# 5. VÍCESLOŽKOVÁ FOTOMETRICKÁ ANALÝZA

**TEORIE:**

Metody molekulové absorpční spektroskopie oblasti UV-VIS jsou založeny na interpretaci změn, které nastávají v molekulách látek při absorpci záření v rozmezí vlnových délek asi 200–800 nm.

Absorbovaná kvanta energie vyvolávají přechody valenčních elektronů. Absorpční přechod je charakterizován hodnotou vlnové délky pro maximum pásu λmax a intenzitou pásu.

V analytické chemii se tato intenzita nejjednodušeji vyjadřuje hodnotou molárního absorpčního koeficientu εmax. Hodnota εmax se vypočítá z hodnoty absorbance Amax změřené pro roztok látky o koncentraci c v kyvetě tloušťky l cm při vlnové délce λmax dle **Bouguer-Lambert-Beerova** **zákona** ve tvaru:

****

Předpokladem pro měření závislostí absorbance na koncentraci A = f(c) a absorbance na vlnové délce A = f(λ), která jsou základem každé spektrofotometrické metody, je časová stabilita proměřovaného roztoku.

Pro určitou barevnou látku v roztoku je charakteristické absorpční spektrum s definovaným absorpčním maximem λmax. Intenzitu zbarvení lze vyjádřit veličinou absorbance Aλ, tj. jako logaritmus poměru světelného toku Φλ,0 vstupujícího do barevného prostředí k světelnému toku Φλ prošlému barevným roztokem při určité vlnové délce použitého záření.

Platí:

** →** 

Je-li v roztoku přítomna směs barevných látek A a B, je absorpce světelného toku určité vlnové délky λ1 tímto roztokem součtem absorpcí barevnými látkami A a B a pro absorbanci při této vlnové délce tedy platí:



Pro absorbanci při jiné vlnové délce λ2 platí: 

Při přesném fotometrickém stanovení dvou barevných složek v roztoku metodou klasické vícesložkové analýzy vycházíme proto z těchto předpokladů:

1. roztok látky A o koncentraci *c*A silně absorbuje při vlnové délce λ1 a málo při vlnové délce λ2. Naproti tomu roztok látky B o koncentraci *c*B silně absorbuje při vlnové délce λ2 a málo při vlnové délce λ1
2. absorpce roztoků jedné i druhé složky se při obou vlnových délkách λ1 a λ2 řídí **Bouguer-Lambert-Beerovým zákonem:**

****

*kde:* ελ je hodnota molárního absorpčního koeficientu pro danou vlnovou délku [l mol-1 cm-1 ],

lje tloušťka kyvety [cm],

c je koncentrace [mol. l-1].

Na základě tohoto zákona a vzhledem k výše uvedené aditivnosti absorbance můžeme absorbanci směsi dvou barevných látek při vlnové délce λ1 vyjádřit takto:

* pro vlnovou délku λ1: 

*kde:* (εA)λ1, resp. (εB)λ1 jsou molární absorpční koeficienty látky A, resp. látky B pro vlnovou délku λ1

* pro vlnovou délku λ2 platí analogicky: 

*kde:* (εA)λ2, resp. (εB)λ2 jsou molární absorpční koeficienty látky A, resp. látky B pro vlnovou délku λ2 .

Používáme-li při měření kyvety o stále stejné tloušťce (nejčastěji l = 1 cm), můžeme hodnoty *ε* definovat vzhledem k této jednotkové tloušťce a veličinu *l* v rovnicích vynechat.

Rovnice pro Aλ1 a Aλ2 představují dvě vzájemně spjaté rovnice pro dvě neznámé, kterými jsou koncentrace látky A, tj. *c*A, a látky B, tj. *c*B ve směsi.

**Hodnoty jednotlivých veličin vyskytujících se v těchto rovnicích určíme takto**:

1. hodnoty Aλ1 a Aλ2  **změřením**

hodnoty (εA)λ1 a (εA)λ2 **výpočtem**, resp. graficky jako směrnice koncentračních závislostí pro standardní roztok látky A naměřených pro dvě zvolené vlnové délky (Aλ1 = f (cA) a Aλ2 = f (cA))

1. hodnoty (εB)λ1 a (εB)λ2 **výpočtem**, resp. graficky jako směrnice koncentračních závislostí pro standardní roztok látky B naměřených pro dvě zvolené vlnové délky (Aλ1 = f (cB) a Aλ2 = f (cB))

Pro současné stanovení dvou složek je žádoucí, aby poměr molárních absorpčních koeficientů jednotlivých složek byl alespoň při jedné ze dvou zvolených vlnových délek



### 5.1. Příprava kalibračních roztoků

**KMnO4**

Přesně 0,5; 1; 1,5; 2 a 2,5 ml 0,01 M KMnO4 napipetovat postupně do pěti 50 ml odměrných baněk, pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H2SO4 a 1 M H3PO4, doplnit destilovanou vodou po rysku a dobře promíchat.

**K2Cr2O7**

Přesně 1, 2, 3, 4 a 5 ml 0,01 M K2Cr2O7 napipetovat postupně do pěti 50 ml odměrných baněk, pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H2SO4 a 1 M H3PO4, doplnit destilovanou vodou po rysku a dobře promíchat.

### 5.2. Měření absorpčních spekter manganistanu a dichromanu

Měření absorpčních spekter manganistanu a dichromanu provést pro kalibrační roztoky střední koncentrace (tj. obsahující 1,5 ml manganistanu a 3 ml dichromanu).

Absorbanci v rozsahu 370–550 mn změřit po 10 nm v 1 cm kyvetách proti destilované vodě. V oblastech absorpčních maxim doměřit ještě absorbance pro vlnové délky po 5 nm. Absorpční křivky (tj. závislosti absorbance na vlnové délce) jednotlivých komponent vynést do grafu.

Při práci s kyvetou dodržujeme tyto zásady:

* kyvetu naplnit měřeným roztokem do 2/3 objemu kyvety (pokud ji naplníme 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

### 5.3. Měření kalibračních závislostí manganistanu a dichromanu při vybraných vlnových délkách

Po vyhodnocení každé naměřené absorpční křivky vybrat vlnové délky vhodné pro stanovení, tj. takové, kde jsou rozdíly v absorbancích jednotlivých látek nejvýraznější (maximum, minimum). Pro analýzy směsí manganistanu a dichromanu jsou doporučeny vlnové délky 390, 470 a 545 nm.

Při každé z vybraných vlnových délek změřit kalibrační závislost se sadou kalibračních roztoků v 1 cm kyvetách proti destilované vodě:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| A390 = f(cKMnO4) | A470 = f(cKMnO4) | A545 = f(cKMnO4) |
| A390 = f(cK2Cr2O7) | A470 = f(cK2Cr2O7) | A545 = f(cK2Cr2O7) |

Výsledky zaznamenat do tabulky sestavené pro pozdější výpočty:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Vpip (zás.roztoku K2Cr2O7)  [ml] | c(K2Cr2O7)  [mol . l-1] | A390 | A470 | A545 |
| 0,5 |  |  |  |  |
| 1 |  |  |  |  |
| 1,5 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 2,5 |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Vpip (zás.roztoku KMnO4)  [ml] | c(KMnO4)  [mol . l-1] | A390 | A470 | A545 |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |

Pro každou vlnovou délku sestrojit kalibrační křivky KMnO4 a K2Cr2O7 jako závislosti A = f(c).

### 5.4. Příprava modelových směsných roztoků manganistanu a dichromanu a neznámého vzorku

Do tří 50 ml odměrných baněk připravit dle následující tabulky směsné roztoky o různém poměru obsahu manganistanu a dichromanu. Pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H2SO4 a 1 M H3PO4 , doplnit destilovanou vodou po značku a dobře promíchat.

K neznámému vzorku přidat 10 ml směsi 1 M H2SO4 a 1 M H3PO4 , doplnit destilovanou vodou po značku a dobře promíchat.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Vpip [ml]  (K2Cr2O7) | cK2Cr2O7 [mol/l]  (dáno) | A390 | A470 | A545 | Vpip [ml]  (KMnO4) | A545 | A545 | A545 | cKMnO4 [mol/l]  (dáno) |
| Vzorek I | 2,5 |  |  |  |  | 1,5 |  |  |  |  |
| Vzorek II | 1 |  |  |  |  | 2 |  |  |  |  |
| Vzorek III | 4 |  |  |  |  | 0,5 |  |  |  |  |
| Neznámý vzorek | x |  |  |  |  | x |  |  |  |  |

**5.5. Měření absorbance směsných vzorků a výpočet jejich složení**

Při vlnových délkách, při nichž byly naměřeny kalibrační závislosti, změřit absorbance modelových vzorkův 1 cm kyvetě proti destilované vodě.

### 5.6. Stanovení koncentrace manganistanu a dichromanu v modelových vzorcích

Jak lze odvodit z naměřených spekter, jsou rozdíly mezi absorpčními křivkami pro žlutooranžový dichroman a fialový manganistan takové, že v oblasti vlnové délky 545 nm dichroman na rozdíl od manganistanu prakticky neabsorbuje.

To umožňuje z absorbance naměřené při této vlnové délce stanovit s použitím příslušné kalibrační křivky pro manganistankoncentraci manganistanu ve vzorku.

Naměřená absorbance směsného vzorku při 545 nm odpovídá totiž pouze koncentraci manganistanu, protože platí:



Pro takto určenou koncentraci manganistanu odečíst na kalibračních křivkách pro manganistan při 390 nm a 470 nm odpovídající hodnoty absorbance, tj. (AKMnO4)390  a (AKMnO4)470.

Pro jednotlivé vlnové délky odečíst tyto hodnoty od naměřených hodnot absorbance směsného modelového vzorku A390, resp. A470, čímž lze získat korigovanéhodnoty absorbancí, které odpovídají pouze koncentraci dichromanu (AK2Cr2O7)390 a (AK2Cr2O7)470.

Při výpočtu je třeba vycházet z následujících vztahů, patřičně je upravit:









Z vypočtených korigovaných hodnot absorbancí (AK2Cr2O7)390 a (AK2Cr2O7)470 určit pomocí kalibračních křivek dichromanu pro jednotlivé vlnové délky (390 a 470 nm) hledané koncentrace dichromanu ve vzorku. Určené koncentrace dichromanu pro jednotlivé vlnové délky (390 a 470 nm) porovnat a posoudit, zda existuje souvislost mezi přesností měření pro určitou úroveň absorbance a výsledkem analýzy.

### 5.7. Stanovení koncentrace manganistanu a dichromanu v neznámém vzorku

K neznámému vzorku v 50 ml odměrné baňce napipetovat 10 ml směsi 1 M H2SO4 a 1 M H3PO4 , doplnit destilovanou vodou po značku a dobře promíchat.

### 5.7.1. Použití tabulkového procesoru pro grafické znázornění naměřených závislostí a zpracování výsledků

Podle pokynů vedoucího cvičení v programu MS Excel otevřít šablonu *„5-vícesložková analýza - vzorové řešení“* a uložit nový sešit.

Přepsat absorbance pro jednotlivé vlnové délky.

Program zpracuje zadaná vstupní data a naměřené hodnoty a v řádcích 93–111, ve sloupcích A–I se objeví výsledky analýz modelových vzorků (v jednotkách hmotnostních v řádcích 95–101 a v jednotkách objemových v řádcích 103–113). V řádcích 114–131 a ve sloupcích A–D jsou výsledky analýzy zadaného neznámého vzorku.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Výpočet m{Mn,Cr} v modelových vzorcích (v mg)*** | | | |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **DÁNO:** |  |  |  |  |  |  |  |  |
| M.H. KMnO4 | 158,045 | g/mol | vzorek č. | pipetováno |  |  |  |  |
| 0.0100 roztok | 1,58045 | mg/ml |  | ml | mg |  |  |  |
|  |  |  | ***1*** | 1,50 | 2,370675 |  |  |  |
|  |  |  | ***2*** | 2,00 | 3,1609 |  |  |  |
|  |  |  | ***3*** | 0,50 | 0,790225 |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| M.H. K2Cr2O7 | 294,19 | g/mol | vzorek č. | pipetováno |  |  |  |  |
| 0.0100M roztok | 2,9419 | mg/ml |  | ml | mg |  |  |  |
|  |  |  | ***1*** | 2,50 | 7,35475 |  |  |  |
|  |  |  | ***2*** | 1,00 | 2,9419 |  |  |  |
|  |  |  | ***3*** | 4,00 | 11,7676 |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **KALIBRAČNÍ KŘIVKA MANGANISTAN** | | |  |  |  |  |  |  |
| c(KMnO4) | 0,01 |  | t.j. v 1 ml je 0.01 mmol | |  |  |  |  |
|  |  |  | t.j. v 1 ml je 1.58045 mg KMnO4 | | |  |  |  |
| ml do 50 ml | mmol | c(KMnO4) | **A** | ε | **A** | ε | **A** | ε |
|  | v 50 ml | mol/l | **390** | 390 | **470** | 470 | **545** | 545 |
| **0,50** | 0,005 | 0,0001 | **0,021** | 210,0 | **0,043** | 430,0 | **0,124** | 1240,0 |
| **1,00** | 0,010 | 0,0002 | **0,031** | 155,0 | **0,077** | 385,0 | **0,237** | 1185,0 |
| **1,50** | 0,015 | 0,0003 | **0,041** | 136,7 | **0,113** | 376,7 | **0,386** | 1286,7 |
| **2,00** | 0,020 | 0,0004 | **0,047** | 117,5 | **0,143** | 357,5 | **0,548** | 1370,0 |
| **2,50** | 0,025 | 0,0005 | **0,072** | 144,0 | **0,213** | 426,0 | **0,944** | 1888,0 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | průměrná hodnota | |  | 152,6 |  | 395,0 |  | 1393,9 |
|  | stand. odchylka % | |  | 23% |  | 8% |  | 20% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **KALIBRAČNÍ KŘIVKA DVOJCHROMAN** | | |  |  |  |  |  |  |
| c(K2Cr2O7) | 0,01 |  | t.j. v 1 ml je 0.01 mmol | |  |  |  |  |
|  |  |  | t.j. v 1 ml je 2.9419 mg K2Cr2O7 | | |  |  |  |
| ml v 50 ml | mmol | c(K2Cr2O7) | **A** | ε | **A** | ε | **A** | ε |
|  | v 50 ml | mol/l | **390** | 390 | **470** | 470 | **545** | 545 |
| **1,00** | 0,010 | 0,0002 | **0,075** | 375,0 | **0,042** | 210,0 | **0,004** | 20,0 |
| **2,00** | 0,020 | 0,0004 | **0,142** | 355,0 | **0,077** | 192,5 | **0,001** | 2,5 |
| **3,00** | 0,030 | 0,0006 | **0,232** | 386,7 | **0,118** | 196,7 | **0,001** | 1,7 |
| **4,00** | 0,040 | 0,0008 | **0,328** | 410,0 | **0,148** | 185,0 | **0,011** | 13,8 |
| **5,00** | 0,050 | 0,001 | **0,447** | 447,0 | **0,181** | 181,0 | **0,003** | 3,0 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | průměrná hodnota | |  | 394,7 |  | 193,0 |  | 8,2 |
|  | stand.odchylka % | |  | 9% |  | 6% |  | 101% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **Naměřené absorbance** | |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **A(390)** |  | **A(470)** |  | **A(545)** |  |  |  |
| 1.vzorek | **0,227** |  | **0,192** |  | **0,395** |  |  |  |
| 2.vzorek | **0,122** |  | **0,173** |  | **0,556** |  |  |  |
| 3.vzorek | **0,346** |  | **0,177** |  | **0,128** |  |  |  |
| **4.vzorek - x** | **0,097** |  | **0,108** |  | **0,244** |  |  |  |

**5.7.2 Vyhodnocení vícesložkové analýzy**

Při vyhodnocení stanovení koncentrací a hmotností KMnO4 a K2Cr2O7 v neznámém vzorku v protokolu do závěru uvést:

1. **Naměřená absorpční spektra pro manganistan a dichroman se zdůvodněním vybraných vlnových délek.**
2. **Kalibrační závislosti a vyplněné tabulky pro manganistan a dichroman při 390, 470 a 545 nm, popř. jiných vybraných vlnových délkách.**
3. **Tabulku výsledků analýz modelových vzorků s údaji:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Výsledek analýz modelových vzorků** | | |  |  |  |  |  |  |
| VÝSLEDEK | KMnO4 | 158,045 |  | K2Cr2O7 | 294,19 |  |  |  |
| v mg | dano | stanoveno | rel.ch. | dano | stanoveno při 400nm. | rel. ch. | stanoveno při 470 nm | rel. ch. |
|  | mg | mg | % | mg | mg | % | mg | % |
| 1.vzorek | **2,3707** | **2,2393** | -6% | **7,3548** | **6,8473** | -7% | **6,1007** | -17% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2. vzorek | **3,1609** | **3,1520** | 0% | **2,9419** | **2,2776** | -23% | **1,1760** | -60% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3. vzorek | **0,7902** | **0,7256** | -8% | **11,7676** | **12,3712** | 5% | **10,7235** | -9% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| VÝSLEDEK | KMnO4 | 158,045 |  | K2Cr2O7 | 294,191 |  |  |  |
| přepočet na ml | dano | stanoveno | rel.ch. | dano | stanoveno při 400nm. | rel. ch. | stanoveno při 470 nm | rel. ch. |
|  | ml | ml | % | ml | ml | % | ml | % |
| 1.vzorek | **1,50** | **1,416854** | -6% | **2,50** | **2,3275** | -7% | **2,0737** | -17% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2. vzorek | **2,00** | **1,9943565** | 0% | **1,00** | **0,7742** | -23% | **0,3997** | -60% |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3. vzorek | **0,50** | **0,4591324** | -8% | **4,00** | **4,2052** | 5% | **3,6451** | -9% |

**Z tabulky výsledků analýz modelových vzorků uvést do oddělené tabulky teoretické hodnoty stanovovaných látek (m[mg]) a hodnoty naměřené při jednotlivých stanoveních modelových vzorků (m[mg], c[mol . l-1]) s ohledem na relativní chybu stanovení:**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| vzorek č. | c. KMnO4  [mol . l-1] | mteoret. KMnO4  [mg] | mstanoveno KMnO4  [mg] | c K2Cr2O7  [mol . l-1] | mteoret. K2Cr2O7  [mg] | mstanoveno K2Cr2O7  [mg] |
| I |  |  |  |  |  |  |
| II |  |  |  |  |  |  |
| III |  |  |  |  |  |  |
| N.vzorek |  | x |  |  | x |  |

**Uvést a zdůvodnit, při které vlnové délce je stanovený obsah dichromanu draselného přesnější.**

1. **Početně stanovit množství KMnO4 a K2Cr2O7 v modelových vzorcích a neznámém vzorku pomocí vztahů v odstavci 5.6.**
2. **Zdůvodnit příčiny možného chybného stanovení obsahu KMnO4 a K2Cr2O7 v neznámém vzorku.**