

Měření koncentrace roztoku absorpčním spektrofotometrem

Teoretický úvod

Absorpční spektrofotometrie je metoda stanovení koncentrace disperzního podílu analytické disperze, založená na měření absorpce světla. Prochází-li monochromatické světlo tímto prostředím, sníží se jeho intenzita z původní hodnoty I_0 na I . Mírou snížení intenzity je veličina, zvaná **absorbance** A (používá se rovněž ekvivalentní termín extinkce E). Absorbance je definována vztahem

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Jinou veličinou, která charakterizuje absorpci světla, je transmitance T , definovaná jako

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Absorbance a transmitance tedy souvisí vzájemným vztahem $A = -\log_{10} T$. Obě tyto veličiny jsou bezrozměrné.

Mezi absorbancí A a koncentrací c disperzního podílu platí **lineární** vztah, zvaný Lambert-Beerův zákon:

$$A = k \cdot c \cdot L$$

kde k je extinkční koeficient, jehož hodnota je charakteristická pro danou látku v roztoku a pro danou vlnovou délku světla (jednotkou k je $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c je molární koncentrace látky (mol/l), a L je tloušťka vzorku disperze (cm).

Absorpční fotometrie slouží ke stanovení koncentrací jak bezbarvých, tak i barevných analytických disperzí. U bezbarvých roztoků se používá monochromatické světlo z UV oblasti (200-380 nm), u barevných roztoků se může použít jak UV, tak i viditelná oblast světla (380-760 nm). Rozhodujícím kritériem při volbě vlnové délky je co nejvyšší citlivost měření. To znamená nalezení takové vlnové délky, při které malé změně koncentrace odpovídá největší změna absorbance. Tomuto požadavku odpovídá vlnová délka absorpčního maxima; v případě většího počtu absorpčních maxim pak vlnová délka absorpčního maxima s největší absorbancí.

V úloze bude použit moderní typ spektrofotometru (Biochrom Libra S6), který umožňuje rychlé změření absorpčního spektra v širokém rozsahu vlnových délek. Jako zdroj světla slouží halogenová lampa s wolframovým vláknem, která vydává světlo v celé šíři viditelného spektra. Toto bílé světlo je kolimováno, dopadá kolmo na vzorek, a po průchodu vzorkem je ohybem na optické mřížce rozloženo na monochromatické paprsky. Tyto dopadají na soustavu fotodiod, které měří intenzitu jednotlivých paprsků. Přístroj tedy neobsahuje žádné pohyblivé části, a umožňuje prakticky simultánní měření absorbance pro až 1024 vlnových délek.

Přístroje a pomůcky:

1. Absorpční spektrofotometr Biochrom Libra S6.
2. Počítač s rozhraním pro komunikaci se spektrofotometrem.
3. Sada roztoků CuSO_4 .

4. Kyvety.

Úkol:

1. Změřte absorpční spektrum roztoku síranu měďnatého.
2. Ověřte platnost Lambert-Beerova zákona.
3. Určete neznámou koncentraci síranu měďnatého.

Provedení:

1. Zapněte počítač. Spusťte program Graphico (ikona v pravém horním rohu obrazovky). Vyplňte jméno jednoho ze studentů ve Vaší skupině, a v kolonce „Organization“ vyplňte číslo kruhu a číslo skupiny.
2. Zapněte spektrofotometr černým tlačítkem v pravém dolním rohu ovládacího panelu na spektrofotometru. Vyčkejte 1 minutu, dokud neskončí sebediagnostika přístroje. (Dokud je přístroj zaneprázdněn diagnostikou či měřením, naskakuje postupně poslední řádek u spodního okraje displeje.)
3. Stiskem tlačítka F2 přejděte na úvodní obrazovku, která dává na výběr:
 - Repeat last operation
 - Make a measurement
 - Set up instrumentKdykoli během měření se můžete na tuto obrazovku vrátit stiskem tlačítka F2.
4. Zvolte „Make a measurement“ a na další obrazovce zvolte „Scan“. Poté tlačítkem F1 zvolte jako výstup absorbanci (Abs).
5. Do držáku napravo od displeje vložte kyvetu naplněnou čistou vodou. Toto bude referenční vzorek. Poté stisknutím **modrého tlačítka označeného „0A/100%T“** spusťte měření absorpčního spektra referenčního vzorku, které bude automaticky uloženo do paměti.
6. Vyjměte referenční vzorek a vložte kyvetu naplněnou roztokem s nejvyšší koncentrací síranu měďnatého. Poté stisknutím **zeleného tlačítka** spusťte měření absorpčního spektra. Na displeji se objeví graf, kde na ose x je vlnová délka a na ose y je **rozdíl absorbancí** nyní vloženého vzorku a referenčního vzorku. Souhlasí Vámi naměřené absorpční spektrum s barvou roztoku, jak je vnímána okem?
7. Graf se objeví také na počítači v programu Grafico. (Neobjeví-li se graf, přepněte program do režimu „Scan“ tlačítkem na horní liště). Graf uložte na Plochu jako soubor formátu pdf (pomocí příkazu Print, nikoli Save). Poté si soubor uložte na USB paměť nebo odešlete přes e-mail.
8. Z grafu odečtěte vlnovou délku absorpčního maxima. Všechna následná měření budete provádět pro tuto vlnovou délku.
9. Přepněte spektrofotometr do režimu měření při fixní vlnové délce (F2 → Make a measurement → Single/Multi/Ratio → Single λ). Nastavte vlnovou délku z předchozího kroku (zvolte Set λ , poté tlačítky s šipkami upravte vlnovou délku, poté zvolte Accept λ).
10. Vkládejte postupně kyvety naplněné roztoky se známými koncentracemi síranu měďnatého, a s neznámou koncentrací. Pro každý roztok naměřte stisknutím zeleného tlačítka hodnotu absorbance (relativně k absorbanci referenčního vzorku, která je stále v paměti přístroje).
11. Změřené hodnoty absorbance roztoků запиšte do tabulky a sestrojte kalibrační křivku (tj. graf závislosti absorbance na koncentraci). Souhlasí naměřená křivka s Lambert-Beerovým

zákonem? Z kalibrační křivky odečtete koncentraci síranu měďnatého ve vzorku s neznámou koncentrací.

12. Vyčistěte použité kyvety. Vypněte spektrofotometr. Odstraňte z počítače Vámi uložený soubor, a ukončete program Grafico.

Kontrolní otázky:

1. U jakých roztoků lze spektrofotometr Libra S6 použít ke stanovení koncentrace?
2. Jak je definována absorbance (extinkce) a transmitance?
3. Co popisuje Lambert-Beerův zákon?
4. Co je absorpční spektrum?