

6. SPEKTROFOTOMETRIE

TEORIE:

Podstatou metody molekulové absorpční spektroskopie oblasti VIS je absorpce viditelného záření zředěnými roztoky molekul v rozmezí vlnových délek asi 400–800 nm.

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření. Příjem kvanta elektromagnetického záření přivede molekulu do vyššího (tzv. excitovaného) energetického stavu, tj. při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových elektronů. Protože molekuly mohou existovat pouze v určitých energetických stavech, absorbují elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Molekula přechází ze stavu s nižší energií E_q do stavu s energií vyšší E_p a absorbuje záření o frekvenci, která odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_p a E_q obou kvantových stavů podle Planckovy podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Elektronové přechody zapříčínují absorpci viditelného záření (400 až 800 nm). Látky, které absorbují viditelné světlo jsou barevné. Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrometry. Při absorpčním měření se při určité vlnové délce záření porovnává tok záření prošlého kyvetou s čistým rozpouštědlem (Φ_0) s tokem záření prošlého kyvetou s měřeným roztokem (Φ). Podíl těchto zářivých toků se nazývá propustnost (transmitance T). Transmitance je relativní část prošlého záření, často se uvádí v procentech:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \cdot 100$$

Na většině spektrofotometrů lze odečíst hodnotu absorbance A, tj. záporně vzatý logaritmus transmitance. Je-li absorbance záření nulová, transmitance je jednotková (100 %). Je-li absorpce záření nulová, je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí absorbance roste. Pro měření mají proto význam hodnoty nepřekračující jednotku.

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

Předpokladem pro měření závislosti absorbance na koncentraci $A = f(c)$ a absorbance na vlnové délce $A = f(\lambda)$, která jsou základem každé spektrofotometrické metody, je časová stabilita proměřovaného roztoku. Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy, což vyjadřuje **Lambertův – Beerův zákon**:

$$A = \varepsilon_\lambda c l \quad \rightarrow \quad \varepsilon_\lambda = \frac{A}{l \cdot c}$$

kde: ε_λ je hodnota molárního absorpčního koeficientu pro danou vlnovou délku [$l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$],

l je tloušťka kyvety (absorbující vrstvy) [cm],

c je látková koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$].

Lambertův – Beerův zákon, který se využívá u většiny absorpčních metod, je splněn pouze pro zředěné roztoky do koncentrací přibližně $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

6.1. Stanovení železa ve vzorku 1,10-fenantrolinem - METODA A

Ionty Fe^{2+} tvoří s činidlem červené komplexní ionty tris-fenantrolino-železnaté. Zbarvení je téměř neomezeně stálé a jeho intenzita prakticky nezávisí na pH v rozmezí 2 – 9 ($\varepsilon_{550\text{nm}} = 11\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Stanovení ruší značný počet iontů, dávajících buď sraženiny, nebo barevné sloučeniny se základními složkami systému. Jejich vliv však lze omezit volbou vhodného pH.

Metoda se používá i ke stanovení Fe^{3+} : chlorid hydroxylamonia, přítomný v reakční směsi, redukuje kvantitativně Fe^{3+} na Fe^{2+} .

6.1.1. Měření časové závislosti vývoje zbarvení

Časová stabilita proměřovaného roztoku je předpokladem pro měření závislosti absorbance na koncentraci $A = f(c)$ a absorbance na vlnové délce $A = f(\lambda)$.

Měření $A = f(t)$ se provádí s jedním roztokem při vlnové délce 510 nm.

POSTUP:

Do odměrné baňky na 25 ml napipetovat 5 ml standardního roztoku Fe^{3+} (standard A) a pH roztoku upravit 3 ml 2 M octanu sodného na hodnotu 3,5. Poté k upravenému standardu napipetovat 1 ml 10% roztoku hydrochloridu hydroxylamonia, 1 ml 0,5% roztoku 1,10-fenantrolinu a baňku doplnit destilovanou vodou po rysku. Je důležité dodržet pořadí jednotlivých komponentů.

Absorbanci roztoku proměřovat po dobu 40 minut vždy po 5 minutách v 1 cm kyvetách proti destilované vodě nebo blanku.

Při práci s kyvetou dodržovat tyto zásady:

- kyvetu naplnit měřeným roztokem do $\frac{2}{3}$ objemu kyvety (pokud je naplněna po okraj, hrozí nebezpečí vylití jejího obsahu do přístroje a jeho následné poškození)
- pro měření vždy používat stejnou absorpční kyvetu
- kyvetu vkládat do kyvetového prostoru vždy stejnou stranou, ověřit si směr paprsku

VYHODNOCENÍ:

Do grafu vynést závislost absorbance na čase, zjistit čas, kdy je absorbance konstantní. Všechna následující měření se budou provádět po tomto zjištěném čase.

6.1.2 Měření absorpčního spektra v rozsahu 460-560 nm po 10 nm

Absorpční spektrum vyjadřuje graficky závislost absorbance na vlnové délce.

POSTUP:

Ke stanovení použít roztok připravený dle odstavce 6.1.1, kde již bude absorbance konstantní. Na spektrofotometru proměřit absorbanci roztoku v závislosti na vlnové délce, nastavované na přístroji v rozmezí 460–560 nm po 10 nm. Měřit v 1 cm kyvetě proti destilované vodě jako blanku.

VYHODNOCENÍ:

Do grafu vynést závislost absorbance na vlnové délce a odečíst λ_{\max} . Při této vlnové délce pak provést měření kalibračních roztoků a vzorku.

6.1.3 Měření závislosti absorbance na koncentraci, kalibrační křivka

Měření závislosti $A = f(c)$ se provádí s řadou standardních roztoků o známé koncentraci. Přímkový průběh závislosti $A = f(c)$ potvrzuje platnost Bouguer-Lambert-Beerova zákona:

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

POSTUP:

Do 25 ml odměrných baněk napipetovat postupně 1–10 ml standardního roztoku Fe^{3+} (**standard A**) a pH roztoku upravit 3 ml 2 M octanu sodného. Poté k těmto roztokům napipetovat 1 ml 10% roztoku hydrochloridu hydroxylamonia, 1 ml roztoku 0,5% 1,10-fenantrolinu a odměrné baňky doplnit destilovanou vodou po rysku.

Na spektrofotometru nastavit λ_{\max} a v 1 cm kyvetách změříme absorbanci jednotlivých roztoků. Jako blank použít destilovanou vodu.

Z jednotlivých měření sestavit následující tabulku (tabulka 1):

č.	$V_{\text{pip.}}$ (0,01M Fe^{3+}) [ml]	m_{Fe} [μg]	n_{Fe} [mol]	$c(\text{Fe})$ [mol. l ⁻¹]	Absorbance A	ε $\varepsilon = A/c(\text{Fe})$ [l. mol ⁻¹ .cm ⁻¹]	teor. absorbance A^t
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

VYHODNOCENÍ:

- Do grafu vynést závislost absorbance na hmotnosti Fe [μg] v příslušné odměrné baňce.
- Pro každý bod kalibrační závislosti vypočítat hodnotu molárního absorpčního koeficientu (z poměru $A_i/(c_{Fe})_i$, kde $(c_{Fe})_i$ je koncentrace iontů železa v i-té odměrné baňce v mol/l a A_i je naměřená absorbance v 1 cm kyvetě).
- Hodnoty ε zapsat do tabulky a jejich soubor statisticky vyhodnotit, tj. stanovit průměrnou hodnotu molárního absorpčního koeficientu ε^* , standardní odchylku průměru dle Dean-Dixona (pokyny u úlohy č.7) a interval spolehlivosti.
- S použitím hodnoty průměrného absorpčního koeficientu ε^* vypočítat pro každý bod kalibrační křivky teoretickou hodnotu absorbance A^t pro ideálně proloženou kalibrační křivku. Vypočtené údaje zaneš do tabulky a doplň do grafu k naměřeným hodnotám.

6.1.4. Stanovení koncentrace Fe²⁺ (popř. Fe³⁺) v neznámém vzorku

POSTUP:

Zadaný vzorek doplnit po rysku ($V_0 = 100$ ml). Z tohoto vzorku pipetovat do tří 25 ml odměrných baněk po 10 ml roztoku, pH roztoku upravit 3 ml 2 M octanu sodného. Dále přidat 1 ml 10% roztoku hydrochloridu hydroxylamonia a 1 ml 0,5% roztoku 1,10-fenantrolinu. Proměřit absorbanci roztoků v 1 cm kyvetách při λ_{max} proti destilované vodě jako blanku.

VYHODNOCENÍ ANALÝZY:

- graficky z kalibrační křivky:** z grafu odečíst hmotnost Fe [μg] v odměrné baňce s měřeným barevným roztokem. Výsledek přepočítat na hmotnost v baňce se zadaným roztokem vzorku s použitím údaje o pipetovaném alikvotním množství vzorku. Výsledek uvádět v μg Fe
- výpočtem:** za použití průměrného absorpčního koeficientu ε^* dosadit do rovnice:

$$c = \frac{A}{\varepsilon^* \cdot l}$$

kde: l je optická délka kyvety [cm],
 c je koncentrace absorbujících částic [mol .l⁻¹],
 ε^* je průměrný molární absorpční koeficient [l.mol⁻¹.cm⁻¹].

Takto získanou koncentraci Fe v odměrné baňce s barevným roztokem (v mol.l⁻¹) přepočítat na konkrétní látkové množství v odměrné baňce a na hmotnost Fe v μg. S přihlédnutím k ředění vzorku vypočítat hmotnost Fe v zadaném roztoku (v odměrné baňce je pouze alikvotní část zadaného vzorku).

POZOR! Při stanovení koncentrace Fe³⁺ v neznámém vzorku postupovat stejně, jako je uvedeno při stanovení koncentrace Fe²⁺, hydrochlorid hydroxylamonia, přidávaný do reakční směsi, redukuje kvantitativně Fe³⁺ na Fe²⁺.

UKONČENÍ ANALÝZY:

Plastové kyvety opláchnout destilovanou vodou, skleněné kyvety destilovanou vodou a ethanolom, otřít pouze zvenku do sucha skládaným tampónem a uložit do zásobníku. Použité odměrné baňky vyprázdnit, vymýt destilovanou vodou a dát uschnout do stojanu ústím dolů.

6.2. Stanovení železa kyselinou sulfosalicylovou - METODA B

Ionty Fe³⁺ reagují s přebytkem kyseliny 5-monosulfosalicylové v závislosti na aciditě prostředí za vzniku řady komplexů, které se navzájem liší složením a zbarvením:

oblast existence (pH)	1,8 - 2,5	4 - 8	8 - 11
poměr koncentrací kovů k činidlu	1 : 1	1 : 2	1 : 3
maximum absorbance	510 nm		420 nm
ε [l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹]	1 600		6 000
zbarvení	červenofialové	červené	oranžově žluté

Ve spektrofotometrii se nejčastěji využívá reakce v alkalickém prostředí, kde žlutooranžový komplex dávají, v důsledku vzdušné oxidace, ionty Fe^{3+} i Fe^{2+} , a kde tedy stanovujeme sumu obou forem železa. Intenzita zbarvení přitom prakticky nezávisí na koncentraci amoniaku a amonných solí, reakci ruší organické polyhydroxykyseliny (vinná, citronová), oxidační činidla a kovové ionty, které se srážejí v amoniakálním prostředí, resp. které tvoří podobně barevné komplexy.

6.2.1. Měření časové závislosti

Měření $A = f(t)$ se provádí s jedním roztokem při vlnové délce 420 nm v 1 cm kyvetě.

POSTUP:

Do odměrné baňky na 50 ml napipetovat 2 ml standardního roztoku Fe^{3+} (**standard B**), pipetou přidat 5 ml 10% roztoku kyseliny sulfosalicylové, 10 ml 10% amoniaku a doplnit destilovanou vodou po rysku. Absorbanci roztoku měřit při 420 nm po dobu 45 minut po 5 minutách v 1 cm kyvetě proti blanku nebo destilované vodě.

VYHODNOCENÍ:

Do grafu vynést závislost absorbance na čase, zjistit čas, za který je absorbance konstantní. Všechna následující měření budou prováděna po tomto zjištěném čase.

6.2.2. Měření absorpčního spektra v rozmezí 400 - 480 nm

Absorpční spektrum vyjadřuje graficky závislost absorbance na vlnové délce.

POSTUP:

Ke stanovení použít roztok připravený dle odstavce 6.2.1, kde již bude absorbance konstantní. Po čase zjištěném v odst. 6.2.1 měřit absorbanci roztoku v závislosti na vlnové délce, a to v rozsahu 400–480 nm vždy po 10 nm. Měření provádět v 1 cm kyvetách proti blanku nebo destilované vodě.

VYHODNOCENÍ:

Do grafu vynést závislost absorbance na vlnové délce a odečíst λ_{max} . Při této vlnové délce pak provést měření kalibrační křivky a vzorku.

6.2.3. Měření závislosti absorbance na koncentraci, kalibrační křivka

POSTUP:

Do 50 ml odměrné baňky pipetovat 0,5–3,0 ml standardního roztoku Fe^{3+} (**standard B**), přidat 5 ml 10% roztoku kyseliny sulfosalicylové, 10 ml 10% amoniaku a doplnit destilovanou vodou po značku. Při λ_{max} měřit absorbanci v závislosti na rostoucí koncentraci železa v 1 cm kyvetách proti blanku nebo destilované vodě.

VYHODNOCENÍ:

Z jednotlivých měření sestavit tabulku č. 2.

č.	$V_{pip.}$ (0,1M Fe^{3+}) [ml]	m_{Fe} [μg]	n_{Fe} [mol]	$c(Fe)$ [mol. l ⁻¹]	Absorbance A	ϵ $\epsilon = A/c(Fe)$ [l. mol ⁻¹ .cm ⁻¹]	teor. absorbance A ^t
1							
2							
3							
4							
5							
6							

6.2.4. Stanovení železa v neznámém vzorku (VZOREK B)

POSTUP:

Přímo ke vzorku v 50 ml odměrné baňce přidat 5 ml 10% roztoku kyseliny sulfosalicylové, 10 ml 10% amoniaku, doplnit vodou po rysku a měřit absorbancí při λ_{\max} v 1 cm kyvetách. Koncentraci železa v neznámém vzorku odečíst z kalibračního grafu (vyhodnotit *graficky* i *výpočtem*).

6.3. Zpracování výsledků, vyjádření závislosti $A = f(c_{Fe})$ lineární regresi

V analytické chemii se využívá závislosti určité měřitelné veličiny na koncentraci stanovené látky v roztoku, u spektrofotometrie je to závislost absorbance na koncentraci stanovovaného iontu $A = f(c_{Me})$.

Většinou bývá funkční závislost mezi měřenou veličinou a koncentrací roztoku zjišťována pokusně a nalezená závislost se zpracovává graficky, formou **kalibračního grafu**. Naměřené hodnoty mají určitý nahodilý rozptyl, daný nejen přesností vlastního měření analytického signálu, ale i nepřesnostmi při navažování, ředění a pipetování, které ovlivňují i hodnoty nezávisle proměnné, údaje o koncentraci iontu. Proto body kalibrační závislosti neleží vždy na hladké křivce. Chyby lze graficky vyrovnat proložením křivky naměřenými body tak, aby procházela co největším počtem bodů a ostatní byly kolem ní rovnoměrně rozděleny. Pomocí kalibrační křivky zpravidla následně vyhodnocujeme měření analyzovaných vzorků.

Někdy je účelnější definovat funkční závislost analytického signálu na koncentraci a soubor naměřených hodnot nahradit křivkou, která je tzv. „nejlepší“ proložením. Rovnici takové křivky získáme lineární regresi datového souboru.

Při lineární závislosti u spektrofotometrie uvažujeme rovnici přímky:

$$A = a + b \cdot c$$

kde: A je naměřená absorbance jako závisle proměnná,
 c je koncentrace stanovovaného iontu (nezávisle proměnná).

Známe-li hodnoty koeficientů a , b , můžeme snadno vypočítat pro jakékoliv c příslušnou hodnotu A . Spolehlivě lze určit koeficienty a a b se zřetelem na chyby v měřené proměnné A na základě tzv. principu maximální věrohodnosti pro normálně rozdělené proměnné, který vede k definování regresní přímky pro regresi A na c . Vliv náhodných chyb je na základě tohoto principu kompenzován tím, že se minimalizuje součet čtverců odchylek jednotlivých bodů od regresní přímky (uvažují se odchylky rovnoběžné s osou y).

V programu MS Excel vypočítáme koeficienty regresní přímky a jejich parametry:

směrnici regresní přímky, tzv. regresní koeficient b

$$b = \frac{\sum(c) \cdot \sum(A) - n \sum(c \cdot A)}{[\sum(c)]^2 - n \sum(c^2)}$$

posunutí regresní přímky, koeficient a

$$a = \frac{1}{n} \sum(A) - b \cdot \frac{1}{n} \sum(c)$$

odhad směrodatné odchylky $s_{A,c}$ charakterizující rozptýlení kolem regresní přímky

$$s_{A,c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - Y_i)^2}{n - 2}}$$

odhad směrodatné odchylky s_b regresního koeficientu b

$$s_b = \frac{s_{A,c}}{\sqrt{\sum c^2 - \frac{[\sum c]^2}{n}}}$$

odhad směrodatné odchylky s_a posunutí a

$$s_a = s_{A,c} \sqrt{\frac{\sum(c^2)}{n \sum(c^2) - [\sum(c)]^2}}$$

korelační koeficient r

$$r = \frac{n \cdot \sum c \cdot A - \sum c \cdot \sum A}{\sqrt{[n \cdot \sum(c^2) - (\sum c)^2] [n \cdot \sum(A^2) - (\sum A)^2]}}$$

kde: $Y_i = a + b \cdot c_i$,

A_i jsou naměřené hodnoty.

6.4. Vyhodnocení spektrofotometrie

Při vyhodnocení spektrofotometrického stanovení obsahu železa v neznámých vzorcích v protokolu do závěru uvést:

1. Grafy naměřených časových závislostí se zdůvodněním vybraného času pro proměření jednotlivých vzorků i kalibračních závislostí.
2. Grafy naměřených absorpčních spekter se zdůvodněním vybraných vlnových délek pro jednotlivá stanovení.
3. Vyhodnocení stanovení obsahu železa v μg v neznámém vzorku metodou A - kalibrační křivky, grafické i početní vyhodnocení dle odstavce 6.1.3, 6.1.4 a 6.3.
4. Vyhodnocení stanovení obsahu železa v μg v neznámém vzorku metodou B - kalibrační křivky, grafické i početní vyhodnocení dle odstavce 6.2.3, 6.2.4 a 6.3.
5. Zdůvodnění příčin možného chybného stanovení obsahu železa v neznámém vzorku.