

MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

v UV a viditelné oblasti spektra

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Koncentrace n složek ve směsi, z nichž každá poskytuje analytický signál při nejméně jedné vlnové délce, lze určit na základě měření signálů na n vlnových délkách a řešením soustavy rovnic o n neznámých. Tento výpočet je principiálně umožněn aditivitou absorbancí: platnost [Bouguert-Lambert–Beerova zákona](#)

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

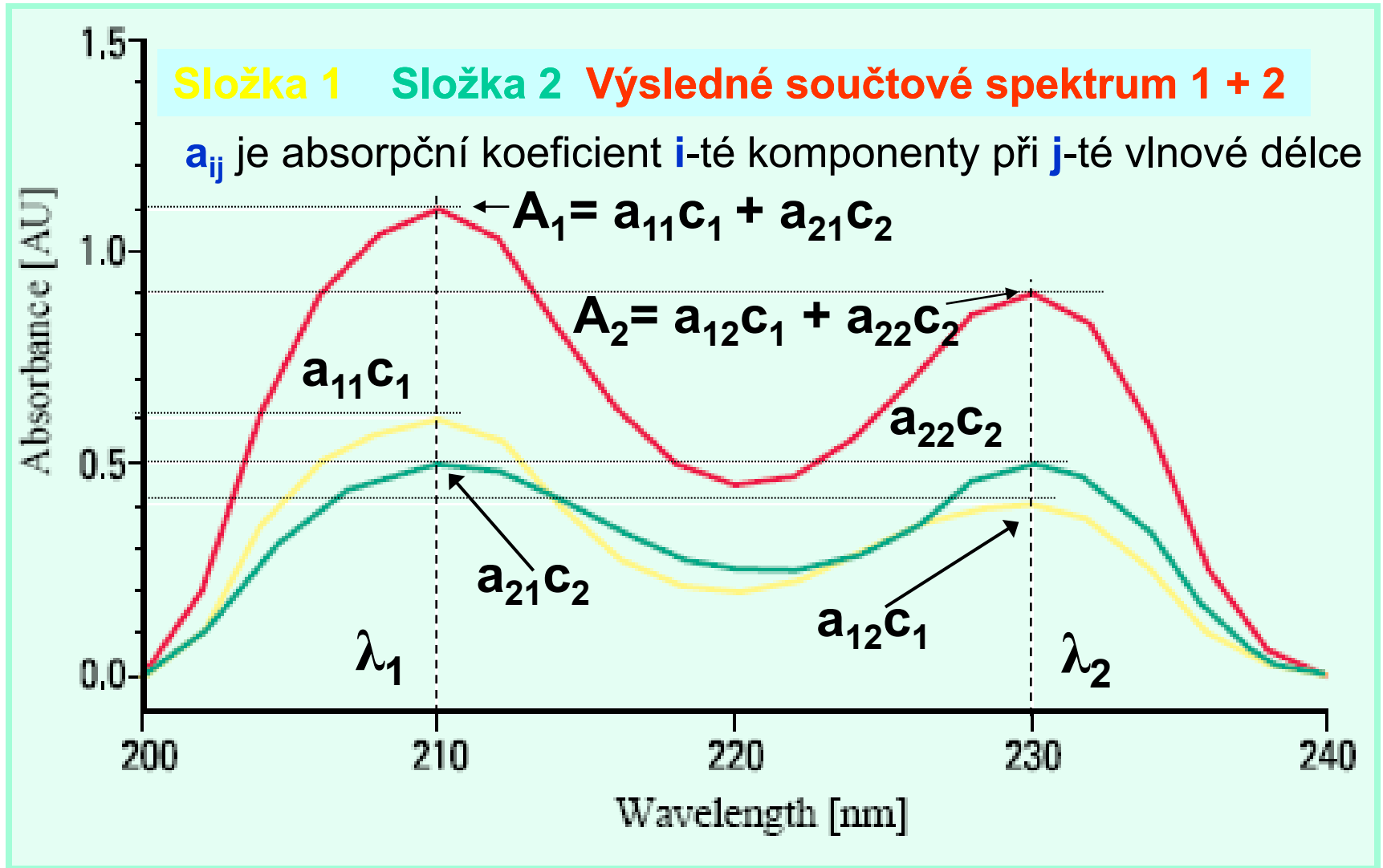
- **MA** je založena na aditivitě absorbancí
- **A_j** je absorbance při vlnové délce λ_j
- **a_{ij}** je absorpční koeficient **i**-té komponenty při **j**-té vlnové délce
- **c_i** je koncentrace **i**-té složky
- **l** je tloušťka absorbující vrstvy; dále **l = 1**

$$A_j = \sum_{i=1}^{i=n} a_{ij} c_i l$$

- Určení počtu absorbujících komponent
 - ✓ graficky
 - ✓ numericky
- Strukturní změny na chromoforech \Rightarrow více izolovaných chromoforů v jedné absorbující komponentě \Rightarrow
- \Rightarrow počet maxim \geq počet absorbujících komponent

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)



Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- **Numerické řešení** – eliminační metoda pro soustavu rovnic – nejjednodušší případ = **dvousložkový systém**

$$A_1 = a_{11}c_1 + a_{21}c_2 \quad \lambda_1$$

$$A_2 = a_{12}c_1 + a_{22}c_2 \quad \lambda_2$$

$$c_1 = \frac{A_1 a_{22} - A_2 a_{21}}{a_{11} a_{22} - a_{21} a_{12}}$$

$$c_2 = \frac{A_2 a_{11} - A_1 a_{12}}{a_{11} a_{22} - a_{21} a_{12}}$$

$$c_1 = A_1 / a_{11} \quad c_2 = \frac{a_{12} A_1 - a_{11} A_2}{a_{11} a_{22}} \quad a_{21} = 0$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Řešení soustavy rovnic o 2 neznámých: 2-složková soust.
- = **Cramerovo pravidlo**

$$c_1 = \frac{\begin{vmatrix} A_1 & a_{12} \\ A_2 & a_{22} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{vmatrix}} \quad c_2 = \frac{\begin{vmatrix} a_{11} & A_1 \\ a_{22} & A_2 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{vmatrix}}$$

$$\begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{vmatrix} = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Třísložková soustava – rovnice o 3 neznámých

$$\begin{aligned}A_1 &= a_{11}c_1 + a_{21}c_2 + a_{31}c_3 & \lambda_1 \\A_2 &= a_{12}c_1 + a_{22}c_2 + a_{32}c_3 & \lambda_2 \\A_3 &= a_{13}c_1 + a_{23}c_2 + a_{33}c_3 & \lambda_3\end{aligned}$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Determinanty 3. řádu, **Sarussovo pravidlo**

$$D_1 = \begin{vmatrix} A_1 & a_{21} & a_{31} \\ A_2 & a_{22} & a_{32} \\ A_3 & a_{23} & a_{33} \end{vmatrix} \quad D_2 = \begin{vmatrix} a_{11} & A_1 & a_{31} \\ a_{12} & A_2 & a_{32} \\ a_{13} & A_3 & a_{33} \end{vmatrix} \quad D_3 = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{21} & A_1 \\ a_{12} & a_{22} & A_2 \\ a_{13} & a_{23} & A_3 \end{vmatrix}$$
$$D = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{21} & a_{31} \\ a_{12} & a_{22} & a_{32} \\ a_{13} & a_{23} & a_{33} \end{vmatrix} \quad c_1 = D_1 / D \quad c_2 = D_2 / D \quad c_3 = D_3 / D$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Přesnost a správnost závisí na
 - a) počtu komponent
 - b) volbě vlnových délek
- Pro každou složku hledáme λ_j , kde je absorpční koeficient dané složky podstatně větší než absorpční koeficienty této složky při ostatních λ_j
- Pro i -tou složku se hledá hodnota $r_{ij(max)}$ v závislosti na λ_j ,

$$r_{ij} = \frac{c_i a_{ij}}{A_j}$$

- Obvykle tyto absorpční koeficienty jsou indexovány:

$$a_{ij(max)} \approx i = j \quad a_{11} \gg a_{12}, a_{13}, a_{14} \dots a_{1j} \dots a_{1n}$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Na hlavní diagonále matice prvků $a_{ij}c_i$ leží tedy obvykle maximální hodnoty pro každý řádek:
- $a_{11}c_1, a_{22}c_2, a_{33}c_3, \dots, a_{nn}c_n$;
- Absorpční koeficienty se určují s jednosložkovými roztoky
- Počet vlnových délek, při nichž provádíme měření, ve vztahu k počtu absorbujících složek:
 - ✓ = počtu absorbujících složek
 - ✓ > počet absorb. složek (přeurčený systém)

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

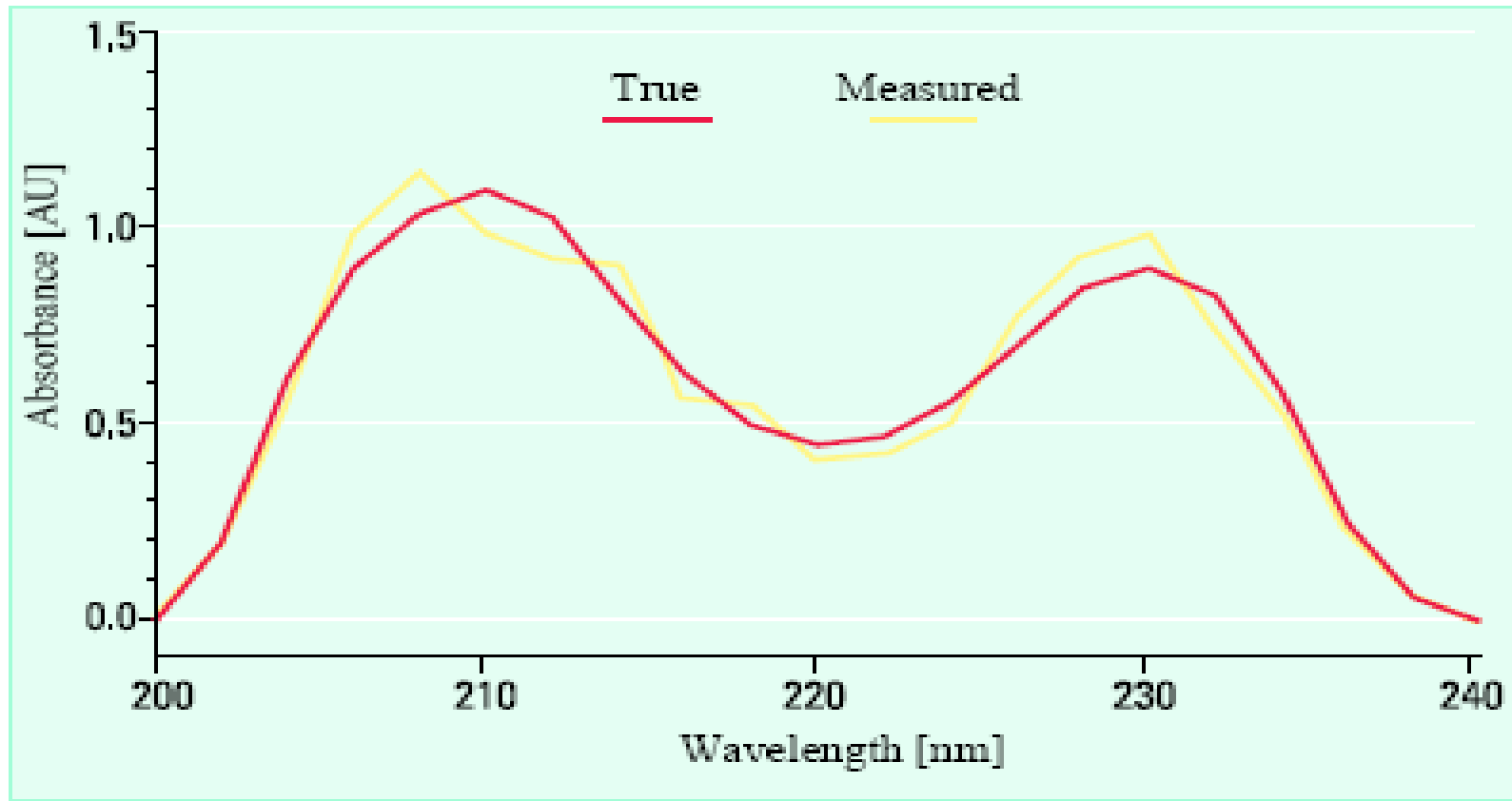
- Vícesložkový systém (> 3)
- Nezbytné použít počítač
- i – počet složek (n)
- j – počet vlnových délek (m)
- Numerické metody (determinanty, iterace, Gaussova eliminace, Gauss-Jordanova eliminace)
- Vhodný je pře určený systém $m > n$, redukuje se na soustavu „normálních rovnic“ metodou nejmenších čtverců. Ideální více bodů spektra, celé křivky (CCD)

$$A_j = \sum_{i=1}^{i=n} a_{ij} c_i$$

$$\sum_{j=1}^m \left(A_{exp,j} - A_{calc,j} \right)^2 = \min$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)



Výsledné spektrum 2 složek změřené s 10%-ní chybou (žlutá) a proložená křivka **metodu nejmenších čtverců** (červená) method of least squares (MLS)

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Přeurčený systém – příklad: dvousložková soustava není popsána 2 vlnovými (210 a 230 nm) délkami, ale 21 datovými body v rozsahu 200-240 nm (krok 2 nm). Pomocí LS (least squares) s prokládají spektra a srovnává se s naměřeným spektrem. Chyba při 2 vlnových délkách může být až 100%, chyba při 21 vlnových délkách je $< 1\%$.

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Soustava ***m*** rovnic o ***n*** neznámých složkách

$$\begin{array}{rcl}
 A_1 & = & a_{11}c_1 + a_{21}c_2 + a_{31}c_3 + \dots + a_{n1}c_n & \lambda_1 \\
 A_2 & = & a_{12}c_1 + a_{22}c_2 + a_{32}c_3 + \dots + a_{n2}c_n & \lambda_2 \\
 A_3 & = & a_{13}c_1 + a_{23}c_2 + a_{33}c_3 + \dots + a_{n3}c_n & \lambda_3 \\
 \vdots & & \vdots & \\
 A_m & = & a_{1m}c_1 + a_{2m}c_2 + a_{3m}c_3 + \dots + a_{nm}c_n & \lambda_m
 \end{array}$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Schéma transformace přeurčeného systému na systém normálních rovnic
- Přeurčený systém:

$$\begin{array}{rcccccc} a_1 x_1 + b_1 x_2 + d_1 x_3 + \dots + \eta_1 x_n = A_1 & \lambda_1 \\ a_2 x_1 + b_2 x_2 + d_2 x_3 + \dots + \eta_2 x_n = A_2 & \lambda_2 \\ a_3 x_1 + b_3 x_2 + d_3 x_3 + \dots + \eta_3 x_n = A_3 & \lambda_3 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_m x_1 + b_m x_2 + d_m x_3 + \dots + \eta_m x_n = A_m & \lambda_m \end{array}$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Kde:

$$a_1 \approx a_{11}; b_1 \approx a_{21}; d_1 \approx a_{31}$$

$$a_2 \approx a_{12}; b_2 \approx a_{22}; d_2 \approx a_{32}$$

$$x_1 \approx c_1; x_2 \approx c_2; x_3 \approx c_3$$

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

Normální rovnice

$$\begin{array}{r} \mathbf{a} \bar{x}_1 + \mathbf{b} \bar{x}_2 + \mathbf{d} \bar{x}_3 + \dots + \mathbf{n} \bar{x}_n = \mathbf{A} \bar{---} \\ \mathbf{b} \bar{x}_1 + \mathbf{b} \bar{x}_2 + \mathbf{d} \bar{x}_3 + \dots + \mathbf{n} \bar{x}_n = \mathbf{b} \bar{A} \bar{---} \\ \mathbf{d} \bar{x}_1 + \mathbf{b} \bar{x}_2 + \mathbf{d} \bar{x}_3 + \dots + \mathbf{n} \bar{x}_n = \mathbf{d} \bar{A} \bar{---} \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ \mathbf{d} \bar{x}_1 + \mathbf{b} \bar{x}_2 + \mathbf{d} \bar{x}_3 + \dots + \mathbf{n} \bar{x}_n = \mathbf{d} \bar{A} \bar{---} \end{array}$$

kde

$$\mathbf{a} \bar{---} = \sum_i a_i = a_1 a_1 + a_2 a_2 + a_3 a_3 + \dots + a_m a_m$$

$$\mathbf{b} \bar{---} = \sum_i b_i = a_1 b_1 + a_2 b_2 + a_3 b_3 + \dots + a_m b_m$$

atd .

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

A dále

$$\mathbf{A} = \sum_i \mathbf{A}_i = a_1 \mathbf{A}_1 + a_2 \mathbf{A}_2 + a_3 \mathbf{A}_3 + \dots + a_m \mathbf{A}_m$$

Soustava normálních rovnic je řešena numerickými metodami,
Gaussova eliminací, Gauss-Jordanova metoda

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

- Příklady metod

1. Stanovení $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ a MnO_4^- v oceli (0,2-5% Mn, 0,2-20% Cr) Fe (III) se maskuje kys. Fosforečnou, $\lambda = 440 \text{ nm}$, 545 nm nebo 520 nm .
2. Stanovení Fe(III), Cu(II), Co(II) jako thiokyanáto komplexů, Nadbytek SCN^- , prostředí 50% aceton, + HCl nebo HNO_3 , $\lambda = 380 \text{ nm}$, 480 nm a 625 nm .
3. Stanovení Cu(II), Co(II), Ni(II) s diethyldithiokarbamátem. Cheláty kovů se extrahují do chloroformu, $\lambda = 436 \text{ nm}$, 367 nm a 328 nm .
4. Stanovení tryptofanu a thyrosinu
5. Stanovení W(VI), Mo(VI), Nb(V) v ocelích, barevné iontové asociáty komplexů s katecholem s butyltrifenyl fosfoniovým kationtem. Selektivní extrakce do chloroformu z 0,5-2,5 M kyseliny sírové. Neruší Fe(II), Ti(IV), V(V, IV). $\lambda = 390 \text{ nm}$, 550 nm , 660 nm

Vícesložková analýza

Multicomponent analysis (MA)

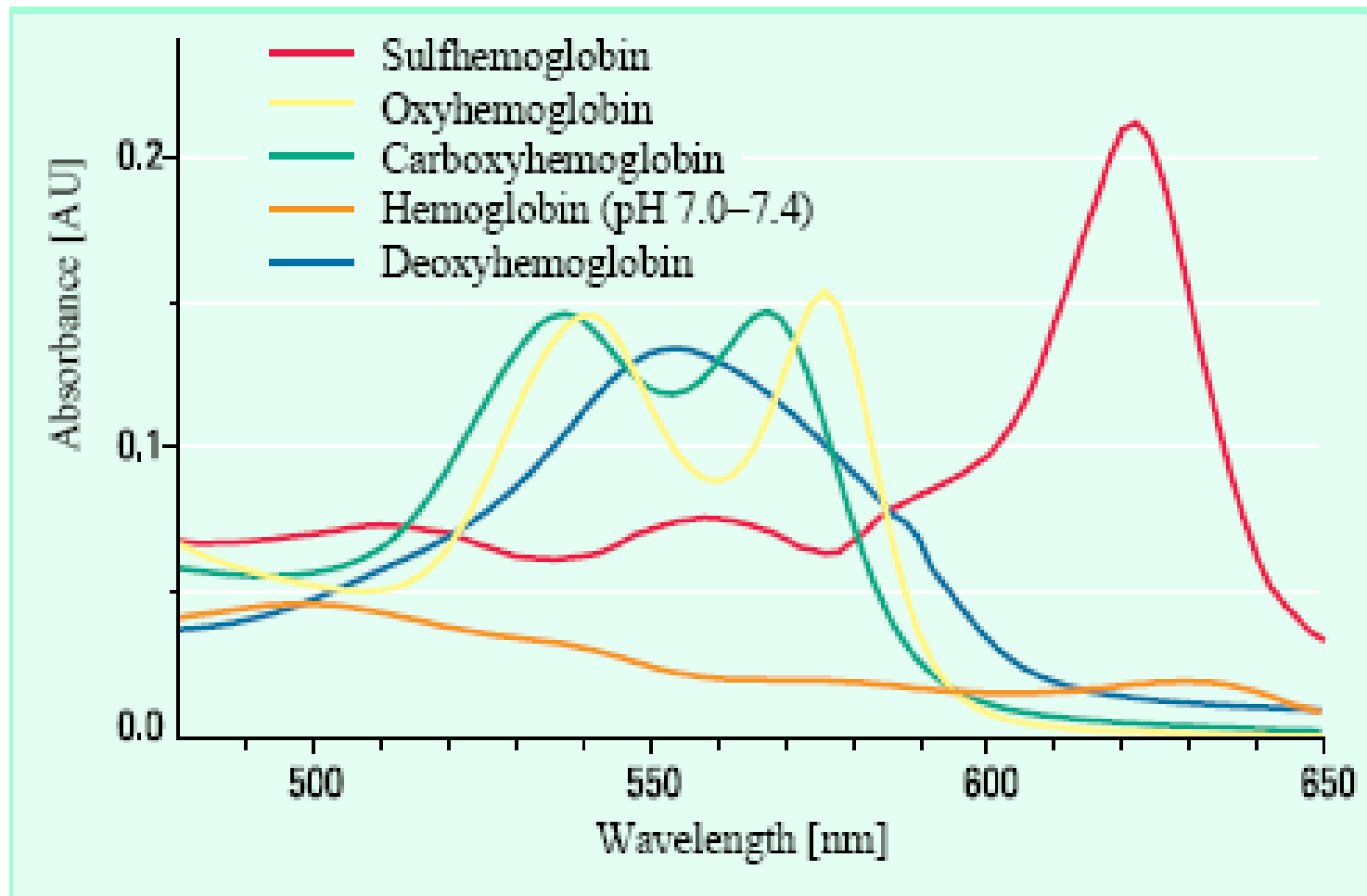


Figure 15

Absorption spectra of hemoglobin derivatives