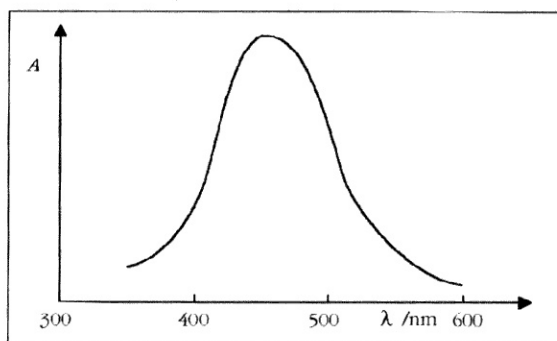


Úloha č. 1: Spektrofotometrické stanovení barviva

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

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

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 %)

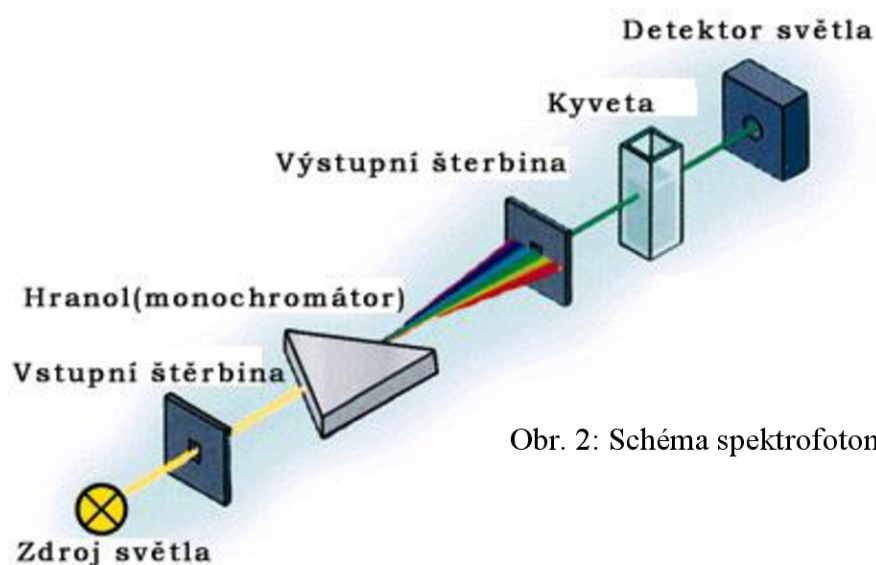
A_λ je absorbance (bezrozměrná)

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 absorbance 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 absorbance 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 absorbance používá.



Obr. 2: Schéma spektrofotometru

V úloze stanovováno používáno barvivo „Direct Orange 39“ (CAS No. 1325-54-8), což je sodná sůl kyseliny [2-(4-aminofenyl)fenyl]iminosulfamové. Je to barvivo používané zejména k barvení textilu. Patří mezi tzv. přímá barviva, rozpustná ve vodě a snadno vybarvující celulósová vlákna. Jde o produkt technické čistoty (dle výrobce minimálně 95 %), proto jsou při výpočtech v této úloze použity hmotnostní koncentrace, neboť použití látkových koncentrací by bylo principiálně chybné.

Pracovní postup

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

Naváží se s přesností ± 0.1 mg (tj. na analytických vahách) navážka barviva 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 [mg],
- V** - objem připraveného zásobního roztoku [0,5 l],
- c_z** - koncentrace barviva v připraveném zásobním roztoku [mg/l].

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

Do čisté 100ml odměrné baňky se odpipetuje 10 ml zásobního roztoku barviva 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 barviva v zásobním roztoku vypočtená v bodě 1 [mg/l],
- V_z** - pipetovaný objem zásobního roztoku [10 ml],
- V** - objem připraveného základního roztoku [100 ml],
- c₀** - koncentrace barviva v připraveném základním roztoku [mg/l].

3. Příprava kalibračních roztoků barviva

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

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

kde:

- c₀** - koncentrace barviva v základním roztoku vypočtená v bodě 2 [mg/l],
- V_i** - pipetovaný objem základního roztoku barviva [5, 10, 15 nebo 20 ml],
- V** - objem připraveného kalibračního roztoku [25 ml],
- c_i** - koncentrace barviva 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 barviva

Dle postupu pro obsluhu spektrofotometru se změří hodnoty absorbance základního roztoku barviva (přípraveného 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 barviva.

6. Měření kalibrační křivky pro spektrofotometrické stanovení barviva

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 barviva při vlnové délce λ_{\max} . Vynesete se do grafu závislost změřené absorbance na koncentraci barviva 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 barviva ve vzorku

Tříkrát vedle sebe se změří hodnota absorbance roztoku vzorku (přípraveného v bodě 4) při vlnové délce λ_{\max} (zjištěné v bodě 5); po každém měření se kyveta 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 barviva v roztoku vzorku. Obsah barviva ve vzorku se vypočítá následovně:

$$m = c \cdot V$$

kde:

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

V - objem roztoku vzorku [25.10⁻³ l],

m - hmotnost barviva obsaženého ve vzorku [mg].

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

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 absorpance 0,200. Pro jaký rozsah koncentrací dusičnanů v měřeném roztoku lze provést kalibraci, jestliže závislost absorpance na koncentraci je lineární v intervalu absorpance 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 absorpance 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. Absorpance při 592 nm byla 0,446. Jaké je ϵ komplexu při 592 nm? Má-li roztok neznámé koncentrace tohoto komplexu niklu absorpanci 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 absorpanci 0,563 (1 cm kyveta).
6. Vypoč'tete z hodnot naměřených během provádění této úlohy hodnotu molárního dekadického absorpčního koeficientu použitého barviva při zvolené vlnové délce λ_{max} a porovnejte vypoč'tenou hodnotu s hodnotami uváděnými v literatuře.
7. Odhadněte, jakou barvu bude mít roztok, který má $\lambda_{\text{max}} = 630$ nm.
8. Nakreslete strukturální vzorec barviva použitého v této úloze (tj. sodné soli kyseliny [2-(4-aminofenyl)fenyl]iminosulfamové).
9. Vysvětlete, jaký je rozdíl mezi barvivem a pigmentem.