

## Spektrofotometrie

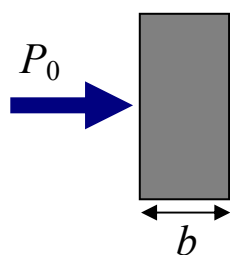
Metody kvantitativní analýzy se často zakládají na určení absorpce elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové (vlnová délka  $\lambda < 380$  nm) nebo viditelné části spektra ( $\lambda = 380 - 780$  nm) stanovovanou látkou. Molekuly absorbují elektromagnetické záření pouze takové energie (kvantum energie), která je přivede do vyššího (excitovaného) energetického stavu. Tuto energii lze vyjádřit pomocí vztahu:

$$\Delta E = h \nu = h c / \lambda$$

kde  $h$  je Planckova konstanta,  $\nu$  frekvence absorbovaného záření,  $c$  rychlost světla ve vakuu,  $\lambda$  vlnová délka absorbovaného záření.

Vlnová délka ( $\lambda$ ) absorbovaného elektromagnetického záření, je tedy určena vzdáleností dvou sousedních energetických hladin ( $\Delta E$ ) molekul dané látky, mezi kterými molekuly přechází.

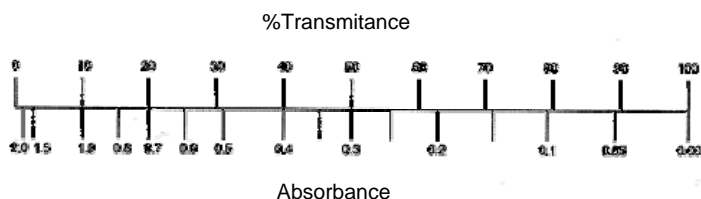
Pokud monochromatické záření (záření o dané vlnové délce) o zářivém toku  $P_0$  prochází vrstvou absorbující látky  $b$ , dochází k pohlcení (absorpci) části záření, takže vycházející elektromagnetické záření má zářivý tok  $P$  nižší, než záření dopadající.



Množství absorbovaného záření může být vyjádřeno dvojným způsobem:

- jako **transmittance** (propustnost):  $T = P / P_0$
- často se udává jako procento prošlého záření  $T = 100 P / P_0 \%$
- jako **absorbance**:  $A = \log(P_0 / P) = \log(1 / T) = -\log T$
- zastaralé pojmy pro absorpenci jsou optická hustota (*OD*, z *angl. optical density*) nebo extinkce (*E*) se nedoporučují používat

Vztah mezi transmittancí a absorpencí vyjadřuje následující schéma:



Pokud nedochází k absorpci záření při jeho průchodu látkou, tak transmittance je rovna 100 % a absorbance je nulová. Pokud veškeré záření je pohlceno roztokem, tak transmittance je nulová a absorbance je nekonečno.

Velikost absorpce elektromagnetického záření závisí na třech faktorech, na vlnové délce záření, koncentraci absorbující látky v roztoku a na tloušťce měřené vrstvy.

Při dané vlnové délce záření existuje mezi koncentrací absorbující látky a absorpencí přímá úměra. Tuto závislost vyjadřuje **Lambertův-Beerův zákon** (někdy označovaný pouze jako Beerův zákon):

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda b c$$

kde  $\epsilon_\lambda$  je **molární absorpční koeficient** (neboli molární absorptivita, jeho hodnota odpovídá absorpenci látky o koncentraci 1 mol/l a tloušťce měřené vrstvy 1 cm),  $c$  je látková koncentrace (mol/l) a  $b$  tloušťka měřené vrstvy (cm).

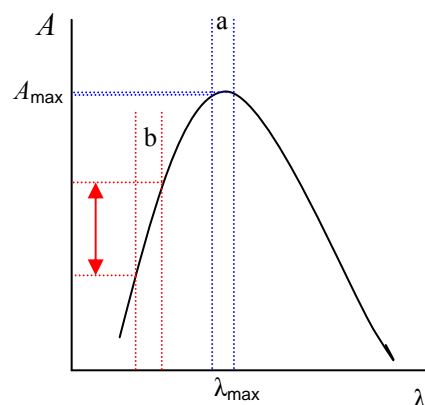
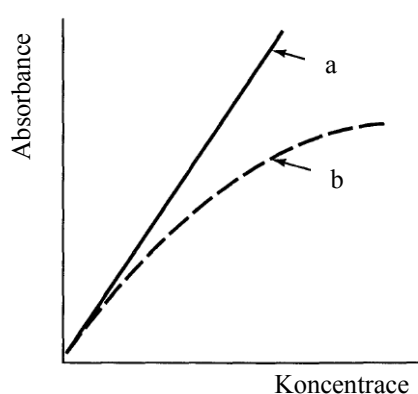
Absorbance je aditivní veličina, tj. pokud je v roztoku přítomno více látek, které absorbují při dané vlnové délce, tak celková absorbance roztoku je dána vztahem:

$$A_{\text{celková}} = A_1 + A_2 + \dots = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots$$

Lambertův-Beerův zákon platí pouze pro:

- monochromatické záření
- zředěné roztoky ( $< 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ )
- homogenní roztoky (nedochází k rozptylu záření na částicích vzorku)
- vzorky, které nefluoreskují ani nefosforeskují při dané vlnové délce
- monomerní látky, které v roztoku neasociují

Závislost absorbance na vlnové délce nazýváme **absorpční spektrum** (absorpční křivka). Absorpční spektrum je charakteristické pro danou sloučeninu. Praktický význam mají absorpční maxima křivky a jim příslušející vlnové délky. Ke stanovení koncentrací absorbujících látek se volí zpravidla vlnové délky těchto maxim, poněvadž stanovení je nejpřesnější (viz obrázek) a současně i nejcitlivější (viz Lambertův-Beerův zákon).



Z absorpční křivky lze též vypočítat hodnoty molárních absorpčních koeficientů, známe-li koncentraci absorbující látky, pro kterou byla absorpční křivka sestrojena:

$$\varepsilon_{\lambda_{\text{max}}} = A_{\text{max}} / b c$$

Protože hodnota molárního absorpčního koeficientu závisí na konkrétních experimentálních podmínkách, tak se v podstatě vždy při spektrofotometrických stanoveních koncentrace vychází z kalibračního grafu. K jeho zhotovení se připraví z nejčistšího preparátu stanovované látky (standardu) standardní roztok a jeho ředěním řada kalibračních roztoků. Každý kalibrační roztok se zpracuje stejným postupem jako vzorky s neznámou koncentrací. Poté se změří jejich absorbance proti rozpouštědлу nebo činidlu bez měřené látky (slepému vzorku/pokusu, angl. *blank*). Naměřené hodnoty se vynesou do grafu jako závislost absorbance kalibračních roztoků na jejich koncentraci. Závislost je lineární pro rozsah koncentrací, ve kterém platí Lambertův-Beerův zákon. Odchyly od přímky jsou běžné u vysokých koncentrací. Body ležícími v lineární části grafu se proloží přímka (jejíž obecná rovnice je  $y = k x + q$ ).

Poněvadž standard i analyzovaná látka mají za daných experimentálních podmínek stejnou hodnotu molárního absorpčního koeficientu, tj.  $\epsilon_{\text{std}} = \epsilon_x$ , získáme po dosazení z Lambertova-Beerova vztahu za  $\epsilon$  rovnici  $A_{\text{std}}/(b c_{\text{std}}) = A_x/(b c_x)$ , z které pro koncentraci analytu v neznámém vzorku vyplývá:

$$c_x = c_{\text{std}} A_x / A_{\text{std}}$$

Koncentraci analyzované látky  $c_x$  lze vypočítat ze změřených absorbancí analyzovaného vzorku  $A_x$  a kalibračního roztoku  $A_{\text{std}}$  o koncentraci  $c_{\text{std}}$ , která je blízká koncentraci analytu v neznámém vzorku  $c_x$ . Absorbance jsou měřeny proti slepému vzorku.

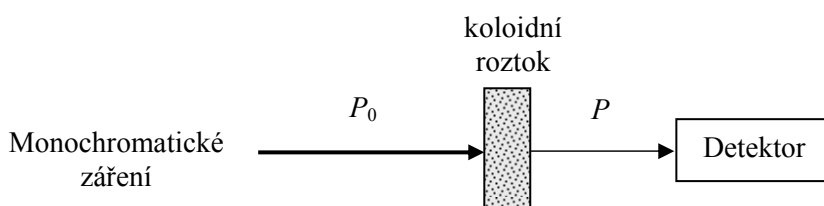
Látky barevné (tj. látky výrazně absorbující viditelné záření) lze spektrofotometricky stanovit přímo. Látky bez výrazného absorpčního maxima ve VIS/UV oblasti je třeba nejprve reakcí s vhodným činidlem (**derivatizací**) převést na zbarvený produkt. Podmínkou je, aby množství barevného produktu bylo úměrné koncentraci stanovované látky. Intenzita zbarvení roztoku tímto barevným produktem je pak přímo úměrná koncentraci analytu v původním analyzovaném roztoku a lze ji změřit spektrofotometrem.

## Zákalové metody

Při interakci světelného záření s koloidním roztokem dochází k interakcím mezi světlem a částicemi, jejichž výsledkem je, že koloidní roztoky se při průchodu světla jeví zakalené. Při průchodu světla soustavou s disperzními částicemi se světelné paprsky mohou:

- od částic odrážet,
- mohou částicemi procházet, přičemž index lomu částic je téměř vždy odlišný od indexu lomu disperzního prostředí, takže paprsek mění směr,
- vyvolat oscilaci částice (pokud je částice dostatečně malá tj. je-li průměr částice  $r < 0,1 \lambda$ ), takže částice sama se stane zdrojem záření o stejné vlnové délce.

## Turbidimetrie



Prochází-li světlo disperzním prostředím, dochází k jeho zeslabení. Této vlastnosti disperzních soustav využívá **turbidimetrie**. Je-li původní hodnota světelného toku  $P_0$  a hodnota světelného toku po průchodu disperzní soustavou  $P$ , platí vztah obdobný Lambertovu-Beerovu zákonu:

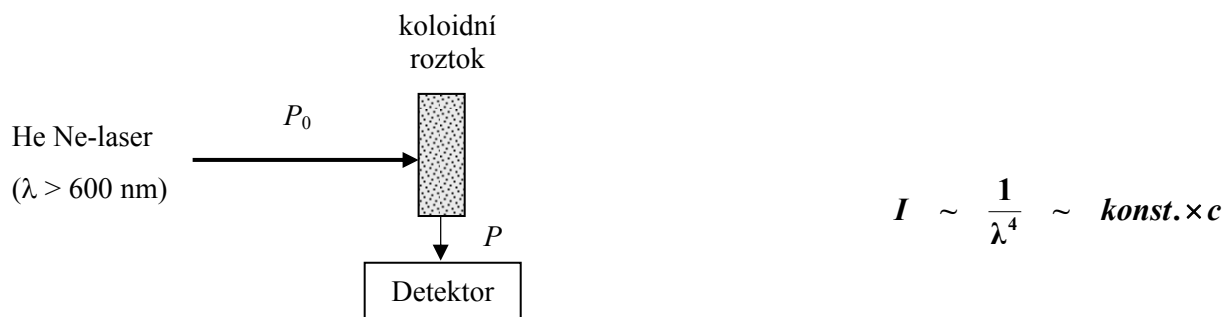
$$A_T = \log \frac{P_0}{P} \sim \text{konst.} \times c$$

Konstanta určující vztah mezi turbidancí  $A_T$  a koncentrací se zjišťuje z kalibračních křivek za pomoci známých koncentrací standardů.

Světelný tok po průchodu disperzní soustavou se při turbidimetri měří ve stejném směru, v jakém paprsky do soustavy vstupují. Lze použít i běžné absorpční fotometry a spektrofotometry.

## Nefelometrie

Nefelometrie je obdobná analytická metoda, k měření se však využívá světelného toku rozptýleného disperzní soustavou. Rozptýlené světlo se měří obvykle kolmo ke směru primárního paprsku.



Jako zdroj světelného záření se používají halogenové nebo xenonové a rtuťové/xenonové lampy, světlo emitující diody nebo lasery.

## Fluorimetrie

Fluorimetrie je metoda, při které se využívá jev označovaný jako fotoluminiscence. Molekuly látek se po ozáření viditelným nebo UV světlem o dostatečné energii excitují do vyššího energetického stavu. Při zpětném přechodu do základního stavu vyzařují světlo o nižší energii, tedy s vyšší vlnovou délkou. Světelná emise při fluorescenci trvá po ozáření běžných fluoroforů primárním paprskem pouze  $10^{-9}$  až  $10^{-6}$  sekund, zatímco u fosforescence vlivem pomalejšího přechodu molekuly do základního stavu více jak  $10^{-4}$  sekund a může přetrvávat i déle po osvitu primárním paprskem.

Proces fotoluminiscence může být vyjádřen vztahem:



kde  $X$  a  $X^*$  je základní a excitovaný stav molekuly,  $h\nu$  a  $h\nu'$  vyjadruje dopadající resp. emitovanou světelnou energii.

Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitujícího záření se označuje jako **Stokesův posun**. Intenzita emitovaného fluorescenčního záření je proporcionální počtu fluoreskujících molekul tj. jejich koncentraci. Tento vztah však platí pouze pro zředěné roztoky.

Fluoreskující látky obsahují v molekule obvykle aromatická jádra nebo vysoce konjugované systémy dvojných vazeb (tzv. fluorofory). Fluorescence je velmi citlivá na použité rozpouštědlo a též změnu pH. Změnou rozpouštědla nebo pH může zcela vymizet. Měření intenzity fluorescence je 100–1000krát citlivější než měření absorbance. Při nízké koncentraci je zaznamenána nízká absorbance, tj. velmi malý rozdíl mezi dopadajícím a vycházejícím zářením ( $P$  je téměř stejně vysoké jako  $P_0$ ). Při fluorimetrickém měření se zaznamenává pouze emitované záření proti velmi slabému pozadí, proto je měření mnohem přesnější. Fluorescence je také specifitější, protože existuje jen málo přirozených fluoroforů, které by mohly působit interferenci.