

2024

SPEKTROFOTOMETRIE VE VIDITELNÉ OBLASTI SPEKTRA

Vedoucí prací: Mgr. Alla Sinica Ph.D.

Obecné základy

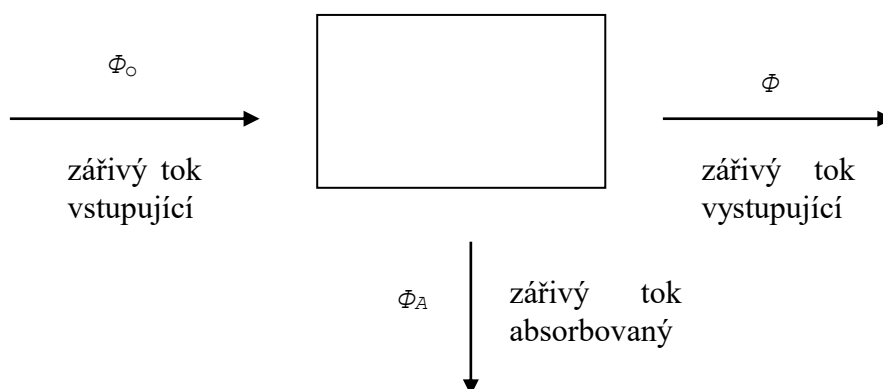
Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_p a E_q obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \nu = h c / \lambda \quad (1)$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka a h je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J s); podle konvence je excitovaná hladina označena indexem p , základní indexem q .

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (190 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrofotometry.

Při absorpčním měření je ze vstupujícího toku záření Φ_o část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok Φ_A) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ .



Podíl zářivých toků Φ a Φ_o se nazývá propustnost neboli **transmittance**:

$$\tau = \Phi / \Phi_o \quad (2)$$

Na většině spektrofotometrů lze také odečíst hodnotu **absorbance** A , tj. záporně vzatý logaritmus propustnosti:

$$A = -\log \tau = \log (\Phi_0/\Phi) \quad (3)$$

Konstrukčně se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. V našich laboratořích používáme jednopaprskový spektrofotometr, který měří pouze vystupující tok záření. Proto je třeba provést dvě měření: vedle měření vzorku (Φ) ještě srovnávací pokus (Φ_0), při kterém se měří slepý vzorek, kde nedochází k absorpci.

Závislost propustnosti či absorbance na vlnové délce (frekvenci) nazýváme **absorpční spektrum**. Absorpční spektrum je tvořeno absorpčními pásy. Absorpční pás charakterizujeme polohou jeho maxima, propustností (nebo absorbancí) v maximu a tvarem. Absorpční spektrum slouží k identifikaci sloučenin, zejména organických, s chromoforními skupinami, jako např. C=O, N=N, N=O, konjugovanými dvojnými vazbami apod.

Velká většina kationtů ve zředěných vodných roztocích vykazuje jen nepatrnou vlastní absorpci. Kationty se proto převádějí do barevných stabilních komplexů reakcí s komplexotvornými činidly obsahujícími chromoforní skupiny. Vznik komplexu obvykle vyžaduje prostředí o vhodné hodnotě pH apod.

Těžiště aplikací absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra je v kvantitativní analýze. Kvantitativní analýza je založena na **Lambertově-Beerově zákoně**, podle kterého je hodnota absorbance A při vlnové délce λ přímo úměrná látkové koncentraci c (mol l^{-1}). V případě jediné absorbující látky platí:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b c = k \cdot c \quad (4)$$

Konstantou úměrnosti je součin tloušťky vrstvy b (cm) a molárního absorpčního koeficientu při dané vlnové délce ε_λ , který má rozměr $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Z uvedeného vztahu dále vyplývá, že součin $\varepsilon_\lambda b$ je pro měření stejného analytu při stejné vlnové délce a ve stejné kyvetě konstantní a může být nahrazen konstantou k .

Lambertův-Beerův zákon platí pro monochromatické elektromagnetické záření a obor nízkých koncentrací, řádově menších než $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$. Pro kvantitativní analýzu je nutné vybrat takovou vlnovou délku, při níž stanovovaná látka silně absorbuje (nejlépe maximum absorpčního spektra) a případné interferující látky mají absorpci minimální.

Při spektrofotometrickém stanovení se obvykle pracuje srovnávacím způsobem, protože hodnota molárního absorpčního koeficientu stanovované látky při zvolené vlnové délce nebývá známá. Proto se měří vedle vzorku i standardní roztok. Konstantu úměrnosti k ze vztahu (4) pak zjistíme z absorbance A_{st} a koncentrace c_{st} standardního roztoku podle vztahu:

$$k = A_{\text{st}}/c_{\text{st}} = A_{\text{vz}}/c_{\text{vz}} \quad (5)$$

Z naměřené absorbance A_{vz} a vypočtené konstanty k pak lze vypočítat neznámou látkovou koncentraci vzorku c_{vz} . V praxi se však většinou nespokojíme se standardním roztokem o jediné koncentraci, ale použijeme tzv. **metodu kalibrační křivky**.

Při tomto postupu se změří absorbance několika kalibračních roztoků o různých koncentracích, samozřejmě v téže kyvetě a při stejné vhodné zvolené vlnové délce. Z průběhu získané závislosti absorbance na koncentraci, tj. z kalibrační křivky lze ověřit platnost Lambertova-Beerova zákona. Výsledná závislost by měla být přímka procházející počátkem a

nazýváme ji **kalibrační přímkou**. Tato metoda je použitelná, pokud stanovujeme danou látku v jednoduché, snadno napodobitelné matrici (např. v pitné vodě, kterou lze pro některá stanovení dobře modelovat destilovanou vodou).

Často je ovšem třeba danou látku stanovit ve složité matrici, např. v odpadní vodě nebo v složité biologické matrici. Modelovou matricí pro přípravu kalibračních roztoků by v tomto případě musela být totožná odpadní voda nebo biologický materiál ovšem neobsahující stanovovanou látku, což je těžce proveditelné. Pak je výhodné použít **metodu standardního přídatku**.

Při stanovení neznámé koncentrace vzorku c_{vz} metodou standardního přídatku se změří absorbance neznámého vzorku A_{vz} a pak se koncentrace stanovované látky ve vzorku zvýší definovaným přídatkem standardu a změří se odpovídající absorbance roztoku. Opět platí vztah (5). Stejně jako u metody kalibrační přímky se provádí často více přídatků a koncentrace vzorku se vyhodnocuje pomocí statistických metod (lineární regrese). Postup je podobný jako u předchozí metody.

Připraví se sada roztoků obsahující vedle stále stejného množství měřeného vzorku i různé známé přídatky standardního roztoku stanovované látky. Výchozím měřením je roztok vzorku bez přídatku standardního roztoku – odpovídá absorbanci A_{vz} . Do grafu se pak vynáší naměřené absorbance proti změnám koncentrace (rozdílům oproti koncentraci vzorku). Ze směrnice přímky k a výchozí hodnoty absorbance A_{vz} se vypočítá koncentrace vzorku c_{vz} .

$$c_{vz} = A_{vz} / k$$

Absorpční spektrofotometr

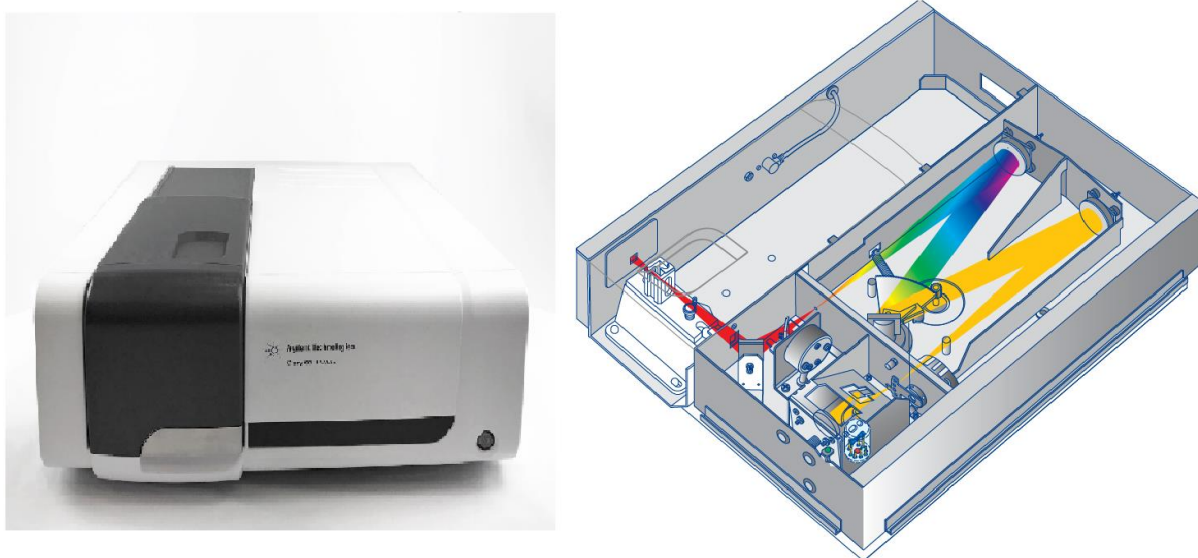
Základními částmi absorpčního spektrofotometru

Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi: 1. zdrojem záření, 2. monochromátorem, 3. absorpčním prostředím a 4. detekčním systémem.

1. **Zdrojem** spojitého elektromagnetického záření pro viditelnou oblast je běžně wolframová, halogenová nebo xenonová pulzní lampa (v případě Cary 60).
2. **Monochromátor** je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo reflexní mřížka. Pro viditelnou oblast spektra, tj. 400–800 nm, je hranol ze skla. Natáčením rozkladného prvku se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinu na štěrbinu výstupní.
3. **Absorpční prostředí** tvoří kyveta s měrným, příp. srovnávacím roztokem. Materiál kyvet se řídí měřenou oblastí spektra. Pro viditelnou oblast jsou okénka kyvety ze skla. Absorpční prostředí tvoří většinou roztok látky ve vhodném rozpouštědle. Nejběžnějším rozpouštědlem pro viditelnou oblast spektra je destilovaná voda.
4. **Detekční systém** je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používají fotonky nebo fotonásobiče, selénové hradlové fotočlánky, fotoodpory apod. Signál z detektoru se zpracovává v zesilovači a jeho výstup se zobrazí na číslcovém displeji.

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbinu

svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na digitální výstup.



Obr. 1. Absorpční spektrofotometr Cary 60

Spektrofotometr Agilent Cary 60 UV–Vis je jednopaprskový s kvalitním a přesným skenováním v rozsahu od 190 do 1100 nm s rychlostí skenování 24 000 nm /min.

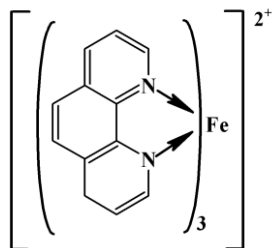
STANOVENÍ ŽELEZA 1,10-FENANTHROLINEM

Úkoly:

1. Proměřte elektronové absorpční spektrum komplexu a nalezněte vlnovou délku maxima absorpčního spektra.
2. Zjistěte časovou stálost komplexu.
3. Proměřte závislost absorbance na koncentraci komplexu a sestrojte kalibrační graf. Stanovte hmotnost železa (mg) ve vzorcích pitné vody metodami kalibrační přímky a standardního přídatku.
4. Zjistěte stechiometrii a vypočítejte konstantu stability vzniklého komplexu metodou kontinuálních variací (Jobova metoda).
5. Zpracujte a vyhodnoťte výsledky.

Princip

Ke stanovení železa ve vodných roztocích se používá velmi stabilní komplex dvojmocného železa (Fe^{2+}) s třemi molekulami 1,10-fenanthrolinu, vznikající při $\text{pH} = 2$ až 9.



Předpokladem kvantitativního stanovení je kvantitativní vznik komplexu (tzn. alespoň 99,99% Fe^{2+} je ve formě komplexu), chemická stálost komplexu v daném prostředí a rychlost vzniku komplexu. Ta musí být dostatečně vysoká, abychom mohli předpokládat, že komplex vzniká v době, která uplyne od namíchání roztoku do změření absorbance.

Aby přítomné železo bylo ve formě Fe^{2+} (s trojmocným železem komplex nevzniká), přidává se redukční činidlo, jako např. hydroxylamin. Reakce je velmi citlivá a dovoluje stanovit i velmi nízké koncentrace železa, řádově mg l^{-1} . Lambertův-Beerův zákon platí do koncentrací železa cca 60 mg l^{-1} .

Pro stanovení železa 1,10-fenanthrolinem se používá absorpční spektrofotometr Cary 60 (Obr. 1.). Jedná se o jednopaprskový absorpční spektrofotometr měřící ve spektrálním rozmezí 190–1000 nm.

Přístroj zapojíme síťovou šňůrou na 220 V a na Cary 60 zapneme po pravé straně síťový vypínač. Po jeho stisknutí se vypínač rozsvítí blikajícím žlutým světlem. Necháme přístroj krátkou dobu temperovat (asi 1–2 min). Po rozsvícení stálého zeleného světla vypínače přístroj lze použít k práci.

Činidla a roztoky

1. Základní roztok 1,10-fenanthrolinu má přesnou koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ a je připraven v dávkovači (dávka 2 ml). Toto množství představuje dostatečný přebytek činidla tak, aby komplexace s železnatým iontem proběhla kvantitativně.
2. Octanový tlumivý roztok ($\text{pH} = 4,5$) o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ je připraven v dávkovači (dávka 5 ml). Tento zásobní roztok obsahuje též hydroxylamin (100 g l^{-1}) pro redukci přítomného Fe^{3+} na Fe^{2+} .
3. Standardní roztok železnaté soli o objemu 250 ml a o látkové koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ připravíme navážením potřebného množství hexahydrátu síranu amonnoželeznatého (Mohrovy soli) – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M = 392,13 \text{ g mol}^{-1}$) s přesností na 4 desetinná místa. Navážené množství se rozpustí v malém množství destilované vody v 250 ml odměrné baňce a k tomu se přidá 2,5 ml H_2SO_4 , zředěné v poměru 1:10 (roztok H_2SO_4 , zředěné 1:10 je připraven v zásobní lahvi s dávkovačem), pak se roztok doplní po rysku a promíchá se.

Vzorky

Každý student dostane neznámé vzorky do 2 odměrných baněk na 50 ml označených číslem (podle čísla stolu). (V případě skupiny s počtem studentů nad 12 se doporučuje jen jeden vzorek pro studenta)

Baňky se vzorky doplňte destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchejte. Dále postupujete podle návodu.

Pracovní postup

Po zapnutí přístroje a počítače na obrazovce najdete složku **fotometrie, úloha 5**. Po otevření této složky otevřete složku „**metod**“, ve které jsou uvedeny metody pro plnění úkolů laboratorní práce.

Před měřením na disku F ve složce odpovídající aktuálnímu roku vytvořte složku, do které budete ukládat naměřená data.

1. Absorpční spektrum komplexu

a) připravte roztok pro vynulování přístroje a proměřování „baseline“

Do 25 ml odměrky se odměří 5 ml octanového tlumiče, přidá se 2 ml činidla o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, doplní se po rysku a promíchá.

b) připravte roztok pro měření absorpčního spektra

Do 25 ml odměrky se odměří 2 ml roztoku železnaté soli o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, přidá se 5 ml octanového tlumiče, 2 ml činidla o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, doplní se po rysku, promíchá.

Pro měření **absorpčního spektra** komplexu zvolte metodu „**absorpční spektrum**“ a zkontrolujte parametry nastavení. Na levé straně panelu najdete tlačítko „**Setup**“, po kliknutí na toto tlačítko se objeví parametry pro měření. Zkontrolujte:

- rozsah měřeného spektra: „**start 600 stop 400**“;
- v položce „**Scan controls**“ – zvolit „**medium**“;
- v položce „**Beam mode**“ – zvolit „**dual beam**“;
- v horní části panelu „**Setup**“ je záložka „**baseline**“ – položka „**baseline correction**“ musí být aktivovaná.

Práci začnete proměřením „baseline“ s pomocí tlačítka „baseline“ na levé části panelu.

Pro měření „baseline“ použijte roztok **1a** (5 ml pufru, 2 ml fenantrolinu a doplněny vodou do 25 ml). Tento roztok použijte i pro měření nultého spektra.

Měření aktivujete tlačítkem **Start**.

Proměřte připravený roztok **1b** pro získání absorpčního spektra.

Opište hodnoty $A_{\max}$ a odpovídající hodnotu vlnové délky λ (nm).

Vypočítejte hodnotu ϵ_{λ} . Pracujeme s měrnou kyvetou o šířce 1 cm

2. Zjištění časové stálosti komplexu

Do 25 ml odměrky se odměří 2 ml roztoku železnaté soli o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, přidá se 5 ml octanového tlumiče, 2 ml činidla o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, doplní se po rysku, promíchá a ihned se měří absorbance při vlnové délce λ_{max} . Absorbance se měří v půlminutových intervalech po dobu 5 minut.

(Vzhledem k okamžité tvorbě komplexu a z důvodu úspory času lze pracovat s roztokem **1b**).

Pro měření **časové stálosti komplexu** zvolte ze složky „**metod**“ metodu „**Kinetika**“.

V případě otevřeného předchozího měřicího softwaru s pomoci tlačítka „**Connect**“ propojte přístroj s programem. Jinak máte na displeji aktivované tlačítko „**Start**“.

- Zkontrolujte parametry nastavení ve funkci **Setup**:
 - „**Wavelength nm**“ (v případě potřeby opravte hodnotu podle výsledku z úkolu 1); „**Sample collect**“: „**Stage**“ **1**; „**cycle**“ (min) **0.5**; „**stop**“ (min) **5**.

Měření aktivujete tlačítkem **Start**.

Do protokolu vypište tabulku závislosti změny hodnoty absorbance vzorku na časových intervalech.

Podle získaných výsledků posuďte o stálosti komplexu.

3. Sestrojení kalibrační křivky

V sedmi 25 ml odměrkách připravte řadu 7 roztoků se vzrůstajícím obsahem standardního roztoku Mohrovy soli a se stejným množstvím octanového tlumiče a roztoku fenanthrolinu:

Roztok		0	1	2	3	4	5	6
ml	$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
ml	octanový tlumič	do každé odměrné baňky 5 ml						
ml	$0,01 \text{ mol l}^{-1}$ činidla	do každé odměrné baňky 2 ml						

Odměrné baňky doplňte po rysku, promíchejte a změřte hodnoty absorbance při vlnové délce λ_{max} .

Měrnou kyvetu je třeba vždy před měřením alespoň 3x propláchnout roztokem, který chceme měřit.

4. Stanovení železa ve vzorku

a) *stanovení hmotnosti železa ve vzorcích pitné vody metodou kalibrační přímky*

Do třech odměrných baněk na 25 ml odpipetujte po 1 ml vzorku, přidejte 5 ml octanového tlumiče a 2 ml fenanthrolinového činidla. Roztoky doplňte po rysku destilovanou vodou a promíchejte.

Stejný postup použijte u druhého vzorku.

Změřte hodnoty absorbance za přesně stejných podmínek, za jakých byla měřena kalibrační křivka. Zásadou je, aby měřená hodnota absorbance ležela v rozsahu hodnot kalibrační křivky.

Pro měření **kalibračních roztoků a stanovení obsahu železa ve vzorcích pitné vody metodou kalibrační přímky** zvolte metodu „kalibrační přímka“ ze složky „metod“.

V případě otevřených předchozích měřicích softwarů s pomoci tlačítka „**Connect**“ propojte přístroj s programem. Jinak máte na displeji aktivovanou funkci „**Start**“.

Po aktivaci metody „kalibrační přímka“ zkontrolujte parametry nastavení ve funkci **Setup**:

- „Wavelength nm“ (v případě potřeby opravte podle výsledku z úkolu 1);
- „Replicates“ 3;

v horní části panelu „setup“ v záložce „standards“ zkontrolujte:

- „Units“ $\mu\text{mol/l}$;
- „Standards“ 7; (vypočítejte koncentraci připravených standardních roztoků a uveďte hodnoty do tabulky;
- „Fit type“ **linear**;

v horní části panelu „Setup“ v záložce „Samples“ vyplňte počet měřených roztoků vzorků (3 odměrné baňky pro každý vzorek): 1 student u stolu – **6**; 2 studenti u stolu – **12**; 3 studenti u stolu – **9 v případě jestli asistent nerozhodne jinak**.

Do kyvety dejte první kalibrační roztok s **0** $\mu\text{mol/l}$ koncentraci Fe^{2+} .

Pro vynulování použijte funkci „zero“ na levé části panelu.

Proměřte standardní roztoky **0–6**. Měření aktivujete tlačítkem **Start**.

Kyvetu je třeba vždy před měřením 3x propláchnout roztokem, který chceme měřit!

Opište do protokolu tabulku kalibrační přímky a rovnice popisující lineární vztah. Opište naměřené hodnoty absorbance a vypočtené hodnoty koncentrace pro neznámé vzorky. Dopočítejte hmotnost analytu (Fe) v neznámých vzorcích v mg.

b) *stanovení hmotnosti železa ve vzorcích pitné vody metodou standardního přídatku*

Pro stanovení hmotnosti železa metodou standardního přídatku pipetujeme takový objem vzorku, aby odpovídající hodnota absorbance byla kolem 0,2. Připravíme pět roztoků, do kterých se vedle tohoto objemu vzorku přidá postupně proměnné množství standardního roztoku železnaté soli a stejné množství tlumiče a činidla:

Roztok		0	1	2	3	4
ml	vzorku	množství odpovídající $A=0,2$				
ml	$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0
ml	octanový tlumič	do každé odměrné baňky 5 ml				
ml	0.01 mol l^{-1} činidla	do každé odměrné baňky 2 ml				

Roztoky doplňte po rysku, promíchejte a u všech změřte hodnotu absorbance.

Pro měření připravených roztoků zvolte ze složky „*metod*“ metodu „*Standardní přídavek*“. Jestli po spuštění programu „*Standardní přídavek*“ na displeji není aktivované tlačítko „*Start*“, použijte tlačítko „*Connect*“ pro propojení přístroje s programem.

Zkontrolujte parametry nastavení ve funkci **Setup**:

- „*Wavelength nm*“ (v případě potřeby opravte podle výsledku z úkolu 1);
- „*Replicates*“ **3**;
- v horní části panelu „*setup*“ v záložce „*standards*“ zkontrolujte:
- „*Units*“ **$\mu\text{mol/l}$** ;
- „*Standards*“ **5**; do tabulky uveďte hodnoty standardních přídatků (opište prvních pět koncentrací z „kalibrační přímky“);
- „*Fit type*“ **linear**;
- v horní části panelu „*Setup*“ v záložce „*Samples*“ **0**.

Do kyvety dejte roztok **1a** pro vynulování (5 ml pufru, 2 ml fenantrolinu a doplněný vodou do 25 ml) a použijte tlačítko „*zero*“ na levé části panelu.

Proměřte roztoky **0–4** se standardními přídatky.

Měření aktivujete tlačítkem **Start**.

Kyvetu je třeba vždy před měřením 3x propláchnout roztokem, který chceme měřit!

Opište do protokolu tabulku výsledků měření „*standardní přídavek*“ a rovnice popisující lineární vztah. Dopočítejte hmotnost analytu (Fe) v neznámých vzorcích v mg. Stejný postup použijte i pro stanovení hmotnosti analytu (Fe) v druhém vzorku.

Zpracování dat

1. Podle grafu absorpčního spektra určete $\lambda_{\max}$.
2. Na základě Lambertova-Beerova zákona (viz vztah 4) a podle hodnoty absorbance při $\lambda_{\max}$ a koncentraci připraveného roztoku v baňce 25 ml vypočítejte hodnotu molárního absorpčního koeficientu při dané vlnové délce ε_{λ} [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$].
3. Sledujte závislost absorbance na čase a v závěru protokolu diskutujte stálost komplexu.
4. Pro získání **kalibrační křivky** (závislosti absorbance na látkové koncentraci železa) proložte experimentálními body přímkou pomocí lineární regrese. Lambertův-Beerův zákon odpovídá přímce procházející počátkem (viz vztah 4). Při experimentálním uspořádání, kdy se měří rozdíl absorbancí kyvety s destilovanou vodou a kyvety se slepým vzorkem (fenantrolinové činidlo, octanový tlumič a voda), je třeba použít obecnou rovnici přímky $A = k \cdot c + q$.
5. Pomocí získaných hodnot koncentrací vzorku z kalibrační přímky vypočítejte látkovou koncentraci (Fe). **Pozor** na to, že na základě kalibrační přímky byly vyhodnoceny roztoky připravené odpipetováním určitého objemu zásobního roztoku vzorku a jeho zředěním na objem 25 ml, přičemž sám původní vzorek byl zředěn v baňce na objem 50 ml. Z vypočtené koncentrace vzorku v 50 ml určete celkovou hmotnost Fe ($M_{\text{Fe}} = 55,847 \text{ g mol}^{-1}$) ve vzorku (mg) pro neznámé vzorky.
6. Pro metodu standardního přídatku použijte rovněž lineární regresi. Vstupními daty pro výpočet koncentrace neznámého vzorku jsou hodnoty směrnice přímky a velikost úseku na ose absorbance, který odpovídá absorbanci vzorku

$$A = kc + q$$

$$c = \frac{q}{k}$$

Z vypočtené koncentrace vzorku c_1 , známých objemu ředění (25 ml) a pipetovaného objemu lze vypočítat látkovou koncentraci původního vzorku.

$$n_1 \text{ (naředěné) [mol]} = n_2 \text{ (odebrané) [mol]}; \quad c_1 \cdot V_{1(\text{řed})} = c_2 \cdot V_2 \text{ (pip)}$$

Získanou koncentraci a celkový objem připraveného vzorku 50 ml použijte pro přepočet na hmotnost železa ve vzorku.

URČENÍ STECHIOMETRIE KOMPLEXU METODOU KONTINUÁLNÍCH VARIACÍ (JOBOVA METODA)

Pro určení stechiometrie komplexu ML_n má nejširší použití metoda kontinuálních variací.

Metoda kontinuálních variací (Jobova metoda) je založena na měření absorbance roztoků kovu (M) a ligandu (L), v nichž je součet celkových analytických koncentrací M a L stálý, tj. $c(\text{M}) + c(\text{L}) = m$, ale mění se jejich poměr v závislosti na látkovém zlomku kovu $x = c(\text{M})/m$. V řadě roztoků se mění x od 0 do 1. Lze prokázat, že tato závislost má maximum v bodě $n = (1 - x)/x$.

Pro rovnovážné koncentrace kovu [M] a ligandu [L] platí (materiálová bilance):

$$[M] = c(M) - [ML_n] \quad \text{a} \quad [L] = c(L) - n[ML_n] \quad (6)$$

Vztah mezi [M], [L] a [ML_n] je dán konstantou stability:

$$\beta_n = [ML_n] / ([M] \cdot [L]^n) \quad (7)$$

Dosazením rovnice (6) do (7) a úpravou lze získat vztah pro závislost rovnovážné koncentrace komplexu na látkovém zlomku kovu:

$$[ML_n] = \beta_n (x m - [ML_n]) \{(1-x)m - n[ML_n]\}^n \quad (8)$$

Pokud ionty kovu a ligandu, na rozdíl od komplexu, při zvolené vlnové délce neabsorbují, lze vypočítat n z hodnoty x odpovídající maximu závislosti absorbance A na x a hodnotu koncentrace komplexu v bodě maxima z Lambertova-Beerova zákona, protože platí, že

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot [ML_n] \cdot b$$

Ve skutečnosti vždy měříme koncentraci komplexu, ovšem při přebytku činidla platí, že koncentrace komplexu je rovna koncentraci železa.

Metoda kontinuálních variací je vhodná i pro relativně slabé komplexy, tj. komplexy s malou hodnotou konstanty stability. Pro $n > 3$ jsou však výsledky této metody nejisté. Samozřejmě ji nelze použít v případě, kdy se za daných podmínek tvoří více než jeden komplex.

Činidla a roztoky

1. Standardní roztok železnaté soli o látkové koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$
2. Ze základního roztoku 1,10-fenanthrolinu o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ se připraví 1,10-fenanthrolin o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ zředěním destilovanou vodou do odměrné baňky objemu 100 ml
Pozor – jiná zásobní lahev s $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ 1,10-fenanthrolinem s dávkovačem
3. Tlumivý roztok octanu sodného a kyseliny octové o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ (obsahuje hydrochlorid hydroxylaminu, který redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+}).

Pracovní postup k určení stechiometrie komplexu metodou kontinuálních variací

**Pozor!!! V této úloze se používá roztok o koncentraci 1,10-fenanthrolinu $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.
Nezaměňujte jej s roztokem $0,01 \text{ mol l}^{-1}$.**

V deseti 25 ml odměrných baňkách se přesně připraví roztoky podle následující tabulky

ml	$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	5,0	8,0	10,0
ml	octanový tlumič	do každé odměrné baňky 5 ml									
ml	$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ činidla	10,0	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	5,0	2,0	0

Odměrné baňky doplňte po rysku a promíchejte. Změřte hodnoty absorbance při vlnové délce λ_{max}

Pro měření připravených roztoků zvolte ze složky „**metod**“ metodu „**Jobova metoda**“. Jestli po spuštění metody na displeji není aktivovaná funkce „**Start**“, použijte tlačítko „**Connect**“ pro propojení přístroje s programem.

Zkontrolujte parametry nastavení ve funkci **Setup**:

- „*Wavelength nm*“ (v případě potřeby opravte podle výsledku z úkolu 1).

První připravený roztok řady použijte pro vynulování s pomocí tlačítka „*zero*“ na levé části panelu a pak od něj začněte proměřovat hodnoty absorbance.

Změřte hodnoty absorbance pro všech 10 připravených roztoků.

Měření aktivujete tlačítkem **Read**.

Opište do protokolu hodnoty absorbancí roztoků připravených podle návodu. Získané výsledky měření použijte pro výpočet konstanty stability vzniklého komplexu.

Zpracování dat k určení stechiometrie komplexu metodou kontinuálních variací

Do grafu vyneste absorbanci proti látkovému zlomku železa $x_{\text{Fe}} = \text{ml Fe}^{2+}/10$. Extrapolací přímkových větví určete jejich průsečík, spuštění kolmice udá x , z něhož se vypočte počet ligandů $n = (1 - x)/x$

Z experimentálních hodnot vypočtete dále konstantu stability $\beta(\text{ML}_n)$ pomocí rovnic uvedených níže. Hodnotu $A(\text{ML}_n)$ odečtete z maxima závislosti $A = f(x)$.

1. Z hodnoty A_λ pro roztok se známou $[\text{ML}_n]$ odečtete ε_λ , je-li $b = 1 \text{ cm}$.
2. Z hodnoty $A(\text{ML}_n)$ vypočtete hodnotu $[\text{ML}_n]$ pro váš neznámý roztok.
3. Spočítejte hodnoty celkové koncentrace ligandu (1,10-fenanthrolinu) a celkové koncentrace kovu (Fe^{2+}) v roztoku odpovídající největší hodnotě absorbance.
4. Vypočtete hodnoty $[\text{M}]$ a $[\text{L}_n]$.
5. Vypočtete konstantu stability $\beta(\text{ML}_n)$.



$$\beta = \frac{[ML_n]}{[M] \cdot [L]^n}$$

$$n = (1 - x_{A_{\max}}) / x_{A_{\max}}$$

$$[ML_n] = \frac{A_{\max(\lambda)}}{\varepsilon_{(\lambda)} b}; \quad b = 1 \text{ cm}$$

$$[M] = c(M) - [ML_n]$$

$$[L] = c(L) - n [ML_n]$$

$$c(M) = \frac{c(Fe^{2+}) \cdot V(Fe^{2+})}{V(\text{ředění})}$$

$$c(L) = \frac{c(L) \cdot V(L)}{V(\text{ředění})}$$

Protokol

Protokol obsahuje jednoduše vyjádřený princip práce, úkoly a přehledným způsobem zpracované výsledky včetně navážek a příkladů výpočtů. V závěru protokolu budou stručně a přehledně sestaveny naměřené výsledky, tj. $\lambda_{\max}$, $\varepsilon_{\lambda_{\max}}$ (vypočtete ze směrnice kalibrační přímky a tloušťky kyvety) komplexu železa s 1,10-fenanthrolinem a hmotnosti železa v dodaných vzorcích v mg stanovené jak metodou kalibrační přímky, tak metodou standardního přidavku. Určete stechiometrie komplexu a vypočítejte konstantu stability $\beta(ML_n)$ komplexu.

Kontrolní otázky

1. Formulujte Bohrovu frekvenční podmínku.
2. Které energetické přechody jsou excitovány absorpcí ultrafialového a viditelného záření?
3. Vymezte ultrafialovou a viditelnou oblast záření v nm.
4. Vyjmenujte čtyři základní části jednopaprskového spektrofotometru. Popište jednotlivé části a jejich funkci.
5. Co je to transmitance, absorpance a jak jsou definovány?
6. Co je to absorpční spektrum? Jaké veličiny a v jakých jednotkách jsou v absorpčním spektru vynášeny na osy?
7. Co vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon?

8. Vymezte podmínky platnosti Lamberova-Beerova zákona.
9. Které veličiny v Lambertově-Beerově zákoně závisí na vlnové délce?
10. Jaký význam má pro fotometrii měření časové stálosti komplexu?
11. Co je to kalibrační křivka a jaký má význam pro fotometrické stanovení?
12. Na čem je založena metoda standardního přídávku a v čem spočívá její výhoda?
13. Popište princip metody kontinuálních variací.
14. Jak se určuje stechiometrie komplexu podle Jobovy metody?
15. Co je to konstanta stability komplexu a jak charakterizuje komplex?