5. VÍCESLOŽKOVÁ FOTOMETRICKÁ ANALÝZA

TEORIE:

Metody molekulové absorpční spektroskopie oblasti UV-VIS jsou založeny na interpretaci změn, které nastávají v molekulách látek při absorpci záření v rozmezí vlnových délek asi 200–800 nm.

Absorbovaná kvanta energie vyvolávají přechody valenčních elektronů. Absorpční přechod je charakterizován hodnotou vlnové délky pro maximum pásu λ_{max} a intenzitou pásu.

V analytické chemii se tato intenzita nejjednodušeji vyjadřuje hodnotou molárního absorpčního koeficientu ε_{max}. Hodnota ε_{max} se vypočítá z hodnoty absorbance A_{max} změřené pro roztok látky o koncentraci c v kyvetě tloušťky l cm při vlnové délce λ_{max} dle **Bouguer-Lambert-Beerova zákona** ve tvaru:

$$\varepsilon_{\max} = A_{\max} \cdot (l \cdot c)^{-1}$$

Předpokladem pro měření závislostí absorbance na koncentraci A = f(c) a absorbance na vlnové délce A = f(λ), která jsou základem každé spektrofotometrické metody, je časová stabilita proměřovaného roztoku.

Pro určitou barevnou látku v roztoku je charakteristické absorpční spektrum s definovaným absorpčním maximem λ_{max}. Intenzitu zbarvení lze vyjádřit veličinou absorbance A_λ, tj. jako logaritmus poměru světelného toku $\Phi_{\lambda,0}$ vstupujícího do barevného prostředí k světelnému toku Φ_λ prošlému barevným roztokem při určité vlnové délce použitého záření.

Platí:

$$\Phi_\lambda = \Phi_{\lambda,o}.10^{-\varepsilon lc} \quad \rightarrow \qquad A_\lambda = \log \frac{\Phi_{\lambda,o}}{\Phi_\lambda} = \varepsilon_\lambda lc$$

Je-li v roztoku přítomna směs barevných látek A a B, je absorpce světelného toku určité vlnové délky λ_1 tímto roztokem součtem absorpcí barevnými látkami A a B a pro absorbanci při této vlnové délce tedy platí:

$$A_{\lambda 1} = (A_A)_{\lambda 1} + (A_B)_{\lambda 1}$$

Pro absorbanci při jiné vlnové délce λ_2 platí:

$$A_{\lambda 2} = (A_A)_{\lambda 2} + (A_B)_{\lambda 2}$$

Při přesném fotometrickém stanovení dvou barevných složek v roztoku metodou klasické vícesložkové analýzy vycházíme proto z těchto předpokladů:

a) roztok látky A o koncentraci c_A silně absorbuje při vlnové délce λ_1 a málo při vlnové délce λ_2. Naproti tomu roztok látky B o koncentraci c_B silně absorbuje při vlnové délce λ_2 a málo při vlnové délce λ_1
b) absorpce roztoků jedné i druhé složky se při obou vlnových délkách λ_1 a λ_2 řídí **Bouguer-Lambert-Beerovým zákonem:**

$$A_\lambda = \log \frac{\Phi_{\lambda,o}}{\Phi_\lambda} = \varepsilon_\lambda lc$$

kde: ε_λ je hodnota molárního absorpčního koeficientu pro danou vlnovou délku [l mol^{-1} cm^{-1}],
l je tloušťka kyvety [cm],
c je koncentrace [mol. l^{-1}].

Na základě tohoto zákona a vzhledem k výše uvedené aditivnosti absorbance můžeme absorbanci směsi dvou barevných látek při vlnové délce λ_1 vyjádřit takto:

- pro vlnovou délku λ_1:

$$A_{\lambda 1} = (\varepsilon_A)_{\lambda 1} \cdot c_A + (\varepsilon_B)_{\lambda 1} \cdot c_B$$

kde: $(\varepsilon_A)_{\lambda_1}$, resp. $(\varepsilon_B)_{\lambda_1}$ jsou molární absorpční koeficienty látky A, resp. látky B pro vlnovou délku λ_1

- pro vlnovou délku λ_2 platí analogicky:

$$A_{\lambda 2} = (\varepsilon_A)_{\lambda 2} \cdot c_A + (\varepsilon_B)_{\lambda 2} \cdot c_B$$

kde: $(\varepsilon_A)_{\lambda_2}$, resp. $(\varepsilon_B)_{\lambda_2}$ jsou molární absorpční koeficienty látky A, resp. látky B pro vlnovou délku λ_2 .

Používáme-li při měření kyvety o stále stejné tloušťce (nejčastěji l = 1 cm), můžeme hodnoty ε definovat vzhledem k této jednotkové tloušťce a veličinu *l* v rovnicích vynechat.

Rovnice pro $A_{\lambda 1}$ a $A_{\lambda 2}$ představují dvě vzájemně spjaté rovnice pro dvě neznámé, kterými jsou koncentrace látky A, tj. c_A, a látky B, tj. c_B ve směsi.

Hodnoty jednotlivých veličin vyskytujících se v těchto rovnicích určíme takto:

- hodnoty A_{λ_1} a A_{λ_2} **změřením**
- hodnoty $(\varepsilon_A)_{\lambda_1}$ a $(\varepsilon_A)_{\lambda_2}$ **výpočtem**, resp. graficky jako směrnice koncentračních závislostí pro standardní roztok látky A naměřených pro dvě zvolené vlnové délky
  ($A_{\lambda_1} = f(c_A)$ a $A_{\lambda_2} = f(c_A)$)
- hodnoty $(\varepsilon_B)_{\lambda_1}$ a $(\varepsilon_B)_{\lambda_2}$ **výpočtem**, resp. graficky jako směrnice koncentračních závislostí pro standardní roztok látky B naměřených pro dvě zvolené vlnové délky
  ($A_{\lambda_1} = f(c_B)$ a $A_{\lambda_2} = f(c_B)$)

Pro současné stanovení dvou složek je žádoucí, aby poměr molárních absorpčních koeficientů jednotlivých složek byl alespoň při jedné ze dvou zvolených vlnových délek

$$\left(\text{např. } \frac{(\varepsilon_A)_{\lambda_1}}{(\varepsilon_B)_{\lambda_1}}\right) \text{ co největší.}$$

5.1. Příprava kalibračních roztoků

$KMnO_4$

Přesně 0,5; 1; 1,5; 2 a 2,5 ml 0,01 M $KMnO_4$ napipetovat postupně do pěti 50 ml odměrných baněk, pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H_2SO_4 a 1 M H_3PO_4, doplnit destilovanou vodou po rysku a dobře promíchat.

$K_2Cr_2O_7$

Přesně 1, 2, 3, 4 a 5 ml 0,01 M $K_2Cr_2O_7$ napipetovat postupně do pěti 50 ml odměrných baněk, pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H_2SO_4 a 1 M H_3PO_4, doplnit destilovanou vodou po rysku a dobře promíchat.

5.2. Měření absorpčních spekter manganistanu a dichromanu

Měření absorpčních spekter manganistanu a dichromanu provést pro kalibrační roztoky střední koncentrace (tj. obsahující 1,5 ml manganistanu a 3 ml dichromanu).

Absorbanci v rozsahu 370–550 mn změřit po 10 nm v 1 cm kyvetách proti destilované vodě.

V oblastech absorpčních maxim doměřit ještě absorbance pro vlnové délky po 5 nm. Absorpční křivky (tj. závislosti absorbance na vlnové délce) jednotlivých komponent vynést do grafu.

Při práci s kyvetou dodržujeme tyto zásady:

- kyvetu naplnit měřeným roztokem do $^2/_3$ objemu kyvety (pokud ji naplníme po okraj, hrozí nebezpečí vylití jejího obsahu do přístroje a jeho následné poškození)
- pro měření vždy používat stejnou absorpční kyvetu
- kyvetu vkládat do kyvetového prostoru vždy stejnou stranou, ověřit si směr paprsku

5.3. Měření kalibračních závislostí manganistanu a dichromanu při vybraných vlnových délkách

Po vyhodnocení každé naměřené absorpční křivky vybrat vlnové délky vhodné pro stanovení, tj. takové, kde jsou rozdíly v absorbancích jednotlivých látek nejvýraznější (maximum, minimum). Pro analýzy směsí manganistanu a dichromanu jsou doporučeny vlnové délky 390, 470 a 545 nm.

Při každé z vybraných vlnových délek změřit kalibrační závislost se sadou kalibračních roztoků v 1 cm kyvetách proti destilované vodě:

$A_{390} = f(c_{KMnO_4})$ $A_{470} = f(c_{KMnO_4})$ $A_{545} = f(c_{KMnO_4})$

$A_{390} = f(c_{K_2Cr2O_7})$ $A_{470} = f(c_{K_2Cr2O_7})$ $A_{545} = f(c_{K_2Cr2O_7})$

Výsledky zaznamenat do tabulky sestavené pro pozdější výpočty:

V_{pip} (zás.roztoku) [ml]	$c(K_2Cr_2O_7)$ [mol . l^{-1}]	A_{390}	A_{470}	A_{545}
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				

V_{pip} (zás.roztoku) [ml]	$c(KMnO_4)$ [mol . l^{-1}]	A_{390}	A_{470}	A_{545}
1				
2				
3				
4				
5				

Pro každou vlnovou délku sestrojit kalibrační křivky $KMnO_4$ a $K_2Cr_2O_7$ jako závislosti A = f(c).

5.4. Příprava modelových směsných roztoků manganistanu a dichromanu

Do tří 50 ml odměrných baněk připravit dle následující tabulky směsné roztoky o různém poměru obsahu manganistanu a dichromanu. Pipetou přidat 10 ml směsi 1 M H_2SO_4 a 1 M H_3PO_4 , doplnit destilovanou vodou po značku a dobře promíchat.

	V_{pip} [ml] ($K_2Cr_2O_7$)	$c_{K2Cr2O7}$ [mol/l] (dáno)	A_{390}	A_{470}	A_{545}	V_{pip} [ml] ($KMnO_4$)	A_{545}	A_{545}	A_{545}	c_{KMnO4} [mol/l] (dáno)
Vzorek I	2,5					1,5				
Vzorek II	1					2				
Vzorek III	4					0,5				
Neznámý vzorek	x					x				

5.5. Měření absorbance směsných vzorků a výpočet jejich složení

Při vlnových délkách, při nichž byly naměřeny kalibrační závislosti, změřit absorbance modelových vzorků v 1 cm kyvetě proti destilované vodě.

5.6. Stanovení koncentrace manganistanu a dichromanu v modelových vzorcích

Jak lze odvodit z naměřených spekter, jsou rozdíly mezi absorpčními křivkami pro žlutooranžový dichroman a fialový manganistan takové, že v oblasti vlnové délky 545 nm dichroman na rozdíl od manganistanu prakticky neabsorbuje.

To umožňuje z absorbance naměřené při této vlnové délce stanovit s použitím příslušné kalibrační křivky pro manganistan koncentraci manganistanu ve vzorku.

Naměřená absorbance směsného vzorku při 545 nm odpovídá totiž pouze koncentraci manganistanu, protože platí:

$$A_{545} = \left(\varepsilon_{KMnO_4}\right)_{545} \cdot c_{KMnO_4}$$

Pro takto určenou koncentraci manganistanu odečíst na kalibračních křivkách pro manganistan při 390 nm a 470 nm odpovídající hodnoty absorbance, tj. $(A_{KMnO4})_{390}$ a $(A_{KMnO4})_{470}$.

Pro jednotlivé vlnové délky odečíst tyto hodnoty od naměřených hodnot absorbance směsného modelového vzorku A_{390}, resp. A_{470}, čímž lze získat korigované hodnoty absorbancí, které odpovídají pouze koncentraci dichromanu $(A_{K2Cr2O7})_{390}$ a $(A_{K2Cr2O7})_{470}$.

Při výpočtu je třeba vycházet z následujících vztahů, patřičně je upravit:

$$A_{390} = \left(A_{KMnO_4}\right)_{390} + \left(A_{K_2Cr_2O_7}\right)_{390}$$

$$A_{390} = \left(\varepsilon_{KMnO_4}\right)_{390} \cdot c_{KMnO_4} + \left(\varepsilon_{K_2Cr_2O_7}\right)_{390} \cdot c_{K_2Cr_2O_7}$$

$$A_{470} = \left(A_{KMnO_4}\right)_{470} + \left(A_{K_2Cr_2O_7}\right)_{470}$$

$$A_{470} = \left(\varepsilon_{KMnO_4}\right)_{470} \cdot c_{KMnO_4} + \left(\varepsilon_{K_2Cr_2O_7}\right)_{470} \cdot c_{K_2Cr_2O_7}$$

Z vypočtených korigovaných hodnot absorbancí $(A_{K2Cr2O7})_{390}$ a $(A_{K2Cr2O7})_{470}$ určit pomocí kalibračních křivek dichromanu pro jednotlivé vlnové délky (390 a 470 nm) hledané koncentrace dichromanu ve vzorku. Určené koncentrace dichromanu pro jednotlivé vlnové délky (390 a 470 nm) porovnat a posoudit, zda existuje souvislost mezi přesností měření pro určitou úroveň absorbance a výsledkem analýzy.

5.7. Stanovení koncentrace manganistanu a dichromanu v neznámém vzorku

K neznámému vzorku v 50 ml odměrné baňce napipetovat 10 ml směsi 1 M H_2SO_4 a 1 M H_3PO_4 , doplnit destilovanou vodou po značku a dobře promíchat.

5.7.1. Použití tabulkového procesoru pro grafické znázornění naměřených závislostí a zpracování výsledků

Podle pokynů vedoucího cvičení v programu MS Excel otevřít šablonu *„5-vícesložková analýza - vzorové řešení“* a uložit nový sešit.
Přepsat absorbance pro jednotlivé vlnové délky.
Program zpracuje zadaná vstupní data a naměřené hodnoty a v řádcích 93–111, ve sloupcích A–I se objeví výsledky analýz modelových vzorků (v jednotkách hmotnostních v řádcích 95–101 a v jednotkách objemových v řádcích 103–113). V řádcích 114–131 a ve sloupcích A–D jsou výsledky analýzy zadaného neznámého vzorku.

Výpočet m(Mn,Cr) v modelových vzorcích (v mg)

DÁNO:

M.H. $KMnO_4$ 158,045 g/mol
0.0100 roztok 1,58045 mg/ml

vzorek č.	pipetováno	
	ml	mg
1	1,50	2,370675
2	2,00	3,1609
3	0,50	0,790225

M.H. $K_2Cr_2O_7$ 294,19 g/mol
0.0100M roztok 2,9419 mg/ml

vzorek č.	pipetováno	
	ml	mg
1	2,50	7,35475
2	1,00	2,9419
3	4,00	11,7676

KALIBRAČNÍ KŘIVKA MANGANISTAN

c($KMnO_4$) 0,01 t.j. v 1 ml je 0.01 mmol

t.j. v 1 ml je 1.58045 mg $KMnO_4$

ml do 50 ml	mmol v 50 ml	c($KMnO_4$) mol/l	**A 390**	ε 390	**A 470**	ε 470	**A 545**	ε 545
0,50	0,005	0,0001	**0,021**	210,0	**0,043**	430,0	**0,124**	1240,0
1,00	0,010	0,0002	**0,031**	155,0	**0,077**	385,0	**0,237**	1185,0
1,50	0,015	0,0003	**0,041**	136,7	**0,113**	376,7	**0,386**	1286,7
2,00	0,020	0,0004	**0,047**	117,5	**0,143**	357,5	**0,548**	1370,0
2,50	0,025	0,0005	**0,072**	144,0	**0,213**	426,0	**0,944**	1888,0
	průměrná hodnota			152,6		395,0		1393,9
	stand. odchylka %			23%		8%		20%

KALIBRAČNÍ KŘIVKA DVOJCHROMAN

c($K_2Cr_2O_7$) 0,01 t.j. v 1 ml je 0.01 mmol

t.j. v 1 ml je 2.9419 mg $K_2Cr_2O_7$

ml v 50 ml	mmol v 50 ml	c($K_2Cr_2O_7$) mol/l	**A 390**	ε 390	**A 470**	ε 470	**A 545**	ε 545
1,00	0,010	0,0002	**0,075**	375,0	**0,042**	210,0	**0,004**	20,0
2,00	0,020	0,0004	**0,142**	355,0	**0,077**	192,5	**0,001**	2,5
3,00	0,030	0,0006	**0,232**	386,7	**0,118**	196,7	**0,001**	1,7
4,00	0,040	0,0008	**0,328**	410,0	**0,148**	185,0	**0,011**	13,8
5,00	0,050	0,001	**0,447**	447,0	**0,181**	181,0	**0,003**	3,0
	průměrná hodnota			394,7		193,0		8,2
	stand.odchylka %			9%		6%		101%

Naměřené absorbance

	A(390)		**A(470)**		**A(545)**
1.vzorek	**0,227**		**0,192**		**0,395**
2.vzorek	**0,122**		**0,173**		**0,556**
3.vzorek	**0,346**		**0,177**		**0,128**
4.vzorek - x	**0,097**		**0,108**		**0,244**

5.7.2 Vyhodnocení vícesložkové analýzy

Při vyhodnocení stanovení koncentrací a hmotností $KMnO_4$ a $K_2Cr_2O_7$ v neznámém vzorku v protokolu do závěru uvést:

1. **Naměřená absorpční spektra pro manganistan a dichroman se zdůvodněním vybraných vlnových délek.**
2. **Kalibrační závislosti a vyplněné tabulky pro manganistan a dichroman při 390, 470 a 545 nm, popř. jiných vybraných vlnových délkách.**
3. **Tabulku výsledků analýz modelových vzorků s údaji:**

Výsledek analýz modelových vzorků

VÝSLEDEK	$KMnO_4$	158,045		$K_2Cr_2O_7$	294,19			
v mg	dano mg	stanoveno mg	rel.ch. %	dano mg	stanoveno při 400nm. mg	rel. ch. %	stanoveno při 470 nm mg	rel. ch. %
1.vzorek	**2,3707**	**2,2393**	-6%	**7,3548**	**6,8473**	-7%	**6,1007**	-17%
2. vzorek	**3,1609**	**3,1520**	0%	**2,9419**	**2,2776**	-23%	**1,1760**	-60%
3. vzorek	**0,7902**	**0,7256**	-8%	**11,7676**	**12,3712**	5%	**10,7235**	-9%

VÝSLEDEK	$KMnO_4$	158,045		$K_2Cr_2O_7$	294,191			
přepočet na ml	dano ml	stanoveno ml	rel.ch. %	dano ml	stanoveno při 400nm. ml	rel. ch. %	stanoveno při 470 nm ml	rel. ch. %
1.vzorek	**1,50**	**1,416854**	-6%	**2,50**	**2,3275**	-7%	**2,0737**	-17%
2. vzorek	**2,00**	**1,9943565**	0%	**1,00**	**0,7742**	-23%	**0,3997**	-60%
3. vzorek	**0,50**	**0,4591324**	-8%	**4,00**	**4,2052**	5%	**3,6451**	-9%

Z tabulky výsledků analýz modelových vzorků uvést do oddělené tabulky teoretické hodnoty stanovovaných látek (m[mg]) a hodnoty naměřené při jednotlivých stanoveních modelových

vzorků (m[mg], c[mol . l^{-1}]) s ohledem na relativní chybu stanovení:

vzorek č.	c. $KMnO_4$ [mol . l^{-1}]	$m_{teoret.}$ $KMnO_4$ [mg]	$m_{stanoveno}$ $KMnO_4$ [mg]	c $K_2Cr_2O_7$ [mol . l^{-1}]	$m_{teoret.}$ $K_2Cr_2O_7$ [mg]	$m_{stanoveno}$ $K_2Cr_2O_7$ [mg]
I						
II						
III						
N.vzorek		x			x	

Uvést a zdůvodnit, při které vlnové délce je stanovený obsah dichromanu draselného přesnější.

4. **Početně stanovit množství $KMnO_4$ a $K_2Cr_2O_7$ v modelových vzorcích a neznámém vzorku pomocí vztahů v odstavci 5.6.**
5. **Zdůvodnit příčiny možného chybného stanovení obsahu $KMnO_4$ a $K_2Cr_2O_7$ v neznámém vzorku.**