

Úloha 1. Spektrofotometrie – Absorpční křivka eosinu a stanovení jeho koncentrace

Požadované znalosti: Optické laboratorní metody

Cíl úlohy:

Určení absorpčního maxima eosinu z absorpční křivky. Spektrofotometrické stanovení koncentrace.

Úkol 1

Měření absorpční křivky eosinu a určení maxima v oblasti viditelného spektra.

Potřeby k měření:

Spektrofotometr Specol, automatická pipeta, roztoky pro měření, destilovaná voda.

Pracovní postup:

- 1) Zapněte spektrofotometr a nastavte pomocí voliče vlnových délek vlnovou délku 450nm.
- 2) Zkontrolujte čistotu kyvet (pozor: každá kyveta má 2 stěny čiré a 2 matné). Kyvetu uchopte vždy pouze za matné stěny.
- 3) Spektrofotometr Specol má pohyblivý držák měřicího nástavce pro 2 kyvety, vložte nejprve kyvetu s destilovanou vodou do jednoho úchyty, do druhého úchyty kyvetu s měřeným roztokem. Kyvety musí být naplněny nejméně do dvou třetin.
- 4) Změřte hodnotu absorbance. Pro destilovanou vodu se na displeji spektrofotometru musí ukázat hodnota 0,000. To znamená, že pro destilovanou vodu se automaticky nastavila hodnota absorbance 0,000. Nyní do měřicího prostoru zasuňte kyvetu s měřeným roztokem a odečtěte jeho absorbanci A.
- 5) Poté do měřicího prostoru zasuňte opět kyvetu s destilovanou vodou a hodnotu vlnové délky zvětšete o 5 nm. Po vynulování displeje (absorbance pro destilovanou vodu opět 0,000) vložte do měřicího prostoru kyvetu se zkoumaným roztokem a odečtěte jeho absorbanci A.
- 6) Uvedený postup opakujte a vlnovou délku světla zvyšte při každém kroku o 5 nm. Při proměrování absorpční křivky postupujeme do vlnové délky 550 nm.
- 7) Do grafu vynesete závislost absorbance na vlnové délce a odečtěte absorpční maximum, což je vlnová délka, při které je absorbance měřeného roztoku nejvyšší.

Úkol 2

Spektrofotometrické stanovování koncentrace roztoků.

Potřeby k měření:

Spektrofotometr Boeco, automatická pipeta, stojan s potřebným množstvím zkumavek, roztok pro měření o známé koncentraci, vzorek o neznámé koncentraci, destilovaná voda, buničitá vata.

Pracovní postup:

1. Zásobní roztok o známé koncentraci nařed'te destilovanou vodou tak, aby jste získali několik dalších roztoků o známých nižších koncentracích než byla původní koncentrace. Ředění zásobního roztoku proved'te nejlépe pomocí křížového pravidla. (Např. pro eosin máme zásobní roztok o koncentraci 5μg/l a pomocí křížového pravidla a přesného ředění připravíme roztoky o koncentraci 4, 3, 2 a 1μg/l).
2. Zapněte spektrofotometr a nastavte pomocí voliče vlnových délek vlnovou délku dříve zjištěného absorpčního maxima eosinu

3. Zkontrolujte čistotu kyvet (pozor: každá kyveta má 2 stěny čiré a 2 matné). Kyvetu uchopte vždy pouze za matné stěny.
4. Kyvety musí být naplněny nejméně do dvou třetin. Spektrofotometr Boeco má pouze jeden držák, vložte nejdříve kyvetu s destilovanou vodou, potom teprve kyvetu s měřeným roztokem o nejnižší koncentraci.
5. Změřte hodnotu absorbance. Pro destilovanou vodu se na displeji spektrofotometru musí ukázat hodnota absorbance 0,000. To znamená, že pro destilovanou vodu se automaticky nastavila hodnota absorbance 0,000. Nyní do měřicího prostoru zasuňte kyvetu s měřeným roztokem o nejnižší koncentraci a odečtěte jeho absorbanci A.
6. Poté opět do měřicího prostoru zasuňte opět kyvetu s destilovanou vodou. Po vynulování displeje (absorbance pro destilovanou vodu 0,000) vložte do měřicího prostoru kyvetu s nařaděným roztokem o další známé koncentraci a odečtěte jeho absorbanci.
7. Uvedený postup opakujte se všemi připravenými známými koncentracemi zkoumaného roztoku. Před každou novou koncentrací kalibrujte přístroj destilovanou vodou (absorbance pro destilovanou vodu 0,000). Vlnovou délku světla neměňte. Použité koncentrace a jim příslušné naměřené absorbance zapište do tabulky a vytvořte graf závislosti.
8. Nakonec změřte absorbanci téhož roztoku o neznámé koncentraci. Z vytvořeného grafu odečtěte koncentraci neznámého vzorku.