

SPEKTROFOTOMETRIE

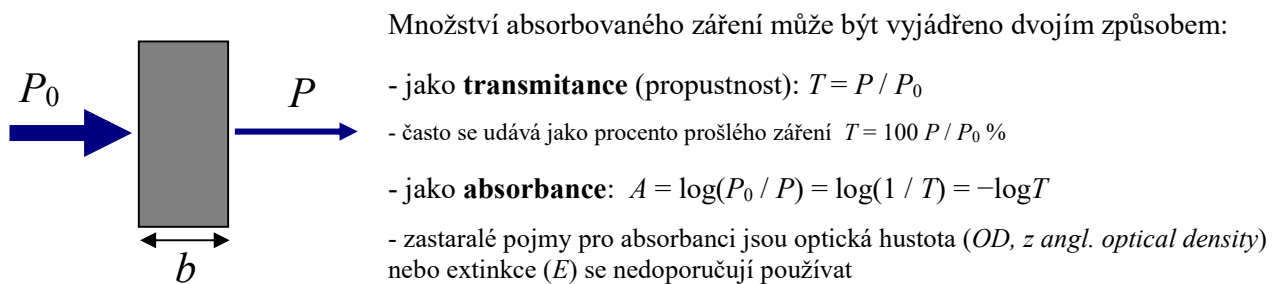
Metody kvantitativní analýzy se často zakládají na určení absorpce elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové (vlnová délka $\lambda < 380$ nm) nebo viditelné části spektra ($\lambda = 380\text{--}780$ nm) stanovenou látkou. Molekuly absorbují elektromagnetické záření pouze takové energie (kvantum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

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

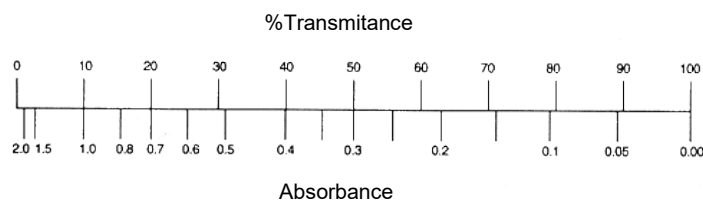
kde h je Planckova konstanta, ν frekvence absorbovaného záření, c rychlost světla ve vakuu, λ vlnová délka absorbovaného záření.

Vlnová délka (λ) absorbovaného elektromagnetického záření, je tedy určena vzdáleností dvou sousedních energetických hladin (ΔE) 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.



Vztah mezi transmittancí a absorbancí vyjadřuje následující schéma:



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

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 absorbancí přímá úměra. Tuto závislost vyjadřuje **Lambertův-Beerův zákon** (někdy označovaný pouze jako Beerův zákon):

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

kde ϵ_{λ} je **molární absorpční koeficient** (neboli molární absorptivita, jeho hodnota odpovídá absorpci látky o koncentraci 1 mol/l a tloušťce měřené vrstvy 1 cm), c je látková koncentrace (mol/l) a b tloušťka měřené vrstvy (cm).

Někdy je absorbující látka charakterizována pomocí **absorpčního koeficientu** a (absorptivity, extinčního koeficientu k), který odpovídá absorpci látky o koncentraci 1 g/l a $b = 1$ cm nebo **procentuálního absorpčního koeficientu** $\epsilon^{1\%}$, který odpovídá absorpci látky o koncentraci 1 % (např. 10 mg/ml) a $b = 1$ cm (pro přepočty mezi koeficienty platí: $a = \epsilon/M = 0,1 \epsilon^{1\%}$).

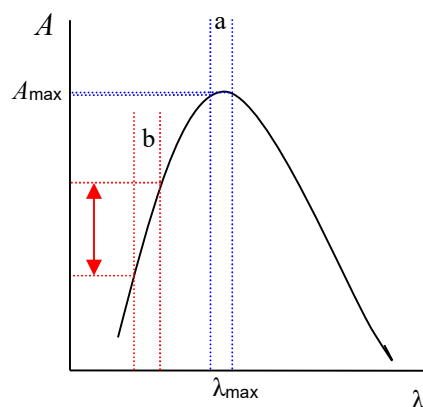
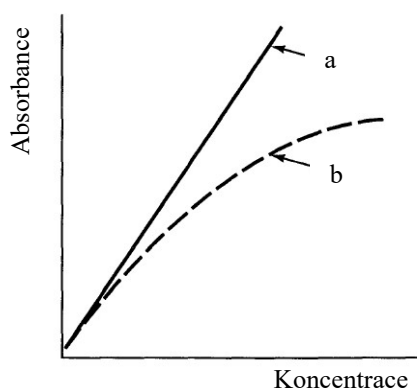
Absorbance je aditivní veličina, tj. pokud je v roztoku přítomno více látek, které absorbují při dané vlnové délce, tak celková absorbance roztoku je dána vztahem:

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

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/pokus, 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. Odchylny od přímky jsou běžné u vysokých koncentrací. Body ležícími v lineární části grafu se proloží přímkou (jejíž obecná rovnice je $y = kx + q$).

Pokud se měří absorbance proti slepému vzorku, tak kalibrační přímka prochází počátkem souřadnic:

$$A = k c$$

k je směrnice přímky (tj. tangenta úhlu, který svírá přímka s osou x):

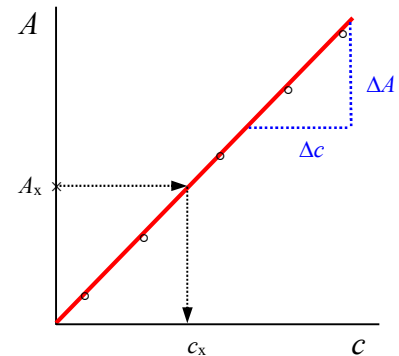
$$k = \Delta A / \Delta c$$

Převrácená hodnota směrnice přímky $1/k$ se nazývá **kalibrační faktor** (F):

$$F = 1/k = \Delta c / \Delta A$$

Pro výpočet koncentrace analytu v neznámém vzorku potom platí:

$$c_x = A_x F$$



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 ϵ 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_{std} o koncentraci c_{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.

Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace je nutné dodržovat určité zásady:

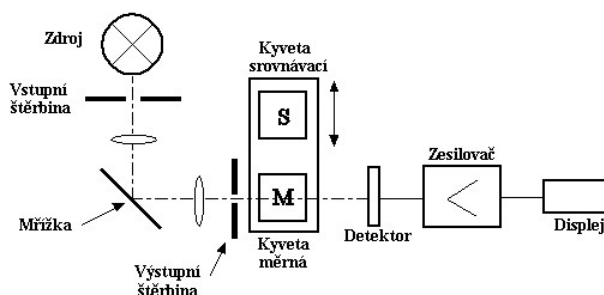
- kyvety plňte do $\frac{3}{4}$ jejich objemu
- vnější stěny kyvety udržujte čisté a suché
- nedotýkejte se prsty stěn kyvety, kterými prochází světlo
- kyvetu držte pouze za boční stěny, které bývají matované nebo vroubkované
- roztok v kyvetě musí být bez bublin, příp. odstraňte sklepnutím nebo promícháním tyčinkou
- kyvetu vkládejte do držáku vždy stejnou stranou ke zdroji světla, např. ocejchovanou stranou
- měření absorbance v rozmezí 0,2–0,7 poskytuje nej přesnější výsledky při stanovení koncentrace

Přístroje, které se používají k měření zářivého toku v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra se nazývají **fotometry** nebo **spektrofotometry**. Fotometry jsou jednodušší a používají k vymezení úzkého pásma vlnových délek filtry. Spektrofotometry používají většinou mřížkový monochromátor, který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém intervalu. Spektrofotometr má zpravidla citlivější detektor než fotometr a obvykle dva zdroje světla (zvlášť pro UV a zvlášť pro VIS oblast).

Všechny fotometry a spektrofotometry sestávají ze tří základních částí:

- zdroje zářivé energie
- filtru nebo mřížky pro izolaci úzkého pásma zářivé energie
- detektoru měřícího zářivou energii propuštěnou vzorkem.

Zjednodušené schéma jednopaprskového spektrofotometru SPEKOL 11



Ve viditelné oblasti je nejčastěji používaným zdrojem světla **žárovka** s wolframovým vláknem. Její spektrální charakteristiku lze významně zlepšit halogenovou atmosférou. Kromě toho jsou rozšířené různé typy zdrojů elektrického výboje. V UV oblasti to jsou deuteriové **výbojky** (190 až 375 nm), pro UV + VIS spektra xenonové a rtuťové výbojky. Excitace výbojky je vyvolána průchodem elektronů plynem.

Pro selektivitu, správnost a citlivost všech měření je nutné vybrat úzké pásmo vlnových délek, vyzařovaných ze širokospéktrálního zdroje. K tomu účelu se obvykle používají **interferenční filtry** nebo **reflexní mřížky** (nemají ztrátu světla absorpcí). Mřížka je vedle vstupní **štěrbin**, vymežující svazek heterochromatického záření, a výstupní štěrbin, propouštějící pásmo světla blízké nominální vlnové délce, nejdůležitější částí optického zařízení k získání monochromatického světla, tzv. **monochromátoru**.

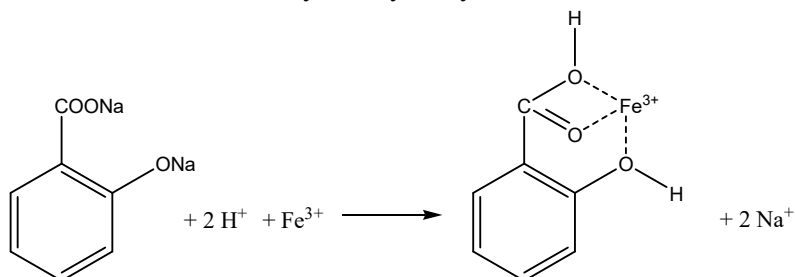
Detektory používané ve VIS a UV oblasti převádějí zářivou energii na elektrickou energii. Používají se fotonky, fotonásobiče a diodová pole. Ve **fotonkách** se elektrony uvolněné z fotokatody po dopadu fotonů pohybují k anodě účinkem napětí. Je-li fotonka plněná plynem, elektrony cestou ionizují jeho molekuly, takže na anodu dopadne větší počet elektronů, než byl uvolněn z katody. **Fotonásobiče** jsou uspořádány tak, že elektrony dopadnou po ozáření fotokatody na první zesilovací elektrodu, tzv. dynodu, kde je počet fotoelektronů násoben sekundární emisí. Takových dynod je ve fotonásobiči 10 i více a výsledný efekt zesílení může být i několik milionů. V **detektoru diodového pole** je světlo rozptylováno mřížkou na pole mnoha (např. 200) světlocitlivých diod a vzniká napětí, které je převedeno na digitální signál. Tyto detektory umožňují měřit současně celé spektrum, např. v rozsahu 200 až 700 nm.

Pro fotometrická měření se používají **kyvety** skleněné a plastové (pro viditelnou oblast spektra) nebo křemenné pro měření v ultrafialové oblasti. Tloušťka kyvety bývá obvykle 1 cm (při manuálním měření, analyzátoři s fotometrickou detekcí používají kyvety menších rozměrů), běžné je i používání průtokových kyvet a průtokových cel. Kyveta s roztokem měřeného vzorku se vkládá mezi filtr, resp. mřížku a detektor.

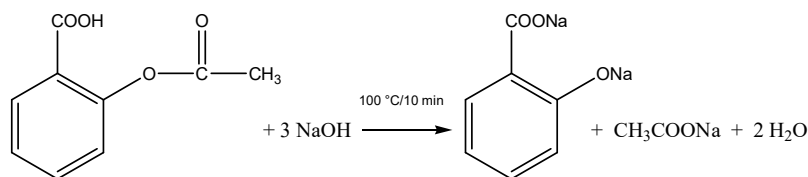
PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 11.1 Spektrofotometrické stanovení salicylové kyseliny

Acetylsalicylová kyselina (ASA, z angl. *acetylsalicylic acid*, $pK_A = 4,57$) bývá jednou z účinných látek antipyretik (látek snižujících horečku). V organismu je ASA při průchodu játry hydrolyzována na salicylát. Spektrofotometrické stanovení salicylátu je založeno na metodě, při níž je bezbarvý salicylát převeden v kyselém prostředí na barevný komplex se železitými ionty. Budeme předpokládat, že se vytváří komplexní kation s 1 molekulou salicylové kyseliny:



Takto lze nepřímo stanovit i množství ASA v tabletě medikamentu po alkalické hydrolyze na salicylát:



Materiál: Salicylát sodný ($M_r = 160,10$), železité činidlo (dusičnan železitý, 0,1 mol/l v 0,12 mol/l HCl), váženka, odměrná baňka 10 ml, nálevka. Analytické váhy, nastavitelný mikrodávkoř 100–1000 μ l. Dělené pipety 2 ml, mikrozkuřavky 1,5 ml, nízké zkuřavky, tyčinka, popisovač. Vzorek s neznámou koncentrací salicylátu, spektrofotometr.

Provedení:

a) Příprava kalibračních roztoků salicylátu

- Připravte 10 ml standardního roztoku salicylátu sodného o látkové koncentraci 5 mmol/l rozpuštěním připravené navážky.
- Ředěním standardního roztoku salicylátu připravte do očíslovaných mikrozkuřavek řadu kalibračních roztoků dle tabulky. Před odměřováním vypočítejte objemy demi-vody a standardního roztoku potřebné k přípravě právě 1 ml kalibračního roztoku o dané koncentraci:

Roztok č.	Standardní roztok (ml)	Demi-voda (ml)	c (mmol/l)
1			1
2			2
3			3
4			4
5			5

b) Sestrojení absorpční křivky komplexu Fe^{3+} -salicylát

- Do dvou zkuřavek odměřte přesně skleněnou pipetou po 2 ml železitého činidla.
- Do první zkuřavky přidejte 100 μ l kalibračního roztoku č. 3, do druhé 100 μ l demi-vody. Důkladně promíchejte a ponechte 10 minut stát.
- Pomocí spektrofotometru Spekol 1300 nebo Hélios δ (návod bude přiložen u přístroje) změřte absorpční spektrum komplexu Fe^{3+} -salicylát v první zkuřavce v rozsahu vlnových délek 450–600 nm. Roztok ve druhé zkuřavce použijte jako slepý vzorek.

1. Zaznamenejte hodnoty absorbancí pro všechny vlnové délky.
2. Vyneste graficky na milimetrový papír závislost absorbance na vlnové délce záření.
3. Určete nejvhodnější vlnovou délku (maximální absorbance) pro stanovení koncentrace salicylátu.
4. Vypočítejte hodnotu molárního absorpčního koeficientu komplexu Fe^{3+} -salicylát v jeho absorpčním maximu (uvědomte si správnou hodnotu koncentrace komplexu Fe^{3+} -salicylát v měřeném roztoku (0,1 ml kalibrátoru č. 3 + 2,0 ml železitého činidla)).

c) Zhotovení kalibračního grafu a stanovení koncentrace salicylátu ve vzorku

- Do sedmi zkumavek odměřte přesně skleněnou pipetou 2 ml železitého činidla.
 - Do 1. až 5. zkumavky odměřte po 100 μ l příslušného kalibračního roztoku (ke zhotovení kalibračního grafu), do 6. zkumavky 100 μ l neznámého vzorku a do 7. zkumavky 100 μ l demi-vody (slepý pokus). Důkladně promíchejte a ponechte 10 minut stát.
 - Změřte absorbanci všech roztoků při vlnové délce absorpčního maxima, které jste určili v předchozí úloze, proti slepému pokusu.
-
- ✍ 5. Ze získaných hodnot absorbance kalibračních roztoků sestrojte kalibrační graf.
 - ✍ 6. Z lineární části grafu vypočtete kalibrační faktor.
 - ✍ 7. Stanovte koncentraci salicylátu v neznámém vzorku jak odečtením z kalibračního grafu, tak výpočtem pomocí kalibračního faktoru.
 - ✍ 8. Jaké množství fotonů je absorbováno roztokem, tj. jaká je hodnota T v %, jeli hodnota absorbance rovna: a) 0,3 b) 1,0 c) 2,0?
 - ✍ 9. V jakých jednotkách se udává absorbance?
 - ✍ 10. V jakých jednotkách se udává molární absorpční koeficient?
 - ✍ 11. Vypočtete koncentraci hovězího sérového albuminu v mg/ml, jestliže roztok albuminu má absorbanci $A_{280} = 1,334$. Procentuální absorpční koeficient pro albumin $\epsilon_{280}^{1\%} = 6,67$.