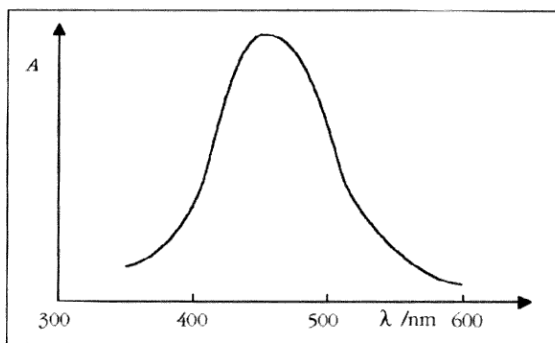


Úloha č. 1: Spektrofotometrické stanovení barviva "Oranž II"

Princip:

Koncentrace některých látek v roztoku může být stanovena na základě toho, že daná látka absorbuje viditelné světlo (jeví se nám jako barevná). Při absorpci světla dodá foton pohlcený molekulou určité látky energii elektronu z některého molekulového orbitalu, a způsobí tím jeho přechod do orbitalu s vyšší potenciální energií. Takto excitovaná molekula se pak přebytečné energie zbaví většinou tím, že ji předá molekulám rozpouštědla a tak ji přemění na teplo (tzv. nezářivá deexcitace). Protože v každé molekule jsou možné jen elektronové přechody odpovídající jistým konkrétním hodnotám energie, jsou také absorbovány jen fotony o vlnových délkách odpovídajících těmto hodnotám energie. Závislost intenzity absorpce na vlnové délce (energii) použitého světla se nazývá spektrum a ve viditelné oblasti má většinou tvar jednoho, nebo více vrcholů (tzv. píků) - viz obr. 1. Pro stanovení se obvykle používá světlo té vlnové délky při, které je absorpce největší (λ_{MAX}), protože pak je stanovení nejcitlivější. Použití monochromatického světla, ve skutečnosti ale konečného, i když úzkého intervalu vlnových délek (tzv. spektrální šířky), je nutné také proto, že kdyby spektrální šířka nebyla dostatečně úzká a docházelo-li by v jejím rozmezí ke znatelným výkyvům ve spektru, nedostali bychom lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací. Je třeba si uvědomit, že v roztoku mohou být kromě látky, kterou stanovujeme ještě další látky, které při použité vlnové délce absorbují a stanovení je potom zatíženo chybou. Proto je třeba celý postup měření a přípravy vzorku vždy pečlivě promyslet a konzultovat s literaturou. Při stanovení je měřený roztok umístěn v průhledné skleněné nádobce nazývané kyveta. Standardní rozměry kyvety jsou takové, že světlo projde vrstvou roztoku silnou přesně jeden centimetr. Na této dráze (nazývané optická dráha také dochází k absorpci světla. Je zřejmé, že kdybychom použili kyvetu širší (s delší optickou dráhou), absorpce by se zvýšila (což se v praxi někdy používá, chceme-li zvýšit citlivost stanovení). Také je přirozené, že na jednotkové dráze bude množství absorbovaného světla tím vyšší, čím vyšší bude koncentrace absorbující látky v roztoku. Tyto vztahy jsou vyjádřeny Lambert-Beerovým zákonem:



Obr.1 Elektronové absorpční spektrum 4-chlor-2-nitrofenolu

bychom lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací. Je třeba si uvědomit, že v roztoku mohou být kromě látky, kterou stanovujeme ještě další látky, které při použité vlnové délce absorbují a stanovení je potom zatíženo chybou. Proto je třeba celý postup měření a přípravy vzorku vždy pečlivě promyslet a konzultovat s literaturou. Při stanovení je měřený roztok umístěn v průhledné skleněné nádobce nazývané kyveta. Standardní rozměry kyvety jsou takové, že světlo projde vrstvou roztoku silnou přesně jeden centimetr. Na této dráze (nazývané optická dráha také dochází k absorpci světla. Je zřejmé, že kdybychom použili kyvetu širší (s delší optickou dráhou), absorpce by se zvýšila (což se v praxi někdy používá, chceme-li zvýšit citlivost stanovení). Také je přirozené, že na jednotkové dráze bude množství absorbovaného světla tím vyšší, čím vyšší bude koncentrace absorbující látky v roztoku. Tyto vztahy jsou vyjádřeny Lambert-Beerovým zákonem:

$$\log \frac{I_0}{I} = -\log T = A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

kde:

I_0 je světelný tok naměřený před kyvetou se vzorkem (např. lm)

I je světelný tok naměřený po průchodu kyvetou se vzorkem (např. lm)

T je transmitance, čili podíl světla, který prošel neabsorbován (bezrozměrná, někdy v %)

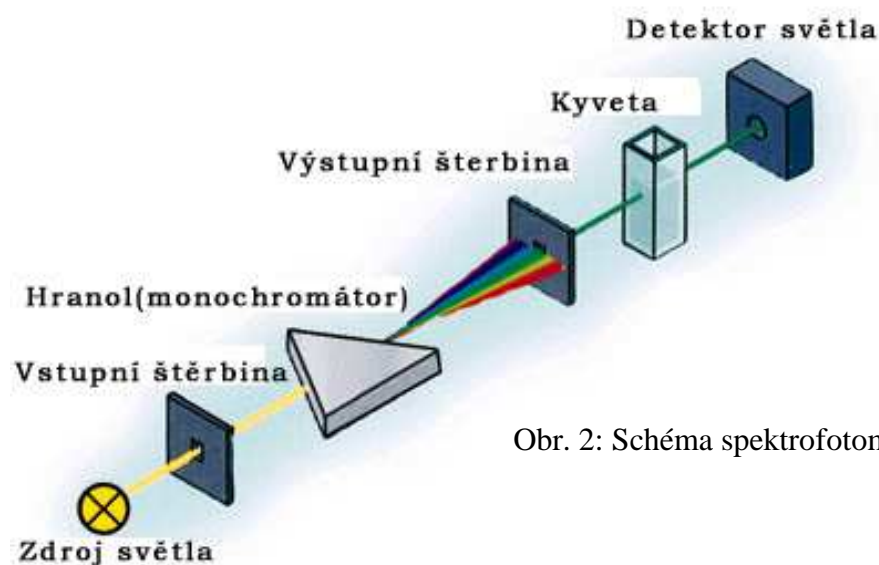
A_λ je absorbance (bezrozměrná)

ε_λ je molární dekadický absorpční koeficient, který je charakteristický pro určitou látku a danou vlnovou délku, a je v podstatě mírou schopnosti látky absorbovat světlo ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

l je optická dráha (cm)

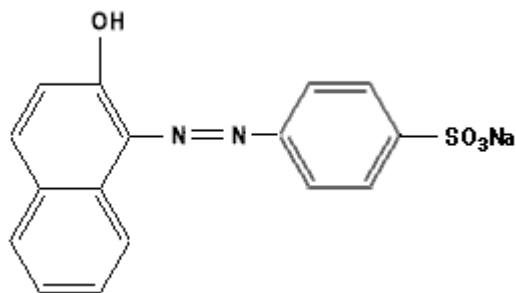
Nejčastěji je měřenou veličinou absorbance, protože je výhodné, že je lineárně závislá na koncentraci. V praxi provádíme měření tak, že přístroj je vynulován (tj. hodnota I_0 je změřena

a uložena v paměti nebo nastavení přístroje), když je do dráhy paprsku umístěna kyveta s čistým rozpouštědlem. Tím je zároveň měření opraveno o absorpci samotného rozpouštědla a kyvety (tzv. korigováno o pozadí). Poté je možno měřit další roztoky. Stanovení látky ve vzorku nejčastěji provádíme metodou kalibrační přímky. Metoda spočívá v tom, že máme k dispozici standard látky, kterou stanovujeme, tj. čistou látku získanou z důvěryhodného zdroje, který garantuje její čistotu, a z ní připravíme sadu roztoků o vzrůstající koncentraci stanovované látky (tzv. analytu), kde rozmezí koncentrací pokrývá předpokládaný rozsah možných koncentrací analytu ve vzorku. Jak je vidět z Lambert-Beerova zákona, měla by závislost absorpce kalibračních roztoků na známé koncentraci standardu být přímková, což umožňuje proložit naměřenými body přímkou (např. pomocí počítače v programu Excel). Obsah analytu v neznámém vzorku poté určíme změřením jeho absorpce a určením koncentrace analytu v něm buď výpočtem z určené rovnice kalibrační přímky nebo graficky z grafu kalibrační přímky. Na obrázku 2 je schématicky znázorněný přístroj, který se pro měření absorpce používá.



Obr. 2: Schéma spektrofotometru

Spektrofotometrické stanovení Oranži II je založeno na její absorpci ve viditelné oblasti světla. Oranž II, neboli sodná sůl kyseliny 1-(2-hydroxylnaftyl)azobenzen-4-sulfonové, je kyselé azobarvivo, které se používá k barvení usní, vlny, kompozitních materiálů apod.



Pracovní postup

1. Příprava zásobního roztoku Oranži II o koncentraci cca 200 mg/l

Naváží se s přesností ± 0.1 mg (tj. na analytických vahách) navážka barviva "Oranž II" blízká hodnotě 0,1 g, rozpustí se v potřebném množství destilované vody a kvantitativně se převede do 500ml odměrné baňky. Odměrná baňka se doplní destilovanou vodou po rysku a dokonale promíchá. Z hodnoty skutečné navážky barviva se vypočítá skutečná koncentrace připraveného roztoku:

$$c_z = \frac{m}{V}$$

kde:

- m** - navážka barviva "Oranž II" [mg],
- V** - objem připraveného zásobního roztoku [0,5 l],
- c_z** - koncentrace Oranži II v připraveném zásobním roztoku [mg/l].

2. Příprava základního roztoku Oranži II o koncentraci cca 20 mg/l

Do čisté 100ml odměrné baňky se odpipetuje 10 ml zásobního roztoku Oranži II připraveného v bodě 1, tato odměrná baňka se doplní destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchá. Vypočítá se skutečná koncentrace připraveného roztoku:

$$c_0 = \frac{c_z \cdot V_z}{V}$$

kde:

- c_z** - koncentrace Oranži II v zásobním roztoku vypočtená v bodě 1 [mg/l],
- V_z** - pipetovaný objem zásobního roztoku Oranži II [10 ml],
- V** - objem připraveného základního roztoku [100 ml],
- c₀** - koncentrace Oranži II v připraveném základním roztoku [mg/l].

3. Příprava kalibračních roztoků Oranži II

Do čtyř odměrných baněk o objemu 25 ml se odpipetuje postupně 5, 10, 15 a 20 ml základního roztoku Oranži II, připraveného v bodě 2. Tyto odměrné baňky se doplní destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchají. Koncentrace Oranži II v připravených kalibračních roztocích se vypočítá dle vzorce:

$$c_i = \frac{c_0 \cdot V_i}{V}$$

kde:

- c₀** - koncentrace Oranži II v základním roztoku vypočtená v bodě 2 [mg/l],
- V_i** - pipetovaný objem základního roztoku Oranži II [5, 10, 15 nebo 20 ml],
- V** - objem připraveného kalibračního roztoku [25 ml],
- c_i** - koncentrace Oranži II v připraveném kalibračním roztoku [mg/l],
- i** - pořadové číslo kalibračního roztoku [1, 2, 3 nebo 4].

4. Příprava roztoku vzorku

Zadaný vzorek v 25ml odměrné baňce se doplní destilovanou vodou po rysku a důkladně promáchá.

5. Měření absorpčního spektra Oranži II

Dle postupu pro obsluhu spektrofotometru se změří hodnoty absorbance základního roztoku Oranži II (připraveného v bodě 2) v rozsahu vlnových délek 360 – 460 nm po 10 nm. Z grafického znázornění závislosti změřené absorbance A na vlnové délce λ (obr. 1) se zjistí hodnota vlnové délky λ_{\max} , při které byla naměřena nejvyšší hodnota absorbance základního roztoku Oranži II.

6. Měření kalibrační křivky pro spektrofotometrické stanovení Oranži II

Spektrofotometr se nastaví pro měření při vlnové délce λ_{\max} (zjištěné v bodě 5). Změří se postupně absorbance destilované vody, všech kalibračních roztoků a základního roztoku Oranži II při vlnové délce λ_{\max} . Vynesete se do grafu závislost změřené absorbance na koncentraci Oranži II v roztoku (pozor, je nutno použít skutečné hodnoty koncentrací vypočtené v bodech 2 a 3). Získaná závislost by měla být přímková. Pokud se některý z bodů kalibrační křivky výrazně odchyluje od přímkové závislosti, je nutno připravit novou sadu kalibračních roztoků a měření kalibrační křivky zopakovat. **Tabulku s vypočtenými koncentracemi kalibračních roztoků a změřenými hodnotami absorbance předložte, spolu s vykreslenou kalibrační přímkou, vyučujícímu ke kontrole!**

Body kalibrační křivky se proloží přímkou pomocí lineární regrese (metodou nejmenších čtverců). Získá se rovnice kalibrační přímky ve tvaru:

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

kde:

A - absorbance

c - koncentrace

a, b - číselné parametry vypočtené pomocí lineární regrese

Pomocí lineární regrese se vypočítá taktéž koeficient korelace **r**, jehož hodnota by se měla blížit 1.

7. Stanovení obsahu Oranži II ve vzorku

Tříkrát vedle sebe se změří hodnota absorbance roztoku vzorku (připraveného v bodě 4) při vlnové délce λ_{\max} (zjištěné v bodě 5); po každém měření se kvjeta vyleje a naplní novým vzorkem. Vypočítá se aritmetický průměr naměřených hodnot absorbance vzorku, který se dosadí do rovnice kalibrační křivky (nalezené v bodě 6) a vypočítá se hodnota koncentrace **C**, což je koncentrace Oranži II v roztoku vzorku. Obsah Oranži II ve vzorku se vypočítá následovně:

$$m = c \cdot V$$

kde:










c - koncentrace Oranži II v roztoku vzorku zjištěná z kalibrační křivky [mg/l],

V - objem roztoku vzorku [$25 \cdot 10^{-3}$ l],

m - hmotnost barviva "Oranž II" obsaženého ve vzorku [mg].

Výsledek analýzy udejte v **mg** oranži II v analyzovaném vzorku. Spolu s výsledkem analýzy se předkládají ke kontrole také obrázky absorpčního spektra a kalibrační křivky Oranži II.

Návod k obsluze spektrofotometru SPEKOL 11

1. Zapojíme napájecí šňůru do elektrické sítě (220 V).
2. Zapneme přístroj stisknutím tlačítka  (1) - začnou blikat indikační diody.
3. Necháme přístroj asi 15 minut zahřívát.
4. Nastavíme zvolenou vlnovou délku pomocí bubínku (2), přičemž páčka (3) je v poloze . Při vlnových délkách $\lambda < 390$ nm přepneme páčku (3) do polohy .
5. Posuneme rukojeť na krytu fotonky (4) ve směru označeném modře (při vlnové délce 340 – 620 nm) nebo červeně (při vlnové délce 620 – 850 nm).
6. Do výměníku kyvet vložíme čistou kyvetu se vztažnou kapalinou (destilovaná voda) a vsuneme ji do dráhy paprsku.
7. Stiskneme tlačítko  - začne blikat dioda **R**.
8. Stiskneme tlačítko  - po krátké době (max. 5 s) dojde k automatickému vynulování, nebo **OFL**. V případě **OFL** páčku (3) přesuneme z polohy  do polohy **O** a znovu stiskneme . Při měření průběhu absorpčního spektra doměříme zbývající hodnoty absorbance v této poloze **O**.
9. Do výměníku kyvet vložíme kyvetu s měřeným roztokem, vsuneme ji do dráhy paprsku a na displeji odečteme změřenou hodnotu absorbance.
10. Pro měření při jiné vlnové délce pokračujeme znovu od bodu 4 s nastavením páčky (3) do odpovídající polohy dle zvolené vlnové délky. Pro měření jiného roztoku při téže vlnové délce pokračujeme bodem 9. Po přibližně 5 měřeních nebo po delší přestávce v měření je vhodné zkontrolovat nulovou polohu přístroje změřením absorbance vztažné kapaliny (destilovaná voda); dojde-li k odchylce, provedeme vynulování stisknutím tlačítka .
11. Po skončení měření vypneme přístroj stisknutím tlačítka  (1) a vytáhneme napájecí šňůru ze zásuvky.

Poznámka: Kyvety je nutno brát za matné stěny, měřeným roztokem kyvetu několikrát vypláchnout, naplnit cca 3 mm pod horní okraj a vnější strany kyvety otřít do sucha. Do výměníku kyvet je nutno kyvetu vkládat vždy stejně orientovanou (např. číslem dopředu).

Doplňkové příklady:

1. Při kolorimetrickém stanovení dusičnanů byl do 25 ml odměrné baňky pipetován 1 ml standardního roztoku NO_3^- o koncentraci 25 mg/ml, 1 ml směsi činidel a po vzniku zbarvení (20 min) byl baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený barevný roztok byl změřen na spektrofotometru při zvolené vlnové délce a byla odečtena hodnota absorbance 0,200. Pro jaký rozsah koncentrací dusičnanů v měřeném roztoku lze provést kalibraci, jestliže závislost absorbance na koncentraci je lineární v intervalu absorbancí od 0,010 (mez stanovitelnosti) do 1,800.
2. Jak byste připravili standardní roztok NO_3^- o koncentraci 25 mg/ml z pevného NaNO_3 ?
3. Převed'te následující údaje absorbance na transmitanci: 0,235; 0,543; 0,418; 1,000; 3,000. Kolik procent světla je v posledním případě roztokem absorbováno? Jak asi takový roztok při pohledu okem vypadá?

4. $5,00 \times 10^{-4}$ M roztok komplexu niklu byl naplněn do kyvety s optickou dráhou 1,000 cm. Absorbance při 592 nm byla 0,446. Jaké je ϵ komplexu při 592 nm? Má-li roztok neznámé koncentrace tohoto komplexu niklu absorbanci 0,125 při stejné vlnové délce, jaká je jeho koncentrace?
5. Spočítejte molární dekadický absorpční koeficient látky při dané vlnové délce, která má při koncentraci 0,023 mol/l absorbanci 0,563 (1 cm kyveta).
6. Vypočtete z hodnot naměřených během provádění této úlohy hodnotu molárního dekadického absorpčního koeficientu použitého barviva Oranž II při zvolené vlnové délce λ_{\max} a porovnejte vypočtenou hodnotu s hodnotami uváděnými v literatuře.
7. Odhadněte, jakou barvu bude mít roztok, který má $\lambda_{\max} = 630$ nm.