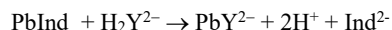


9. FOTOMETRICKÁ TITRACE

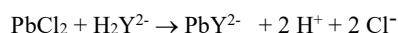
9.1. Standardizace 0,01M roztoku chelatonu III na navážku PbCl₂

Roztok PbCl₂ se titruje odměrným roztokem (Na₂H₂Y) na indikátor xylenolovou oranž.

Chelát xylenolové oranže s Pb²⁺ (PbInd) je **tmavě červenofialový**, absorpční křivka má maximum při vlnové délce 580 nm, zbarvení **volného indikátoru** (Ind²⁻) je za podmínek titrace jasně **citronově žluté** s maximem absorbance při vlnové délce 430 nm. Titrace probíhá při pH = 5 - 6 (tlumivý roztok urotropinu).



$$\lambda = 580\text{nm}$$



$$M(\text{PbCl}_2) = 278,10 \text{ g/mol}$$

9.1.1. Příprava roztoku standardu

Na analytických vahách odvážit s přesností na jednu desetinu mg přibližně 70 mg chloridu olovnatého. Navážku kvantitativně převést do kádinky o objemu 100 ml, doplnit destilovanou vodou asi na 50 ml a okyselit 2–3 kapkami 2 M HNO₃. Takto připravený roztok zahřát (nevařit!), po rozpuštění PbCl₂ kvantitativně převést do odměrné baňky o objemu 200 ml a doplnit destilovanou vodou po rysku.

9.1.2. Výpočet předpokládané teoretické spotřeby:

$$V_{ekv} = \frac{m}{M} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{c}$$

kde: m je hmotnost navážky PbCl₂ v mg,

M je molární hmotnost PbCl₂,

c je koncentrace Chelatonu III (0,01 mol.l⁻¹).

Číslo 20 ve zlomku představuje faktor zředění, protože budeme titrovat vždy 10 ml připraveného roztoku standardu, tj. 1/20 z 200 ml.

9.1.3. Orientační titrace s vizuální indikací

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetovat 10 ml roztoku standardu, 10 ml destilované vody, 3 kapky 10% roztoku urotropinu (tlumivý roztok) a špachtlí přidat malé množství směsi xylenolové oranže s KNO₃ tak, aby roztok byl zřetelně slabě fialový. Kyvetu s roztokem promíchat mírnými otáčkami na magnetické míchače

Pomocí mikropipety do kyvety přidávat odměrný roztok Chelatonu III po 0,1 ml a za stálého míchání vizuálně pozorovat roztok až do přechodu barvy z fialové do čistě žluté.

9.1.4. Fotometrická titrace

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetovat 10 ml roztoku standardu, 10 ml destilované vody, 3 kapky 10% roztoku urotropinu (tlumivý roztok) a špachtlí přidat malé množství směsi xylenolové oranže s KNO₃ tak, aby roztok byl zřetelně slabě fialový. Kyvetu s roztokem promíchat mírnými otáčkami na magnetické míchače

Po přidání správné množství indikátoru je absorbance roztoku před započítáním titrace při $\lambda = 580 \text{ nm}$ v rozmezí 0,6 až 0,9 (roztok je zřetelně světle fialový s přechodem do žlutého zbarvení).

Při vlastní titraci je třeba přidávat odměrný roztok nejprve po 0,2 ml a zaznamenávat absorbanci. Po přiblížení k předpokládanému bodu ekvivalence na $\pm 0,1 \text{ ml}$, je třeba snížit objem přidávaného činidla dle potřeby až na 0,01 ml (nejmenší objem, který lze dávkovat mikropipetou 10 – 100 μl).

Titraci opakovat třikrát.

9.1.5 Zpracování výsledků

Pro každou titraci sestavit grafickou závislost absorbance titrovaného roztoku na objemu přidávaného činidla, kde :

- na vodorovnou osu vynést objem přidávaného odměrného činidla v ml
- na svislou osu odpovídající hodnoty absorbance titrovaného roztoku

Graficky zjistit spotřebu odměrného činidla v bodě ekvivalence proložením jedné přímky několika body těsně před koncovým zlomem křivky a druhé přímky několika body za koncovým zlomem křivky. Z průsečíku těchto přímek spustit kolmici k vodorovné ose a odečíst spotřebu odměrného činidla.

Při zjišťování bodu ekvivalence se vychází z principu, že od okamžiku dosažení ekvivalence se zbarvení roztoku nemění, proto je třeba zjistit okamžik vymizení barvy indikátorového komplexu.

Výpočet přesné koncentrace (titru) odměrného činidla

Pro každou hodnotu graficky získaného objemu titračního činidla v bodě ekvivalence spočítat přesnou koncentraci odměrného činidla v mol.l⁻¹ :

$$c_{H_2Y} = \frac{m_{PbCl_2}}{M_{PbCl_2}} \cdot \frac{1}{20} \cdot \frac{1}{V_{ekv}}$$

kde: m_{PbCl_2} je navážka PbCl₂ v mg,

V_{ekv} objem odměrného činidla v bodě ekvivalence v ml,

M_{PbCl_2} je molární hmotnost PbCl₂ v g.mol⁻¹ (M = 278,10 g.mol⁻¹)

Statistické zpracování výsledků

Ze získaných hodnot sestavit do protokolu následující tabulku:

$\lambda = 580 \text{ nm}$			
poř. číslo titrace	1	2	3
$V_{ekv} \text{ [ml]}$			
$c_{ChelIII} \text{ [mol.l}^{-1}\text{]}$			
průměr $c_{ChelIII} \text{ [mol.l}^{-1}\text{]}$			
$s(c_{ChelIII}) \text{ [mol.l}^{-1}\text{]}$			
rel.směr.odchylka $c_{ChelIII}$			

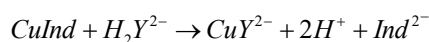
Výpočet směrodatné odchytky s provést podle Deana a Dixona z rozpětí (viz text na konci úlohy). Pro další výpočty používat přesnou koncentraci se čtyřmi platnými číslicemi.

9.2 Titračně fotometrické chelatometrické stanovení kationtu Cu²⁺ v neznámém vzorku

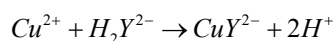
9.2.1 Fotometrická titrace neznámého vzorku obsahujícího Cu²⁺

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

Měď tvoří s murexidem chelát žluté barvy (CuInd). Při titraci roztokem Chelatonu III se nejprve na Chelaton III vážou volné ionty Cu²⁺, chelát CuY²⁻ je modrý. V okolí bodu ekvivalence dojde k barevné změně způsobené reakcí



Volný indikátor má při daném pH modrofialovou barvu.



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

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

Příprava vzorku

Neznámý vzorek ve 100 ml odměrné baňce doplnit po značku destilovanou vodou a dobře promíchat.

Orientační titrace s vizuálním pozorováním barevné změny

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetovat 10 ml destilované vody, špachtlí přidat indikátor murexid, promíchat na magnetické míchačce (roztok se zbarví do středně syté oranžové barvy) a poté přidat 10 ml roztoku vzorku s neznámým obsahem mědi. Připravený roztok by měl být zbarven žlutozeleně až žlutooranžově.

Pomocí mikropipety do kyvety přidávat odměrný roztok Chelatonu III po 0,1 ml a za stálého míchání vizuálně pozorovat změny zbarvení roztoku. Těsně před předpokládaným bodem ekvivalence je nutné přidat 1 kapku amoniakálního tlumiče a titrovat až do přechodu do čistě fialového zbarvení.

Nastavení fotometru

Před každou změnou vlnové délky je potřeba provést pro určenou vlnovou délku **nastavení fotometru** při vložené srovnávací kyvetě s destilovanou vodou.

Příprava roztoku k fotometrické titraci

Do kyvety fotometru o objemu 30 ml s míchadlem napipetovat 10 ml destilované vody, špachtlí přidat indikátor murexid, promíchat na magnetické míchačce a poté přidat 10 ml roztoku vzorku s neznámým obsahem mědi. Připravený roztok bude žlutozelený až žlutooranžový. Po přidání správné množství indikátoru je absorbance roztoku před započítáním titrace při $\lambda = 460 \text{ nm}$ v rozmezí 0,4 až 0,6.

Titrace

Při vlastní titraci je třeba přidávat pomocí mikropipety odměrný roztok nejprve po 0,1 ml a zaznamenávat absorbanci. Po přiblížení k předpokládanému bodu ekvivalence na $\pm 0,1$ ml, je třeba snížit objem přidávaného činidla dle potřeby až na 0,010 ml, současně je třeba těsně před předpokládaným bodem ekvivalence přidat 1 kapku amoniakálního tlumiče a poté titrovat až do přechodu do čistě fialového zbarvení.

Titraci opakovat třikrát.

9.2.2 Zpracování výsledků

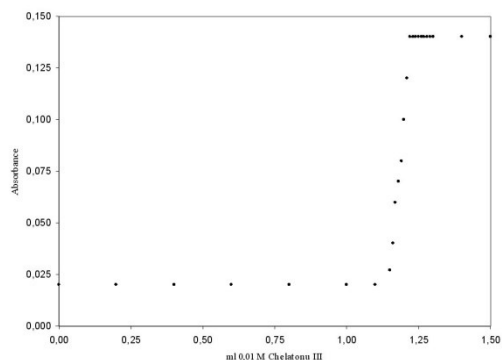
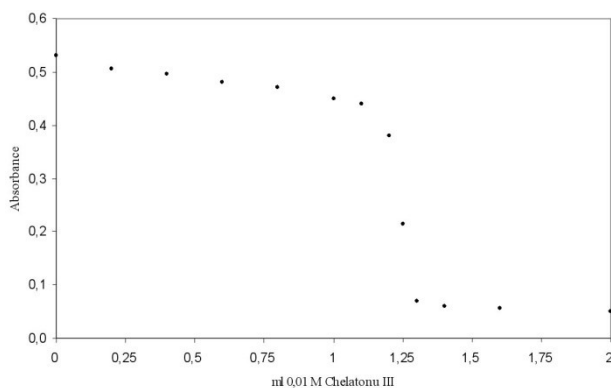
Pro každou titraci sestojit grafickou závislost absorbance titrovaného roztoku na objemu přidávaného činidla, kde :

- na vodorovnou osu vynést objem přidávaného odměrného činidla v ml
- na svislou osu odpovídající hodnoty absorbance titrovaného roztoku

Graficky zjistit spotřebu odměrného činidla v bodě ekvivalence proložením jedné přímkou několika body těsně před koncovým zlomem křivky a druhé přímkou několika body za koncovým zlomem křivky. Z průsečíku těchto přímk spustit kolmicí k vodorovné ose a odečíst spotřebu odměrného činidla.

Při zjišťování bodu ekvivalence se vychází z principu, že od okamžiku dosažení ekvivalence se zbarvení roztoku nemění, měří se buď konstantní zbarvení volné formy indikátoru nebo vymizení barvy indikátorového komplexu.

Příklady titračních křivek při fotometrickém stanovení Cu^{2+} jsou na obr. 9.1 a 9.2.



Obr. 9.1: Fotometrická titrace Cu²⁺ na murexid při 460 nm

Obr. 9.2: Fotometrická titrace Cu²⁺ na murexid při 550 nm

Výpočet hmotnosti mědi v neznámém vzorku

Dosazením do vzorce vypočítat hmotnost mědi ve vzorku:

$$m_{Cu} = V_{ekv} \cdot c_{H_2Y} \cdot \frac{V_0}{V_{pip}} \cdot M_{Cu}$$

kde: V_{ekv} je průměrná spotřeba odměrného činidla (ml),
 c_{H_2Y} je přesná koncentrace 0,01 M odměrného roztoku Chelatonu III,
 M_{Cu} je molární hmotnost mědi (63,546 g.mol⁻¹),
 V_0 je objem odměrné baňky s neznámým vzorkem,
 V_{pip} je objem roztoku pipetovaného do kyvety (10 ml).

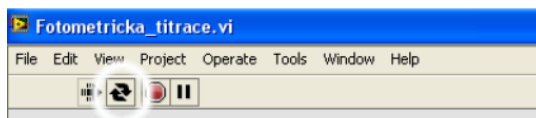
Statistické zpracování výsledků

Zvlášť pro každou vlnovou délku zpracovat výsledky do následující tabulky do protokolu. Výpočet směrodatné odchylky s provést podle Deana a Dixona z rozpětí.

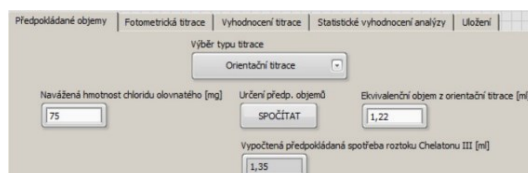
$\lambda = 460 \text{ nm}$			
poř. číslo titrace	1	2	3
$V_{ekv} [\text{ml}]$			
$m_{Cu} [\mu\text{g}]$			
průměr $m_{Cu} [\mu\text{g}]$			
$s(m_{Cu}) [\mu\text{g}]$			
rel.směr.odchylka			

9.3. Postup měření na spektrofotometru UV-VIS 1240 mini

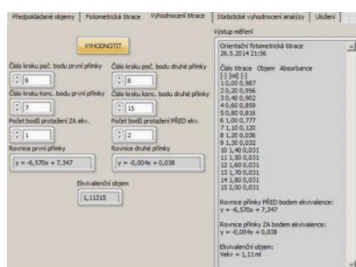
1. Na ploše PC spustit program Fotometrická titrace. Po spuštění programu je třeba ho aktivovat kliknutím na ikonku „Continuous run“.



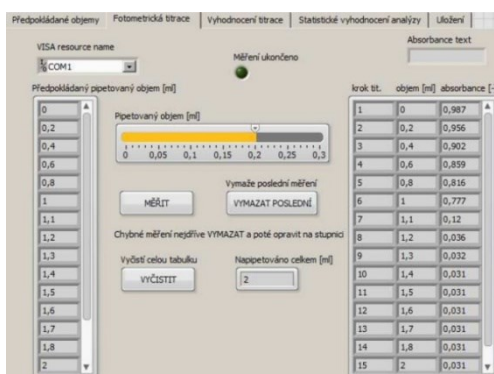
2. V záložce „Předpokládané objemy“ zvolte typ titrace:



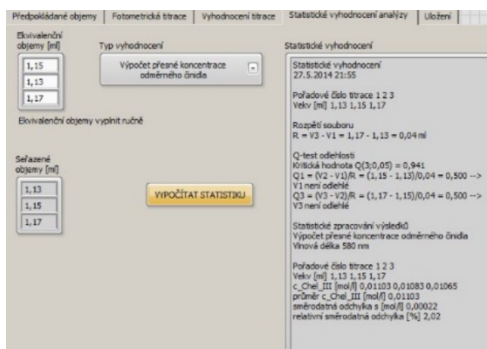
- a) „**orientační titrace**“ - vyplnit kolonku „**Navážená hmotnost chloridu olovnatého**“ → po stlačení tlačítka „**SPOČÍTAT**“ se vypočítá předpokládaná spotřeba roztoku Chelatonu III.
 - b) „**přesná titrace**“ - vyplnit kolonku „**Ekvivalenční objem z orientační titrace**“ → po stlačení tlačítka „**SPOČÍTAT**“ se aktivuje tabulka s možností zadávání dávkování roztoku Chelatonu III (v tabulce v kolonce „**Fotometrická titrace**“ jsou již předdefinované doporučené objemy od 0 do 2,4 ml doplněné krokem 0,2 ml).
3. Nastavení spektrofotometru:
Na hlavním panelu spektrofotometru pomocí tlačítka „**RETURN**“ se dostaneme na úvodní obrazovku na displeji. Po stlačení tlačítka „**F4**“ (PC Ctrl) se přepne kontrola ovládání spektrofotometru na připojený PC.
 4. Nastavení programu - záložka „**Fotometrická titrace**“:
Pro správnou funkci programu je nutné zvolit správný port, přes který je připojený spektrofotometr k PC. Z rolovací nabídky „**VISA resource name**“ je třeba vybrat port COM2.
Po zvolení správného portu se kontrolka „**Měření ukončeno**“ rozsvítí zeleně a v poli „**Absorbance text**“ se zobrazí aktuální hodnota absorbance.
 5. Na posuvníku „**Pipetovaný objem**“ nastavit objem přídavku roztoku Chelatonu III. Zpočátku přidávat po 0,2 ml, v oblasti bodu ekvivalence po co nejmenších objemech.
 6. Po stlačení tlačítka „**MĚŘIT**“ se do tabulky naměřených hodnot přidá nový řádek s přidáním objemu Chelatonu III a danou naměřenou absorbancí. Celkový přidávaný objem se zobrazí i v kolonce „**Napipetováno celkem**“.
 7. Postup přidávání Chelatonu III pro požadovaný graf se zobrazuje v pravé části okna.



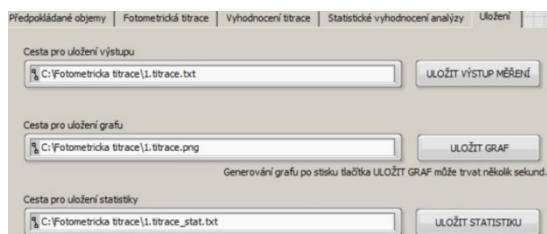
8. Po ukončení titrace otevřít záložku „**Vyhodnocení titrace**“:



9. Pro vyhodnocení titrace je nutné proložit grafem dvě přímky:
 - a) pro proložení přímky, která prochází strmou částí grafu před bodem ekvivalence je nutné vyplnit hodnoty v levé části záložky
 - b) pro proložení přímky, která prochází vodorovnou částí grafu za bodem ekvivalence je nutné vyplnit hodnoty v pravé části záložky
 Pořadová čísla jednotlivých titrací můžeme vyčíst z pole „**Výstup měření**“. Po stlačení tlačítka „**VYHODNOTIT**“ se přímky proloží grafem a určí se jejich průsečík, který lze vyčíst z pole „**Ekvivalenční objem**“.
10. Po provedení tří opakujících se titrací otevřít záložku „**Statistické vyhodnocení analýzy**“:



11. Po zadání 3 ekvivalenčních objemů vybrat z rolovací nabídky „*Typ vyhodnocení*“:
 - a) „*Výpočet přesné koncentrace odměrného činidla*“ pro výpočet přesné koncentrace odměrného roztoku Chelatonu III
 - b) „*Výpočet množství mědi v neznámém vzorku*“ pro výpočet obsahu mědi ve vzorku.
 Výsledek statistického zpracování dat se zobrazí v poli „*Statistické vyhodnocení*“.
12. Záložka „*Uložení*“ slouží k uložení naměřených a vyhodnocených dat. Je třeba předběžně si vytvořit cestu pro jejich uložení (vytvořit si složku a zkopírovat sdresu):



9.4. Statistické vyhodnocení výsledků analýzy

Pro statistické vyhodnocení výsledků analýzy použít matematicko-statistického postupu dle Dean-Dixona, který se používá pro zpracování malých souborů paralelních výsledků, jež jsou obvykle k dispozici při analýzách praktických vzorků.

1. Výsledky m_i seřadit podle rostoucí velikosti.
2. Vypočítat rozpětí souboru $R = m_3 - m_1$.
3. Zjistit, zda některý z výsledků m_i není zatížen hrubou chybou, tj. zda se statisticky významně s určitou pravděpodobností neliší od ostatních paralelních výsledků stanovení. Použít Q-testu, vypočítat hodnoty Q_3 a Q_1 dle rovnic

$$Q_3 = \frac{m_3 - m_2}{R}, \quad Q_1 = \frac{m_2 - m_1}{R}$$

a porovnat je s kritickou hodnotou $Q(3, \alpha)$ z tabulce statistických konstant (tab. III).

Je-li Q_3 nebo Q_1 větší než $Q(3; 0,05)$, znamená to, že příslušná hodnota je zatížena hrubou chybou a musí být ze souboru vyřazena.

4. Vypočítat průměrnou hodnotu m_x jako hodnotu nejbližší správnému výsledku

$$m_x = \frac{\sum m_i}{i}$$

Vyhodnotit variabilitu paralelních výsledků, jako míru přesnosti stanovení vypočítat směrodatnou odchylku s (jako chybu jednotlivých měření) podle Dean-Dixona z rozpětí R s pomocí tabelované konstanty k_i , která je pro daný počet paralelních stanovení i uvedena v tabulce statistických konstant (tab. 9.1)

$$s = R \cdot k_i$$

5. Přesnost měření charakterizovat také směrodatnou odchylkou průměru s_x

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{i}} = \frac{R \cdot k_i}{\sqrt{i}}$$

6. Protože se směrodatná odchylka vztahuje k určitému definovanému provedení analýzy a obvykle závisí i na obsahu stanovované složky, vyjádřit přesnost ve vztahu ke stanovovanému množství jako relativní směrodatnou odchylku s_r

$$s_r [\%] = \frac{s}{m_x} \cdot 100$$

7. Pokud je známa směrodatnou odchylku s a průměr m_x , lze jako výsledek analýzy definovat interval (v jednotkách výsledku), v němž s určenou pravděpodobností leží správný výsledek (jde o definici intervalu spolehlivosti)

$$m_x \pm K_i \cdot R$$

Konstantu K_i odečíst z tabulky statistických konstant (tab. 9.1) pro daný počet stanovení.

Tab. 9.1: Statistické konstanty dle Dean-Dixona (pro $\alpha = 0,05$)

počet měření i	k_i	$\frac{1}{\sqrt{i}}$	K_i	Q
2	0,086	0,71	6,4	
3	0,591	0,58	1,3	0,941
4	0,486	0,50	0,72	0,765
5	0,430	0,45	0,51	0,642
6	0,395	0,41	0,40	0,560
7	0,370	0,38	0,33	0,507
8	0,351	0,35	0,29	

9.4. Vyhodnocení fotometrické titrace

Při vyhodnocení stanovení Cu^{2+} v neznámém vzorku v protokolu uvést:

1. **Hodnoty nalezených koncentrací Chelatonu III a hmotností Cu^{2+} v neznámém vzorku zaokrouhlené na platný počet míst, vyplněné tabulky a vyhodnocené grafy.**
2. **Statistické vyhodnocení výsledku analýz.**
3. **Zdůvodnění možného chybného stanovení.**