widmo cząsteczkowe przypadają trzy rodzaje promieniowania elektromagnetycznego: widmo rotacyjne, widmo oscylacyjno-rotacyjne oraz widmo elektronowo-oscyłacyjno-rotacyjne. Absorpcja w zakresie widzialnym i w nadfiolecie związana jest głównie ze stanami elektronowymi cząsteczek (spektrometria elektronowa), w zakresie podczerwieni z oscylacyjnymi (spektrometria oscylacyjna), w zakresie mikrofalowym z rotacyjnymi (spektrometria rotacyjna).

W wyniku stosowania aparatów zwanych *spektrofotometrami* uzyskuje się widma absorpcyjne, charakterystyczne dla badanej substancji. Przez badaną próbkę przechodzą kolejno wiązki światła monochromatycznego. Podział metod spektrofotometrycznych związany jest z określonym przedziałem długości fal świetlnych stosowanych oraz z różnorodnością ich oddziaływań niesprężystych z substancją badaną. Różne są również źródła promieniowania elektromagnetycznego.

- Spektrofotometria UV-Vis
- Spektroskopia w podczerwieni IR
- Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR
- Spektroskopia paramagnetycznego rezonansu elektronowego EPR
- Absorpcjometria (kolorymetria)

Absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA), wykorzystuje zjawisko absorpcji charakterystycznego promieniowania elektromagnetycznego atomy przez atomy cząsteczek, poddanych uprzednio atomizacji i przeprowadzone w stan pary wolnych atomów, znajdujące się w stanie podstawowym. Następuje pomiar osłabienia promieniowania elektromagnetycznego. Absorpcja odbywa się tylko w zakresie długości fal charakterystycznych dla pierwiastków.

b) Techniki emisyjne.

Pojedyncze atomy, cząsteczki pierwiastków oraz związków chemicznych obdarzone są pewnym zasobem energii wewnętrznej, której ilość ulega zmianie. Stany podwyższonej

energii są nietrwałe. Atom emituje nadmiar energii aż do stanu minimalnej dla danych warunków wartości. Atomy emitują promieniowanie tylko w stanie wzbudzonym. Atomy poddane wzbudzeniu emitują widmo liniowe (wybrane długości fal promieniowania). Emisja promieniowania następuje przy przejściu ze stanu wzbudzonego na niższy poziom energii. Techniki emisyjne dzieli się w zależności od *rodzaju wzbudzenia*, od którego zależy ilość pochłoniętej energii i stopień wzbudzenia. Inny podział dotyczy rodzaju źródła emisji.

Techniki emisyjne atomowe

- Fotometria płomieniowa – najprostsza metoda oparta na emisji promieniowania przez atomy próbki po atomizacji i wzbudzeniu w strumieniu energii płomienia palnika.
- Spektrografia emisyjna – emisja promieniowania UV-VIS przez atomy próbki wzbudzonej.
- Fluorescencja rentgenowska – emisja promieniowania rentgenowskiego przez elektron. Atomy wzbudzone promieniami Roentgena.

Techniki emisyjne cząsteczkowe

Substancje chemiczne podlegające napromieniowaniu ulegają wzbudzeniu, a następnie emitują pochłoniętą energię w postaci promieniowania elektromagnetycznego lub w postaci ciepła. Substancje te często powodują emisje światła w zakresie widzialnym. Mechanizm przejść elektronowych decyduje o tym, czy jest to *fluorescencja* czy *fosforescencja*. Oba zjawiska nazywane są ogólnie *fotoluminescencją*. Rodzaje luminescencji: fotoluminescencja – cząsteczki wzbudzone promieniowaniem elektromagnetycznym; chemiluminescencja – cząsteczki wzbudzone w czasie reakcji chemicznej; bioluminescencja – wzbudzenie cząsteczek w przebiegu procesów biologicznych; elektroluminescencja – wzbudzenie strumieniem elektronów.

- Fluorymetria
- Spektrofluorymetria

2. Metody optyczne oparte są na sprężystym oddziaływaniu z promieniowaniem elektromagnetycznym bez powodowania zmiany ilości energii promieniowania.

W wyniku tych oddziaływań obserwuje się: rozproszenie, załamanie, skręcanie płaszczyzny polaryzacji światła. W metodzie tej stosowane są różne techniki pomiaru.

a. Technika pomiaru intensywności zmętnienia

Umożliwiają oznaczanie związków chemicznych i pierwiastków nie tworzących połączeń barwnych, lecz tworzących pochodne nierozpuszczalne. Powstające w przebiegu reakcji chemicznych analitu związki nierozpuszczalne w odpowiednio małych stężeniach są subtelną zawiesiną lub roztworem koloidalnym. W pewnych granicach stężeń intensywność powstającego zmętnienia jest wprost proporcjonalna do stężenia badanej substancji.

- Nefelometria
- Turbidymetria
- Dyfrakcja promieni rentgenowskich

b. Technika pomiaru współczynnika załamania światła.

Ta sama substancja w różnych stężeniach oraz różne substancje w tym samym stężeniu wykazują różny współczynnik załamania światła (refrakcji – n).

- Refraktometria
- Interferometria

c. Technika pomiaru skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła spolaryzowanego

W wiązce światła spolaryzowanego drgania fali świetlnej są uporządkowane w jednej płaszczyźnie. Kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji jest proporcjonalny do stężenia substancji wywołującej skręcenie (kąt skręcenia polaryzacji światła (α))

- Polarymetria

d) Technika pomiaru światła odbitego

- Reflektometria

III. Właściwości fizykochemiczne. Metody oparte głównie na procesach elektrochemicznych. Metody oparte na tych właściwościach, wg. Komisji Chemii Elektroanalitycznej Wydziału Chemii Analitycznej IUPAC, nazywane są metodami elektrochemicznymi lub elektroanalitycznymi

Metody elektroanalityczne wykorzystują zjawiska związane z przepływem prądu elektrycznego przez roztwory elektrolitów i reakcje zachodzące na elektrodach zanurzonych w roztworach elektrolitów.

1. Wydzielanie elektrolityczne (elektroliza zachodzi w całej masie roztworu)

Polegają na pomiarze (ważeniu) wydzielonego, oznaczanego składnika roztworu, na elektrodzie podczas przepływu prądu elektrycznego pomiędzy elektrodami w nim zanurzonymi. Pomiar dotyczy masy substancji wydzielonej na elektrodzie.

-Elektrogravimetria (wielkość mierzona – masa metalu lub tlenku metalu wydzielona na elektrodzie platynowej)

- Elektroliza wewnętrzna – ogniwo galwaniczne (elektrody platynowa i cynkowa połączone przewodem). Na elektrodzie platynowej wydziela się metal znajdujący się w roztworze, do roztworu przechodzi zaś ilościowo cynk z drugiej elektrody.

-Elektrografia (wielkość mierzona-porównanie elektrografów, masa substancji rozpuszczonej elektrodowo)

-Kulometria i miareczkowanie kulometryczne

W przebiegu oznaczenia zachodzi zjawisko **elektrolizy w całej masie** badanej próbki

Wielkość mierzona – ładunku elektrycznego (C) przepływającego przez badany roztwór elektrolitu, niezbędnego do reakcji *elektrooutlenienia* i *elektroredukcji* oznaczanej substancji. Wartość ładunku zmierzonego jest proporcjonalna do zawartości.

Analiza kulometryczna bezpośrednia

Substancja badana podlega reakcji bezpośredniej na elektrodzie.

Analiza kulometryczna pośrednia

Substancja reaguje z inną, wytwarzaną na elektrodzie. Kulometry wagowe, Kulometr miareczkowy, Kulometry gazowe, Kulometry kolorymetryczne.

2. Przepływ prądu pomiędzy elektrodami (zjawisko-elektroliza warstwy dyfuzyjnej)

Oparte są na pomiarze **natężenia prądu elektrycznego** przepływającego w układzie elektrod w roztworze badanym pod wpływem przyłożonego napięcia. Pomiar dokonywany jest z użyciem rtęciowej elektrody kroplowej.

-Polarografia – badanie zależności natężenia prądu elektrycznego doprowadzonego od napięcia lub potencjału elektrody z zastosowaniem elektrod ciekłych

-Woltamperometria – badanie zależności natężenia prądu elektrycznego doprowadzonego od napięcia lub potencjału elektrody z zastosowaniem stacjonarnych elektrod wskaźnikowych

-Amperometria i miareczkowanie amperometryczne – badanie zależności natężenia prądu w funkcji stężenia substancji elektroaktywnej przy stałym potencjale z użyciem elektrod zarówno ciekłych jak i stałych

3. Zmiana potencjału elektrody wskaźnikowej (zjawisko – przez ogniwo nie płynie prąd stały).

Oparte na pomiarze różnicy potencjałów elektrochemicznych między elektrodami zanurzonymi w analizowanych roztworach (elektroda wskaźnikowa i elektroda odniesienia). Potencjał elektrody wskaźnikowej zależy od stężenia badanej substancji.

- Potencjometria – różnica potencjałów między elektrodami zależy wprost od stężenia substancji badanej.

Pehametria: *Pehametria bezpośrednia* – bezpośredni pomiar pH bez wzorcowych roztworów buforowych. *Elektrody* – wodorowa, chinhydronowa, antymonowa, bizmutowa; *Pehametria pośrednia* – do pomiaru pH stosuje się roztwory buforów wzorcowych. Metoda jest częściej stosowana, ma największą dokładność. *Elektroda* – szklana

- Miareczkowanie potencjometryczne – zmiana potencjału w zależności od objętości zużytego odczynnika miareczkującego, określenie punktu końcowego miareczkowania.

Miareczkowanie pehametryczne. Elektrody – szklana, chinhydronowa, wodorowa

Miareczkowanie redoksymetryczne Elektrody - wskaźnikowa – platynowa; odniesienia – NEK (nasycona elektroda kalomelowa)

Miareczkowanie precypitometryczne Elektrody – z metali biorących udział w oznaczeniu

Miareczkowanie kompleksometryczne Elektrody – jonoselektywna, rtęciowa

4. Przewodnictwo lub pojemność elektryczna roztworów (zjawisko – przez ogniwo nie płynie prąd stały). Wielkość mierzona – przewodnictwo, opór elektryczny (konduktancja – mierzona w simensach S, roztworów elektrolitów, zależna od stężenia, ładunku i rozmiaru jonów).

- Konduktometria

- Miareczkowanie konduktometryczne

- Oscylometria

- Miareczkowanie oscylometryczne

IV. Metody oparte na pomiarze promieniowania powstającego w wyniku reakcji jądrowych (α , β , γ) Polegają na pomiarze promieniowania jądrowego emitowanego przez naturalne i sztuczne izotopy promieniotwórcze. Również efekty naświetlania badanej próbki promieniowaniem jądrowym.

- **Metody radiometryczne**

Metody oparte na absorpcji i odbiciu promieniowania jądrowego.

Metody oparte na pomiarze aktywności naturalnych pierwiastków promieniotwórczych.

Metody polegające na wzbudzeniu atomów przez naświetlanie promieniowaniem gamma ze źródeł izotopowych. Wzbudzone atomy emitują charakterystyczne promieniowanie fluorescencyjne.

Metody wskaźników promieniotwórczych.

V. Metody rozdzielcze służące wyizolowaniu substancji, jej identyfikacji i oznaczaniu, dzięki zróżnicowanej odpowiedzi specyficznych substancji na warunki rozdziału.

- Chromatografia – podział składników mieszaniny pomiędzy fazę stacjonarną i ruchomą układu

Parametry podziału – współczynnik retencji (k); ułamek czasu migracji substancji (R_f) – czynnik zatrzymania lub ułamek prędkości; R_M – $\log k$. Rodzaje: chromatografia gazowa; cieczowa, kolumnowa; cienkowarstwowa.

- Elektroforeza – zróżnicowana szybkość poruszania się naładowanych cząstek mieszaniny w polu elektrycznym. Parametr podziału – ruchliwość elektroforetyczna μ_{ef} Rodzaje: swobodna; w nośnikach; na bibule; na żelach; kapilarna.

VI. Metody oparte na innych zjawiskach fizycznych

1. Strumień cząsteczek naładowanych i jonów w polu magnetycznym o różnym stosunku m/z

- Spektrometria mas

2. Efekty cieplne (bez zmiany masy)

- Termiczna analiza różnicowa (DTA)

3. Zmiany masy ogrzewanej próbki

- Termograwimetria (TG)

4. Efekty cieplne związane ze zmianą masy

- Termiczna analiza różnicowa (DTA)

Obecne trendy w stosowaniu instrumentalnych technik analitycznych:

Chromatograficzne > optyczne > elektryczne > klasyczne > sprzężone > mieszane > jądrowe

Uwaga: źródła pozyskiwania informacji o właściwościach chemicznych, fizycznych i fizykochemicznych: np. Farmakopee (Polska, Europejska itp.), Poradnik fizykochemiczny.

Praca zbiorowa Wyd. Nauk-Tech.1974).

I. Metody oparte na chemicznych reakcjach analitycznych, których podstawą są zjawiska chemiczne (reakcje analityczne):

Rodzaj metody		Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Metoda wagowa (grawimetria)		Ściśle określony skład chemiczny analitu i znany Ir w rozpuszczalniku,	Efekt solny Wpływ jonów wodorowych przy wytrącaniu wodorotlenków i soli słabych kwasów Hydroliza osadu, Wpływ temp	Ba SO ₄ MgNH ₄ PO ₄ Fe(OH) ₃
Metody objętościowe	Alkacymetria	Zachodzenie reakcji kwas-zasada (w znaczeniu teorii Brönsteda)	Dobór wskaźnika, pH i titranta	HCl titrant-NaOH wskaźnik oranż metylowy
	Argentometria	Znany Ir w rozpuszczalniku	1) Dobór wskaźnika w zależności od Ir powstających substancji, 2) Roztwór nie może zawierać inne nie oznaczane aniony mogące stanowić konkurencyjne trudno rozpuszczalne osady ze wskaźnikiem w zależności od pH	W metodzie Mohra: chlorki, bromki, srebro w środowisku obojętnym W metodzie Volharda: chlorki, bromki w środowisku kwaśnym
	Redoksymetria	Równocześnie zachodzące reakcje utleniania i redukcji	1) Dobór pH zależny od reakcji zachodzących w roztworze 2) W jodometrii wykorzystuje się związek addycyjny z jodem jako wskaźnik	1. Nadmanganianometria- oznaczanie reduktorów. 2. Jodometria do oznaczania utleniaczy np. Fe(III), Cu (II), aceton, aldehydy, hydrochinon i reduktorów np.: As ₂ O ₃ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ SO ₃
	Kompleksometria	Utworzenie trwałego i rozpuszczalnego związku kompleksowego	Dobór pH i wskaźnika tak aby trwałość kompleksu metal - EDTA była dużo większa niż kompleksu metal-wskaźnik	1. Do oznaczania metali na różnym stopniu utlenienia metodami: bezpośrednią, odwrotną, podstawieniową. Do oznaczania anionów metoda pośrednia np. siarczany.

II. Metody oparte na właściwościach fizyczne, głównie na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z próbką:

Rodzaj metody		Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Metody optyczne	Nefelometria	Rozproszenie promieniowania, współczynniki załamania światła ośrodka i fazy rozproszonej muszą być różne	Kąt pomiaru promieniowania rozproszonego najczęściej powinien wynosić 90° aby oddzielić promieniowanie wiązki pierwotnej od promieniowania rozproszonego. Warunki pomiaru próbek badanych winny być możliwie identyczne	Oznaczanie ilościowe np.: anionów Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} rozcieńczonych roztworów białek
	Turbidymetria	Rozproszenie i absorpcja promieniowania, pomiar absorpcji pozornej	Warunki pomiaru próbek badanych winny być możliwie identyczne	Oznaczanie ilościowe np.: anionów Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} w stężeniu 10^{-6} – 10^{-9} mol/l, rozcieńczonych roztworów białek
	Refraktometria	Załamania światła wynikające ze zmiany prędkości światła przy przechodzeniu przez ośrodki o różnej gęstości	Pomiar współczynnika załamania nie jest selektywny, dlatego skład jakościowy substancji musi być znany, do badania stosowane jest światło monochromatyczne	Pomiary form enancjomerycznych, refrakcji molowych R_m
	Polarymetria	Zdolność substancji optycznie czynnej do skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego	Istotna jest długość fali i temperatura pomiarów	Identyfikacja i oznaczanie środków leczniczych, badanie równowag i mechanizmów reakcji Oprócz oznaczania stężeń związków czynnych optycznie, technika ta umożliwia także pomiar tzw. <u>czystości optycznej enancjomerów</u> . Zastosowanie w przemyśle cukrowniczym.

Rodzaj metody		Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Absorpcja promieniowania	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa VIS (kolorymetria)	Selektywna absorpcja (związana ze stanami elektronowymi cząsteczki,) promieniowania widzialnego. Zabarwienie obserwowane jest dopełnieniem barwy promieniowania absorbowanego.	Wymagana jest barwa własna jonu oznaczanego pierwiastka lub związku, w który w wyniku reakcji został przeprowadzony oznaczany pierwiastek lub obecność sprzężonych wiązań wielokrotnych albo chromoforu	Oznaczanie ilościowe Fe(III) za pomocą KSCN, należy zachować odpowiednie pH i stężenia reagentów z uwagi na możliwość powstawania barwnych kompleksów przeszkadzających
	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa UV/VIS	Promieniowanie ultrafioletowe powoduje przejścia elektronów wiązań typu π (wiązania wielokrotne) ze stanów podstawowych na wyższe poziomy energetyczne – <i>stany wzbudzone</i> .	Spełnione prawa absorpcji L-B i addytywności	Oznaczenia ilościowe i jakościowe, wyznaczanie pK aldehydu p-hydroksybenzoesowego, wyznaczanie składu kompleksu np. Fe (II) w $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ z kwasem 5-sulfo-salicylowym

	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa IR	Absorpcja w zakresie podczerwieni (0,2-30 μm np. wiąże się ze stanami oscylacyjnymi (spektrometria oscylacyjna), w zakresie mikrofalowym z rotacyjnymi (spektrometria rotacyjna).	Przygotowanie właściwe próbek do rejestrowania widma substancji w fazie gazowej, ciekłej i stałej.	Analiza strukturalna chloramfenikolu, oznaczenia ilościowe nifuroksazydu w zakresie NIR.
	Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)	Absorpcja promieniowania w zakresie fal radiowych 1-3000m przez jądra atomów cząsteczki w polu magnetycznym o dużym natężeniu	Odpowiednie przygotowanie próbek dostosowanie do rodzaju badanych cząsteczek właściwego natężenia pola magnetycznego	Badanie struktur cząsteczek np: p-chloronitrobenzen

Rodzaj metody		Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Emisja promieniowania	Emisja atomowa np. fotometria płomieniowa	Emisja promieniowania przez atomy próbki wzbudzonej strumieniem energii	Pierwiastki oznaczane muszą mieć niskie potencjały wzbudzenia (1,4-3,0 V), emitują promieniowanie w zakresie widzialnym. Istotne jest otrzymanie linii rezonansowej	Oznaczane są raczej litowce i berylowce stężenia do 10^{-8} g
	Emisja cząsteczkowa np. fluorymetria UV	Zdolność emisji promieniowania UV i VIS cząsteczek wzbudzonych (co warunkuje obecność w budowie związku układu sprzężonych wiązań podwójnych)	Próbka w formie ciekłej. Odpowiedni dobór monochromatora i detektora	Można oznaczać zarówno substancje organiczne, jak i nieorganiczne o stężeniach 0,01 ppm; np.: oznaczenie chlorowodoru chininy

III. Metody oparte na właściwościach fizykochemicznych, głównie na procesach elektrochemicznych nazywane są metodami elektrochemicznymi lub elektroanalitycznymi:

Rodzaj metody	Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Potencjometria i miareczkowanie potencjometryczne	Zmiana potencjału elektrody wskaźnikowej (zjawisko-przez ogniwo nie płynie prąd stały), (wielkość mierzona-potencjał elektrody) Związek spełnia równanie Nernsta. a) z użyciem elektrody szklanej kombinowanej b) z użyciem elektrody jonoselektywnej	Wymagają stężeń substancji oznaczanych co najmniej rzędu 10^{-2} - 10^{-3} mol/l, oraz ograniczenia zakresu pH zależnie od stosowanej elektrody szklanej kombinowanej, w przypadku wyznaczania kilku st. dysocjacji, różnice powinny być co najmniej o ok. 1,5 jednostek pH pomiędzy tymi stałymi. Dobór odpowiedniej elektrody do określonego rodzaju jonów	Oznaczanie zawartości CH_3COOH , oraz mieszaniny Na_2CO_3 i NaHCO_3 , wyznaczanie graficznie pK słabych kwasów
Konduktometria i miareczkowanie konduktometryczne	Związek jest elektrolitem, istotny jest dobór titranta	Przewodnictwo mocnych elektrolitów może przebiegać wyłącznie w roztworach bardzo rozcieńczonych	Oznaczanie ilościowe wodnych roztworów HCl, p-toluidyny i NH_4Cl

IV. Metody rozdzielcze

Rodzaj metody	Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Chromatografia	Metoda fizykochemiczna, rozdzielane składniki mieszaniny ulegają podziałowi ilościowemu pomiędzy dwie fazy z szybkościami określonymi przez ich powinowactwo do każdej fazy	Właściwy dobór faz w zależności od rodzaju oznaczanych składników mieszaniny oraz detektora w danej technice chromatograficznej	Analiza ilościowa aminokwasów metodą TL, oznaczanie ilościowe kofeiny metodą HPLC
Elektroforeza	Zróżnicowana szybkość migracji jonów w polu elektrycznym. Ruchliwość elektroforetyczna w danym roztworze jest wielkością charakterystyczną dla danego jonu przy zachowaniu określonych warunków doświadczalnych	Szczególnie w przypadku elektroforezy kapilarnej istotny jest dobór pH, lepkości i siły jonowej oraz składu roztworu w którym jest badany jon.	Zastosowanie w oznaczeniach aminokwasów, peptydów, białek, nukleotydów, DNA, węglowodanów, amin i witamin w próbkach biologicznych i płynach ustrojowych w analizie biochemicznej i biomedycznej, w analizie czystości leków i do rozdzielania izomerów optycznych oraz w badaniach farmakokinetycznych. W ochronie środowiska metoda jest najczęściej stosowana do oznaczeń fenoli, pestycydów i herbicydów.

Wielkości charakteryzujące metodę, jako kryteria wyboru metody analitycznej

Zgodnie z procedurą analityczną, początkowo następuje wybór techniki odpowiadającej możliwościom próbki i zawartego w niej analitu oraz najskuteczniejszej dla żądanych potrzeb analizy. Następnym krokiem jest wybór dokładnej instrukcji postępowania, czyli metody, w obrębie wybranej techniki. Decyzja o podjęciu badania wybraną metodą podejmowana jest na podstawie oceny wyników wykonanych prób, lub doświadczeń innych analityków.

Jak pokazują przedstawione poniżej przykłady, analit może być badany różnymi dostępnymi technikami i metodami, jednak nie każda z nich będzie jednakowo skuteczna. Przed wykonaniem właściwej analizy, czynnością zasadniczą jest wybór odpowiedniej metody analitycznej. Wybór ten musi uwzględniać założone kryteria (dla przypomnienia, przytoczono definicje wielkości charakteryzujących metody):

a) Właściwe postawienie zadania analitycznego

To określenie celu analizy, np. czy jest to analiza czysto chemiczna, służąca do zidentyfikowania składników próbki, czy też jest to analiza służąca do określenia stężenia lub ilości znanego składnika (składników) w mieszaninie lub roztworze. Służyć to może dalej do oceny jakości próbki, rozwiązania postawionego problemu badawczego czy postawienia właściwej diagnozy.

b) Określenie wymaganej precyzji i dokładności oznaczenia

Precyzja oznacza stopień zgodności między wynikami uzyskanymi w określonych warunkach, przy wykonaniu wielokrotnych pomiarów tej samej wielkości. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe zebranych wyników z serii pomiarów dla tego samego wzorca. Mała wartość odchylenia standardowego oznacza dużą precyzję i powtarzalność wyników.

Dokładność zaś rozumiemy, jako stopień zgodności wartości rzeczywistej ze średnią arytmetyczną wyników uzyskanych dla oznaczanej wielkości.

c) Czułość i ilościowy zakres zastosowania metody

Czułość metody analitycznej jest mierzona stosunkiem zmiany wartości sygnału analitycznego do odpowiadającej jej zmiany stężenia lub masy oznaczanego składnika.

W sensie matematycznym czułość metody wyrażana jest współczynnikiem kierunkowym krzywej kalibracyjnej (tangens nachylenia stycznej do wykresu krzywej kalibracyjnej).

Granica wykrywalności (ang. *limit of detection, LOD*) oznacza najmniejszą ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Jest ściśle związana z poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego (najczęściej to trzykrotność tego poziomu szumów).

Granica oznaczalności (ang. *limit of quantification, LOQ*) oznacza najmniejszą ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją.

Granice wykrywalności i oznaczalności wyznacza się przez pomiar stosunku sygnału do szumu (S/N). Polega to na wykonywaniu pomiarów dla ślepych prób i dla próbki o bardzo małej zawartości analitu. Wyznacza się wartość stosunku sygnału do szumu S/N i stosuje zasadę, że zawartość analitu, dla której S/N=3 jest dla stosowanej metody analitycznej granicą wykrywalności a zawartość, dla której S/N=10 jest granicą oznaczalności. Znając wartość odchylenia standardowego *s* oraz nachylenia krzywej kalibracji *a* wartości LOD i LOQ można również obliczyć ze wzorów: $LOD = (3,3s)/a$ oraz $LOQ = (10s)/a$, więc $LOQ \approx 3 \cdot LO$

d) Określenie wymogów selektywności i specyficzności oznaczeń

Selektywność metody to zdolność do rozróżniania oznaczanego składnika (grupy składników) w złożonej mieszaninie bez zakłóceń ze strony innych składników tej mieszaniny.

Metoda specyficzna to metoda o pełnej selektywności dla substancji oznaczanej.

e) Odtwarzalność

Odtwarzalność to cecha zgodności wyników otrzymanych podczas badania tego samego produktu (próbki), tą samą metodą, ale wykonywanych przez różnych wykonawców, w różnych laboratoriach lub w tym samym laboratorium w różnym czasie.

f) Trwałość próbki

Wybór metody do analizy musi uwzględniać podatność próbki na możliwość jej rozkładu w czasie wykonywanej analizy. Jest oczywiste, że przy oznaczaniu ilościowym składnika musimy mieć pewność, że oznaczany składnik wykazuje trwałość w czasie. Ta trwałość może zależeć od wielu czynników, np. takich jak: temperatura, pH środowiska, wilgotność, wystawienie próbki na wpływ światła słonecznego. Wykonując analizę należy wcześniej sprawdzić, na jakie czynniki zewnętrzne wrażliwa jest próbka, a te dobrać tak, aby pomiar był wiarygodny.

Innymi uwzględnianymi kryteriami mogą być również:

- g) Stan skupienia próbki
- h) Czas wykonywania analizy
- i) Liczba oznaczeń
- j) Koszt analizy

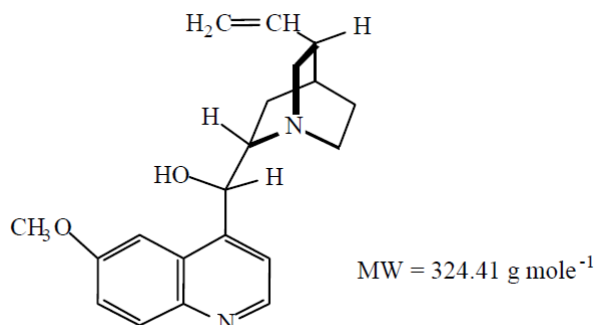
Spełnienie założonych kryteriów analitycznych wymaga przede wszystkim wybrania odpowiedniej reakcji chemicznej lub zjawiska fizycznego potrzebnego do wykonania oznaczenia. W przypadku zastosowania metod instrumentalnych, istotne jest również wybranie właściwej aparatury, odczynników, naczyń pomiarowych (kuwet itp.).

Poniżej, w kontekście zakładanych różnych kryteriów metody, przedstawiono przykłady zastosowania różnych metod oznaczania ilościowego kilku wybranych substancji. Trzeba stwierdzić, że nie ma metod uniwersalnych. Każda spełnia tylko część ze spisu wymienionych powyżej kryteriów. Przykłady dobrano tak, aby pokazać oznaczanie związków w różnych postaciach chemicznych. Wybrano **przykłady oznaczania jonów, np. Cl^- i Cu^{2+}** , jak i substancji cząsteczkowych, szczególnie mających znaczenie biologiczne, np. **chininy, ryboflawiny, alaniny i aspiryny**. Na przykładzie oznaczania chlorków metodą Mohra, jodometrycznego i kompleksometrycznego oznaczania Cu^{2+} czy alkacymetrycznego oznaczania aspiryny, pokazano i omówiono, jakie kryteria spełniają metody klasyczne. Równolegle pokazano, jakie kryteria spełniają metody instrumentalne, np. przy oznaczaniu tych samych chlorków metodami potencjometrycznymi, czy oznaczaniu chlorków metodami optycznymi, np. metodą nefelometryczną czy turbidymetryczną. Podobnie, dla aspiryny, którą można także oznaczać metodą instrumentalną, jaką jest konduktometria. Również jony Cu^{2+} można oznaczać kilkoma metodami instrumentalnymi, np. kolorymetrycznie (roztwory są barwne), elektrogawimetrycznie, wykorzystując prawo Faradaya, lub z zastosowaniem absorpcji atomowej (AAS). Przedstawiono także inne sposoby analizy związków cząsteczkowych (chinina, ryboflawina, alanina). Tutaj, szczególne zastosowanie mają takie metody instrumentalne jak: spektroskopia absorpcyjna UV/VIS, fluorescencja czy szeroko rozumiane metody chromatograficzne, np. chromatografia cieczowa HPLC i cienkowarstwowa TLC z zastosowaniem techniki densytometrycznej. Dla każdej z tych metod omówiono kryteria, które zastosowana metoda może spełnić. Poniżej przedstawiono przykłady ilustrujące takie zadania.

Przykład I

Propozycje metod ilościowego oznaczania chininy. Ocena kryteriów.

Chinina jest organicznym związkiem chemicznym o wzorze sumarycznym ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) i strukturalnym, przedstawionym na Rys. 1.



Rys. 1. Wzór strukturalny chininy.

Chinina jest krystaliczną, białą substancją, trudno rozpuszczalną w wodzie, względnie łatwo rozpuszcza się w etanolu, eterach, chloroformie i kwasach. Chinina była pierwszym skutecznym lekiem przeciwko malarii. Posiada ponadto właściwości przeciwgorączkowe, przeciwzapalne i przeciwbólowe. Odpowiada za charakterystyczny smak znanego napoju gazowanego – toniku.

Cząsteczka chininy zawiera dwa sprzężone ze sobą pierścienie aromatyczne ze sprzężonym układem wiązań podwójnych. Sugeruje to, że może absorbować promieniowanie elektromagnetyczne od bliskiego ultrafioletu nawet do zakresu światła widzialnego w obszarze fioletu. Ponadto układ sprzężonych wiązań podwójnych, sugeruje możliwość zjawiska fluorescencji związku, które można także wykorzystać do ilościowej analizy związku.

a) Metoda spektrofotometryczna (kolorymetryczna) oznaczania chininy.

Przed rejestracją widm należy właściwie dobrać rozpuszczalnik oraz kuwety (rodzaj materiału, z którego jest wykonana). Rozpuszczalnik musi spełniać dwa podstawowe warunki:

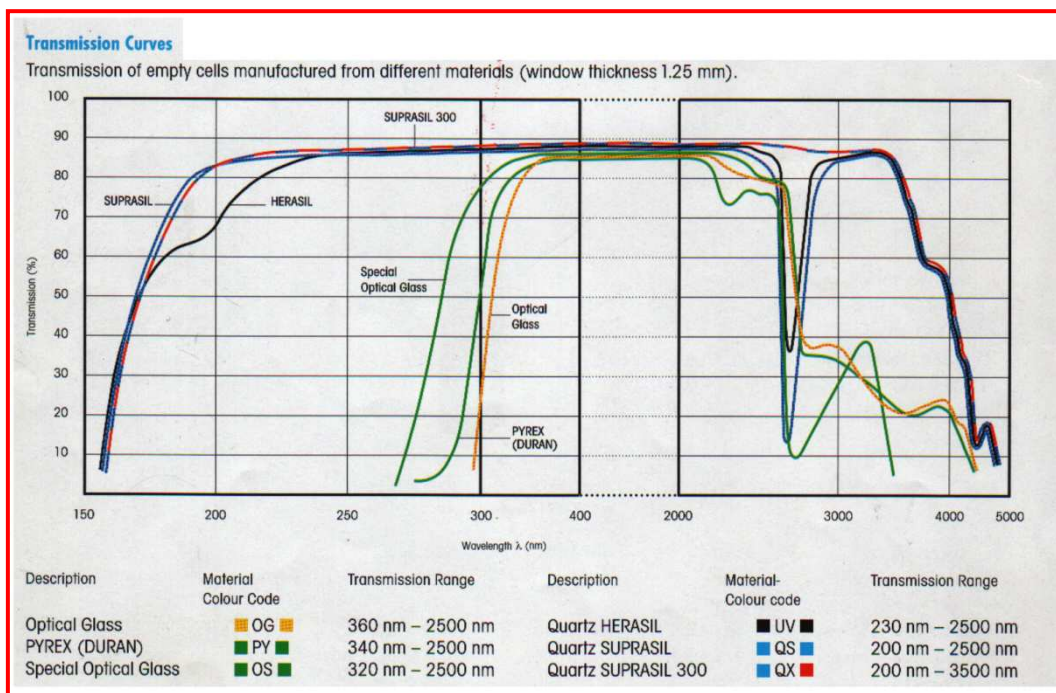
- 1) musi być przezroczysty w użytym zakresie promieniowania;
- 2) nie może oddziaływać z badanym związkiem.

Typowe rozpuszczalniki mają następujące zakresy przepuszczalności:

Woda - od 200 nm; alkany – od 200 nm; CH_3OH , C_2H_5OH – od 210 nm; CH_3Cl – od 250 nm; eter dietylowy – od 215 nm; CH_3COOH – od 260 nm; benzen – od 280 nm.

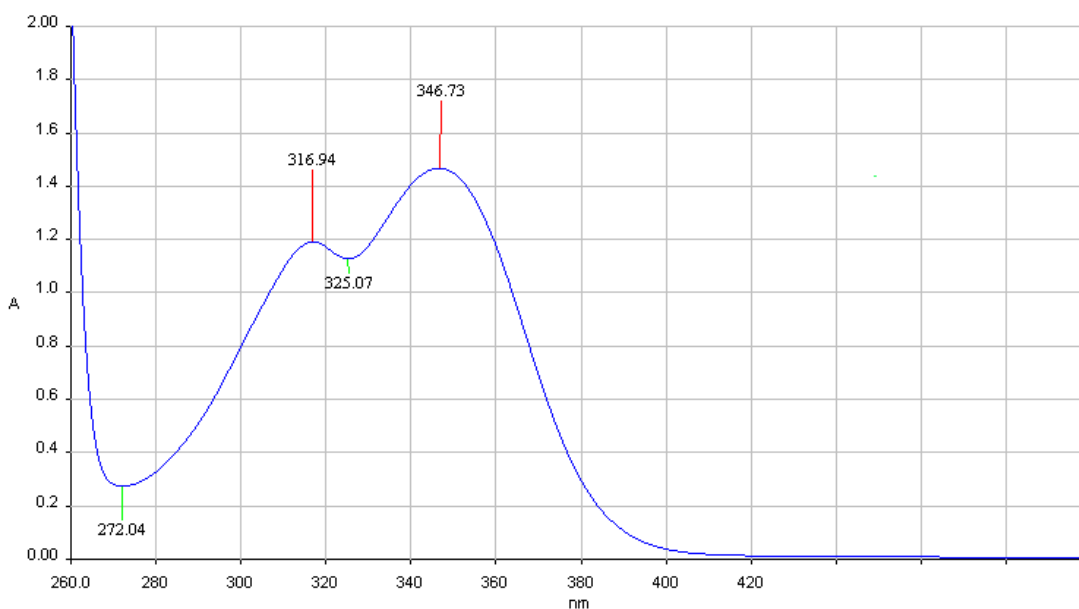
Ponieważ chinina bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie, do analiz spektroskopowych wybiera się roztwór chininy w rozcieńczonym kwasie (chinina ma charakter zasadowy – atomy azotu w pierścieniu). Takim sprawdzonym roztworem do badań chininy jest jej roztwór w rozcieńczonym kwasie siarkowym (około 0,1 mol/l).

Drugim ważnym zagadnieniem jest właściwy dobór kuwet. Te mogą być wykonane ze szkła, kwarcu lub przezroczystych tworzyw sztucznych. Istotne jest, aby kuweta była przezroczysta w rejestrowanym zakresie widma. Tabelę przepuszczalności materiałów kuwet przedstawia Rys. 2.



Rys. 2. Krzywe przepuszczalności (transmisji) różnych materiałów.

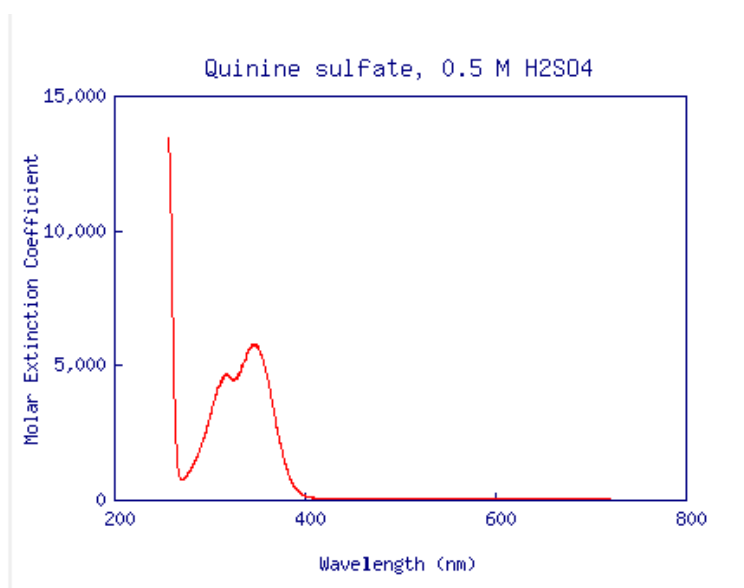
Z Rys. 2. widać, że tak popularny materiał, jakim jest szkło przepuszcza dobrze promieniowanie tylko w zakresie 350 – 2500 nm. Nie można więc stosować kuwet szklanych do rejestracji widm w krótkofalowej części zakresu UV ($\lambda < 350$ nm). W takim przypadku należy stosować kuwety kwarcowe, które mają bardzo dobrą przepuszczalność w zakresie 200 – 2500 nm. Rys. 3 przedstawia zarejestrowane elektronowe widmo absorpcyjne UV/VIS chininy.



CHIM10.SP

Rys. 3. Elektronowe widmo absorpcyjne chlorowodoru chininy w 0,1 mol/l kwasie siarkowym, $l=1\text{cm}$, $c=2,56 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Dla $\lambda=346$ - absorbancja $A=1,46$.

Widmo absorpcji chininy posiada wyraźne pasma w zakresie ultrafioletu o maksimach przy długościach fali 316 i 346 nm. Widmo molowego współczynnika siarczanu chininy przedstawia Rys. 4.



Rys. 4. Widmo molowego współczynnika absorpcji siarczanu chininy w 0,5 mol/l kwasie siarkowym. W maksimum pasma dla $\lambda=346$ nm molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_m=5700$.

Znając molowy współczynnik absorpcji pasma przyjętego, jako pasmo analityczne (silne, wyraźne pasmo dla $\lambda=346$ nm), można opracować sposób oznaczania chininy metodą kolorymetryczną.

Założmy, że do oznaczeń używamy typowej kuwety o grubości (długość drogi optycznej) $l=1$ cm. Założmy dalej, że dokonujemy rejestracji widma roztworu chininy o stężeniu $c=10^{-4}$ mol/l. Wiedząc, że dla pasma dla $\lambda=346$ nm molowy współczynnik $\epsilon_m=5700$, można obliczyć wartość absorbancji w maksimum tego pasma, która jest równa

$$A = \epsilon_m l c = 5700 \cdot 1 \cdot 10^{-4} = 0,57$$

Aparaturowy błąd pomiaru absorbancji A jest równy $\pm 0,001$ jednostki A (dla typowego spektrofotometru UV/VIS – tutaj aparat Lambda 25 firmy Perkin-Elmer). Oznacza to, że roztwory chininy o stężeniu $c=10^{-4}$ mol/l przy pojedynczym pomiarze spektrofotometrycznym można wyznaczyć z błędem względnym

$$(\pm 0,001/0,57) \cdot 100\% = \pm 0,17\% \approx \pm 0,2\%$$

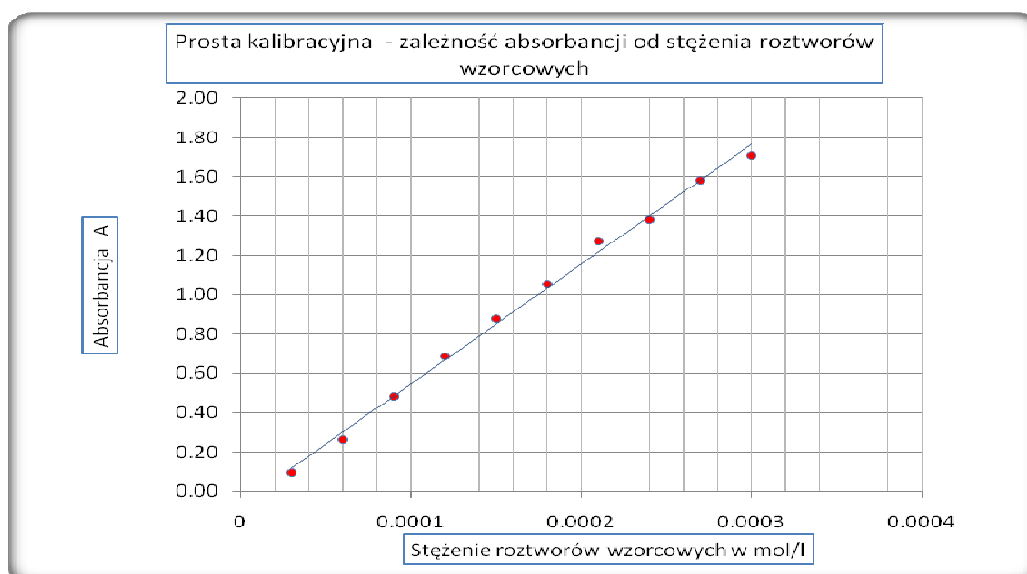
Gdyby stężenie oznaczanej chininy było na poziomie $c=10^{-5}$ mol/l, ten błąd względny byłby już na poziomie ok. 2%. Można więc stwierdzić, że przy przyjętym kryterium, że możliwy dopuszczalny błąd w pojedynczym pomiarze nie może przekroczyć 2%, chinina może być oznaczana spektrofotometrycznie dla stężeń nie mniejszych niż $c=10^{-5}$ mol/l.

Z drugiej strony, pomiar stężeń chininy o wartościach rzędu 10^{-3} mol/l dawałby absorbancję rzędu $A = 6$ – vide prawo Lamberta-Beera. Oznacza to nadzwyczaj małą transmisję światła przechodzącego przez próbkę – około jedna milionowa część natężenia wiązki odniesienia. Biorąc pod uwagę elektroniczne szумы aparatury, sensowny pomiar w tym zakresie stężeń jest praktycznie niemożliwy – aparat sygnalizuje wtedy błąd pomiaru lub widmo jest graficznie „zaszumione” – nie jest gładkie i widać na nim silne zniekształcenia. Rozwiązanie

tego problemu mogłoby być dwojakie. Można byłoby zastosować kuwetę o grubości 10 razy mniejszej ($l=1$ mm) lub dziesięciokrotnie rozcieńczyć roztwór chininy. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera absorbancja wróciłaby wtedy do wartości około 0,6 jednostki A, która jest sensowną wartością pomiarową absorpcji – mieści się w zalecanym technicznie zakresie pomiaru absorbancji: 0,5 -1,5 jednostki absorbancji A. Podsumowując, dla stężeń chininy rzędu (10^{-3} - 10^{-5}) mol/l metoda spektrofotometryczna dobrze **spełnia kryterium dokładności metody**.

Tę dokładność można jeszcze bardziej zwiększyć przez wykonanie krzywej kalibracyjnej, która jest wykresem absorbancji A w funkcji stężenia c kilku roztworów wzorcowych obejmujących badany zakres stężeń. Taką przykładową krzywą przedstawia Rys. 5.

Dla zebranych danych kalibracyjnych można wtedy zastosować opracowanie statystyczne zawarte w arkuszu kalkulacyjnym EXCEL – procedura REGLINP (zakładka FORMUŁY → FUNKCJE STATYSTYCZNE). Przy założeniu, że dla rozcieńczonych roztworów zależność absorbancji od stężenia jest liniowa (prawo Lamberta-Beera), dokonuje się aproksymacji liniowej i wyznacza współczynnik kierunkowy a funkcji $A = a \cdot c$. Jego obliczenie pozwala następnie przez pomiar absorbancji A określić dokładniej wartość stężenia c.



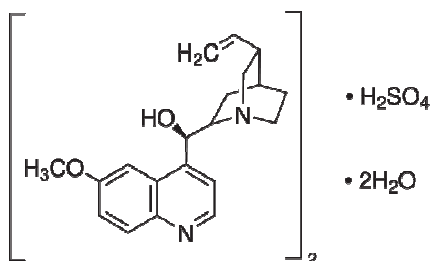
Rys. 5. Krzywa kalibracyjna dla oznaczania chlorowodoru chininy - zależność absorbancji A dla $\lambda=346$ nm od stężenia chininy. Roztwór chlorowodoru chininy w 0,1 mol/l kwasie siarkowym, $l = 1$ cm, $\epsilon_m(\lambda=346 \text{ nm}) = 5700$

Omawiana metoda **nie spełnia jednak kryterium selektywności i specyficzności pomiaru**. Załóżmy, że w roztworze oprócz chininy znajduje się inny składnik absorbujący w zakresie absorpcji chininy Absorbancja roztworu, zgodnie z prawem addytywności, byłby wtedy sumą absorbancji chininy i dodatkowego składnika. Pomiar nie potrafiłby odpowiedzieć na pytanie, jaki jest w niej udział pochodzący od interesującego nas składnika – tutaj chininy. Ustalenie dokładnego stężenia chininy byłoby więc utrudnione lub nawet niemożliwe.

Powtarzalność pomiarów absorbancji dla współczesnych spektrofotometrów jest na poziomie $\pm 0,001$ jednostki A. Jak widać **metoda spektrofotometryczna UV/VIS spełnia dobrze kryterium metody precyzyjnej**. Trzeba także zauważyć, że opisywane **pomiary są szybkie** – rzędu kilku minut i **praktycznie o znikomych kosztach**. Jeżeli więc za kryterium przyjąć koszty i czas pomiaru, metoda ta spełnia je właściwie.

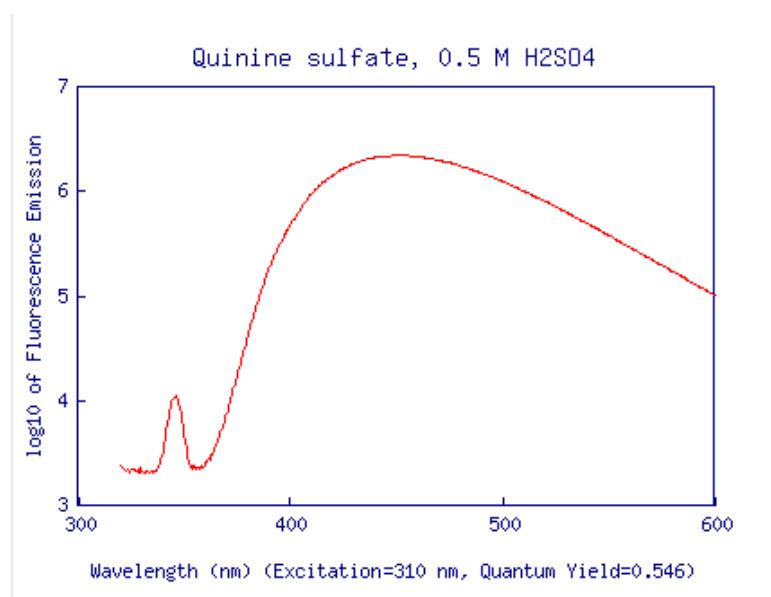
b) Metoda fluorymetryczna oznaczania chininy.

Chinina może być również oznaczana fluorescencyjnie. W rozcieńczonych roztworach kwasowych, najczęściej kwasu siarkowego, gdzie występuje pod postacią siarczanu – rys. 6, wykazuje silną fluorescencję.



Rys. 6. Siarczan chininy.

Analizując widmo absorpcyjne chininy – Rys. 3. widzimy, że analizowany związek absorbuje silnie w zakresie 300-360 nm. Jest zasadą, że dobór długości promieniowania wzbudzającego musi być ustawiony w zakresie silnej absorpcji promieniowania przez związek – tutaj w podanym wcześniej zakresie. Faktycznie, jeżeli do wzbudzenia użyć promieniowania o długości $\lambda=310$ nm, otrzymuje się silną emisję promieniowania fluorescencyjnego o długości fali większej (energii mniejszej) od długości fali promieniowania wzbudzającego. Rys. 7. przedstawia fluorescencyjne widmo emisyjne siarczanu chininy.



Rys. 7. Widmo emisyjne siarczanu chininy. Wzbudzenie promieniowaniem o długości $\lambda=310$ nm.

Na Rys. 7. widać silną emisję promieniowania wzbudzonego dla długości fali około 470 nm. W oznaczeniach fluorymetrycznych tę właśnie wartość, lub zbliżoną, wybiera się do analiz ilościowych. Wiedząc, że dla niezbyt dużych stężeń związku, natężenie tego promieniowania jest proporcjonalne do stężenia, można zjawisko emisji wykorzystać do ilościowego oznaczania związku. Przykładowe dane pomiarowe przedstawia Tabela 1.

Roztwór	Stężenie	Stężenie	Pomiar (1)	Pomiar (2)	Pomiar (3)	Pomiar (1)	Pomiar (2)	Pomiar (3)	Średnia	Odchylenie standardowe
	mg/100 ml	(µg/ml)	I ₁	I ₂	I ₃	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	I _s (%)	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0%	0,0%	0,0%	0,00	0,0000
2	0,01	0,10	0,07	0,08	0,11	2,3%	2,7%	3,7%	2,89	0,0069
3	0,03	0,30	0,25	0,31	0,28	8,3%	10,3%	9,3%	9,33	0,0100
4	0,06	0,60	0,54	0,62	0,59	18,0%	20,7%	19,7%	19,44	0,0135
5	0,10	1,00	0,98	1,03	1,05	32,7%	34,3%	35,0%	34,00	0,0120
6	0,20	2,00	1,95	2,02	1,98	65,0%	67,3%	66,0%	66,11	0,0117
7	0,30	3,00	3,00	3,00	3,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,00	0,0000
ZADANIE ---->			1,02	0,98	1,01	34,0%	32,7%	33,7%	33,44	0,0069

Tabela 1. Przykładowe dane pomiarowe fluorescencyjnego oznaczania siarczanu chininy. Długość fali promieniowania wzbudzającego $\lambda=340$ nm, długość analizowanego promieniowania emitowanego $\lambda=470$ nm.

W Tabeli 1. eksperymentalne wyniki intensywności fluorescencji umieszczone są w niebieskich kolumnach (trzy pomiary dla każdego roztworu wzorcowego). W następnych trzech kolumnach są one przeliczone na procenty, przyjmując, że dla roztworu o maksymalnym stężeniu – tutaj 3 µg/ml, intensywność fluorescencji jest równa 100%. Do wykonania prostej kalibracyjnej wzięta jest ich wartość średnia (kolumna żółta). Wizualizację wyników przedstawia Rys. 8.



Rys. 8. Krzywa wzorcową fluorescencji siarczanu chininy.

Współczynniki prostej $I\% = (a \cdot c + b)$ aproksymującej wyniki pomiarowe można szybko obliczyć wykorzystując odpowiedni moduł statystyczny programu EXCEL (zob. REGLINP).

Są one równe kolejno: $a = 33,4048$; $b = -0,2937$. Dla zadania (pomiary zaznaczone czerwonym kolorem) $I_{sr} = 33,44\%$, stąd mając obliczone współczynniki a i b , przez odwrócenie funkcji liniowej, można łatwo obliczyć stężenie chininy $c_x = 1,01 \mu\text{g/ml}$.

Metoda fluorescencyjna ma cechę wysokiej czułości i oznaczalności – można tą metodą oznaczać stężenia związków rzędu µg/ml. Metoda ta nie jest jednak metodą precyzyjną. Natężenie emitowanego światła jest z reguły słabe. Z tego powodu pomiary natężenia światła emitowanego wykonuje się kilkakrotnie, a do rachunków bierze wartość średnią. Metoda fluorescencyjna może również dobrze spełniać kryterium selektywności metody. Jest

to możliwe wtedy, gdy obecne w roztworze inne związki wykazują fluorescencję w innym zakresie niż badany związek. Tę selektywność można wzmocnić przez umiejętny dobór odpowiedniego filtra dla promieniowania wzbudzającego fluorescencję i filtra dla analizy światła emitowanego. Interesujący nas związek można wtedy oznaczać ilościowo w obecności innych związków. **Choć metoda ta nie spełnia kryterium metody precyzyjnej, jest uznawana za metodę czułą i dokładną.**

c) Metody chromatograficzne oznaczania chininy.

Obecność i stężenie chininy w roztworach można również określać wykorzystując metody chromatograficzne. Tak np. wykrywa się obecność chininy w szamponach i płynach do włosów. Najczęściej identyfikację przeprowadza się metodą chromatografii cienkowsarstwowej TLC na żelu krzemionkowym. Roztworem odniesienia jest przesącz przez filtr miliporowy wcześniej przygotowanego (1h) roztworu 100 mg bezwodnej chininy rozpuszczonej w 100 ml metanolu. Chromatogramy rozwija się na płytkach z żelem krzemionkowym (grubość żelu 0,25 mm) bez wskaźników fluorescencji. Na płytkę nanosi się 1,0 μ l roztworu standardowego i 1,0 μ l roztworu próbki. Chromatogram rozwijany jest na wysokość 150 mm. Fazą rozwijającą jest mieszanina:

toluen - eter dietylowy - dichlorometan - dietyloamina (20:20:20:8 v/v/v/v).

Po wysuszeniu płytki w temperaturze pokojowej spryskuje się ją mieszaniną 5 ml kwasu siarkowego i 95 ml eteru dietylowego. Po 1h obserwuje się płytkę w świetle lampy UV nastawionej na długość fali 360 nm. Chinina pojawia się, jako plamka o intensywnej błękitnej fluorescencji ($R_f = 0,20$). Dla dalszego potwierdzenia obecności chininy jej fluorescencję można wyeliminować oparami bromu. Granica identyfikacji (czułość) chininy tą metodą jest równa 0,1 μ g/ml, **jest to więc metoda spełniająca dobrze kryterium oznaczalności**. Ilościowo chininę można oznaczyć wykonując pomiary densytometryczne dla serii roztworów wzorcowych i roztworu badanego – vide opis chromatograficznego oznaczania alaniny – zad. 3.

Oznaczanie ilościowe chininy można także wykonać metodą HPLC. Metoda ta jest stosowana do oznaczania maksymalnej, dopuszczalnej zawartości chininy w szamponach (0,5%) i w płynach do włosów (0,2 %). Roztworem wymywającym jest mieszanina:

kwas ortofosforowy (V) - diwodorooortofosforan (V) potasu - bromek tetrametyloamonowy - woda - acetonitryl (10:50:100:340:90 v/v/v/v/v).

Kolumna wypełniona jest krzemionką poddaną działaniu oktadecylosilanu, 10 μ m. Analityczna długość fali jest nastawiona na 332 nm. Roztworem wzorcowym jest roztwór 10 mg bezwodnej chininy rozpuszczonej w 100 ml metanolu.

Metoda HPLC cechuje się dobrą powtarzalnością. Dla zawartości bezwodnej chininy 0,5% (m/m) różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie przekracza 0,02 %.

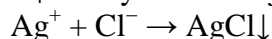
Podsumowując, należy stwierdzić, że w zależności od przyjętego kryterium, do oznaczania ilościowego chininy można zastosować różne metody analityczne. Prosta, szybka i tania w wykonaniu jest metoda spektrofotometryczna. Nie można jej jednak zastosować w przypadku roztworów bardzo rozcieńczonych. Większą czułość i selektywność daje metoda fluorymetryczna. Metody chromatograficzne są z kolei najbardziej pracochłonne i czasochłonne. Wymagają kosztownej aparatury i wysokiej czystości odczynników. W porównaniu z innymi metodami są metodami kosztownymi, wymagają wykwalifikowanego personelu obsługi. Zapewniają jednak dużą czułość, oznaczalność, dokładność i selektywność. Służą do analizy złożonych związków chemicznych o znaczeniu biologicznym np. w farmacji, medycynie, kryminalistyce, toksykologii itp.

Przykład II

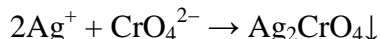
Propozycje metod ilościowego oznaczania chlorków. Ocena kryteriów.

a) Klasyczna metoda oznaczania chlorków metodą Mohra.

Metoda polega na miareczkowaniu obojętnego roztworu chlorków mianowanym roztworem AgNO_3 . Wskaźnikiem jest roztwór K_2CrO_4 . W wyniku reakcji

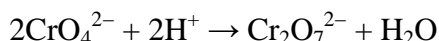


wytrąca się trudno rozpuszczalny osad AgCl . Po praktycznie całkowitym związaniu Cl^- , nadmiar AgNO_3 , zgodnie z poniższą reakcją,



wytrąca chromian srebra o brunatno czerwonym zabarwieniu. Wskazuje to koniec miareczkowania.

Metoda ta może być tylko stosowana dla roztworów wodnych, których pH mieści się w przedziale 7-10,5. W roztworach zbyt zasadowych wytrąca się Ag_2O . W roztworach kwaśnych, jony H^+ , zgodnie z poniższą reakcją, wyłączają działanie wskaźnika



Jest to klasyczna metoda oznaczania chlorków. Nie nadaje się do oznaczania roztworów rozcieńczonych, stąd **zakres oznaczanych stężeń jest ograniczony**. Zazwyczaj oznaczane tą metodą chlorki mają stężenie ok. 0,1 mol/l. **Jest metodą pracochłonną** – wymaga najpierw nastawienia miana titranta - AgNO_3 (nastawianie na wysuszony wcześniej NaCl) a następnie kilkakrotnego miareczkowania analizowanego roztworu. Przy właściwym postępowaniu jest metodą o **dużej powtarzalności (precyzji)**. Przyjmując, że zalecana objętość titranta, przy miareczkowaniu biuretą 50 ml, jest około 25 ml, a odczyt objętości titranta jest możliwy z powtarzalnością na poziomie $\pm 0,05$ ml, oznacza to precyzję na poziomie $(\pm 0,05/25) \cdot 100\% = \pm 0,2\%$. Ponadto, każde miareczkowanie przeprowadza się kilkakrotnie (z reguły 3 razy). Spełnienie wszystkich wymagań tego oznaczania analitycznego sprawia, że spełnia ono także kryterium dużej **dokładności**. Niestety, **nie jest metodą selektywną**. Nie może być stosowana w obecności takich jonów towarzyszących jak: Br^- , I^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} i Fe^{2+} . Wytrącają się wtedy towarzyszące osady, co uniemożliwia selektywne, ilościowe oznaczenie chlorków.

W środowisku kwaśnym (pH 2,3-2,8) chlorki można oznaczać metodą merkurymetryczną. Oznaczane chlorki miareczkuje się mianowanym roztworem $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Wskaźnikiem jest difenylokarbazon. Na początku jony Cl^- są wiązane w słabo zdysocjowany HgCl_2 . Po przekroczeniu punktu równoważnikowego nadmiar Hg^{2+} z difenylokarbazonem tworzy związek kompleksowy o fioletowym zabarwieniu.

b) Potencjometryczne oznaczanie chlorków – dwa sposoby.

I. Oznaczanie polega na pomiarze potencjału jonoselektywnej elektrody chlorkowej względem elektrody odniesienia, którą najczęściej jest elektroda kalomelowa. Różnica potencjałów między tymi elektrodami jest miarą stężenia jonów chlorkowych. Potencjał jonoselektywnych elektrod membranowych, w szczególności elektrody chlorkowej, opisany jest przez wzór Nikolskiego:

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln(a_i + \sum_{j=1}^n K_{ij} \cdot a_j^{n/z})$$

gdzie

a_i – aktywność oznaczanego jonu

a_j – aktywność jonu przeszkadzającego

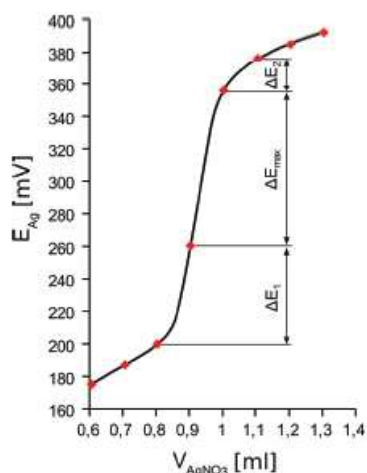
n – wartościowość jonu i na który czuła jest elektroda

z – wartościowość jonu przeszkadzającego j

K_{ij} – współczynnik selektywności (stała selektywności) elektrody czulej na jon i względem jonu j ; im większa wartość współczynnika K , tym mniejsza selektywność elektrody

W praktyce, najpierw wykonuje się tzw. krzywą wzorcową, która jest wykresem z zebranych danych eksperymentalnych zależności $E = f(\log a_i)$. Dla roztworów bardzo rozcieńczonych wykreśla się zazwyczaj krzywą wzorcową w układzie $E = f(\log c_i)$. W celu zniwelowania wpływu stężenia roztworu na przebieg krzywej wzorcowej pomiary przeprowadza się w roztworach o stałej sile jonowej. W tym celu dodaje się do roztworów wzorcowych i roztworów badanych odpowiedni nadmiar elektrolitu obojętnego, np. 1M roztworu azotanu (V) potasu. Nie ma on wpływu na potencjał elektrody a współczynniki aktywności mają wtedy stałą wartość. Aktywność jonów jest wtedy proporcjonalna do ich stężenia. Metoda krzywej wzorcowej jest prosta, lecz wrażliwa na obecność w badanej próbce substancji zakłócających, nieobecnych w roztworach wzorcowych. Po wykonaniu krzywej wzorcowej, dla roztworu badanego dokonuje się pomiaru potencjału E , a następnie graficzne z odwrócenia zależności $E = f(\log c_i)$ odczytuje wartość stężenia chlorków. Pomiary potencjałów dokonuje się z dokładnością do miliwolta. Za wynik końcowy oznaczenia należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników kilku równoległe wykonanych oznaczeń.

II). Chlorki można oznaczać potencjometrycznie także inną metodą. Wykorzystuje się wtedy reakcję strącania chlorków za pomocą AgNO_3 . Oznaczany jon Cl^- jest wtedy „usuwany” (wytrącany) z roztworu a elektroda wskaźnikowa reaguje na nadmiar titranta (jony Ag^+), który pojawia się po przekroczeniu punktu równoważnikowego miareczkowania. Elektroda wskaźnikową (pomiarową) jest elektroda srebrowa a elektrodą odniesienia elektroda chlorosrebrowa. Oznaczenie polega na wyznaczeniu objętości titranta, przy której następuje gwałtowny skoku potencjału wywołany przez nadmiar jonów Ag^+ po strąceniu chlorków zawartych w roztworze, w postaci AgCl - Rys. 9.



Rys. 9. Krzywa miareczkowania potencjometrycznego chlorków za pomocą AgNO_3 .

Metody te nie są zbyt precyzyjne, dlatego do rachunków wykorzystuje się średnią z kilku pomiarów. **Są metodami czułymi** – elektrody dobrze reagują na zmianę stężenia chlorków.

Ich dużą zaletą jest to, że **spełniają kryterium szerokiego zakresu pomiarów**. W przypadku elektrody jonoselektywnej można oznaczać stężenia chlorków od 1 do 10^{-5} mol/l. Niestety, nie może być ona stosowana, jeżeli w roztworze oprócz jonów chlorkowych obecne są jony S^{2-} , Br^- , J^- i CN^- . **Selektywność tej metody jest więc dość ograniczona**. Metoda ta po przygotowaniu krzywej wzorcowej **pozwała na uzyskiwanie szybkich wyników pomiarów** stężenia chlorków. **Koszty aparatury** (miliwoltomierz i elektrody) **i wykonania samej analizy są niewielkie**. Zaletą metody z wykorzystaniem elektrody srebrowej jest to, że nie występuje konieczność jej kalibrowania. Służy ona tylko do wyznaczenia skoku krzywej miareczkowania.

c) Nefelometryczne i turbidymetryczne oznaczanie chlorków.

Metoda ta umożliwia pomiar stężenia koloidów i zawiesin w roztworach, w szczególności jonów chlorkowych wytrąconych w postaci trudno rozpuszczalnego osadu AgCl. Dla niskich stężeń jonów chlorkowych wytrącony AgCl ma postać koloidalną a jego stężenie może być oznaczone z pomiaru natężenia światła rozproszonego I_r . Wyraża je poniższy wzór:

$$I_r = F \cdot I_0 \cdot N_{cz} \cdot r^6 \cdot \tilde{\nu}^4 \quad \sim \quad \frac{V_{cz}^2}{\lambda^4} N_{cz}$$

gdzie:

F – współczynnik zależny od geometrii układu optycznego aparatury

I_0 – intensywność wiązki pierwotnej

N_{cz} – liczba cząstek rozpraszających zależna od oznaczanego stężenia

r – promień cząsteczki

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{– liczba falowa}$$

λ – długość fali,

V – objętość cząsteczki

Jak widać z powyższego wzoru, natężenie promieniowania rozproszonego I_r jest proporcjonalne do ilości cząsteczek rozpraszających, która z kolei jest wprost proporcjonalna do oznaczanego stężenia chlorków. Ustalając eksperymentalnie tę zależność dla serii roztworów wzorcowych, można przez pomiar natężenia promieniowania rozproszonego roztworu badanego określić szukane stężenie koloidu (metoda krzywej wzorcowej). Ten sposób określania stężenia jest podstawą metody nazywanej nefelometrią.

Innym sposobem określenia stężenia jest pomiar osłabienia wiązki przechodzącej. Wtedy, dla roztworów rozcieńczonych, istnieje liniowa zależność między tzw. absorbancją pozorną a stężeniem.

$$A_{poz} = -\log(I_{tr} / I_0) = \epsilon_{poz} \cdot l \cdot c$$

Metoda oparta jest na liniowej zależności A_{poz} od stężenia c i wykorzystująca również krzywą wzorcową nazywa się turbidymetrią.

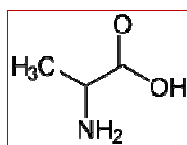
W przypadku oznaczania chlorków tymi metodami, przeprowadza się je w koloidalną postać AgCl. Można wtedy określać stężenia chlorków na poziomie $\mu\text{g/ml}$, co odpowiada stężeniu chlorków rzędu 10^{-5} mol/l. Ta metoda **spełnia kryterium czułości metody**. **Nie spełnia kryterium selektywności**. Nie jest możliwe oznaczanie chlorków tymi metodami w obecności kationów, które tworzą trudno rozpuszczalne sole z jonami Ag^+ , np. Br^- , J^- czy SO_4^{2-} . Co więcej, **metody te nie są metodami precyzyjnymi**. Natężenie promieniowania rozproszonego

jest słabe, wyniki nie są powtarzalne a roztwór koloidu podlega procesowi starzenia się. W celu otrzymania wiarygodnych wyników należy ściśle kontrolować czas, jaki upływa od momentu wytrącenia osadu a momentem dokonania pomiarów.

Przykład III

Propozycje metod ilościowego oznaczania alaniny. Ocena kryteriów

Alanina ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) - rys. 10, jest jednym z 22 aminokwasów budujących białka. Jest aminokwasem endogennym i pełni kluczową rolę w cyklu glukozy-alaninowym, czyli procesie przenoszenia azotu pomiędzy mięśniami a wątrobą. Stanowi także ważny substrat w procesie glukoneogenezy (proces „tworzenia” glukozy ze związków niecukrowych). Jest substancją krystaliczną i rozpuszcza się w wodzie.

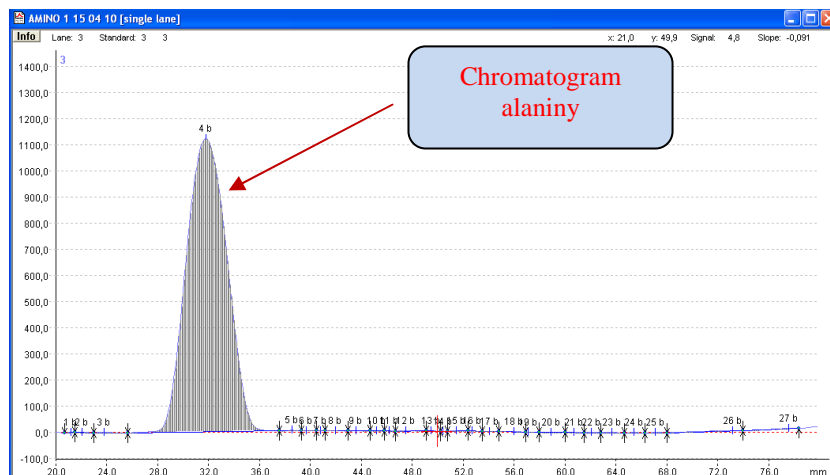


Rys. 10. Alanina.

a) Chromatograficzna metoda oznaczania chininy.

Cząsteczka alaniny ma bardzo prostą budowę chemiczną, brakuje w niej jednak układu sprzężonych wiązań podwójnych. Z tego powodu nie absorbuje promieniowania w zakresie widzialnym i bliskim ultrafiolecie (roztwór alaniny w wodzie jest bezbarwny). Oznaczanie ilościowe alaniny metodą kolorymetryczną w zakresie UV/VIS lub fluorymetryczną jest niemożliwe. Ponadto alanina, jako aminokwas musi być często oznaczana w obecności innych aminokwasów. Metodami, które pozwalają oznaczać ten związek w obecności innych aminokwasów np. hydroksyproliny, metioniny, są metody chromatograficzne, w szczególności chromatografia cienkowarstwowa TLC. **Metoda ta jest prosta i tania w wykonaniu.** Należy przygotować wodne roztwory aminokwasów o stężeniu rzędu $\mu\text{g/ml}$, nanieść na płytkę pokrytą zelem krzemionkowym (Kieselgel 60) i rozwinąć w komorze chromatograficznej w układzie *n*-propanol-woda-chloroform w stosunku 5:2:1(v/v/v). Plamki aminokwasów wywołuje się roztworem ninhydryny w acetonie. Po ogrzaniu zachodzi specyficzna, barwna reakcja między ninhydryną a aminokwasami – na płytce pojawiają się różowe plamki pokazujące miejsca rozwinięcia aminokwasów. Ponieważ każdy z aminokwasów ma inną wartość współczynnika R_f , możliwy jest rozdział składników. Metoda ta, jeżeli tylko współczynniki R_f aminokwasów różnią się odpowiednio, **spełnia dobrze kryterium selektywności. Jest metodą czasochłonną** – szczególnie dużo czasu (kilkadziesiąt minut) zajmuje proces rozwijania chromatogramów.

Chromatografia cienkowarstwowa po połączeniu jej z analizą densytometryczną może być również wykorzystana do ilościowego oznaczenia każdego z aminokwasów. Przykład takiego skanowania chromatogramu alaniny przedstawia Rys. 10. Przed właściwym ilościowym oznaczeniem należy przygotować roztwory wzorcowe o rosnącym liniowo stężeniu analizowanego aminokwasu, tutaj alaniny – Rys. 11. Po rozwinięciu chromatogramów roztworów wzorcowych oraz zadania, dokonuje się skanowania densytometrycznego. Na podstawie zeskanowanych wzorców ustala się zależność, najczęściej liniową, między polem powierzchni pików a stężeniem. Znając tę zależność i pole powierzchni pików zadania można określić stężenie aminokwasu w badanej próbce. Procedurę przedstawiają kolejno Rys. 12-15.



Rys. 10. Chromatogram alaniny.

Result list

Samples Standards Calibration function Amount of substances

Chromatogram: AMINO 1 15 04 10

Method: TLC aminokwasy, 2010-03-30 13:10:50

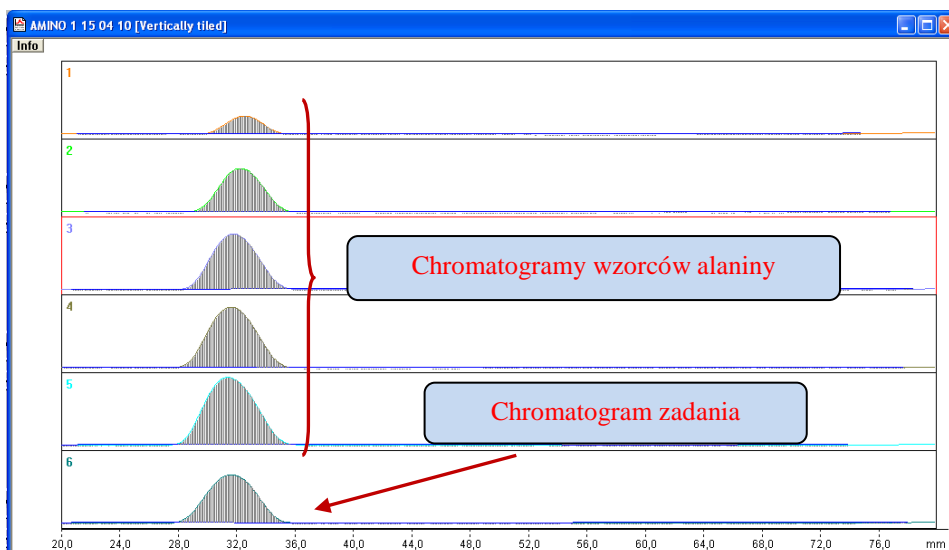
Calibration: $y=a*x+b$ (without 0,0) via Area

Component: Component 1

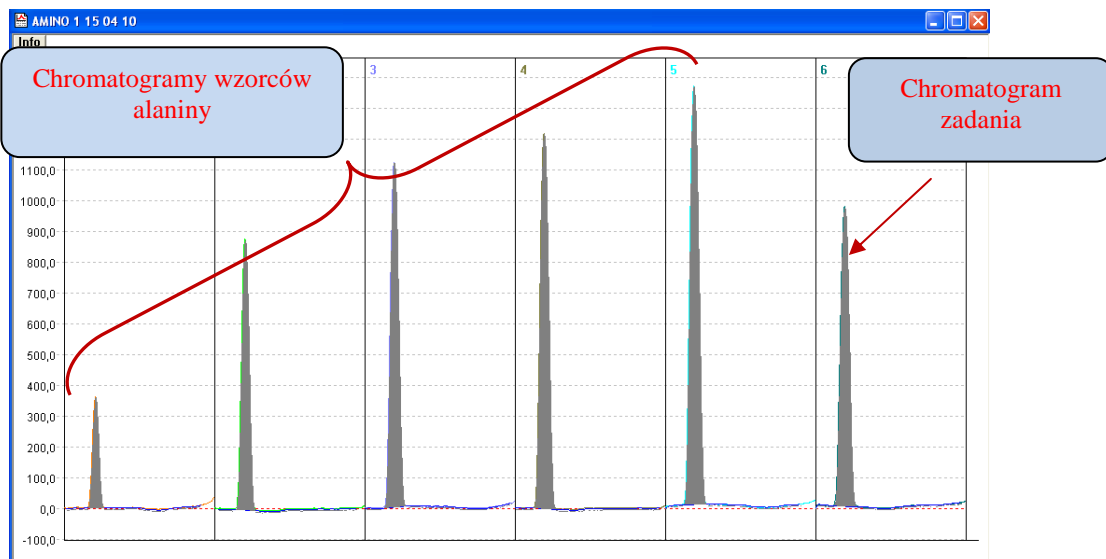
Lane	Standard	Name	Y-Pos	Area	Height	CV [%]	Concentrat...
1	1	1	32,6 mm	1009,057	358,002		0,8 µg
2	2	2	32,2 mm	2972,328	871,633		1,6 µg
3	3	3	31,8 mm	4104,705	1110,460		2,4 µg
4	4	4	31,6 mm	4596,489	1206,819		3,2 µg
5	5	5	31,4 mm	5450,803	1345,569		4,0 µg

OK Anuluj Zastosuj

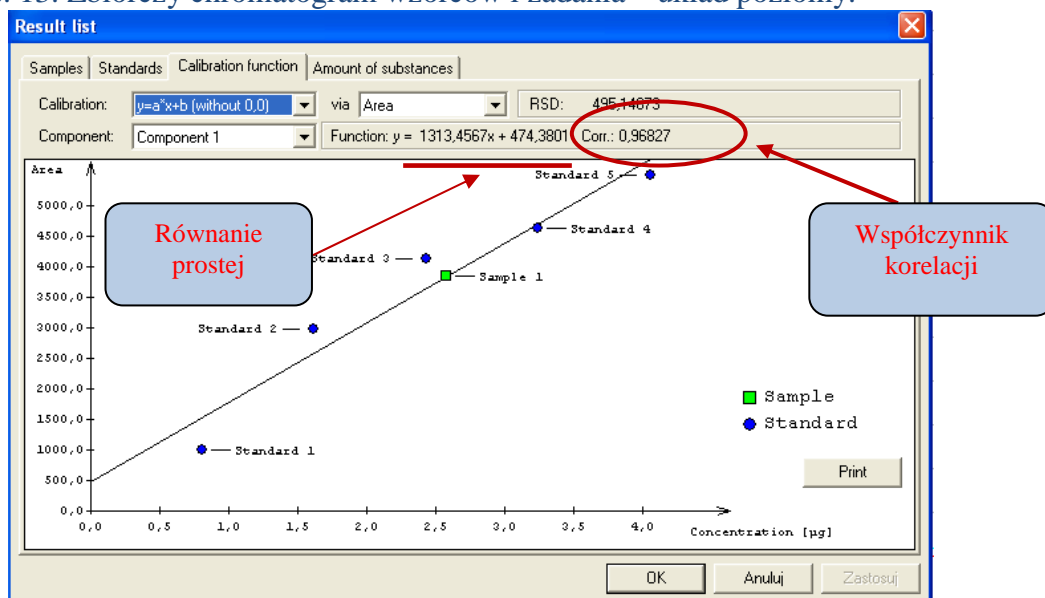
Rys. 11. Użyte wzorce alaniny.



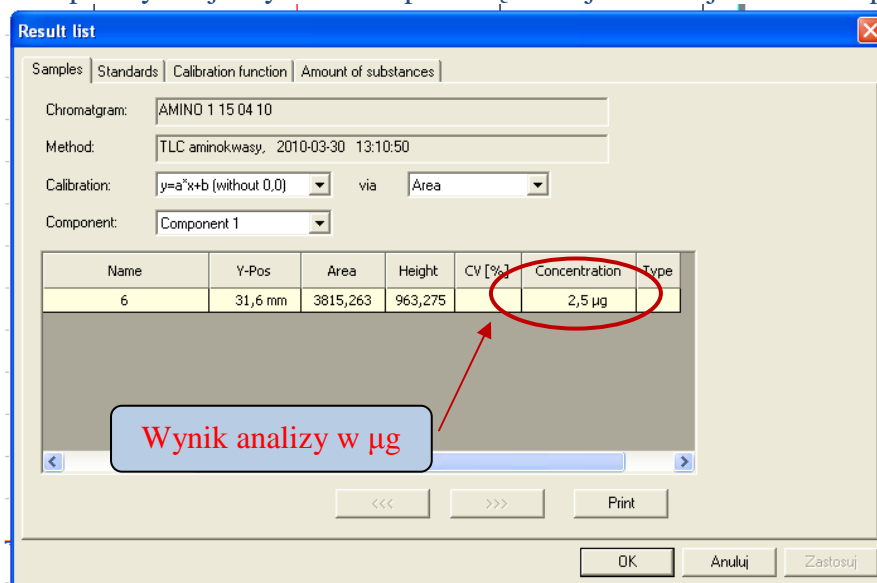
Rys. 12. Zbiórny chromatogram wzorców i zadania – układ pionowy.



Rys. 13. Zbiorczy chromatogram wzorców i zadania – układ poziomy.



Rys. 14. Aproksymacja wyników za pomocą funkcji liniowej i równanie prostej.



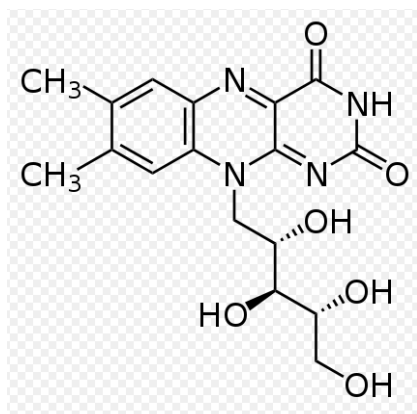
Rys. 15. Wynik analizy.

Metoda TLC sprzężona z densytometrem jest metodą pracochłonną i czasochłonną (przygotowanie roztworów wzorcowych, naniesienie ich na płytkę, rozwijanie chromatogramów i skanowanie). Jej najsilniejszą cechą jest to, że ma wysoką oznaczalność na poziomie ułamka $\mu\text{g/ml}$ i w przeciwieństwie do innych metod, do analizy wystarcza bardzo mała objętość analizowanego roztworu – rzędu $1 \mu\text{l}$. Jest metodą czułą. Wykonanie analizy nie jest kosztowne (odczynniki, płytki), kosztowny jest zakup densytometru.

Przykład IV

Propozycje metod ilościowego oznaczania ryboflawiny. Ocena kryteriów

Ryboflawina jest organicznym związkiem chemicznym ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$) – Rys. 16. W organizmach zwierząt pełni funkcję witaminy (B_2). Jej niedobór może powodować zaburzenia w funkcjonowaniu układu nerwowego oraz stany zapalne błon śluzowych.

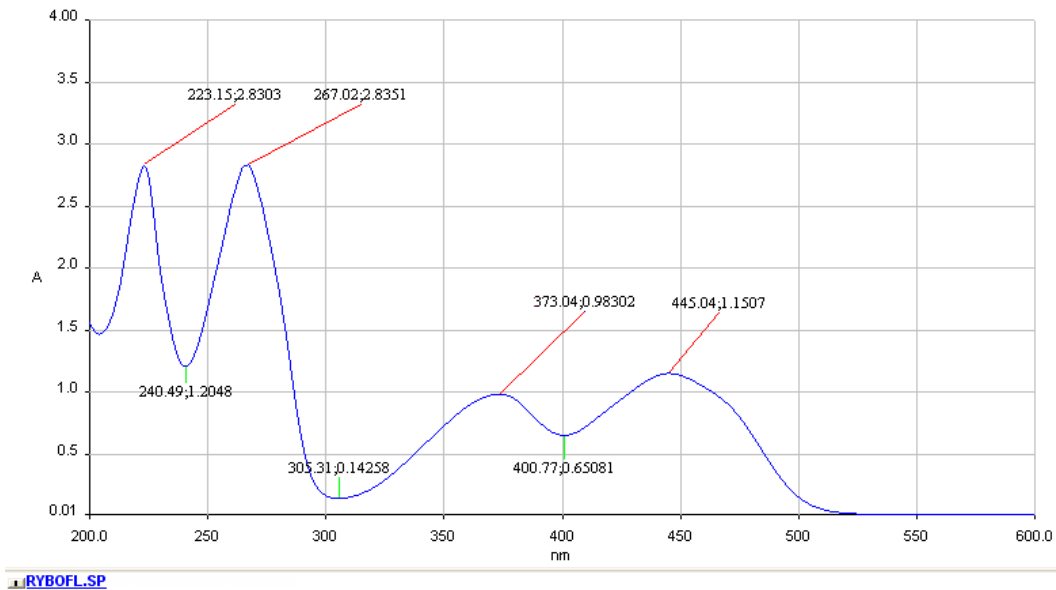


Rys. 16. Wzór strukturalny ryboflawiny, MW = 376,36 g/mol

Ryboflawina jest żółtą substancją, niezbyt łatwo rozpuszczalną w wodzie, etanolu i metanolu. Praktycznie nierozpuszczalna w eterach i chloroformie.

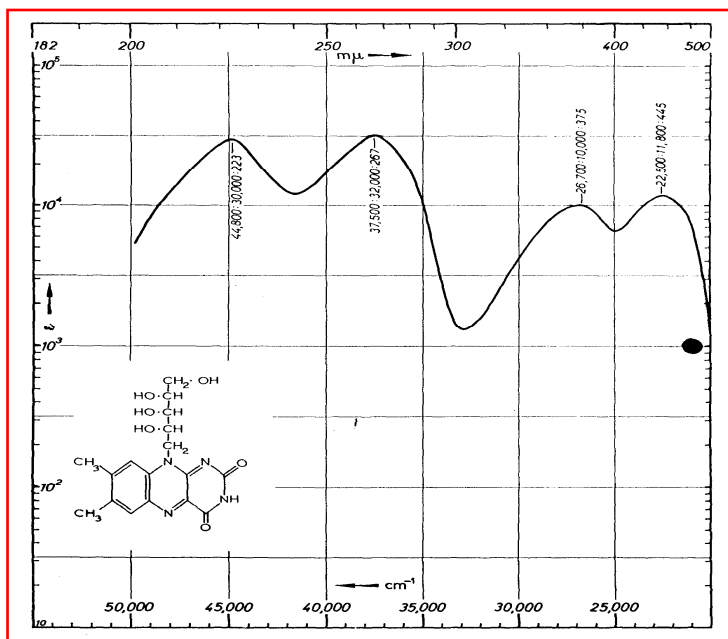
a) Metoda spektrofotometryczna oznaczania ryboflawiny.

Cząsteczka ryboflawiny jest zbudowana z łańcucha rybitylowego połączonego z pierścieniem izoaloksazynowym, który jest układem chromoforowym tego związku. W porównaniu do chininy, układ sprzężonych wiązań podwójnych jest bardziej rozbudowany, co sugeruje, że absorpcja promieniowania powinna być bardziej przesunięta w stronę fal długich. Faktycznie, widmo absorpcyjne - Rys. 17., wchodzi w zakres promieniowania widzialnego w obszarze fioletu, co sprawia, że roztwory ryboflawiny są żółte.



Rys. 17. Widmo absorpcyjne ryboflawiny w wodzie, $l = 1\text{cm}$, $c \approx 10^{-4}\text{ mol/l}$.

Jak widać z Rys. 17., widmo składa się z 4 silnych pasm absorpcyjnych, z których każde może być użyte do ilościowego oznaczania ryboflawiny metodą spektrofotometryczną. Wcześniej należy sprawdzić molowe współczynniki absorpcji pasm. Można je znaleźć np. w DMS (Documentation of Molecular Spectra, Vol. IV) – Rys. 18.

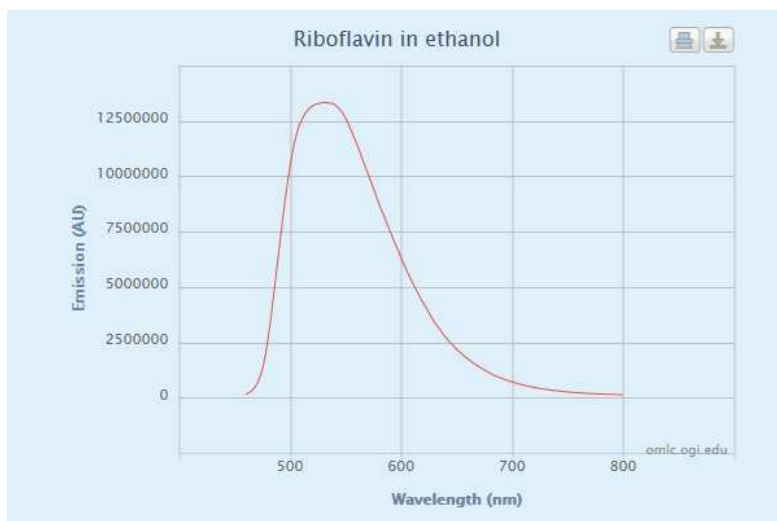


Rys. 18. Widmo molowego współczynnika absorpcji ryboflawiny w wodzie. Przy każdym paśmie podane są kolejno: położenie pasma (cm^{-1}), molowy współczynnik absorpcji ϵ_m , położenie pasma w nm. Np. dla najbardziej długofalowego pasma $\lambda=445\text{ nm}$ (11800 cm^{-1}) molowy współczynnik $\epsilon_m=11800$.

Porównując molowe współczynniki pasm ryboflawiny z molowym współczynnikiem głównego pasma chininy - $\epsilon_m=5700$ ($\lambda=346$ nm), widać, że są one kilkakrotnie większe. Np. dla pasma ryboflawiny o maksimum dla $\lambda=267$ nm mamy $\epsilon_m=32000$. Oznacza to, że gdyby tego pasma użyć do ilościowego oznaczania ryboflawiny, **oznaczalność a także czułość metody byłaby ponad 5 razy większa niż dla chininy**. Sposób oznaczania i pozostałe cechy metody istotne przy wyborze kryterium są analogiczne, jak przy oznaczaniu chininy metodą kolorymetryczną.

b) Fluorymetryczna metoda oznaczania ryboflawiny.

Ryboflawinę można również oznaczać metodą fluorymetryczną. Do wzbudzenia używa się promieniowania o długości około $\lambda \approx 450$ nm. Ta wartość jest nieprzypadkowa - to położenie maksimum długofalowego pasma absorpcyjnego ryboflawiny. Poniższy rys. 19 przedstawia wykres emisji promieniowania etanolowego roztworu ryboflawiny wzbudzonej promieniowaniem o długości 450 nm.



Rys. 19. Wykres emisji promieniowania etanolowego roztworu ryboflawiny wzbudzonej promieniowaniem o długości 450 nm.

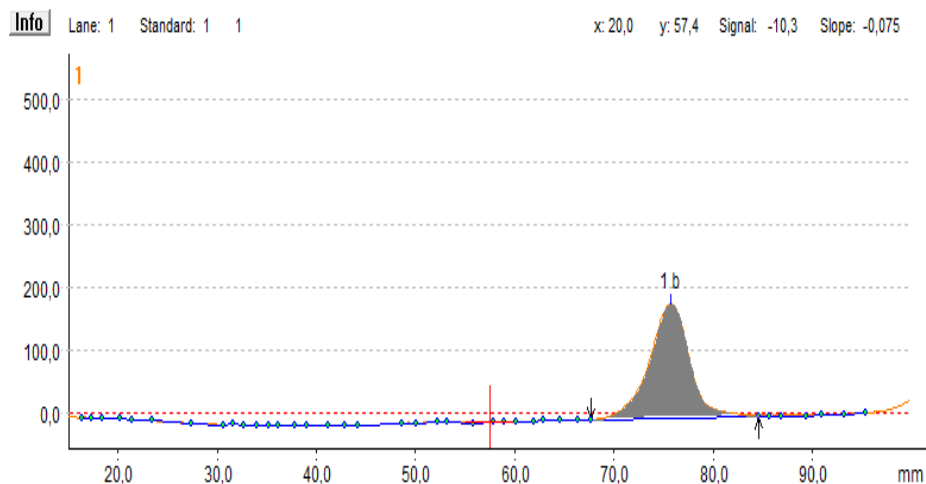
Jak widać, maksimum emisji ($\lambda \approx 530$ nm) przypada na znacznie większą długość fali niż długość fali promieniowania wzbudzającego ($\lambda \approx 450$ nm). Z tego powodu fluoryzujące roztwory ryboflawiny wykazują zielonkawożółtą barwę. Maksymalna fluorescencja ryboflawiny występuje w zakresie pH od 6 do 7. W praktyce, w przypadku oznaczania ryboflawiny w materiale biologicznym, jest mierzona w zakresie pH od 3 do 5, gdzie jest niezależna od fluorescencji substancji interferujących.

Ryboflawinę można również oznaczać fluorymetrycznie innym, pośrednim sposobem. Jest to tzw. metoda lumiflavinowa. Wykorzystuje się tutaj fakt, że w środowisku alkalicznym pod wpływem światła (fotoliza) ryboflawina przechodzi w lumiflavinę – nazwa systematyczna to 7,8,10-trimetyloizooaloksazyne. Związek ten wykazuje silne cechy niebieskiej fluorescencji. Metoda fluorymetrycznego oznaczania ryboflawiny spełnia analogiczne kryteria jak opisana wcześniej metoda fluorymetrycznego oznaczania chininy – zadanie 1, punkt b).

b) Chromatograficzne metody oznaczania ryboflawiny

Ilościowo ryboflawina może być również oznaczana metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC. Dokładne oznaczenie ilościowe związku jest możliwe po zastosowaniu techniki analizy densytometrycznej. Analogicznie do alaniny, na płytce chromatograficznej nakłada się roztwory wzorcowe ryboflawiny, następnie suszy i rozwija w komorze chromatograficznej (fazą rozwijającą jest mieszanina: alkoholu benzyłowego, alkoholu etylowego i wody w stosunku 3:2:1 (v/v)). Niestety, ta analiza wymaga dość długiego czasu rozwijania, co nie służy analizie.

W przeciwieństwie do oznaczania alaniny, gdzie trzeba było wywoływać plamki aminokwasu przez reakcję z ninhydriną, analiza ryboflawiny jest prosta. Sama ryboflawina jest substancją barwną (kolor żółty), stąd detektor plamek ryboflawiny może być ustawiony na pomiar osłabienia promieniowania odbitego – analogicznie, jak przy skanowaniu wywołanych plamek alaniny. Przy zastosowaniu techniki analizy promieniowania odbitego należy wcześniej ustalić długość fali promieniowania użytego do skanowania. Należy wtedy uruchomić procedurę „Multiscan”. Dla ryboflawiny zidentyfikowana długość fali jest równa około $\lambda=460$ nm (położenie długofalowego pasma absorpcyjnego ryboflawiny). Po wybraniu tej fali analitycznej, można skanować plamki chromatogramów. Przykładowy chromatogram dla ryboflawiny przedstawia Rys. 20.



Rys. 20. Przykładowy chromatogram ryboflawiny. Faza rozwijająca - mieszanina: alkohol benzyłowy-alkohol etylowy-woda 3:2:1 (v/v). Długość fali zastosowana do skanowania $\lambda = 460$ nm (położenie długofalowego pasma absorpcji ryboflawiny).

Skanowanie rozwiniętych chromatogramów ryboflawiny może być również wykonane z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego – ryboflawina wykazuje opisaną wcześniej już cechę fluorescencji. Ilościowo ryboflawinę można również oznaczać metodą chromatografii HPLC. Analiza prowadzona jest na kolumnie z wypełnieniem RP18. Fazą mobilną jest mieszanina metanolu i 0,05 molowego roztworu octanu amonu (pH=6).

Metody chromatograficznego oznaczania ryboflawiny spełniają analogiczne kryteria jak opisana wcześniej metoda chromatograficznego oznaczania chininy i alaniny – zadanie 1 i 3.

Przykład IV

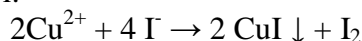
Propozycje metod ilościowego oznaczania Cu^{2+} . Ocena kryteriów

Ilościowo, jony Cu^{2+} można oznaczać zarówno metodami klasycznymi i instrumentalnymi.

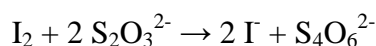
Do metod klasycznych należą dwie podstawowe metody:

a) Metoda jodometryczna

Wiadomo, że sole Cu^{2+} reagują z jonami jodkowymi w środowisku obojętnym lub słabo kwaśnym wg następującej reakcji:

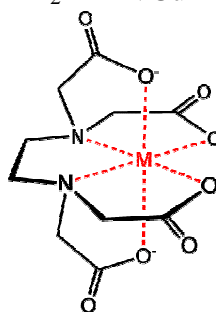
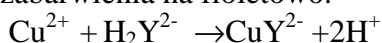


Reakcja ta jest odwracalna a jej przebieg ilościowy (w prawo) możliwy jest dzięki zastosowaniu znacznego nadmiaru jodku potasu. Wydzielony jod odmiareczkuje się mianowanym roztworem tiosiarczanu sodowego (wskaźnikiem jest kleik skrobiowy) wg reakcji:



b) Metoda kompleksometryczna

Jony Cu^{2+} przeprowadza się najpierw w niebieski kompleks przez dodanie stężonego amoniaku. Następnie, jako wskaźnik dodaje się mureksyd i miareczkuje roztworem wersenianu (EDTA) do zmiany zabarwienia na fioletowe.



Utworzony kompleks CuY^{2-}

Zgodnie z powyższą reakcją, wiedząc, że jeden mol Cu^{2+} reaguje z jednym molem ligandu (wersenianu), można oznaczyć ilościowo zawartość Cu^{2+} .

Te dwie metody klasycznego oznaczania Cu^{2+} **cechuje ograniczony zakres oznaczanych stężeń** (najczęściej ok. 0,1 mol/l). Miareczkowanie **jest metodą pracochłonną**. Należy przygotować (wysuszyć i dokładnie odważyć) substancje wzorcowe (bromian w celu nastawienia miana tiosiarczanu, CaCO_3 w celu nastawienia miana EDTA). Substancje te rozpuszcza się w wodzie, nastawia miano odpowiednich titrantów (trzykrotne miareczkowanie) i wykonuje właściwe, końcowe miareczkowanie analizowanego roztworu (trzykrotnie). Ten **sposób analizy jest zarówno pracochłonny, jak i czasochłonny**. Przy spełnieniu wszystkich zasad wykonania analizy jest to jednak metoda o **dużej powtarzalności (precyzji)** – odczyt objętości titranta jest możliwy z dokładnością do 0,05 ml, a kilkakrotne (z reguły 3 razy) miareczkowanie daje **dużą dokładność**. Niestety, **nie jest metodą selektywną**. Np. oznaczanie Cu^{2+} nie może być prowadzone w obecności jonów, które równolegle ulegają reakcji kompleksowania przez EDTA. Takimi jonami przeszkadzającymi mogą być np. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} czy Fe^{3+} .

Do metod instrumentalnych oznaczania Cu^{2+} należą trzy główne metody:

a) Metoda elektrogravimetryczna (kulometria)

Metoda ta wykorzystuje zjawisko elektrolizy i opiera na prawie Faradaya, które mówi, że masa m substancji wydzielonej na elektrodzie podczas elektrolizy dana jest następującym wzorem:

$$m = k \cdot I \cdot t$$

gdzie:

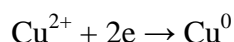
k – równoważnik elektrochemiczny danej substancji (masa substancji wydzielona na elektrodzie przez ładunek 1 C)

I – natężenie prądu, [A]

t – czas, [s]

Elektroliza może być wykorzystana zarówno do wydzielenia jonów jednego metalu z mieszaniny jonów różnych metali, jak i do rozdzielania i oznaczania kilku metali występujących obok siebie. Możliwe jest to wówczas, gdy różnice między potencjałami wydzielania poszczególnych metali są dostatecznie duże. Mierząc przyrost masy elektrody można wyznaczyć masę wydzielonego produktu.

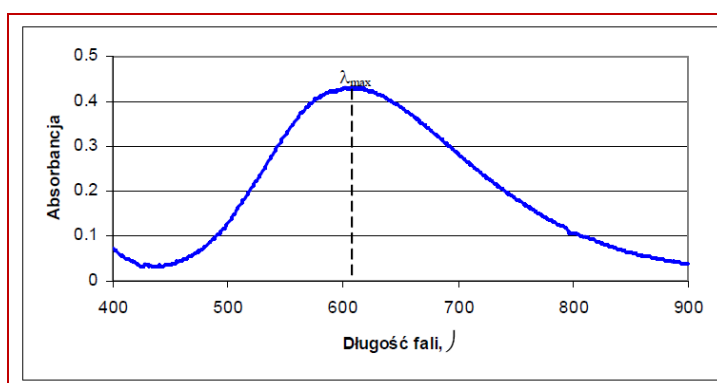
Miedź wydziela się w postaci metalu na katodzie z kwaśnych roztworów zawierających 3-4% kwasu siarkowego i 1-3% kwasu azotowego. Reakcja katodowa przebiega następująco:



Otrzymany na katodzie osad miedzi powinien mieć zabarwienie łososiowo-różowe. Zaciemnienie osadu wskazuje na osadzanie się wraz z miedzią innych metali o stosunkowo niewysokim potencjale wydzielania lub może być wynikiem częściowego utleniania się miedzi. Metoda **spełnia kryterium selektywności**, o ile różnice między potencjałami wydzielania jonów metali towarzyszących są dostatecznie duże. Metalami przeszkadzającymi są: Ag, Hg, Bi, Sn, As, Te. Ogólnie, ta metoda oznaczania daje **wyniki dokładne i odtwarzalne**. **Wykonanie oznaczeń jak i aparatura są proste**.

b) Metoda kolorymetryczna

Wodne roztwory jonów Cu^{2+} mają niebieską barwę. Po dodaniu amoniaku jony Cu^{2+} tworzą niebieskogranatowy kompleks $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Widmo absorpcyjne tego kompleksu ma maksimum dla $\lambda=608 \text{ nm}$ - Rys. 21.



Rys. 21. Poglądowe widmo kompleksu $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$.

Kolorymetryczne oznaczenie Cu^{2+} polega na przygotowaniu serii roztworów wzorcowych Cu^{2+} o rosnącym liniowo stężeniu, przeprowadzeniu Cu^{2+} w kompleks, a następnie pomiarze

fotometrycznym przy długości fali $\lambda=608$ nm. Po zebraniu wyników, rysuje się krzywą wzorcową, jako zależność $A = f(c)$. Na podstawie pomiaru absorbancji (dla $\lambda=608$ nm) roztworu badanego, z krzywej tej można bezpośrednio odczytać stężenia Cu^{2+} .

Metoda (po przygotowaniu krzywej wzorcowej) **jest prosta i szybka w wykonaniu. Nie wymaga skomplikowanej aparatury** – można ją wykonać przy użyciu aparatu Spekol. Jeżeli stężenie Cu^{2+} jest wystarczające dla zarejestrowania absorbancji w przedziale 0,5-1,5, metoda kolorymetryczna **jest dokładna, precyzyjna i tania. Nie spełnia jednak kryterium selektywności.** Jeżeli w analizowanym roztworze istnieją związki absorbujące w zakresie absorpcji kompleksu miedzi, oznaczenie nie jest możliwe.

c) Metoda absorpcji atomowej AAS (Atomic Absorption Spectrometry)

Absorpcyjna spektrometria atomowa jest metodą opartą na zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez wolne atomy. Podstawą oznaczenia jest prawo promieniowania Kirchhoffa – pierwiastek absorbuje tylko to promieniowanie, które emituje w stanie wzbudzenia.

Wielkość absorbancji A wyraża wzór:

$$A \sim N_p \cdot l$$

gdzie

N_p - jest ilością atomów w stanie podstawowym w jednostce objętości

l – grubość warstwy absorbującej

Jeśli przez ośrodek zawierający swobodne atomy jakiegoś pierwiastka w stanie gazowym przepuszcza się monochromatyczne promieniowanie odpowiadające linii rezonansowej tego pierwiastka, to promieniowanie to ulega absorpcji. Podstawą ilościowych oznaczeń metodą AAS jest fakt, że absorbancja zależy od liczby wolnych atomów w środowisku absorbującym, a ta z kolei zależy od stężenia analizowanego pierwiastka w próbce. W analizie ilościowej wykorzystuje się liniową zależność absorbancji od stężenia pierwiastka w próbce. Absorpcyjna spektrometria atomowa wykazuje wiele zalet, dzięki którym należy obecnie do najczęściej stosowanych technik analitycznych. Są nimi: **duża selektywność, prostota, szybkość, czułość i duża wykrywalność.** Szczególnie cecha dużej wykrywalności sprawia, że ASA nadaje się szczególnie do oznaczania śladowych stężeń metali. Umożliwia ona oznaczenie około 70 pierwiastków.

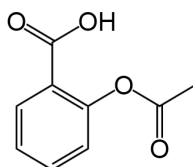
W przypadku oznaczania jonów Cu^{2+} , najczęściej za linię analityczną (rezonansową) przyjmuje się linię dla $\lambda = 324,7$ nm. Dla współczesnych spektrometrów AAS granica wykrywalności jonów Cu^{2+} jest na poziomie 0,001 ppm, a zakres roboczy mieści się w przedziale 0,02-5 ppm. W przypadku oznaczeń tą metodą **najwięcej czasu zajmuje przygotowanie próbki i wykonanie krzywej kalibracji. Sam pomiar jest stosunkowo prosty i szybki.** W starszych aparatach absorpcji atomowej wadą była konieczność użycia osobnej lampy dla każdego oznaczanego pierwiastka. Dlatego też technika ta była szczególnie **zalecana dla seryjnych oznaczeń danego pierwiastka.**

Przykład VI

Propozycje metod ilościowego oznaczania aspiryny. Ocena kryteriów

Aspiryna jest popularnym środkiem przeciwgorączkowym i przeciwbólowym. Ma działanie przeciwzakrzepowe i zaliczana jest do niesterydowych leków przeciwzapalnych. Właściwości te wynikają z jej zdolności blokowania enzymu cyklooksygenazy, odpowiedzialnego za syntezę w organizmie prostaglandyn wywołujących reakcje zapalne i odczucie bólu.

Z chemicznego punktu widzenia jest acetylową pochodną kwasu salicylowego. Wzór kwasu acetylosalicylowego przedstawia Rys. 22.



Rys. 22. Kwas acetylosalicylowy (aspiryna)

Widać, że układ chromoforowy związku jest bardzo prosty, stąd absorpcja promieniowania zachodzi dla długości poniżej 300 nm. Ponieważ w tym zakresie absorbuje wiele innych związków, do oznaczania aspiryny wykorzystuje się inne niż kolorymetryczne metody oznaczania. Do takich metod należy metoda miareczkowania alkacymetrycznego – aspiryna ma właściwości słabego kwasu, oraz miareczkowanie konduktometryczne.

a) Metoda alkacymetryczna

Po zważeniu tabletki aspiryny i jej rozdrobieniu, wrzuca się ją do zlewki i rozpuszcza w 50 cm³ wody destylowanej. Ponieważ aspiryna jest słabo rozpuszczalna, zlewkę podgrzewa się do temp. około 85^oC. Po ochłodzeniu, dodaje się do roztworu kilka kropel fenoloftaleiny i miareczkuje 0,1 M NaOH aż do zabarwienia się roztworu na malinowy kolor.

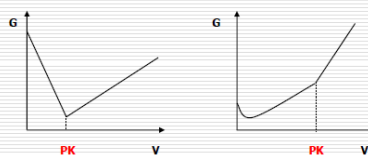
Podobnie jak przy oznaczaniu chlorków metodą Mohra i oznaczaniu Cu²⁺ metodą jodometryczną lub kompleksometryczną zakres **oznaczanych stężeń aspiryny jest ograniczony**. Nie można oznaczać roztworu zbyt rozcieńczonego z powodu małego skoku krzywej miareczkowania. **Jest metodą pracochłonną** – wymaga nastawienia miana titranta - NaOH (nastawianie na oznaczony wcześniej HCl, który jeszcze wcześniej trzeba nastawić np. na KHCO₃), a następnie kilkakrotnego miareczkowania analizowanego roztworu. Przy właściwym postępowaniu jest to metoda o **dużej powtarzalności (precyzji)**, a kilkakrotne (z reguły 3 razy) miareczkowanie daje **dużą dokładność**. Niestety, **nie jest metodą selektywną**. Nie może być stosowana, jeżeli w miareczkowanym roztworze obecne są inne związki o charakterze kwasu lub zasady.

b) Metoda konduktometryczna

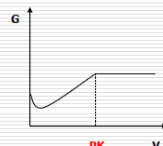
Konduktometria polega na pomiarze przewodnictwa elektrycznego słupa cieczy znajdującego się między dwiema elektrodami. Na przewodnictwo to składa się udział wszystkich jonów obecnych w roztworze. Dla niewielkich stężeń przewodnictwo rośnie liniowo wraz ze stężeniem jonów. Dla większych stężeń przewodnictwo maleje, co stanowi o ograniczoności tej metody analitycznej. Metoda ta nadaje się tylko do oznaczania roztworów odpowiednio rozcieńczonych. Poniżej – Rys. 23., przedstawione są, w zależności od rodzaju, różne krzywe miareczkowania konduktometrycznego.

Krzywe miareczkowania konduktometrycznego:

mocny kwas – mocna zasada słaby kwas – mocna zasada



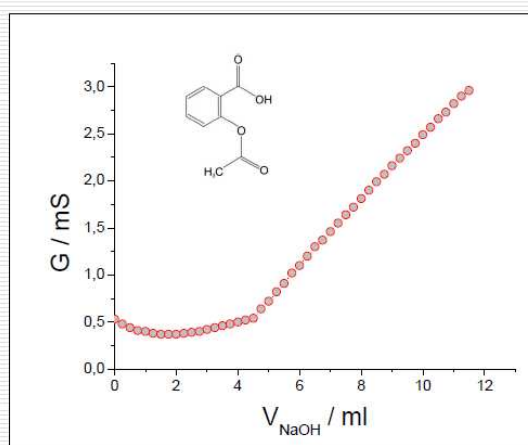
słaby kwas – słaba zasada



Rys. 23. Różne krzywe miareczkowania konduktometrycznego.

Krzywa miareczkowania konduktometrycznego:

oznaczenie Kwasu Acetylosalicylowego (aspiryny)

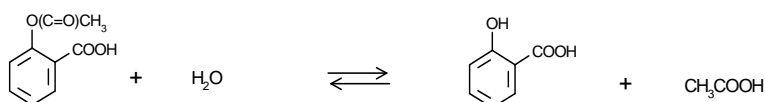


Rys. 24. Krzywa miareczkowania konduktometrycznego aspiryny.

Przedstawiona metoda konduktometrycznego oznaczania aspiryny **cehuje wysoka czułość, precyzja i dokładność pomiaru**. **Możliwe jest oznaczanie przy stosunkowo dużym rozcieńczeniu związku**. **Stosunkowo niskie są koszty aparatury – konduktometru o prostej budowie**. Istotna jest również **możliwość miniaturyzacji i automatyzacji pomiarów**. Wynika to z faktu, że pomiary wielkości elektrycznych (przewodnictwa) **są stosunkowo proste i wygodne**. Takie cechy są ważnymi przesłankami przy wyborze kryterium metody oznaczania aspiryny. **Metoda ta nie spełnia kryterium metody selektywnej**. Obecność w roztworze innych związków jonowych, mających udział w przewodnictwie roztworu, uniemożliwia selektywne oznaczenie interesującego nas związku.

c) Analiza chromatograficzna

Aspiryna, jako lek ma ograniczoną trwałość w czasie, gdyż w obecności wilgoci i w podwyższonej temperaturze łatwo ulega hydrolizie na kwas salicylowy i kwas octowy według następującej reakcji:



Obecność kwasu salicylowego wywołuje drażniący wpływ na układ pokarmowy. Właśnie analizę chromatograficzną cienkowarstwową stosuje się do badania, czy lek nie zawiera niepożądanego kwasu salicylowego. Po rozpuszczeniu badanej próbki, wykonuje się analizę na płytce chromatograficznej. Jako eluent można stosować jedną z następujących mieszanin: **(I)** cykloheksan-chloroform-kwas octowy 4:5:1 (v/v/v), **(II)** octan etylu lub **(III)** octan etylu-lodowaty kwas octowy 99:1(v/v). Na linię startu oprócz badanej próbki leku nanosi się aspirynę i kwas salicylowy, jako wzorce. Po rozwinięciu chromatogramu płytkę suszy się i obserwuje za pomocą lampy UV. Dodatkowo płytkę można wybarwić metanolem z roztworem FeCl_3 , który daje charakterystyczną reakcję barwną z kwasem salicylowym (związki zawierające grupę fenolową lub enolową dają barwne kompleksy z chlorkiem żelaza(III)).

Przedstawiona powyżej metoda chromatograficznej analizy aspiryny ma charakter analizy jakościowej. **Spełnia kryterium metody prostej, szybkiej i taniej w wykonaniu.** Po zastosowaniu reakcji barwnej z FeCl_3 **jest metodą bardzo czułą** na obecność kwasu salicylowego.

Zalecana literatura do ćwiczenia - „Kryteria wyboru metody analitycznej”

1. R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2”, PZWL, 2002
2. W. Szczepaniak „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, PWN, 2011
3. T. Lipiec, Z. Szmaj „Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej”, PZWL, 1997
4. J. Minczewski, Z. Marczenko „Chemia analityczna - tom 2”, PWN, 2009
5. D. Kealey, „Chemia analityczna” tom 1 i 2, PWN, 2009
6. R. Silverstein, „Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych”, PWN, 2007
7. Praca zbiorowa pod redakcją W. Zielińskiego, „Metody spektroskopowe”, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, 2000
8. Farmakopea Polska – Wydanie IX, tom 1 i 2, Warszawa, 2011