

Statistické zpracování dat

Chyby výsledků chemické analýzy

Úkolem analytického chemika by mělo být poskytování **kvalitních výsledků**. Kvalitním výsledkem je myšlen takový výsledek, který je **správný a přesný**. Kvantitativní výsledky chemických analýz mohou být jako všechna čísla získaná měřením zatížena **chybou**. V praxi se setkáváme s trojím typem chyb:

- chyby systematické**, které vznikají například při použití nesprávné metodiky pro daný vzorek (například použitím nesprávného indikátoru při titraci systematicky dochází k přetitrování). Výskyt takové chyby musí být vyloučen vhodnou volbou analytické techniky, případně adekvátním způsobem eliminován či korigován.
- chyby hrubé** - mohou vznikat například nesprávným způsobem odečítání výchylky měřicího přístroje či objemu z byrety, nebo nedodržením kritického kroku v návodu - jsou to tzv. chyby osobní. Dodržováním základních analytických návyků a návodů a maximální pečlivostí bychom těmto chybám měli předcházet.
- chyby náhodné** - nabývají se stejnou pravděpodobností kladné i záporné hodnoty a jsou dány statistickým charakterem měření. Mohou být statisticky vyhodnoceny a odhadnuta jejich velikost.

Po vyloučení systematických chyb (adekvátně volená metodika analýzy) a hrubých chyb (adekvátně volený analytik) lze získat výsledky analýzy, které jsou zatíženy pouze náhodnými chybami. Tyto náhodné chyby vnáší do výsledku analýzy jistou míru **nejistoty** - výsledky analýzy nelze považovat za absolutní číslo, výsledkem je vždy interval, ve kterém se opravdová (správná) hodnota nachází s jistou pravděpodobností.

Abychom mohli statisticky vyhodnotit výsledek analýzy a odhadnout míru jeho variability, je třeba získat dostatečný počet dílčích dat pro zpracování. Z tohoto důvodu se všechna analytická stanovení provádí opakovaně a data se následně zpracují pro získání **odhadu střední hodnoty a míry variability** této střední hodnoty. Správně uvedený výsledek analýzy by tedy měl sestávat z této střední hodnoty a hodnoty její variability. V praxi se u sériových (rutinních) analýz zpravidla provádí pouze jedno opakování s tím, že variabilita získaného výsledku je získána zpracováním dostatečně velkého souboru dat v procesu tzv. validace. Během **validace** se mimo této hodnoty získávají také další parametry, které charakterizují použitou metodiku a její aplikaci na daný vzorek (mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita kalibrační závislosti, pracovní rozsah, selektivita, rušivé vlivy, opakovatelnost, reprodukovatelnost, robustnost a další).

Vyloučení odlehlých výsledků

Získáme-li při analýze dostatečný počet dat, měla by být data s krajními hodnotami (nejnižší a nejvyšší) otestována na **odlehlost**. Pro testování odlehlosti nejmenší a největší hodnoty seřazených (x_1 až x_n) dat můžeme použít různé testy, zde je uveden test Q:

$$Q_l = (x_2 - x_1) / R$$
$$Q_n = (x_n - x_{n-1}) / R$$

kde R je tzv. rozpětí ($x_{max} - x_{min}$)

Vypočteme tedy hodnoty testu pro první a poslední hodnotu v řadě dat a srovnáme je s kritickými hodnotami v tabulce podle počtu získaných dat a zvolené hladiny pravděpodobnosti (zpravidla $\alpha = 0,95$). V případě, že je hodnota testu vyšší než kritická hodnota, je výsledek odlehlý a je třeba jej ze souboru vyloučit. Po vyloučení opět testujeme (nově získanou) krajní hodnotu na odlehlost (nutno přepočítat rozpětí). Vylučovat nelze ze dvou hodnot a také ze tří hodnot, kde dvě z nich jsou shodné.

Tabulka kritických hodnot Q testu pro vyloučení odlehlých hodnot:

n	Q _k		n	Q _k	
	$\alpha = 0,95$	$\alpha = 0,90$		$\alpha = 0,95$	$\alpha = 0,90$
3	0,941	0,988	7	0,507	0,637
4	0,765	0,889	8	0,468	0,590
5	0,642	0,760	9	0,437	0,555
6	0,560	0,698	10	0,412	0,527

Výpočet odhadu střední hodnoty a její variability

Po vyloučení odlehlých hodnot vypočteme **odhad střední hodnoty** souboru dat. Pro většinu výsledků analytických metod lze za nejlepší odhad střední hodnoty považovat **aritmetický průměr \bar{X}** :

$$\bar{X} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$$

Parametrem variability odhadu střední hodnoty (aritmetického průměru) je potom **směrodatná odchylka σ** (získaná z velmi velkého - teoreticky nekonečného počtu měření), respektive **odhad směrodatné odchylky s** . Pro menší počet výsledků ($n \leq 10$) je vhodné zjednodušeně vypočítat odhad směrodatné odchylky z rozpětí R_n ($R_n = x_{max} - x_{min}$):

$$s = R_n \cdot k_n$$

Hodnoty koeficientu k_n pro odhad směrodatné odchylky z rozpětí:

n	k_n	n	k_n
2	0,8862	7	0,3698
3	0,5908	8	0,3512
4	0,4857	9	0,3367
5	0,4299	10	0,3249
6	0,3946		

Jako relativní měřítko náhodné chyby se často používá **relativní směrodatná odchylka s_r** , zpravidla vyjádřená v procentech:

$$s_r = s \cdot 100 / \bar{X} \%$$

Směrodatná odchylka je statistickým parametrem měřicího postupu a v jednotlivém případě pouze udává, že při náhodném rozdělení (Gaussovo rozdělení) leží 68,3% všech naměřených hodnot v rozpětí $\pm\sigma$ okolo aritmetického středu. Chceme-li výsledky vyjádřit s větší statistickou pravděpodobností P , musíme rozpětí zvětšit na $\pm k\sigma$, jak vyplývá z níže uvedené tabulky (P by přitom mělo být vždy uvedeno!).

Chyba v rozmezí $\pm k\sigma$	Statistická pravděpodobnost P	Chyba v rozmezí $\pm k\sigma$	Statistická pravděpodobnost P
0,675 $\cdot \sigma$	50,0%	2,58 $\cdot \sigma$	99,0%
1,00 $\cdot \sigma$	68,3%	3,00 $\cdot \sigma$	99,7%
1,64 $\cdot \sigma$	90,0%	3,29 $\cdot \sigma$	99,9%
1,96 $\cdot \sigma$	95,0%	4,00 $\cdot \sigma$	99,99%

Hromadění chyb a nejistota

Je-li výsledek analýzy kombinací několika experimentálně zjištěných hodnot (naprostá většina výsledků), z nichž každá má svoji chybu (přesnost pipet, vah, odečítání objemu na byretě, přesnost - opakovatelnost rozkladu vzorku, odečtu výchylky na přístroji apod.), dochází k **hromadění chyb**. V praxi to znamená, že čím více operací při analýze provádíme, tím větší je pravděpodobnost, že celková chyba stanovení bude větší (pokud dané operace nemají zanedbatelnou chybu samy o sobě). Jednotlivé chyby se "sčítají" dle zákona šíření chyb - chyba součtu či rozdílu je dána odmocninou ze součtu kvadrátů chyb dílčích hodnot, v případě součinu či podílu je relativní chyba dána odmocninou ze součtu kvadrátů relativních chyb dílčích hodnot.

V současném moderním pojetí analytické metrologie se operuje s pojmy **standardní nejistota - kombinovaná nejistota - rozšířená kombinovaná nejistota**. Zjednodušeně lze směrodatnou odchylku (jednoho kroku analytického postupu) považovat za standardní nejistotu. Kombinovaná nejistota je potom směrodatná odchylka výsledku celého analytického procesu, a to získaná buď ze zákona šíření chyb jednotlivých kroků analytického postupu, a nebo z výsledků opakovaně provedených analýz téhož vzorku. Rozšířením kombinované nejistoty **faktorem pokrytí k** získáme rozšířenou kombinovanou nejistotu - interval, v němž se správná hodnota

výsledku analýzy vyskytuje s předem zvolenou pravděpodobností (zpravidla pro pravděpodobnost $P = 95\%$, $k = 2$).

Srovnání experimentálních výsledků

Výsledky, které mají malou (relativní) směrodatnou odchylku, jsou **přesné** (výsledky opakovaného stanovení padají blízko k průměrné hodnotě). Výsledky, jejichž střední hodnota je blízko očekávané (správné hodnoty) jsou potom **správné**. V praxi se setkáváme se všemi kombinacemi možností - výsledky správné a přesné (**spolehlivé**, ideální stav), výsledky správné ale nepřesné, výsledky nesprávné ale přesné a konečně výsledky nesprávné a nepřesné.

Často potřebujeme srovnat dva výsledky analýzy, například při analýze téhož vzorku dvěma různými metodami při ověřování jejich vhodnosti pro analýzu v rámci procesu validace. Vzhledem ke statistické povaze výsledků chemické analýzy nelze srovnávat dva výsledky jako absolutní čísla, ale je třeba brát v úvahu také míru jejich variability. Pro srovnání dvou experimentálních výsledků (průměrů X_A a X_B) využíváme statistický test na **shodnost**, který zahrnuje jak střední hodnotu výsledků, tak jejich směrodatnou odchylku s_A a s_B :

$$t = (X_A - X_B) / \sqrt{[(s_A^2 + s_B^2) / (n - 1)]}$$

získanou hodnotu porovnáváme s kritickou tabelovanou hodnotou pro daný počet měření n (resp. počet stupňů volnosti $\nu = n - 1$). Výsledky jsou shodné, pokud platí $t < t_{krit}$. Je-li výsledná hodnota větší než kritická hodnota, je rozdíl dvou testovaných středních hodnot statisticky významný (na hladině pravděpodobnosti P) a výsledky nejsou shodné. Pro test platí jistá omezení, a to že se směrodatné odchylky s_A a s_B nesmí významně lišit a že počet paralelních stanovení $n_A = n_B = n$.

Srovnáváme-li experimentálně získanou hodnotu X s definitivní hodnotou μ , u které nepředpokládáme žádnou variabilitu (například připravíme-li si standard se známým obsahem analytu a zanedbatelnou nejistotou této hodnoty), použijeme opět statistický test, tentokrát test na **správnost**:

$$t = \sqrt{n} \cdot (X - \mu) / s$$

a získanou hodnotu opět porovnáme s tabelovanou kritickou hodnotou v tabulce, nyní pro počet stupňů volnosti $\nu = 2n - 2$. Je-li $t < t_{krit}$, pak je výsledek správný.

Tabulka kritických hodnot t_{krit} pro test shodnosti a správnosti (hladina pravděpodobnosti $P = 0,95$) a počet stupňů volnosti ν :

ν	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t_{krit}	12,706	4,303	3,182	2,776	2,571	2,447	2,365	2,306	2,262	2,228
ν	11	12	13	14	15	16	18	20	30	> 30
t_{krit}	2,201	2,179	2,160	2,145	2,131	2,120	2,101	2,086	2,042	2,000

Zpracování kalibrační závislosti

V řadě instrumentálních metod se setkáváme s pojmem kalibrace, což je proces přiřazení změřené hodnoty analytického signálu (proud, napětí, absorbance, atd.) známé hodnotě nezávisle proměnné (koncentrace, absolutní množství). Pro většinu analyticky využívaných metod přitom platí, že závislost je v určitém rozmezí lineární a také většinou prochází počátkem (při nulovém obsahu či koncentraci analytu je nulový také analytický signál). Pro kalibraci se zpravidla konstruuje tzv. kalibrační graf, tedy grafické znázornění výše zmíněné závislosti. Vzhledem k tomu, že jednotlivé body v tomto grafu jsou změřeny experimentálně, mají každý svoji nejistotu. Pokud bychom každý z bodů měřili opakovaně, mohli bychom nejistotu vyjádřit například jako směrodatnou odchylku. Abychom omezili vliv chyby měření jednotlivých bodů, provádíme tzv. vyrovnání, kdy experimentální hodnoty (body) prokládáme křivkou, která odpovídá nějaké algebraické funkci $y = f(x)$ a která prochází co nejpřesněji naměřenými body. Cílem přitom není nalézt funkci, která by jednotlivé body spojila, ale takovou funkci, s jejíž pomocí se nám podaří vyrovnat chyby měření jednotlivých bodů.

Lineární funkci lze popsat rovnicí $y = ax + b$. Odhady parametrů a (směrnice) a b (úsek na ose závisle proměnné - analytického signálu) lze z n dvojic měření ($[x_1, y_1], [x_2, y_2]$ až $[x_n, y_n]$) vypočítat metodou nejmenších čtverců. Hodnoty obou parametrů, směrnice i úsek na ose, jsou přitom zatíženy chybou, která závisí na počtu

bodů n a na rozptylu bodů kolem regresní přímky (body, které neleží na přímce, zvyšují chybu odhadu parametru). Tyto chyby lze vyjádřit jako směrodatné odchytky. Je-li hodnota parametru b malá (srovnatelná s vlastní směrodatnou odchytkou), nebo je-li pro to fyzikální důvod, je vhodné úsek na ose otestovat, zda je statisticky významně odlišný od nuly, a to pomocí tzv. t-testu. Vyjde-li nevýznamná odlišnost od nuly, položíme tento úsek roven nule (přímka potom prochází počátkem) a přepočítáme směrnici (rovnice přímky má potom tvar $y = ax$).

Práce s automatickou pipetou:

Automatické pipety (mikropipety) jsou určeny pro přesné odměřování malých objemů od několika mikrolitrů do 1 ml, případně pro větší objemy (do 5 - 10 ml, makropipety). V těle pipety je umístěn píst, který je veden v utěsněném kanále a jeho pohybem se nasává či vypuzuje vzduch. Pipety bývají konstruovány jako tzv. **jednokanálové** (jedna trubička) či **multikanálové** (například 8 kanálů pro současné pipetování 8 stejných objemů - využití ve spojení s mikrotitračními destičkami v klinické biochemii, molekulární biologii atd.). Vyrábějí se pipety s **fixně nastaveným objemem** (zpravidla násobky 1, 2 a 5) a pipety s **nastavitelným objemem** v určitém rozmezí (například 200 - 1000 μ l). Přesnost automatických pipet se pohybuje kolem 1%, přičemž přesnost fixních pipet je lepší než pro nastavitelné pipety. Nastavení objemu pipet s volitelným objemem se provádí zpravidla otáčením stavěcího kolečka, šroubu v hlavě pipety či nasávací části v závislosti na konstrukci a výrobci pipety. Nastavený objem je indikován číslicí na stupnici (zpravidla v μ l).

Pipetovaná kapalina se **nenasává přímo do pipety**. Na pipetu se nasazuje tzv. **pipetovací špička**, což je plastová trubička, na jednom konci vytažená do špičky a na druhém konci vytvarovaná tak, aby ji bylo možno těsně nasadit na sací / výtlačnou trubičku těla automatické pipety. Špičky jsou vyrobeny z polypropylenu, bývají barevně rozlišeny podle pipetovaného objemu, na který jsou určeny a mohou se mírně tvarově lišit podle výrobce pipety, pro kterou jsou určeny (pozor na špičky určené pro jiné značky pipet nebo tzv. univerzální špičky, které nemusí dostatečně těsnit nebo nejdou na pipetu nasadit). Některé špičky mají rysky, orientačně udávající určitý objem pro kontrolu při pipetování (například špičky 1000 μ l s ryskami 500 a 1000 μ l). Jsou dostupné ve sterilním či nesterilním balení a zpravidla jsou určeny k jednorázovému použití. Kvalitní špičky (nesmáčivé) je možno při pipetování stejného roztoku použít i opakovaně, případně je mezi pipetováním vypláchnout vodou (vždy v závislosti na zvyklostech pracoviště a nárocích metodiky, nikdy však u sterilní práce!). Některé pipety jsou vybaveny tzv. vyhazovačem špiček, což je další tlačítko (vedle tlačítka pístu), určené pro odstranění nasazené pipetovací špičky po použití bez dotyku rukou (například po pipetování infekčního materiálu).

Při pipetování se postupuje tak, že se nastaví požadovaný objem na pipetě (u stavitelných pipet), na pipetu se nasadí vhodná špička, přičemž je nutno dbát na správné nasazení tak, aby byla nasazena těsně a nedocházelo k podtékání. Píst pipety má dvě polohy - první (sací) poloha je do prvního znatelného odporu, druhá (výtlačná) je do druhého (definitivního) odporu při stlačení (vzhledem k poměrně větší síle, nutně ke stlačení pístu, používáme při pipetování palec). Píst pipety tedy stlačíme do prvního stupně, špičku ponoříme do pipetované kapaliny asi 5 mm, přičemž pipetu držíme **svisle**, a **pomalým (kontrolovaným) uvolněním pístu** nasajeme kapalinu do špičky. Po vytažení pipety se špičkou z pipetovaného roztoku by neměl na vnější straně špičky ulpívat žádný roztok. Při nasávání pipetu z roztoku nevytahujeme předčasně, jinak by došlo k nasátí vzduchu do špičky a odpipetovaný objem by nebyl správný (pozor u špiček s malým sacím otvorem), podobně při rychlém nasátí mohou díky kavitaci vzniknout ve špičce bublinky! Pipetu přemístíme nad nádobu, do které roztok odměřujeme a stlačení pístu kapalinu ze špičky vypustíme. Stlačení pístu do druhé polohy vytlačíme ze špičky případně ulpívající roztok. Na rozdíl od skleněných pipet při pipetování automatickou pipetou **nesmí ve špičce zůstat žádný roztok!** Pokud zůstane ve špičce kapka roztoku, můžeme se pokusit opakovaným stlačení pístu tuto kapku vypudit, případně (pokud to další postup nevyklučuje) můžeme špičku vypláchnout (nasátím vody a vypuštěním k odpipetovanému objemu). Špičky jsou vyráběny v nesmáčivé úpravě, přesto se některé kusy smáčí (zvláště univerzálních špiček), obzvláště při pipetování viskózních kapalin či biologických tekutin (krev, sérum, plazma, moč).

Automatickou pipetu s nasazenou špičkou a nasátým roztokem **nikdy nepokládáme do vodorovné polohy!** Automatické pipety **nikdy nepoužíváme pro pipetování těkavých látek**, jako jsou koncentrované roztoky kyselin, amoniak, organická rozpouštědla. Páry poškozují píst pipety či jeho zatěsnění a dojde ke zničení pipety v hodnotě několika tisíc Kč. Stejně tak je nutno vyvarovat se rychlému puštění pístu pipety při nasávání kapaliny, kdy dojde ke **vstříknutí pipetovaného roztoku dovnitř kanálu** a opět k poškození pístu či těsnění. V takovém případě je nutno pipetu ihned rozebrat, vyčistit, po vysušení namazat vhodným mazadlem a opět složit. V případě takové havárie ji ihned **nahlaste vedoucímu cvičení!**

Úloha č. 7 - Argentometrické stanovení obsahu chloridů v moči

Princip

Stanovení obsahu chloridů v moči je významným parametrem biochemického vyšetření moči a společně s dalšími ionty (sodík, draslík) slouží k hodnocení rovnováhy iontů v organismu. Stanovení se provádí ve vzorku moči, sbíraném během 24 hodin (denní moč, dU). Po této době se změří její objem a po homogenizaci se odebere vzorek ke stanovení. Ze zjištěné koncentrace a objemu se vypočte celkové množství chloridů (a dalších iontů), vyloučených během 24 hodin. Normální fyziologické rozmezí je u zdravého člověka 170 - 250 mmol/24hod.

Obsah chloridů v moči se běžně stanovuje například pomocí iontově selektivní elektrody. Chloridy lze také stanovit merkurimetrickou titrací (roztokem dusičnanu rtuťnatého) nebo argentometricky (roztokem dusičnanu stříbrného). Argentometrické stanovení je založeno na srážecí reakci chloridů se stříbrnými ionty. K indikaci bodu ekvivalence lze použít například srážecí indikátor - chroman draselný. Při titraci se nejprve sráží méně rozpustný, bílý chlorid stříbrný. První nadbytečná kapka stříbrné soli reaguje s chromanem za vzniku červenohnědého chromanu stříbrného a titrovaná směs se tak začne barvit do oranžovohněda (chroman draselný samotný má žluté zbarvení). Jiný způsob indikace bodu ekvivalence spočívá v adsorpci některých typů barviv (fluorescein, eosin, bromfenolová modř) na sraženinu chloridu stříbrného v okamžiku bodu ekvivalence, čímž se změní zbarvení.

V této úloze provedete argentometrické stanovení obsahu chloridů ve vzorku moči, a to metodou kalibrační závislosti. Údaje o spotřebě odměrného roztoku (objem) nám nahradí některou z veličin v instrumentálních analytických metodách (například absorbanci ve spektrofotometrii). Pro stanovení použijete dva indikátory. Na oba indikátory potom provedete stanovení obsahu Cl^- ve vzorku syntetické moči, a to opakovaně, aby bylo možno získaná data statisticky zpracovat.

Provedení:

Příprava standardního roztoku:

Připravte 25 ml roztoku chloridu sodného o koncentraci Cl^- přibližně $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ navážením pevného NaCl, rozpuštěním ve vodě a doplněním na 25 ml. Aktuální navážku použijte k vypočtení přesného množství chloridů, použitého pro sestavení kalibrační závislosti.

Kalibrační závislost:

Do titrační baňky pipetujte automatickou pipetou 0,2 ml standardního roztoku chloridu, zřed'te vodou na objem asi 50 ml a přidejte 1 ml roztoku chromanu draselného jako indikátor. Titrujte roztokem AgNO_3 až do změny zbarvení ze žlutého do oranžovohnědého. Spotřebu odměrného roztoku zapište a totéž opakujte s 0,4 - 0,6 - 0,8 a 1,0 ml standardního roztoku chloridu.

Stejným způsobem získáte spotřeby odměrného roztoku při titraci na indikátor fluorescein. K pipetovanému roztoku NaCl, zředěnému na 50 ml vodou, přidejte 2 kapky roztoku fluoresceinu a titrujte až do změny žlutého zbarvení do růžového (současně dojde k vysrážení chloridu stříbrného).

Ze získaných hodnot spotřeby odměrného roztoku a pipetovaného množství chloridů sestrojte kalibrační závislost, k vyrovnání použijte lineární regresi, vypočtete parametry regresní rovnice a podle svých schopností proveďte testování významnosti úseku na ose objemu AgNO_3 .

Stanovení chloridů ve vzorku moči:

Ze vzorku moči pipetujte 10 ml do titrační baňky, zřed'te na 50 ml vodou a titrujte stejně jako standardní roztoky NaCl. Stanovení s každým indikátorem opakujte 10x.

Ze zjištěných spotřeb pomocí rovnice regresní závislosti přepočtete objemy na obsah chloridů ve vzorku (v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), otestujte krajní hodnoty na odlehlost a případně proveďte vyloučení odlehlých hodnot. Spočítejte aritmetický průměr, odhad směrodatné odchylky a relativní směrodatnou odchylku průměru. Průměrné hodnoty obsahu chloridů v moči z titrace na chroman a na fluorescein vzájemně porovnejte testem na shodnost a obě hodnoty otestujte na správnost proti hodnotě, zadané vedoucím cvičení. Výsledky zpracujte do přehledné tabulky. Zjištěnou hodnotu koncentrace chloridů přepočtete podle objemu sbírané moči na látkové množství vyloučených chloridů za 24 hodin a rozhodněte, zda spadá do fyziologického rozmezí.

Spektrofotometrie

Spektrofotometrie (molekulová absorpční spektrometrie v oblasti elektronických spekter) patří mezi optické analytické metody, využívající absorpci záření molekulami analytu či jiné sloučeniny obsahující analyt. Absorpce záření o určité vlnové délce ve viditelné oblasti spektra se projeví jako barevnost látky (látky má zbarvení komplementární k absorbované barvě záření). Záření je absorbováno elektronem v molekule absorbující látky a dochází k excitaci elektronu z energeticky chudšího molekulového orbitalu do orbitalu o vyšší energii, podobně jako je tomu při absorpci záření elektronem v atomu (atomová absorpční spektrometrie, AAS). Energie excitovaného elektronu se potom mění na tepelnou energii, tedy neuspořádaný pohyb molekul. prochází-li monochromatický paprsek o původní intenzitě Φ_0 vrstvou absorbujícího prostředí o tloušťce l , zeslabí se vlivem absorpce intenzita paprsku na hodnotu Φ . Míru absorpce záření lze popsat pomocí propustnosti (transmitance) T

$$T = \Phi / \Phi_0$$

často vyjadřované v % (vynásobením poměru 100). Ve spektrofotometrii (stejně jako v AAS) využíváme spíše absorbanci A

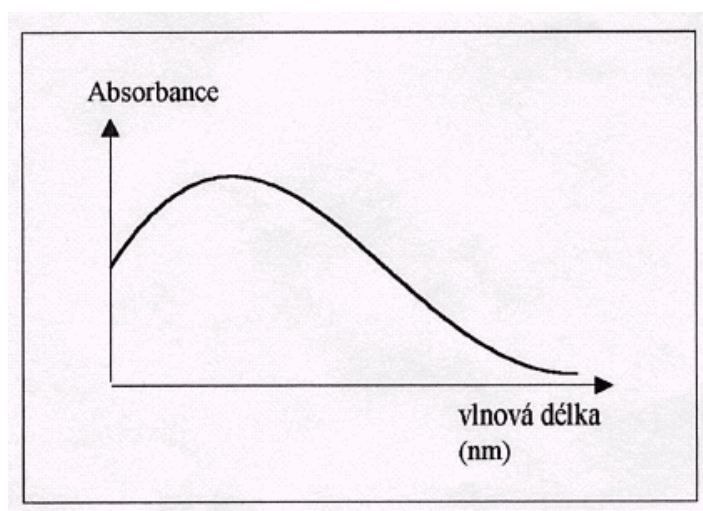
$$A = -\log T = \log \Phi_0 / \Phi$$

kteřá je přímo úměrná koncentraci absorbující látky c při zachování konstantní tloušťky absorbující vrstvy l

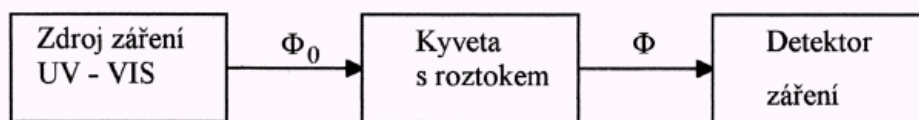
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Konstanta ϵ je tzv. molární absorpční koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), charakterizující míru absorpce záření dané látky v roztoku jednotkové molární koncentrace o šířce absorbující vrstvy 1 cm. Velikost koeficientu je závislá na vlnové délce. Výše uvedená rovnice se označuje jako Lambertův - Beerův zákon a platí, pokud je v roztoku přítomna jen jedna absorbující látka. Při výskytu více absorbujících látek je hodnota absorbance při dané vlnové délce aditivní.

Závislost absorbance na koncentraci absorbující látky je tedy lineární a lze ji využít pro stanovení obsahu absorbující látky v roztoku pomocí kalibrační závislosti. Při vyšších koncentracích absorbující látky však již dochází k různým jevům (například rozptylu světla) a kalibrační závislost se zakřivuje k ose koncentrací. Pro stanovení analytu se absorbance měří při vlnové délce, při které analyt (jeho barevná forma) nejvíce absorbuje. Tuto vlnovou délku zjistíme z tzv. absorpční křivky, což je závislost absorbance roztoku na vlnové délce záření.



V experimentálním uspořádání spektrofotometrických měření využíváme spojitý zdroj UV či viditelného záření (wolframová žárovka, deuteriová výbojka), mřížkového monochromátoru (izolace vlnové délky) a paprsek prochází přes skleněnou či křemennou kyvetu, naplněnou měřeným roztokem. Intenzita záření se měří fotoelektrickým detektorem (fotočlánek, fotobuňka, fotodiody aj.)



Spektrofotometrická stanovení lze použít pro analyty, které samy absorbují záření ve viditelné oblasti spektra (jeví se jako barevné) či ultrafialové oblasti (jeví se jako bezbarvé). Analyty, které samy neabsorbují (nebo absorbují málo) je možno vhodnou chemickou reakcí převést na látky barevné, což umožní použití spektrofotometrie pro jejich stanovení. Takových spektrofotometrických stanovení je přitom většina. Vznikající barevná sloučenina přitom musí být stabilní, její tvorba musí být kvantitativní a rychlá. Mnohá stanovení využívají vznik barevných komplexů. Pro stanovení některých látek lze využít i tzv. nepřímou spektrofotometrii, kdy analyt (sám bezbarvý) reaguje s barevnou sloučeninou za vzniku sloučeniny jiné barvy, takže dochází ke snížení absorbance roztoku s použitým činidlem.

Pro kvantifikaci obsahu analytu ve vzorku lze použít metodu kalibrační závislosti, která je v určitém rozmezí absorbancí lineární a zpravidla prochází nulou (roztok bez analytu neabsorbuje záření) a získáme ji změřením absorbance sady kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci analytu. V lineární oblasti odezvy lze použít také metodu přidavku standardu (nesprávně "metoda standardního přidavku"), kdy změříme absorbanci vzorku a dále absorbanci vzorku se známým přidavkem standardu. Z rozdílu obou hodnot absorbance zjistíme odezvu přidávaného množství analytu (standardu) a přepočteme obsah analytu ve vzorku. Tato metoda zlepšuje správnost výsledku stanovení, například při rušení tvorby barevného produktu některými složkami vzorku.

Úloha č. 8 - Spektrofotometrické stanovení obsahu Fe v přírodní vodě

Princip:

Pro stanovení nízkých koncentrací železa ve vzorcích přírodních vod se využívá červeně zbarvený, velmi stabilní komplex dvojmocného železa se třemi molekulami 1,10-fenanthrolinu, který vzniká při pH 2 - 9. Reakce je velmi citlivá a dovoluje stanovit obsah Fe(II) v koncentracích i pod $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Pro zajištění redoxního stavu Fe(II) se přidává do směsi redukční činidlo (například hydroxylamin hydrochlorid) a pH pro reakci se upravuje přidávkem octanu sodného. Vzorky vody pro stanovení železa (a dalších kovů) je nutno ihned při odběru konzervovat přidávkem kyseliny (například HNO_3 na koncentraci 0,5%), aby nedocházelo během transportu vzorku do laboratoře ke změnám ve složení (srážení hydroxidů, sorpci analytů na stěny nádoby apod.). Železo je důležitý biogenní prvek, jeho vyšší koncentrace například v pitné vodě však není žádoucí, protože nepříznivě ovlivňuje organoleptické vlastnosti vody (chuť, pach) a její technologické využití.

Vyhodnocení celkového obsahu Fe ve vzorku je možno provést pomocí kalibrační závislosti, sestavené pomocí sady standardních kalibračních roztoků, nebo metodou přidavku standardu. Obě tyto metody v následujícím postupu využijeme.

Provedení:

Příprava standardních kalibračních roztoků:

Do řady 25 ml odměrných baněk pipetujeme 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 ml zásobního standardního roztoku Fe o koncentraci 10 mg.l^{-1} , do každé baňky poté přidáme 1 ml 10% roztoku hydroxylamin hydrochloridu, 3 ml 2 mol.l^{-1} roztoku octanu sodného a 1 ml 0,25% roztoku 1,10-fenanthrolinu. Baňky doplníme destilovanou vodou po značku a obsah promícháme. Před vlastním měřením necháme reagovat přibližně 15 minut.

Příprava vzorku vody pro vyhodnocení metodou kalibrační závislosti:

Ze vzorku vody pipetujeme 10 ml do odměrné baňky objemu 25 ml a dále postupujeme stejně, jako při přípravě kalibračních roztoků (tj. přidavek octanu sodného, hydroxylamin hydrochloridu, 1,10-fenanthrolinu, doplnění po značku destilovanou vodou a promíchání). Před vlastním měřením necháme reagovat přibližně 15 minut.

Příprava vzorku vody pro vyhodnocení metodou přidavku standardu:

Vzorek bez přidavku standardu se připravuje stejně, jako vzorek pro měření obsahu Fe metodou kalibrační závislosti. Výše připravený vzorek tedy využijeme pro vyhodnocení i metodou přidavku standardu.

Vzorek s přidavkem standardu připravíme pipetováním 10 ml vzorku vody do odměrné baňky objemu 25 ml, přidáním 5 ml zásobního standardního roztoku Fe o koncentraci 10 mg.l^{-1} a dále přidáním všech činidel, nutných pro vybarvení. Obsah baňky doplníme vodou po značku a promícháme. Před vlastním měřením necháme reagovat přibližně 15 minut.

Změření absorpčního spektra:

Kalibračním roztokem s nejvyšší koncentrací Fe vypláchneme několikrát skleněnou kyvetu a naplníme ji asi do 2/3 objemu. Kyvetu držíme vždy za ty stěny, přes které při měření neprochází paprsek světla (zpravidla matované) a po nalití roztoku kyvetu otřeme kouskem buničité vaty. Druhou kyvetu stejným způsobem naplníme slepým pokusem (kalibrační roztok o nulové koncentraci Fe). Podle návodu u spektrofotometru nastavíme vlnovou délku 400 nm, dále nulovou polohu přístroje a po zařazení kyvety s barevným roztokem odečteme absorbanci. Poté změníme vlnovou délku o 10 nm a nastavení nulové polohy a odečet absorbance barevného roztoku opakujeme, až k vlnové délce 600 nm.

Ze získaných párů hodnot (vlnová délka - absorbance) sestrojíme absorpční křivku a odečteme vlnovou délku maxima absorbance. Při této vlnové délce provádíme všechna další měření. Absorpční křivku přiložíme k protokolu.

Měření absorbance připravených roztoků a vyhodnocení:

Po zjištění vlnové délky maxima absorpce nastavíme na spektrofotometru tuto vlnovou délku, nastavíme nulovou polohu (na nulový kalibrační roztok) a proměříme absorbanci všech připravených standardních roztoků, vzorku a vzorku s přidavkem standardu.

Zjištěné absorbance spolu s množstvím Fe (v μg v odměrné baňce) a přepočtenou molární koncentrací komplexu Fe(II)-1,10-fenantrolin uvedeme v protokolu do tabulky a pro každý změřený kalibrační roztok provedeme výpočet molárního absorpčního koeficientu komplexu a jeho průměrnou hodnotu.

Sestrojíme graf závislosti absorbance kalibračních roztoků na absolutním množství Fe (v μg) a body proložíme přímkou, procházející nulou. Z kalibrační závislosti odečteme obsah Fe v pipetovaném množství vzorku vody a přepočteme na koncentraci v mg.l^{-1} . Kalibrační graf přiložíme k protokolu.

Absorbanci vybarveného roztoku vzorku a vzorku s přidavkem standardu použijeme pro výpočet obsahu Fe metodou přidavku standardu, a to graficky nebo početně. Pro grafické zpracování sestrojíme závislost absorbance roztoku na množství přidaného Fe - absorbance roztoku samotného vzorku tedy bude ležet na ose y (množství přidaného Fe = $0 \mu\text{g}$), absorbance roztoku vzorku s přidavkem Fe bude vynesena proti množství Fe = $50 \mu\text{g}$. Spojením obou bodů přímkou a jejím protažením k ose x v záporné části získáme v průsečíku přímky s osou x zápornou hodnotu obsahu Fe v pipetovaném množství vzorku, které opět přepočteme na koncentraci v mg.l^{-1} . Početně lze postupovat tak, že od absorbance vzorku s přidavkem odečteme absorbanci vzorku bez přidavku - získaná hodnota absorbance potom odpovídá pouze přidanému množství Fe ($50 \mu\text{g}$). Z těchto hodnot a hodnoty absorbance vzorku bez přidavku vypočítáme množství Fe přímou úměrou a opět přepočteme na koncentraci v mg.l^{-1} . Grafické či početní vyhodnocení uvedeme v protokolu.

Pipetovaný objem standardu Fe	Množství Fe v baňce	Koncentrace komplexu	Naměřená A	Molární absorpční koeficient
ml	μg	mol.l^{-1}		$\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
0				
2				
4				
...				
Průměr	-	-	-	

Atomová absorpční a emisní spektrometrie

Atomová absorpční a emisní spektrometrie patří mezi **metody optické** - využíváme zde absorpci či emisi záření s energií, odpovídající vlnovou délkou ultrafialové a viditelné části spektra. Obě tyto metody hrají velmi významnou roli v analytické chemii při stanovení celkových obsahů prvků (především kovových) v nejrůznějších typech vzorků, včetně vzorků biologických materiálů.

Základem obou těchto metod je nejprve převedení vzorku, respektive analytu ve vzorku, do formy volných atomů. V **atomové absorpční spektrometrii (AAS)** využíváme skutečnosti, že elektrony valenční vrstvy atomu mohou přijímat energii ve formě záření o vhodné vlnové délce a dochází k excitaci elektronu. Energie tohoto záření je shodná s excitační energií přechodu valenčního elektronu do některé z vyšších, neobsazených energetických hladin. Dochází k **absorpci záření volnými atomy** a míru absorpce záření je možno měřit. Intenzita absorpce je úměrná koncentraci volných atomů v atomizačním zdroji a potažmo i koncentraci (či absolutnímu obsahu) analytu ve vzorku. Pro atomizaci analytu využíváme termické zdroje - nejběžnější je **plamen** (například acetylen - vzduch) nebo elektrotermická atomizace (ohřev ohmickým odporem při průchodu proudu například grafitovou kyvetou). Zdroj záření pro měření absorpce atomů musí být monochromatický - zpravidla se používají výbojky s dutou katodou, vyrobenou z prvku, který stanovujeme. Intenzita absorpce je potom měřena fotoelektrickým detektorem.

V **atomové (optické) emisní spektrometrii (AES, OES)** využíváme toho, že u volných atomů můžeme vhodným způsobem excitovat valenční elektrony do některé z vyšších energetických hladin. Při deexcitaci (návratu elektronu na nižší či původní energetickou hladinu) se přebytečná energie vyzáří a dochází k **emisi záření**. Energie (vlnová délka) záření odpovídá energetickému rozdílu hladin a je charakteristická pro daný přechod - souvisí s elektronovým obalem atomu a tedy i s prvkem, který dané záření emituje. Spektrální analýzu emitovaného záření lze využít pro kvalitativní rozbor vzorku a důkaz přítomnosti určitých prvků. Intenzita záření o vybrané vlnové délce (analytická vlnová délka) závisí na koncentraci emitujících částic v excitačním zdroji a ta je závislá na koncentraci (či absolutním obsahu) analytu ve vzorku. Pro atomizaci a excitaci analytu lze využít plamene jako v AAS (plamenová fotometrie, například pro stanovení alkalických kovů), větší počet prvků je však excitován v různých plazmových zdrojích (elektrický oblouk, indukčně vázané plazma, mikrovlnné plazma aj.). Pro izolaci záření o potřebné vlnové délce se používají zpravidla monochromátory na principu difrakční mřížky a intenzita záření je měřena fotoelektrickým detektorem.

Vzorek vnášíme do atomizačního (AAS) či excitačního (AES) prostředí zpravidla ve formě roztoku, a to **zmlžováním** proudem plynu. Vznikne aerosol, který vnášíme do plamene - zde dojde k odpaření rozpouštědla (vody), atomizaci a případně excitaci elektronů v atomech. Pevné vzorky či vzorky ve vodě nerozpustné je tedy nejprve nutno převést do roztoku. Využíváme k tomu rozpouštění například v kyselinách, směsi kyselin, tavení s vhodným činidlem a další postupy. V případě biologických materiálů hovoříme o tzv. mineralizaci, kdy použitým postupem odstraníme (alespoň částečně) organické složky vzorku (bílkoviny, sacharidy, tuky aj.). V některých případech není nutno rozložit vzorek zcela - stačí, pokud se námi stanovovaný analyt rozpustí (vyextrahuje se) v použitém činidle.

Kvantitativní analýza využívá závislosti mezi naměřeným signálem (absorbancí, intenzitou emitovaného záření) a koncentrací analytu v roztoku vzorku. Nejde o metody absolutní a proto je nutná **kalibrace** pomocí sady standardních kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci analytu. Kalibrační závislosti bývají zpravidla lineární v určité oblasti koncentrací, a proto je vhodné koncentraci analytu ve vzorku upravit tak, aby intenzita změřeného signálu ležela v lineární části. Obě metody dosahují nízkých mezí detekce, jsou určeny převážně pro stanovení nízkých až stopových koncentrací analytů, například těžkých kovů či alkalických kovů. Ve **stopové analýze** se však setkáváme s problémy, které jsou při stanovení vyšších koncentrací (odměrná analýza, gravimetrie aj.) opominutelné. Jde především o hodnotu slepého pokusu - tedy koncentraci analytu v roztoku, který obsahuje všechna námi použitá činidla pro stanovení a byl podroben všem operacím, ale neobsahuje analyzovaný vzorek. V případě stanovení nízkých obsahů analytu je takovýto **slepý pokus** nutný, protože z použitých chemikálií, nádobí, vody i ze vzduchu či pracovníka může docházet ke kontaminacím při zpracování vzorku před měřením. Hodnotu slepého pokusu je potom nutno odečíst od stanoveného obsahu, protože se tím zkrusluje výsledek stanovení a analýza je potom nesprávná.

Úloha č. 9 - Stanovení zinku metodou AAS a draslíku metodou AES v multivitaminovém přípravku

Princip:

Tabletu multivitaminového přípravku nejprve rozpustíme ve vhodném činidle a roztok zbváme nerozpustných příměsí, které by vadily při stanovení. Roztok naředíme tak, aby koncentrace analytu ležela v rozsahu koncentrací kalibrační závislosti a proměříme absorbanci, resp. intenzitu emise, na přístroji pro AAS (AES). Pro oba analyty (Zn, K) připravíme sadu kalibračních roztoků, které využijeme k sestrojení kalibračních závislostí. Cílem úlohy je stanovení obsahu Zn a K v jedné multivitaminové tabletě - lze postupovat tak, že jednu tabletu celou rozložíme a stanovíme obsah analytů v roztoku, nebo tabletu zvážíme, rozdrtíme, v alikvotním podílu po rozložení stanovíme obsah analytů a přepočteme na celou tabletu. Vedle kvantitativního stanovení obsahu draslíku využijeme emisní spektrometrie také pro kvalitativní důkaz některých dalších prvků.

Provedení:

Příprava vzorku multivitaminového přípravku:

Celou tabletu v kádince (100 ml) zalijeme 10 ml 10% roztoku kyseliny dusičné. Kádinku umístíme na plotýnku vařiče a mírně zahříváme, až se tableta rozpadne. Poté obsah kádinky necháme vychladnout, zředíme na asi 60 ml destilovanou vodou a přefiltrujeme přes papírový filtr do odměrné baňky objemu 100 ml. Do baňky přitom musíme dostat kvantitativně veškerý roztok z kádinky, tzn. kádinku je nutno několikrát vypláchnout malým množstvím vody (a přefiltrovat) a filtr následně zbvavit ulpívajícího roztoku oplachem destilovanou vodou ze stříčky. Odměrnou baňku poté doplníme vodou po značku a promícháme. Stejným způsobem provádíme i slepé stanovení, včetně zahřívání na vařiči a filtrace! Získaný roztok potom vhodně naředíme 1% roztokem HNO_3 tak, aby koncentrace analytu (Zn, K) ležela asi uprostřed kalibrační závislosti.

Stanovení draslíku AES:

Naředěním zásobního standardního roztoku draslíku o koncentraci 10 mg.l^{-1} 1% roztokem kyseliny dusičné připravíme sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci K 0 - 2 mg.l^{-1} po $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (po 25 ml). Po nastavení přístroje proměříme dle návodu intenzitu emise na analytické čáře draslíku a pomocí obslužného programu sestrojíme kalibrační závislost (lineární, procházející nulou). Změříme koncentraci K ve slepém pokusu a v připraveném roztoku vzorku. Koncentraci vyhodnocenou dle kalibrační závislosti přepočteme na množství K v tabletě (po případné korekci na hodnotu slepého pokusu) a srovnáme s deklarovanou hodnotou.

Kvalitativní spektrální analýza:

Podle návodu k přístroji nasnímáme emisní spektrum při zmlžování neředěného roztoku vzorku v rozsahu vlnových délek 550 - 800 nm. Odečteme vlnovou délku pozorovaných emisních čar a identifikujeme jednotlivé čáry ve spektru (tj. který prvek záření o dané vlnové délce emituje). Spektrum vytisknete a přiložte k protokolu.

Stanovení zinku AAS:

Naředěním zásobního standardního roztoku zinku o koncentraci 10 mg.l^{-1} 1% roztokem kyseliny dusičné připravíme sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci Zn 0 - 1 mg.l^{-1} po $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (po 25 ml). Po nastavení přístroje proměříme dle návodu absorbanci na čáře zinku a pomocí obslužného programu sestrojíme kalibrační závislost (lineární, procházející nulou). Změříme koncentraci Zn ve slepém pokusu a v připraveném roztoku vzorku. Koncentraci vyhodnocenou dle kalibrační závislosti přepočteme na množství Zn v tabletě (po případné korekci na hodnotu slepého pokusu) a srovnáme s deklarovanou hodnotou.

Potenciometrická a konduktometrická indikace bodu ekvivalence

Princip:

Potenciometrie je založena na sledování změn potenciálu vhodné indikační elektrody na koncentraci iontu, který tento potenciál ovlivňuje. **Indikační** elektrodou mohou být elektrody I. druhu (kovové elektrody, například stříbrná, reaguje na koncentraci Ag^+), elektrody II. druhu (elektrody se sraženinou, například Ag/AgCl , reaguje na koncentraci Cl^-), redoxní elektrody (platinová, zlatá, reagují na poměr oxidovaná forma / redukována forma) nebo iontově selektivní elektrody membránové (skleněná pH elektroda, reaguje na koncentraci H^+). Potenciál elektrody nelze měřit přímo, ale vždy je vztažen k jiné elektrodě, tzv. **referentní** (například kalomelová nebo argentchloridová elektroda). V potenciometrii tedy měříme potenciálový rozdíl, tzv. elektromotorické napětí EMN, mezi indikační a referentní elektrodou. Toto napětí je úměrné koncentraci iontu či poměru koncentrací dvou forem.

Tuto metodu lze využít v tzv. **přímé potenciometrii** k měření koncentrace (resp. aktivity) daných iontů (například měření pH skleněnou elektrodou) po předcházející kalibraci na sadu standardních roztoků. S výhodou lze potenciometrická měření využít při různých typech **potenciometrických titrací** k sestavení tzv. **potenciometrické titrační křivky**, ze které je možno zjistit bod ekvivalence a některé další informace (například disociační konstantu). Titrační křivka obecně je závislost nějaké vlastnosti, charakterizující titrovaný roztok, na objemu přidaného titračního činidla. U potenciometrické titrační křivky vynášíme závislost EMN (či přímo pH) na objemu přidaného činidla. Z titrační křivky lze zjistit bod ekvivalence jako **inflexní bod** sigmoidní křivky, a to buď graficky, a nebo poččetně (z první derivace, druhé derivace, po linearizaci dle Grana aj.).

Vhodnou volbou indikační elektrody lze využít potenciometrickou indikaci bodu ekvivalence téměř pro všechny běžně používané typy titrací, jako je alkalimetrie a acidimetrie (skleněná pH elektroda), oxidimetrie či reduktometrie (Pt, Au elektrody), srážecí titrace (Ag elektroda v argentometrii) nebo chelatometrie (iontově selektivní membránové elektrody).

Konduktometrie je založena na měření vodivosti roztoků. Různé ionty vedou elektrický proud různě, a tak je vodivost roztoku ve vztahu k jeho složení. V porovnání s potenciometrií je však konduktometrie značně neselektivní a lze tak **přímou konduktometrii** využít pouze při analýze jednosložkových směsí. Naopak se neselektivita využívá při stanovení celkového obsahu rozpuštěných látek ve vodách (měrná vodivost, konduktivita).

Sledováním vodivosti titrovaného roztoku lze také zjistit bod ekvivalence při tzv. **konduktometrických titracích**. **Konduktometrická titrační křivka** se skládá ze dvou lineárních částí, které se protínají v bodě ekvivalence. Přidáváním titračního činidla se nám v titrovaném roztoku mění koncentrace jedné ze složek (reaguje) a vzniká složka jiná. Vhodné je, aby tyto dvě složky měly velký rozdíl v molárních iontových vodivostech - titrační křivka má potom ostrý přechod v bodě ekvivalence. Příkladem jsou acidobazické titrace, kde lze tento způsob indikace s výhodou použít (iontová vodivost H^+ a OH^- iontů je velká v porovnání s ostatními ionty a změny vodivosti jsou tak výrazné). U ostatních typů titrací reakce většinou vyžaduje úpravu prostředí (okyselení, pufrování aj.), takže titrovaný roztok sám má vysokou hodnotu vodivosti a malé změny, způsobené vlastní reakcí, nejsou dobře postřehnutelné.

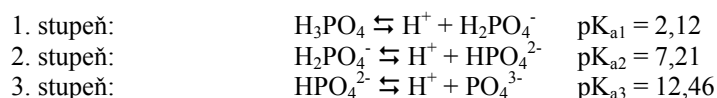
Potenciometrické i konduktometrické indikace bodu ekvivalence jsou vhodné pro možnost automatizace celého procesu a využívají se v tzv. titrátorech. S výhodou lze použít pro titraci roztoků zakalených či zbarvených, u kterých by byla vizuální indikace bodu ekvivalence obtížná či nemožná.

Úloha č. 10 - Stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích

Princip:

Kyselina fosforečná se používá v potravinářství jako okyselující prostředek (dle klasifikace přídatných látek - E338). Známe je její použití v některých typech kolových nápojů (Coca-Cola aj.). Její obsah se pohybuje v řádu stovek $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v limonádě. Jako poměrně silná kyselina má ve vyšších koncentracích nepříznivý vliv na zubní sklovinu a žaludeční sliznici. Vzhledem k přítomnosti barviv je její stanovení alkalimetrickou titrací s vizuální indikací bodu ekvivalence znemožněno. S výhodou tedy využijeme možnosti potenciometrie a konduktometrie k indikaci bodu ekvivalence při titraci kyseliny fosforečné v Cole roztokem hydroxidu sodného.

Kyselina fosforečná je středně silná, trojsytná kyselina. Disociuje ve třech stupních dle rovnic:



Prakticky lze kyselinu fosforečnou titrovat do prvních dvou stupňů - s vizuální indikací do prvního stupně na methylovou oranž a do druhého stupně na fenolftalein. Na potenciometrické titrační křivce se projeví stupňovitá neutralizace dvěma skoky s dvěma inflexními body. V případě konduktometrické titrace zaznamenáváme nejprve pokles vodivosti (klesá koncentrace silně vodivých H^+ , narůstá koncentrace méně vodivých H_2PO_4^-), za prvním bodem ekvivalence dochází opět k nárůstu vodivosti. Pro vyhodnocení obsahu kyseliny fosforečné v limonádě lze použít pouze titraci do prvního stupně, protože se zde nachází celá řada dalších látek, které se mohou titrovat společně s kyselinou fosforečnou (slabé organické kyseliny, umělá sladidla, oxid uhličitý) při titraci do druhého stupně.

Standardizace odměrného roztoku NaOH 0,025 mol.l⁻¹

$$M[\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}] = 97,095 \text{ g.mol}^{-1}$$

Připravte 100 ml roztoku kyseliny amidosulfonové o koncentraci 0,025 mol.l⁻¹. Standardizaci odměrného roztoku NaOH proveďte titrací 20 ml roztoku kyseliny amidosulfonové, zředěné v kádince na objem asi 150 ml za současného míchání a zapisování hodnot pH a vodivosti po každém přidavku činidla. Kolem očekávaného bodu ekvivalence zmenšete přidavky titračního činidla, aby byla potenciometrická titrační křivka vykreslena z dostatečného počtu bodů. V titraci je třeba pokračovat i za bodem ekvivalence, aby bylo možno závislosti vhodně proložit. Sestrojte titrační křivky, odečtěte bod ekvivalence a vypočtěte koncentraci odměrného roztoku pro každou z použitých metod indikace bodu ekvivalence.

Titrace vzorku kyseliny fosforečné

Vzorek čisté kyseliny fosforečné doplňte v odměrné baňce po rysku a po promíchání pipetujte 20 ml do kádinky a zpracujte stejně, jako vzorek limonády. Srovnajte tvar titračních křivek čisté kyseliny a limonády a vypočtěte koncentraci kyseliny fosforečné ve vzorku (v mg.l⁻¹). Všimněte si rozdílu ve tvaru titračních křivek pro čistou kyselinu fosforečnou a její směs s dalšími látkami v limonádě.

Titrace vzorku limonády

Ze vzorku limonády, který byl předem zbaven oxidu uhličitého povařením, pipetujte 20 ml do kádinky a zřed'te vodou tak, aby bylo možno do kádinky umístit elektrodu pH-metru, konduktometru a míchadlo tak, aby nedocházelo k nárazům míchadla do elektrod. Titrujte roztok limonády za současného zapisování pH a vodivosti. První titrace slouží jako orientační, u druhé titrace zmenšete přidavky odměrného roztoku v okolí bodu ekvivalence. Opět pokračujte v titraci až za bod ekvivalence. Sestrojte titrační křivky, odečtěte body ekvivalence a vypočtěte koncentraci kyseliny fosforečné (v mg.l⁻¹) z koncentrace odměrného roztoku odpovídající metody (konduktometrie - konduktometrie).