

# **Laboratorní cvičení z analytické chemie**

## **Základy analytické chemie**

### **Soubor návodů k úlohám**

Jiří Machát, Vítězslav Otruba, Jaroslav Šenkýř

**Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta**

**Brno, 2006**

## Organizace cvičení

Cvičení lze rozdělit do dvou bloků. V prvním bloku jsou prováděny úlohy kvalitativní analytické chemie (úlohy 1 a 2) a úlohy věnované základům kvantitativní analytické chemie a klasickým analytickým metodám (úlohy 3 - 6). Všechny tyto úlohy jsou prováděny všemi studenty společně, každý student s vlastním vybavením a také s vlastním neznámým vzorkem. V následujícím bloku instrumentálních metod (úlohy 7-11) provádí jednu úlohu vždy dva studenti (dle možností každý s vlastní instrumentací) a to dle rozpisu, který je v předstihu uveřejněn na nástěnce u laboratoře základního cvičení. Poslední cvičení je vyhrazeno exkurzi po pokročilých metodách analytické chemie a udělování zápočtu oprávněným studentům.

Návody k úlohám jsou vždy uvedeny stručnou kapitolou z teorie metody - její prostudování vám pomůže pochopit prováděnou úlohu, i když jste se s metodou prozatím na přednáškách nesetkali. Celý návod si předem přečtěte a připravte se na cvičení výpočtením potřebných navážek a pod.

Seznam úloh:

### Blok I.

- 1) Selektivní reakce kationů a anionů I ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )
- 2) Selektivní reakce kationů II ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ )
- 3) Kvantitativní analýza - základní operace
- 4) Gravimetrie - stanovení železa v pigmentu jako  $\text{Fe}_2\text{O}_3$
- 5) Odměrná analýza - Jodometrická titrace - stanovení vitamínu C v ovoci, vitamínovém preparátu
- 6) Odměrná analýza - Chelatometrická titrace - stanovení Ca a Mg ve vodách a vápenatých schránkách živočichů

### Blok II.

- 7) Statistické zpracování dat - argentometrické stanovení obsahu chloridů v moči
- 8) Spektrofotometrie - stanovení obsahu Fe v přírodní vodě
- 9) Atomová absorpční a emisní spektrometrie - stanovení Zn a K v multivitaminovém přípravku
- 10) Potenciometrická a konduktometrická indikace bodu ekvivalence - stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích
- 11) Stanovení obsahu  $\beta$ -karotenu v džusu extrakční spektrofotometrií
- 12) Exkurze - instrumentální metody analytické chemie (AAS, AFS, ICP-OES, ICP-MS, XRF, LIBS, MFS, MAS, HPLC, GC, CE, LIF, MALDI-MS aj.)

## Vypracování protokolu

Z každé vámi provedené úlohy vypracujete **protokol**. Odevzdání a uznání protokolů (tedy věcná správnost vašich pozorování a výpočtů) ze všech absolvovaných úloh jsou podmínkou k udělení zápočtu. Protokoly odevzdávejte **vždy v následujícím cvičení**. Protokoly k opravě dostanete zpět, všechny uznané protokoly potom na konci semestru.

**Kvalitativní analýza** - v protokolech k úlohám z kvalitativní analýzy uvedete ke každému z analyzovaných neznámých vzorků **všechna činidla (reakce) a jejich výsledek**, která jste použili k dokázání či vyloučení přítomnosti hledaného iontu. Uvedeny budou i ty reakce, které nevedly k pozitivnímu výsledku, aby bylo možno na základě popsaných pozorování jednoznačně rozhodnout, zda hledaný ion je či není v neznámém vzorku přítomen. Použité reakce je možno popsat schematicky a stručně. Na konci protokolu musí být vždy uveden **závěr**, ve kterém slovně popíšete výsledek vašeho experimentu, tedy který ion (ionty) jste ve vašem vzorku (vzorcích) našli.

**Kvantitativní analýza** - v protokolech k úlohám z kvantitativní analýzy není nutno popisovat přesný postup provedení experimentu či teorii. Důležité a nutné je naopak uvést **všechna experimentálně získaná data**, která mají rozhodující vliv na výsledek: navážka standardní látky či vzorku (zde uvést hmotnost prázdné navažovací nádoby i nádoby s látkou), objem připraveného roztoku, množství pipetovaného alikvotního podílu roztoku, celkový objem roztoku vzorku, spotřeba odměrného roztoku a podobně. Stejně tak je nutno uvést **všechny výpočty**, které provádíte. Nároky na protokoly u různých úloh se mohou lišit, stejně jako se liší svojí náročností různé analytické metody. Vždy však musí být protokol ukončen závěrem, kde opět slovně uvedete získané výsledky a zhodnotíte je. Vaším úkolem je v kvantitativní analýze se co nejvíce přiblížit hodnotě (vám neznámého) obsahu analytu ve vzorku. Pečlivou prací a také správným postupem výpočtu můžete dosáhnout velmi dobrých výsledků. Všechny vaše výpočty jsou kontrolovány na správnost postupu a výsledku.

V hlavičce protokolu musí být vždy uvedeny tyto informace:

**Jméno a příjmení, studijní obor**

**Datum praktické realizace úlohy ve cvičení** (pozor při nahrazování absence!)

**Číslo úlohy a její název**

**Číslo vzorku(ů)** (pozor při nahrazování absence!)

# Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza je jednou z oblastí analytické chemie, spočívající v důkazu hledaných prvků či sloučenin a v identifikaci vzorků neznámého složení. K tomu účelu nám mohou posloužit různé chemické reakce, při kterých vzniká sloučenina charakteristicky zbarvená, sraženina či jiný projev. Chemické reakce lze využít pro důkaz jednotlivých anorganických iontů, stejně tak lze v organické kvalitativní analýze identifikovat sloučeniny použitím reakcí charakteristických skupin látek (hydroxylová skupina, karboxyl, karbonyl, aminoskupina atd.). V současné kvalitativní analýze se využívá moderních instrumentálních metod jak pro analýzu prvkovou (například emisní spektrometrie), tak pro analýzu organických sloučenin (IR spektrometrie, NMR spektrometrie, hmotnostní spektrometrie aj.).

Jednoduché důkazové reakce, se kterými se v následujících úlohách seznámíte, mohou sloužit například pro identifikaci neznámé anorganické chemikálie ve vaší laboratoři (láhev bez štítku apod.). Pro důkazové reakce jsou ideální tzv. specifické reakce, kdy za daných podmínek reaguje pouze hledaný ion. Takových reakcí je ale málo a je tedy nutno dodržovat postup důkazu a v přítomnosti rušících iontů tyto předem oddělit nebo maskovat. Ve cvičení si nejprve vyzkoušíte všechny důkazové reakce uvedených iontů, budete pozorovat, co je pozitivní a co naopak negativní projev důkazu – u každé zkoušky je nutno provádět tzv. slepý pokus.

Slepý pokus je paralelně prováděný pokus za stejných podmínek a se stejnými činidly jako vlastní pokus, jediný rozdíl je v tom, že místo zkoumaného roztoku vzorku použijeme stejné množství destilované vody. Účelem slepého pokusu je poznat *negativní* výsledek reakce, a dále ověřit čistotu použitých činidel. Má-li být reakce dostatečně průkazná, musí být výsledek slepého pokusu zřetelně odlišný od vlastního pokusu.

Vaším úkolem je dokázat v předloženém vzorku (vzorcích) hledané ionty. Při analýze roztoku vzorku se doporučuje provádět ještě další, třetí pokus: místo vzorku se bere stejné množství roztoku příslušného iontu. Výsledek pokusu s naším vzorkem potom porovnáme s oběma extrémními výsledky (slepý a "plný" pokus) a tím si usnadníme rozhodování o přítomnosti nebo nepřítomnosti hledaného iontu. Tímto třetím pokusem současně ověříme správnou funkci činidla a máme-li správné reakční prostředí.

## Pracovní technika a pomůcky.

### *Kapkovací deska a filtrační papír.*

Většina reakcí se provádí v kapce zkoumaného roztoku vzorku v jamce na kapkovací desce. Vznik barevných produktů - rozpustných i sraženin - sledujeme na porcelánové kapkovací desce, bílé a světlé sraženiny či zákaly pozorujeme nejlépe na skleněné kapkovací desce proti černému, nebo alespoň tmavému pozadí. Promíchání kapky provádíme mírným foukáním přes pipetku. Zahřívání roztoku v kapce provádíme jen výjimečně, a to ponořením zahřátého Pt drátku. Jiným způsobem zahřívání kapkovací desky nelze doporučit, hrozí prasknutí desky .

V některých případech je výhodné provádět kapkové reakce na kousku filtračního papíru. Vznik sraženiny rozeznáme na filtračním papíře od rozpustného produktu při oplachování papíru pod tekoucí vodou: sraženina se na rozdíl od rozpustného produktu nedá vymýt.

Pro sledování tvaru krystalků sraženiny pod mikroskopem používáme podložní sklíčko. Sklíčko před použitím musí být dokonale čisté a suché. Na sklíčko kápneme minimální množství vzorku a činidla a promícháme (není nutno používat krycího skla). Zaostřování mikroskopu provádíme pohybem tubusu *od vzorku*. Pokud dojde k namočení objektivu do vzorku, otřeme jej opatrně navlhčenou vatou a osušíme!

### *Pipetky, kapátka a lopatička*

Přidávání roztoků vzorků a činidel provádíme pomocí kapátek nebo pipetek. Pipetky jsou skleněné trubičky, na jednom konci vytažené v zúženou část. Pipetky musí být před použitím čisté, vypláchnuté destilovanou vodou, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku nebo činidla. Doporučuje se uchovávat pipetky ve větší kádince s destilovanou vodou během pokusů. Kapátka jsou v širší části zakončena kouskem elastické hadičky, jejíž konec je zaslepen, a tvoří uzávěr většiny lahvíček s reagenčními roztoky.

Při kapkování se *nikdy* nesmíme dotknout kapátkem nebo pipetkou roztoku, ke kterému přidáváme kapku. Kapku necháme volně ukápnout přes vzduchovou mezeru mezi kapátkem a povrchem roztoku, ke kterému přikapáváme. V opačném případě hrozí kontaminace roztoku ve špičce pipetky nebo kapátka a zanesení nečistot do vzorku nebo činidel. Znečištění roztoku vzorku záměnou pipetky zabráníme, když jednu pipetku vyčleníme pouze pro přidávání roztoku vzorku a uchováваме ji ve zkumavce se vzorkem.

Reagencie v pevném stavu se přidávají pomocí špachtlí (mikrolžiček). Špachtli po použití opláchneme vodou a otřeme hadříkem.

## ***Zkumavky, centrifugační zkumavky***

Některé operace (dělení skupin iontů, zahřívání a j.) provádíme ve zkumavce (dlouhé, tenkostěné). Ve zkumavce pracujeme obvykle - pokud není v návodu uvedeno jinak - s objemy 1 - 2 ml (tj. cca 1 – 2 cm vrstva kapaliny). Zkumavky zahříváme buď přímo v plameni plynového kahanu, nebo na vodní lázni. Při zahřívání v plameni musíme dbát na některé zásady bezpečnosti. Sklo zkumavky jako špatný tepelný vodič se může lokálně přehřát a prasknout. Zahříváme proto vždy za současného intenzivního protřepávání obsahu zkumavky a jen po dobu několika sekund v plameni a potom zase několik sekund mimo plamen necháme teplo z ohřátého skla přejít na roztok vzorku. Destilující páry kondenzují v horní části zkumavky, kterou ohřejí. Nechceme-li si popálit prsty, použijeme zkumavkový držák. **Nikdy nemíříme ústím zkumavky na sebe nebo na jinou osobu,** ale vždy směrem do regálu. **Nikdy neohříváme hořlavé kapaliny přímo na plameni** (alkohol, benzen, kyselinu octovou), ale použijeme vodní lázeň. Vodní lázeň pro zahřívání zkumavek sestává z kádinky na 250 ml a kovové vložky pro zkumavky. Kádinka se naplní vodou a zahřívá se na síťce. Teplotu vody udržujeme blízko bodu varu. Vyvařenou vodu nezapomínat doplnit! Unikají-li toxické nebo dráždivé plyny či páry, provádíme zahřívání v digestoři se spuštěným odtahem.

Centrifugace slouží k oddělení sraženiny od roztoku odstředěním. Oddělení sraženiny se často urychlí zahříváním směsi, kdy dochází k tvorbě větších shluků pevné fáze (sraženina se sbalí). Skleněné centrifugační zkumavky jsou kónicky zúženy směrem ke dnu a směrem je zahřívát pouze na vodní lázni. Při zahřívání v plameni dochází k lokálnímu přehřátí spojenému s utajeným varem, jehož následkem obsah zkumavky vystřikuje a zkumavky snadno praskají. Vhodnější je nejprve připravit sraženinu v normální zkumavce (včetně zahřívání) a v centrifugační zkumavce provést pouze centrifugaci. Některé typy centrifug umožňují použití plastových centrifugačních zkumavek (tyto nezahříváme). Při centrifugaci vždy dbáme na **vyvážení centrifugy** druhou zkumavkou s přibližně stejným množstvím kapaliny (vody). Nevyvážená centrifuga vibruje a může se poškodit. Doba centrifugace se různí podle stupně koagulace sraženiny, její specifické hmotnosti a rychlosti otáčení. Obvykle několik minut (3 – 5) postačí k dobrému oddělení.

## ***Porcelánová miska a kelímek***

Obojí používáme k odpaření roztoku vzorku, případně k přežhánání odparku. Porcelán je křehký materiál který při větším teplotním šoku snadno praská. Zahřívání provádíme buď na vodní nebo vzdušné lázni, na síťce, nebo přímo v plameni. Při zahřívání přímo v plameni dbáme na pomalé a rovnoměrné ohřívání celého povrchu misky nebo kelímku. Kelímek vložíme do trianglu (tři keramické trubičky svázané drátem do rovnostranného trojúhelníku) a ten položíme na železný kruh, upevněný na stojanu. Rozžhavený kelímek při přemísťování uchopíme kleštěmi, jejichž hroty jsme předem nahřáli v plameni. Horký porcelán nikdy nepokládáme přímo na dlaždice stolu nebo na železný podstavec stojanu (prudkým ochlazením porcelán praská), ale pouze na azbestovou síťku. Porcelánové misky ohříváme v plameni jen výjimečně, držíme je v kleštích.

Vzdušnou lázeň realizujeme tak, že kelímek v trianglu, který leží na železném kruhu, nebo misku položenou přímo na železném kruhu umístíme nad síťku, ohřívanou plamenem kahanu. Mezi síťkou a dnem kelímku nebo misky zůstává mezera 1 - 2 cm.

## ***Platinový drátek***

Platinový drátek průměru 0,5 mm a délky několik cm je zataven ve skleněné tyčince. Používá se hlavně pro plamenové zkoušky. Platinový drátek při těchto zkouškách nejprve vyčistíme střídavým ponořením do koncentrované kyseliny chlorovodíkové a přežhánáním v plameni, dokud barví plamen. Při žhánání v plameni drátek nevnášíme nikdy do středního, modrého kužele plamene (hrozí vznik karbidu platiny, zkřehnutí drátku a jeho zlomení), ale vždy jen na okraj plamene či nad modrý kužel. Do plamene a stejně tak do zkoumaného vzorku vnášíme drátek maximálně do poloviny jeho délky, jinak hrozí přehřátí skleněné tyčinky a po následném ochlazení v kapalině její prasknutí a uvolnění drátku. Platinový drátek je snadno ohebný a může se zlomit, neponožujte jej proto až na dno zkumavek a uchovávejte jej v kádince otočené drátkem vzhůru. Při náhodném zlomení jej odevzdejte instruktorovi.

## ***Čištění laboratorního nádobí***

Použitá nádobí omyjeme pod tekoucí pitnou vodou a opláchneme destilovanou vodou. Zde platí, že opakovaný oplach menším množstvím vody je účinnější než naplnění nádoby a vylití. Spotřeba destilované vody v analytické laboratoři je velká, snažte se jí šetřit (nikoli však nemístně). Některé sraženiny jdou rozpustit ve vhodném činidle (HCl, NaOH), poté vždy následuje oplach pitnou a destilovanou vodou.

# Úloha č. 1 - Selektivní reakce kationů a anionů I ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ )

## ***Na<sup>+</sup>***

### *Důkaz v plameni*

Sodné soli barví plamen intenzivně žlutě, ve spektru pozorujeme žlutou čáru (ve skutečnosti dvojitou: 589,6 a 589,0 nm). Reakce je vysoce citlivá, nepatrné stopy  $\text{Na}^+$  stačí k zbarvení plamene (i plamenné reakce dalších iontů mohou být ovlivněny stopami sodných solí z použitých chemikálií). Žluté čáry pozorujeme ve spektru stále, sledování spektra v tomto případě nemá smysl.

Provedení: Vyčištěný platinový drátek (očko) namočíme do roztoku vzorku a vneseme do plamene. Přítomnost  $\text{Na}^+$  ve vzorku uvádíme pouze tehdy, je-li zbarvení plamene po několika sekundách jasně a svítivě žluté.

### *Mikroskopický důkaz s octanem uranylhořečnatým*

Koncentrovaný roztok octanu uranylhořečnatého v kyselině octové dává s  $\text{Na}^+$  málo rozpustnou, světle žlutou krystalickou sraženinu  $\text{NaMg}(\text{UO}_2)_3(\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Pod mikroskopem pozorujeme pomalou tvorbu charakteristických krystalů (stěny z rovnostranných trojúhelníků, některé krystaly připomínají svým tvarem židovskou hvězdu).

Ruší: Velký nadbytek  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , celá řada těžkých kovů,  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Lze je odstranit povařením 1 ml vzorku s přebytkem  $\text{MgO}$  a odstředěním. Neruší  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ .

Provedení: Na čisté podložní skličko kápneme 1 kapku čirého roztoku a přikápneme jednu kapku činidla. Po několika minutách (2 - 5) pozorujeme pod mikroskopem vzniklé krystaly. Současně překontrolujeme čistotu činidla slepým pokusem.

## ***K<sup>+</sup>***

### *Důkaz v plameni*

Přítomnost  $\text{K}^+$  ve vzorku se projeví světle fialovým zbarvením plamene. Ve spektru se projeví jen při větší intenzitě emitovaného světla slabá červená čára při 766 a 770 nm.

Ruší: Všechny ostatní ionty barví plamen, protože zbarvení plamene draslíkem je ze všech nejslabší. Intenzita zbarvení klesá v řadě: Na, Li, Ca, Ba, K. Nejvíce ruší intenzivní zbarvení sodíku, jehož žluté světlo se však dá do značné míry potlačit modrým kobaltovým sklem, přes které zbarvení plamene pozorujeme. Ve spektru není červená linie draslíku (pokud se objeví) ničím rušena.

Provedení: Vzhledem ke slabé intenzitě zbarvení plamene je vhodné pracovat s odparkem vzorku. Roztok v porcelánovém kelímku odpaříme do sucha a do vychlazeného kelímku přidáme 1 kapku konc.  $\text{HCl}$ . Vzniklou kašovitou hmotu nabíráme dobře vyčištěným Pt drátkem a vnášíme do plamene. Plamen pozorujeme přes kobaltové sklo (červenofialové zbarvení) a spektroskopem. Doporučuje se připravit si modelové vzorky obsahující: Na, K a směs Na + K a sledovat jejich zbarvení plamene přes kobaltové sklo.

### *Důkaz dipikrylamínem*

Vznik oranžově červené sraženiny v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Sraženina je zpočátku jemně krystalická a světlejší, časem se tvoří větší krystalky temnějšího zbarvení. Pod mikroskopem pozorujeme hexagonální krystalky, převažuje tvar pravidelného kosočtverce. Jako činidlo se používá vodný roztok sodné soli s přídavkem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Ruší:  $\text{NH}_4^+$  (vznik izomorfní sraženiny), kyselé prostředí (vznik žluté sraženiny dipikrylamínu),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , kationy těžkých kovů (sražejí se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  přítomným v činidle). Amonné soli odkouříme, ostatní rušení odstraníme přídavkem nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ke zkoumanému roztoku vzorku.

Provedení: Obsahuje-li vzorek  $\text{NH}_4^+$ , odpaříme 1 ml roztoku vzorku v porcelánové misce do sucha a odparek opatrně žháme přímo v plameni do slabě červeného žáru (misku držíme zahřátými kleštěmi). Po ochlazení

přidáme 1 ml destilované vody a 2 až 3 kapky nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a po přelití do centrifugační zkumavky odstředíme.

Na podložní skličko dáme 1 kapku čirého roztoku, přikápneme 1 kapku činidla a pozorujeme pod mikroskopem. Dobře vyvinuté krystalky vzniknou po 2 - 3 min. Pozor: krystalky obdélníkového tvaru na okraji kapky vznikají krystalizací samotného činidla odpařováním vody, nezaměňovat s pozitivní reakcí!

## $\text{NH}_4^+$

### *Důkaz Nesslerovým činidlem*

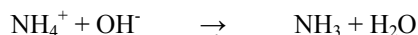
Nesslerovo činidlo je roztok tetrajodortuřnatanu v NaOH. V alkalickém prostředí vzniká s amoniakem hnědá sraženina, obsahující skupiny -I a  $-\text{NH}_2$  kolísavého složení. Reakce je velmi citlivá, už stopy  $\text{NH}_4^+$  nebo  $\text{NH}_3$  dávají žluté zbarvení.

Ruší: Všechny kationy, které se srážejí v alkalickém prostředí. V jejich přítomnosti provedeme důkaz  $\text{NH}_4^+$  v plynné fázi jako  $\text{NH}_3$ .

Provedení: 1 kapka roztoku vzorku + 1 kapka roztoku činidla. Pozorujeme vznik hnědé sraženiny .

### *Důkaz jako $\text{NH}_3$ v plynné fázi*

Plynný  $\text{NH}_3$  se uvolňuje z roztoku  $\text{NH}_4^+$  v alkalickém prostředí:



Zahříváním roztoku vzorku po zalkalizování uniká plynný  $\text{NH}_3$ , který dokážeme indikačním pH papírkem nebo Nesslerovým činidlem.

Provedení: 3 kapky roztoku vzorku a 3 kapky 10% NaOH zahříváme opatrně v porcelánovém kelímku na síťce. Kelímek je zakrytý kouskem filtračního papíru s 1 kapkou Nesslerova činidla. V přítomnosti  $\text{NH}_4^+$  zbarví unikající amoniak vlhkou skvrnu na filtračním papíru do hněda (papír nesmí vyschnout, vlhčit destilovanou vodou), ovlhčený pH papírek zmodrá.

## $\text{Mg}^{2+}$

### *Důkaz magnezonem*

Čerstvě srážený hydroxid hořečnatý se vybarvuje některými barvivy velmi charakteristicky. Magnezon (4-nitrobenzenazorezorcín nebo 4-nitrobenzenoazo-1-naftol) tvoří s  $\text{Mg}^{2+}$  v alkalickém prostředí modrý chelát, který je stabilizován adsorpcí na  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ .

Ruší: velký nadbytek amonných solí a kationy "těžkých kovů". V přítomnosti velkého nadbytku solí  $\text{NH}_4^+$  se snižuje citlivost reakce a proto je nutno tyto soli odkouřit. Při vyšší koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  se alkalickým hydroxidem sráží  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , jehož bílá sraženina se v nepřítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  vybarví magnezonem fialově a může se tím ztížit rozhodování. Kationy "těžkých kovů" tvoří samy barevné hydroxidy nebo se jejich hydroxidy též vybarvují činidlem (např.  $\text{Cd}^{2+}$ ). Odstraní se čerstvě připraveným sulfidem amonným.

Provedení: 1 kapka roztoku vzorku + 1 kapka činidla + 1 - 2 kapky 10% NaOH . V přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  vznikne chrpově modrá sraženina. Souběžně provádíme slepý pokus: v nepřítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  původně žlutý roztok po zalkalizování změni barvu na fialovou (roztok zůstane čirý).

Obsahuje-li vzorek "těžké kovy" (vznik sraženiny nebo zákalu s čerstvě připraveným sulfidem amonným) přidáváme k 1 ml roztoku vzorku po kapkách roztok sulfidu amonného, odstředíme a čirý a bezbarvý roztok (kontrola úplnosti srážení!) použijeme pro důkaz  $\text{Mg}^{2+}$ .

## $\text{Ca}^{2+}$

### *Důkaz v plameni*

Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  barví plamen cihlově červeně. V přítomnosti chloridů se přechodně tvoří těkavější  $\text{CaCl}_2$ , který se projeví v plameni jasnějšími karmínově červenými záblesky (záměna s Li možná!) bezprostředně po vnesení vzorku do plamene. S určitým zpožděním se objeví méně výrazné cihlově červené zbarvení plamene,

kteře ve spektru vykazuje dva pásy: červený při 620 nm a zelený při 554 nm. Charakteristické je, že se oba pásy objevují a mizí současně.

Ruší: Na a Li mnohem intenzivnějším zbarvením plamene, které překryje zbarvení Ca. Ve spektru může kombinace Li+Ba předstírat přítomnost Ca, ovšem jasná a mnohem užší červená linie Li se neobjevuje a nemizí současně se zelenými liniemi Ba.

#### *Důkaz kyselinou šťavelovou*

Vznik bílé krystalické sraženiny šťavelanu vápenatého v slabě kyselém prostředí nadbytku kyseliny šťavelové.

Ruší: většina kationů "těžkých kovů", neruší  $Ba^{2+}$  a alkalické kovy.

Provedení: 1 kapka roztoku vzorku + 1 kapka roztoku kyseliny šťavelové - vznikne bílá krystalická sraženina. Provádíme na skleněné kapkovací desce. Sraženina, tvořená většími krystalky, je často špatně postřehnutelná. Jsou-li ve vzorku přítomny kationy "těžkých kovů", odstraníme je pomocí MgO.

### **$SO_4^{2-}$**

#### *Důkaz $Ba^{2+}$ nebo $Sr^{2+}$ solí*

Vznik bílé krystalické sraženiny nerozpustné ve zředěných kyselinách. Konverze na jiné sloučeniny je možná pouze na suché cestě, např. redukcí kovovým hořčíkem nebo sodíkem při vyšších teplotách na BaS nebo SrS. Vzniklý sulfid (vzniká ze všech sloučenin síry!) se potom dokáže např. zčernáním stříbrného plíšku nebo nitroprusidem.

Ruší:  $S_2O_3^{2-}$  pomalým vylučováním síry po okyselení. Vznikne bílý koloidní roztok, který znemožňuje pozorování tvorby bílé sraženiny  $BaSO_4$ .

Provedení: K 1 kapce roztoku vzorku přidáme 1 kapku 2 M HCl a 1 kapku 0,05 M  $BaCl_2$ . Vznik bílé sraženiny nebo zákalu dokazuje přítomnost  $SO_4^{2-}$ .

### **$PO_4^{3-}$**

#### *Důkaz molybdenanem*

Vznik žluté sraženiny (přechodně i žlutý roztok), nejlépe za horka, proměnlivého složení, obvykle  $(NH_4)_3P(Mo_3O_{10})_4 \cdot xH_2O$  v přítomnosti  $NH_4^+$  a v prostředí  $HNO_3$  (nebo jiné minerální kyseliny).

Provedení: K 1 ml roztoku vzorku ve zkumavce přidáváme 2 M  $HNO_3$  do kyselé reakce (1 ml) a potom přidáme 1 ml molybdenanového činidla. V přítomnosti fosforečnanů vznikne žlutá sraženina. Při nižších koncentracích fosforečnanu vzniká sraženina až po několikaminutovém zahřívání (např. na vodní lázni).

### **Cl**

#### *Důkaz Denigesovým činidlem*

V prostředí konc.  $H_2SO_4$  se chloridy oxidují manganistanem na chlor, který uniká z reakční směsi a zachycuje se v kapce NaOH. Vzniklý chlornan oxiduje anilin a fenol na modrý indamin a indofenol.

Ruší: velký nadbytek redukujících látek (též  $Br^-$  a  $I^-$ ). Unikající páry bromu či jodu vybarví *suchou* část papíru hnědě či fialově a mohou tím znesnadnit pozorování modrého zbarvení. Proto vlhčíme papír 1 M NaOH, který  $Br_2$  i  $I_2$  odbarví.

Provedení: Do porcelánového kelímku dáme 1 ml konc.  $H_2SO_4$ , několik krystalků pevného  $KMnO_4$ , přidáme 5 kapek roztoku vzorku a kelímek ihned zakryjeme kouskem filtračního papíru, ovlhčeného 1 kapkou 1 M NaOH a 1 kapkou Denigesova činidla (vodný roztok čerstvě destilovaného fenolu a anilinu). V přítomnosti chloridů se vlhká část papíru vybarví modře. Při nižším obsahu chloridů kelímek opatrně zahříváme a dbáme na to, aby filtrační papír nevyschl (přikápnutím 1 M NaOH).

### *Důkaz tvorbou chromylchloridu*

V bezvodém prostředí konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se z dichromanu tvoří těkavý červenohnědý  $\text{CrO}_2\text{Cl}_2$ , který jako chlorid kyseliny chromové ve vodě snadno hydrolyzuje na  $\text{H}_2\text{CrO}_4$  a  $\text{HCl}$ .

Ruší:  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  vznikem  $\text{NOCl}$ , který spotřebovuje chloridy a důkaz má negativní výsledek. Negativní výsledek dávají i nerozpustné nebo nedisociované chloridy, např.  $\text{AgCl}$  a  $\text{HgCl}_2$ . Červené nebo hnědofialové dýmy  $\text{Br}_2$ ,  $\text{NO}_2$  a  $\text{I}_2$  neruší, protože po zachycení v roztoku  $\text{NaOH}$  se odbarví.

Provedení: 1 ml roztoku vzorku odpaříme v porcelánovém kelímku, k odparku přidáme špetku pevného  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 5 kapek konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Kelímek ihned přikryjeme kouskem filtračního papíru navlhčeného 1 - 2 kapkami 1 M  $\text{NaOH}$  a opatrně zahříváme na vzdušné lázni. Přítomnost chloridů se projeví tvorbou červených dýmů, které vybarví *vlhký* papír do žluta (papír stále vlhčíme 1 M  $\text{NaOH}$ ).

## **$\text{NO}_3^-$**

### *Důkaz difenylaminem*

Oxidační činidla oxidují difenylamin v kyselém prostředí na modré oxidační produkty, které však nejsou stálé a přecházejí přes fialové zbarvení do špinavě hnědé sraženiny. Kyselina dusitá má už ve slabě kyselém prostředí oxidační účinky, zatímco kyselina dusičná až ve značně koncentrovaném stavu. Důkaz  $\text{NO}_3^-$  difenylaminem musíme proto provádět v silně kyselém a vodu odnímajícím prostředí konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Ruší: veškerá oxidační činidla, např.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  aj. Částečně ruší i  $\text{I}^-$  (konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  uvolňuje červenohnědý  $\text{I}_2$ ).

Provedení: Do čisté zkumavky dáme 1 kapku roztoku vzorku a otáčením zkumavky smočíme co největší povrch vnitřní stěny zkumavky. V blízkosti ústí zkumavky kápneme 1 kapku roztoku difenylaminu v konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pozor, žíravina! chránit oči brýlemi) a sledujeme její stopu při stékání uvnitř zkumavky. V místě styku s roztokem vzorku se vytváří modrá stopa, která po chvíli změní zbarvení. Pozor, při přidávání roztoku difenylaminu se nedotýkejte kapátkem stěny zkumavky – zkontaminujete celý obsah lahvičky s difenylaminem.

### *Důkaz tvorbou azobarviva po redukci na $\text{NO}_2^-$ zinkem*

V prostředí kyseliny octové se dusičnany redukují práškovým zinkem na dusitany, které se dokáží diazotační a kopulační reakcí za vzniku azobarviva.

Ruší:  $\text{NO}_2^-$ , odstraní se močovinou v prostředí zředěné  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Provedení: Kapku roztoku vzorku na porcelánové kapkovací desce okyselíme 1 kapkou konc. kyseliny octové a přidáme na špičku lopatičky prachového zinku. Foukáním přes pipetku promícháme a přidáme 1 - 2 kapky roztoku kyseliny sulfanilové, 1 kapku roztoku kyseliny chromotropové a zalkalizujeme 1 M  $\text{NaOH}$ . Jasně červené zbarvení dokazuje  $\text{NO}_3^-$  ve vzorku (v nepřítomnosti  $\text{NO}_2^-$ ).



## Úloha č. 2 - Selektivní reakce kationů II ( $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ )

### $\text{Pb}^{2+}$

#### *Důkaz kyselinou sírovou*

Ionty  $\text{SO}_4^{2-}$  způsobují tvorbu hutné bílé sraženiny  $\text{PbSO}_4$ . Jako srážecí činidlo je nejvhodnější 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Síran olovnatý je rozpustný v nadbytku  $\text{NaOH}$  (rozdíl od  $\text{BaSO}_4$ ). Přídavkem sulfidu amonného bílá sraženina zčerná za vzniku  $\text{PbS}$  ( $\text{BaSO}_4$  zůstane bílý).

Ruší:  $\text{Ba}^{2+}$  tvoří také bílou sraženinu, která však nedává uvedené reakce.  $\text{Pb}^{2+}$  můžeme oddělit od  $\text{Ba}^{2+}$  např. 2 M  $\text{HCl}$  (vznikne bílá sraženina  $\text{PbCl}_2$ ) nebo 2 M  $\text{NH}_3$  (vznikne bílá sraženina  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ).

Provedení: K 1 kapce roztoku vzorku přidáme 1 - 2 kapky 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Vznikne, vzniká bílá sraženina, která přídavkem 1 kapky sulfidu amonného zčerná, nebo přídavkem několika kapek 10%  $\text{NaOH}$  se rozpustí. Provádíme na skleněné kapkovací desce.

#### *Důkaz chromanem draselným*

Vznik žluté sraženiny  $\text{PbCrO}_4$ , rozpustné ve 20 %  $\text{NaOH}$  (na rozdíl od  $\text{BaCrO}_4$ ).

Ruší: celá řada kationů tvorbou žlutých až hnědých sraženin. Srážením 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vyloučíme  $\text{PbSO}_4$  a  $\text{BaSO}_4$  ze vzorku a konverzí s  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  získáme žlutý  $\text{PbCrO}_4$  ( $\text{BaSO}_4$  nereaguje).

Provedení: Ke 3 kapkám vzorku přidáme po kapkách 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  až do úplného vysrážení, odstředíme a sraženinu promyjeme cca 1 ml 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ke sraženině přilijeme promývací kapalinu, roztřepeme, odstředíme a odlijeme) a ještě destilovanou vodou, ke které přidáme 2 - 3 kapky 1 M octanu sodného. Po odstředění slijeme promývací vodu, ke sraženině přidáme 5 kapek 5 %  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , sraženinu zvíříme a zahříváme několik minut na vodní lázni. Po opětovném odstředění žlutá sraženina dokazuje přítomnost  $\text{Pb}^{2+}$ . V přítomnosti většího množství  $\text{Ba}^{2+}$  je sraženina pouze zřetelně nažloutlá, proto použijeme v tomto případě konverzi na  $\text{PbS}$ .

### $\text{Cu}^{2+}$

#### *Důkaz kyanoželeznatanem*

Vznik červenohnědé sraženiny proměnlivého složení (převládá  $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a  $\text{Cu}_2\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) v neutrálním nebo slabě kyselém prostředí. Sraženina se snadno rozpouští ve zředěných minerálních kyselinách a v amoniaku.

Ruší:  $\text{Fe}^{3+}$  - vznik intenzivně zbarvené berlínské modři. Rušení lze odstranit amoniakálním dělením. Barevné sraženiny s  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  dávají i některé jiné kationy (např.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ), důkaz  $\text{Cu}^{2+}$  však ruší jen při velkém přebytku.

Provedení: k 5 kapkám roztoku vzorku přidáme konc.  $\text{NH}_3$  do zřetelného přebytku (je cítit amoniak), směs odstředíme. Vznik modrého roztoku svědčí o přítomnosti mědi (možnost záměny s  $\text{Ni}^{2+}$ !). K 1 kapce tohoto roztoku na porcelánové kapkovací desce přidáme konc. kyselinu octovou do světle modrozeleného zbarvení a 1 kapku  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . V přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  vznikne červenohnědá sraženina.

#### *Důkaz diethyldithiokarbaminem (kupralem)*

Vzniká hnědá sraženina chelátu 1 : 2 v neutrálním, kyselém i alkalickém prostředí. Ve vodě nerozpustný chelát se dobře rozpouští v chloroformu, izoamylalkoholu a jiných organických rozpouštědlech.

Ruší: málo rozpustné cheláty vznikají s velkým počtem prvků. Provedeme-li reakci s amoniakálním výluhem v přítomnosti EDTA, vzniká hnědý chelát, extrahovatelný do  $\text{CHCl}_3$ , pouze s  $\text{Cu}^{2+}$ .

Provedení: Amoniakální výluh získáme jako v předchozím důkazu. Ke 2 kapkám tohoto roztoku přidáváme po kapkách 0,1 M EDTA do změny modrofialového zbarvení na světle blankytně modré. Přidáme několik krystalů pevného kupralu a protřepeme. Vznikne hnědá sraženina, která po přídavku 1 ml  $\text{CHCl}_3$  a protřepání se v něm rozpustí na hnědý roztok. Provádíme ve zkumavce.

## **Al<sup>3+</sup>**

### *Důkaz alizarinem S (1,2-dihydroxyantrachinon-3-sulfonan)*

Vznik červeného chelátu AIL, povrchově adsorbovaného na sraženinu Al(OH)<sub>3</sub> v amoniakálním prostředí. Tato sraženina je nerozpustná ve zředěné kyselině octové (v tomto prostředí se však nesráží, vzniká pouze cihlově červený roztok chelátu). Činidlo je acidobazický indikátor, v kyselém prostředí je žluté, v alkalickém fialové.

Ruší: Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> aj. Oddělíme je pomocí NaOH.

Provedení: K 1 ml 1 M NaOH přidáme 10 kapek roztoku vzorku. Z hlinitých solí vzniká přechodně hydroxid hlinitý, který se však v přebytku hydroxidu rozpouští na hlinitan. Rušící kationy se vysráží – jsou-li přítomny, po protřepání se směs odstředí. Na porcelánovou kapkovací desku se nanese 1 kapka čirého alkalického roztoku, přidá se 1 kapka činidla a přikapává se 2 M CH<sub>3</sub>COOH až se fialové zbarvení změní: v přítomnosti Al<sup>3+</sup> na cihlově červené, slepý pokus má žluté zbarvení.

## **Fe<sup>3+</sup>**

### *Důkaz thiokyanatanem*

V kyselém prostředí vznikají intenzivně červeně zbarvené rozpustné komplexy FeNCS<sup>2+</sup> vedle Fe(NCS)<sub>2</sub><sup>+</sup>.

Ruší: F<sup>-</sup> v nadbytku - maskovací činidlo.

Provedení: Na kapkovací desce se k 1 kapce kyselého roztoku vzorku přidá 1 kapka 20 % thiokyanatanu amonného. V přítomnosti Fe<sup>3+</sup> vznikne intenzivně červené zbarvení.

### *Důkaz kyanoželeznatanem draselným*

V kyselém prostředí vzniká sraženina nebo koloidní roztok berlínské modři.

Ruší: Cu<sup>2+</sup> ve velkém nadbytku.

Provedení: Na kapkovací desce se přidá k 1 kapce roztoku vzorku po 1 kapce konc. HCl a 10 % K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. V přítomnosti Fe<sup>3+</sup> vznikne modrá sraženina.

### *Důkaz kyselinou 5-sulfosalicylovou*

Při pH 1 - 2 vzniká v nadbytku činidla fialový rozpustný chelát.

Ruší: F<sup>-</sup>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - (maskovací činidla).

Provedení: Na kapkovací desce se k 1 kapce kyselého roztoku vzorku přidají krystalky pevného činidla. V přítomnosti Fe<sup>3+</sup> vzniká fialové nebo červené zbarvení.

## **Mn<sup>2+</sup>**

### *Důkaz oxidací na MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> jodistanem*

Oxidace probíhá v kyselých roztocích za horka a vzniká fialový MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Reakce je velmi citlivá a musí se provádět se zředěným roztokem vzorku. Při vyšších koncentracích a nižší aciditě vzorku vzniká hnědá sraženina MnO<sub>2</sub> (burel).

Ruší: Cl<sup>-</sup> v nadbytku

Provedení: 1 kapku roztoku vzorku zředíme ve zkumavce cca 2 ml dest. vody a obsah zkumavky vylijeme. Ulpívající kapky na stěnách zkumavky postačují na důkaz. Přidáme 2 ml 2 M HNO<sub>3</sub>, na špičku lopatičky pevný KIO<sub>4</sub> a zahříváme k varu. Po několika minutách se v přítomnosti Mn<sup>2+</sup> roztok začne barvit fialově. Pokud se zbarvení neobjeví ani po několika minutách, přidáme další KIO<sub>4</sub> a dále zahříváme. Pozor na záměnu se slabě růžovým zbarvením Co<sup>2+</sup>.

## **Zn<sup>2+</sup>**

### *Důkaz kyanoželeznatanem*

V prostředí 1 M HCl vzniká sraženina kyanoželeznatanů zinečnatých s proměnlivým obsahem draselných iontů, která je teoreticky bílá. Ve žlutém roztoku nadbytečného kyanoželeznatanu se však jeví žlutě a v přítomnosti Fe<sup>3+</sup> (vznik berlínské modři ze znečištění chemikálií stopovými obsahy Fe) v konečném efektu pozorujeme obvykle žlutozelenou sraženinu. Sraženina je nerozpustná v 20 % HCl.

Ruší: Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>. Odstraníme dělením v 1 M NaOH.

Provedení: K 2 ml 1 M NaOH ve zkumavce přidáme 0,5 ml roztoku vzorku, po protřepání směs krátce povaříme, odstředíme (obsahuje-li sraženinu) a čirý roztok opatrně slijeme. K roztoku přidáme stejný objem konc. HCl, 1 M octanu sodného a činidla. Vznik žlutozelené sraženiny nebo zákalu dokazuje přítomnost zinku. V nepřítomnosti Zn<sup>2+</sup> vznikne *čirý* žlutozelený roztok (slepý pokus nutný, provádíme ve zkumavce).

## **Co<sup>2+</sup>**

### *Důkaz thiokyanatanem*

Vznik modrého rozpustného komplexu [Co(NCS)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> s nadbytkem činidla. Komplex se extrahuje do polárních kyslíkatých rozpouštědel (např. do izoamylalkoholu).

Ruší: Fe<sup>3+</sup> (maskuje se F<sup>-</sup> za vzniku bezbarvého rozpustného komplexu), Cu<sup>2+</sup> tvoří hnědou sraženinu (v nadbytku NH<sub>4</sub>SCN se však daří vyextrahovat do izoamylalkoholu modrý Co - komplex).

Provedení: K 1 kapce neutrálního nebo slabě alkalického roztoku vzorku přidáme několik zrníček NH<sub>4</sub>SCN (v přítomnosti Fe<sup>3+</sup> přidáváme pevný NaF do odbarvení intenzivního červeného zbarvení za míchání opatrným foukáním přes pipetku, zabránit nadbytku NaF) a 2 kapky izoamylalkoholu. Foukáním přes pipetku se v přítomnosti Co<sup>2+</sup> modré zbarvení extrahuje do vnější organické fáze.

### *Důkaz 1-nitroso-2-naftolem*

Vznik červenohnědé sraženiny chelátu CoL<sub>3</sub> v neutrálním, slabě kyselém nebo amoniakálním prostředí. Vyloučená sraženina se nerozpouští v 10 % HCl.

Ruší: Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>. Jejich cheláty se však v 10 % HCl rozloží.

Provedení: Na filtrační papír se kápne 1 kapka roztoku vzorku, 1 kapka 1 M octanu sodného a 1 kapka činidla. Po chvíli se přidá 1 kapka 10% HCl. V přítomnosti Co<sup>2+</sup> zůstává hnědočervená skvrna na papíře (srovnávací pokus s Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> se doporučuje).

## **Ni<sup>2+</sup>**

### *Důkaz diacetyldioximem*

V amoniakálním prostředí vzniká růžově červená sraženina chelátu Ni(DH)<sub>2</sub>.

Provedení: K 1 ml 2 M NH<sub>3</sub> přidáme 3 kapky roztoku vzorku a po protřepání odstředíme. Čirý roztok slijeme a přidáme k němu 1 - 2 kapky činidla. V přítomnosti Ni<sup>2+</sup> vzniká růžově červená sraženina. Důkaz můžeme provést i na filtračním papíře: K 1 kapce roztoku vzorku se přidají 2 kapky roztoku činidla a papír se okouří amoniakem (nad hrdlem lahvičky s konc. NH<sub>3</sub>). Objeví se růžová skvrna, která se nedá spláchnout pod tekoucí vodou.

# Kvantitativní analýza – základní operace

Kvalitativní analýza neznámých vzorků je jen jednou z oblastí analytické chemie. Stěžejní činností analytického chemika je kvantifikace známých složek, zjištění jejich obsahu ve vzorku, tedy **kvantitativní analýza**. V souvislosti s vlastnostmi a charakterem **analytu** (tedy látky stanovované) a **vzorku** (hmota, v níž stanovovanou látku hledáme) je využívána celá řada metod analytické chemie k tomu, aby stanovení svými metrologickými vlastnostmi (správnost, přesnost, mez stanovitelnosti, opakovatelnost aj.) vyhovovalo požadavkům zadavatele analýzy a tedy i uživatele výsledků.

Moderní analytická chemie využívá řadu metod na rozličných fyzikálně-chemických principech, nicméně u všech se setkáváme se základními činnostmi, jako je vážení, odměřování objemu, ředění roztoků, kalibrace přístroje apod. S těmito základními operacemi (nejen) analytické chemie se setkáte také ve své praxi biologické, fyzikální či v ostatních oblastech chemie. Vzhledem k tomu, že kvalita výsledků vaší práce je mimo jiné závislá také na přesnosti a správnosti prováděných základních analyticko-chemických operací, je tato úloha zaměřena právě na získání správných návyků při vážení a odměřování objemu pipetou, byretou a odměrnou baňkou. Využijete je ve všech následujících úlohách kvantitativní analytické chemie a věříme, že vám napomohou i ve vašem dalším profesním životě.

## Váhy a vážení

### *Analytické váhy*

Analytické váhy patří k základnímu vybavení každé analytické laboratoře. Je to velmi jemné a citlivé zařízení, proto musíme analytické váhy chránit především proti otřesům, prachu, vlhkosti, před agresivními látkami, které způsobují korozi kovových částí vah, a proti změnám teploty. Proto bývají umístěny v samostatné místnosti (váhovně) na masivních konzolách upevněných na nosné zdi. Ve váhovně se udržuje konstantní teplota a nesmí se tam manipulovat ani s vodou či jinými látkami, uvolňujícími agresivní páry. Analytické váhy mohou být různé konstrukce, od nejstarších dvoumiskových vah s ručním přidáváním závaží přes váhy jednomiskové s analogovou stupnicí až po nejmodernější váhy digitální. I přes zjednodušující se obsluhu těchto zařízení jsou to vždy přístroje velmi citlivé a jemné a proto je nanejvýš vhodné se k nim také tak chovat. Analytické váhy jsou konstruovány tak, aby byly schopny vážit s přesností na 0,1 mg. Všechny hmotnosti, získané vážením na analytických vahách, tedy budou uváděny (v gramech) na 4 desetinná místa. Pokud je na posledním místě nula, je nutno ji tam také uvést.

V našich laboratořích se používají vesměs poloautomatické dvoumiskové váhy s tlumenými kyvy. Vahadlo je opatřeno třemi achátovými břity, které spočívají na achátovém ložisku. Ostrost břitů má bezprostřední vliv na citlivost vah, limituje mez važitelnosti a reprodukovatelnost vážení, proto se břity chrání aretací. Aretace je oddálení břitů od svého ložiska (achátové destičky) mechanickým nadzvednutím vahadla a závěsů misek po dobu, kdy se neváží. Aretace se ovládá knoflíkem uprostřed báze vah. Váhy jsou chráněny před prachem a vzdušným prouděním během vážení prosklenou, uzavíratelnou skříňkou. Ve středu vahadla pod středním břitem je upevněn jehlový ukazatel. Na jeho spodním konci je umístěna značka, která se optickým zařízením promítá na osvětlenou stupnici (+ 100 dílků nalevo a - 100 dílků napravo od středové nulové polohy). Stupnicí lze pohybovat otáčením knoflíku napravo od stupnice. Číslice na stupnici odpovídají miligramům, jednotlivé dílky desetinám miligramu.

Poloautomatické váhy mají na závěsu pravého ramene vahadla zařízení, které umožňuje zavěšovat kroužková zlomková závaží (10 - 990 mg). Zařízení se ovládá knoflíkem (10 - 90 mg) a mezikružím (100 - 900 mg) v pravém horním rohu skříňky. Na pravou misku vah se kladou jen gramová závaží (pomocí pinzety s umělohmotnými nebo mosaznými špičkami). Závaží jsou mosazná, pochromovaná a jsou umístěna v příslušné sádce podle schématu: 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 a 100 g. Na levou misku se klade vážený předmět. Vzduchové tlumiče pod závěsy misek umožňují rychlé, aperiodické ustálení rovnovážné výchylky.

### *Technické váhy*

Technické jednomiskové váhy slouží k rychlému odvažování činidel nebo k rychlému určení hmotnosti s přesností na 0,1 g. S výhodou se používají jako tzv. předvážky pro urychlení jinak zdlouhavého vyvažování na analytických vahách. Na osvětlené stupnici odečítáme celé gramy (udané číslici) a desetiny gramů (jednotlivé dílky). Před vlastním vážením zkontrolujeme nulovou polohu stupnice a případně ji korigujeme knoflíkem vpravo od stupnice. Osvětlení stupnice se zapíná knoflíkem na levé straně vah otáčením dozadu (transformátor pro napájení žárovky osvětlení musí být připojen na síťové napětí). Osvětlení stupnice zapínáme jen po dobu vážení!

## Postup při vážení

Na předvážkách nejprve určíme hmotnost váženého předmětu (váženky, kelímku ap.) s přesností na desetiny gramu a hmotnost si poznamenáme. Vybereme si analytické váhy a na těchto vahách provádíme **obojí vážení**: většina vážení má totiž diferenční charakter - napřed zvážíme nádobku a potom nádobku s látkou; hmotnost vážené látky určíme jako rozdíl obou vážení. Použijeme-li v obou případech stejné váhy a stejná závaží, kompenzují se do značné míry chyby, způsobené nepřesností závaží. U každých analytických vah je kartička, do které zapíšeme požadované údaje: datum, studijní obor a jméno. Překontrolujeme, jsou-li váhy připojeny na síť, dále jsou-li misky vah prázdné a je-li knoflík zařízení pro navěšování zlomkových závaží (kroužků) v nulové poloze. Provedeme odaretování vah **opatrným** otáčením knoflíku doleva, při tom se rozsvítí stupnice a sledujeme čárkovou značku na stupnici. Značka nesmí **nikdy** opustit stupnici, jinak hrozí poškození vah! Vyčkáme ustálení polohy značky (v blízkosti středu stupnice) a knoflíkem vpravo posuneme stupnici tak, aby se střed stupnice (nulová poloha) přesně kryl se značkou. Nepodaří-li se nám takto nastavit nulovou polohu, informujeme instruktora. Váhy opět **opatrně** zaaretujeme, otevřeme levá dvířka, na levou misku položíme vážený předmět a dvířka opět zavřeme. Po otevření pravých dvířek dáme na pravou misku pomoci pinzety příslušná gramová závaží podle hmotnosti, zjištěné na předvážkách, a dvířka zavřeme. Navěsíme ještě odpovídající zlomková závaží **pomalým** otáčením vnějšího knoflíku (mezikruží). Váhy zvolna odaretujeme, ale **ne úplně!** Pozorně sledujeme pohyb značky, která nesmí opustit stupnici. Nachází-li se značka v levé části stupnice, váhy zaaretujeme a otáčením vnitřního knoflíku přidáváme setiny gramu, až se značka ustálí uvnitř stupnice. V opačném případě musíme nejprve ubrat desetiny gramu a dále postupovat stejným způsobem. Teprve zůstává-li značka uvnitř stupnice, můžeme váhy **plně** odaretovat. Po ustálení polohy značky odečítáme hmotnost: celé gramy udávají závaží na misce, desetiny a setiny gramu odečteme z polohy příslušných knoflíků zařízení pro navěšování zlomkových závaží. K tomuto číslu připočteme miligramy a desetiny miligramů, odečtené ze stupnice, a to se znaménkem +, je-li značka v levé části stupnice, nebo se znaménkem -, je-li značka napravo od nuly. V tomto případě je výhodnější přesunout značku do levé části stupnice pootočením vnitřního knoflíku o jednu hodnotu zpět. Po odečtení hmotnosti (a zapsání do pracovního deníku) váhy zaaretujeme, odstraníme vážený předmět i závaží a oba knoflíky kroužkových závaží **pomalou** otočíme do nulové polohy. Než opustíme váhy, přesvědčíme se kontrolou nulové polohy, že všechna závaží byla odstraněna a na misku nebylo nic usypáno.

Navazování látek provádíme zpravidla na předvážkách. Ve většině případů nemusíme mít odváženo přesně spočítané nebo zadané množství chemikálie či vzorku – přesně známou hmotnost dokážeme přepočítat na koncentraci apod. (zpravidla v návodech uvádíme, že „odvážíme přesně asi X g látky“ – tzn. nemusí být přesně spočítané množství, ale musíme vědět přesně, kolik je odváženo). Do přesně zvážené nádoby (na analytických vahách) přidáváme na předvážkách pomocí lopatičky vypočítané množství látky s přesností na 0,1 g a na analytických vahách zjistíme přesnou hmotnost. Pouze v případě, že musíme navážit přesně určité množství látky, musíme použít časově velmi náročný postup navazování přímo na analytických vahách.

Při vysypání navazované látky na misku vah musíme ji ihned po skončení vážení vymést pomocí vlasového štětečku napřed z misky (misku přitom opatrně přidržujeme) a potom ze skříňky. A opět zkontrolujeme nulovou polohu.

## Desatero pravidel pro vážení:

1. Analytické váhy používáme **pouze pro přesná vážení** (s přesností na 0,1 mg). Maximální zatížení analytických vah je 200g. V ostatních případech používáme technických vah (předvážek).
2. S výjimkou okamžiku vlastního vážení (odečítání polohy značky na světelné stupnici) musí být váhy **stále zaaretovány**.
3. Aretačním knoflíkem a knoflíkem i mezikružím pro zavěšování zlomkových závaží otáčíme **pomalou a s citem**. Prudší pohyb může způsobit poškození vah (vyhození vahadla a závěsů misek z aretačního zařízení a poškození břitů resp. shoení či "vystřelení" kroužkových závaží ze zavěšovacího mechanismu).
4. Dvířka vah otevíráme **pouze při vkládání** váženého předmětu (závaží) na misky a při jejich odstraňování.
5. Vážené předměty musí mít **teplotu místnosti**. Horké předměty necháme vychladnout v exsikátoru.
6. Závaží ani vážené předměty **nebereme do ruky**. Závaží přenášíme **výhradně pinzetou**, kelímky pomocí kleští. Váženky lze výjimečně uchopit špičkami prstů za jazýček po dobu nezbytně nutnou.
7. Při diferenčním vážení používáme zásadně **stejně váhy a stejná závaží**.
8. Odvažované látky se **nikdy nedávají přímo na misky**, ale použijí se vhodné nádoby (váženky, lodičky, hodinové sklíčko, kádinka ap.). Misky vah musí být stále čisté (hrozí koroze), usypané látky se ihned po vážení odstraní štětečkem z misky i ze skříňky.
9. Veškeré **závady se ihned nahlásí** instruktorovi.
10. Ve váhově **udržujeme čistotu a pořádek**. Jakékoliv ořesy nebo nárazy poškozují váhy a ruší při vážení. Do váhově se nesmějí přinášet žádné roztoky a těkavé látky.

## Odměrné nádoby, odměřování objemů

Základní operací v odměrné analýze je odměřování objemů, což je obdoba určování hmotnosti ve vázkové analýze. K odměřování objemů používáme v analytické chemii kalibrovaného nádobí. Pro přípravu roztoků o přesné koncentraci používáme *odměrné baňky*, pro přesné odměřování objemů *pipety* a konečně pro přesné měření spotřeby odměrných roztoků při titraci *byrety*. K méně přesnému nebo přibližnému odměřování objemů slouží *odměrné válce* (roztoky pomocných činidel, jako jsou kyseliny či pufrы k úpravě prostředí pro titraci, není nutno přesně odměřovat pipetováním!). Odměrné nádoby je kalibrováno podle způsobu měření buď na *dolítí*, t.j. po doplnění odměrné nádoby (odměrná baňka) po značku je uvnitř nádoby vyznačený objem, nebo na *vylití*, t.j. vyteklý objem odpovídá přesně vyznačenému objemu. Přitom ulpí vlivem smáčivosti na stěnách nádoby (pipety, byrety) určité množství kapaliny ve formě tenkého filmu a též ve výtokové špičce (pipety) zůstane malé množství kapaliny a obě tato množství *nepatří* k odměřenému objemu. Kalibrace na dolítí je vyznačena zkratkou "In", kalibrace na vylití zkratkou "Ex". Spolu s tímto označením je na nádobí uvedena teplota odměřovaného roztoku, pro kterou platí tato kalibrace, u novějšího skla zpravidla 20°C. Nádoby kalibrované na dolítí nelze použít k odměření objemu vylitím (na stěnách nádoby zůstane nedefinované množství kapaliny, které sníží odměřený objem) a naopak. Pro odměrné nádoby obecně platí, že se *nesmí zahřívát ani vysoušet v sušárnách!* Zásadně nedržíme odměrné nádoby rukou v místech, kde se nachází odměřovaný roztok, protože se teplem ruky roztok zahřívá a mění objem. Odměrné nádoby je kalibrováno s přesností, která odpovídá výrobní normě a třídě přesnosti a zpravidla se pohybuje v řádu desetin procenta deklarovaného objemu. V praxi to znamená, že pro běžně používané pipety, byrety a odměrné baňky je deklarovaný objem odměřen s přesností několika setin mililitru (viz tabulka níže).

### Odměrné baňky

slouží k přípravě roztoků určité přesné koncentrace (nejčastěji odměrných a standardních roztoků). Jsou to baňky hruškovitého tvaru s dlouhým úzkým hrdlem. Na hrdle je vyryta po celém obvodu jediná ryska, která vyznačuje, kam až je nutno baňku doplnit, aby obsahovala jmenovitý objem. Tuhé látky se zásadně nerozpouštějí přímo v baňce (nesmí se zahřívát!), nýbrž vždy předem v kádince. Přesnou navážku tuhé látky spláchneme do kádinky, přidáme rozpouštědlo (zpravidla destilovanou vodu) v množství zhruba 2/3 konečného objemu, mícháme tyčinkou a případně zahříváme. Dokonale rozpuštěnou látku převedeme *kvantitativně* pomocí nálevky do čisté a opláchnuté odměrné baňky, přičemž roztok přeléváme po tyčince, která se dotýká vnitřní stěny nálevky. Kádinku vypláchneme pomocí stříčky třikrát (celá vnitřní stěna kádinky musí být opláchnuta), do odměrné baňky opláchneme i tyčinku a nálevku zevnitř a její stonek po povytažení z hrdla baňky i zvnějšku. Koncentrovanější roztoky je nutno během této operace několikrát promístit krouživými pohyby baňky. Má-li obsah baňky vyšší teplotu než laboratorní, baňku ochladíme pod tekoucí vodou na okolní teplotu (baňku přitom držíme prsty za hrdlo *nad ryskou*). Teprve potom můžeme baňku doplnit stříčkou několik milimetrů pod značku. Pro přesné doplnění po značku postavíme baňku na stůl a destilovanou vodu přidáváme po kapkách z menší pipety, až se spodní okraj menisku právě kryje s ryskou. Nakonec baňku zazátkujeme a roztok dokonale promícháme několikanásobným obrácením baňky. Někdy zůstane část kapaliny u zátky a proto již hladina kapaliny v baňce nedosahuje rysky – v tomto případě ale nikdy hladinu již po rysku dodatečně nedoplňujeme! Před odběrem roztoku po delším stání, kdy v hrdle kondenzuje voda a roztok proto mění koncentraci, je nutné provést promíchání.

### Pipety

používáme k přesnému odměřování alikvotních (t.j. úměrných) podílů roztoku vzorku nebo odměrných činidel. Jsou to skleněné trubice, většinou s válcovitě rozšířenou střední částí, opatřené buď jedinou ryskou (tzv. nedělené pipety), nebo více ryskami pro odměření jednotlivých dílčích objemů (tzv. dělené pipety). Pipety jsou kalibrovány na vylití.

Pipety musí být před použitím řádně vyčištěny, odmaštěny a vysušeny. Před pipetováním roztoku pipetu nejprve vypláchneme daným roztokem nejlépe tím způsobem, že jej nasajeme přibližně do poloviny jejího objemu, horní konec rychle uzavřeme ukazovákem, pipetu dáme do vodorovné polohy a otáčením kolem její osy opláchneme celý vnitřní povrch až kousek za značku. Nakonec roztok vypustíme do odpadu. Vypláchnutí pipety je nutné obzvláště pokud není suchá, jinak si pipetovaný roztok zředíme! Pipetu držíme mezi palcem a prostředníkem v místech nad ryskou. Zdravotně nezávadné roztoky můžeme nasávat ústy, jinak použijeme pístovou násadku na pipety či balónek (pouze však k nasátí kapaliny - při nastavení hladiny po rysku a vypouštění z pipety odstraníme!). Při nasávání dbáme na to, aby špička pipety byla dostatečně hluboko ponořena v roztoku, chceme-li zabránit nežádoucímu prudkému vniknutí roztoku do úst. Odměřovaný roztok zvolna nasajeme asi 2-3 cm nad rysku a pipetu rychle uzavřeme *ukazovákem (ne palcem!)*. Ukazovákem nejcitlivěji

regulujeme pomalé odpouštění roztoku k rysce. Nedaří-li se nám pipetu dobře utěsnit, je nutno špičku ukazováčkem nepatrně navlhčit (naopak příliš vlhká pokožka brání jemné regulaci). Špičku pipety vyjmeme z roztoku a opřeme ji o vnitřní stěnu hrdla odměrné baňky (nebo jiné nádoby, ze které pipetujeme). Při odměřování musí být pipeta **vždy ve svislé poloze a značka ve výši oka**. Jemným uvolněním prstu odpouštíme přebytečný roztok, až se dolní okraj menisku přesně kryje s ryskou. Vyjmeme pipetu z hrdla baňky, dáme ji do vodorovné polohy (tím zrušíme hydrostatický tlak odměřované kapaliny, která se posune ze špičky pipety a nemůže z ní ukápnout) a zvenku osušíme kouskem filtračního papíru. Roztok z pipety vypouštíme tak, že se špička svisle postavené pipety dotýká vnitřní stěny nádoby a roztok necháme volně odtékat po stěně nádoby. Potom je nutno **vyčkat ještě 15 sekund** (jak předepisuje norma). Po tuto dobu se ztenčuje vrstva roztoku na stěnách pipety (pozorujeme zvyšování menisku ve špičce pipety) až na trvale ulpívající film. Špičku pipety **otřeme o stěnu nádoby** (nebo se dotkneme hladiny odpipetované kapaliny), až se meniskus ve špičce pipety dále nesnižuje. Tento stav - pevně ulpívající film a zbytek roztoku ve špičce pipety - musí být zachován, abychom přesně odpipetovali jmenovitý objem. **Vyfukování roztoku z pipety je hrubou chybou!** Pipety s poškozenou špičkou jsou znehodnocené a nelze je pro přesnou práci používat. Po skončení práce se pipeta několikrát vypláchne destilovanou vodou výše popsaným způsobem.

## Dělené pipety

mají kalibrační stupnici s počátkem buď v horní nebo dolní poloze. Pipety s počátkem (nulou) v horní poloze jsou v současné době vyráběny téměř výhradně. V prvním případě odměříme požadovaný objem tak, že meniskus nastavíme na počátek stupnice a roztok odpouštíme, až je meniskus několik milimetrů nad zvolenou značkou, vyčkáme podle normy 7 sekund a teprve potom necháme meniskus klesnout na zvolenou rysku. V druhém případě nastavíme meniskus na zvolenou rysku a dále postupujeme jako u nedělené pipety (obsah pipety vypustíme). Čekací doba je ovšem i zde 7 sekund. Pro odměření objemu celé pipety (např. 5 ml u dělené pipety na 5 ml) je však vhodnější dát přednost pipetě nedělené.

## Byrety

jsou skleněné trubice o stejnoměrném průměru, opatřené stupnicí a v dolní části výpustním kohoutem buď zábrusovým, teflonovým nebo kuličkovým ventilem. Byreta s kuličkovým ventilem je určena pro práci s alkalickými roztoky, které by mohly způsobit „zapečení“ skleněného zábrusového kohoutu (trvalé slepení zabroušených ploch skleněného kohoutu vodním sklem, které vznikne působením alkálií na porušený povrch skla). Kuličkový ventil se otvírá stiskem hadičky v místě kuličky, čímž se vytvoří mezi kuličkou a pryžovou hadičkou kanálky, kterými může roztok z byrety vytékat. Byrety s teflonovým ventilem je možné používat jak pro kyselé, tak alkalické roztoky. Byrety jsou kalibrovány na vylití. Nejčastěji používáme byrety na 50 ml s dělením na 0,1 ml. Při odečítání objemu se snažíme odhadovat druhé desetinné místo (setiny mililitru) z polohy menisku mezi dvěma sousedními ryskami. Na byretě odečtený objem uvádíme **zásadně na dvě desetinná místa**. U byret na 10 ml odečítáme objem na 0,01 ml. Byrety se uchovávají naplněné odmašťovacími roztoky saponátu. Před použitím se tento roztok vyleje do výlevky, byreta se dvakrát propláchne destilovanou vodou (naplní se asi do poloviny vodou a podobně jako pipeta se ve vodorovné poloze otáčivým pohybem opláchne celá vnitřní stěna, část vody se propustí přes kohout, aby se i ten propláchl, a zbytek se vylije). Stejným způsobem se byreta vypláchne i odměrným roztokem. Takto připravenou byretu upevníme do stojanu v takové výšce, aby špička byrety zasahovala asi 1 cm do hrdla titrační baňky. Byretu plníme odměrným roztokem pomocí malé nálevky, kterou též napřed propláchneme stejným roztokem. Odměrný roztok odebíráme ze zásobních lahví do vyhrazené kádinky a z této plníme byretu. Přitom dbáme na to, aby v byretě (obzvláště mezi kohoutem a špičkou) nezůstaly uzavřeny vzduchové bubliny. Byretu plníme několik milimetrů nad počátek stupnice a **ihned odstraníme nálevku!** Meniskus nastavíme na počátek stupnice až těsně před vlastní titrací, přičemž odpustíme do podstavné kádinky přebytečné množství odměrného roztoku (**tento se dále již nepoužije ani nevrací do zásobní lahve!**). Nikdy nezapomeneme při tom otřít kapku na špičce byrety o vnitřní stěnu nádoby (v tomto případě podstavné kádinky).

Vlastní titraci provádíme tak, že titrační baňku s titrovaným roztokem, indikátorem a příp. dalšími látkami (viz příslušný pracovní návod) držíme pravou (šikvnější) rukou za hrdlo a rovnoměrným krouživým pohybem mícháme obsah baňky, zatímco druhou rukou ovládáme kohout byrety. Roztok činidla z byrety přidáváme zpočátku rychleji (obzvláště známe-li přibližnou polohu ekvivalenčního bodu), roztok však nesmí vystříkavat z baňky. Při tom stále mícháme krouživým pohybem baňky. V místě přítoku odměrného roztoku se titrovaný roztok barví na konečné zbarvení (lokální přetitrování), mícháním se však toto zbarvení ztrácí. Blízkost ekvivalenčního bodu se prozradí tím, že toto odbarvování (přesněji změna zbarvení indikátoru za ekvivalenci na původní zbarvení před ekvivalencí) se děje stále méně ochotně. V závěru titrace přidáváme činidlo po kapkách (za stálého míchání). V okamžiku, kdy předpokládáme, že jsme se poslední přidanou kapkou již co nejtěsněji přiblížili bodu ekvivalence, dotkneme se vnitřní stěnou hrdla titrační baňky špičkou byrety a stěnu baňky

opláchneme vodou ze stříčky. Přidáme další kapku odměrného roztoku a takto postupujeme do dosažení předepsaného zbarvení indikátoru. Nakonec vyčkáme po čekací dobu (u byret činí **30 sekund**) a odečteme spotřebu. O tom, že jsme skutečně dosáhli předepsaného zbarvení indikátoru (viz pracovní návod) se přesvědčíme přidáním další kapky odměrného činidla. Každou titraci opakujeme nejméně třikrát tak, aby se spotřeby odměrného roztoku u těchto tří titrací nelišily více jak o 0,1 ml. Z jednotlivých spotřeb vypočítáme průměrnou hodnotu, kterou použijeme pro další výpočty. Časově náročnou první titrací (neznáme-li ani přibližnou spotřebu) můžeme nahradit orientační titrací s rychlým dávkováním odměrného roztoku do konečného zbarvení, která nám určí přibližnou polohu ekvivalenčního bodu. V dalších titracích můžeme přidat rychle až 90% objemu, zjištěného orientační titrací, čímž se titrace podstatně zrychlí.

Baňka se správně ztitrovaným roztokem se může použít jako barevný vzor pro další titrace. Barevné změny jsou lépe pozorovatelné na bílém pozadí, proto jsou stojany pro byrety opatřeny základní deskou s bílým povrchem. Po skončení práce se roztok z byrety vylije, byreta se vypláchne vodou a naplní roztokem saponátu **až nad stupnici. Nespotřebovaný odměrný roztok z byrety nikdy nevracíme zpět do zásobní láhve!**

### Způsob odečítání objemu

Kapaliny, smáčejíci povrch skla (např. vodné roztoky), vytvářejí meniskus, jehož spodní okraj se při odměřování objemů musí krýt s kalibrační ryskou odměrného nádobí (u neprůhledných roztoků je nutno použít horní okraj menisku, pipety a odměrné baňky je však nutno na tento způsob čtení překalibrovat). Při pozorování menisku je nutno snížit chybu, způsobenou paralaxou, na minimum (paralaxa obecně vzniká při odečítání výchylky analogového měřícího přístroje, není-li rovina pohybu ukazatele přístroje shodná s rovinou stupnice a odečítáme-li výchylku ukazatele pod různým úhlem). Spojnice oka a rysky na odměrném nádobí musí svírat s podélnou osou pipety, byrety nebo hrdla odměrné baňky vždy úhel 90°. Podélná osa proto musí být při odečítání ve svislé poloze a směr pozorování vodorovný. Při správném odečítání se celoobvodová ryska musí jevit jako úsečka. Spodní okraj menisku vidíme zřetelněji, podržíme-li za ním list bílého papíru šikmo asi pod úhlem 45°. Některé byrety nebo dělené pipety jsou při výrobě opatřeny Schellbachovým pruhem (natavený pruh bílého mléčného skla s úzkým, většinou modrým proužkem). V místě menisku se modrý proužek jeví vlivem lomu světla jako shora i zdola ostře zahrocený. V doteku obou hrotů se odečítá objem na stupnici. Schellbachův pruh ale neodstraňuje vliv paralaxy při odečítání, pouze dovoluje přesnější určení polohy menisku!

## Úloha č. 3 - Kalibrace pipety

Ve cvičení nejprve sledujte výklad a praktické ukázky správné techniky práce s odměrným nádobím (odečítání objemu, pipetování, doplnění odměrné baňky, odměřování objemu byretou, kvantitativní převádění, titrace). Vaším úkolem bude kalibrace nedělené skleněné pipety (10 ml), spočívající ve zvážení odpipetovaného množství destilované vody o známé teplotě (a hustotě) a přepočtení hmotnosti na objem. Vodu budete pipetovat do suché očíslované nádobky, předem zvážené na analytických vahách (při pipetování do plastové nádobky je nutné se dotknout špičkou pipety hladiny kapaliny - nesmáčivý plast neumožní vytečení posledních kapek z pipety!). Po napipetování vody zvažte nádobku na stejných analytických vahách a vypočtete objem vody. Abychom vyloučili vliv náhodné chyby při pipetování (či vážení), proved'te vážení pipetovaného objemu opakovaně (pipetujte do již zvážené nádobky s vodou, alespoň 6x) a vypočtete průměrný pipetovaný objem a absolutní odchylku od deklarovaného objemu. Ovládáte-li základní statistické nástroje k vyhodnocení souboru dat a získáte-li dostatečný počet dat, můžete aplikovat vyloučení odlehlých výsledků, výpočet odhadu směrodatné odchylky výběru dat a přepočet na relativní směrodatnou odchylku.

Do protokolu zpracujte vaše data ve formě přehledné tabulky s uvedením všech získaných experimentálních dat (hmotností, teploty vody atd.) a srovnajte vámi kalibrovaný objem pipety s deklarovaným obsahem a případně jeho udanou přesností a výsledek komentujte.

Tabulka hustoty vody (v g.cm<sup>-3</sup>) v závislosti na teplotě:

$t$	$\rho_t$	$t$	$\rho_t$	$t$	$\rho_t$
17,5	0,998 685	20,0	0,998 203	22,5	0,997 654
18,0	595	20,5	098	23,0	537
15,5	500	21,0	0,997 991	23,5	417
19,0	403	21,5	881	24,0	295
19,5	304	22,0	769	24,5	170



Dovolené odchylky objemu komerčních odměrných nádob - příklady

<i>Objem / ml</i>	<b>ČSN 70 4106, třída A</b>	<b>ČSN 70 4106, třída B</b>
<b>Odměrné baňky, kalibrace na dolítí "IN" pro teplotu 20°C</b>		
<b>25</b>	0,015	0,030
<b>100</b>	0,05	0,10
<b>500</b>	0,14	0,28
<b>Byrety, kalibrace na vylití "EX" pro teplotu 20°C, čekací doba 30s</b>		
<b>10, dělení 0,05</b>	0,03	0,05
<b>25, dělení 0,1</b>	0,05	0,10
<b>50, dělení 0,1</b>	0,08	0,10
<b>Dělené pipety, kalibrace na vylití "EX" pro teplotu 20°C, čekací doba 7s</b>		
<b>2, dělení 0,02</b>	0,01	0,02
<b>5, dělení 0,05</b>	0,02	0,04
<b>10, dělení 0,10</b>	0,03	0,06
<b>Nedělené pipety, kalibrace na vylití "EX" pro teplotu 20°C, čekací doba 15s</b>		
<b>5</b>	0,010	0,020
<b>10</b>	0,015	0,030
<b>25</b>	0,025	0,050

Návrh tabulky pro vypracování protokolu

č. měření	nádobka	s vodou	voda	teplota	hustota	voda	deklarováno
	g	g	g	°C	g.cm <sup>-3</sup>	ml	ml
1							---
2							---
3							---
...							---
...							---
Průměr	---	---	---	---	---		
Sm. odch.	---	---	---	---	---		
Rel. sm. odch. %	---	---	---	---	---		

# Vázková analýza

(Gravimetrie)

## Princip:

Zkoumaná látka (analyt) se vyloučí ve formě málo rozpustné sloučeniny (vylučovací forma) a tato se převede žiháním nebo sušením na sloučeninu přesně definovaného složení, jejíž hmotnost se určí vážením (forma k vážení). Ze stechiometrického poměru hledané a vážené formy se vypočte obsah stanovované látky. Gravimetrické metody jsou zdoluhavé a náročné na praktickou zručnost. Jsou to však metody absolutní a používají se proto pro kontrolu a standardizaci ostatních analytických metod.

## Srážení

Účelem srážení je oddělit stanovovanou látku (analyt) z roztoku více složek **kvantitativně**, v čisté a dobře filtrovatelné formě. Při srážení se musí vytvořit nejprve zárodečná centra tuhé fáze (nukleace). Z nich se v průběhu dalšího srážení vytváří krystalická nebo amorfní sraženina, v závislosti na chemických vlastnostech dané látky a podmínkách srážení. Pro gravimetrické stanovení jsou vhodnější sraženiny krystalické, protože jsou čistší, lépe se filtrují a promývají. Amorfní sraženiny mají větší povrch částic, vykazují proto větší adsorpci nečistot a navíc mají tendenci vytvářet koloidní roztoky. Znečištění sraženiny způsobuje i okluze (mechanické stržení nečistot do rostoucích částíček sraženiny) a inkluze (uzavření matečného roztoku do rostoucích částíček sraženiny) při příliš rychlém srážení. Někdy je nutno znečištěnou sraženinu čistit přesrážením (sraženinu rozpustíme a znovu vysrážíme tentokrát z podstatně čistějšího roztoku). Dobře filtrovatelné sraženiny dosáhneme zpravidla při srážení za vyšší teploty a tím, že srážedlo přidáváme v okamžiku tvorby zárodečných center **velmi pomalu a za neustálého míchání**.

Roztok stanovované látky upravujeme podle návodu (ředíme, upravíme iontovou sílu či pH, zahřejeme ap.) zpravidla v kádince, jejíž velikost volíme tak, aby na konci všech operací byla naplněna max. do 2/3 objemu. Zahřívání provádíme plynovým kahanem na azbestové síťce, přitom je **kádinka přikryta hodinovým sklíčkem** a ve výlevce kádinky je šikmo zasunuta **skleněná tyčinka**, která brání vzniku utajeného varu. Po dosažení požadované teploty odstavíme kahan, sejmeme hodinové sklíčko (prsty si chráníme před popálením dvěma kousky podélně rozříznuté pryžové hadice) a **opláchneme ho do kádinky**. **Skleněnou tyčinku ponecháme v kádince až do ukončení celé operace** (do vyprázdnění a vypláchnutí kádinky). Roztok srážedla (musí být čirý, filtrovaný) přidáváme obvykle z pipety zpočátku **po kapkách za účinného míchání** skleněnou tyčinkou. Přitom se tyčinka nesmí otírat o stěny kádinky (**žádné "zvonění"**), protože v místě otěru vznikají přednostně zárodečná centra, na kterých vzniká sraženina, pevně ulpívající na stěnách kádinky. Srážíme do malého přebytku srážedla. O úplnosti srážení se přesvědčíme, když do vyčěřeného roztoku nad sraženinou přidáme několik kapek srážecího roztoku: roztok se nesmí ani slabě zakalít. Při správném postupu se sraženina poměrně rychle "sbalí", sedne ke dnu a zanechá nad sebou zcela čirý roztok. Některé typy sraženin je nutno nechat "zrát" (stáním překrystalizují na větší, lépe filtrovatelné krystalky), jiné se filtrují ihned za horka.

## Filtry, filtrační kelímky, filtrace

Oddělení sraženiny od matečního roztoku provádíme filtrací papírovým filtrem, skleněným nebo porcelánovým kelímkem.

### *Papírový filtr*

Kvantitativní filtrační papíry se vyrábějí v kruhovém tvaru různé velikosti a různé porózy z papíru s nízkým obsahem popela po spálení. Pro filtraci amorfních vločkovitých sraženin [např.  $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ] se používají řídké filtry, označené černou páskou nebo červeným tiskem na krabíčce. Pro nejjemnější sraženiny (např.  $\text{BaSO}_4$ ) se používá hustý filtr, značený modrou páskou nebo dodávaný v modré krabíčce. Středně husté filtry jsou ve žluté krabíčce (bílá páska). Potřebný druh filtru je uveden u jednotlivých postupů gravimetrického stanovení. Kotouček filtračního papíru se nejprve přeloží na půlku, odtrhne se jeden růžek a znovu se přeloží na čtvrtku. Takto složený filtr se rozevře v kužel tak, že odtržený růžek se nachází vně kužele. Skleněnou filtrační nálevku držíme v levé ruce ve svislé poloze, přičemž ukazovákem uzavřeme konec stonku, naplníme ji asi do poloviny kužele destilovanou vodou a opatrně vsuneme rozevřený papírový kužel po stěně nálevky do její špičky. Papírový kužel přitom držíme vždy za trojitou vrstvu. Dbáme na to, aby pod filtrem nezůstaly vzduchové bubliny. Horní okraj filtru přitlačíme po celém obvodu k nálevce, aby dobře přilnul a byl vzduchotěsný.

Po uvolnění konce stonku voda z filtru odeče. U dobře vloženého filtru však zůstane pod filtrem a ve stonku **souvislý sloupec kapaliny**, který umožňuje svým hydrostatickým tlakem rychlejší filtraci. Odtržený rožek filtru zamezí vzniku vzduchového kanálku na rozhraní trojitě a jednoduché vrstvy papíru, který by způsobil odečtení sloupce kapaliny ze stonku. Papírový filtr musí být aspoň 5 mm pod okrajem nálevky. Připravený filtr upevníme pomocí kruhu s dřevěnou vložkou na stojan a pod filtr umístíme větší čistou kádinku pro zachycení matečního roztoku. Stonek nálevky se musí dotýkat špičkou vnitřní stěny kádinky v její horní třetině.

### **Filtrační kelímky**

Skleněné a porcelánové filtrační kelímky jsou kelímky s pórovitým dnem různé hustoty. Nejčastěji používané skleněné kelímky jsou označeny S3 (velikost pórů 30  $\mu\text{m}$ ) a S4 (8  $\mu\text{m}$ ). Používají se při gravimetrických stanoveních, při kterých se sraženiny před vážením pouze suší při teplotách 100 - 130°C. Porcelánové filtrační kelímky lze po vysušení i žíhat v ochranné mističce. Filtrace kelímky se provádí za sníženého tlaku (odsávání) a je proto rychlejší než filtrace papírovým filtrem. Kelímek se upevní pomocí pryžového těsnění do válcovité nálevky (tulipánu), která je spojena s odsávací lahví pomocí pryžové zátky. Odsávací láhev se připojí pomocí pryžové hadice k vodní vývěvě.

### **Filtrace**

Filtraci *filtračním papírem* provádíme následovně: Sejmeme z kádinky hodinové skličko, opláchneme ho do kádinky destilovanou vodou ze stříčky, tyčinku (která byla dosud stále v kádince) držíme šikmo nad filtrem a její konec přiblížíme k trojitě vrstvě papírového filtru. **Mateční louh** z kádinky opatrně sléváme po tyčince na filtr. Dbáme na to, aby se **sraženina nezvířila**, roztok nevystříkl z filtru a abychom tyčinkou neprotrhli filtrační papír. Filtr nenaplňujeme **nikdy výše než 5 mm** pod horní okraj papíru. Čirý mateční louh se filtruje velmi rychle.

Když jsme takto slili mateční louh, **promyjeme sraženinu v kádince dekantací**, t.j. na sraženinu v kádince nalijeme předepsané množství promývacího roztoku (viz příslušný pracovní návod), sraženinu necháme usadit a opět filtrujeme pouze roztok nad sraženinou. Dekantace se provádí obvykle třikrát. Při poslední dekantaci se zvířená sraženina s promývacím roztokem převede po tyčince na filtr (po naplnění filtru sraženinou probíhá filtrace podstatně pomaleji). Tyčinka a stěny kádinky se opláchnou promývacím roztokem a znovu se roztok se zbytky sraženiny převede na filtr.

Na tyčince a na stěnách kádinky ulpělé zbytky sraženiny rozpustíme přidávkem minimálního množství vhodného činidla (podle pracovního návodu), přičemž pomocí tyčinky smočíme celý vnitřní povrch kádinky a všechny ulpělé zbytky sraženiny kvantitativně rozpustíme. Vzniklý roztok zředíme, provedeme opět srážení a zbytek sraženiny zfiltrujeme přes filtr s hlavním podílem sraženiny. Je-li sraženina v běžných činidlech nerozpustná (např.  $\text{BaSO}_4$ ), kádinku i tyčinku vyčistíme kousky filtračního papíru, které spálíme spolu s filtrem s hlavním podílem sraženiny. Sraženinu na filtru nakonec ještě zbavíme posledních zbytků matečního louhu promýváním promývacím roztokem (vyžaduje-li to návod).

### **Sušení, spalování, žíhání**

Promyté, vlhké sraženiny je pro účely vázkové analýzy nutné převést na látky o konstantním a přesně definovaném složení, t.j. na vážitelnou formu. Děje se tak žíháním nebo sušením sraženin. *Papírový filtr* se sraženinou se spaluje a sraženina se následně žíhá v glazovaných porcelánových kelímcích. Kelímek se před použitím musí vyčistit a **vyžít do konstantní hmotnosti**. Taktéž skleněný filtrační kelímek musí být vyčištěný a vysušený do konstantní hmotnosti. Zásadně musí být dodrženo pravidlo, že prázdné kelímky musí být žíhány resp. sušeny **za stejných podmínek**, za jakých budou žíhány resp. sušeny sraženiny.

Papírový filtr povytáhneme z nálevky za volný, min. 5 mm široký okraj na straně trojitě vrstvy (nejlépe nehtem palce), necháme odtéct roztok ze stonku a odkapat poslední kapky z filtru. Potom opatrně složíme filtr na čtvrtku (jednoduchou vrstvou papíru směrem k sobě), přehneme oba rožky a nakonec ještě otevřenou stranu: vznikne pětiúhelník. Tento vložíme do zváženého porcelánového kelímku špičkou napřed a mírně jej přimáčkneme ke dnu kelímku. Kelímek s filtrem usadíme na triangl (trojúhelník z keramických trubiček, spojených drátem), položený na železném kruhu, který je upevněn na stojanu s trojnožkou v takové výši nad plamenem plynového kahanu, aby se filtr zvolna vysoušel (asi 10 cm nad špičkou plynového plamene). Během sušení nesmí dojít k varu (prskání, praskání a vystřikování) zbytku roztoku ve filtru. Sušení lze též provést v sušárně nebo stáním přes noc v kelímku, zakrytém kouskem filtračního papíru.

Po sušení následuje fáze spalování papíru. Kelímek uložíme na trianglu **šikmo a zahříváme mírným plamenem** dno kelímku. Unikající dýmy a páry se **nesmějí vznítit**, při hoření se do plamene strhávají částice sraženiny a vznikají ztráty. Při spalování proto máme v ruce připraveno hodinové skličko, kterým kelímek

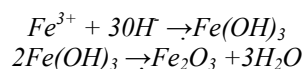
v okamžiku vzplanutí ihned přiklopíme do zahašení plamene. Spalování provádíme zvolna za nízké teploty a za dokonalého přístupu vzduchu (nakloněná poloha kelímku), jinak vzniká obtížně spalitelný grafitový uhlík. Během spalování se kelímek občas pootočí pomocí kelímkových kleští, jejichž **špičky** se v plameni krátce **předehřejí** (rozpálený kelímek by při doteku studenými kleštěmi popraskal). Kleště odkládáme na pracovní stůl **vždy špičkami nahoru**, aby se zabránilo jejich znečištění. Přestanou-li unikat dýmy, uložíme kelímek na trianglu do svislé polohy a začneme kelímek ohřívat na maximálně dosažitelnou teplotu. Přívod vzduchu do plynového kahanu zvětšíme tak, aby se plamen při průvanu ještě nezhášel. Dno kelímku by mělo být asi 2 cm nad modrým studeným kuzelem plamene. Od tohoto okamžiku počítáme dobu žihání, požadovanou návodem. Při žihání dbáme na to, aby se případný černý nálet uhlíku na vnitřních stěnách kelímku beze zbytku spálil. Pootáčíme kelímek kleštěmi (nahřát špičky!), aby se stěny kelímku s vyloučeným uhlíkem ohřívaly v mezerách trianglu.

Po uplynutí předepsané doby žihání odstavíme plamen, vyčkáme, až ustane červený žár kelímku a **nahřátými kleštěmi** vložíme kelímek do exsikátoru. Exsikátor nesmíme uzavřít víkem zcela, ponecháme úzkou mezeru, kterou se může vyrovnat přetlak ohřátého vzduchu s vnějším tlakem. U exsikátorů s kohoutem stačí otevřít kohout. Po cca 1 min. můžeme exsikátor uzavřít úplně. Vychlazení kelímku na teplotu místnosti trvá asi 30min. K vážení se kelímky přenášejí v uzavřeném exsikátoru, který se smí otevřít jen na dobu nezbytně nutnou k vyjmutí kelímku (náplň exsikátoru, sloužící k vysušení prostoru exsikátoru, při jeho dlouhodobém otevření zvlhne a ztrácí účinnost). Při přenášení se exsikátor uchopí oběma rukama za přírubu a palce přidržují víko. Víko se nesmí pokládat na stůl zabroušenou plochou, která je namazána těsnícím tukem.

## Úloha č. 4 - Stanovení železa v pigmentu jako $Fe_2O_3$

### Princip:

Barevný přírodní pigment na bázi oxidů železa je směsí různě hydratovaných oxidů, hydroxidů a případně uhličitánů železitých. Pro stanovení obsahu železa v něm gravimetricky je třeba nejprve vzorek rozpustit v kyselině. Z kyselého roztoku  $Fe^{3+}$  se amoniakem sráží  $Fe(OH)_3$  který se vyžihá na vážitelnou formu  $Fe_2O_3$ . Vaším úkolem je stanovit, kolik procent železa je obsaženo v železitém pigmentu.



$M(Fe) = 55,847 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $M(Fe_2O_3) = 159,692 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

### Pracovní postup:

Před vlastní analýzou připravíme porcelánový kelímek. Vybereme si čistý a neporušený kelímek, který je na neglazovaném dně popsán grafitovou tužkou a jeho označení si zapíšeme. Kelímek umístíme do trianglu a nejprve mírným plamenem vyhřejeme, aby neprasknul. Po dostatečném zahřátí postavíme kahan pod kelímek na plný výkon a žiháme po dobu 1 hodiny. Během této doby provádíme srážení a filtraci. Po žihání odstavíme kahan, kelímek necháme několik minut chladnout a poté jej přeneseme nahřátými kleštěmi do exsikátoru (návod popsán výše).

Na analytických vahách odvážíme přesně asi 0,2 g vzorku železitého pigmentu do suché kádinky objemu 100 ml. Vzorek v kádince rozpustíme v 1 ml koncentrované HCl v digestoři za mírného zahřívání na elektrickém vařiči (kádinku zakryjeme hodinovým sklem). Po rozpuštění spláchneme hodinové sklo a stěny kádinky stříčkou, převedeme obsah kvantitativně do kádinky objemu 250 ml, zředíme na cca 150 ml destilovanou vodou, přidáme 10 ml 10%  $NH_4NO_3$  a zahříváme téměř k varu. Případnou hydrolyzu soli  $Fe^{3+}$  (projevuje se oranžovým až červenohnědým zbarvením roztoku, přecházejícím na červenohnědou sraženinu) potlačíme přidávkem malého množství 2M HCl. Před vlastním srážením musí být roztok žlutý a čirý.

Při prvních náznacích varu přerušíme zahřívání a srážíme 2M  $NH_3$ . Zpočátku můžeme přidávat větší dávky srážedla až do okamžiku, kdy se roztok začne barvit do oranžova. Dále už přidáváme srážecí roztok jen **po kapkách za intenzivního míchání**, dokud se obsah kádinky zřetelně nezakalí. Tato fáze srážení rozhoduje o kvalitě sraženiny. Další přidávky 2M  $NH_3$  můžeme zrychlit. Srážení ukončíme, je-li amoniak z roztoku zřetelně cítit. Při správném postupu se sraženina  $Fe(OH)_3$  rychle sbalí, t.j. usadí se ke dnu ve formě jemných vloček a zanechá nad sebou bezbarvý čirý roztok.

Ještě za horka se čirý roztok filtruje přes řídký filtrační papír (červená krabička), sraženina se 3x dekantuje a po převedení na filtr se promývá horkým 1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Na stěnách kádinky a tyčinky pevně ulpívající sraženina se kouskem kvantitativního filtračního papíru důkladně setře a tento kousek papíru se přidá k hlavnímu podílu sraženiny na filtru po odkapání posledních kapek promývacího roztoku. Poté filtr se sraženinou složíme, vložíme do vyžehnaného a zvažného kelímku, necháme schnout na vyhrazeném místě do příštího cvičení, kdy jej spálíme a vyžeháme do konstantní hmotnosti (1 hod.). Vážíme červenohnědý až černý  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Z jeho hmotnosti a hmotnosti původního vzorku pigmentu vypočteme hmotnostní zlomek Fe ve vzorku (v %).

# Odměrná analýza

(titrace, volumetrie)

## Princip

Podstatou odměrné analýzy je chemická reakce (acidobazická, redoxní, srážecí nebo komplexotvorná), která proběhne mezi stanovovanou látkou a činidlem **kvantitativně, dostatečně rychle a jednoznačně podle známé stechiometrie**. Činidlo přidáváme ve formě roztoku o **známé látkové koncentraci** postupně po dávkách až do dosažení **ekvivalenčního bodu**, t.j. do okamžiku, kdy k hledanému látkovému množství stanovované látky přidáme přesně ekvivalentní množství činidla. Bod ekvivalence musí být přitom zřetelně zjistitelný, např. barevnou změnou indikátoru (vizuální indikace) nebo dosažením určité hodnoty fyzikálně chemické veličiny indikujícího systému (např. absorbance, potenciálu ap.). Z naměřeného objemu roztoku činidla v bodu ekvivalence a jeho koncentrace vypočítáme látkové množství činidla, ze kterého s pomocí známých stechiometrických koeficientů vypočítáme hledané látkové množství stanovované složky.

Roztoky odměrných činidel přesné koncentrace nelze ve většině případů připravit navažováním nebo zředováním z obchodních preparátů, protože tyto výchozí látky nejsou obvykle dostatečně čisté nebo stálé. Proto se z nich připravují roztoky **přibližné** koncentrace, jejichž **přesnou** koncentraci stanovíme titrací na vhodný **primární standard** (tuhé látky stálého a přesně definovaného složení, čistota min. 99,9%, např.  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{PbCl}_2$  aj.). Stanovení přesné koncentrace odměrného roztoku nazýváme **standardizací**. Přitom lze postupovat dvěma způsoby:

- připravíme větší objem roztoku primárního standardu o určité, přesně známé koncentraci, z kterého odebíráme pro titraci vhodné alikvotní podíly (pipetou)
- pro každou titraci zvlášť navažujeme odpovídající množství primárního standardu (pracnější ale přesnější a spolehlivější postup).

Standardizaci provádíme pokud možno za stejných podmínek, za jakých budeme provádět vlastní stanovení (volíme tedy i stejný indikátor), minimalizuje se tím **titrační chyba** (postřehnutí změny zbarvení indikátoru vyžaduje jisté množství odměrného činidla, přidaného navíc ke směsi ztitrované přesně do ekvivalenčního bodu).

Při vlastním stanovení jsme někdy nuceni postupovat tak, že stanovovanou látku přidáváme k nadbytku titračního činidla (např. při pomalé nebo neúplné reakci, při titraci těkavé látky apod.) a přebytek činidla zpětně titrujeme jiným vhodným činidlem. Takovéto titrace se nazývají **zpětné titrace**.

## Úloha č. 5 - Jodometrická titrace - stanovení vitamínu C v ovoci, vitamínovém preparátu

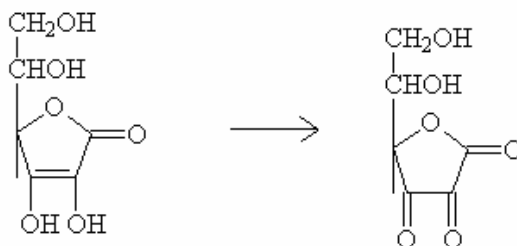
### Princip:

Jodometrické titrace patří mezi titrace oxidimetrické, kdy využíváme redoxních reakcí mezi elementárním jodem (resp. trijodidovým iontem  $\text{I}_3^-$ ) jako oxidovadlem a redukující látkou (analytem). Elementární jod je ve vodě velmi málo rozpustný, využíváme jeho lepší rozpustnosti v přebytku jodidu, kdy vzniká trijodidový anion  $\text{I}_3^-$ . Jodem můžeme oxidovat například ionty cínaté, arsenitany, sulfidy, siřičitany, thiosíranu a další. Z organických látek lze stanovit například kyselinu askorbovou (vitamín C) nebo formaldehyd. Mezi jodometrická stanovení patří i stanovení oxidovadel (peroxid vodíku, dichroman, bromičnan, chlornan, aj.), založené na oxidaci jodidu na jod a jeho následné titraci roztokem thiosíranu sodného. Většina stanovení probíhá v kyselém prostředí (v alkalickém prostředí elementární jod disproportionuje).

Pro indikaci bodu ekvivalence lze využít vlastního zbarvení trijodidového iontu, který je ve zředěných roztocích žlutě zbarven. Mnohem citlivější je však použití škrobu, který s jodem poskytuje intenzivně modře zbarvený komplex. V případě titrací thiosíranem (stanovení oxidovadel) se nejprve titruje roztokem thiosíranu do slabě žlutého zbarvení. Teprve poté se přidá roztok škrobu a dotitruje se do vymizení modrého zbarvení.

Vzhledem k těkavosti jodu nejsou jeho roztoky příliš stálé a je třeba je standardizovat. K tomu lze použít například oxid arsenitý po rozpuštění ve slabě alkalickém roztoku ( $\text{NaHCO}_3$ ). Často se také roztok jodu standardizuje na roztok thiosíranu, standardizovaný na vhodné oxidovadlo (dichroman draselný, bromičnan draselný aj.). Lze také využít reakce jodičnanu s jodidem v kyselém prostředí. Jodičnan draselný je standardní látkou a po přesném navážení lze jeho reakcí s nadbytkem jodidu v kyselém prostředí připravit ekvivalentní množství jodu.

Kyselina askorbová (vitamín C) se oxiduje v kyselém prostředí jodem na kyselinu dehydroaskorbovou:



Titrovat lze roztokem jodu na indikátor škrobový maz. Abychom se vyhnuli nutnosti standardizace odměrného roztoku jodu, využijeme k jeho přípravě standardní látku - jodičnan draselný. Jeho reakcí s jodidem v kyselém prostředí vznikne jod, který reaguje s kyselinou askorbovou. Poněkud netradičně budeme titrovat přímo roztokem jodičnanu a jodid a kyselé prostředí ve vzorku nám zajistí vznik jodu přímo v titrované směsi, kde bude ihned reagovat s kyselinou askorbovou. První nadbytečná kapka jodičnanu způsobí vznik nadbytečného jodu, který poskytne s přítomným škrobem modré zbarvení (modré zbarvení bude pouze v bezbarvém roztoku, pozor na různá další barviva v preparátu).



### ***Příprava odměrného roztoku jodičnanu 0,001 mol.l<sup>-1</sup>***

$$M[\text{KIO}_3] = 214,00 \text{ g.mol}^{-1}$$

Na analytických vahách odvážíme přesně asi 0,50 – 0,55 g jodičnanu draselného, spláchneme kvantitativně do kádinky a rozpustíme ve vodě. Po kvantitativním převedení do odměrné baňky objemu 100 ml doplníme vodou po rysku a promícháme. Z připraveného roztoku pipetujeme 10 ml do odměrné baňky na 250 ml, doplníme vodou po rysku a promícháme. Z navážky, objemu roztoku a ředění vypočteme přesnou koncentraci odměrného roztoku, kterou použijeme při výpočtu obsahu vitamínu C ve vzorcích.

### ***Stanovení vitamínu C ve vitamínovém preparátu***

$$M[\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6] = 176,13 \text{ g.mol}^{-1}$$

Provedení:

Tabletku vitamínového přípravku necháme rozpadnout v menším množství vody a poté převedeme do odměrné baňky a doplníme na 100 ml vodou. Po promíchání necháme hlavní podíl plniv tablety usadit a poté pipetujeme do titrační baňky 10 ml roztoku. Zředíme asi na 50 ml, přidáme 10 ml roztoku jodidu draselného (10%), 10 ml 2M HCl a 5 ml roztoku škrobu. Titrujeme roztokem jodičnanu draselného až do okamžiku vzniku modrého zbarvení. Ze spotřeby vypočítáme množství kyseliny askorbové (v mg) v jedné tabletce preparátu a srovnáme s deklarovaným obsahem.

### ***Stanovení vitamínu C v ovoci***

Vzorek ovoce je nejprve nutno připravit pro analýzu. Zde se spokojíme s přípravou ovocné šťávy a stanovení vitamínu C v ní. Pro stanovení jsou vhodné citrusové plody s vysokým podílem šťávy, případně jiné ovoce, ze kterého lze získat dostatečný objem šťávy, nutný k analýze (alespoň 50 ml). Obsah vitamínu C v pevných částech dužiny lze zanedbat a stanovení vitamínu ve slupkách nemá význam, protože se běžně nekonzumují. Jodometrické stanovení není specifické, reagují (titrují se) i další látky, oxidovatelné jodem. Jejich obsah v ovoci je však zanedbatelný a do výsledku vnášejí jen malou (akceptovatelnou) chybu.

Provedení:

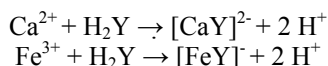
Ovoce rozřízneme nerezovým nožem a pomocí lisu na citrusy do kádinky vymačkáme dostatečné množství vzorku. V některých případech bude nutné použít více kusů ovoce (například citron 2ks). Šťávu v kádince v tom případě promísíme (homogenizujeme) a dále zbavíme větších kousků dužiny (například filtrací přes jemné sítko). Přítomný kal odstraníme odstředěním v centrifuze. Naplníme dostatečný počet zkumavek vzorkem (pozor, zkumavky plnit maximálně do 2/3 objemu a v centrifuze umístit naproti sobě vždy zkumavky se stejným objemem!) a po odstředění slijeme čirý vzorek zpět do čisté kádinky.

Ze vzorku pipetujeme 10 nebo 20 ml (podle získaného objemu šťávy tak, abychom mohli provést alespoň 3 opakované titrace - objem si však poznamenejme!), v titrační baňce zředíme asi na 50 ml a dále postupujeme stejně jako v případě vitamínového preparátu. Pozor na vlastní zbarvení ovocné šťávy při určování bodu ekvivalence! Ze spotřeby a pipetovaného objemu vzorku vypočteme obsah vitamínu C a vyjádříme jej v mg / 100 ml šťávy (tj. asi 100 g konzumního podílu ovoce).

## Úloha č. 6 - Chelatometrická titrace - stanovení Ca a Mg ve vodách a vápenatých schránkách živočichů

### Princip:

Chelatometrické titrace jsou zvláštní případ komplexometrických titrací, kdy reagují ionty kovů s činidlem za vzniku chelátů. Stanovovaný kation kovu reaguje s činidlem za vzniku málo disociovaného, ve vodě rozpustného komplexu, vždy v molárním poměru 1 : 1. Činidlem je nejčastěji kyselina ethylendiamintetraoctová  $H_4Y$ , ve zkratce EDTA, používaná ve formě disodné soli  $Na_2H_2Y$  s obchodním názvem Chelaton 3,  $(HOOC-CH_2)_2N-CH_2-CH_2-N(CH_2COONa)_2$ .



Při reakci se uvolňují protony, takže průběh reakce je ovlivněn hodnotou pH. Chelatometrické reakce se proto provádějí v přítomnosti tlumiče takové hodnoty pH, která spadá do oblasti optimální stability daného komplexu. Komplexy dvojmocných kationtů jsou stále v alkalickém a slabě kyselém prostředí, komplexy výšemocných kovů jsou stále i v kyselých roztocích (jednomocné kationty tvoří naopak jen velmi slabé komplexy a nelze je tudíž titrovat). Vhodnou volbou podmínek při titraci (pH, indikátor) lze stanovit i dva kationty vedle sebe nebo jeden kation v přítomnosti jiného.

Vizuální indikace bodu ekvivalence se provádí pomocí tzv. metalochromních indikátorů, které tvoří s kovovým kationtem slabý barevný komplex [MInd]. Ke konci titrace (v okamžiku, kdy je už veškerý volný kovový kation vázán do komplexu s EDTA) se začíná barevný indikátor uvolňovat z komplexu [MInd], ze kterého je vytěsňován chelatonem  $H_2Y^{2-}$  (vzniká stabilnější komplex  $[MY]^{z-4}$ ). Volná forma metalochromního indikátoru [HInd] (slabá kyselina) musí mít zřetelně odlišné zbarvení od svého komplexu [MInd]. Roztoky metalochromních indikátorů jsou obvykle nestálé, proto se indikátory přidávají v pevném stavu. Barevný přechod indikátoru v bodě ekvivalence je tím ostřejší, čím méně ho přidáme. Abychom mohli indikátor jemněji dávkovat, ředí se stonásobně přebytkem indiferentní soli NaCl nebo  $KNO_3$ .

Chelatometrické titrace se provádějí ve větších objemech titrovaného roztoku (100-150 ml) v titračních baňkách na 250 ml. Při tomto zředění nehrozí, že by vznikaly kineticky stabilnější komplexy indikátoru se stanovovaným kationtem, které způsobují neostrý barevný přechod v bodě ekvivalence. Chelaton 3 není standardní látka a jeho roztoky je nutno standardizovat, například na dusičnan olovnatý.

### *Standardizace 0,05 M chelatonu 3 na dusičnan olovnatý*

$$M[Pb(NO_3)_2] = 331,20 \text{ g.mol}^{-1}$$

Navážku  $Pb(NO_3)_2$ , potřebnou k přípravě 100 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  roztoku, rozpustíme ve vodě, předem okyselené 2 - 3 kapkami  $2 \text{ mol.l}^{-1} HNO_3$  [zabrání hydrolyze  $Pb^{2+}$ , která znemožňuje úplné rozpuštění  $Pb(NO_3)_2$ ]. Roztok převedeme do odměrné baňky a doplníme po značku. Do titrační baňky pipetujeme 20 ml, zředíme vodou na 100 - 150 ml, přidáme 5 ml 10%ního roztoku urotropinu (nebo 0,5 g pevné látky) a indikátor xylenolovou oranž do



slabě fialového zbarvení. Titrujeme 0,05M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Y do citrónově žlutého zbarvení. Vypočítáme přesnou látkovou koncentraci 0,05M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Y.

### ***Analýza vzorku vody - stanovení vápníku a hořčíku vedle sebe***

$$M(\text{Ca}) = 40,08 \text{ g.mol}^{-1}, M(\text{Mg}) = 24,31 \text{ g.mol}^{-1}$$

V silně alkalickém prostředí se hořčík vysráží jako Mg(OH)<sub>2</sub> a vápník titrujeme selektivně na indikátor murexid. V druhém alikvotním podílu vzorku titrujeme v amoniakálním tlumiči sumu Ca + Mg na eriochromčeri T. Z rozdílu spotřeb na oba indikátory zjistíme spotřebu na Mg. Součet koncentrací Ca a Mg v mmol.l<sup>-1</sup> vyjadřuje celkovou tvrdost vody.

#### *Titrace Ca*

Ze vzorku vody do titrační baňky pipetujeme 25 ml, zředíme vodou na 100 - 150 ml, přidáme 5 ml 2M KOH a murexid do slabě růžového zbarvení. Titrujeme do modrofialového zbarvení. Ze spotřeby 0,05M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Y vypočítáme hmotnostní koncentraci Ca v mg.l<sup>-1</sup> a v mmol.l<sup>-1</sup>.

#### *Titrace Ca + Mg*

Opět pipetujeme 25 ml vzorku, zředíme na 100 - 150 ml, přidáme 5 ml amoniakálního tlumiče a eriochromčeri T do slabě fialově červeného zbarvení. Titrujeme do jasně modré barvy. Z rozdílu spotřeb titrace sumy Ca + Mg a titrace Ca vypočítáme hmotnostní koncentraci Mg v mg.l<sup>-1</sup> a také v mmol.l<sup>-1</sup> a v protokolu uvedeme také celkovou tvrdost vody v mmol.l<sup>-1</sup>.

### ***Analýza vzorku vápenatých schránek - stanovení vápníku***

Princip stanovení obsahu Ca ve vápenatých schránkách živočichů (skořápky vajec ptáků, ulity plžů, mlžů aj.) je stejný jako stanovení ve vodě. Pevný vzorek je ale nejprve nutno připravit k analýze. Skořápky byly nejprve zbaveny měkkých organických zbytků vypráním v tenzidu a roztoku chlornanu. Po vysušení byly rozemlety v kulovém mlýnu a homogenizovány. Vaším úkolem je odváženy vzorek rozložit v kyselině a dále zpracovat výše uvedeným způsobem. Pro rozklad (mineralizaci) vzorků biologických materiálů se využívají různé postupy. Rozklad kyselinou dusičnou za zvýšené teploty je jednou z možností. Nezajišťuje úplné odstranění organických látek ze vzorku, což však v případě stanovení Ca není na závadu (zbývající organické látky vytvářejí žlutě zbarvené sloučeniny, patrné v mineralizátu vzorku). Pro kompletní mineralizaci je třeba použít například spalování vzorku v muflové peci při teplotě asi 450 - 500°C nebo oxidace kyselinou dusičnou za tlaku při teplotě až 300°C.

#### *Provedení:*

Vzorek (0,2 - 0,3 g) navážíme přímo do suché 100 ml kádinky a přidáme 4 ml koncentrované HNO<sub>3</sub>. Přidávání kyseliny, zahřívání a ředění provádíme v digestoři a oči si chráníme brýlemi! Kádinku zakryjeme hodinovým sklem a po skončení bouřlivé reakce umístíme na elektrický vařič a mírně zahříváme, až se začne směs jemně vařit. Po vyčeření směsi odstavíme z vařiče a kádinku necháme zchladnout! Po zchladnutí opláchneme hodinové sklo do kádinky, stříčkou spláchneme stěny kádinky a obsah kvantitativně převedeme do odměrné baňky objemu 100 ml. Po vychlazení obsahu baňky doplníme po rysku a promícháme.

Z baňky pipetujeme ke stanovení Ca 20 ml a dále postupujeme jako při stanovení Ca ve vodách (přídavek roztoku KOH zvýšíme na 10 ml, abychom neutralizovali nadbytečnou kyselinu z mineralizace). Ze spotřeby odměrného roztoku chelatonu 3 a navážky vzorku vypočteme procentuální obsah Ca ve vzorku a také přepočteme na obsah CaCO<sub>3</sub> v %.

# Úloha č. 7 - Statistické zpracování dat - Argentometrické stanovení obsahu chloridů v moči

## 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 vnášejí 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:

$$Q_1 = (x_2 - x_1) / R$$
$$Q_n = (x_n - x_{n-1}) / R$$

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 <sub>k</sub>		n	Q <sub>k</sub>	
	$\alpha = 0,95$	$\alpha = 0,90$		$\alpha = 0,95$	$\alpha = 0,90$
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  $\sigma$**  (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 porovnáme s kritickou tabelovanou hodnotou pro daný počet měření  $n$  (resp. počet stupňů volnosti  $\nu = 2n - 2$ ). 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  $\mu$ , 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  $\nu = n - 1$ . 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  $\nu$ :

<b><math>\nu</math></b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b><math>t_{krit}</math></b>	12,706	4,303	3,182	2,776	2,571	2,447	2,365	2,306	2,262	2,228
<b><math>\nu</math></b>	11	12	13	14	15	16	18	20	30	> 30
<b><math>t_{krit}</math></b>	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 odchylky. Je-li hodnota parametru  $b$  malá (srovnatelná s vlastní směrodatnou odchylkou), 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  $\mu$ l). Přesnost automatických pipet se pohybuje kolem 1%, přičemž přesnost fixních pipet je lepší než u nastavitelných pipet. 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  $\mu$ 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  $\mu$ l s ryskami 500 a 1000  $\mu$ 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 stlačením pístu kapalinu ze špičky vypustíme. Stlačením 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 stlačením 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!**

## 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 změní 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  $\text{Cl}^-$  ve vzorku syntetické moči, a to opakovaně, aby bylo možno získaná data statisticky zpracovat.

Chroman, používaný v argentometrii jako indikátor, je karcinogen a nebezpečný pro životní prostředí a nesmí se vylévat do odpadu. Také použití stříbrné soli je poměrně nákladné. Veškeré ztitrované roztoky a zbytky po titraci, které obsahují Ag a chroman proto sbíráme do připravené nádoby - Ag z nich lze recyklovat a chroman bude před vylitím do odpadu redukován na trojmocnou formu.

### Provedení:

#### *Kalibrační závislost:*

Připravte 25 ml roztoku o koncentraci  $\text{Cl}^-$  přibližně  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . K jeho přípravě navažte vypočítané množství pevného NaCl, rozpusťte ve vodě a doplňte na 25 ml. Aktuální navážku NaCl použijte k vypočtení přesného množství chloridů, použitého pro sestrojení kalibrační závislosti.

Do titrační baňky pipetujte automatickou pipetou 1,0 ml standardního roztoku chloridu, zřed'te vodou na objem asi 50 ml a přidejte 1 ml roztoku chromanu draselného jako indikátor. Titrujte roztokem  $\text{AgNO}_3$  až do změny zbarvení ze žlutého do oranžovohnědého (titraci provádějte 1x). Spotřebu odměrného roztoku zapište a totéž opakujte s 0,2 - 0,4 - 0,6 a 0,8 ml standardního roztoku chloridu. V protokolu uveďte do tabulky.

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 (v mg) sestrojte kalibrační závislost objemu  $\text{AgNO}_3$  na  $\text{mg Cl}^-$ , k vyrovnání použijte lineární regresi, vypočtete parametry regresní rovnice a podle svých schopností proveďte testování významnosti úseku na ose objemu  $\text{AgNO}_3$ .

#### *Stanovení chloridů ve vzorku moči:*

Ze vzorku moči pipetujte 2 ml do titrační baňky, zřed'te na 50 ml vodou a titrujte stejně jako standardní roztoky NaCl. Stanovení s každým indikátorem opakujte alespoň 6x (nejlépe 10x).

Pomocí rovnice přímky kalibrační závislosti přepočtete spotřeby roztoku  $\text{AgNO}_3$  na obsah chloridů v titrovaném množství vzorku (v mg) a přepočtete na  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . U hodnot koncentrací otestujte krajní hodnoty na odlehlost a případně proveďte vyloučení odlehlých hodnot. Spočítejte aritmetický průměr, odhad směrodatné odchylky a relativní směrodatnou odchylku průměru. Průměrné hodnoty molární koncentrace chloridů v moči z titrace na chroman a na fluorescein vzájemně porovnejte testem na shodnost. Výsledky zpracujte do přehledné tabulky. Zjištěnou hodnotu koncentrace chloridů přepočtete podle objemu sbírané moči (zadá vedoucí cvičení) na látkové množství vyloučených chloridů za 24 hodin a rozhodněte, zda spadá do fyziologického rozmezí.

Data pro kalibrační závislost:

		chroman	fluorescein
V (NaCl)	m (Cl <sup>-</sup> )	V (AgNO <sub>3</sub> )	
ml	mg	ml	
0,2			
0,4			
...			
...			
1,0			
směrnice	---		
úsek	---		

Zpracování dat z titrace vzorku

V (vzorek)	chroman			fluorescein		
	V (AgNO <sub>3</sub> )	m (Cl <sup>-</sup> )	c (Cl <sup>-</sup> )	V (AgNO <sub>3</sub> )	m (Cl <sup>-</sup> )	c (Cl <sup>-</sup> )
ml	ml	mg	mmol.l <sup>-1</sup>	ml	mg	mmol.l <sup>-1</sup>
2						
2						
...						
...						
$\bar{X}$	---	---		---	---	
$s$	---	---		---	---	
$s_r$	---	---		---	---	
<i>t-test</i>						

## Úloha č. 8 - Spektrofotometrie - stanovení obsahu Fe v přírodní vodě

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 (látka 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  $\Phi_0$  vrstvou absorbujícího prostředí o tloušťce  $l$ , zeslabí se vlivem absorpce intenzita paprsku na hodnotu  $\Phi$ . 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 absorpenci  $A$

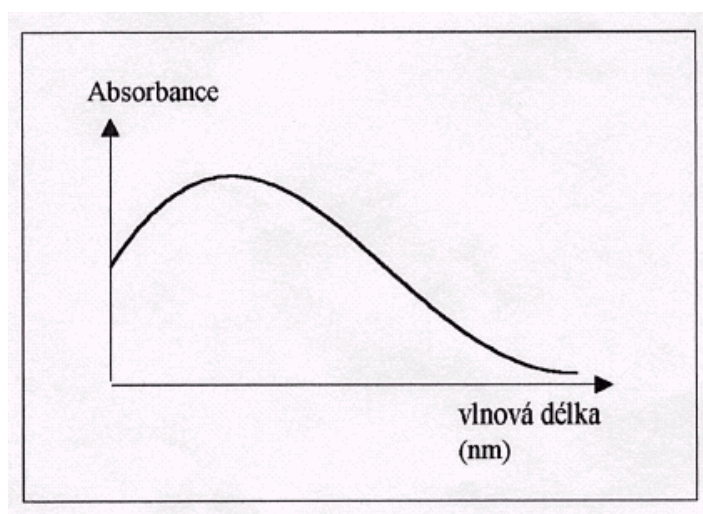
$$A = -\log T = \log \Phi_0 / \Phi$$

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

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

Konstanta  $\epsilon$  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 absorpce při dané vlnové délce aditivní.

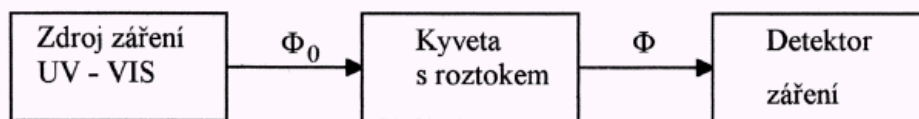
Závislost absorpce na koncentraci absorbující látky je tedy lineární a lze ji využít pro stanovení obsahu absorbující látky v roztoku pomocí kalibrační závislosti. Při vyšších koncentracích absorbující látky však již dochází k různým jevům (například rozptylu světla) a kalibrační závislost se zakřivuje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



V experimentálním uspořádání spektrofotometrických měření využíváme spojitého zdroje 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, fotodioda 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 přidaného množství analytu (standardu) a přepočteme obsah analytu ve vzorku. Tato metoda zlepšuje správnost výsledku stanovení, například při rušení tvorby barevného produktu některými složkami vzorku.

## 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 přidavkem octanu sodného. Vzorky vody pro stanovení železa (a dalších kovů) je nutno ihned při odběru konzervovat přidavkem kyseliny (například  $\text{HNO}_3$  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, sestrojené pomocí sady standardních kalibračních roztoků, nebo metodou přidavku standardu. Obě tyto metody v následujícím postupu využijeme.

### Provedení:

#### Příprava standardních kalibračních roztoků:

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci Fe  $1 \text{ g.l}^{-1}$  nejprve připravíme 100 ml roztoku o koncentraci Fe  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  vhodným zředěním (do odměrné baňky před doplněním po rysku přidáme 1 ml  $\text{HNO}_3$  zředěné v poměru 1:1 vodou).

Do řady 25 ml odměrných baňek pipetujeme 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 ml standardního roztoku Fe o koncentraci  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ , do každé baňky poté přidáme 1 ml 10% roztoku hydroxylamin hydrochloridu, 3 ml  $2 \text{ mol.l}^{-1}$  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  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  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 430 nm, dále nulovou polohu přístroje a po zařazení kyvety s barevným roztokem odečteme absorbanci. Poté změňme 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) sestojíme 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.

Sestojíme graf závislosti absorbance kalibračních roztoků na absolutním množství Fe (v  $\mu\text{g}$ ) a body proložíme přímkou, procházející nulou. Z kalibrační závislosti odečteme obsah Fe v pipetovaném množství vzorku vody a přepočteme na koncentraci v  $\text{mg.l}^{-1}$ . 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 sestojíme 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  $\text{mg.l}^{-1}$ . 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  $\text{mg.l}^{-1}$ . Grafické či početní vyhodnocení uvedeme v protokolu.

Zjištěné absorbance vybarvených standardních roztoků spolu s množstvím Fe (v  $\mu\text{g}$  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.

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

## Úloha č. 9 - Atomová absorpční a emisní spektrometrie - Stanovení zinku a draslíku v multivitaminovém přípravku

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 úlohu 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 plynném stavu. V atomové absorpční spektrometrii (AAS) využíváme skutečnosti, že elektrony valenční vrstvy atomu v základním stavu 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 v plynném stavu a míru absorpce záření je možno měřit. Atomy absorbují záření ve velmi úzkém spektrálním intervalu. V tomto intervalu 0,0005 – 0,005 nm musí zdroj záření emitovat vysokou zářivou energii. Proto se používá záření téhož prvku, který stanovujeme. Mezi původním tokem záření  $\Phi_0$  a tokem záření  $\Phi$ , který je výsledkem snížení toku  $\Phi_0$  absorpci atomy v plynném stavu, platí Lambertův-Beerův zákon

$$\Phi = \Phi_0 \cdot 10^{-\kappa \cdot N \cdot l}$$

ve kterém jednotlivé symboly značí:

$\kappa$  – atomový absorpční koeficient

$l$  – délka absorpční vrstvy

$N$  – počet atomů v jednotce objemu.

Po jeho úpravě zavedením bezrozměrné veličiny absorbance,  $A$  získáme vztah

$$A = \log \Phi_0 / \Phi = \kappa \cdot N \cdot l$$

Pro praktická měření není důležité znát absolutní počet atomů v absorpčním objemu, nýbrž obsah analytu ve vzorku. Naměřená hodnota absorbance se proto vztahuje na koncentraci analytu ve vzorku. V atomovém absorpčním spektrometru záření ze zdroje prochází absorpčním prostředím (atomizátorem), optickou soustavou a dopadá na detektor a zařízení, kde se měří a vyhodnocuje signál. Pro atomizaci analytu využíváme atomizátory - nejběžnější je plamen (například acetylen - vzduch) nebo elektrotermický atomizátor (ohřev ohmickým odporem při průchodu proudem například grafitovou trubicí). Zdrojem záření pro měření absorpce atomů jsou zpravidla výbojky s dutou katodou, vyrobenou z prvku, který stanovujeme. Pro detekci záření se zpravidla využívá fotonásobič.

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. Atomový plamenový emisní spektrometr se skládá z budícího zdroje, monochromátoru, fotoelektrického detektoru a zařízení pro vyhodnocování signálu. V současné době se vedle jednoúčelových plamenových spektrometrů s výhodou používají atomové absorpční spektrometry, přičemž je přívod k primárnímu zdroji záření zakryt clonou a emitované záření je přerušováno (modulováno) výkonným přerušovačem za účelem získání vystupujícího signálu rozlišitelného od signálu

pozadí. Téměř každý komerční atomový absorpční spektrometr lze snadno použít jako atomový emisní spektrometr.

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 případné excitaci atomů. 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 by se tím zkrátil výsledek stanovení a analýza by byla nesprávná.

## **Stanovení zinku metodou AAS a draslíku metodou AES v multivitaminovém přípravku**

### **Princip:**

Tabletu multivitaminového přípravku nejprve rozpustíme ve vhodném činidle a roztok zbavíme nerozpustných příměsí, které by rušily při stanovení. Roztok naředíme tak, aby koncentrace analytu ležela v rozsahu koncentrací kalibrační závislosti a proměříme absorbancí, resp. intenzitu emise, na atomovém absorpčním spektrometru. 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.

Hlavní rezonanční čáry alkalických kovů leží převážně ve viditelné oblasti spektra. Spektrálně se projevují intenzivními dublety. Při stanovení draslíku je nejcitlivější čára při 766,5 nm, výhodnou se jeví také druhá čára dubletu při 769,9 nm. Vzhledem k nízké excitační energii stačí k excitaci atomů i nízkoteplotní plameny. Při stanovení alkalických kovů pomocí AAS a AES se s moderními přístroji dosahuje výsledků podobné kvality. Předností AAS jsou menší spektrální rušivé vlivy. Díky nízkým hodnotám ionizačních energií dochází u alkalických kovů snadno k ionizaci, zejména při vyšší teplotě plamene. Pro jejich stanovení se někdy doporučuje chladnější plamen zemní plyn-vzduch nebo propan-vzduch. Nízká teplota plamene však vede ke zvýšení vlivu osnovy vzorku. Stechiometrický plamen acetylen-vzduch je teplejší, získané signály jsou stabilní a reprodukovatelné. V plameni acetylen-N<sub>2</sub>O ionizují všechny alkalické kovy a jejich stanovení vyžaduje přídavek ionizačního pufru k potlačení ionizace (jeden z alkalických kovů v nadbytku). K potlačení ionizace draslíku je však třeba přídavku vysoké koncentrace Na (jako NaCl), která ale vede k nestabilitě signálu pravděpodobně ucpáváním hořáku. Použití koncentrace 1 g l<sup>-1</sup> Na je řešení kompromisní. Účinný je přídavek 1 g.l<sup>-1</sup> Cs. Kalibrační křivky při stanovení v plameni acetylen-vzduch jsou lineární v rozsahu do 2 mg.l<sup>-1</sup> K.

Stanovení zinku patří k nejcitlivějším stanovením v AAS. Charakteristická koncentrace je většinou 0,018 mg l<sup>-1</sup> Zn. Zinek je v plameni zcela disociován a na jeho stanovení nepůsobí žádné výraznější rušivé vlivy. Stanovení se provádí AAS v plameni acetylen-vzduch pomocí kalibrační křivky sestavené pro srovnávací roztoky do 2 mg.l<sup>-1</sup> Zn.

## **Provedení:**

### ***Příprava vzorku multivitaminového přípravku:***

Celou tabletu zalijeme v kádince (100 ml) 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 zbavit 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  $\text{HNO}_3$  tak, aby koncentrace analytu (Zn, K) ležela asi uprostřed kalibrační závislosti. Pro stanovení draslíku je nutno ještě před doplněním po rysku přidat tolik zásobního roztoku Na (Cs), aby jeho koncentrace po doplnění byla  $1 \text{ g.l}^{-1}$  (také slepý pokus je nutno ředit s přísadkou Na!).

### ***Stanovení draslíku AES:***

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci K  $1 \text{ g.l}^{-1}$  nejprve připravíme 100 ml roztoku o koncentraci K  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  vhodným zředěním. Dalším ředěním zásobního standardního roztoku draslíku o koncentraci  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  1% roztokem kyseliny dusičné připravíme sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci K 0 -  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  po  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  (po 25 ml). Ke každému roztoku přidáme tolik zásobního roztoku Na (Cs), aby jeho koncentrace po doplnění odměrné baňky byla  $1 \text{ g.l}^{-1}$ . 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:***

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci Zn  $1 \text{ g.l}^{-1}$  nejprve připravíme 100 ml roztoku o koncentraci Zn  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  vhodným zředěním. Dalším ředěním zásobního standardního roztoku zinku o koncentraci  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  1% roztokem kyseliny dusičné připravíme sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci Zn 0 -  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  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.

# Úloha č. 10 - Potenciometrická a konduktometrická indikace bodu ekvivalence - Stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích

**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  $\text{Ag}^+$ ), elektrody II. druhu (elektrody se sraženinou, například  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , reaguje na koncentraci  $\text{Cl}^-$ ), redoxní elektrody (platinová, zlatá, reagují na poměr oxidovaná forma / redukována forma) nebo iontově selektivní elektrody membránové (skleněná pH elektroda, reaguje na koncentraci  $\text{H}^+$ ). 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 sestrojení 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 konduktometrií** 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  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$  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 je lze použít pro titraci roztoků zakalených či zbarvených, u kterých by byla vizuální indikace bodu ekvivalence obtížná či nemožná.

## Stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích

### Princip:

Kyselina fosforečná se používá v potravinářství jako okyselující prostředek (dle klasifikace přídatných látek - E338). Známé 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:

1. stupeň:	$H_3PO_4$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + H_2PO_4^-$	$pK_{a1} = 2,12$
2. stupeň:	$H_2PO_4^-$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HPO_4^{2-}$	$pK_{a2} = 7,21$
3. stupeň:	$HPO_4^{2-}$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + PO_4^{3-}$	$pK_{a3} = 12,46$

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<sup>-1</sup>

$$M[NH_2SO_3H] = 97,095 \text{ g.mol}^{-1}$$

Připravte 100 ml roztoku kyseliny amidosulfonové o koncentraci 0,025 mol.l<sup>-1</sup>. Standardizaci odměrného roztoku NaOH proveďte titrací 10 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 (po 0,5 ml). Kolem očekávaného bodu ekvivalence ( $\pm 2$  ml) 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, proložte experimentální body křivkou (potenciometrie) či přímkami (konduktometrie), odečtěte body ekvivalence a vypočtěte koncentraci odměrného roztoku pro každou z použitých metod indikace bodu ekvivalence.

## Titrace vzorku kyseliny fosforečné

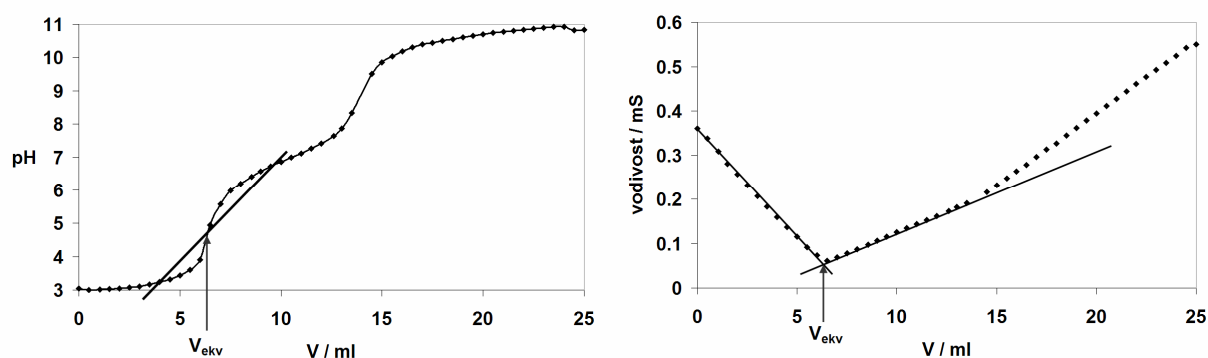
$$M[H_3PO_4] = 97,995 \text{ g.mol}^{-1}$$

Vzorek čisté kyseliny fosforečné doplňte v odměrné baňce po rysku a po promíchání pipetujte 20 ml do kádinky a zřed'te vodou tolik, aby bylo možno do kádinky umístit elektrodu pH-metru, konduktometru a míchadlo tak, aby nedocházelo k narázům míchadla do elektrod. Titrujte roztok kyseliny za současného zapisování pH a vodivosti (přidavky po 0,5 ml) a pokračujte v titraci až za bod ekvivalence (do 25 ml). Sestrojte titrační křivky, odečtěte body ekvivalence a vypoč'tete koncentraci kyseliny fosforečné (v mg.l<sup>-1</sup>) z koncentrace odměrného roztoku odpovídající metody (konduktometrie - konduktometrie).

## Titrace vzorku limonády

Ze vzorku limonády, který byl předem zbaven oxidu uhličitého povařením, pipetujte 20 ml do kádinky a zpracujte stejně, jako vzorek čisté kyseliny fosforečné. Sestrojte titrační křivky, srovnejte tvar titračních křivek čisté kyseliny a limonády a z objemu v bodu ekvivalence vypoč'tete koncentraci kyseliny fosforečné ve vzorku (v mg.l<sup>-1</sup>).

Potenciometrická a konduktometrická titrační křivka kyseliny fosforečné a zjištění bodu ekvivalence (1. stupeň)



# Úloha č. 11 - Stanovení obsahu $\beta$ -karotenu v džusu extrakční spektrofotometrií

## Princip:

Separací metody (např. chromatografie, extrakce, elektroforéza aj.) hrají v analytické chemii velmi důležitou roli. Směs stanovaných látek se nejprve vhodnou technikou rozdělí na chemická individua a následně se detekuje jejich koncentrace či absolutní množství. Chromatografické techniky vyžadují poměrně složitá zařízení, proto se pro demonstraci využití separačních technik spokojíme s jednodušší variantou - kapalinovou extrakcí, kterou využijeme k separaci  $\beta$ -karotenu ze směsi s dalšími látkami v nápoji (multivitaminový džus).

$\beta$ -karoten je přírodní barvivo chemicky patří do skupiny tetraterpenoidů a je provitaminem vitamínu A. Karoteny jsou nepolární organická barviva, rozpustná v tucích a nepolárních rozpouštědlech. K jejich oddělení od matrice lze využít opakovanou extrakci do hexanu (jediným extrakčním krokem bychom nevyextrahovali veškerý  $\beta$ -karoten). Intenzitu zbarvení extraktu lze přímo měřit spektrofotometricky proti hexanu a ze známé hodnoty absorpčního koeficientu se vypočte obsah karotenu v testovaném materiálu:

$$c_{\text{KAROTEN}} = (3,86 * A_{450} * V_{\text{ex}} * R) / V_{\text{vz}}$$

kde

$c_{\text{KAROTEN}}$	je hmotnostní koncentrace $\beta$ -karotenu v $\text{mg.l}^{-1}$
3,86	je absorpční koeficient $\beta$ -karotenu v hexanu při vlnové délce 450 nm
$A_{450}$	je absorbance hexanového extraktu při 450 nm, měřená proti hexanu v 1 cm kyvetě
$V_{\text{ex}}$	je objem hexanového extraktu po extrakci vzorku, v ml
R	je faktor ředění hexanového extraktu, pokud je příliš vysoká hodnota absorbance
$V_{\text{vz}}$	je objem vzorku džusu, který byl extrahován hexanem, v ml

## Pracovní postup

Do dělicí nálevky odpipetujeme 10 ml vzorku džusu, přidáme 30 ml vody, 1 ml 2M HCl a 10 ml hexanu z dávkovače. Nálevku zazátkujeme, otočíme vzhůru stopkou a uvolníme přetlak otevřením kohoutu. Po uzavření kohoutu mírně zatřepeme a opět uvolníme přetlak. Ještě jednou zopakujeme uvolnění přetlaku a poté s uzavřeným kohoutem nálevkou intenzivně třepeme asi 20 sekund. Otočíme vzhůru zátkou, celou nálevkou zakroužíme a postavíme do stojanu.

Po oddělení vrstev odzátujeme nálevku a spodní (vodnou) vrstvu odpustíme do kádinky (objemu 150 ml), k hexanové vrstvě přilijeme 10 ml vody a protřepeme. Po oddělení vrstev spodní vodnou vrstvu spojíme s předchozí a hexanovou vrstvu odpustíme do zabroušené baničky objemu 100 ml.

Vodnou vrstvu vrátíme zpět do dělicí nálevky a celý postup s 10 ml hexanu opakujeme, včetně vyprání hexanové vrstvy vodou. Vodná vrstva opět přijde spojit s předchozí vodnou vrstvou, hexanová po vyprání přijde spojit s hexanovou vrstvou z předchozí extrakce. Poté extrakci zopakujeme ještě dvakrát, opět s 10 ml hexanu.

Po čtvrté extrakci necháme hexanovou vrstvu v nálevce, přidáme k ní předchozí hexanové extrakty a 40 – 50 ml vody. Protřepeme a po oddělení fází vodnou vrstvu odpustíme do odpadu. Hexanovou vrstvu vypustíme do zabroušené baničky, přidáme 1 lžičku bezvodého síranu sodného na vysušení hexanové vrstvy a intenzivně třepeme asi 20 sekund. Poté extrakt přefiltrujeme přes suchý filtrační papír do 50 ml odměrné baňky. Síran sodný v baničce přelijeme 10 ml hexanu, zatřepeme (vypereme zbytky extraktu ze soli) a opět přefiltrujeme do odměrné baňky. Filtr ještě promyjeme malým množstvím čistého hexanu (pozor na přelití objemu odměrné baňky!). Poté odměrnou baňku doplníme hexanem po rysku a obsah zamícháme.

Extrakt nalijeme do suché kyvety spektrofotometru, druhou naplníme čistým hexanem (obě kyvety přitom uzavřeme víčkem, aby se nám těkavý hexan z kyvety během měření neodpařoval). Proměříme na spektrofotometru absorpční spektrum v rozsahu 430 – 540 nm (po 5 nm) a dále absorbance roztoku při 450 nm a 477 nm.

Ze zjištěných hodnot sestrojíme absorpční křivku (graf) a přiložíme k protokolu. Z hodnot absorbancí při 450 nm a 477 nm provedeme zkoušku totožnosti – poměr těchto hodnot pro čistý  $\beta$ -karoten je v rozmezí 1,16 – 1,18. Je-li naměřený poměr jiný, vyextrahovaly se současně s  $\beta$ -karotenem také jiná nepolární barviva (xanthophyly). Z absorbance při 450 nm vypočtete hmotnostní koncentraci  $\beta$ -karotenu ve zkoumaném vzorku džusu a porovnejte s případně deklarovanou hodnotou.

Veškeré zbytky hexanu (i extrakt po změření) slijte do láhve k tomu určené! Laboratorní sklo, které přichází do styku s čistou hexanovou fází (odměrná baňka, nálevka, kyvety) musí být suché! Případné kapky vody odstraňte opláchnutím nádobí alkoholem.



## Úloha č. 12 - Chemicko-analytické výpočty

- 1) Standardní roztok mědi (měďnatých kationů) je možno připravit různými způsoby, například rozpuštěním navážky kovové mědi v kyselině dusičné a doplněním na definovaný objem. Vypočítejte, kolik g kovové mědi je třeba na přípravu 500 ml roztoku měďnatých kationů o koncentraci  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ .
- 2) Vypočítejte, kolik bezvodého síranu měďnatého je třeba na přípravu stejného roztoku.
- 3) Jaká musí být molární koncentrace pentahydrátu síranu měďnatého roztoku, který odpovídá roztoku o koncentraci síranu měďnatého  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ?
- 4) Vypočítejte, kolik ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové je třeba odměřit, aby po doplnění na objem 2000 ml byla koncentrace vzniklého roztoku HCl  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ . Koncentrace HCl v koncentrované kyselině chlorovodíkové je 35% (hmotn.), její hustota  $1,19 \text{ g.cm}^{-3}$ .
- 5) Vypočítejte, kolik g bezvodého uhličitanu sodného bude třeba navážít na přípravu 100 ml jeho roztoku, aby při titraci 10 ml tohoto roztoku výše připravenou kyselinou chlorovodíkovou (na methyloranž) byla spotřeba roztoku HCl asi 20 ml.
- 6) pH žaludečních šťáv je přibližně 2. Vypočítejte molární koncentraci a hmotnostní zlomek HCl (v %) v žaludeční šťávě.
- 7) Jaká musí být koncentrace roztoku hydroxidu sodného, použitého při alkalimetrickém stanovení koncentrace HCl v žaludeční šťávě, aby bylo na titraci 10 ml odebraného vzorku šťáv spotřebováno přibližně 5 ml odměrného roztoku NaOH?
- 8) Obsah železa ve slitině byl stanoven manganometrickou titrací po rozpuštění vzorku ve zředěné kyselině sírové. Navážka 0,2033 g byla po rozpuštění titrována roztokem manganistanu draselného o koncentraci  $0,02088 \text{ mol.l}^{-1}$ . Jeho spotřeba činila 30,34 ml. Vypočítejte obsah Fe (v hmotnostních %) ve slitině.
- 9) Jaké bude výsledné pH roztoku kyseliny octové, smísíme-li 100 ml roztoku o  $\text{pH} = 2,16$  a 500 ml roztoku o  $\text{pH} = 3,16$ ?  $\text{pK}_a = 4,75$
- 10) Jaké bude pH roztoku, který vznikne smísením 250 ml roztoku kyseliny dusičné o koncentraci  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  a 50 ml roztoku hydroxidu barnatého o koncentraci  $0,125 \text{ mol.l}^{-1}$ ?
- 11) Jaká bude koncentrace volné kyseliny chlorovodíkové v roztoku, který vznikne smísením 25 ml roztoku HCl o  $\text{pH} = 1,22$  a 10 ml roztoku NaOH o koncentraci  $0,1223 \text{ mol.l}^{-1}$ ? O kolik jednotek se změní pH tohoto roztoku?
- 12) Vypočítejte hmotnost dusičnanu olovnatého, potřebného k přípravě 100 ml standardního roztoku Pb o hmotnostní koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$ .
- 13) Kolik ml zásobního roztoku Pb o hmotnostní koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  je třeba zředit, abychom získali 100 ml roztoku o hmotnostní koncentraci Pb 10  $\text{mg.l}^{-1}$ ?
- 14) Vzorek půdy o hmotnosti 1,0332 g byl rozložen směsí kyselin a doplněn na objem 100 ml vodou. Ve vzniklém roztoku bylo olovo stanoveno metodou plamenové AAS. Absorbance při zmlžování roztoku standardu o koncentraci  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  byla 0,899, absorbance při zmlžování roztoku vzorku byla 0,334. Za předpokladu, že kalibrační závislost je lineární a prochází nulou, vypočítejte obsah olova v  $\text{mg.kg}^{-1}$  ve vzorku půdy.
- 15) 0,6973 g vzorku směsi chloridu a chlorečnanu sodného bylo rozpuštěno ve vodě a doplněno na objem 250 ml. Ze vzorku bylo pipetováno 25 ml a dusičnanem stříbrným byl vysrážen chlorid stříbrný. Po odfiltrování a vysušení činila jeho hmotnost 0,1388 g. V dalším odpipetovaném podílu 25 ml roztoku vzorku byly chlorečnany nejprve redukovány zinkem na chloridy. Hmotnost AgCl, vyloučeného z tohoto redukováného podílu vzorku, činila 0,1555 g. Vypočítejte procentuální obsah NaCl,  $\text{NaClO}_3$  a nereagujících nečistot ve vzorku.
- 16) Obsah  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v hornině byl stanoven nepřímou chelatometrickou titrací. Vzorek o hmotnosti 0,5021 g byl rozložen směsí kyselin a doplněn na objem 100 ml. Z roztoku bylo pipetováno 10 ml do titrační baňky, přidáno 25 ml roztoku Chelatonu 3 o koncentraci  $0,04998 \text{ mol.l}^{-1}$  a po proběhnutí reakce byl nadbytečný Chelaton 3

retitrován zinečnatou solí o koncentraci  $0,05004 \text{ mol.l}^{-1}$ . Jeho spotřeba činila 7,23 ml. Vypočtete hmotnostní zlomek (v %)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v hornině.

17) Obsah oxidu siřičitého ve víně je stanoven jodometrickou titrací vzorku vína. 50 ml vzorku bylo titrováno roztokem jodu o koncentraci  $0,01038 \text{ mol.l}^{-1}$  na indikátor škrobový maz. Spotřeba odměrného roztoku činila 8,39 ml. Vypočtete obsah  $\text{SO}_2$  v  $\text{mg.l}^{-1}$ .

18) Zjistěte sumární vzorec organické sloučeniny, u které byl elementární analýzou zjištěn obsah uhlíku 32,0% (hmotn.), obsah vodíku 4,0% (hmotn.) a dále byla kvalitativní analýzou vyloučena přítomnost N, S, P, halogenů a kovů. Hmotnostní spektrometrií byla zjištěna molární hmotnost sloučeniny  $150,0 \text{ g.mol}^{-1}$ .

19) Při odběru vzorku 500 ml minerální vody byl přítomný sulfan konzervován přídavkem zinečnaté soli a hydroxidu. Vzniklá sraženina sulfidu a hydroxidu zinečnatého byla v laboratoři odfiltrována a v titrační baňce bylo ke sraženině pipetováno 20 ml roztoku jodu o koncentraci  $0,02000 \text{ mol.l}^{-1}$  a roztok byl okyselen přídavkem kyseliny chlorovodíkové. Sulfidická síra se jodem oxiduje na elementární síru. Nadbytečný jod byl retitrován roztokem thiosíranu sodného o koncentraci  $0,02506 \text{ mol.l}^{-1}$ , jeho spotřeba činila 11,13 ml. Vypočtete koncentraci sulfanu ve vodě v  $\text{mg.l}^{-1}$ .

20) Z  $1,2699 \text{ g}$  vzorku semen slunečnice byl extrahován tuk hexanem v Soxhletově extraktoru. Po odpaření rozpouštědla činila hmotnost vyextrahovaného tuku  $0,4335 \text{ g}$ . V separátním vzorku semen byla stanovena vlhkost. Navážka  $1,2100 \text{ g}$  vzorku byla sušena při  $110^\circ\text{C}$  do konstantní hmotnosti, která činila  $1,0898 \text{ g}$ . Vypočtete obsah tuku v sušině slunečnicových semen.

21) Přesná koncentrace odměrného roztoku manganistanu draselného se stanoví titrací roztoku kyseliny šťavelové v kyselém prostředí za horka, kdy se kyselina oxiduje na oxid uhličitý a manganistan redukuje na sůl manganatou. Navážka dihydrátu kyseliny šťavelové  $0,6322 \text{ g}$  byla rozpuštěna ve vodě a doplněna na objem 100 ml vodou. Z roztoku bylo pipetováno 20 ml, okyseleno kyselinou sírovou a po zahřátí byla směs titrována odměrným roztokem manganistanu do prvního stálého růžového zbarvení. Spotřeba manganistanu byla 19,78 ml. Vypočtete přesnou koncentraci odměrného roztoku manganistanu.

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

$$M(\text{CuSO}_4) = 159,610 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{HCl}) = 36,461 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 105,99 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{Fe}) = 55,847 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2) = 331,2 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{Pb}) = 207,2 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{NaCl}) = 58,443 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{NaClO}_3) = 106,441 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{AgCl}) = 143,321 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{Al}_2\text{O}_3) = 101,961 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{SO}_2) = 64,065 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{C}) = 12,011 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{H}) = 1,008 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{O}) = 15,9994 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{H}_2\text{S}) = 34,082 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 126,07 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}) = 46,069 \text{ g.mol}^{-1}$$

Výsledky příkladů:

- 1) 3,1773 g Cu
- 2) 7,9805 g CuSO<sub>4</sub>
- 3) 0,5 mol.l<sup>-1</sup>
- 4) 17,5 ml
- 5) 1,0599 g
- 6) 0,01 mol.l<sup>-1</sup>, 0,036%
- 7) 0,02 mol.l<sup>-1</sup>
- 8) 87,01%
- 9) pH = 2,54
- 10) pH = 7,00
- 11) c(HCl) = 0,008097 mol.l<sup>-1</sup>, změna pH = +0,87
- 12) 0,1598 g
- 13) 1 ml
- 14) 360 mg.kg<sup>-1</sup>
- 15) w(NaCl) = 81,17%, w(NaClO<sub>3</sub>) = 17,78%, w(nečistoty) = 1,05%
- 16) 90,13%
- 17) 112 mg.l<sup>-1</sup>
- 18) C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>
- 19) 17,7 mg.l<sup>-1</sup>
- 20) 37,9%
- 21) 0,02028 mol.l<sup>-1</sup>