

# **Laboratorní cvičení z analytické chemie**

## **Základy analytické chemie**

### **Soubor návodů k úlohám**

Markéta HOLÁ, Jiří MACHÁT, Vítězslav OTRUBA,  
Jaroslav ŠENKÝŘ, Tomáš VACULOVICĚ

**Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta**

**Brno, 2024**

## 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 7-12) 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.

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 **vypočtením potřebných navážek apod.**

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) Práce s pipetou – ověření správného pipetování
- 4) Gravimetrie - stanovení železa v pigmentu jako  $\text{Fe}_2\text{O}_3$
- 5) Odměrná analýza - Chelatometrická titrace - stanovení Ca ve vápenatých schránkách živočichů
- 6) Odměrná analýza - Jodometrická titrace - stanovení vitamínu C v ovoci a vitamínovém preparátu

### Blok II.

- 7) Statistické zpracování dat - argentometrické stanovení obsahu chloridů v moči
- 8) Spektrofotometrie - stanovení obsahu Fe v přírodní vodě
- 9) Stanovení mědi ve slitinách
- 10) Potenciometrická a konduktometrická indikace bodu ekvivalence - stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích
- 11) Stanovení obsahu  $\beta$ -karotenu v džusu extrakční spektrofotometrií
- 12) Semikvantitativní analýza – Stanovení  $\beta$ -karotenu a luteinu v rostlinách pomocí TLC
- 13) Chemicko-analytické výpočty

## 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.

**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!)

# Statistické vyhodnocení výsledků

## Chyby výsledků chemické analýzy

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

- a) **chyby náhodné** ovlivňují **preciznost měření**. Jejich příspěvek se nedá eliminovat. Velikost systematické chyby se dá statisticky vyhodnotit a popsat – **odhad směrodatné odchylky**, interval spolehlivosti, nejistota, apod. Nabývají se stejnou pravděpodobností kladné i záporné hodnoty a jsou dány statistickým charakterem měření.
- b) **chyby systematické** ovlivňují **pravdivost měření**. Způsobují posun výsledku k vyšší nebo nižší hodnotě vůči pravdivému výsledku. Jejich příčinu lze nalézt a eliminovat. Vznikají například při použití nesprávné metodiky pro daný vzorek (například použitím nesprávného indikátoru při titraci systematicky dochází k přetitrování, spektrální interference způsobuje falešně vyšší intenzity oproti skutečnosti, ...). Výskyt takové chyby musí být vyloučen vhodnou volbou analytické techniky, případně adekvátním způsobem eliminován či korigován. K odhalení slouží **test pravdivosti výsledků**.
- c) **chyby hrubé** ovlivňují **preciznost i pravdivost měření**. Mohou vzniknout 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. K odhalení slouží **test odlehlosti hodnot**.

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 (pravdivá) 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 (aritmetický průměr, medián, geometrický průměr, ...)** a **míry variability (odhad směrodatné odchylky, interval spolehlivosti, ...)** této střední hodnoty. Správně uvedený výsledek analýzy by tedy měl sestávat z této střední hodnoty a hodnoty její variability.

## Vyloučení odlehlých výsledků

Získáme-li při analýze dostatečný počet dat, měla by být data s krajními hodnotami (nejnižší a nejvyšší) otestována na **odlehlost** (přítomnost hrubé chyby). Proto nejdříve provedeme pořádkovou statistiku (seřazení hodnot od nejmenší po největší). Pro testování odlehlosti **nejmenší a největší hodnoty** seřazených ( $x_1$  až  $x_n$ ) dat můžeme použít různé testy (Dean-Dixonův, Studentův...), zde je uveden Dean-Dixonův Q test, který se používá pro malý soubor dat (typicky  $<7$ ):

$$Q_1 = \frac{(x_2 - x_1)}{R}$$

$$Q_n = \frac{(x_n - x_{n-1})}{R}$$

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 (Tab. 1), 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.

n	Q <sub>k</sub>		n	Q <sub>k</sub>	
	α = 0,95	α = 0,90		α = 0,95	α = 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

Tab.1: Kritické hodnoty Q testu pro vyloučení odlehlých hodnot

## 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 X**:

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

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

$$s = R_n \cdot k_n$$

n	k <sub>n</sub>	n	k <sub>n</sub>
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		

Tab. 2: Hodnoty koeficientu  $k_n$  pro odhad směrodatné odchylny z rozpětí

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

$$s_r = s \cdot 100 / X \%$$

Směrodatná odchylna 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 . $\sigma$	50,0%	2,58 . $\sigma$	99,0%
1,00 . $\sigma$	68,3%	3,00 . $\sigma$	99,7%
1,64 . $\sigma$	90,0%	3,29 . $\sigma$	99,9%
1,96 . $\sigma$	95,0%	4,00 . $\sigma$	99,99%

Tab. 3: Vztah mezi směrodatnou odchylnou a statistickou pravděpodobností

## 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, anebo 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  $P = 95\%$ ,  $k = 2$ ).

Výpočet **kombinované nejistoty**  $u_c$ , kde  $SD(A)$ ,  $SD(B)$ , ... jsou odhady směrodatných odchylek jednotlivých experimentálně zjištěných hodnot:

$$u_c(y(A, B, C)) = \sqrt{SD(A)^2 + SD(B)^2 + SD(C)^2}$$

Výpočet **rozšířené kombinované nejistoty**  $U$ , kde  $k$  je koeficient rozšíření (pro 95% hladinu spolehlivosti  $k=2$ ):

$$U = u_c \cdot k$$

## Srovnání experimentálních výsledků

Výsledky, které mají malou (relativní) směrodatnou odchylku, jsou **precizní** (výsledky opakovaného stanovení jsou blízko sebe). Výsledky, jejichž střední hodnota je blízko očekávané (pravdivé hodnoty) jsou potom **pravdivé**. V praxi se setkáváme se všemi kombinacemi možností - výsledky pravdivé a precizní (**spolehlivé**, ideální stav), výsledky pravdivé ale neprecizní, výsledky nepravdivé ale precizní a konečně výsledky nepravdivé a neprecizní.



Obr.1: Grafické znázornění pravdivosti a preciznosti výsledků

### Test shodnosti výsledků

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 statistické testy na **shodnost** (Lordův, Studentův...). Pro malý soubor dat se používá Lordův test, který zahrnuje jak střední hodnotu výsledků, tak jejich rozpětí  $R_A$  a  $R_B$ .

$$u = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{R_A + R_B}$$

získanou hodnotu porovnááme s kritickou tabelovanou hodnotou pro daný počet měření  $n$ . Výsledky jsou shodné, pokud platí  $u < u_{krit}$ . Je-li výsledná hodnota větší než kritická hodnota, je rozdíl dvou testovaných středních hodnot statisticky významný (na hladině pravděpodobnosti  $P$ ) a výsledky nejsou shodné.

### Test pravdivosti výsledků

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 **pravdivost**:

$$u = \frac{|\bar{X} - \mu|}{R}$$

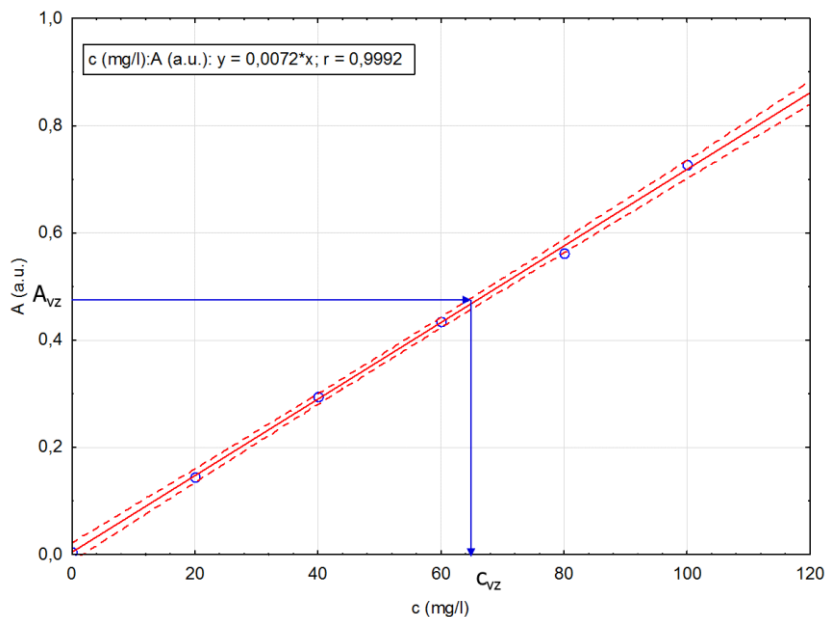
a získanou hodnotu opět porovnáme s tabelovanou kritickou hodnotou v tabulce. Je-li  $u < u_{krit}$ , pak je výsledek pravdivý.

n	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$u_{krit}$	1,714	0,636	0,406	0,306	0,250	0,213	0,186	0,167	0,152

Tab. 3: Kritické hodnoty  $t_{krit}$  pro test shodnosti a správnosti (hladina pravděpodobnosti  $P = 0,95$ ) a počet stupňů volnosti  $v$ :

## 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.



Obr. 2. Příklad lineární kalibrační závislosti s grafickým odečtem koncentrace v neznámém vzorku

**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  $y = ax$ ).

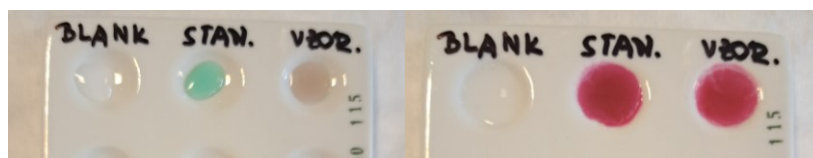
# Kvalitativní analýza

**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.



Obr. 3: Správné provedení má 3 důkazové reakce: blank, standard, vzorek. a) před přidáním specifického činidla, b) výsledek po přidání specifického činidla

## 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, otfeme 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 zúžené 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 uchováujeme 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 aj.) provádíme ve zkumavce (dlouhé, tenkostěnné). 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 plamenu plynového kahanu, nebo na vodní lázni. Při zahřívání v plamenu 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 plamenu 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 plamenu** (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 plamenu 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 plamenu. Při zahřívání přímo v plamenu 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 plamenu. 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 plamenu 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 plamenu, dokud barví plamen. Při žhání v plamenu **drátek nevnašíme 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 vnašíme drátek maximálně do poloviny jeho délky, jinak hrozí přehřátí skleněné tyčinky a po následném ochlazení v kapalině její prasknutí a uvolnění drátku (Obr.4). 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.



Obr. 4: Prasklá tyčinka Pt drátku po jejím vložení do plamene kahanu

### **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 nádobky 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 ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ )

**Úkol:** Ve vzorku A dokažte přítomnost 1 kationtu. Ve vzorku B dokažte přítomnost 1 kationtu a 1 aniontu

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

#### *Důkaz v plamenu*

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 zabarvení 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 sekund 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 sklíčko 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 plamenu*

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 barvící 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 vychládlého 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 dipikrylaminátem*

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 dipikrylaminu),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , kationy těžkých kovů (srážejí 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 žiháme 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*

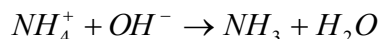
Nesslerovo činidlo je roztok tetrajodortuřnatanu v NaOH. V alkalickém prostředí vzniká s amoniakem hnědá sraženina, obsahující skupiny -I a  $-\text{NH}_2$  kolísavého složení. Reakce je velmi citlivá, už stopy  $\text{NH}_4^+$  nebo  $\text{NH}_3$  dávají žluté zbarvení.

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 změní 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  $\text{Mg}^{2+}$ .

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

### *Důkaz v plamenu*

Ionty Ca<sup>2+</sup> barví plamen cihlově červeně. V přítomnosti chloridů se přechodně tvoří těkavější CaCl<sub>2</sub>, který se projeví v plamenu jasnějšími karmínově červenými záblesky (záměna s Li možná!) bezprostředně po vnesení vzorku do plamene. S určitým zpožděním se objeví méně výrazné cihlové červené zbarvení plamene, které 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<sup>2+</sup> 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<sub>4</sub><sup>2-</sup>**

### *Důkaz Ba<sup>2+</sup> nebo Sr<sup>2+</sup> soli*

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<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> pomalým vylučováním síry po okyselení. Vznikne bílý koloidní roztok, který znemožňuje pozorování tvorby bílé sraženiny BaSO<sub>4</sub>.

Provedení: K 1 kapce roztoku vzorku přidáme 1 kapku 2 M HCl a 1 kapku 0,05 M BaCl<sub>2</sub>. Vznik bílé sraženiny nebo zákalu dokazuje přítomnost SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

## **PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>**

### *Důkaz molybdenanem*

Vznik žluté sraženiny (přechodně i žlutý roztok), nejlépe za horka, proměnlivého složení, obvykle (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O v přítomnosti NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a v prostředí HNO<sub>3</sub> (nebo jiné minerální kyseliny).

Provedení: K 1 ml roztoku vzorku ve zkumavce přidáváme 2 M HNO<sub>3</sub> 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 (těž Br<sup>-</sup> a I<sup>-</sup>). 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<sub>2</sub> i I<sub>2</sub> odbarví.

Provedení: Do porcelánového kelímku dáme 1 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , několik krystalků pevného  $\text{KMnO}_4$ , 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 HCl.

Ruší:  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  vznikem NOCl, který spotřebuje chloridy a důkaz má negativní výsledek. Negativní výsledek dávají i nerozpustné nebo nedisociované chloridy, např. 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 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 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 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, žiravina! 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 NaOH. Jasně červené zbarvení dokazuje  $\text{NO}_3^-$  ve vzorku (v nepřítomnosti  $\text{NO}_2^-$ ).

## **Protokol:**

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup**
- **Výsledky všech provedených důkazových reakcí (i negativních).** K prezentaci použijte navrženou tabulku (vizte Tab.4)
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

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

**Úkol:** Ve vzorku A dokažte přítomnost 1 kationtu. Ve vzorku B jsou obsaženy 1-3 kationty, dokažte jejich přítomnost.

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

#### *Důkaz kyselinou sírovou*

Ionty  $\text{SO}_4^{2-}$  způsobují tvorbu hutné bílé sraženiny  $\text{PbSO}_4$ . Jako srážecí činidlo je nevhodnější 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 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 zviríme 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  $\text{PbS}$ .

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

#### *Důkaz hexakvanoželeznanem*

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 kationty (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 přidavku 1 ml  $\text{CHCl}_3$  a protřepání se v něm rozpustí na hnědý roztok. Provádíme ve zkumavce.

### **$\text{Al}^{3+}$**

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

Vznik červeného chelátu  $\text{AlL}$ , povrchově adsorbovaného na sraženinu  $\text{Al}(\text{OH})_3$  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:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  aj. Oddělíme je pomocí  $\text{NaOH}$ .

Provedení: K 1 ml 1 M  $\text{NaOH}$  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 10 kapek činidla a přikapává se 2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  až se fialové zbarvení změní: v přítomnosti  $\text{Al}^{3+}$  na cihlově červené, slepý pokus má žluté zbarvení.

### **$\text{Fe}^{3+}$**

#### *Důkaz thiokyanatanem*

V kyselém prostředí vznikají intenzivně červeně zbarvené rozpustné komplexy  $\text{FeNCS}^{2+}$  vedle  $\text{Fe}(\text{NCS})_2^+$ .

Ruší:  $\text{F}^-$  v nadbytku - maskovací činidlo.

Provedení: Na kapkovací desce se k 1 kapce kyselého roztoku vzorku přidá 1 kapka 20 % thiokyanatanu amonného. V přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  vznikne intenzivně červené zbarvení.

#### *Důkaz hexakvanoželeznatanem draselným*

V kyselém prostředí vzniká sraženina nebo koloidní roztok berlínské modři.

Ruší:  $\text{Cu}^{2+}$  ve velkém nadbytku.

Provedení: Na kapkovací desce se přidá k 1 kapce roztoku vzorku po 1 kapce konc.  $\text{HCl}$  a 10 %  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . V přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  vznikne modrá sraženina.

#### *Důkaz kyselinou 5-sulfosalicylovou*

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

Ruší:  $\text{F}^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  - (maskovací činidla).

Provedení: Na kapkovací desce se k 1 kapce kyselého roztoku vzorku přidají krystalky pevného činidla. V přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  vzniká fialové nebo červené zbarvení.

### **$\text{Mn}^{2+}$**

#### *Důkaz oxidací na $\text{MnO}_4^-$ jodistanem*

Oxidace probíhá v kyselých roztocích za horka a vzniká fialový  $\text{MnO}_4^-$ . Reakce je velmi citlivá a musí se provádět se zředěným roztokem vzorku. Při vyšších koncentracích a nižší aciditě vzorku vzniká hnědá sraženina  $\text{MnO}_2$  (burel).

Ruší:  $\text{Cl}^-$  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 lopatíčky 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 hexakynoželeznanem*

V prostředí 1 M HCl vzniká sraženina hexakynoželeznanů zinečnatých s proměnlivým obsahem draselných iontů, která je teoreticky bílá. Ve žlutém roztoku nadbytečného hexakynoželeznanu 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-nitrozo-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.

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup**
- **Výsledky všech provedených důkazových reakcí (i negativních).** K prezentaci použijte navrženou tabulku
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

Důkaz iontu	Výsledek důkazu			Závěr
	Blank	Standard	Vzorek A	
$\text{Pb}^{2+}$ s $\text{H}_2\text{SO}_4$	čirý roztok	bílá sraženina; po přidání roztoku NaOH došlo k jejímu rozpuštění	čirý roztok	$\text{Pb}^{2+}$ není ve vzorku přítomen
$\text{Mn}^{2+}$ s $\text{IO}_4^-$	beze změny	fialové zbarvení	fialové zbarvení	přítomnost $\text{Mn}^{2+}$ ve vzorku

Tab. 4: Vzorová tabulka pro zpracování důkazových reakcí.

# 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.**

### *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 číslicí) 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!

### **Pravidla pro vážení:**

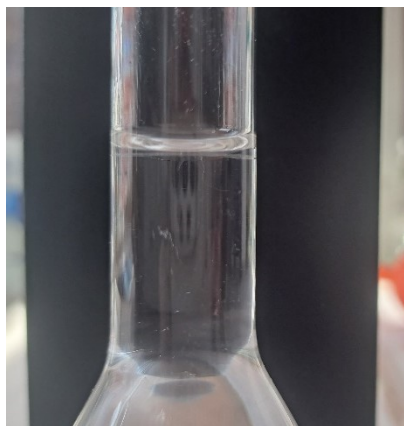
1. Analytické váhy používáme **pouze pro přesná vážení** (s přesností na 0,1 mg). Maximální zatížení analytických vah je 200g. V ostatních případech používáme technických vah (předvážek).
2. Vážené předměty musí mít **teplotu místnosti**. Horké předměty necháme vychladnout v exsikátoru.
3. Odvažované látky se **nikdy nedávají přímo na misky**, ale použijí se vhodné nádoby (váženky, lodičky, hodinové skličko, kádinka ap.). Misky vah musí být stále čisté (hrozí koroze), usypané látky se ihned po vážení odstraní štětečkem z misky i ze skříňky.
4. Veškeré **závady se ihned nahlásí** instruktorovi.
5. Ve váhovně **udržujeme čistotu a pořádek**. Jakékoliv otřesy nebo nárazy poškozují váhy a ruší při vážení.

## 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 kalibrované nádoby. 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 **dolití**, 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) zbude malé množství kapaliny a obě tato množství *nepatří* k odměřenému objemu. Kalibrace na dolití 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 dolití 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 (vizte tabulka níže).

### Odměrné baňky

Odměrné baňky slouží k přípravě roztoků určité přesné koncentrace (nejčastěji odměrných a standardních roztoků). Mají hruškovitý tvar 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. **Odměrné baňky jsou kalibrovány na dolití.** 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 promísit 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.



Obr. 5: Správné doplnění odměrné baňky (spodní hrana menisku se kryje s ryskou)

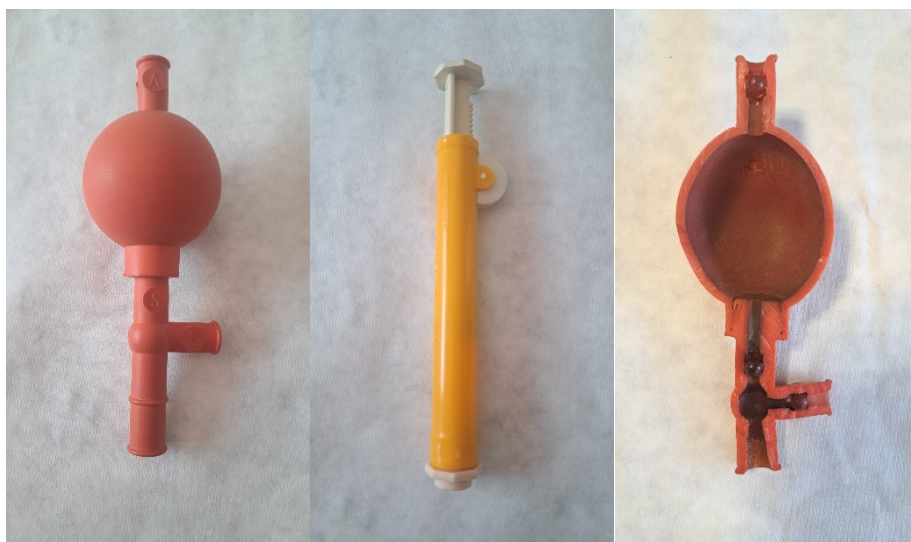
## Pipety

Skleněné pipety používáme k přesnému odměřování alikvotních 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 vylítí.** Nejčastěji se používají k pipetování objemů od desetin mililitru po desítky mililitrů.



Obr. 6: Příklady mikropipet a skleněných dělených a nedělených pipet

Pro pipetování skleněnou pipetou používáme buď speciální nástavec (pipetík), nebo pipetovací balónek. Pipetovací balónek má tři ventily, označené, A, S a E. A (Air) je ventil pro vypouštění a nasávání vzduchu do balónku a je tedy klíčový pro regulaci tlaku v balónku. S (Suction) je ventil pro nasávání kapaliny do pipety a ventil E (empty) je určen pro vypuštění kapaliny z pipety.



Obr. 7: Pipetovací balónek a nástavec, řez pipetovací balónkem


Pipety musí být před použitím řádně vyčištěny, odmaštěny a vysušeny. Před pipetováním roztoku pipetu nejprve vypláchneme destilovanou vodou a potom také 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!

### Postup při pipetování balónkem:

1. Stiskněte balónek a současně stiskněte ventil A (Air). Tím nasajete vzduch do balónku, čímž se vytvoří podtlak potřebný pro další kroky.
2. Nasadte balónek na horní konec pipety tak, aby byl dobře připevněn a těsně přiléhal. Nepoužívejte hrubou sílu, ať nedojde k vytlačení kuličky ventilu S do těla balónku.
3. Vložte dolní konec pipety do kapaliny, kterou chcete pipetovat. Stiskněte a držte ventil S (Suction), což způsobí nasávání kapaliny do pipety pomocí podtlaku vytvořeného v balónku. Jakmile kapalina dosáhne hladiny nad požadovanou rysku pipety, uvolněte ventil S. Dávejte pozor na to, abyste nenasáli kapalinu do balónku.
4. Mírným stisknutím ventilu E (Empty), uvolněte přebytečnou kapalinu z pipety, dokud se spodní okraj menisku přesně nekryje s ryskou.
5. Přesuňte pipetu nad nádobu, do které chcete kapalinu vypustit. Roztok z pipety vypouštějte tak, že se špička pipety dotýká vnitřní stěny nádoby a roztok nechejte volně odtékat po stěně. Pipetu držte svisle. Potom vyčkejte ještě 15 vteřin (jak předepisuje norma). Po tuto dobu se ztenčuje vrstva roztoku na stěnách pipety (pozorujeme zvyšování menisku ve špičce pipety) až na trvale ulpívající film. Pevně ulpívající film a zbytek roztoku ve špičce pipety musí být zachován, abychom přesně odpipetovali definovaný objem. Proto pipetu nikdy nevyfukujte! Pipety s poškozenou špičkou jsou znehodnocené a nelze je pro přesnou práci používat.
6. Po skončení práce se pipetu vypláchněte destilovanou vodou výše popsáním způsobem.


### Postup při pipetování pomocí mechanického nástavce:

1. Vložte horní konec skleněné pipety do spodní části mechanického nástavce. Ujistěte se, že je pipeta pevně připevněna a těsní.
2. Vložte dolní konec pipety do kapaliny, kterou chcete pipetovat. Otáčejte kolečkem na mechanickém nástavci (obvykle proti směru hodinových ručiček) pro nasátí kapaliny do pipety.
3. Jakmile kapalina dosáhne hladiny nad požadovanou rysku pipety (2-3 cm), uvolněte nástavec a pipetu rychle uzavřete ukazováčkem (ne palcem!). Špičku pipety při tom opřete o dno nádoby, zpomalíte tak vytékání kapaliny z pipety. Dávejte pozor na to, abyste nenasáli kapalinu do balónku. Špičku pipety vyjměte z roztoku a opřete ji o vnitřní stěnu nádoby, ze které pipetujete. Při odměřování musí být pipeta vždy ve svislé poloze a značka ve výši oka. Jemným uvolněním prstu odpusťte přebytečný roztok, až se spodní okraj menisku přesně kryje s ryskou.
5. Přesuňte pipetu nad nádobu, do které chcete kapalinu vypustit. Roztok z pipety vypouštějte tak, že se špička pipety dotýká vnitřní stěny nádoby a roztok nechejte volně odtékat po stěně. Pipetu držte svisle. Potom vyčkejte ještě 15 vteřin (jak předepisuje norma). Po tuto dobu se ztenčuje vrstva roztoku na stěnách pipety (pozorujeme zvyšování menisku ve špičce pipety) až na trvale ulpívající film. Pevně ulpívající film a zbytek roztoku ve špičce pipety musí být zachován, abychom přesně odpipetovali definovaný objem. Proto pipetu nikdy nevyfukujte! Pipety s poškozenou špičkou jsou znehodnocené a nelze je pro přesnou práci používat.
6. Po skončení práce se pipetu vypláchněte destilovanou vodou výše popsáním způsobem.

Video: Základní informace o skleněných pipetách 

Video: Proplach pipety před použitím 

Video: Pipetování s použitím pipetovacího balónku 

Video: Pipetování s použitím pipetovacího nástavce 

## ***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.


## Mikropipety

Jsou nástroje používané v laboratořích pro přesné dávkování velmi malých objemů kapalin. Slouží nejen k přímému pipetování (dávkování zředěných vodných roztoků), což je nejběžnější technika pipetování ale i k reverznímu pipetování (dávkování viskózních, smáčivých nebo vysoce těkavých kapalin), opakovanému pipetování (opakované dávkování stejného objemu) nebo k pipetování heterogenních vzorků (např. krev). Aby bylo zajištěno přesné a reprodukovatelné pipetování, je důležité dodržovat několik základních pravidel:

- Před zahájením pipetování **je nutné na spodní díl pipety nasadit jednorázovou špičku**. Ujistěte se, že je špička pevně a rovnoměrně nasazena, aby se zabránilo úniku kapaliny nebo vzniku vzduchových bublin, které by mohly ovlivnit přesnost měření. Nesahejte na spodní část špičky.
- Při nastavování pipetovaného objemu na mikropipetě pomocí ovladače **postupujte opatrně**. Jemné otáčení ovladače umožní nastavení správného objemu, který je zobrazen na ukazateli objemu, obvykle umístěném na boku pipety.
- Ovladač mikropipety má obvykle **tři polohy; základní a dvě polohy stisku ovladače**. První poloha stisku slouží k nasávání kapaliny do špičky, zatímco druhá poloha se používá pro úplné vypuštění kapaliny ze špičky. Druhá poloha je rovněž využívána při reverzním či opakovaném pipetování.
- Při manipulaci s ovladačem pipety je důležité postupovat pomalu a hlavně plynule, zejména při nasávání a vypouštění kapaliny. Rychlé nebo trhané pohyby mohou způsobit vznik vzduchových bublin nebo nežádoucí ztráty kapaliny, což by mohlo vést k nepřesnostem v pipetování.
- **Pipetu je třeba držet ve svislé poloze při nasávání kapaliny**, aby byl zajištěn správný objem. Při vypouštění kapaliny je vhodné držet pipetu pod mírným úhlem vůči stěně nádoby, aby se zajistilo, že všechny nasátý objem kapaliny bude vypuštěn.

Dodržování těchto zásad při pipetování mikropipetou je nezbytné pro dosažení spolehlivých a přesných výsledků v laboratorní práci. Následující postupy zahrnují hlavní techniky pipetování.


Video: Základní informace o mikropipetách 

Video: Příprava před pipetováním 

### Postup při přímém pipetování:

Slouží k pipetování zředěných roztoků.

1. Nasadte špičku na spodní díl pipety a ujistěte se, že je správně upevněna.
2. Před samotným pipetováním špičku 2-3 krát naplňte a vyprázdněte vzorkem, který budete pipetovat. Tento krok je důležitý proto, že po vyprázdnění špičky zůstává vnitřní stěna špičky pokrytá tenkým filmem kapaliny. Pokud byste tento krok vynechali, vyprázdňovaný objem by byl menší, než je požadovaná hodnota, a snížila by se přesnost pipetování.
3. Nastavte požadovaný objem, který budete pipetovat, opatrným otáčením ovladače (ukazatel bývá umístěn na boku pipety)
4. Při nasávání kapaliny do špičky mějte pipetu vždy svisle. **Pro nasátí kapaliny stiskněte ovladač do první polohy, špičku vnořte do kapaliny a pomalu ovladač uvolněte (dojde k nasátí požadovaného objemu kapaliny do špičky)**. Poté pipetu se špičkou opatrně vytáhněte z kapaliny tak, že špička se dotýká nádoby, ze které pipetujete – tím odstraníte přebytečnou kapalinu z vnější strany špičky. Zkontrolujte, zda ve špičce nejsou vzduchové bubliny. Pokud ano, může být špička špatně nasazena. Vypusťte kapalinu ze špičky a postup v tomto kroku zopakujte.
5. Při vypouštění kapaliny nakloňte pipetu se špičkou pod mírným úhlem vůči stěně nádoby. Pokud již v nádobě nějaká kapalina je, špička by měla být nad hladinou této kapaliny. **Plynule stiskněte ovladač do první polohy, vyčkejte přibližně jednu vteřinu, a poté rychlým stisknutím pokračujte do druhé polohy ovladače, čímž dojde k úplnému vyprázdnění špičky**. Nakonec špičku vytáhněte z nádoby a uvolněte ovladač do základní polohy.


Video: Postup při přímém pipetování 



#### Postup při reverzním pipetování:

Slouží k pipetování vysoce viskózních nebo pěnících kapalin a kapalin s vysokou těkavostí nebo i dávkování velmi malých objemů.

1. Nasadíte špičku na spodní díl pipety a ujistěte se, že je správně upevněna.
2. Před samotným pipetováním špičku 2-3 krát naplňte a vyprázdněte vzorkem, který budete pipetovat. Tento krok je důležitý proto, že po vyprázdnění špičky zůstává vnitřní stěna špičky pokrytá tenkým filmem kapaliny. Pokud byste tento krok vynechali, vyprázdněný objem by byl menší, než je požadovaná hodnota, a snížila by se přesnost pipetování.
3. Nastavte požadovaný objem, který budete pipetovat, opatrným otáčením ovladače (ukazatel bývá umístěn na boku pipety)
4. Při nasávání kapaliny do špičky mějte pipetu vždy svisle. **Pro nasátí kapaliny stiskněte ovladač do druhé polohy, špičku vnořte do kapaliny a pomalu ovladač uvolněte (dojde k nasátí kapaliny do celého objemu špičky).** Poté pipetu se špičkou opatrně vytáhněte z kapaliny tak, že špička se dotýká nádoby, ze které pipetujete – tím odstraníte přebytečnou kapalinu z vnější strany špičky. Zkontrolujte, zda ve špičce nejsou vzduchové bubliny. Pokud ano, může být špička špatně nasazena. Vypusťte kapalinu ze špičky a postup v tomto kroku zopakujte.
6. Při vypouštění kapaliny nakloňte pipetu se špičkou pod mírným úhlem vůči stěně nádoby. Pokud již v nádobě nějaká kapalina je, špička by měla být nad hladinou této kapaliny. **Plynule stiskněte ovladač do první polohy ovladače, čímž dojde k nadávkování požadovaného (nastaveného) objemu kapaliny.** Špičku vytáhněte z nádoby a uvolněte ovladač do základní polohy. Ve špičce zůstane kapalina, kterou můžete využít k opakovanému pipetování do jiných nádobek, nebo stiskem ovladače do druhé polohy můžete všechnu tuto kapalinu ze špičky vypustit.

Video: Postup při reverzním pipetování 

#### Postup při opakovaném pipetování:

Slouží k pipetování stejného objemu stejné kapaliny (rychlejší způsob).

1. Nasadíte špičku na spodní díl pipety a ujistěte se, že je správně upevněna.
2. Před samotným pipetováním špičku 2-3 krát naplňte a vyprázdněte vzorkem, který budete pipetovat. Tento krok je důležitý proto, že po vyprázdnění špičky zůstává vnitřní stěna špičky pokrytá tenkým filmem kapaliny. Pokud byste tento krok vynechali, vyprázdněný objem by byl menší, než je požadovaná hodnota, a snížila by se přesnost pipetování.
3. Nastavte požadovaný objem, který budete pipetovat, opatrným otáčením ovladače (ukazatel bývá umístěn na boku pipety)
4. Při nasávání kapaliny do špičky mějte pipetu vždy svisle. **Pro nasátí kapaliny stiskněte ovladač do druhé polohy, špičku vnořte do kapaliny a pomalu ovladač uvolněte (dojde k nasátí kapaliny do celého objemu špičky).** Poté pipetu se špičkou opatrně vytáhněte z kapaliny tak, že špička se dotýká nádoby, ze které pipetujete – tím odstraníte přebytečnou kapalinu z vnější strany špičky. Zkontrolujte, zda ve špičce nejsou vzduchové bubliny. Pokud ano, může být špička špatně nasazena. Vypusťte kapalinu ze špičky a postup v tomto kroku zopakujte.
6. Při vypouštění kapaliny nakloňte pipetu se špičkou pod mírným úhlem vůči stěně nádoby. Pokud již v nádobě nějaká kapalina je, špička by měla být nad hladinou této kapaliny. **Plynule stiskněte ovladač do první polohy, čímž dojde k nadávkování požadovaného (nastaveného) objemu kapaliny.** Špičku vytáhněte z nádoby a uvolněte ovladač do základní polohy. Špičku umístěte do další nádoby a stisknutím ovladače do první polohy nadávkujte požadovaný objem. Tento postup opakujte tak dlouho, dle požadovaného množství opakování.

#### Postup při pipetování heterogenních vzorků:


Slouží k pipetování vzorků, u kterých není možné provést proplach špičky pipety vzorkem (bod 3 předchozích technik). Jedná se například o vzorky krve.

1. Nasadíte špičku na spodní díl pipety a ujistěte se, že je správně upevněna.
2. Nastavte požadovaný objem, který budete pipetovat, opatrným otáčením ovladače (ukazatel bývá umístěn na boku pipety)
3. Při nasávání kapaliny do špičky mějte pipetu vždy svisle. **Pro nasátí kapaliny stiskněte ovladač do první polohy, špičku vnořte do kapaliny a pomalu ovladač uvolněte (dojde k nasátí požadovaného objemu kapaliny do špičky).** Poté pipetu se špičkou opatrně vytáhněte z kapaliny tak, že špička se dotýká nádoby, ze které pipetujete – tím odstraníte přebytečnou kapalinu z vnější strany špičky. Zkontrolujte, zda ve špičce nejsou



vzduchové bubliny. Pokud ano, může být špička špatně nasazena. Vypusťte kapalinu ze špičky a postup v tomto kroku zopakujte. Otrete špičku suchou buničinou.

5. Při vypouštění kapaliny nakloňte pipetu se špičkou pod mírným úhlem vůči stěně nádoby a **špičku ponořte do kapaliny, která je už v nádobce. Plynule stiskněte ovladač do první polohy, vyčkejte přibližně jednu vteřinu pro vyprázdnění špičky. Ujistěte se, že špička je pod hladinou a ovladač uvolněte do výchozí polohy, ať dojde ke zpětnému nasátí kapaliny do špičky. Opět ovladač stiskněte do první polohy. Tento postup opakujte, dokud nezůstane špička čistá.** Nakonec stiskněte ovladač do druhé polohy k úplnému vypuštění a špičku vytáhněte z kapaliny. Ovladač uvolněte do základní polohy.

Video: Postup při pipetování heterogenních vzorků 


## 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.

### Postup při titrování vzorků:

1. Byretu vypláchněte odměrným roztokem (byrety se totiž uchovávají naplněné destilovanou vodou). Byretu naplňte asi do poloviny odměrným roztokem a podobně jako u pipety pipeta otáčivým pohybem ve vodorovné poloze byrety opláchněte celou vnitřní stěnu, poté roztok vypusťte z byrety přes kohout, aby se i ten propláchl.
2. Takto připravenou byretu upevněte do stojanu tak, aby špička byrety zasahovala asi 1 cm do hrdla titrační baňky.
3. Byretu naplňte odměrným roztokem (z kádinky) pomocí malé nálevky. Dávejte pozor, aby v byretě (obzvláště mezi kohoutem a špičkou) nezůstaly uzavřeny vzduchové bubliny. Byretu naplňte několik milimetrů nad počátek stupnice a **odstraňte nálevku!**
4. Otočením kohoutu byrety vypusťte přebytečný odměrný roztok (do odpadní kádinky) a meniskus nastavte na počátek stupnice. **Takto odpuštěný odměrný roztok již nepoužívejte a nevracejte do zásobní láhve.** Otrete kapku na špičce byrety o vnitřní stěnu odpadní kádinky. V tuto chvíli máte byretu připravenou k titrování.
5. Titraci provádějte tak, že titrační baňku (obsahuje vzorek, indikátor a případně další látky dle pracovního návodu) držíte za hrdlo v šikovější ruce a kruživým pohybem mícháte obsah titrační baňky, zatímco druhou rukou ovládáte kohout byrety.
6. Odměrný roztok můžete ze začátku z byrety přidávat rychleji (místě přítoku odměrného roztoku se titrovaný roztok barví na konečné zbarvení, dochází k lokálnímu přetitrování, mícháním se však toto zbarvení ztrácí). Blížící se bod ekvivalence se projevuje tak, odbarvení se děje pomaleji. V tuto chvíli již přidávejte odměrný roztok po kapkách (pořád přitom mícháte obsah v titrační baňce). Pokračujte tímto způsobem, dokud není zbarvení titrovaného roztoku trvalé (alespoň 30 vteřin). Ze stupnice byrety **odečtete spotřebu na dvě desetinná místa.**
7. Každou titraci **zopakujte alespoň třikrát.** Spotřeby by se neměly lišit o více než 0,10 ml.
8. První, časově náročnou titraci můžete nahradit titrací orientační, kdy odměrný roztok přidáváte z byrety rychle po celou dobu titrace až do konečné změny zbarvení. Tímto způsobem získáme přibližný objem pro dosažení bodu ekvivalence. Při dalších třech titracích pak můžete přidat až 90 % z tohoto rychle a zbytek dotitrovat po kapkách.
9. Po skončení titrací vylejte odměrný roztok z byrety (**nevracejte jej do zásobní láhve**), byretu vypláchněte destilovanou vodou a poté naplňte destilovanou vodou až nad začátek stupnice byrety.

Video: Příprava byrety na titraci 

Video: Správný způsob titrování 

## ***Způsob odečítání objemu***

Kapaliny, smáčeující 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 měřicího 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 – Práce s pipetou – ověření správného pipetování

### Princip:

Jednou ze základních operací v chemických laboratořích je dávkování malých objemů. K tomuto účelu slouží pipety, které jsou kalibrované na vylití. Tyto pipety mohou být skleněné a ty dále dělíme na **dělené skleněné pipety** – mají kalibrovanou stupnici a mohou dávkovat různé objemy a **nedělené skleněné pipety** (Obr. 3.2) – mají kalibrovanou pouze jednu rysku a mohou tak dávkovat jen jeden objem. Výhodou nedělených pipet oproti děleným je vyšší přesnost dávkovaných objemů. Vzhledem k manuální a časové náročnosti práce se skleněnými pipetami je jejich použití již upozaděno a častěji se používají tzv. **mikropipety** (Obr. 3.2). Na horním konci je třípolohový ovladač (tlačítko), který slouží k nasávání nastaveného objemu vzorku do špičky a vypouštění vzorku ze špičky. Pomocí ovladače připojeného k mikrometrickému šroubu je nastavován objem, který bude pipetou nasáván. Spodní díl pipety je tvarován tak, aby na něj mohly být **nasazovány vyměnitelné špičky**, do kterých je vzorek nasáván.

Mikropipeta může být využita nejen k **přímému pipetování** (dávkování zředěných vodných roztoků), což je nejběžnější technika pipetování ale i **reverznímu pipetování** (dávkování viskózních, smáčivých nebo vysoce těkavých kapalin), **opakovanému pipetování** (opakované dávkování stejného objemu) nebo **pipetování heterogenních vzorků** (např. krev).

### Úkol:

- Ověřte preciznost a pravdivost pipetování nedělenou skleněnou pipetou a mikropipetou vážkově
- Ověřte preciznost pipetování mikropipetou fotometricky

### Vážkové ověření preciznosti a pravdivosti pipetování

Vášim úkolem bude ověřit, jak dobře ovládáte práci s nedělenou skleněnou pipetou a mikropipetou s nastavitelným objemem a zda tyto pipety dávkují nastavené objemy. K tomuto účelu budete mít dispozici nedělenou pipetu o objemu 10 ml, mikropipetu s objemem nastavitelným v rozmezí 2 – 10 ml, plastové nádoby a analytické váhy, na kterých budete zjišťovat hmotnost pipetovaných objemů. Pravdivost dávkovaného objemu bude ověřováno vážkově, kdy každý přírůstek objemu bude zvážena a pomocí hustoty vody bude tato hmotnost přepočítána na objem. Vypočtený objem bude poté porovnán s objemem, který pipeta měla dávkovat. Preciznost pipetování bude vyhodnocena na základě opakovaného dávkování objemu pipetou a bude vyjádřena jako odhad směrodatné odchylky.

### Postup:

Nejdříve zvažte na analytických vahách čtyři suché plastové nádoby o objemu 50 ml. Do dvou z nich poté budete pipetovat 10 ml destilované vody pomocí nedělené skleněné pipety. Každý tento přírůstek zvážíte. Do obou nádobek nadávkuje 3 krát po 10 ml destilované vody. To samé zopakujte s mikropipetou, u které nastavíte pipetovaný objem na 10,00 ml. Aby bylo možné přepočítat hmotnost na objem, je nutné znát hustotu vody. Vzhledem k tomu, že hustota je závislá na teplotě, změříte teplotu vody a hustotu vody odečtete z příložené tabulky. V případě, že teplota vody neodpovídá teplotám uvedeným v tabulce, určete hustotu vody při této teplotě interpolací.

$t [^{\circ}\text{C}]$	$\rho_t [\text{g}/\text{cm}^3]$	$t [^{\circ}\text{C}]$	$\rho_t [\text{g}/\text{cm}^3]$	$t [^{\circ}\text{C}]$	$\rho_t [\text{g}/\text{cm}^3]$
17,5	0,998 685	20,0	0,998 203	22,5	0,997 654
18,0	595	20,5	098	23,0	537
18,5	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

Tab. 5: Tabulka hodnot hustoty vody při různých teplotách

Do protokolu zpracujte vaše data ve formě přehledné tabulky s uvedením všech získaných experimentálních dat (hmotností, teploty vody atd.), proveďte test odlehlosti výsledků a srovnajte Vámi zjištěné objemy pipet s deklarovanými objemy (test pravdivosti výsledků) a preciznostmi. Okomentujte, která pipeta poskytuje preciznější a pravdivější výsledky.

Objem pipety/ ml	ČSN 70 4106, třída A	ČSN 70 4106, třída B
<b>Nedělená pipeta, kalibrace na vylití "EX" pro teplotu 20°C</b>		
<b>10</b>	0,015 ml	0,030 ml
<b>Mikropipeta pipeta, odchylky dle výrobce</b>		
<b>10</b>		

Tab. 6: Dovolené odchylky dávkovaných objemů pro pipety

### Fotometrické a kolorimetrické ověření preciznosti pipetování

Vaším úkolem bude ověřit preciznost Vašeho pipetování fotometrickým stanovením. Pro tyto účely budete mít k dispozici mikropipety a spektrofotometr. Preciznost pipetování bude hodnocena na základě změření kalibračních roztoků o různé koncentraci Mn a vzorku o neznámé koncentraci Mn.

#### Postup:

Ze zásobního roztoku  $\text{KMnO}_4$  o přibližné koncentraci 0,01 mol/l připravte kalibrační roztoky následujícím způsobem. Do čtyř 50ml odměrných baněk napipetujte 0-100-200-500 ul zásobního roztoku  $\text{KMnO}_4$ . Odměrné baňky doplňte destilovanou vodou po rysku. Obsah v odměrných baňkách dobře promíchejte a změřte.

#### Absorbanční měření:

Podle návodu u spektrofotometru nastavte vlnovou délku 570 nm. Kalibračním roztokem s nejnižší koncentrací Mn (kalibrační blank) vypláchněte několikrát skleněnou kyvetu a poté ji naplňte ji asi do 2/3 objemu. Kyvetu držte vždy za ty stěny, přes které při měření neprochází paprsek světla (jsou zpravidla matované) a po nalití roztoku kyvetu otřete kouskem buničité vaty. Druhou kyvetu stejným způsobem naplňte deionizovanou vodou. Nastavte nulovou polohu (pomocí kyvetu s deionizovanou vodou), poté do měřicího prostoru vkládejte kyvetu s jednotlivými kalibračními roztoky a proměřte jejich absorbanci. Postupujte vždy od nejnižší po nejvyšší koncentraci.

Sestrojte graf závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci Mn (v mg/l) a body proložte přímkou. Kalibrační graf přiložte k protokolu.

### Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Hmotnost lahvíček před a po přidavcích, a vypočtené nadávkované objemy (Tab. 3.3.). K průměrným hodnotám nadávkovaných objemů uveďte i odhady směrodatných odchylek.
  - S využitím testu pravdivosti výsledků rozhodněte, zda použité pipety dávkují objem správně. Pokud ne, zdůvodněte proč.
  - Navážku  $\text{KMnO}_4$  pro fotometrické a kolorimetrické ověření preciznosti pipetování
  - Tabulku s přesnými koncentracemi Mn v kalibračních roztocích vycházejícími z navážky  $\text{KMnO}_4$  a naměřenými absorbancemi (Tab. 3.4)
  - Dosazené hodnoty do vzorců nutných pro výpočty
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

č. měření	hmotnost před přídavkem	hmotnost po přídavku	hmotnost přídavku	teplota vody	hustota vody	nadávkový objem
	[g]	[g]	[g]	[°C]	[g.cm <sup>-3</sup> ]	[ml]
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Průměr						
Odhad směrodatné odchylky						

Tab. 6: Vzorová tabulka pro zpracování dat získaných vážením

kalibrační roztok č.	V (KMnO <sub>4</sub> ) [μl]	c (Mn) [mg/l]	A [a.u.]
1			
2			
3			
4			

Tab. 7: Vzorová tabulka pro absorbanční měření kalibrace

# Vázková analýza

(Gravimetrie)

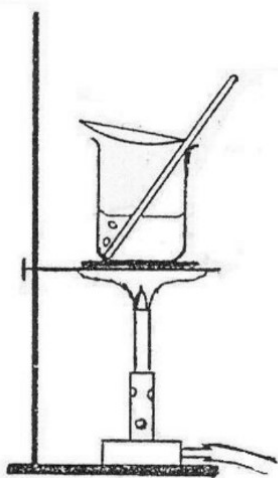
## Princip:

Zkoumaná látka (analyt) se vyloučí ve formě málo rozpustné sloučeniny (vylučovací forma) a tato se převede ztláčením 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 částic sraženiny) a inkluze (uzavření matečného roztoku do rostoucích částic 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 (Obr. 8). 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 vyčefeného 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.



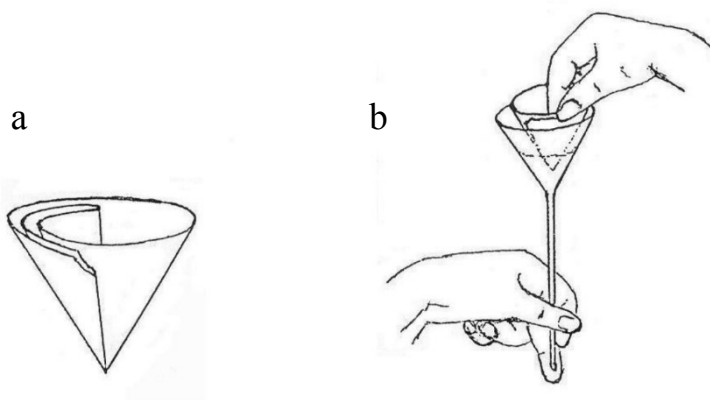
Obr. 8: Zahřívání roztoku před srážením

## 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 krabici. Pro nejjemnější sraženiny (např.  $\text{BaSO}_4$ ) se používá hustý filtr, značený modrou páskou nebo dodávaný v modré krabici. Středně husté filtry jsou ve žluté krabici (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 (Obr. 9 a). 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 (Obr. 9 b). 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 odteče. 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 jednoduše vrstvy papíru, který by způsobil odtečení 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.



Obr. 9: Správné složení papírového filtru (a), vložení filtru do nálevky (b)

### *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  $100 - 130^\circ\text{C}$ . Porcelánové filtrační kelímky lze po vysušení i žíhat v ochranné místičce. Filtrace kelímky se provádí za sníženého tlaku (odsáváním) a je proto rychlejší než filtrace papírovým filtrem. Kelímkem 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.

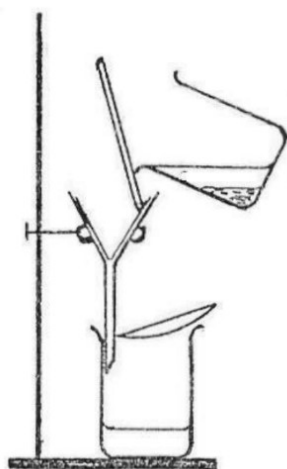
### *Filtrace*

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

(Obr. 10). 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**, tj. na sraženinu v kádince nalijeme předepsané množství promývacího roztoku (vizte 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 vytřeme kousky filtračního papíru, které spálíme spolu s filtrem s hlavním podílem sraženiny. Sraženinu na filtru nakonec ještě zbváme posledních zbytků matečního louhu promýváním promývacím roztokem (vyžaduje-li to návod).



Obr. 10: Filtrace sraženiny pomocí filtračního papíru

## Sušení, spalování, žíhání

Promyté, vlhké sraženiny je pro účely vázkové analýzy nutné převést na látky o konstantním a přesně definovaném složení, tj. na vážitelnou formu. Děje se tak žíháním nebo sušením sraženin. *Papírový filtr* se sraženinou se spaluje a sraženina se následně žihá v glazovaných porcelánových kelímcích. Kelímek se před použitím musí vyčistit a **vyžítat 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 žihány resp. sušeny **za stejných podmínek**, za jakých budou žihány resp. sušeny sraženiny.

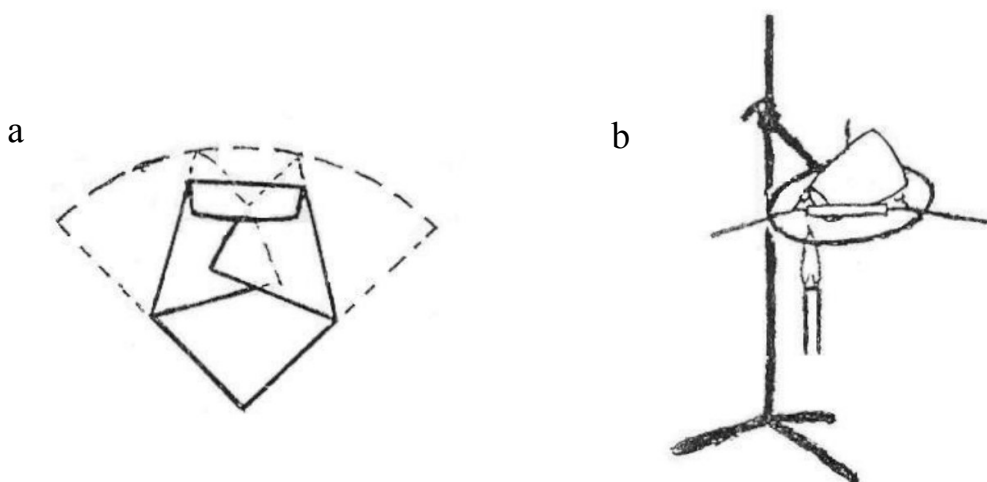
Papírový filtr povytáhneme z nálevky za volný, min. 5 mm široký okraj na straně trojitě vrstvy (nejlépe nehtem palce), necháme odtéct roztok ze stonku a odkapat poslední kapky z filtru. Potom opatrně složíme filtr na čtvrtku (jednoduchou vrstvou papíru směrem k sobě), přehneme oba rožky a nakonec ještě otevřenou stranu: vznikne pětiúhelník (Obr. 11 a). Tento vložíme do zváženého porcelánového kelímku špičkou napřed a mírně jej přimáčkeme 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 (Obr. 11 b). 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 sklíčko, 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 plamenu 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 nezchášel. Dno kelímku by mělo být asi 2 cm nad modrým studeným kuželem 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 30 min. 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.

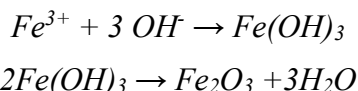


Obr. 11: Skládání filtru se sraženinou po skončení filtrace (a); spalování papírového filtru se sraženinou (b)

## Úloha č. 4 - Stanovení železa v pigmentu jako Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

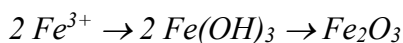
### Princip:

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<sup>3+</sup> se amoniakem sráží Fe(OH)<sub>3</sub> který se vyžihá na vážitelnou formu Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



**Úkol:** Stanovte, kolik hmotnostních procent železa je obsaženo ve vzorku železitého pigmentu.

### Stechiometrie a výpočty:



$$\frac{n(\text{Fe})}{n(\text{Fe}_2\text{O}_3)} = 2 \quad \Rightarrow \quad n(\text{Fe}) = 2 \times n(\text{Fe}_2\text{O}_3)$$

$$n = \frac{m}{M} \quad \Rightarrow \quad m(\text{Fe}) = 2 \times \frac{M(\text{Fe})}{M(\text{Fe}_2\text{O}_3)} \times m(\text{Fe}_2\text{O}_3)$$

$$M(\text{Fe}) = 55,847 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}, \quad M(\text{Fe}_2\text{O}_3) = 159,692 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

### Pracovní postup:

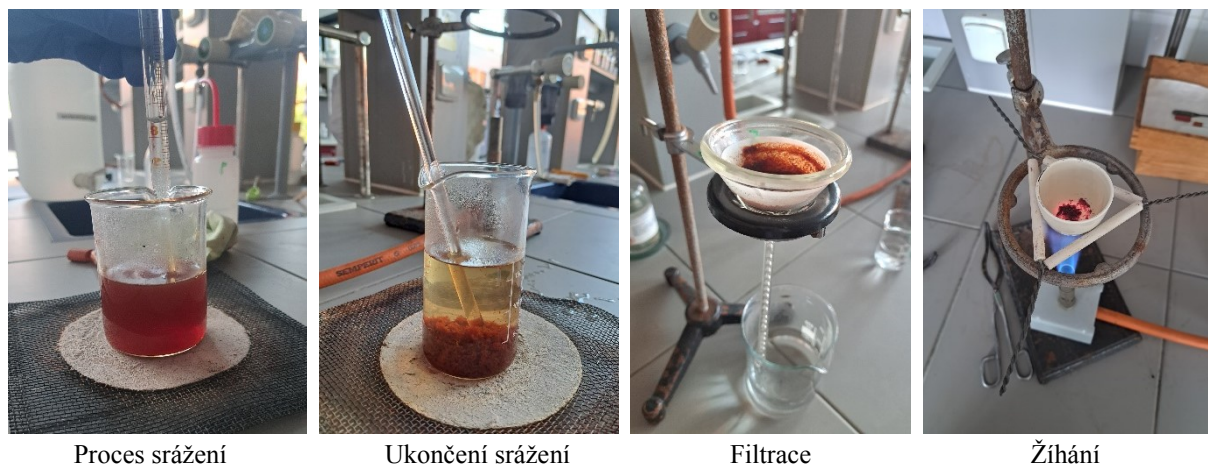
Před vlastní analýzou připravíme porcelánový kelímek. Vybereme si čistý a neporušený kelímek, který je na neglazovaném dně popsán grafitovou tužkou, a jeho označení si zapíšeme. Kelímek umístíme do trianglu a nejprve mírným plamenem vyhřejeme, aby neprasknul. Po dostatečném zahřátí postavíme kahan pod 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). Po vychladnutí kelímek zvážíme.

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 **ještě v digestoři**, převedeme obsah kvantitativně do kádinky objemu 250 ml, zředíme na cca 150 ml destilovanou vodou, přidáme 10 ml 10% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a zahříváme téměř k varu. Případnou hydrolyzu soli Fe<sup>3+</sup> (projevuje se oranžovým až červenohnědým zbarvením roztoku, přecházejícím na červenohnědou sraženinu) potlačíme přidávkou malého množství 2M HCl. Před vlastním srážením musí být roztok žlutý a čirý.

Při prvních náznacích varu přerušíme zahřívání a srážíme 2M NH<sub>3</sub>. 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<sub>3</sub> můžeme zrychlit. Srážení ukončíme, je-li amoniak z roztoku zřetelně cítit. Při správném postupu se sraženina Fe(OH)<sub>3</sub> rychle sbalí, tj. 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 horkým 1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a po převedení na filtr se promývá stejným roztokem. 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 vyžihaného a zváženého 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 (wt %).



Obr. 12: Různé fáze gravimetrického stanovení železa: srážení, filtrace a žihání  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ .

Video: Srážení – přidávání  $2\text{M NH}_3$  po kapkách za míchání roztoku



## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Hmotnost prázdného, vyžehaného kelímku
  - Navážku pigmentu
  - Hmotnost vyžehaného  $\text{Fe}_2\text{O}_3$
  - Dosazené hodnoty do vzorců nutných pro výpočty
  - **Výsledek hmotnostních procent železa** v pigmentu
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

# Odměrná analýza

(titrace, volumetrie)

## Úvod:

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**, tj. 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 indukujícího 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).

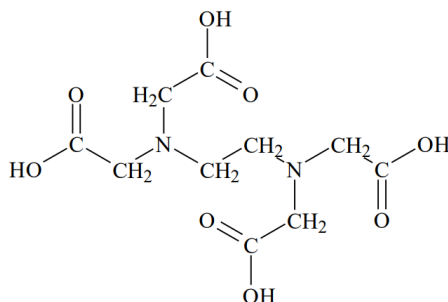
Při vlastním stanovení jsme někdy nuceni postupovat tak, že stanovovanou látku přidáváme k nadbytku titračního činidla (např. při pomalé nebo neúplné reakci, při titraci těkavé látky apod.) a přebytek činidla zpětně titrujeme jiným vhodným činidlem. Takovéto titrace se nazývají **zpětné titrace**.

**Titraci každého vzorku provádíme opakovaně, zpravidla alespoň 3x** tak, aby se zjištěné spotřeby od sebe významně nelišily (rozdíly mezi jednotlivými titracemi **v rámci 0,1 ml**). Pro výpočty bereme průměrnou hodnotu z těchto (minimálně) tří titrací.

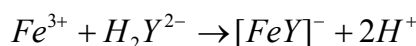
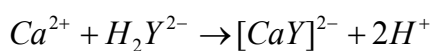
# Chelatometrie

## Princip:

Chelatometrické titrace jsou zvláštní případ komplexometrických titrací, kdy reagují ionty kovů s činidlem za vzniku chelátů. Činidlem je nejčastěji kyselina ethylendiamintetraoctová  $H_4Y$ , ve zkratce EDTA, používaná ve formě disodné soli  $Na_2H_2Y$  s obchodním názvem Chelaton 3,  $(HOOC-CH_2)_2N-CH_2-CH_2-N(CH_2COONa)_2$ .



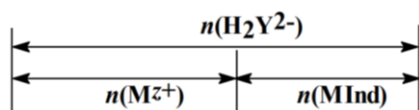
Stanovovaný kation kovu reaguje s činidlem za vzniku málo disociovaného, ve vodě rozpustného komplexu, vždy v molárním poměru 1:1.



Při reakci se uvolňují protony, takže průběh reakce je ovlivněn hodnotou pH. **Chelatometrické reakce se proto provádějí v přítomnosti pufru** takové hodnoty pH, která spadá do oblasti optimální stability daného komplexu. Komplexy dvojmocných kationtů jsou stálé v alkalickém a slabě kyselém prostředí, komplexy výšemocných kovů jsou stálé 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 vytěšňován 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.



Obr. 13: Grafické znázornění chelatometrické titrace

## Úloha č. 5 - Chelatometrická titrace - stanovení Ca a Mg ve vodách a vápenatých schránkách živočichů

### Princip:

Chelatometrie je spolehlivou metodou pro stanovení iontů vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a hořčíku ( $\text{Mg}^{2+}$ ) jak samostatně, tak ve směsi. Vhodnou volbou pH lze stanovit koncentraci těchto kovů, například pomocí Chelatonu 3. Běžně se stanovuje součet koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  v prostředí amoniakálního tlumivého roztoku při  $\text{pH} \approx 10$ , kdy oba ionty tvoří cheláty s Chelatonem 3, za použití indikátoru Eriochromová čerň T. Pro stanovení samotného vápníku se titruje v silně zásaditém prostředí ( $\text{pH} \approx 12$ ), kde je hořčík vysrážen ve formě  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  a s chelatonem tak nereaguje. K titraci  $\text{Ca}^{2+}$  se používá indikátor Murexid. Rozdíl mezi výsledky obou titrací umožňuje vypočítat koncentraci hořečnatých iontů ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

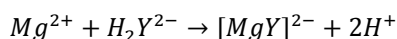
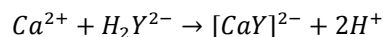
Pitná voda	mmol/l
velmi tvrdá	>3,75
tvrdá	2,5 - 3,75
středně tvrdá	1,25 - 2,5
měkká	0,5 - 1,25
velmi měkká	<0,5

Tab. 8: Stupně tvrdosti pitné vody

### Úkol:

- Stanovte obsah vápníku a hořčíku ve vzorku vody a ze součtu koncentrací Ca a Mg v  $\text{mmol.l}^{-1}$  určete tvrdost vody dle Tab. 8
- Stanovte procentuální obsah Ca ve vzorku vápenaté schránky a přepočítejte na obsah  $\text{CaCO}_3$  v %.

### Stechiometrie a výpočty:



Titrace směsi  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  na Eriochromčerň T:  $n_{\text{CH3}} = n_{\text{Ca}} + n_{\text{Mg}}$

Titrace  $\text{Ca}^{2+}$  na Murexid:  $n_{\text{CH3}} = n_{\text{Ca}}$

$$m_{\text{Ca}} = M(\text{Ca}) \times c_{\text{CH3}} \times V_{\text{CH3}}$$

$$\text{wt}\% (\text{CaCO}_3) = \frac{m(\text{CaCO}_3)}{m(\text{vzorku})} \times 100$$

### Pracovní postup:

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

$$M[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2] = 331,20 \text{ g.mol}^{-1}$$

Navážku  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , potřebnou k přípravě 100 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  roztoku, rozpustíme ve vodě, předem okyselené 2 - 3 kapkami  $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$  [zabrání hydrolyze  $\text{Pb}^{2+}$ , která znemožňuje úplné rozpuštění  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ]. 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  $0,05\text{M Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  do citrónově žlutého zbarvení. Vypočítáme přesnou látkovou koncentraci  $0,05\text{M Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ .

## **Analyza 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  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  a vápník titrujeme selektivně na indikátor murexid. V druhém alikvotním podílu vzorku titrujeme v amoniakálním tlumiči sumu  $\text{Ca} + \text{Mg}$  na eriochromčern T. Z rozdílu spotřeb na oba indikátory zjistíme spotřebu na Mg. Součet koncentrací  $\text{Ca}$  a  $\text{Mg}$  v  $\text{mmol.l}^{-1}$  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  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  vypočítáme hmotnostní koncentraci  $\text{Ca}$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  a v  $\text{mmol.l}^{-1}$ .

### *Titrace Ca + Mg*

Opět pipetujeme 25 ml vzorku, zředíme na 100 - 150 ml, přidáme 5 ml amoniakálního tlumiče a eriochromčern T do slabě fialově červeného zbarvení. Titrujeme do jasně modré barvy. Z rozdílu spotřeb titrace sumy  $\text{Ca} + \text{Mg}$  a titrace  $\text{Ca}$  vypočítáme hmotnostní koncentraci  $\text{Mg}$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  a také v  $\text{mmol.l}^{-1}$  a v protokolu uvedeme také celkovou tvrdost vody v  $\text{mmol.l}^{-1}$  dle tabulky 4.1.

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

$$M(\text{CaCO}_3) = 100,09 \text{ g.mol}^{-1}$$

Princip stanovení obsahu  $\text{Ca}$  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 odvážený 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  $\text{Ca}$  není na závadu (zbývající organické látky vytvářejí žlutě zbarvené sloučeniny, patrně 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  $\text{HNO}_3$ . 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 vyčechení 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  $\text{Ca}$  20 ml a dále postupujeme jako při stanovení  $\text{Ca}$  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  $\text{Ca}$  ve vzorku a odhad směrodatné odchylky a také přepočteme na obsah  $\text{CaCO}_3$  v %.

## **Protokol:**

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Navážku  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , spotřeby titrací pro standardizaci
  - Výpočet přesné látkové koncentraci 0,05M  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ , včetně směrodatné odchylky (SD)
  - Původ vzorku vody, spotřeby titrací pro stanovení  $\text{Ca}$  a  $\text{Mg}$  ve vodě
  - **Výpočty obsahu  $\text{Ca}$  a  $\text{Mg}$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  a také v  $\text{mmol.l}^{-1}$  včetně SD, určení stupně tvrdosti vody**
  - Název a navážku vzorku vápenaté schránky
  - Dosazené hodnoty do vzorců nutných pro výpočty, stanovení obsahu  $\text{Ca}$  včetně SD
  - **Výpočet hmotnostních procent  $\text{CaCO}_3$  ve vzorku**
- **Závěr**

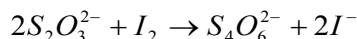
# Redoxní titrace - jodometrie

## Princip:

Jodometrické titrace patří mezi titrace oxidimetrické, kdy využíváme **redoxních** reakcí mezi elementárním jodem (resp. trijodidovým iontem  $I_3^-$ ) 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  $I_3^-$ . Jodem můžeme oxidovat například ionty cínaté, arsenitany, sulfidy, siřičitany, thiosírany 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).

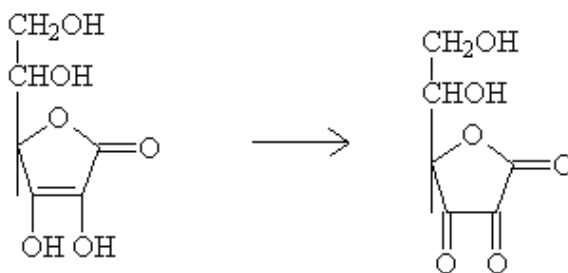
Pro indikaci bodu ekvivalence lze využít vlastního zbarvení trijodidového iontu, který je ve zředěných roztocích žlutě zbarven. Mnohem citlivější je však použití škrobu, který s jodem poskytuje intenzivně modře zbarvený komplex. V případě titrací thiosíranem (stanovení oxidovadel) se nejprve titruje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

**Přímá jodometrie** označuje metodu, kdy používáme **odměrný roztok jodu** jako oxidační činidlo. Při **nepřímé jodometrii** stanovovaná látka (oxidovadlo) **vyloučí** z roztoku jodidu, který je v nadbytku, **ekvivalentní množství jodu**, které se poté stanoví titrací – nejčastěji **odměrným roztokem thiosíranu**. Ten se jodem oxiduje na tetrathionan podle rovnice



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 ( $NaHCO_3$ ). 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.

**V této úloze budeme stanovovat obsah vitamínu C pomocí redoxních titrací (nepřímé a zpětné).** Kyselina askorbová ( $C_6H_8O_6$ ) známá též jako vitamín C, je vitamínem rozpustným ve vodě. Její obsah v ovoci a zelenině se skladováním mění. Pro zajištění přísunu vitamínu C do organismu je potřeba využít koncentrovanější formu, například doplňky stravy. Kyselina askorbová (vitamín C) se oxiduje v kyselém prostředí jodem na kyselinu dehydroaskorbovou:





## Úloha č. 6 - Jodometrická titrace - stanovení vitamínu C v ovoci, vitamínovém preparátu

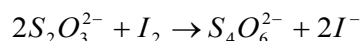
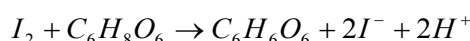
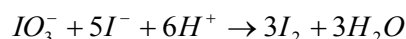
### Princip:

Při zpětné titraci (retitraci), nejprve k roztoku obsahujícímu kyselinu L-askorbovou přidáme **nadbytek jodičnanu draselného**, který spolu s jodidem v kyselém prostředí vytváří jod – ten ihned reaguje s kyselinou L-askorbovou a **jeho nadbytek se stanoví retitrací thiosíranem**. Jako indikátor použijeme škrob, který se přidává těsně před bodem ekvivalence, a z modrého zbarvení pokračujeme v titraci do odbarvení roztoku. Z poměru látkových množství jodičnanu, jodu a vitamínu C lze dopočítat obsah kyseliny L-askorbové ve vzorku.

### Úkol:

- Stanovte obsah vitamínu C v ovoci a vitamínovém preparátu pomocí zpětné titrace
- Porovnejte získané výsledky pro vitamínový preparát s deklarovanou hodnotou pomocí testu pravdivosti výsledku

### Stechiometrie a výpočty:



Celkové látkové množství vytvořeného jodu:

$$n(I_2, \text{celkový}) = 3 \times n(IO_3^-) \quad \rightarrow \quad n(I_2, \text{celk}) = 3 \times c(IO_3^-) \times V(IO_3^-)$$

Nezreagované látkové množství jodu:

$$n(I_2, \text{nezreagovaný}) = \frac{1}{2} n(S_2O_3^{2-}) \quad \rightarrow \quad n(I_2, \text{nezreag}) = \frac{1}{2} c(S_2O_3^{2-}) \times V(S_2O_3^{2-})$$

Množství vitamínu C:

$$n(C_6H_8O_6) = n(I_2, \text{zreagovaný}) \quad \rightarrow \quad m(C_6H_8O_6) = M(C_6H_8O_6) \times [n(I_2, \text{celk}) - n(I_2, \text{nezreag})]$$

$$M(C_6H_8O_6) = 176,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$M(KIO_3) = 214 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

### Pracovní postup:

#### Příprava odměrných roztoků jodičnanu $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických vahách odvažte přesně asi 0,5 – 0,55 g jodičnanu draselného, spláchněte kvantitativně do kádinky a rozpustěte ve vodě. Po kvantitativním převedení do odměrné baňky objemu 100 ml doplňte vodou po rysku a promíchejte ( $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Z připraveného roztoku napipetujte 10 ml do odměrné baňky na 250 ml, doplňte vodou po rysku a promíchejte ( $0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Z navážky, objemu roztoku a ředění vypočtete přesnou koncentraci odměrného roztoku, kterou použijete při výpočtu obsahu vitamínu C ve vzorcích.

### **Standardizace 0,05M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na jodičnan draselný**

Do titrační baňky (100ml) napipetujte 4,00 ml  $0,001\text{mol.l}^{-1}$  roztoku  $\text{KIO}_3$ , přidejte 5 ml 10% KI, okyselte 10 ml 2M HCl a ihned titrujte 0,05M roztokem thiosíranu až do slabě žlutého zbarvení. Poté přidejte 2 ml roztoku škrobu a dotitrujte modrý roztok do odbarvení. Ze spotřeb vypočtete přesnou koncentraci odměrného roztoku.

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

Tabletku vitamínového preparátu s deklarovaným obsahem vitamínu C nechte rozpadnout v menším množství vody. Některá pojiva v tabletě mohou způsobovat, že tableta není zcela rozpuštěna, nerozpuštěné části tablety rozdrťte tyčinkou a poté převed'te do odměrné baňky a doplňte na 100 ml vodou. Po promíchání nechte hlavní podíl plniv tablety usadit a poté pipetujte do titrační baňky 10,00 ml roztoku vzorku. Zřed'te asi na 50 ml, k roztoku přidejte 5 ml 10% KI (odměrným válcem) a 5,00 ml  $0,025\text{mol.l}^{-1}$  odměrného roztoku  $\text{KIO}_3$  (pipetou). Poté ihned titrujte odměrným roztokem thiosíranu do slabě žlutého zbarvení, před bodem ekvivalence přidejte 2 ml roztoku škrobu a titrujte do odbarvení roztoku. Stanovení proved'te nejméně třikrát. Vypočtete průměr a odhad intervalu spolehlivosti. Výsledek uveďte v mg vitamínu C v tabletě. Dále proved'te test shodnosti výsledků analýzy a deklarovaného obsahu vitamínu C v tabletě.

### **Stanovení vitamínu C v ovoci**

Vzorek ovoce je nejprve nutno připravit pro analýzu. 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 vnáší jen malou (akceptovatelnou) chybu.

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

Ze vzorku pipetujte 10 nebo 20 ml (podle získaného objemu šťávy tak, aby bylo možné provést alespoň 3 opakované titrace - pipetovaný objem si poznamenejte!) do titrační baňky, okyselte 0,3M roztokem kyseliny sírové, přidejte 5 ml 10% KI a 10,00 ml odměrného roztoku  $\text{KIO}_3$ . Poté ihned titrujte odměrným roztokem thiosíranu do slabě žlutého zbarvení, před bodem ekvivalence přidejte 2 ml roztoku škrobu a titrujte do odbarvení roztoku. Stanovení proved'te nejméně třikrát. Vypočtete medián a odhad intervalu spolehlivosti. Výsledek vyjádřete v mg vitamínu C ve 100 ml šťávy (tj. asi 100 g konzumního podílu ovoce).

## **Protokol:**

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Navážku  $\text{KIO}_3$ , výpočet přesného látkového množství  $\text{KIO}_3$
  - Spotřeby standardizace  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , výpočet přesné koncentrace, SD
  - Dosazení a výpočet pro nepřímou titraci, SD měření
  - Proved'te test pravdivosti výsledku pro obsah vitamínu C v tabletě
  - **Výsledek obsahu vitamínu C uvádějte v mg/tabletu či mg/100 ml šťávy**
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

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

## Statistické vyhodnocení výsledků

vizte strana 3

## Argentometrické stanovení obsahu chloridů v moči

### Princip:

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

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

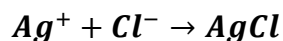
V této úloze provedete argentometrické stanovení obsahu chloridů ve vzorku moči, a to metodou kalibrační závislosti. Údaje o spotřebě odměrného roztoku (objem) nám nahradí některou z veličin v instrumentálních analytických metodách (například absorbanci ve spektrofotometrii). Pro stanovení použijete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

**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.

### Úkol:

- Stanovte argentometricky obsah chloridů ve vzorku moči na dva různé indikátory
- Porovnejte získané výsledky pro indikátor fluorescein a chroman draselný, zda jsou shodné

### Stechiometrie a výpočty:



V bodě ekvivalence platí:

$$n_{Cl} = n_{Ag}$$

$$m_{Cl} = c_{Ag} \times V_{Ag} \times M_{Cl}$$

Rovnice kalibrační závislosti obecně:  $y = ax + b$

Rovnice kalibrační závislost  $V_{Ag}$  vs  $m_{Cl}$ :  $V_{Ag} = am_{Cl} + b$

## Pracovní postup:

### *Kalibrační závislost:*

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

Do titrační baňky pipetujte automatickou pipetou 1,0 ml standardního roztoku chloridu, zředěte 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 запиšte 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, vypočítejte 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 napipetujte 2 ml do titrační baňky, zředěte 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 přepočítejte spotřeby roztoku  $\text{AgNO}_3$  na obsah chloridů v titrovaném množství vzorku (v mg) a přepočítejte 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 přepočítejte podle objemu sbírané moči (zadá vedoucí cvičení) na látkové množství vyloučených chloridů za 24 hodin a rozhodněte, zda spadá do fyziologického rozmezí.

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Dosazené hodnoty do vzorců nutných pro výpočty
  - Navážku NaCl, výpočet přesné koncentrace chloridů
  - Spotřeby  $\text{AgNO}_3$  pro kalibrační závislost (Tab. 13) i pro titrace neznámých vzorků (Tab. 14)
  - Dosazení do vzorců nutných pro výpočet a výpočet pro nepřímou titraci, SD měření
  - Proveďte test shodnosti výsledku pro množství  $\text{Cl}^-$  zjištěných indikací na fluorescein a na chroman
  - **Výsledek koncentrace chloridů přepočítejte podle objemu sbírané moči (zadá vedoucí cvičení) na látkové množství vyloučených chloridů za 24 hodin a rozhodněte, zda spadá do fyziologického rozmezí.**
- 
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

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

Tab. 13: Vzorová tabulka pro kalibrační závislost

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						
...						
...						
X	---	---		---	---	
s	---	---		---	---	
s <sub>r</sub>	---	---		---	---	
t-test						

Tab.14: Vzorová tabulka pro titraci vzorků

# Spektrofotometrie

Spektrofotometrie (molekulová absorpční spektrometrie v oblasti elektronických spekter) patří mezi optické analytické metody, využívající absorpci záření molekulami analytu či jiné sloučeniny obsahující analyt. Absorpce záření o určité vlnové délce ve viditelné oblasti spektra se projevuje jako barevnost látky (látky má zbarvení komplementární k absorbované barvě záření). Záření je absorbováno elektronem v molekule absorbující látky a dochází k excitaci elektronu z energeticky chudšího molekulového orbitalu do orbitalu o vyšší energii, podobně jako je tomu při absorpci záření elektronem v atomu (atomová absorpční spektrometrie, AAS). Energie excitovaného elektronu se potom mění na tepelnou energii, tedy neuspořádaný pohyb molekul. Prochází-li monochromatický paprsek o původní intenzitě  $\Phi_0$  vrstvou absorbujícího prostředí o tloušťce  $l$ , zeslabí se vlivem absorpce intenzita paprsku na hodnotu  $\Phi$ . Míru absorpce záření lze popsat pomocí propustnosti (transmitance)  $T$

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

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

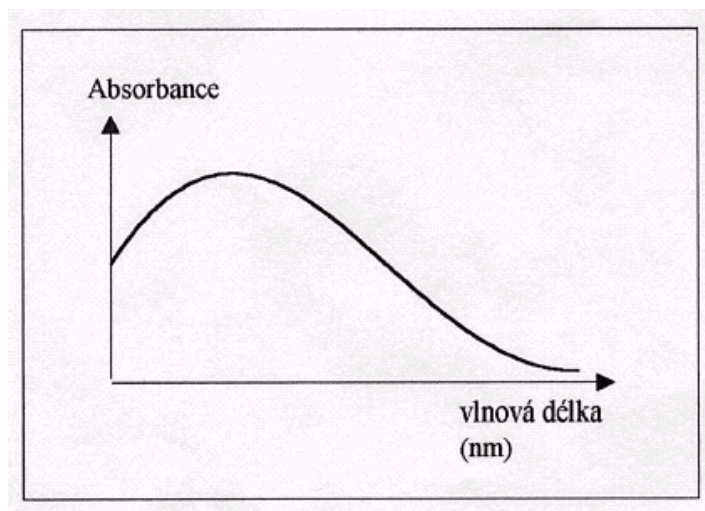
$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi}$$

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

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

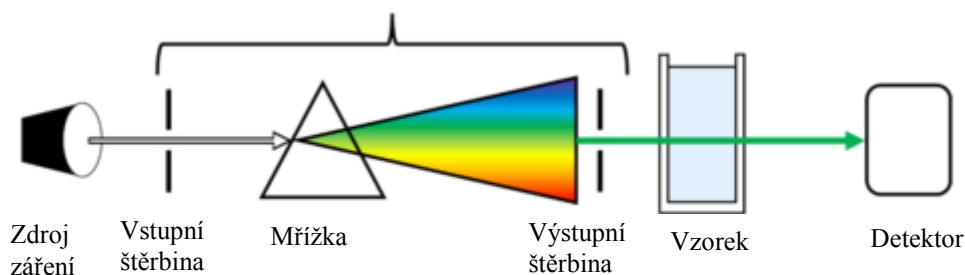
Konstanta  $\varepsilon$  je tzv. molární absorpční koeficient ( $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), charakterizující míru absorpce záření dané látky v roztoku jednotkové molární koncentrace o šířce absorbující vrstvy 1 cm. Velikost koeficientu je závislá na vlnové délce. Výše uvedená rovnice se označuje jako Lambert - 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 (Obr. 14), což je závislost absorpce roztoku na vlnové délce záření.



Obr. 14: Znárodnění absorpční křivky

V experimentálním uspořádání spektrofotometrických měření (Obr. 15) 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.)



Obr. 15: Schematické znázornění fotometru

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 absorpance roztoku s použitým činidlem.

Pro kvantifikaci obsahu analytu ve vzorku lze použít metodu kalibrační závislosti, která je v určitém rozmezí absorpance lineární a zpravidla prochází nulou (roztok bez analytu neabsorbuje záření) a získáme ji změřením absorpance sady kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci analytu. V lineární oblasti odezvy lze použít také metodu přidavku standardu (nesprávně "metoda standardního přidavku"), kdy změříme absorpaci vzorku a dále absorpaci vzorku se známým přidavkem standardu. Z rozdílu obou hodnot absorpance 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.

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

## Princip:

Pro stanovení nízkých koncentrací železa ve vzorcích přírodních vod se využívá červeně zbarvený, velmi stabilní **komplex  $\text{Fe}^{2+}$  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.

## Úkol:

- Změřte absorbanční spektrum komplexu Fe(II) s 1,10-fenanthrolinem
- **Stanovte koncentraci Fe ve vzorku vody metodou kalibrační přímky a metody přidavku standardu**

## Pracovní postup:

### Příprava standardních kalibračních roztoků:

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

Do řady 25 ml odměrných baněk pipetujte 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 ml standardního roztoku Fe o koncentraci  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ , do každé baňky poté přidejte 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 doplňte destilovanou vodou po značku a obsah promíchejte. Před vlastním měřením nechte reagovat přibližně 15 minut.

### Příprava vzorku vody pro vyhodnocení metodou kalibrační závislosti:

Ze vzorku vody odpipetujte 10 ml do odměrné baňky objemu 25 ml a dále postupujete stejně, jako při přípravě kalibračních roztoků (tj. přídavek octanu sodného, hydroxylamin hydrochloridu, 1,10-fenanthrolinu, doplnění po značku destilovanou vodou a promíchání). Před vlastním měřením nechte 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 využijete pro vyhodnocení i metodou přidavku standardu.

Vzorek s přidavkem standardu připravíte 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 doplňte vodou po značku a promíchejte. Před vlastním měřením nechte reagovat přibližně 15 minut.

## Změření absorpčního spektra:

Kalibračním roztokem s nejvyšší koncentrací Fe vypláchněte několikrát skleněnou kyvetu a naplňte ji asi do 2/3 objemu. Kyvetu držte vždy za ty stěny, přes které při měření neprochází paprsek světla (zpravidla matované) a po nalití roztoku kyvetu otřete kouskem buničité vaty. Druhou kyvetu stejným způsobem naplňte slepým pokusem (kalibrační roztok o nulové koncentraci Fe). Podle návodu u spektrofotometru nastavíte vlnovou délku



430 nm, dále nulovou polohu přístroje a po zařazení kyvety s barevným roztokem odečtete absorbanci. Poté změňte vlnovou délku o 10 nm a nastavení nulové polohy a odečet absorbance barevného roztoku opakujte až k vlnové délce 600 nm.

Ze získaných párů hodnot (vlnová délka - absorbance) sestrojte absorpční křivku a odečtete vlnovou délku maxima absorbance. Při této vlnové délce proveďte všechna další měření. Absorpční křivku přiložte k protokolu.

### Měření absorbance připravených roztoků a vyhodnocení:

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

Sestrojte graf závislosti absorbance kalibračních roztoků na absolutním množství Fe (v  $\mu\text{g}$ ) a body proložte přímkou. Z kalibrační závislosti odečtete obsah Fe v pipetovaném množství vzorku vody a přepočtete na koncentraci v  $\text{mg.l}^{-1}$ . Kalibrační graf přiložte k protokolu.

Absorbanci vybarveného roztoku vzorku a vzorku s přidavkem standardu použijte pro výpočet obsahu Fe metodou přidavku standardu, a to graficky nebo počtetně. Pro grafické zpracování sestrojte 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 získáte v průsečíku přímky s osou  $x$  zápornou hodnotu obsahu Fe v pipetovaném množství vzorku, které opět přepočtete na koncentraci v  $\text{mg.l}^{-1}$ . Počtetně lze postupovat tak, že od absorbance vzorku s přidavkem odečtete 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 vypočítáte množství Fe přímou úměrou a opět přepočtete na koncentraci. Grafické či početní vyhodnocení uvedete 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 uveďte v protokolu do tabulky a pro každý změřený kalibrační roztok proveďte výpočet molárního absorpčního koeficientu komplexu a jeho průměrnou hodnotu.

### Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Výpočet přesné koncentrace zásobního roztoku Fe
  - Tabulka s přesným množstvím Fe v kalibračních roztocích, koncentrací komplexu, naměřených absorbancích (Tab. 15)
  - Tabulka s absorbancemi neznámého vzorku a vypočtenou koncentrací, vzorový výpočet.
  - Výpočet koncentrace vzorku metodou přidavku standardu
  - **Výsledek koncentrace Fe ve vzorku vody zjištěný pomocí kalibrační závislosti a metody přidavku standardu**
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

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	-	-	-	

Tab. 15: Vzorová tabulka pro kalibraci

# Úloha č. 9 - Spektrofotometrické stanovení Cu v hliníkové slitině

## Princip:

Metoda je založena na rozkladu vzorku v směsi kyselin za zvýšené teploty. Meďnaté kationty přítomné v rozloženém vzorku vytváří s kuprizonem v prostředí citronanu amonného tmavomodrý komplex, jehož intenzita je přímoúměrná koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  ve vzorku. Absorbance vzniklého tmavomodrého komplexu je měřena při vlnové délce 600 nm.

Slépý pokus (blank vzorku), který v této úloze budete připravovat, je vzorek, který se připravuje stejným postupem jako neznámý vzorek (např. stejné množství kyselin, zahřátí, filtrace, ...) a slouží ke zjištění, zda a jak moc jsou chemikálie použité pro analýzu kontaminovány analytem. Zjištěné množství analytu v blanku vzorku se odečítá od množství analytu zjištěného ve vzorku.

$$m_{\text{Cu}} = m_{\text{vz}} - m_{\text{bl}}$$

, kde  $m_{\text{Cu}}$  je množství Cu odpovídající pouze pevnému vzorku,  $m_{\text{vz}}$  je množství Cu odpovídající pevnému vzorku a chemikáliím použitým při přípravě vzorku k měření,  $m_{\text{bl}}$  je množství Cu odpovídající chemikáliím použitým při přípravě vzorku k měření.

Vzhledem k tomu, že obě hodnoty ( $m_{\text{vz}}$  i  $m_{\text{bl}}$ ) jsou zatíženy nejistotami ( $SD_{\text{vz}}$  a  $SD_{\text{bl}}$ ), tak nejistota odpovídající  $m_{\text{Cu}}$ , tzv. kombinovaná nejistota:

$$u_c = \sqrt{SD_{\text{vz}}^2 + SD_{\text{bl}}^2}$$

## Úkol:

- Rozložte vzorek slitiny ve směsi kyselin a připravte blank vzorku
- Stanovte koncentraci Cu ve vzorku slitiny korigované na blank a vyjádřete kombinovanou nejistotu stanovení

## Pracovní postup

### Rozklad hliníkové slitiny

Přesně navažte asi 0,5 g vzorku a rozpusťte v 250ml kádince ve 30 ml HCl (1:1), kterou přidáváte po malých dávkách. Poté přidejte 1 ml  $\text{HNO}_3$  (1:1) a roztok vařte tak dlouho, dokud nedojde k odstranění oxidů dusíku. Po ochlazení roztok převedte do odměrné baňky a doplňte po rysku. Při obsahu mědi 0,001 – 0,03 % roztok převedte do 50ml odměrné baňky, při obsahu 0,03 – 0,3 % převedte do 100ml odměrné baňky. Z tohoto roztoku odpipetujte 10ml alikvot do 50ml odměrné baňky a zřeďte na objem přibližně 20 ml. Pak pokračujte dle postupu v odstavci „Vybarvení roztoku“. Stejným způsobem **připravte blank vzorku**.

### Externí kalibrace

Do sedmi odměrných baněk přidejte 25 ml 2% roztoku hliníku a do šesti z nich napipetujte 1,5; 3,0; 5,0 ml standardu přibližné koncentraci  $10 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$  Cu, a 1,0; 1,5 a 2,0 ml standardu přibližné koncentraci  $100 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$  Cu. Sedmá baňka slouží jako **kalibrační blank** (nepřidává se žádné množství Cu). Pak pokračujte dle postupu v odstavci „Vybarvení roztoku“.

## Vybarvení roztoku

K připraveným roztokům v odměrných baňkách přidejte 10 ml citronanu amonného, dvě kapky indikátoru neutrální červeně a za stálého míchání amoniak do přechodu zbarvení do žluté. Pak přidejte 1 ml amoniaku navíc, 5 ml roztoku kuprizonu, doplňte po značku a promíchejte.

## Měření absorbance

Za 30 minut po přidání kuprizonu, ne však později než za 60 minut, změřte intenzitu zbarvení při vlnové délce 600 nm proti vodě. Kalibrační roztoky změřte jednou. Absorbanci vzorku změřte 3 krát. Blank vzorku změřte 5 krát.

## Zpracování výsledků

Kalibrační graf sestrojte jako závislost absorbance na hmotnosti mědi v dané odměrné baňce. Z kalibračního grafu odečtete množství v Cu roztoku vzorku i blanku. Proveďte korekci na blank a z opakovaných měření vzorku určete rozšířenou nejistotu tohoto stanovení.

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Výpočet přesné koncentrace zásobního roztoku Cu
  - Tabulka s přesným množstvím Cu v kalibračních roztocích a naměřené absorbance (Tab.16)
  - Tabulka s absorbancemi neznámého a slepého vzorku a vypočtená množství Cu v nich (Tab. 17), vzorový výpočet.
  - Korece obsahu Cu ve vzorku na blank
  - **Výsledek množství Cu ve vzorku slitiny v hm. %**
- **Závěr**

kalibrační roztok č.	V (Cu) [ $\mu$ l]	m (Cu) [ $\mu$ g]	A [a.u.]
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

Tab. 16: Vzorová tabulka pro absorbanční měření kalibrace

$A_{vz}$ [a.u.]	$A_{bl}$ [a.u.]	$m_{vz}$ [ $\mu$ g]	$m_{bl}$ [ $\mu$ g]

Tab. 17: Vzorová tabulka pro absorbanční měření neznámého a slepého vzorku

## 10 Potenciometrická a konduktometrická indikace bodu ekvivalence

**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 / redukováná 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, nebo počítaně (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).

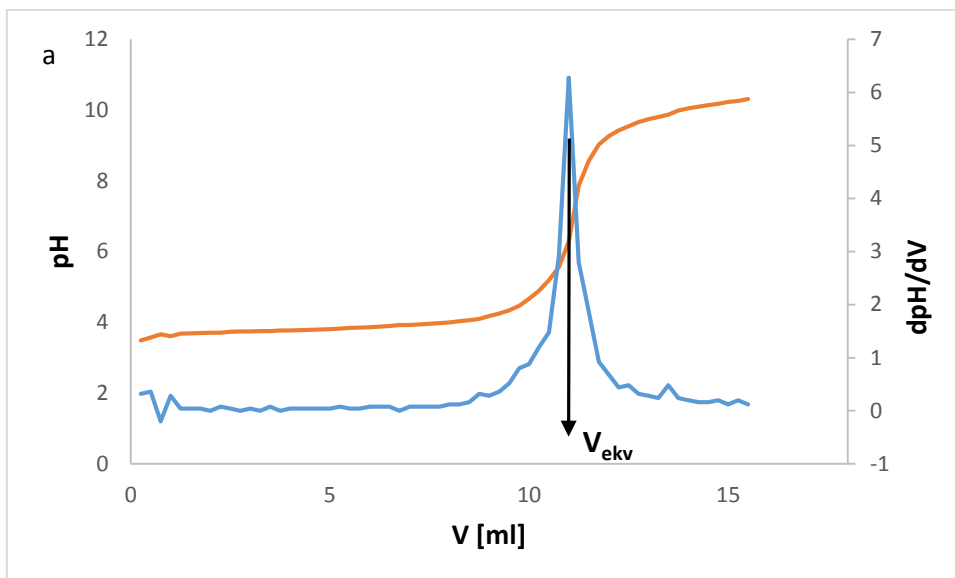
**Konduktometrie** je založena na měření vodivosti roztoků. Různé ionty vedou elektrický proud různě, a tak je vodivost roztoku ve vztahu k jeho složení. V porovnání s potenciometrií je však konduktometrie značně neselektivní a lze tak **přímou konduktometrií** využít pouze při analýze jednosložkových 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.

### Určení bodu ekvivalence potenciometrické titrace z první derivace

Metoda první derivace vychází z předpokladu, že bod ekvivalence se shoduje s inflexním bodem titrační křivky. Pro první derivaci jakékoliv funkce platí, že v inflexním bodě se nachází maximum první derivace. Z naměřených hodnot pH jednotlivých bodů titrační křivky vypočítáme první derivaci, jejich hodnoty vyneseme do grafu a najdeme bod, ve kterém má se nachází maximální hodnota (Obr. 16). V případě, že hodnoty přidávaných objemů titračního činidla jsou v celém rozsahu titrace ekvidistantní, můžeme první derivaci nahradit prostým rozdílem hodnot pH.

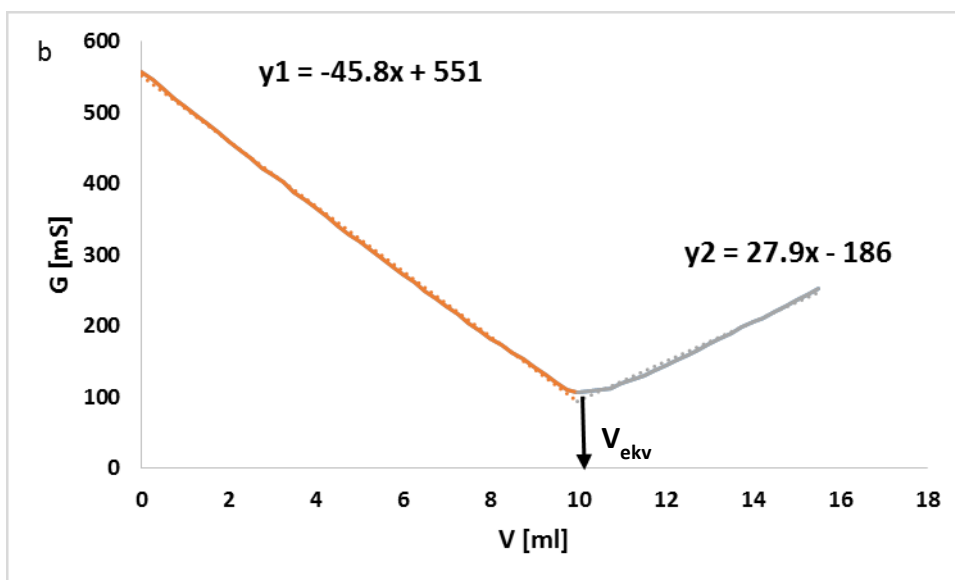


Obr. 16: Určení bodu ekvivalence potenciometrické titrace s využitím první derivace

#### Určení bodu ekvivalence konduktometrické titrace

Konduktometrický způsob indikace má 2 lineární části křivky (při titraci jednosytné kyseliny/zásady). Každou z lineárních částí konduktometrické titrační křivky (Obr. 17) proložíme přímkou ( $y_i = a_i \cdot x + b_i$ ). Hodnotu objemu odpovídající průsečíku těchto přímek (a tím i bod ekvivalence) zjistíme matematicky:

$$y_1 = y_2 = a_1 \cdot x + b_1 = a_2 \cdot x + b_2$$

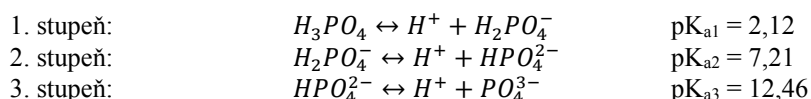


Obr. 17: Určení bodu ekvivalence konduktometrické titrace s využitím lineárních částí křivek

# Úloha č.10 – Stanovení kyseliny fosforečné v kolových nápojích elektrochemickou indikací bodu ekvivalence

## Princip:

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



Prakticky lze kyselinu fosforečnou titrovat do prvních dvou stupňů - s vizuální indikací do prvního stupně na methylovou oranž a do druhého stupně na fenolftalein. Na potenciometrické titrační křivce se projeví stupňovitá neutralizace dvěma skoky s dvěma inflexními body. V případě konduktometrické titrace zaznamenáváme nejprve pokles vodivosti (klesá koncentrace silně vodivých H<sup>+</sup>, narůstá koncentrace méně vodivých H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), 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 0,25 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 0,25 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, srovnajte 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>).



Obr. 18: Sestava pro současnou indikaci bodu ekvivalence pomocí konduktometrie a potenciometrie

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Dosazené hodnoty do vzorců nutných pro výpočty
  - Navážku kyseliny amidosulfonové a výpočet její přesné koncentrace
  - Grafy pro standardizaci NaOH, výpočet jeho přesné koncentrace pro konduktometrickou i potenciometrickou indikaci bodu ekvivalence
  - Grafy pro potenciometrickou a konduktometrickou indikaci stanovení kyseliny fosforečné v kolovém nápoji i v neznámém vzorku.
  - **Výsledky koncentrace kyseliny fosforečné konduktometrickou i potenciometrickou indikací do prvního i druhého stupně uveďte v mg/l.**
  -
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

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

## Princip:

Separční 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 složité 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).

Princip spektrofotometrického stanovení (vizte Úloha č. 8).

**$\beta$ -karoten** je přírodní barvivo chemicky patřící do skupiny tetraterpenoidů a je provitaminem vitamínu A. Karoteny jsou nepolární organická barviva, rozpustná v tučích 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:

$$c_{\text{karoten}} = \frac{3,86 \cdot A_{450} \cdot V_{\text{ex}} \cdot R}{V_{\text{vz}}}$$

$c_{\text{karoten}}$	je hmotnostní koncentrace $\beta$ -karotenu v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
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

## Úkol:

- Extrahujte  $\beta$ -karoten ze vzorku džusu
- Změřte absorpční spektrum  $\beta$ -karotenu
- **Stanovte koncentraci  $\beta$ -karotenu ve vzorku džusu a zjistěte, zda se vyextrahoval pouze  $\beta$ -karoten nebo i další barviva**

## Pracovní postup:

### Extrakce

Do dělicí nálevky odpipetujte 10 ml vzorku džusu, přidejte 30 ml vody, 1 ml 2M HCl a 10 ml hexanu z dávkovače. Nálevku zazátkujte, otočte vzhůru stopkou a uvolněte přetlak otevřením kohoutu. Po uzavření kohoutu mírně zatřepete a opět uvolněte přetlak. Ještě jednou zopakujte uvolnění přetlaku a poté s uzavřeným kohoutem nálevkou intenzivně třepete asi 20 sekund. Otočte vzhůru zátkou, celou nálevkou zakružte a postavte do stojanu.

Pro oddělení vrstev odzátkejte nálevku a **spodní (vodnou) vrstvu odpusťte do kádinky** (objemu 150 ml), k hexanové vrstvě přilejte 10 ml vody a protřepete. Po oddělení vrstev spodní vodnou vrstvu spojíte s předchozí vodnou vrstvou a **hexanovou vrstvu odpusťte do zabroušené baničky** objemu 100 ml.

Vodnou vrstvu vraťte zpět do dělicí nálevky a celý postup s 10 ml hexanu opakujte, 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 zopakujte ještě dvakrát, opět s 10 ml hexanu.

Po čtvrté extrakci nechte hexanovou vrstvu v nálevce, přidejte k ní předchozí hexanové extrakty a 40 – 50 ml vody. Protřepete a po oddělení fází vodnou vrstvu odpusťte do odpadu. Hexanovou vrstvu vypusťte do



zabroušené baničky, přidejte 1 lžičku bezvodého síranu sodného na vysušení hexanové vrstvy a intenzivně třepte asi 20 sekund. Poté extrakt přefiltrujte přes suchý filtrační papír do 50 ml odměrné baňky. Síran sodný v baničce přelijte 10 ml hexanu, zatřepete (dojde tím k vyprání zbytku extraktu ze soli) a opět přefiltrujte do odměrné baňky. Filtr ještě promyjte malým množstvím čistého hexanu (pozor na přelití objemu odměrné baňky!). Poté odměrnou baňku doplňte hexanem po rysku a obsah zamíchejte.

## Měření absorpance

Extrakt nalejete do suché kyvety spektrofotometru, druhou naplňte čistým hexanem (obě kyvety přitom uzavřete víčkem, aby se těkavý hexan z kyvety během měření neodpařoval). Proměřte na spektrofotometru absorpční spektrum v rozsahu 430 – 540 nm (po 5 nm) a dále absorpance roztoku při 450 nm a 477 nm.

Ze zjištěných hodnot sestrojte absorpční křivku (graf) a přiložte k protokolu. Z hodnot absorpance při 450 nm a 477 nm proveďte 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 absorpance 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.

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Absorpční křivku  $\beta$ -karotenu
  - Výpočet totožnosti
  - Výpočet koncentrace  $\beta$ -karotenu
  - **Výsledek množství  $\beta$ -karotenu ve vzorku džusu mg/l**
- **Závěr**

# Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

## Princip:

Chromatografie umožňuje účinnou separaci látek, která je nutná pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek sledované látky. Různé látky se liší svými adsorpčními vlastnostmi, rozdělovacími koeficienty, svými rozměry, náboji atd., což se využívá v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení.

K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Stacionární fází může být pevná látka (papír,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina nebo plyn. Podle způsobu uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fází pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou atd.

Papírová chromatografie byla po dlouhou dobu v praxi nepoužívanější metodou plošné chromatografie. Její největší výhodou je ekonomicky nenáročná chromatografická médium, využitelné pro separaci širokého množství látek od anorganických iontů až k složitým biomolekulám. Základním separačním mechanismem je v případě papírové chromatografie rozdělovací rovnováha mezi vodou či jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. U látek s velkým počtem polárních skupin se často uplatňuje jejich silná interakce přímo s celulózou, v takových případech převládá adsorpční mechanismus dělení. Důležitou charakteristikou použitého chromatografického papíru (často se jedná o speciální papír, ne např. obyčejný filtrační papír) je průtoková rychlost mobilní fáze – podle ní rozlišujeme chromatografické papíry s rychlým, standardním a pomalým průtokem. Rychlost průtoku významně ovlivňuje dobu separace a samozřejmě i její účinnost.

*Tenkvrstvá chromatografie* (TLC, Thin Layer Chromatography) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Provádí se na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina), který je nanesen na vhodné podložce (sklo, kovová fólie, plast). Vzorek se nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatografie. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou, a komora se uzavře. Dodržují se obdobná pravidla jako u papírové chromatografie, vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vzlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky (cca 1 – 2 cm). Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se určí jednotlivé skvrny. K detekci se používají stejné postupy jako v papírové chromatografii, často se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou (fluoreskující při osvětlení UV zářením). Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhasí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu.

Papírovou a tenkvrstvou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je časově velmi nenáročná, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení neznámého vzorku v oblasti sledování znečištění životního prostředí, medicíně i chemickém výzkumu.

V tenkvrstvé chromatografii (TLC) se stacionární fáze nanáší na destičky ze skla, hliníku či plastu, stacionární fáze musí proto dobře ulpívat na zvoleném podkladu a být ve formě jemných částic jednotné velikosti (mezi 1 – 5  $\mu\text{m}$ ). Mobilní fází je směs organických rozpouštědel, někdy ve směsi s vodnou fází. Nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform, benzen a hexan.

Na TLC destičku je nanesen vzorek a destička je umístěna do vyvíjecí komory nasycené parami mobilní fáze tak, aby její spodní část zasahovala minimálně cca 0,5 cm do mobilní fáze. Linie startu a nadávkovaným vzorkem je umístěna nad hladinou mobilní fáze. Dochází ke vzlínání mobilní fáze vzhůru stacionární fází po povrchu destičky. Mobilní fáze rozpouští složky vzorku a unáší je vzhůru po povrchu destičky. Jelikož jednotlivé složky vzorku interagují se stacionární fází různě (tzn., jsou různě intenzivně brzděny oproti čelu mobilní fáze), dochází k jejich vzájemnému rozdělení. Separace probíhá, dokud čelo mobilní fáze nedosáhne cca 1 – 2 cm pod vrchní detekční okraj destičky (vyznačíme tzv. čelo).

Detekce rozdělených složek vzorku při TLC může probíhat několika způsoby:

- **Vizuální detekce barevných látek**

Pokud jsou látky barevné, lze je po separaci detekovat pouhým okem, bez potřeby dalších metod. Barevné sloučeniny jsou jednoduše viditelné jako skvrny na TLC destičce.

- **Detekce pomocí UV záření**

Tato metoda se používá, pokud jsou analyzované látky bezbarvé a není možné je snadno rozlišit vizuálně. Existují dvě hlavní možnosti:

- **Fluorescence samotných látek**

Některé sloučeniny samy o sobě fluoreskují, což znamená, že při vystavení UV záření vyzařují viditelné světlo (svítí). Tyto látky lze pozorovat pod UV lampou jako světélkující skvrny na destičce.

- **Zhášení fluorescence**

Pokud látky **nefluoreskují**, ale destička je připravena tak, aby **fluoreskovala** (obvykle díky přidávku fluorescenčních látek do stacionární fáze, například křemičitanu zinečnatého), analyzovaná látka může zhasnout fluorescenci podkladu. Tento jev nastane, když nefluoreskující látka absorbuje UV záření nebo interferuje s fluorescenčním podkladem, čímž na destičce vytvoří tmavou skvrnu na jinak fluoreskujícím pozadí. Tento kontrast umožňuje detekci látek, které by jinak nebyly viditelné.

- **Vizualizace pomocí specifických činidel**

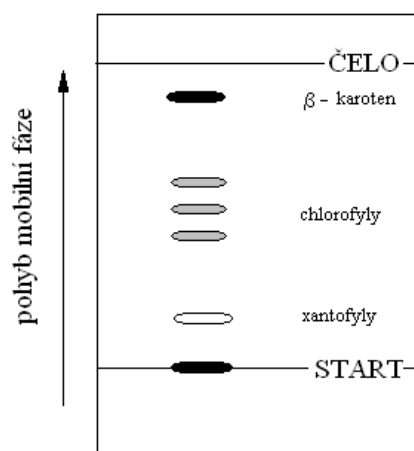
Pokud látky nejsou barevné a ani nefluoreskují (nebo nezhasí fluorescenci), používají se speciální chemická činidla, která s analyzovanými látkami reagují a vytvářejí barevné produkty. Po separaci se destička postříká činidlem, které reaguje s určitými typy sloučenin, čímž vznikne barevná skvrna, kterou lze následně vizuálně detekovat (např. ninhydrin pro aminokyseliny, acidobazické indikátory pro kyselé a zásadité sloučeniny, bromfluorescein pro nenasycené sloučeniny).

V TLC se nejčastěji využívá těchto dvou separačních principů – adsorpce (separované látky jsou poutány na povrch sorbentu) a rozdělovací rovnováhy (separované látky se rozdělují mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, tj. stacionární fáze je kapalina zakotvená na vhodném nosiči). Migrační chování jednotlivých separovaných látek vyjadřuje získaný chromatogram, kde pro každou separovanou látku můžeme definovat hodnotu retenčního (retardačního) faktoru:

$$R_F = \frac{b}{a}$$

kde,  $a$  je vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií, kam až dostoupila mobilní fáze během separace) a linií startu,  $b$  je vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu.

Retardační faktory pro určitý separační systém (určitá stacionární fáze na TLC desce a mobilní fáze) se určují na základě vyhodnocení skvrn standardů (chemicky čisté látky). Metoda patří mezi metody kapalinové chromatografie.



Obr. 19: Schéma TLC destičky a příklady s rozděleným rostlinným vzorkem

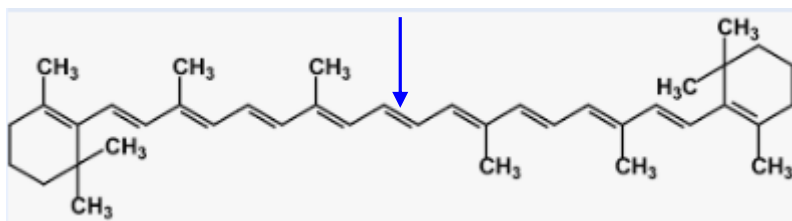
# Úloha č. 12 – Semikvantitativní stanovení $\beta$ -karotenu pomocí TLC

## Princip:

První zmínky o používání rostlinných barviv pocházejí ze starověké Číny a Indie. Výhradně přírodní barviva byla používána k barvení do poloviny 18. století, do doby, než chemický průmysl začal produkovat syntetické náhražky těchto barviv. V poslední době zájem o přírodní barviva opět stoupá vlivem zdravotních a environmentálních problémů souvisejících s používáním barviv syntetických.

Rostlinná barviva jsou organické látky různého složení mající pro rostliny životní význam. Rozdělujeme je na barviva rozpustná v tucích (lipochromy) a ve vodě (hydrochromy). K lipochromům patří zelené chlorofyly, žluté xantofyly a červené karoteny. Chlorofyly mají význam pro fotosyntézu, naproti tomu xantofyly a karoteny způsobují žluté, oranžové a červené zbarvení listů, květů a plodů. Mezi hydrochromy patří především anthokyany, které způsobují modré, červené, fialové až černé zbarvení zejména květů a plodů.

$\beta$ -karoten je nejen prekurzorem vitamínu A, (organizmu vzniká štěpením, nejčastěji na centrální dvojně vazbě 15-15' - symetrické štěpení), ale má i antioxidační a antionkogenní účinky (snižuje riziko rakoviny plic). Zdrojem  $\beta$ -karotenu jsou zejména barevné rostliny jako mrkev, paprika, špenát ale i například hovězí játra.



Obr. 20: Vzorec  $\beta$ -karotenu

U chromatografie na tenké vrstvě převládá rozdílné využití adsorpce na tenké vrstvě sorbentu – adsorpční chromatografie. Analyzovaná směs se nanese na povrch Silufolu, příp. Alufolu (na Start vyznačený tužkou), Silufol se poté umístí do mobilní fáze. Vyvíjení (vzlínání) probíhá v uzavřené tlustostěnné nádobě a k jeho přerušení dojde, jakmile rozpouštědlo dosáhne požadované výšky. Tato výška se označí tužkou (tvrdost HB) jako Čelo chromatogramu. Kvalitativním parametrem pro identifikaci látky v dané vyvíjecí soustavě je hodnota retardačního faktoru RF.

## Úkol:

- Identifikujte jednotlivé složky barviv ve vzorku papriky po separaci TLC. Stanovte množství beta-karotenu ve vzorku papriky

## Pracovní postup:

### Příprava vyvíjecí soustavy

Chromatografickou fólii nastříhejte na obdélníky, jejichž šířka se řídí šířkou vyvíjecí nádoby. Přibližně 1 cm od spodního okraje udělejte čáru (pomocí měkké tužky) rovnoběžnou se spodní okrajem. Tato čára označuje místo (Start), na které budete nanášet roztoky vzorků (které si připravíte) a standardů (jsou již připraveny). Tuto čáru udělejte opatrně tak, aby nedošlo k porušení vrstvy silikagelu (může mít vliv na průběh analýzy). Těsně pod Start udělejte popisky pro pozdější identifikaci jednotlivých vzorků (standardů). Na čáru Startu budete pomocí kapiláry nanášet jednotlivé vzorky a standardy.

### *Příprava kalibrační sady standardu*

Standardní roztok  $\beta$ -karotenu (luteinu) je připraven kvůli rozpustnosti v chloroformu. Kvůli vysoké těkavosti chloroformu otvírejte lahvičku s tímto standardem jen na okamžik odpipetování vzorku.

Ze zásobního roztoku  $\beta$ -karotenu (luteinu) v chloroformu o koncentraci 1000 mg/l připravíte kalibrační sadu s následujícími koncentracemi  $\beta$ -karotenu (luteinu): 0-1-10-100 mg/l. K ředění použijte chloroform. Při práci využijte postup pro pipetování těkavých látek (Úloha č.3).

### *Extrakce barviv z rostlinného materiálu*

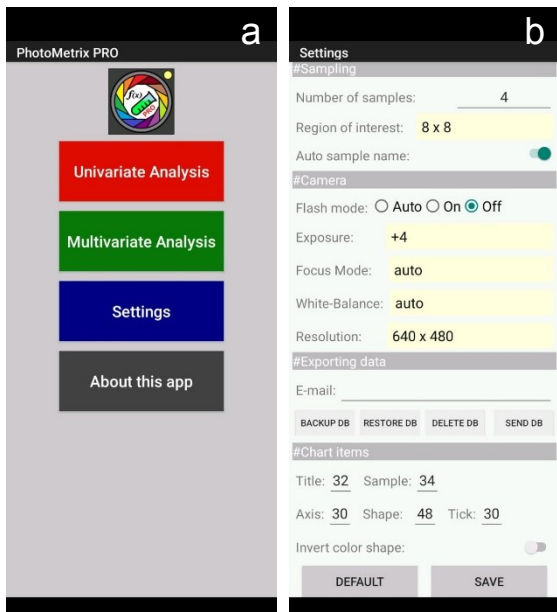
Navážte 100 mg sušené papriky a rozetřete v třecí misce s malým množstvím křemičitanového písku (příp. písku mořského) a s uhlíčitanem vápenatým (na špičku nože) na homogenní kaši. Poté směs přelejte malým množstvím ethanolu a pokračujte v roztírání. Směs přefiltrujte přes buničitou vatu do odpařovací misky a na vodní lázni odpařte do sucha. Po zchladnutí odparek rozpusťte ve 2 ml ethanolu. Ze vzniklého extraktu okamžitě odeberte 10  $\mu$ l pro separaci (naneste na připravenou TLC destičku).

### *Separace pomocí TLC*

K separaci použijte připravenou chromatografickou fólii. Na čáru Start naneste vedle sebe po 10  $\mu$ l kalibračních roztoků a roztoku vzorku. Takto připravenou chromatografickou fólii vložte do vyvíjecí soustavy, která obsahuje vyvíjecí směs benzín:H<sub>2</sub>O:2-propanol v poměru 90:1:9, sahající do výšky 8-10 mm ode dna. Fólii umístěte v mírném sklonu ke stěně vyvíjecí nádoby a ihned uzavřete víkem, aby se prostor uvnitř nádoby nasýtil parami vyvíjecí soustavy. Vyvíjení probíhá tak dlouho, dokud vyvíjecí směs nedosáhne požadované výšky, což je přibližně 1 cm pod horní okraj fólie. Po ukončení vyvíjení fólii vytáhněte, tužkou označte místo značící Čelo (kam doputovalo rozpouštědlo), ihned vyfoťte (skvrny barviv totiž rychle blednou) a měkkou tužkou obtáhněte tyto skvrny. Poté nechte fólii uschnout na vzduchu, příp. ji umístěte na 5 minut do sušárny vyhřáté na teplotu 60 °C. Po vysušení pravítkem změřte vzdálenost Čela mobilní fáze od Startu a vzdálenost středů skvrn od Startu, všechny hodnoty si запиšte., abyste mohli spočítat hodnoty R<sub>F</sub>. Fotografie fólie poté použijte k semikvantitativnímu stanovení  $\beta$ -karotenu ve vzorku. K tomuto účelu použijete aplikaci PhotoMetrix.

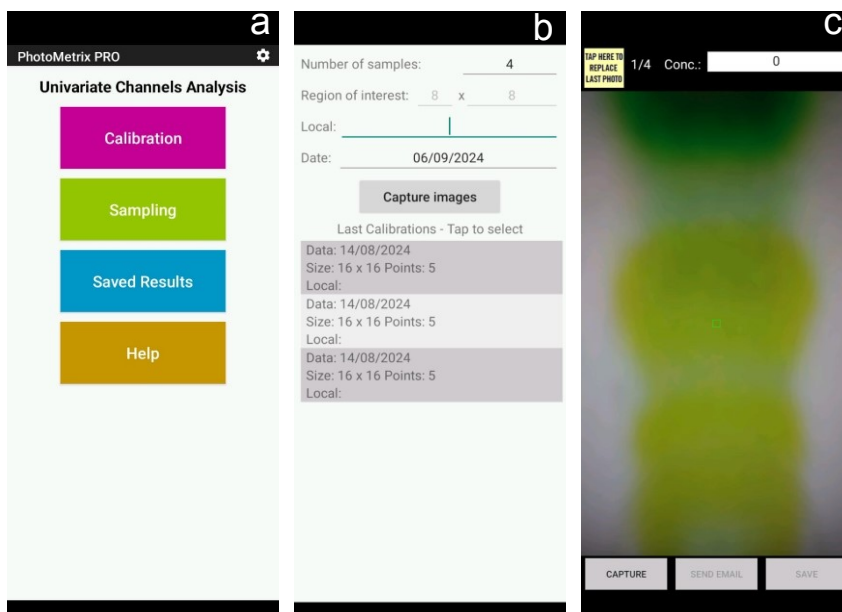
### *Ovládání aplikace Photometrix*

Pro semikvantitativní stanovení  $\beta$ -karotenu využijeme aplikaci Photometrix PRO<sup>®</sup>, která je dostupná zde ([https://play.google.com/store/apps/details?id=com.ghelfer.photometrixpro&hl=en\\_US](https://play.google.com/store/apps/details?id=com.ghelfer.photometrixpro&hl=en_US)). Více detailů této aplikaci najdete zde: [DOI: 10.5935/0103-5053.20160182](https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182). Aplikace Photometrix PRO využívá RGB barevný model, což je jeden ze způsobů reprezentace barev pomocí tří složek: červené (R), zelené (G) a modré (B). Kombinací RGB a jejich intenzit může vzniknout jakákoliv barva. Intenzita každé barvy je vyjádřena v rozmezí 0 až 255, což pro kombinaci všech tří barev RGB dává 16277216 barevných odstínů (např. při plné intenzitě všech tří barev RGB vzniká bílá barva). Každá barva má tedy svůj číselný zápis, ve kterém dané číslo udává intenzitu daného barevného kanálu (RGB (255, 160, 64) je zápis oranžové barvy).



Obr. 21: a) Úvodní obrazovka aplikace Photometrix, b) okno „Settings“

Po spuštění aplikace si z úvodní obrazovky (Obr. 21a) vyberete volbu „Settings“ a nastavíte parametry pro vzorky a kameru (Obr. 21b). „Region of interest“ mění velikost plochy, ze které aplikace bude provádět kolorimetrické vyhodnocení. Parametry se žlutým podkladem nejdu během analýzy měnit. Po uložení parametrů se vrátíte na úvodní obrazovku a vyberete volbu „Univariate Analysis“. Pro měření kalibrace vyberte volbu „Calibration“ a v následujícím okně zkontrolujete správný počet kalibračních roztoků (4) a volbou „Capture image“ přejdete k měření (Obr. 22b). Malý zelený čtverec znázorňuje, ze které oblasti budou data vyhodnocována (Obr. 22c). V pravém horním rohu je místo pro zadávání koncentrace jednotlivých kalibračních bodů. Kameru zaostříte na skvrnu se standardem a tlačítkem „Capture“ vytvoříte snímek. Tímto způsobem proměříte všechny kalibrační body a vzorek. Na základě lineární regrese aplikace zpracuje externí kalibraci a poté vyhodnotí i koncentraci neznámého vzorku. Kalibrační závislost přiložte k protokolu.



Obr. 22: a) volby pro Univariate Analysis, b) okno pro kalibraci, c) okno snímání

## Protokol:

Protokol musí obsahovat následující údaje:

- **Princip metody, cíle a stručný pracovní postup, rovnice a vzorce**
- **Výpočty** a nutné údaje:
  - Koncentrace standardu beta-karotenu, pipetované objemy standardu pro přípravu kalibračních roztoků
  - Navážka vzorku papriky
  - Chromatografická fólie (nebo její foto).  $R_F$  pro jednotlivé identifikované skvrny.
  - Kalibrační závislost exportovaná z Photometrix
  - **Výsledek množství beta-karotenu ve vzorku sušené papriky**
- **Závěr**

Protokol může být doplněn fotografickou dokumentací experimentu.

## Úloha č. 13 - 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 standardního roztoku Cu jako v příkladu 1.
- 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 kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (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  $0,2033 \text{ g}$  byla po rozpuštění titrována roztokem manganistanu draselného o koncentraci  $0,02088 \text{ mol.l}^{-1}$ . Jeho spotřeba činila  $30,34 \text{ ml}$ . Vypočítejte obsah Fe (v hmotnostních %) ve slitině.
- 9) Jaké bude výsledné pH roztoku kyseliny octové, smísíme-li  $100 \text{ ml}$  roztoku o  $\text{pH} = 2,16$  a  $500 \text{ ml}$  roztoku o  $\text{pH} = 3,16$ ?  $\text{pK}_a = 4,75$
- 10) Jaké bude pH roztoku, který vznikne smísením  $250 \text{ ml}$  roztoku kyseliny dusičné o koncentraci  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  a  $50 \text{ ml}$  roztoku hydroxidu barnatého o koncentraci  $0,125 \text{ mol.l}^{-1}$ ?
- 11) Jaká bude koncentrace volné kyseliny chlorovodíkové v roztoku, který vznikne smísením  $25 \text{ ml}$  roztoku HCl o  $\text{pH} = 1,22$  a  $10 \text{ ml}$  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  $100 \text{ ml}$  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  $100 \text{ ml}$  roztoku o hmotnostní koncentraci Pb  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ?
- 14) Vzorek půdy o hmotnosti  $1,0332 \text{ g}$  byl rozložen směsí kyselin a doplněn na objem  $100 \text{ ml}$  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)  $0,6973 \text{ g}$  vzorku směsi chloridu a chlorečnanu sodného bylo rozpuštěno ve vodě a doplněno na objem  $250 \text{ ml}$ . Ze vzorku bylo pipetováno  $25 \text{ ml}$  a dusičnanem stříbrným byl vysrážen chlorid stříbrný. Po odfiltrování a vysušení činila jeho hmotnost  $0,1388 \text{ g}$ . V dalším odpipetovaném podílu  $25 \text{ ml}$  roztoku vzorku byly chlorečnany nejprve redukovány zinkem na chloridy. Hmotnost AgCl, vyloučeného z tohoto redukováného podílu vzorku, činila  $0,1555 \text{ g}$ . 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  $0,5021 \text{ g}$  byl rozložen směsí kyselin a doplněn na objem  $100 \text{ ml}$ . Z roztoku bylo pipetováno  $10 \text{ ml}$  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 retirován roztokem zinečnaté soli 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 přidavkem 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 přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Sulfidická síra se jodem oxiduje na elementární síru. Nadbytečný jod byl retirován 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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