

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PEDAGOGICKÁ FAKULTA  
**KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY CHEMIE**

---

Bc. Veronika Hejsková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Hana Kotoučová, Ph.D.

Studijní obor: Výchova ke zdraví – chemie

2016

## **PROHLÁŠENÍ**

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v období únor 2015 – duben 2016.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především mojí vedoucí práce Ing. Haně Kotoučové, Ph.D., za její ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla. Dále moje poděkování patří paní laborantce Janě Fiřtové za její ochotu a za vytváření příjemné atmosféry v laboratoři a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat prof. Ing. Františkovi Liškovi, CSc., za jeho poutavé přednášky a vstřícný přístup ke studentům, kteří mají o danou problematiku hlubší zájem.

**NÁZEV:**

UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie

**AUTOR:**

Bc. Veronika Hejsková

**KATEDRA:**

Katedra chemie a didaktiky chemie

**VEDOUcí PRÁCE:**

Ing. Hana Kotoučová, Ph.D.

**ABSTRAKT:**

Tato diplomová práce se týká využití UV/VIS spektrofotometrie v rámci vzdělávání učitelů chemie. V teoretické části práce shrnuje poznatky o optických metodách, jejich principech a rozdělení, a velká část je věnována právě UV/VIS spektrofotometrii. V experimentální části jsou uvedené jednotlivé úlohy pro kvantitativní a kvalitativní stanovení látek pomocí UV/VIS spektrofotometru. Úlohy jsou sestavené tak, aby sloužily jako návod pro učitele chemie i jako návod pro studenty, a aby ctily princip postupu od jednoduššího po složitější stanovení látek.

**KLÍČOVÁ SLOVA:**

UV/VIS spektrofotometrie, úlohy pro vzdělávání učitelů chemie, optické metody, spektrální metody, nespektrální metody

**TITLE:**

UV/VIS Spectrophotometry and Its Possibilities of Use in Teacher Education

**AUTHOR:**

Bc. Veronika Hejsková

**DEPARTMENT:**

Department of Chemistry and Chemistry Education

**SUPERVISOR:**

Ing. Hana Kotoučová, Ph.D.

**ABSTRACT:**

This master's thesis discusses the use of UV/VIS spectrophotometry in chemistry teacher education. Optical methods principles are described in theoretical part of the thesis, and the main part is dedicated to UV-VIS spectrophotometry. Tasks for quantifying and qualifying substances determination are described in experimental part. Educational tasks are described in a way so that chemistry teachers could use for instructions.

**KEYWORDS:**

UV/VIS spectrophotometry, educational tasks for teachers of chemistry, optical methods,

## OBSAH

1	Úvod .....	1
2	Teoretická část .....	2
2.1	Princip optických metod .....	2
2.1.1	Elektromagnetické pole .....	2
2.1.2	Elektromagnetické spektrum .....	5
2.2	Rozdělení optických metod.....	5
2.2.1	Nespektrální metody .....	6
2.2.2	Spektrální metody .....	9
2.3	UV/VIS spektroskopie .....	13
2.3.1	Kolorimetrie.....	13
2.3.2	Fotometrie .....	16
2.3.3	Spektrofotometrie .....	16
2.4	UV/VIS spektrofotometrie .....	17
2.4.1	Princip UV/VIS spektrofotometrie .....	17
2.4.2	Elektronové přechody .....	17
2.4.3	Instrumentace .....	25
2.4.4	Využití spektrofotometrie .....	31
3	Cíl práce.....	39
4	Experimentální část .....	40
4.1	Úloha č. 1 – spektrofotometrické stanovení koncentrace kofeinu ve vzorku. .	41
4.1.1	Příprava zásobního roztoku a roztoků kalibračních.....	41
4.1.2	Příprava vzorku – roztoku kofeinu .....	42
4.1.3	Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka .....	42
4.1.4	Stanovení koncentrace kofeinu ve vzorku .....	42

4.1.5	Ověření a komentář k úloze .....	43
4.2	Úloha č. 2 – spektrofotometrické stanovení koncentrace kofeinu (teinu) ve vyluzích mleté kávy a černého čaje. ....	45
4.2.1	Příprava zásobního roztoku a roztoků kalibračních.....	45
4.2.2	Příprava vzorků černého čaje a kávy .....	46
4.2.3	Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka .....	46
4.2.4	Stanovení koncentrace kofeinu (teinu) ve vyluzích černého čaje a mleté kávy.....	46
4.2.5	Ověření a komentář k úloze .....	47
4.3	Úloha č. 3 – kolorimetrické a spektrofotometrické stanovení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku.....	47
4.3.1	Příprava zásobního roztoku a roztoků standardů .....	47
4.3.2	Příprava vzorku – roztoku síranu měďnatého o neznámé koncentraci.....	48
4.3.3	Kolorimetrická stupnice a kolorimetrické stanovení koncentrace ve vzorku .....	48
4.3.4	Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka pro spektrofotometrické stanovení .....	48
4.3.5	Stanovení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku .....	49
4.3.6	Ověření a komentář k úloze .....	49
4.4	Úloha č. 4 – spektrofotometrické stanovení koncentrace ibuprofenu v tabletě Ibuprofenu a v krému Ibalginu.....	51
4.4.1	Příprava zásobního roztoku a příprava kalibračních roztoků .....	51
4.4.2	Příprava vzorků.....	52
4.4.3	Vyhledání absorpčního maxima kalibrační křivka .....	53
4.4.4	Ověření a komentář k úloze .....	53
4.5	Úloha č. 5 – Kvalitativní analýza neznámých vzorků.....	59
4.5.1	Příprava vzorků – standardů .....	59

4.5.2	Příprava vzorků na kvalitativní stanovení .....	59
4.5.3	Kvalitativní analýza vzorků .....	59
4.5.4	Ověření a komentář k úloze .....	60
5	Výsledky a diskuse .....	63
6	Závěr .....	65
7	Seznam literatury .....	66
8	Seznam použitých zkratk .....	70
9	Přílohy .....	71



## 1 Úvod

O využití spektrálních metod ve výzkumech, při kontrole technologických procesů, ve farmacii jistě není pochyb. Každý chemik, i učitel chemie, by měl být s principem spektrálních metod obeznámen, a pokud bude mít i příležitost si takovou metodu vyzkoušet přímo na laboratorním přístroji a nikoliv jen na zjednodušeném modelu, měl by ji přijmout. Od roku 2007 jsou, postupně podle etap a typů škol, školy v České republice povinné tvořit Školní vzdělávací programy (ŠVP) podle Rámcových vzdělávacích programů (RVP). RVP jsou vydané Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy [1]. V Rámcovém vzdělávacím programu pro obor vzdělávání 28-44-M/01 Aplikovaná chemie je jedním z uvedených učiv v obsahovém okruhu „analytická chemie“ učivo „spektrální metody“ [2]. Zmíněný dokument předpokládá, že žák získá odbornou kompetenci pracovat s přístroji, stroji a zařízeními. Pokud se tedy od žáků očekávají uvedené znalosti a kompetence, měli by učitelé chemie být schopni splnit alespoň ty požadavky, které kladou na žáky. Proto je cílem této diplomové práce představit UV/VIS spektrofotometrii a poukázat na možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie, a to vybráním a vypracováním úloh pro kvantitativní a kvalitativní stanovení vybraných látek.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Princip optických metod

Optické metody patří mezi fyzikálně-chemické analytické metody, které jsou založené na interakci elektromagnetického záření s hmotou. Některé optické metody pracují na základě měření absorbovaného nebo emitovaného záření, jiné sledují průchod elektromagnetického záření hmotou [3].

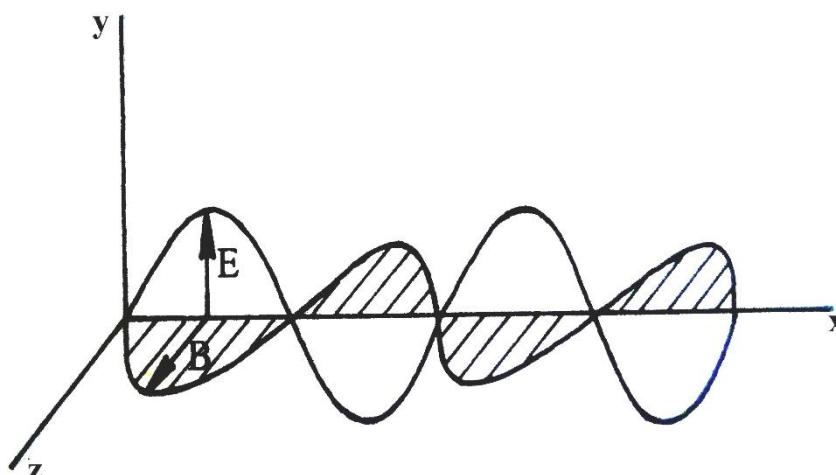
Protože všechny optické metody jsou založené na interakci hmoty s elektromagnetickým zářením, je součástí této kapitoly základní shrnutí informací o tomto záření.

#### 2.1.1 Elektromagnetické pole

Nejlépe prostudovaným z fyzikálních polí je elektromagnetické pole. Jeho vlastnosti jsou dány dualistickým charakterem. Elektromagnetické pole má jednak vlastnosti vlnění, ale také se chová jako proud částic – v tomto případě částic fotonů.

#### Vlastnosti vlny elektromagnetického záření

Elektromagnetická vlna se skládá ze dvou složek, a to ze složky elektrické a složky magnetické. Na Obr. 1 je složka elektrická znázorněna vektorem elektrické intenzity  $\vec{E}$  a složka magnetická charakterizována vektorem magnetické indukce  $\vec{B}$ . Vektory jsou na sebe navzájem kolmé a také jsou oba vektory kolmé na směr šíření paprsku. Elektromagnetické vlnění je tedy vlnění příčné [4, 5, 6, 7].



**Obr. 1. Elektromagnetické vlnění.** Převzato dne 25. 3. 2016 z: [3]

K popisu elektromagnetického vlnění se používá několik základních veličin:

- **Frekvence**

Frekvence neboli kmitočet ( $\nu$ ) udává počet opakování periodického děje, kmitů, za sekundu. Frekvence zůstává neměnná při přechodu z jednoho látkového prostředí do jiného. Jednotkou frekvence je Hertz (Hz)[3, 8].

- **Vlnová délka**

Vlnová délka je vzdálenost, o kterou postoupí vlna za dobu jednoho kmitu. Označuje se řeckým písmenem lambda ( $\lambda$ ) a její základní jednotkou je metr (m). Kmitočet je převrácenou hodnotou vlnové délky  $l$  [3, 8].

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad l$$

Kde  $\tilde{\nu}$  = kmitočet,  $\lambda$  = vlnová délka.

- **Rychlost záření**

Rychlost záření je definována jako vzdálenost, kterou urazí vlna za časovou jednotku (sekundu) a značí se písmenem  $c$ . Rychlost elektromagnetického záření ve vakuu je  $2,99792458 \cdot 10^8$  m/s [9]. Rychlost světla mimo vakuum v normálním prostředí je nižší z důvodu interakce fotonů s atomy či molekulami látek tvořící dané prostředí. Toto vzájemné působení fotonů s atomy

popř. molekulami je možné popsat indexem lomu látky  $n$ . Index lomu látky lze vypočítat podle rovnice 2 [8, 10].]

$$n = \frac{c}{v_\lambda} \quad 2$$

Kde  $c$  = rychlost světla ve vakuu,  $v_\lambda$  = rychlost světla o určité vlnové délce v látkovém prostředí,  $n$  = index lomu.

### Vlastnosti částice elektromagnetického záření

Energie elektromagnetického záření je vyzařována po určitých kvantech. Nositelé těchto kvant jsou fotony a jejich energii je možné vyjádřit matematickou rovnicí 3 Maxe Plancka, kde energie fotonů je přímo úměrná frekvenci [6, 11]

$$E = h * \nu \quad 3$$

Kde  $E$  = energie fotonu;  $h$  = Planckova konstanta ( $h = 6,626 * 10^{-34}$  J s);  $\nu$  = frekvence světla.

Pro fotony platí de Broglieho vztah 4 jenž přiřazuje pohybující částici určitou vlnovou délku [3].

$$\lambda = \frac{h}{m * v} \quad 4$$

Kde  $h$  = Planckova konstanta,  $m$  = hmotnost částice,  $v$  = rychlost částice.

K popisu vlastností částic elektromagnetického záření se používají následující základní veličiny:

- **Zářivý tok**

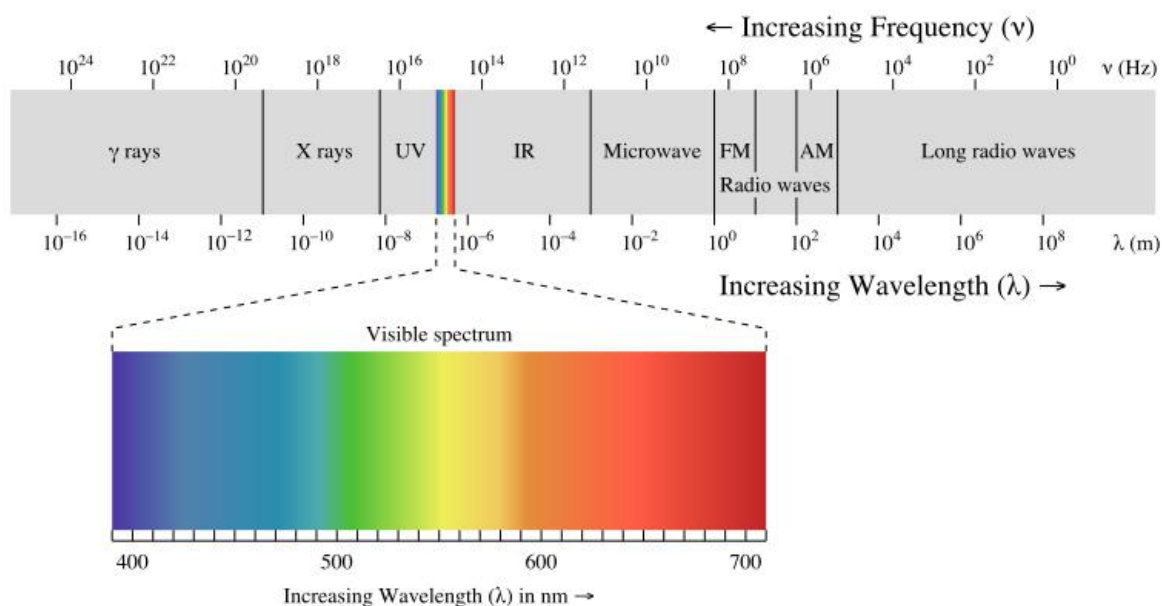
Zářivý tok  $\phi$  a odpovídá zářivé energii, která projde určitou plochou za jednotku času [12].

- **Intenzita záření**

Intenzita záření má značku  $I$  a představuje zářivý tok, který je vyslán příčným průřezem plochy zdroje [8].

## 2.1.2 Elektromagnetické spektrum

Elektromagnetické spektrum zahrnuje záření všech vlnových délek, sahá od vlnových délek v řádu  $10^{-13}$  m po vlnové délky v řádu  $10^6$  m [13]. Rozlišuje se několik oblastí v elektromagnetickém kontinuu podle vlnových délek či frekvencí [5]. Druhy elektromagnetického spektra s odpovídajícími vlnovými délkami a kmitočtem znázorňuje Obr. 2.



**Obr. 2. Elektromagnetické spektrum.** Převzato dne 20. 3. 2016 z WWW: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM\\_spectrum.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg)>. Autorem obrázku je Philip Rhonan.

## 2.2 Rozdělení optických metod

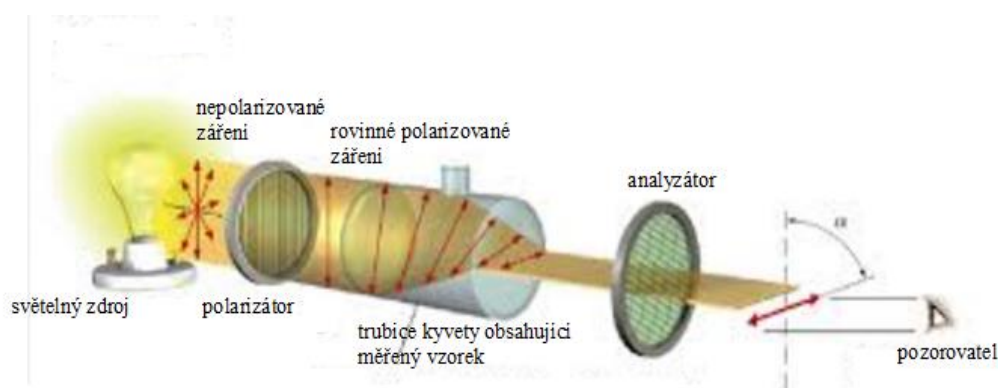
Podle způsobu interakce elektromagnetického záření s hmotou se optické metody rozdělují do dvou hlavních skupin, a to na metody spektrální a nespektrální. Spektrální metody jsou založeny na faktu, že dochází k výměně energie mezi hmotou a zářením. Naopak nespektrální metody využívají případu, kdy hmota a záření energii nevyměňují, ale hmota ovlivňuje procházející záření [3, 8].

## 2.2.1 Nespektrální metody

U nespektrálních metod jsou sledovány změny vlastností záření (změny rychlosti záření, stáčení roviny polarizovaného světla, rozptyl záření) při interakci s prostředím. Jako příklad těchto metod se může uvést polarimetrie, refraktometrie, turbidimetrie a nefelometrie [3, 8].

- **Polarimetrie**

Princip polarimetrie spočívá v převedení nepolarizovaného světla na světlo lineárně polarizované. Světlo je možné polarizovat odrazem, lomem nebo průchodem dvojlomnými krystaly. Látky, které obsahují chirální centrum, jsou schopné stáčet rovinu lineárně polarizovaného světla. Podle směru stáčení roviny tohoto světla se opticky aktivní látky rozdělují na pravotočivé (+) a levotočivé (-). Pravotočivé látky stáčí rovinu polarizovaného světla po směru chodu hodinových ručiček a levotočivé látky stáčí rovinu polarizovaného světla proti směru chodu hodinových ručiček. Směr stáčení polarizovaného světla je sledován proti postupu světla [8, 14, 15]. Schéma polarimetru je znázorněné na Obr. 3.



**Obr. 3. Schéma polarimetrie.** Převzato dne 17. 3. 2016 z: [16] a z důvodu čitelnosti byl upraven text.

Úhel, o který je pootočena rovina polarizovaného světla lze vyjádřit rovnicí 5 [3].

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t l * c \quad 5$$

Kde  $[\alpha]_{\lambda}^t$  = specifická otáčivost při teplotě  $t$  a vlnové délce  $\lambda$ ,  $l$  = tloušťka kyvety,  
 $c$  = koncentrace vzorku.

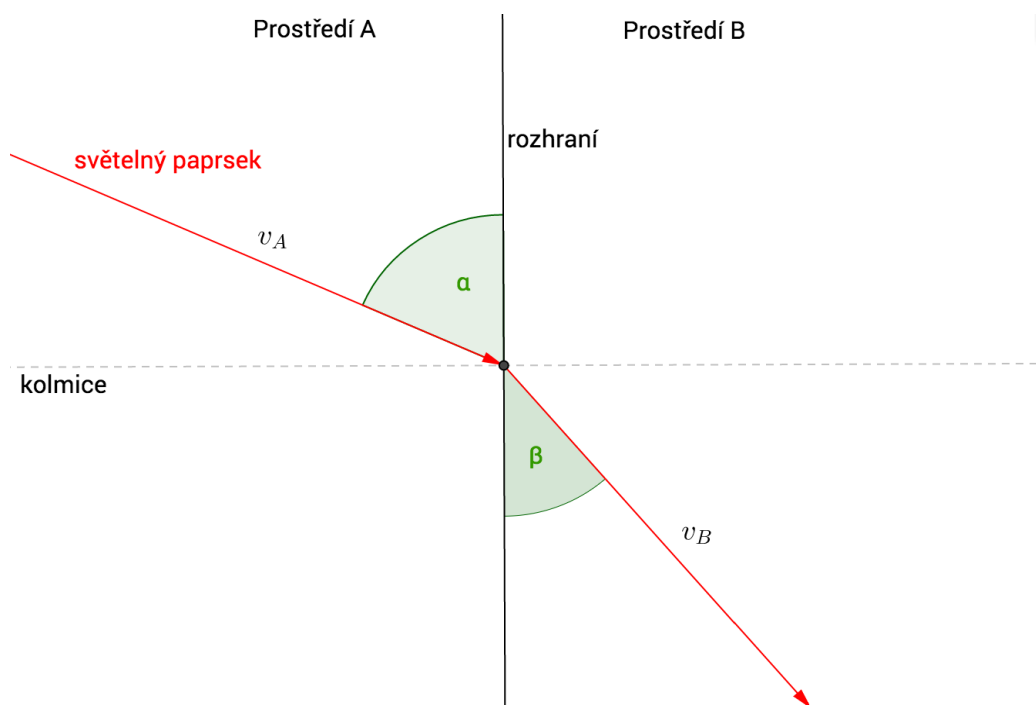
Specifická otáčivost, kterou lze polarimetricky změřit, je pro měřenou látku charakteristická.

- **Refraktometrie**

Refraktometrie je metoda založená na měření indexu lomu světla. Lom světla nastává při průchodu paprsku světla z jednoho optického prostředí do druhého. Pokud nejsou optická prostředí stejná, mění se směr průniku paprsku a jeho rychlost. Rychlost šíření světla optickým prostředím je obtížně měřitelná a proto se využívá Snellova zákona [3, 7, 14, 15]. Snellův zákon popisuje poměr úhlu dopadu světelného paprsku k úhlu odrazu (lomu) světelného paprsku podle rovnice 6 [9]. Lom paprsku monochromatického záření na rozhraní dvou prostředí graficky vyjadřuje Obr. 4.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{v_A}{v_B} = n_{AB} \quad 6$$

Kde  $\alpha$  = úhel dopadu paprsku ke kolmici rozhraní obou prostředí;  $\beta$  = úhel odrazu (lomu) světelného paprsku ke kolmici rozhraní obou prostředí;  
 $v_A$  = rychlost šíření světelného paprsku v prostředí A;  $v_B$  = rychlost šíření světelného paprsku v prostředí B;  $n_{AB}$  = index lomu při přechodu světelného paprsku z prostředí A do prostředí B.

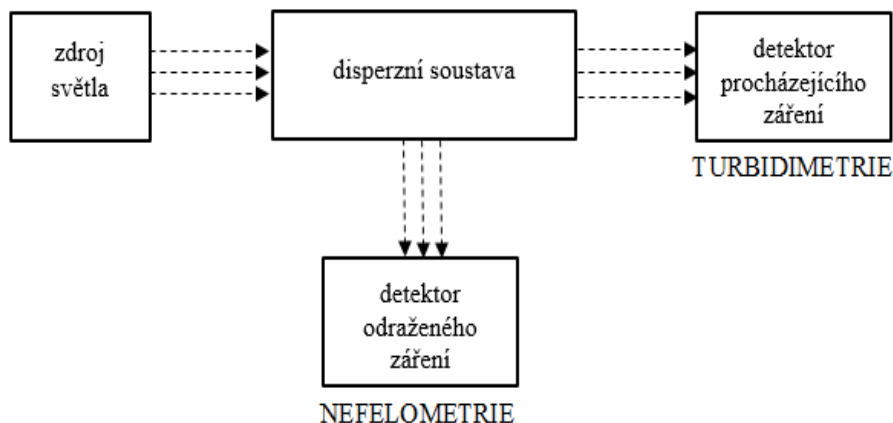


Obr. 4. Lom paprsku monochromatického záření na rozhraní dvou prostředí

- **Turbidimetrie a nefelometrie**

Podstatou turbidimetrie i nefelometrie je rozptyl světla po průchodu disperzní soustavou. Částice obsažené v disperzní soustavě ovlivňují rozptyl světla a intenzitu nerozptýleného světla. Turbidimetrie sleduje intenzitu světla, které prošlo disperzní soustavou, a proto je detektor umístěn ve směru procházení primárního paprsku záření. Detektor u nefelometrie je umístěn kolmo na směr procházení primárního paprsku, neboť nefelometrie měří intenzitu světla rozptýleného [3, 8 17] (Obr. 5).





Obr. 5. Turbidimetrie a nefelometrie

Intenzitu nerozptýleného světla lze vyjádřit matematicky rovnicí 7.

$$I = I_0 \exp(-l\tau) \quad 7$$

Kde  $I$  = intenzita nerozptýleného světla,  $I_0$  = intenzita primárního svazku,  $l$  = tloušťka kyvety,  $\tau$  = velikost rozptylu – turbidita.

### 2.2.2 Spektrální metody

Principem využití spektrálních metod je měření energetické změny, která nastane při průchodu záření látkou (prostředím). Tyto metody jsou založené na skutečnosti, že atomy a molekuly se mohou nacházet v různých energetických stavech. Za normálních podmínek se atomy a molekuly nachází v základním stavu, tj. stavu, ve kterém má atom či molekula nejnižší energii. Dodáním určitého množství energie, kvanta záření, mohou atomy nebo molekuly přejít do energeticky vyššího stavu, tento stav se nazývá excitovaný. Látka ve vyšším energetickém stavu může vyzářit kvantum energie a přejít do energeticky nižšího stavu. Množství vyměněné energie je popsáno Bohrovým–Einsteinovým vztahem 8 [4, 18, 19].

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h * \nu \quad 8$$

Kde:  $E$  = energie fotonu;  $h$  = Planckova konstanta ( $h = 6,626 * 10^{-34}$  J s);  $\nu$  = frekvence elektromagnetického záření.

Z uvedené rovnice 8 vyplývá, že rozdíl mezi počáteční energií  $E_2$  a konečnou energií  $E_1$  se rovná vyměněné energii  $\Delta E$ . Tato vyměněná energie se rovná kvantu záření, které bylo potřeba, aby látka přešla do vyššího energetického stavu nebo se rovná kvantu záření, které bylo vyzářeno látkou při přechodu z vyššího energetického stavu do nižšího.

Ve spektroskopii se více využívá obměněné Bohrovy–Einsteinovy rovnice 10, kde frekvence záření je vyjádřena jako součin rychlosti záření a vlnočtu viz rovnice 9 [3, 4, 19].

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = c \tilde{\nu} \quad 9$$

Kde  $\nu$  = frekvence elektromagnetického záření,  $\lambda$  = vlnová délka,  $c$  = rychlost elektromagnetického záření,  $\tilde{\nu}$  = vlnočet.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h c \tilde{\nu} \quad 10$$

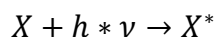
Kde  $\Delta E$  = vyměněná energie,  $E_2$  = počáteční energie,  $E_1$  = konečná energie,  $h$  = Planckova konstanta,  $c$  = rychlost elektromagnetického záření,  $\tilde{\nu}$  = vlnočet.

Spektrometrické metody lze rozdělit do tří skupin:

1. na základě pohlcení či vyzáření kvanta fotonů látkou na **absorpční** a **emisní** metody
2. podle toho, zda absorpce nebo emise záření probíhá na úrovni atomů nebo molekul na metody **atomové** a **molekulové**
3. podle oblastí vlnových délek na **rentgenovou**, **ultrafialovou**, **viditelnou**, **infračervenou** spektrometrii [3].

## Absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie je založena na principu pohlcení energetických kvant fotonů látkou (vzorkem). Pohlcením záření se zvýší energie látky o energii absorbovaného kvanta fotonů, tento děj je vyjádřený schématem 1.



### Schéma 1

**Schéma 1**  $X$  = látka v základním stavu,  $h * \nu$  = energie fotonů,  $X^*$  = látka v excitovaném stavu

Po absorpci záření se energie může spotřebovat na přechod elektronů tvořících chemické vazby nebo se energie spotřebuje ke zvýšení vibrační energie chemických vazeb či ke zvýšení rotační energie molekuly [3, 7, 20].

Na přechod elektronů tvořících chemické vazby jsou potřebná velká energetická kvanta záření v rozmezí od 150 kJ/mol do 627 kJ/mol, což odpovídá vlnovým délkám v rozmezí 190–800 nm (ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření). Ke zvýšení vibrační energie chemických vazeb je nutná energie v rozmezí od 5 kJ/mol do 150 kJ/mol. Této energii odpovídá elektromagnetické záření o vlnových délkách 0,8–30  $\mu\text{m}$  (infračervená oblast). A pro zvýšení rotační energie molekuly je potřebné dodat energii od 0,01 kJ/mol do 4 kJ/mol, což je přibližně energie záření o vlnových délkách 30–10 000  $\mu\text{m}$  (infračervená a mikrovlnná oblast) [3, 20].

Podle velikosti naměřené absorpce lze kvantitativně stanovit množství absorbující látky ve vzorku a podle hodnoty frekvence absorbovaného záření lze provést kvalitativní analýzu vzorku.

## Základní veličiny užívané v absorpční spektrometrii

- **Transmittance**

Transmittance neboli propustnost  $T$  je vyjádřena jako poměr zářivého toku, který prošel látkou k zářivému toku, který do látky vstupoval. Transmittanci lze vyjádřit následující rovnicí 11.

$$T = \frac{\phi}{\phi_0} \quad 11$$

Kde:  $\phi$  = zářivý tok vystupující z látky;  $\phi_0$  = zářivý tok vstupující do látky.

Hodnoty transmittance se nacházejí v intervalu  $< 1; 0 >$  [3].

- **Absorbance**

Absorbance se označuje písmenem  $A$ . Absorbanci lze charakterizovat jako záporný logaritmus hodnoty transmittance. Tento vztah je vyjádřený rovnicí 12. Hodnoty absorbance se nachází v intervalu  $< 0; \infty >$  [3, 21].

$$A = -\log T = \log \frac{\phi_0}{\phi} \quad 12$$

Kde:  $A$  = absorbance,  $T$  = transmittance,  $\phi_0$  = intenzita světelného toku před průchodem vzorkem,  $\phi$  = intenzita světelného toku po průchodu vzorkem.

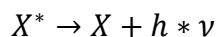
Závislost mezi absorbancí na koncentraci absorbující látky je vyjádřena Bouguerovým–Lambertovým–Beerovým zákonem, který je možno zapsat matematickou rovnicí 13 [18].

$$A = \varepsilon * c * d \quad 13$$

Kde:  $A$  = absorbance,  $\varepsilon$  = molární absorpční (extinkční) koeficient,  $c$  = látková koncentrace,  $d$  = délka kvivety.

## Emisní spektroskopie

Principem emisní spektroskopie je měření energie odpovídající uvolnění energetických kvant fotonů. Aby mohlo dojít k uvolnění záření, musí být látka nejprve excitována – musí se nacházet ve vyšším energetickém stavu. Právě při přechodu látky z vyššího energetického stavu do nižšího energetického stavu dojde k emisi záření. Emisi záření vyjadřuje schéma 2.



**Schéma 2**  $X^*$  = látka v excitovaném stavu;  $h * \nu$  = energie fotonů;  $X$  = látka.

Na principu emise záření je založena atomová emisní spektrometrie (AES) v oblasti rentgenového nebo ultrafialového a viditelného záření [3, 17].

## **Atomová spektroskopie**

Atomová spektroskopie sleduje chování individuálních atomů v plynném stavu a zaznamenává emitované nebo absorbované záření, které odpovídá změně energetického stavu elektronů v atomech látky. Podle toho, zda je zaznamenáváno emitované nebo absorbované záření, se atomová spektroskopie rozděluje na atomovou emisní spektroskopii (AES) a na atomovou absorpční spektroskopii (AAS). Výsledkem atomové spektroskopie je čárové spektrum. Každá spektrální čára je charakteristická pro daný prvek a obsah prvku ve vzorku je úměrný intenzitě spektrální čáry [3, 17].

## **Molekulová spektroskopie**

Molekulová spektroskopie sleduje, v jakých strukturách se atomy v molekulách nacházejí. Při ultrafialové, viditelné a infračervené spektrometrii dochází při absorpci záření ke změně energetického stavu celé molekuly. Molekulovou spektroskopií je získáno pásové spektrum. Jednotlivé pásy jsou různě široké, což je zapříčiněno změnou elektronového, vibračního a rotačního stavu molekuly nebo pouze změnou jejich vibračního a rotačního stavu [3].

## **2.3 UV/VIS spektroskopie**

Mezi metody UV/VIS spektroskopie patří metody využívající absorpci elektromagnetického záření látkami v oblasti ultrafialového a viditelného spektra. Jednotlivé metody se liší přístrojovým vybavením a mírou přesnosti. Mezi metody UV/VIS spektroskopie patří kolorimetrie, fotometrie a spektrofotometrie [3, 8].

### **2.3.1 Kolorimetrie**

Jednou z nejstarších a nejjednodušších fyzikálně-chemických metod, která využívá absorpci záření látkami ve viditelném spektru je optická metoda kolorimetrie. Tato

metoda nevyužívá přístrojové vybavení, detekce absorpce je prováděna subjektivně – zrakem [3].

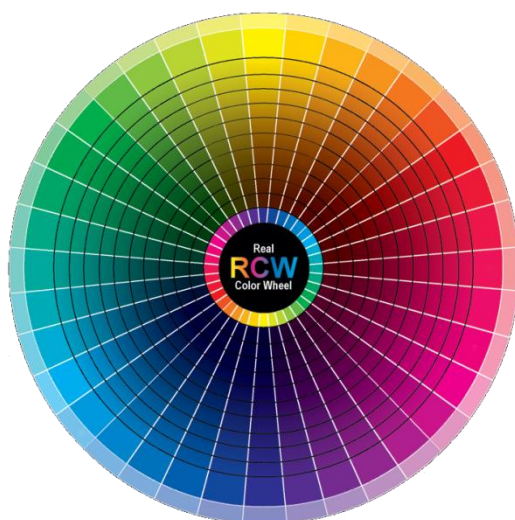
### Vnímání barev lidským okem

Lidské oko je schopné detekovat pouze malou oblast z elektromagnetického spektra, tato oblast se nachází v rozmezích vlnových délek 380–760 nm a nazývá se viditelným zářením [22]. Viditelné světlo se skládá z několika barev rozdělených a charakterizovaných vlnovými délkami viz Obr. 6 [23].



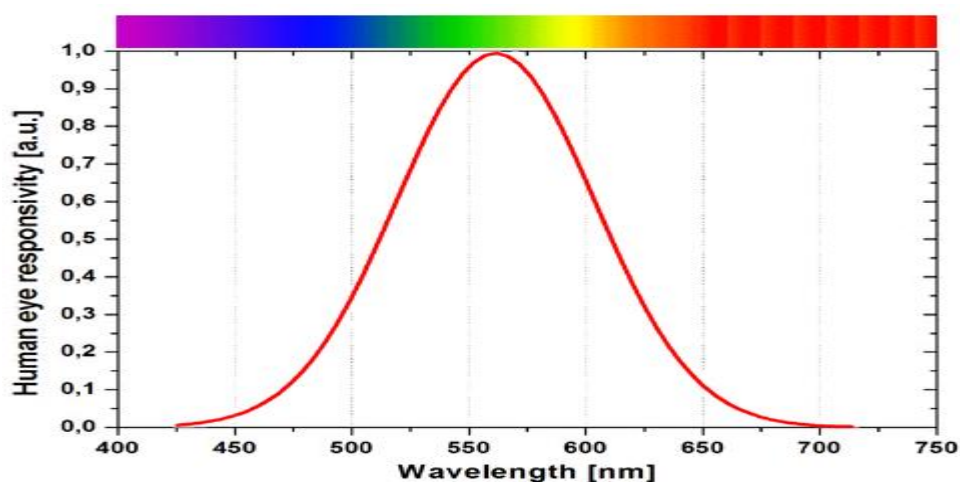
**Obr. 6. Složení viditelného světla podle barev.** Převzato dne 30. 3. 2016 z WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linear\\_visible\\_spectrum.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linear_visible_spectrum.svg). Autorem je uživatel Gringer.

Schopnost vnímat barevnost objektů je daná vlastnostmi objektu, resp. světelným zářením, který objekt pohlcuje a fotoreceptory lidského oka (čípky), které barvu detekují. Pokud daný objekt absorbuje část viditelného záření, lidské oko nevidí barvu tohoto absorbovaného záření, ale absorpce se navenek projeví barvou komplementární. Obr. 7 vyjadřuje komplementaritu záření (barev) pohlcených a viditelných. [7, 13, 14, 24].



**Obr. 7. Komplementarita barev.** Převzato dne 3. 6. 2016 z WWW: <http://www.realcolorwheel.com/rcwplotter.htm>. Autorem je Donald A. Jusko.

Zdravé lidské oko obsahuje tři typy čípků citlivých na viditelnou oblast záření, přičemž maximální citlivost čípků je při vlnové délce 550 nm. Této vlnové délce odpovídá barva zeleno-žlutá [24]. Na Obr. 8 je znázorněna citlivost lidského oka v závislosti na vlnových délkách viditelné oblasti elektromagnetického spektra.



**Obr. 8. Citlivost zdravého lidského oka na vlnové délce.** Převzato dne 3. 6. 2016 z WWW: <http://www.microdesignum.cz/clanky/Polovodicove-lasery-a-LED-ky.Html>. Autory článku, ze kterého byl obrázek převzat, jsou: Ing. Robert Krejčí, Doc. Ing. Eduard Hulicius, CSc.

### Určení koncentrace kolorimetricky

Při určení koncentrace látky kolorimetricky je porovnáván vzorek o neznámé koncentraci se škálou roztoků o známých koncentracích – standardů. Touto srovnávací metodou se s využitím následující rovnice 14 určí neznámá koncentrace látky přibližně [3, 7].

$$c_1 l_1 = c_2 l_2 \quad 14$$

Kde:  $c_1$  = koncentrace standardu,  $l_1$  = tloušťka absorbující vrstvy,  $c_2$  = neznámá koncentrace  $l_2$  = tloušťka absorbující vrstvy.

Avšak jak již bylo řečeno v předcházejících odstavcích, tato metoda je závislá na schopnosti vnímání barev a barevných odstínů okem pozorovatele, a proto není objektivní a lze ji použít pouze pro odhad koncentrace.

### 2.3.2 Fotometrie

Fotometrie je fyzikálně-chemická metoda využívající absorpci látek ve viditelném spektru elektromagnetického záření. Fotometricky je měřeno zeslabování intenzity toku světelného paprsku kyvetou se vzorkem. Podle způsobu detekce se rozlišuje metoda subjektivní, kdy je detektorem lidské oko, a metoda objektivní, kdy je detektorem přístroj – fotometr [3, 12].

### 2.3.3 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je objektivní metodou, jejíž přístrojové vybavení umožňuje změřit záření, které vzorek pohltí. Podrobněji se této metodě věnuje kapitola 2.4.



## 2.4 UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie je fyzikálně-chemická metoda, která se řadí mezi molekulovou absorpční spektrometrii. Rozsah vlnových délek, při kterých UV/VIS spektrofotometrie pracuje je v rozmezí 200–800 nm [3, 4, 19].

### 2.4.1 Princip UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie pracuje na principu měření energie pohlcené vzorkem (látkou) při průchodu záření. Měřením jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce. Absorpcí elektromagnetického záření molekulou dojde ke změně elektronového stavu dané látky (molekuly) – dojde k elektronovým přechodům. Jinými variantami spekter jsou závislosti transmitance nebo extinkčního koeficientu na vlnové délce. Nejčastěji se využívá měření absorbance, přičemž závislost absorbance na koncentraci a tloušťce kyvety je popsána matematicko-fyzikální rovnicí 15 plynoucí z Bouguerova–Lambertova–Beerova zákona (zkráceně Lambertova–Beerova zákona). Platnost Lambertova–Beerova zákona je omezena na zředěné roztoky, protože tvrzení, že extinkční koeficient je nezávislý na koncentraci látky při dané vlnové délce, se vztahuje pouze na zředěné roztoky do koncentrace  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . U roztoků s koncentrací nad  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  je extinkční koeficient závislý na indexu lomu roztoku, a tudíž není koeficientem [8, 18]. Extinkční koeficient je pro různé látky charakteristický.

$$A = \varepsilon * c * d \quad 15$$

Kde:  $A$  = absorbance,  $\varepsilon$  = molární absorpční (extinkční) koeficient,  $c$  = látková koncentrace,  $d$  = délka kyvety.

### 2.4.2 Elektronové přechody

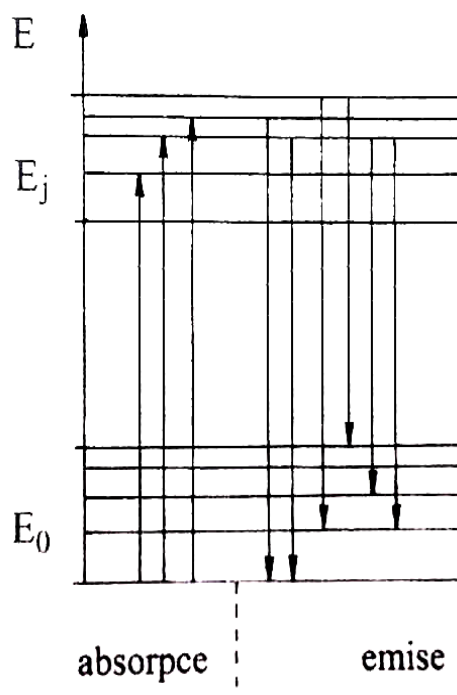
Jak již bylo uvedeno, za normálních podmínek se molekuly nacházejí v základním elektronovém stavu o energii  $E_0$ . Energie základního elektronového stavu je definována

součtem základní elektronové energie  $E_e$ , vibrační energie  $E_v$  a energie rotační  $E_r$ . Jejich vztah je vyjádřen rovnicí 16 [25].

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad 16$$

Kde  $E_0$  = energie základního elektronového stavu,  $E_e$  = základní elektronové energie,  $E_v$  = vibrační energie,  $E_r$  = rotační energie.

Pohlčením určitého kvanta fotonů přejde molekula ze základního stavu do stavu excitovaného. Pokud dojde k absorpci kvant fotonů za přestupu do vyšší energetické hladiny, hovoří se o absorpci. Jestliže dojde k vyzáření kvant fotonů při přechodu z vyšší energetické hladiny na nižší, hovoří se o emisi záření. Schéma absorpce a emise je vyobrazené na Obr. 9.



**Obr. 9. Absorpce a emise.** Převzato dne 5. 3. 2016 z [3]

Excitovaný stav je energeticky bohatší a tudíž má kratší dobu životnosti než stav základní. Doba životnosti excitovaných stavů se udává v řádech  $10^{-9}$  s [3]. Molekuly přechází z excitovaného stavu do stavu základního deexcitačními přechody. Energie,

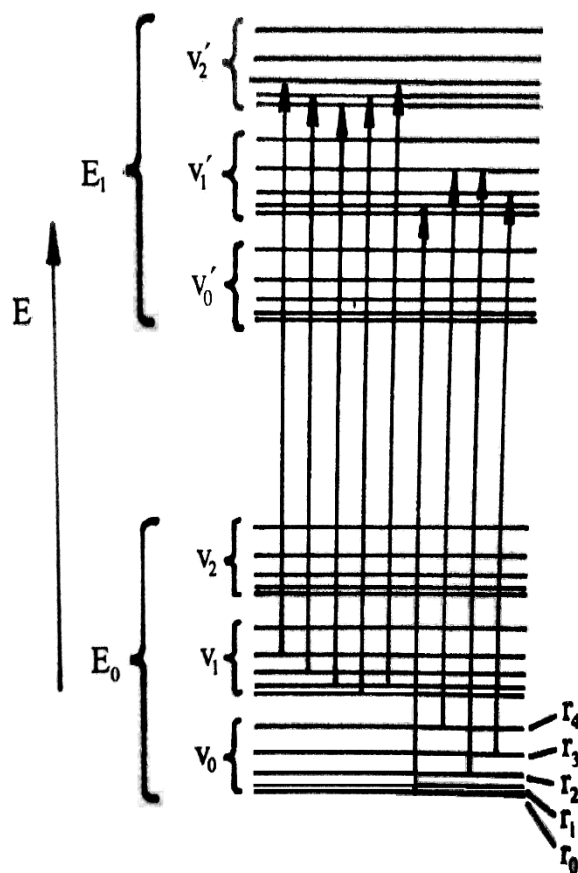
kterou molekula přijala k přechodu ze základního do excitovaného stavu, se rovná energii, kterou daná molekula předala, aby se vrátila zpět na základní hladinu. Tento děj je popsán obměněnou Bohrovou–Einsteinovou rovnicí 17 [4].

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r \quad 17$$

Kde:  $\Delta E$  = změna energie,  $E_1$  = excitovaný elektronový stav,  $E_0$  = základní elektronový stav,  $\Delta E_e$  = změna základních elektronových energií,  $\Delta E_v$  = změna vibračních energií,  $\Delta E_r$  = změna rotační energie.

Elektronové přechody vyvolané absorpcí světla mohou probíhat z různých vibračních a rotačních stavů základního elektronového stavu do libovolných vibračních a rotačních stavů elektronově excitovaného stavu.

Energie, která je potřebná na přechod mezi elektronovými stavy je mnohem větší ( $\Delta E_e \sim 150\text{--}600$  kJ/mol) než energie, která je vyžadována na přechody mezi vibračními stavy ( $\Delta E_v \sim 2\text{--}60$  kJ/mol) a rotačními stavy ( $\Delta E_r \sim 3$  kJ/mol). Proto pokud dojde k přechodu mezi elektronovými stavy, tak zároveň dojde k excitaci vibračních a rotačních hladin molekuly (Obr. 10). Výsledné absorpční ultrafialové spektrum látky má charakter pásový, protože jednotlivé přechody nelze většinou rozlišit [6, 25].

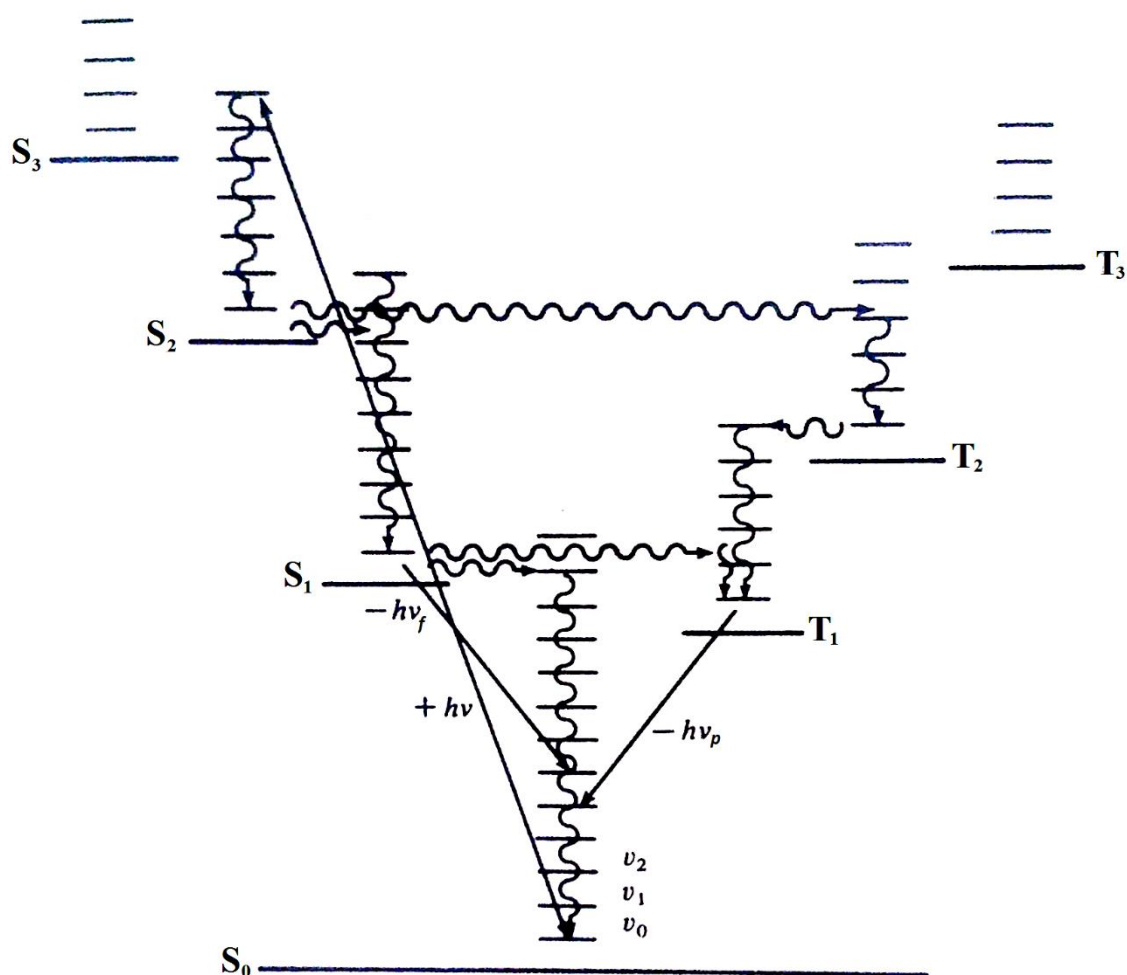


Obr. 10. Schéma energetických hladin. Převzato dne 5. 3. 2016 z [6].

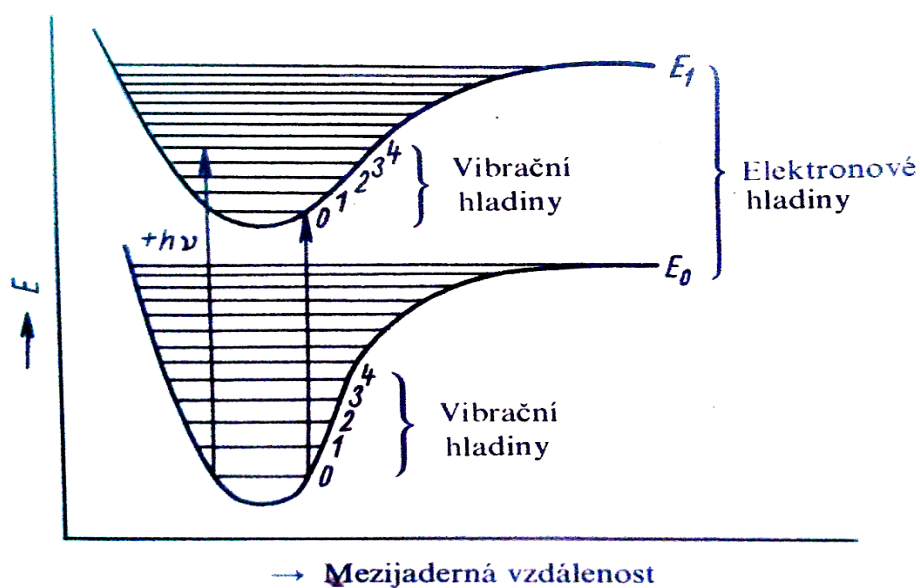
### Elektronové přechody organických sloučenin

Ke znázornění excitovaných polyatomových molekul se používá Jablonskiho diagram (Obr. 11). Jejich struktura je tak komplikovaná, že ji nelze znázornit Morseovými křivkami, viz Obr. 12. Vnější atomy organických molekul většinou mívají sudý počet elektronů. V základním stavu jsou elektrony spárované, tento stav se označuje jako singletový  $S_0$ . Absorpcí světla nemusí dojít ke změně spinu a tímto pochodem vzniká excitovaný singletový stav  $S_n$ . U excitovaného singletového stavu může dojít k inverzi spinu za vzniku tzv. tripletového stavu  $T_n$ . V tripletovém stavu jsou spiny obou elektronů shodné, tudíž jsou nespárované. Přechod mezi singletovým a tripletovým stavem je spinově zakázaný a poskytuje pásy s nejmenší intenzitou ( $\mathcal{E}_{\max} \sim 10^0$ ). Naopak pásy s největší intenzitou ( $\mathcal{E}_{\max} \sim 10^4\text{--}10^5$  l/mol\*cm) tvoří spinově dovolené přechody.

Jako spinově dovolené přechody se označují přechody ze singletového stavu do singletového stavu, nebo přechody z tripletového stavu do tripletového stavu. Na Jablonskiho diagramu jsou vlnitými šipkami demonstrovány spinově dovolené a spinově zakázané přechody. Příkladem spinově dovoleného přechodu může být např. přechod z  $S_2$  do  $S_1$  a příkladem spinově zakázaného přechodu může být přechod z  $S_2$  do  $T_2$ . Na Obr. 11 je ještě znázorněna fosforescence ( $-h \cdot \nu_p$ ) a fluorescence ( $-h \cdot \nu_f$ ). Lze tedy vyčíst, že fosforescence je emise světla při přechodu z prvního tripletového stavu do stavu základního a fluorescence je emise světla při přechodu z prvního singletového stavu do stavu o základní energii [6, 26].



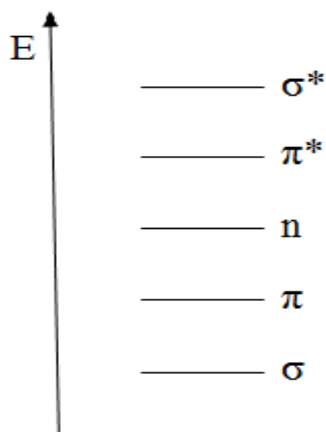
Obr. 11. Jablonskiho diagram. Převzato dne 5. 3. 2016 z [6].



Obr. 12. Morseovy křivky. Převzato dne 5. 3. 2016 z [6]

### Intramolekulární elektronové přechody organických sloučenin

Organické sloučeniny obsahují 3 typy elektronů, a to elektrony typu  $\sigma$ ,  $\pi$  a nevazebné elektrony  $n$ . Jednotlivé typy elektronů se rozlišují podle toho, v kterém molekulovém orbitalu se nacházejí. A tyto molekulové orbitály leží v různých energetických hladinách, jak je znázorněno na Obr. 13.



Obr. 13. Energie hladin molekulových orbitalů

Při absorpci záření v UV nebo VIS oblasti může dojít ke čtyřem typům přechodů [3, 25].

**1. Přejchod z vazebného orbitalu  $\sigma$  do antivazebného orbitalu  $\sigma^*$**

Aby došlo k přechodům elektronů z vazebného orbitalu  $\sigma$  do antivazebného orbitalu  $\sigma^*$ , je nutné dodat velkou energii. Tento typ přechodu lze pozorovat při absorpci krátkovlnného záření – vakuové oblasti pod 200 nm. Uhlovodíky s jednoduchými vazbami se proto používají v UV/VIS spektrofotometrii jako rozpouštědla pro měření spekter jiných látek [3, 4, 27, 28].

**2. Přejchod z nevazebného orbitalu  $n$  do antivazebného orbitalu  $\sigma^*$**

Pro přechod látek z nevazebného orbitalu  $n$  do antivazebného orbitalu  $\sigma^*$  je nutné, aby látka obsahovala atom s volnými elektronovými páry. Na excitaci volných elektronových párů z nevazebného atomu není potřeba dodání takové energie, jaké je potřeba k excitaci vazebných  $\sigma$  elektronů. Vzniklé pásy mají absorpční maxima kolem 200 nm. U látek, které obsahují silně elektronegativní atomy, je absorpce opět pod 200 nm a nedá se pomocí UV/VIS spektrometrie změřit [3, 4, 27 28].

**3. Přejchod z vazebného orbitalu  $\pi$  do antivazebného orbitalu  $\pi^*$**

Přejchod z vazebného orbitalu  $\pi$  do antivazebného orbitalu  $\pi^*$  je typický pro sloučeniny obsahující ve své molekule násobné vazby. Čím má látka více konjugovaných vazeb, tím je absorpční maximum posunuto k delším vlnovým délkám, neboť u látek s konjugovanými dvojnými vazbami dochází ke zvýšení energie nejvyššího vazebného orbitalu a ke snížení energie nejnižšího antivazebného orbitalu. Tím dojde ke snížení rozdílu energie, která je potřebná k přechodu mezi nimi. U aromatických sloučenin obsahující větší počet konjugovaných nenasycených vazeb je rozdíl energie mezi hladinami  $\pi$ - $\pi^*$  tak malý, že jejich absorpční maxima se nacházejí při vlnových délkách, které náležejí do viditelné oblasti [3, 4, 27, 28]

**4. Přejchod z nevazebného orbitalu  $n$  do antivazebného orbitalu  $\pi^*$**

Pokud molekula obsahuje kromě dvojných vazeb i atomy s volným elektronovým párem dojde k přechodu elektronů mezi hladinami  $n$ - $\pi^*$ . Přejchod

je méně energeticky náročný, než je tomu u přechodu  $\pi-\pi^*$  a absorpční maxima leží v oblasti delších vlnových délek. Přítomností atomů s volným elektronovým párem je ovlivněn i přechod  $\pi-\pi^*$ , neboť některé atomy či skupiny s volným elektronovým párem, které leží mezi násobnými vazbami, znemožňují konjugaci [3, 4, 27, 28].

### **Elektronové přechody v komplexech kovů**

Komplexy kovů jsou tvořeny iontem kovu  $M$  a ligandy  $L$ . Vazba v komplexech kovů je klasifikována jako vazba kovalentní polární. Ligand se chová jako Lewisova báze – je dárce, donorem, elektronového páru a centrální atom je příjemcem, akceptorem, elektronového páru, tedy Lewisovou kyselinou. Absorpční pásy komplexů jsou závislé na povaze vazby mezi  $M$  a  $L$  [29]. Zkoumáním absorpčních spekter komplexů kovů byly zjištěno, že existují tři typy základních elektronových přechodů, které se mohou uskutečnit mezi iontem kovu a ligandem [3].

#### **1. Elektronové přechody $d-d$**

U tohoto typu přechodu hraje roli tzv. teorie krystalového a ligandového pole. Různé ligandy mají různou schopnost štěpit hladiny orbitalů  $d$  centrálního atomu v komplexech kovů. Míra schopnosti štěpit tyto hladiny je dána především mírou kovalentní interakce s centrálním atomem. Podle výběrových pravidel jsou elektronové přechody  $d-d$  formálně zakázané a mají proto velmi nízkou intenzitu absorpčních pásů ( $\epsilon \sim 10\text{--}200$  pro jednoelektronové přechody,  $\epsilon < 10$  pro dvouelektronové přechody) [3, 30].

#### **2. Charge-transfer přechody**

Charge-transfer přechody probíhají u dvojic látek, z nichž jedna se chová jako donor a druhá jako akceptor elektronů. Mezi donorem  $D$  a akceptorem  $A$  dochází k přenosu elektronu z jedné části molekuly na druhou za vzniku donor-akceptorového komplexu  $D-A$ . Jestliže donor-akceptorový komplex absorbuje světelné záření, tak se v jeho absorpčním spektru ukáže tzv. CT-pás (charge-transfer pás), který vznikl přechodem elektronu ze základního



vazebného  $\pi$  orbitalu nebo ne vazebného  $n$  orbitalu donoru na antivazebný orbital akceptoru  $\pi^*$ . Tento typ přechodu je energeticky méně náročný, než by tomu bylo při samostatném přechodu elektronů donoru nebo akceptoru. Stejně tak absorpční maximum CT-pásů leží v oblasti jiných vlnových délek, než by leželo absorpční maximum donoru nebo akceptoru. Z hlediska intenzity je intenzita CT přechodů mnohem vyšší (absorpční pás má hodnotu  $\varepsilon \sim 10^2-10^4$ ) než u přechodů  $d-d$  [3, 4].

### 3. Přechody v rámci ligandu

Absorpční pásy komplexů spojené s elektronovými přechody v ligandech jsou velmi intenzivní, jejich intenzita nabývá hodnot  $\varepsilon \sim 10^3-10^5$  a je závislá na povaze vazby v komplexu [3].

## 2.4.3 Instrumentace

Existuje mnoho různých typů UV/VIS spektrofotometrů lišících se použitými součástmi. Experimentální uspořádání je však stejné.

Nehledě na typ UV/VIS spektrofotometru musí každý UV/VIS spektrofotometr obsahovat: zdroj záření, monochromátor, absorbující prostředí (kyveta se vzorkem), detektor záření a výstupní či řídicí zařízení (počítač) [3, 31].

### Zdroje záření

UV/VIS spektrometry mají zdroj, který emituje elektromagnetické záření v rozsahu od 190 do 900 nm. Některé přístroje umožňují kromě viditelné a ultrafialové oblasti měřit i v blízké infračervené oblasti (NIR).

UV/VIS spektrofotometry nejčastěji disponují dvěma zdroji záření, jeden zdroj pro viditelnou oblast a druhý pro ultrafialovou oblast.

### **Zdroje záření pro viditelnou oblast**

Jako zdroj záření pro viditelnou oblast (330–900 nm) se používají wolframové nebo halogenové lampy. Nevýhodou wolframové lampy je její nižší životnost, která je způsobená vyšší pracovní teplotou wolframové cívky a následným odpařováním wolframu. Odpařený wolfram se sráží na stěně chladnější skleněné baňky a způsobí snížení vyzařované energie (pohlčí část emitovaného záření). Tento problém je řešitelný použitím halogen-wolframové žárovky. Halogen je přidán do skleněné baňky s wolframovým vláknem. Po zahřátí se začnou uvolňovat páry halogenu (jódu), který s odpařeným wolframem vytvoří jodid wolframnatý. Při styku s wolframovou cívkou se jodid wolframnatý sráží na wolframové cívce, nikoliv na jen na skleněné baňce. Tloušťka wolframové cívky proto zůstává téměř stejná a kondenzace odpařeného wolframu na skleněné baňce je značně snížena. Životnost wolfram-halogenové lampy je tedy zhruba dvojnásobně vyšší, než tomu je u žárovky wolframové [18, 19, 23].

### **Zdroje záření pro ultrafialovou oblast**

Pro ultrafialovou oblast (pod 350 nm) jsou nejvíce používány vodíkové nebo deuteriové výbojky (viz Obr. 14). Obě výbojky emitují záření o vlnových délkách v rozsahu od 160 do 375 nm. Obě žárovky obsahují wolframovou cívku, která je upevněna na tenkostěnnou křemennou výbojku a je používána jako kladná elektroda – anoda. Jako záporná elektroda – katoda slouží dvojité wolframové cívka, která je namontována bočně. Baňka je naplněna vodíkem nebo deuteriem při nízkém tlaku (cca 10 Torr). Výboje mezi anodou a katodou jsou omezovány prostřednictvím kovu s vysokým bodem tání (molybden), ve kterém je malý průřez (1 mm<sup>2</sup>). Omezením výboje dochází ke zlepšení výnosu záření [8, 18, 19, 32].



**Obr. 14. Deuteriová lampa.**

Převzato dne 16. 2. 2016 z WWW: <http://www.spectralproducts.com/files/attach/images/190/190/41af6ce37f45e9267d13cdfb68fba8ba.jpg>

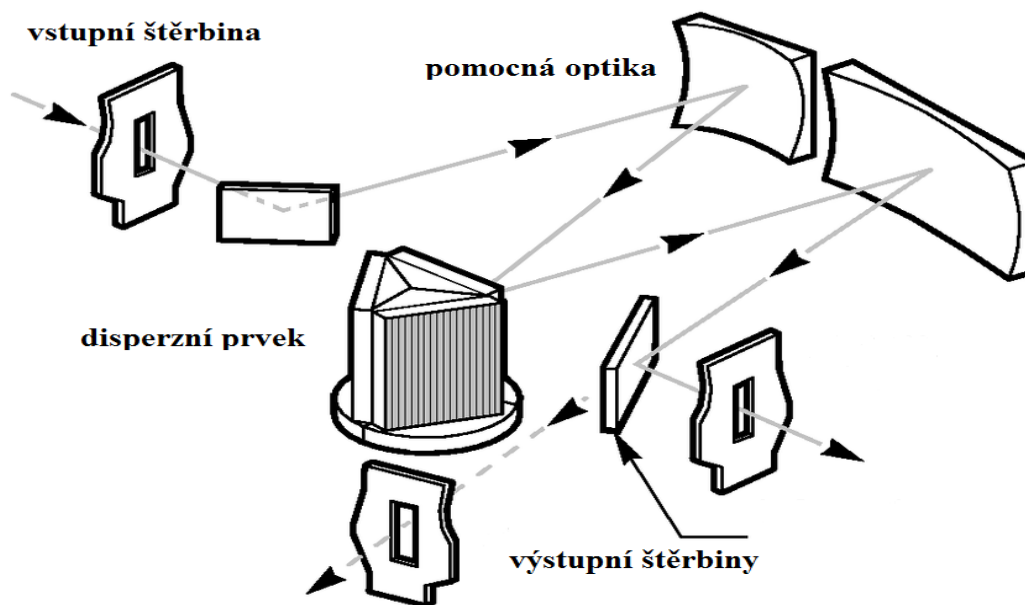
### **Zdroj záření pro viditelnou a ultrafialovou oblast**

Celé kontinuum záření od ultrafialové oblasti do blízké infračervené oblasti jsou schopny emitovat xenonové výbojky (180–2500 nm). Tyto výbojky poskytují vysoký výkon záření, vyrábí se od výkonu 75 W až po několik kW. Pro svůj vysoký výkon záření bývají využívány ve fluorescenční a luminiscenční spektroskopii. Takové výbojky obsahují křemennou baňku, který je naplněna xenonem při vysokém tlaku. Tlak uvnitř baňky ještě roste při provozu výbojky, a proto je tloušťka křemenné baňky větší, než je tomu u deuteriových či vodíkových výbojek. Výhodou xenonových výbojek je, že nevyžadují čas pro zahřátí lampy před samotným měřením, což bývá u deuteriových lamp zhruba 1–2 hodiny, a dosahují plného výkonu ihned po zapnutí. Tato jejich přednost je však kompenzována jejich vyšší cenou [18, 19, 32].

### **Monochromátor**

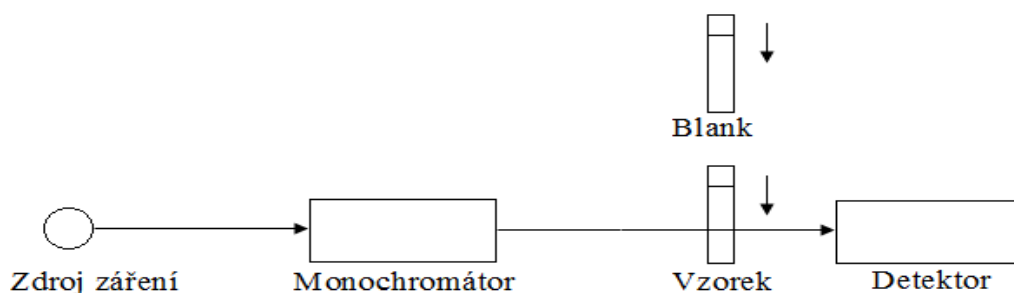
Monochromátor je optické zařízení, které slouží k vymezení určité spektrální části a pomocí monochromátoru se z polychromatického záření získá záření o jedné vlnové délce.

Monochromátor se skládá ze vstupní a výstupní štěrbiny, z disperzního prvku (mřížka, hranol) a z pomocné optiky (čočka, zrcadla). Polohu štěrbiny nelze změnit, požadované vlnové délky je dosaženo otáčením disperzního prvku. K rozkladu světla se používá mřížka nebo hranol, častěji bývá ve spektrometrech užívána mřížka kvůli lepší rozlišovací schopnosti. Schéma monochromátoru je uvedené na Obr. 15.

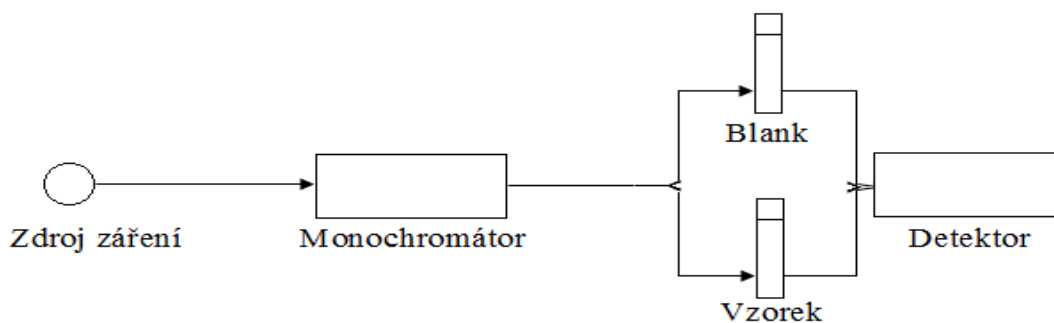


**Obr. 15. Schéma monochromátoru.** Převzato dne 12. 4. 2016 z WWW:<  
<http://search.newport.com/?x2=sku&q2=CS260-RG-2-FH-A>> a upraveno z důvodu nutnosti popisu  
obrázku v českém jazyce.

Spektrofotometry lze rozdělit na dvoupraskové a jednoppraskové podle toho, kolik monochromátorů obsahují. Jednoppraskové přístroje mají jeden monochromátor a dvoupraskové dva. Výhodou dvoupraskových přístrojů je přítomnost děliče paprsků, pomocí něhož se světlo rozdělí do dvou paprsků od sebe vzdálených 10–15 cm. Jeden paprsek prochází kyvetou srovnávací (referenční, blank) obsahující pouze rozpouštědlo nebo vzduch a druhý paprsek prochází kyvetou se vzorkem rozpuštěným v odpovídajícím rozpouštědle. U jednoppraskových spektrofotometrů je nutné změřit nejprve referenční vzorek (blank) a poté teprve změřit zkoumané vzorky [3, 18, 19, 31]. Získaná spektra je pak nutné matematicky odečíst. Schéma základních částí jednoppraskového spektrofotometru je uvedeno na Obr. 16, schéma dvoupraskového je na Obr. 17.



Obr. 16. Schéma základních částí jednopaprskového spektrofotometru



Obr. 17. Schéma základních částí dvouprskového spektrofotometru

### Pomocná optika

Mezi pomocnou optiku se řadí zrcadla, čočky a clony. Zrcadla se rozlišují na rovinná a kulová. Větší využití v UV/VIS spektrometrii mají zrcadla rovinná. Zrcadla slouží k odražení světelného toku záření – paprsku. Funkci zaostřování světelného záření plní další část pomocné optiky – čočky. K usměrnění, vymezení a odstínění svazku paprsků slouží clony [3, 19, 31].

### Absorbující prostředí – nádoby vhodné k měření

Absorbujícím prostředím je kyveta se vzorkem. Kyvety se rozlišují podle velikosti na makro-kyvety, semimikro-kyvety, mikro-kyvety, ultramikro-kyvety. Dále se kyvety

rozlišují podle délky optické dráhy a v neposlední řadě se rozlišují podle typu materiálu, z kterého jsou kyvety vyrobené na skleněné, plastové a křemenné. Kyvety mohou být vyrobené z obyčejného skla (draselno-sodného) nebo z plastu (akrylátu). Akrylátové kyvety jsou postačující pro měření ve viditelné oblasti, avšak jsou nevhodné pro měření v ultrafialové oblasti kvůli materiálu, z nichž jsou vyrobeny. Obyčejné sklo a akrylát absorbují záření v ultrafialové oblasti. Kyvety vhodné pro měření jak v ultrafialové tak ve viditelné oblasti jsou kyvety křemenné a speciální plastové [19, 32].

Dále se kyvety dají rozdělit podle doby životnosti na kyvety na jedno použití a na kyvety, které lze po důkladném omytí a oschnutí opětovně použít. Pro čištění kyvet se doporučuje použít detergentní přípravek, omytí vodou a případně použít chromsírovou směs [19, 32]. Pro běžné čištění je však dostačující omýt skleněné kyvety detergentním přípravkem a opláchnout acetonem, u plastových kyvet se na čištění používá detergentní přípravek a opláchnutí kyvet ethanolem.

### **Detektory**

Detektory jsou zařízení sloužící ke sledování paprsku záření, které prošlo kyvetou. Principem detektorů je přeměna energie světelného záření dopadající na detektor na elektrický signál. Detektory využívané ve spektrofotometrii jsou fotodiody, fotočlánky, fotonásobiče, detektory CCD (charge-coupled device), soustavy fotodiod (photodiode arrays) [3, 19, 43].

Mezi nejvíce používané detektory v UV/VIS spektrometrii patří fotodioda křemíková, která pracuje v rozsahu vlnových délek od 350 nm do 1100 nm. Z fotonásobičů jsou nejvíce využívané fotonásobiče používající fotokatodu tvořenou indiem, galiem či arsenem. Dokonalejší způsob sledování světelného záření zajišťují detektory s diodovým polem (Obr. 18) tzv. photodiode arrays, v tomto případě je signál detekovaný řadou citlivých fotodiod [3, 23].



**Obr. 18. Detektor s diodovým polem.** Převzato s laskavým svolením Hamamatsu Photonics K. K dne 31. 3. 2016 z WWW: < <http://www.hamamatsu.com/jp/en/product/alpha/P/4105/S4111-46Q/index.html>>

#### **2.4.4 Využití spektrofotometrie**

UV/VIS spektrofotometrie nachází své využití v kvantitativní i v kvalitativní analýze. Touto metodou lze analyzovat látky anorganické i organické. Analýza pomocí UV/VIS spektrofotometrie se užívá především v lékařství, v biochemii, v klinickém testování léčiv, v potravinářství při kontrole jakosti či v ekologii při kontrole látek přítomných v životním prostředí. Výhodou spektrofotometrie oproti jiným analytickým metodám je snadnost, rychlost, dostatečná citlivost měření a nízká finanční nákladnost. To se týká přístrojů pro běžná použití v akreditovaných laboratořích, kde se pořizovací cena přístroje s příslušenstvím pohybuje od 200 do 700tis. korun. Více je tato metoda využívána pro kvantitativní analýzu. Kvalitativní analýza není obvykle jednoznačná a k identifikaci látek je nutné použít ještě další metody (IČ, NMR, hmotnostní spektroskopie) [3, 8, 31, 32].

#### **Kvalitativní analýza**

Poloha a výška absorpčních pásů závisí na elektronových přechodech dané látky při absorpci záření. Absorpční pásy jsou ovlivněny jak strukturou látky, tak použitým

rozpouštědlem. Kvalitativní analýza spočívá ve změření absorpčního spektra zkoumané látky a následného porovnání tohoto spektra s knihovnou absorpčních spekter čistých látek. Této metody se využívá především při posuzování čistoty různých organických látek. Pro jednoznačnou identifikaci látek není UV/VIS spektrofotometrie dostačující, protože analyzovaná látka se většinou objevuje ve směsích, které ovlivňují absorpční spektrum. Získané spektrum však napoví řadu informací o charakteru struktury zkoumané látky a poté lze vhodně zvolenou metodou jednoznačně zkoumanou látku stanovit [3, 34].

### **Kvantitativní analýza**

Největší využití má UV/VIS spektrofotometrie pro kvantitativní analýzu – stanovení látek při platnosti Lambertova–Beerova zákona. V kapitole 2.4.1 byl již tento zákon diskutován. Zákon platí pro zředěné roztoky do koncentrací  $10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>. Pro stanovení koncentrace analyzované látky se využívá především metody kalibrační křivky nebo metody standardního přídatku.

### **Metoda kalibrační křivky**

Metoda kalibrační křivka představuje universální způsob stanovení koncentrace analytu. Tato metoda je poměrně časově náročná, protože pro vytvoření kalibrační závislosti je nutné připravit dostatečný počet standardních roztoků (roztoků o známé koncentraci). Pro tvorbu kalibrační křivky je potřebné změřit absorpční spektrum analyzované látky, ze kterého lze vyčíst hodnotu absorpčního maxima (vlnová délka v nm) či určit jinou vlnovou délku, která je pro měření absorbance vhodná. Z hodnot absorbancí získaných změřením standardních roztoků je sestavena kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci analytu při zvolené vlnové délce. Mnohé spektrofotometry jsou schopné kalibrační křivku vytvořit pomocí zadaného regresního modelu i s výpočtem regresního koeficientu. Regresní koeficient (někdy nazýván jako index spolehlivosti) značí míru odchylek od kalibrační závislosti. Pokud některý ze standardů (standardních roztoků) vykazuje vysokou míru odchylky, je vhodné tento standard



eliminovat. Spektrofotometry, které jsou schopny vytvořit kalibrační závislost s regresním koeficientem, většinou disponují funkcí deaktivace odlehlých standardů. Teprve po sestavení kalibrační závislosti s regresním koeficientem blízcím se hodnotě 1,0 (vysoký index spolehlivosti) je možné přejít k měření vzorků obsahujících daný analyt. Ze získané hodnoty absorbance se na kalibrační křivce odečte odpovídající koncentrace analytu ve vzorku [3].

### **Metoda standardního přídatku**

Metoda standardního přídatku je vhodná v případě, kdy kromě stanovovaného analytu absorbuje záření i některá další část vzorku. Při stanovení se postupuje tak, že se připraví sada odměrných baněk, do každé baňky je odměřen vždy stejný objem analyzovaného roztoku. Do první baňky se roztok standardu nepřidává, ale do dalších baněk se přidávají objemy roztoku standardu tak, aby jejich přidávané objemy tvořily aritmetickou řadu. Odměrné baňky jsou doplněny po rysku rozpouštědlem a u takto připravených standardů je změřena jejich absorbance. Koncentrace analyzované látky ve vzorku se vypočítá za použití vztahu uvedenou rovnicí 18 [3].

$$\frac{c_x}{c_s} = \frac{A_x}{A_s} \quad 18$$

Kde:  $c_x$  = koncentrace analytu,  $c_s$  = koncentrace standardu,  $A_x$  = absorbance analytu,  $A_s$  = absorbance standardu.

Různé typy a využití spektrofotometrických stanovení jsou uvedena dále.

### **Jednosložková analýza**

- **Spektrofotometrické stanovení kovů pomocí komplexotvorných činidel**

Kationty kovů, které neabsorbují světlo ve viditelné oblasti, nebo ho absorbují velmi málo, lze převést na tzv. silně barevné sloučeniny pomocí komplexotvorných činidel. Jako silně barevné sloučeniny se označují barevné sloučeniny, jejichž absorpční pásy mají extinkční koeficient větší než  $10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Mezi vhodné komplexotvorné látky patří difenylthiokarbazon,

1-(2-pyridylazo)-2-naftol, 8-hydroxychinolin, formaldoxim, 1,10-fenantrolin, 2,2'-bipyridyl, *N*-benzoyl-*N*-fenylhydroxylamin, morin a thiokyanatý ion. Komplexotvorná činidla mohou tvořit komplexy s velkým množstvím kovů, nejsou tedy selektivní, natož specifická. Selektivita barevných reakcí závisí na zvoleném reakčním činidle, oxidačním čísle kovu, na hodnotě pH a především na konstantě stability vznikajícího komplexu. Pomocí vhodně zvolených podmínek jsou ze vzorku vyloučeny prvky (látky), které nejsou schopny tvořit s činidlem komplex. A za využití tzv. maskovacích činidel jsou eliminovány další nežádoucí prvky, které vytvoří komplex s maskovacím činidlem, a tento komplex už není schopen dále reagovat s použitým komplexotvorným činidlem. Azobarviva, reprezentující organické sloučeniny, jsou početnou složkou látek schopných tvořit komplexy s ionty kovů. Takový komplex může být poté extrahován vhodným organickým rozpouštědlem a vzniklý extrakt je použit pro spektrofotometrické měření. Tímto se zabývá extrakční spektrofotometrie. Některé nízko-rozpustné ionty asociované s barvivem nemohou být extrahovány organickým rozpouštědlem s nízkou dielektrickou konstantou, protože se srážejí na vločky. Rozpouštědlo a vodný roztok lze oddělit dekantací nebo filtrací a sraženinu poté rozpustit. K rozpouštění sraženiny se obvykle používá aceton nebo alkohol. Tento postup popisuje flotační spektrofotometrii [18, 35, 36].

- **Spektrofotometrické stanovení aniontů**

Anionty je možné stanovit pomocí metody, která se taktéž zaměřuje na přeměnu aniontů pomocí vhodných reakcí do formy konečného barevného sledovatelného produktu. Stanovení bromidů a jodidů tvoří výjimku, protože jejich koncentrace může být stanovena přímo v organickém rozpouštědle po oxidaci bromidových resp. jodidových iontů na brom a jód. Ostatní anionty lze stanovit nepřímou metodou, kdy jsou anionty převedeny na málo rozpustné sraženiny. Vzniklý barevný koloidní roztok lze poté spektrofotometricky analyzovat [18, 36].

- **Spektrofotometrická analýza vody**

Při analýze vody se stanovují některé prvky či ionty ve vodě. Existuje mnoho metod pro fotometrické stanovení prvků, aniontů a kationtů ve vodě. Některé firmy distribuující spektrofotometry nabízejí možnost dokoupení tzv. ready-to-use kits. Ready-to-use kits jsou soupravy obsahující činidla pro fotometrické stanovení látek. Výhodou jejich použití je, že některé spektrometry mají v softwaru předprogramované metody a kalibrační křivky pro daná stanovení za využití právě těchto činidel, což urychlí celý proces stanovení [18, 37].

- **Spektrofotometrické stanovení organických látek**

Organické látky, které ve své struktuře obsahují chromofory (seskupení atomů, které absorbují elektromagnetické záření) absorbují elektromagnetické záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. Obvykle jsou známa katalogizovaná absorpční spektra organických látek, ale velká pozornost se musí věnovat použitému rozpouštědлу a hodnotě pH. Obtížnost identifikace jedné organické látky spočívá v přítomnosti i dalších látek v analyzovaném vzorku. Absorpční spektra složek se mohou překrývat a není možné určit koncentraci daného analytu podle Lambertova–Beerova zákona. V tomto případě je prováděno rozdělení směsi na složky nebo je prováděno stanovení látky pomocí vícesložkové analýzy. To však lze uskutečnit v případě, pokud jsou známa absorpční spektra každé jednotlivé složky ve vzorku. Situace je ještě ztížena, pokud jedna z organických složek má nízkou hodnotu extinkčního koeficientu nebo pokud se absorpční maximum analytu nachází v oblasti pod 300 nm. Nízkou hodnotu extinkčního koeficientu mají např. ketony, aldehydy, karboxylové kyseliny a její deriváty. V případě, kdy se absorpční maximum látky nachází v oblasti pod 300 nm, se využívá bathochromního posunu, což je posun absorpčního maxima k delším vlnovým délkám vhodnou modifikací molekuly [18].

- **Spektrofotometrická analýza enzymů a enzymová kinetika**

Enzymatická analýza je využívána v analýze potravin a v biochemické analýze. Mnohé firmy vyrábějící spektrofotometry přidaly do softwarů dodávaných k přístrojům zařízení a software pro měření enzymové kinetiky. S využitím znalosti reakční a enzymové kinetiky a s využitím Lambertova–Beerova zákona lze stanovit koncentraci reagující látky nebo aktivitu enzymu [18]. Fotometrická detekce nárůstu koncentrace absorbujících produktů reakce či úbytku koncentrace absorbujících reaktantů je vhodnou metodou i pro sledování průběhu řady dalších chemických reakcí. Z měření je možné vypočítat rychlostní konstantu reakce. Měření se provádí za použití termostatu, pokud je přístroj vybaven modulem pro jeho připojení a temperování kyvet.

### Vícesložková analýza

- **Vícesložková analýza využívající lineárních rovnic**

Jestliže se analyzovaná látka nachází v analyzovaném vzorku s dalšími látkami, které mají absorpční maximum ve stejné oblasti vlnových délek, je jejich výsledná absorbance při zvolené vlnové délce součtem absorbancí těchto látek. Tuto skutečnost lze vyjádřit rovnicí 19.

$$A_i = (\varepsilon_{i1} c_1 + \varepsilon_{i2} c_2 + \varepsilon_{i3} c_3 + \dots) d \quad 19$$
$$= d \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ij} c_j$$

Kde  $A$  = absorbance,  $\varepsilon$  = extinkční koeficient,  $d$  = tloušťka kyvety,  $i$  = index označující příslušnou vlnovou délku,  $j$  = index označující příslušnou látku ( $j$  nabývá hodnot od 1 do  $n$ ).

Aby bylo možné určit koncentrace látek ve směsi, je nutné změřit absorbanci analyzovaného vzorku při vhodně zvolených vlnových délkách. Vlnové délky jsou voleny podle absorpčních maxim jednotlivých složek ve směsi. Poté následuje zjištění extinkčních koeficientů roztoků čistých jednotlivých složek ve směsi při vhodných vlnových délkách. Tímto postupem se získá soustava

lineárních rovnic a jejím vyřešením jsou stanoveny koncentrace jednotlivých analytů ve směsi [18].

- **Vícesložková analýza využívající derivaci experimentální křivky**

Vícesložková analýza využívající derivaci experimentální křivky je také známá pod pojmem derivační spektrofotometrie. Tato metoda se používá ke zvýraznění překrývajících se absorpčních pásů. Pro kvantitativní analýzu platí, jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, Lambertův–Beerův zákon (viz rovnice 20), který je ovšem derivován podle vlnové délky. První derivací Lambertova–Beerova zákona se získá matematický vztah ve tvaru, který je uvedený rovnicí 21.

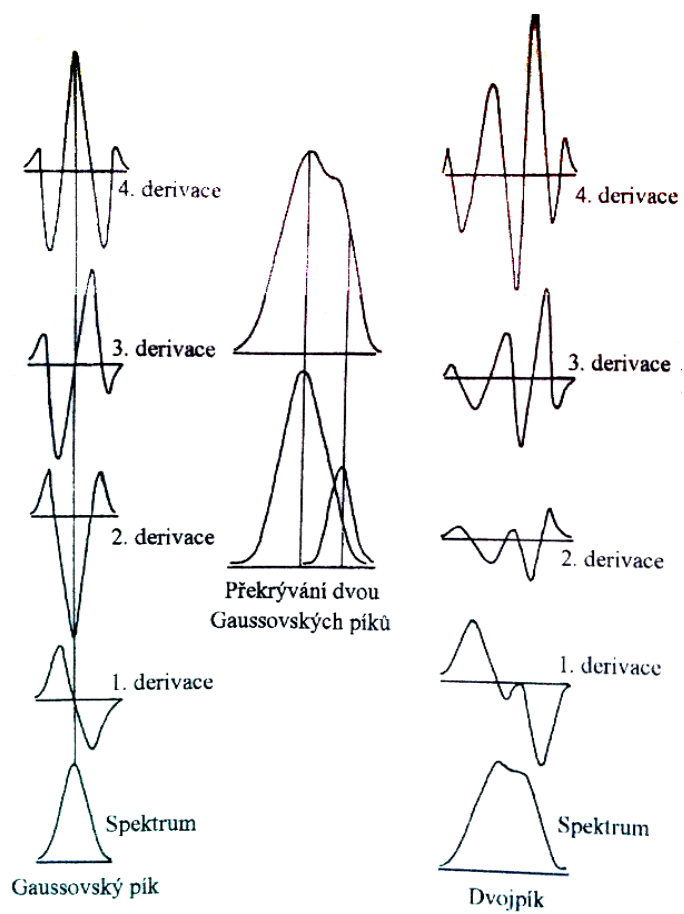
$$A = \varepsilon * c * d \quad 20$$

Kde:  $A$  = absorbance,  $\varepsilon$  = molární absorpční (extinkční) koeficient,  $c$  = látková koncentrace,  $d$  = délka kyvety.

$$\frac{dA}{d\lambda} = c d \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad 21$$

Kde:  $A$  = absorbance,  $\lambda$  = vlnová délka,  $c$  = koncentrace,  $d$  = tloušťka kyvety,  $\varepsilon$  = extinkční koeficient.

K získání přístupnějšího spektra je možno vztah derivovat vícestupňově. Na Obr. 19 je znázorněno, jak vypadá Gaussovský pík a pík překrývajícího se spektra po jeho zderivování. Derivovat lze nejen podle vlnové délky, ale i podle jiných derivačních členů (např. podle času) [3, 18].



Obr. 19. Gaussovský pík a dvojpík po zderivování. Převzato dne 8. 4. 2016 z [3].

### **3 Cíl práce**

Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout postup pro kvantitativní a kvalitativní spektrofotometrickou analýzu vhodných látek a pro tyto analýzy vypracovat metodiku. Výstupem tedy měly být konkrétní detailní návody pro práci v laboratorních cvičeních určené posluchačům Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze oboru chemie. Metodika měla být podle možností ověřena přímo posluchači v předmětu Instrumentální metody.

## **4 Experimentální část**

### **Použité přístroje, chemikálie a materiály**

#### **Použité přístroje:**

Analytik Jena SPECORD 210 PLUS (dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr s rozsahem vlnových délek od 190 do 1100 nm) dodávaný se softwarovým programem WinASPECT PLUS

Analytická váha KERN ABT 220-5DM

#### **Použité chemikálie:**

Acetonitril čistý – Avondale Laboratories

Hydroxid sodný – Lachner

Chlorid sodný – Lachner

Chloroform čistý – Lachner

Ibuprofen – Spolana Neratovice, teplota tání 70 – 73 °C

Kofein – neznámý (zakoupen od Kutilov.cz <http://www.kutilov.cz/>), teplota tání 203 – 205 °C

Methanol p.a. – Lachema, n.p. Brno

Modrá skalice – Lachema, n.p. Brno

#### **Použité materiály:**

černý čaj, mletá zrnková káva



## 4.1 Úloha č. 1 – spektrofotometrické stanovení koncentrace kofeinu ve vzorku.

### 4.1.1 Příprava zásobního roztoku a roztoků kalibračních

Zásobní roztok byl připraven navážením 10 mg kofeinu, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky (100ml) a po rysku doplněn směsí MeOH/voda 1:1.

Kalibrační roztoky o koncentracích 50,0 mg/l, 42,5 mg/l, 35,0 mg/l, 25 mg/l, 12,5 mg/l, a 5 mg/l byly připraveny ředěním zásobního roztoku (100 mg/l) rozpouštědlem (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1). V tabulce 1 jsou uvedené objemy zásobního roztoku a objemy rozpouštědla, které byly použity na přípravu kalibračních roztoků (standardů) o výše uvedených koncentracích. Roztoky byly připraveny přímo do kyvet určených pro UV/VIS spektrofotometrii.

**Tabulka 1.** Ředění kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)

<b>Kalibrační roztok č.</b>	<b>Koncentrace kofeinu [mg/l]</b>	<b>V<sub>zásobní roztok</sub> [μl]</b>	<b>V<sub>rozpouštědlo</sub> [μl]</b>
<b>Standard 1</b>	50,0	1000	1000
<b>Standard 2</b>	42,5	850	1150
<b>Standard 3</b>	35,0	700	1300
<b>Standard 4</b>	25,0	500	1500
<b>Standard 5</b>	12,5	250	1750
<b>Standard 6</b>	5,0	100	1900

*Zásobní roztok kofeinu 100 mg /l, rozpouštědlo MeOH/voda 1:1.*

#### **4.1.2 Příprava vzorku – roztoku kofeinu**

První vzorek (**NZ1**) byl připraven navážením 0,45 mg čistého kofeinu a jeho rozpuštěním ve směsi (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 : 1) na celkový objem 25 ml. Koncentrace takto připraveného roztoku byla 18,0 mg/l.

Druhý roztok (**NZ2**) byl připraven navážením 0,75 mg čistého kofeinu a jeho rozpuštěním ve směsi (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 : 1) na celkový objem 25 ml. Koncentrace takto připraveného roztoku byla 30,0 mg/l.

Tyto vzorky sloužící k ověření správnosti řešení úlohy byly rovněž použity jako vzorky o neznámé koncentraci kofeinu pro studenty.

#### **4.1.3 Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka**

Do první pozice autosampleru spektrofotometru byla vložena kyveta obsahující 2 ml rozpouštědla a do dalších pozic autosampleru byly vloženy kyvety s připravenými kalibračními roztoky. Absorpční spektrum bylo vytvořeno změřením absorbance standardu č. 1 v oblasti spektra s rozsahem vlnových délek od 190 do 1100 nm. Při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu byly změřeny absorbance všech standardů a byla vytvořena kalibrační křivka. Absorpční maximum bylo nalezeno při 275 nm.

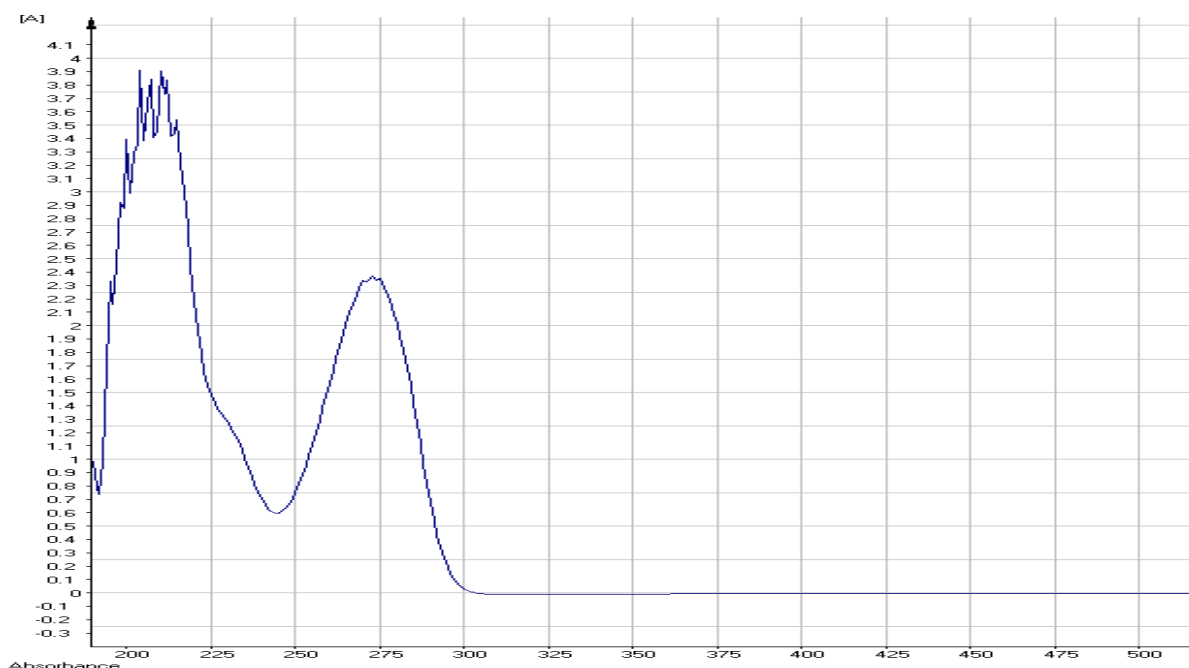
#### **4.1.4 Stanovení koncentrace kofeinu ve vzorku**

Do první pozice autosampleru byl umístěn referenční vzorek (blank) a do druhé pozice autosampleru spektrofotometru byla vložena kyveta obsahující neznámý vzorek. Poté byla změřena jeho absorbance při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu a s využitím vytvořené kalibrační křivky byla určena jeho koncentrace.

#### 4.1.5 Ověření a komentář k úloze

Úloha byla několikrát ověřována. Níže jsou uvedené výsledky ze dvou mnou prováděných stanovení. Při prvním i druhém stanovení byly použity stejné koncentrace zásobního roztoku (100 mg/l) i stejné koncentrace standardů (50,0 mg/l, 42,5 mg/l, 35,0 mg/l, 25,0 mg/l, 12,5 mg/l, 5,0 mg/l). Na ověření správnosti postupu využívajícího metodu kalibrační křivky byly připraveny vzorky o známé koncentraci podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2. Na tyto vzorky se pohlíželo jako na vzorky o koncentraci neznámé.

Absorpční maximum bylo nalezeno při 275,0 nm. Na Obr. 20 je absorpční spektrum kofeinu zpracované v programu WinAspectPlus.



**Obr. 20. Absorpční spektrum kofeinu Standardu 1.** Koncentrace kofeinu Standardu 1. byla 50,0 mg/l, použitým rozpouštědlem byl: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 : 1.

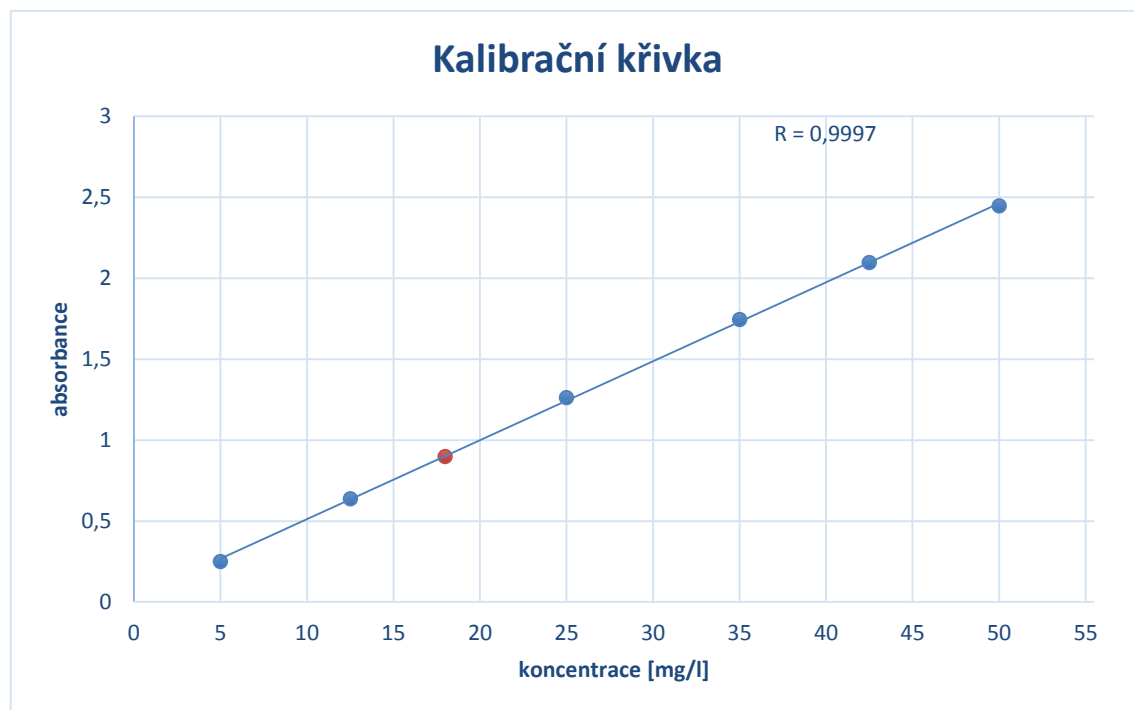
V tabulce 2. jsou uvedeny koncentrace a absorpance kalibračních roztoků z prvního i druhého stanovení a regresní koeficienty stanovení.

**Tabulka 2.** Absorbance kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)

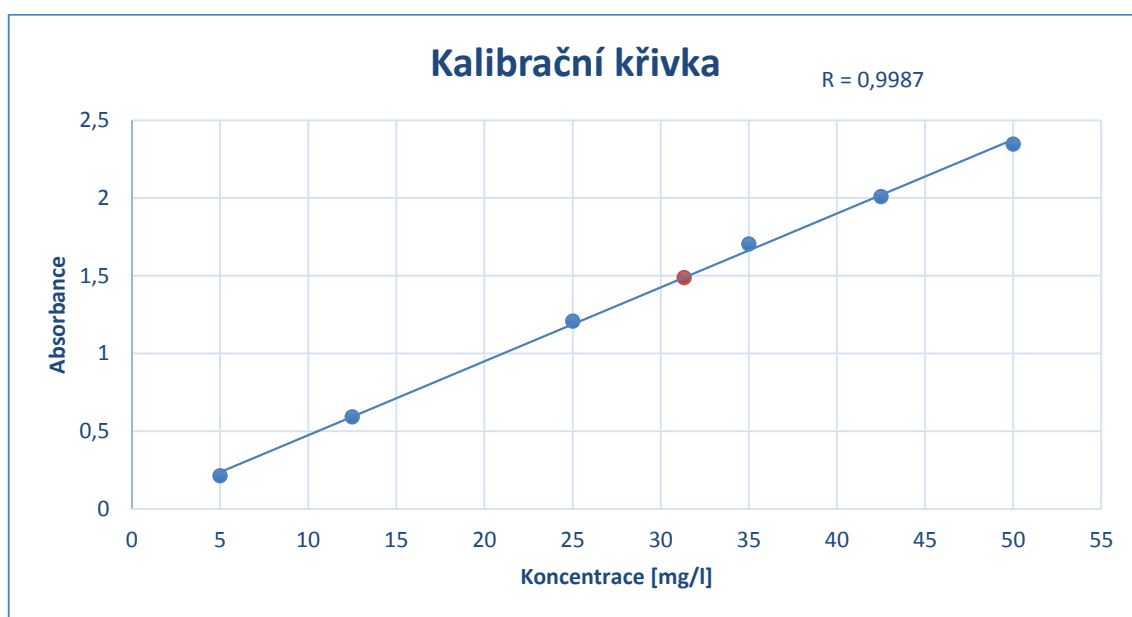
Kalibrační roztok	Koncentrace kofeinu [mg/l]	Absorbance první stanovení	Absorbance druhé stanovení
Standard 1	50,0	2,4474	2,3473
Standard 2	42,5	2,0963	2,0097
Standard 3	35,0	1,7442	1,7042
Standard 4	25,0	1,2616	1,2081
Standard 5	12,5	0,6385	0,5929
Standard 6	5,0	0,2495	0,2132

Rozpouštědlo MeOH/voda 1:1. Regresní koeficient u prvního stanovení  $R_1 = 0,9987$ , u druhého stanovení  $R_2 = 0,9997$ .

Těž přikládám obrázky kalibračních křivek (Obr. 21 a Obr. 22) Modrou barvou jsou vyznačeny body, znázorňující naměřenou hodnotu absorbance u kalibračních roztoků. Bod, jenž je znázorněn červenou barvou, označuje roztok o „neznámé“ koncentraci.



**Obr. 21.** Kalibrační křivka kofeinu z prvního stanovení.



*Obr. 22. Kalibrační křivka kofeinu z druhého stanovení.*

**Tabulka 3.** Porovnání koncentrací připravených a nalezených u NZ1 a NZ2.

Stanovení č.	Připravená koncentrace NZ1	Nalezená koncentrace NZ2	Hodnota regresního koeficientu
Stanovení č. 1.	18,00 mg/l	17,89 mg/l	R = 0,9997
Stanovení č. 2.	30,00 mg/l	31,32 mg/l	R = 0,9987

## 4.2 Úloha č. 2 – spektrofotometrické stanovení koncentrace kofeinu (teinu) ve výluzích mleté kávy a černého čaje.

### 4.2.1 Příprava zásobního roztoku a roztoků kalibračních

Zásobní roztok i roztoky kalibrační byly připraveny stejným způsobem, jaký je uvedený v kapitole 4.1.1.

## 4.2.2 Příprava vzorků černého čaje a kávy

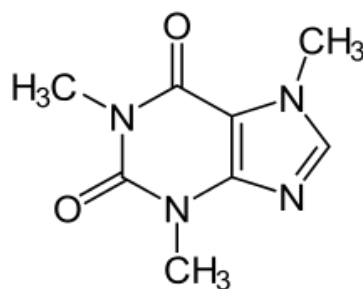
Na analytických vahách bylo odváženo 1,0 g umleté zrnkové kávy a 1,0 g černého čaje. Odvážená množství umleté zrnkové kávy i čaje byla kvantitativně převedena do kádinky a přelita 50 ml vroucí destilované vody. Po pěti minutách byly směsi kávy a čaje přefiltrovány do čistých kádinek. Po úplném vychladnutí byly filtráty převedeny do odměrných baněk (100ml) a doplněny po rysku destilovanou vodou.

## 4.2.3 Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka

Postup vyhledání absorpčního maxima a sestavení kalibrační křivky byl již popsán v kapitole 4.1.3.

## 4.2.4 Stanovení koncentrace kofeinu (teinu) ve vyluzích černého čaje a mleté kávy

Do první pozice autosampleru byl umístěn referenční vzorek (blank). Do druhé pozice byla vložena kyveta obsahující 100  $\mu$ l vyluhu černého čaje a 1900  $\mu$ l rozpouštědla (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 : 1). Bylo změřeno jeho absorpční spektrum, a poté pomocí předem sestavené kalibrační křivky (viz 4.1.3) byla stanovena koncentrace kofeinu **1** (teinu) ve vyluhu vzorku černého čaje (stejně jako u vzorku kofeinu o neznámé koncentraci – **NZ1**, **NZ2**). Stejným způsobem byla stanovena koncentrace kofeinu ve vyluhu mleté kávy.



**1**

#### **4.2.5 Ověření a komentář k úloze**

Nejprve bylo stanovení provedeno v neředěném výluhu černého čaje. Vzhledem k příliš vysokým hodnotám absorbance bylo nutné vzorek pro stanovení zředit. Proto bylo do kyvety odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  výluhu čaje a 1900  $\mu\text{l}$  destilované vody, a poté bylo stanovení opakováno. Hodnota absorpčního maxima byla nalezena opět při 275,0 nm, což odpovídalo absorpčnímu maximu nalezeného v případě čistého kofeinu. Stanovení hodnoty absorpčního maxima u vzorku mleté zrnkové kávy probíhalo stejným způsobem, a absorpční maximum bylo nalezeno při stejné vlnové délce, jako u vzorku mleté kávy.

Ve zředěném vzorku černého čaje bylo nalezeno 32,70 mg/l kofeinu, v zředěném vzorku kávy pak 32,90 mg/l. Po přepočítání bylo zjištěno, že výluh černého čaje obsahuje 654 mg/l kofeinu a výluh mleté kávy 659 mg/l kofeinu.

### **4.3 Úloha č. 3 – kolorimetrické a spektrofotometrické stanovení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku**

#### **4.3.1 Příprava zásobního roztoku a roztoků standardů**

Byl připraven zásobní roztok síranu měďnatého o koncentraci 100 g/l. Na přípravu tohoto roztoku bylo odváženo 31,25 g modré skalice, která byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (200ml) a po rýsku doplněna destilovanou vodou. Roztok byl před použitím přefiltrován a zbaven tak případných nerozpustných nečistot. Z tohoto roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 80 g/l, 60 g/l, 40 g/l, 20 g/l a 10 g/l. V tabulce 4 je uvedeno ředění pro jejich přípravu.

**Tabulka 4.** Ředění kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)

<b>Kalibrační roztok</b>	<b>Koncentrace CuSO<sub>4</sub> [g/l]</b>	<b>V<sub>zásobní roztok</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>rozpouštědlo</sub> [ml]</b>
<b>Standard 1</b>	80,0	8	2
<b>Standard 2</b>	60,0	6	4
<b>Standard 3</b>	40,0	4	6
<b>Standard 4</b>	20,0	2	8
<b>Standard 5</b>	10,0	1	9

*Zásobní roztok síranu měďnatého o koncentraci 100 g/l. Použité rozpouštědlo: destilovaná voda.*

#### **4.3.2 Příprava vzorku – roztoku síranu měďnatého o neznámé koncentraci**

Jako vzorek o neznámé koncentraci byl připraven roztok (Cu1) o koncentraci 30 g/l. Roztok byl připraven ředěním ze zásobního roztoku o koncentraci 100 g/l.

#### **4.3.3 Kolorimetrická stupnice a kolorimetrické stanovení koncentrace ve vzorku**

Do stojanu na zkumavky bylo vloženo 6 zkumavek. Do pěti zkumavek byly odměřeny 3 ml každého kalibračního roztoku, do poslední zkumavky pak 3 ml roztoku zásobního. Roztok o neznámé koncentraci byl poté porovnáván s kolorimetrickou stupnicí.

#### **4.3.4 Vyhledání absorpčního maxima a kalibrační křivka pro spektrofotometrické stanovení**

Absorpční maximum bylo nalezeno podle postupu, který je uveden v kapitole 4.1.3. pro práci s kofeinem. Jako referenční vzorek (blank) byla použita destilovaná voda. Hodnota absorpčního maxima byla nalezena ve viditelné oblasti spektra při vlnové délce 600 nm. Při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu byly změřeny



absorbance všech standardů (do každé kyvety byly odpipetovány 2 ml ze zásobního standardního roztoku) a z naměřených hodnot absorbance byla sestavena kalibrační křivka.

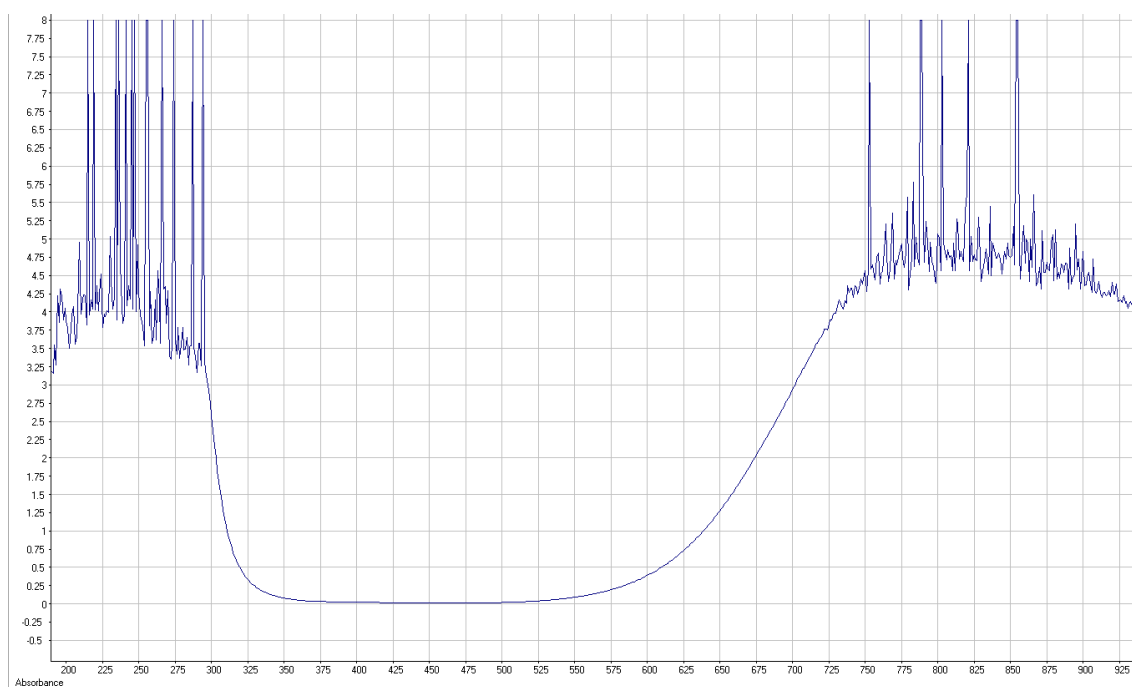
### **4.3.5 Stanovení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku**

Postup při stanovení koncentrace v neznámém vzorku byl stejný jako postup, který je popsán v kapitole 4.1.4 pro práci s kofeinem.

### **4.3.6 Ověření a komentář k úloze**

Roztok o neznámé koncentraci síranu měďnatého **Cu1** byl nejprve porovnáván s kolorimetrickou stupnicí a poté byla jeho koncentrace stanovena spektrofotometricky. Bylo zjištěno, že tento vzorek obsahuje 30,11 g/l síranu měďnatého, což zcela odpovídá koncentraci vypočítané při jeho přípravě (30 g/l). Tuto úlohu jsem ověřovala sama a následně byla zařazena jako pilotní do předmětu Instrumentální metody pro studenty bakalářského studijního programu. Níže jsou uvedené výsledky z mého stanovení.

Absorpční maximum bylo nalezeno při 600 nm. Na Obr. 23 je absorpční spektrum síranu měďnatého.



**Obr. 23. Absorpční spektrum síranu měďnatého. Použit Standard 2 o koncentraci síranu měďnatého 60 g/l, rozpouštědlo destilovaná voda.**

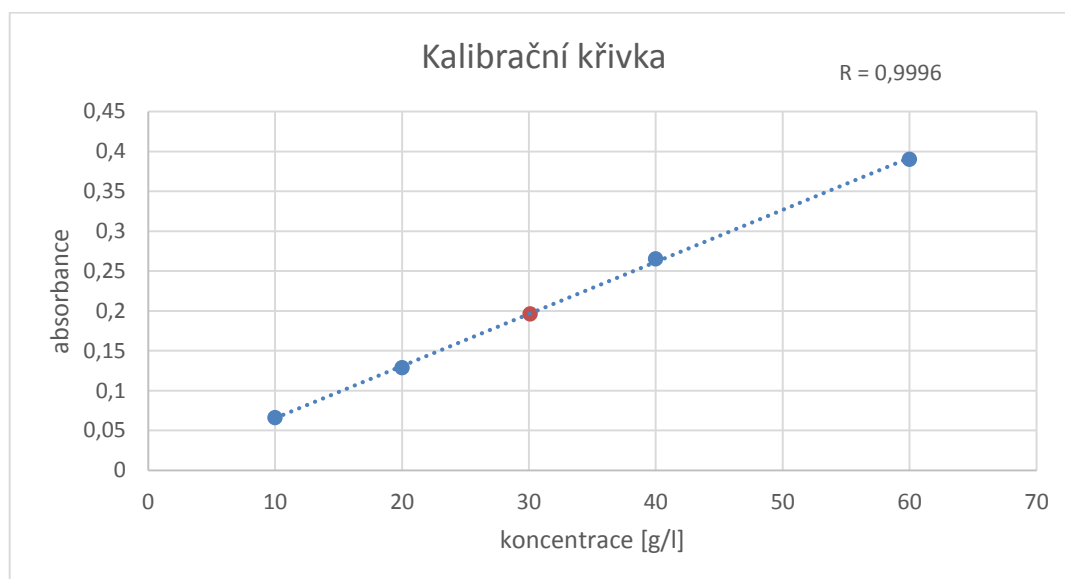
V tabulce 5 jsou uvedeny koncentrace a absorbance kalibračních roztoků.

**Tabulka 5. Absorbance kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)**

<b>Kalibrační roztok</b>	<b>Koncentrace CuSO<sub>4</sub> [g/l]</b>	<b>Absorbance</b>
<b>Standard 1</b>	80,0	0,5015
<b>Standard 2</b>	60,0	0,3904
<b>Standard 3</b>	40,0	0,2654
<b>Standard 4</b>	20,0	0,1287
<b>Standard 5</b>	10,0	0,0661

Regresní koeficient  $R = 0,9996$ .

Příložen je obrázek kalibrační křivky (Obr. 24). Modrou barvou jsou vyznačeny body, znázorňující naměřenou hodnotu absorbance u kalibračních roztoků. Červený bod označuje roztok o „neznámé“ koncentraci.

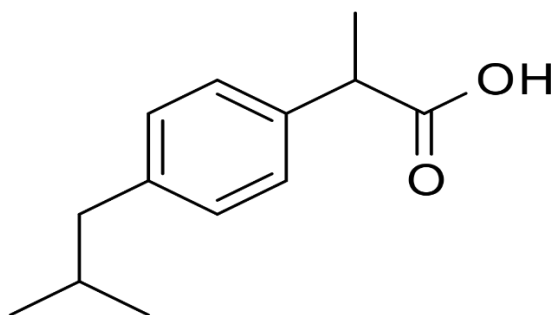


Obr. 24. Kalibrační křivka pro stanovení CuSO<sub>4</sub>.

#### 4.4 Úloha č. 4 – spektrofotometrické stanovení koncentrace ibuprofenu v tabletě Ibuprofenu a v krému Ibalginu

##### 4.4.1 Příprava zásobního roztoku a příprava kalibračních roztoků

Zásobní roztok byl připraven navážením 500 mg čistého ibuprofenu **2** a jeho rozpuštěním v methanolu na objem 100 ml. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 50 ml do 100ml odměrné baňky, a ta byla doplněna po rysku methanolem. Koncentrace takto připraveného zásobního roztoku činila 2500 mg/l. Pro sestavení kalibrační křivky bylo připraveno 6 standardů (standardních roztoků) o koncentracích 2000 mg/l, 1600 mg/l, 1000 mg/l, 800 mg/l, 400 mg/l, 200 mg/l. V tabulce 6 jsou uvedené objemy zásobního roztoku a rozpouštědla potřebné k přípravě standardů o uvedených koncentracích.



2

**Tabulka 6.** Ředění kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)

<b>Kalibrační roztok</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>V zásobní roztok [μl]</b>	<b>V rozpouštědlo [μl]</b>
<b>č.</b>	<b>ibuprofenu [mg/l]</b>		
<b>1</b>	2000	1600	400
<b>2</b>	1600	1280	720
<b>3</b>	1000	800	1200
<b>4</b>	800	640	1360
<b>5</b>	400	320	1680
<b>6</b>	200	160	1840

*Zásobní roztok ibuprofenu o koncentraci 2500 mg/l. Rozpouštědlo methanol.*

#### 4.4.2 Příprava vzorků

##### **Příprava vzorku z čistého ibuprofenu (I-1)**

Jako vzorek o neznámé koncentraci byl připraven roztok (I-1) o koncentraci 600 mg/l. Roztok byl připraven ředěním ze zásobního roztoku o koncentraci 2500 mg/l.

##### **Příprava vzorku z tablety Ibuprofenu 400 (T-1)**

Tableta ibuprofenu (400 mg) byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a rozpuštěna v methanolu. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 50 ml do 250ml

odměrné baňky a odměrná baňka byla po rysku doplněna methanolem. Takto připravený roztok měl koncentraci 800 mg/l.

#### **Příprava vzorku z krému Ibalginu (K-1)**

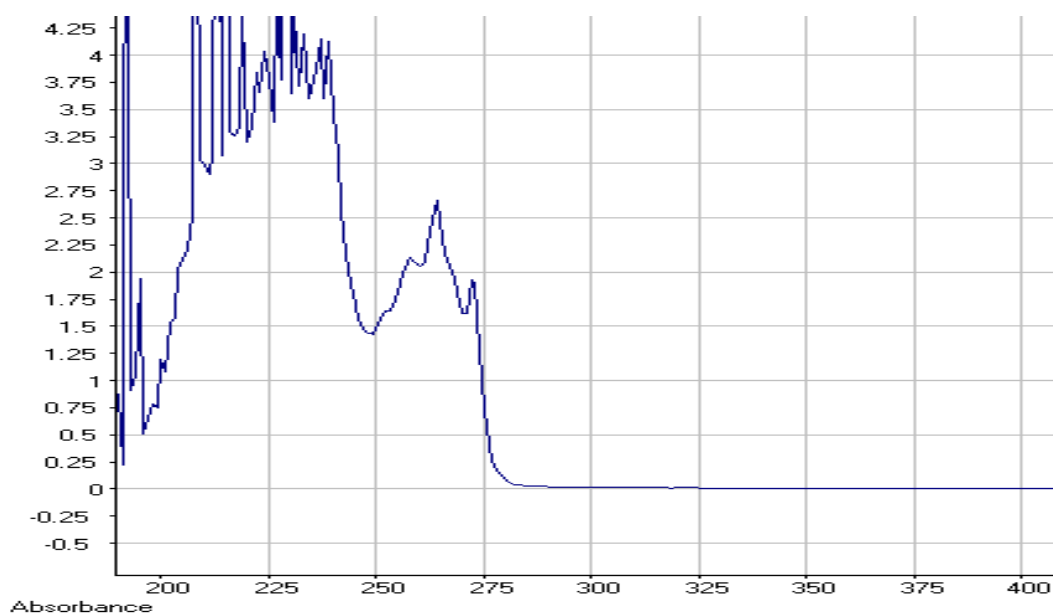
Na analytické váze bylo odváženo 1,0 g krému Ibalginu (výrobce deklaruje 5 g ibuprofenu ve 100 g krému), který byl rozpuštěn v několika mililitrech methanolu při zahřívání na vodní lázni (cca 60 °C). Po úplném rozpuštění krému byla kádinka s roztokem vložena do lednice na 10 minut a ztuhlý tuk byl odfiltrován přes obyčejný filtr. Filtrát byl v odměrné 50ml baňce doplněn po rysku methanolem. Předpokládala jsem, že takto připravený roztok měl koncentraci 1000 mg/l.

#### **4.4.3 Vyhledání absorpčního maxima kalibrační křivka**

Vyhledání absorpčního maxima a sestavení kalibrační křivky proběhlo stejným postupem, jaký uvedený v kapitole v kapitole 4.1.3. Pro vyhledání absorpčního maxima sloužil standard č. 1.

#### **4.4.4 Ověření a komentář k úloze**

Absorpční maximum bylo nalezeno při vlnové délce 264 nm. Na Obr. 25 je absorpční spektrum ibuprofenu.



**Obr. 25.** Absorpční spektrum ibuprofenu Kalibračního roztoku č. 1 (koncentrace 2000 mg/l).  
Použitým rozpouštědlem byl methanol.

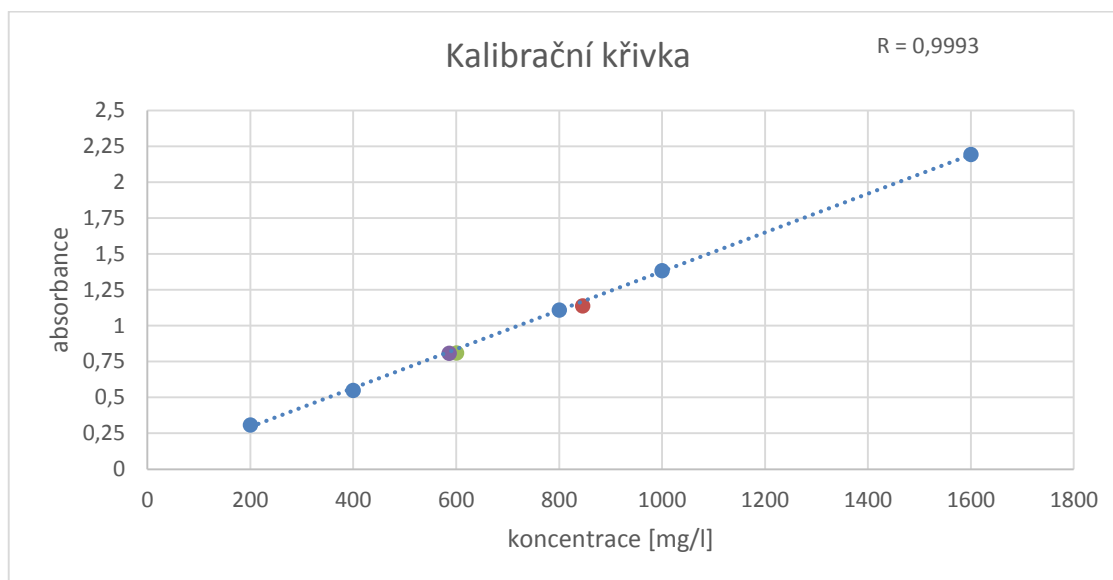
V tabulce 7 jsou uvedeny koncentrace a absorbance kalibračních roztoků.

**Tabulka 7.** Absorbance kalibračních roztoků (kontrolní materiál pro učitele)

Kalibrační roztok č.	Koncentrace ibuprofenu [mg/l]	Absorbance
1	2000	2,6213
2	1600	2,1906
3	1000	1,3824
4	800	1,1083
5	400	0,5474
6	200	0,3061

Koeficient spolehlivosti  $R = 0,9993$ .

Na Obr. 26 je kalibrační křivka, kde modrá barva znázorňuje standardy, zelená barva odpovídá vzorku **I-1**, růžovo-červená odpovídá vzorku **T-1** a fialová znázorňuje vzorek **K-1** po jeho zředění.



**Obr. 26. Kalibrační křivka ibuprofenu.**

Nejprve byla úloha ověřena pro stanovení koncentrace ibuprofenu ve vzorku **I-1**. Ve vzorku bylo naměřeno 600,45 mg/l ibuprofenu, což dobře koresponduje s vypočtenou koncentrací připraveného vzorku. V případě tablety byla zjištěna koncentrace roztoku **T-1** 845,73 mg/l, ale měla činit pouze 800 mg/l. U vzorku krému stanovovaného z připraveného roztoku, kde byla očekávána koncentrace 1000 mg/l, koncentrace vůbec nemohla být změřena, protože absorbance tohoto roztoku **K-1** byla vyšší než 3, což nevyhovuje platnosti Lambertova–Beerova zákona. Roztok byl tedy zředěn (bylo odpipetováno 250  $\mu$ l roztoku **K-1** a 1750  $\mu$ l methanolu přímo do kyvety). Měřením bylo zjištěno, že tento zředěný roztok obsahuje 586,32 mg/l ibuprofenu namísto očekávaných 125 mg/l. Ověřováním jsem tedy zjistila, že metodu kalibrační křivky lze spolehlivě použít pouze pro stanovení vzorku čistého ibuprofenu nikoliv ibuprofenu v tabletě či krému.

Kalibrační křivka sestavená z absorbancí naměřených pro roztoky čistého ibuprofenu (Obr. 26) nevykazuje žádné odchylky, její koeficient spolehlivosti je 0,9993. Z toho lze předpokládat, že správnému stanovení brání další látky přítomné v připravených

vzorcích z tablety a krému, které absorbují ve stejné oblasti. Proto jsem se rozhodla vyzkoušet pro toto stanovení metodu standardního přídatku.

Standardní roztok ibuprofenu pro metodu standardního přídatku byl připraven navážením 0,1 g čistého ibuprofenu a jeho rozpuštěním v methanolu v 25ml odměrné baňce. Absorpční maximum bylo zjišťováno ze vzorku, který byl připraven navážením 5,4 mg čistého ibuprofenu do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonitrilem. Opět byla zjištěna hodnota absorpčního maxima při 264 nm. Vzorek krému Ibalginu (**K-2**) byl připraven navážením 1,0 g krému a jeho rozpuštěním v methanolu v 50ml odměrné baňce. Dále byly připraveny 4 roztoky pro měření metodou standardního přídatku (kapitola Využití 2.4.4). V tabulce 8 jsou uvedena množství roztoku standardu a roztoku vzorku krému, který byl odpipetován do odměrných baněk. Všechny 4 odměrné 10ml baňky byly doplněny po rysku acetonitrilem. Z těchto baněk byly odpipetovány 2  $\mu$ l do kyvet a byly změřeny jejich absorbance (tabulka 8).

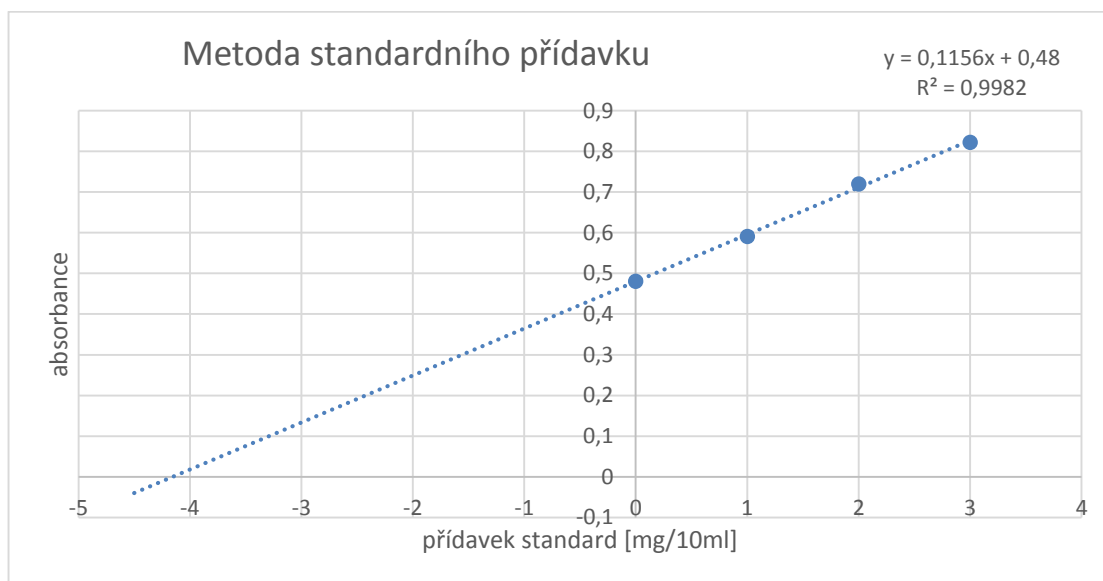
**Tabulka 8.** Příprava roztoků pro metodu standardního přídatku a jejich naměřená absorbance

<b>Baňka č.</b>	<b>V vzorek krém</b>	<b>V standard</b>	<b>Změřená absorbance</b>
1	1 ml	0 ml	0,4803
2	1 ml	0,25 ml	0,5908
3	1 ml	0,5 ml	0,7201
4	1 ml	0,75 ml	0,8226

*Standardní roztok pro ředění o koncentraci 4 g/l. Absorbance měřena při 264 nm.*

Na Obr. 27 je grafické znázornění metody standardního přídatku této úlohy.





**Obr. 27. Grafické vyjádření metody standardního přidavku.**

Z uvedených hodnot bylo zjištěno, že vzorek **K-2** obsahuje 421 mg/l ibuprofenu místo očekávaných 1000 mg/l.

Další metodou stanovení ibuprofenu v masti bylo opět stanovení metodou kalibrační křivky, ale odlišných podmínek. Ibuprofen **2** je karboxylová kyselina – kyselina 2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová, tudíž jsem se pokusila zlepšit její rozpustnost v polárních rozpouštědlech jako je voda, methanol nebo acetonitril převedením na její sůl. Připravila jsem směsný zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  a chloridu sodného o koncentraci  $1 \text{ mol/dm}^3$  v 500ml odměrné baňce. Poté jsem připravila roztok soli kyseliny ibuprofenu navážením 0,112 g ibuprofenu, jeho převedením do 50ml odměrné baňky, doplněním po rysku zásobním roztokem hydroxidu sodného a chloridu sodného. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 1,5 ml do 25ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku zásobním roztokem hydroxidu sodného a chloridu sodného. Získala jsem roztok ibuprofenové soli o koncentraci  $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ . Slepý vzorek (blank) byl připraven navážením 0,5 g vazelíny, která byla rozpuštěna v 25 ml chloroformu. Tento chloroformový roztok byl extrahován třikrát 25 ml zásobního roztoku hydroxidu sodného a chloridu sodného. Vodné podíly byly převedeny do 100ml odměrné baňky a odměrná baňka byla doplněna po rysku zásobním roztokem hydroxidu sodného a chloridu sodného. Do referenční kyvety bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  takto připraveného roztoku a 1800  $\mu\text{l}$  zásobního

roztoku hydroxidu sodného a chloridu sodného. Absorpční maximum bylo nalezeno změřením absorpce vzorku č. 6 (koncentrace ibuprofenu  $6 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>). Vzorek krému Ibalginu (**K-3**) byl připraven navážením 0,5 g krému, který byl rozpuštěn v 25 ml chloroformu, a po rozpuštění extrahován třikrát 25 ml zásobního roztoku hydroxidu sodného a chloridu sodného. Vodné podíly byly převedeny do 100ml odměrné baňky a odměrná baňka byla doplněna po rysku zásobním roztokem hydroxidu sodného a chloridu sodného. Koncentrace ibuprofenu v takto připraveném roztoku byla 25 mg/l.

Kalibrační série byla sestavena ze šesti vzorků (viz tabulka 9) a pro kalibrační křivku byla zvolena lineární regrese ve tvaru rovnice 22.

**Tabulka 9.** Objemy zásobního roztoku a objemy sodné soli ibuprofenu potřebné k přípravě kalibrační série a změřená absorbance kalibračních vzorků.

Vzorek č.	Koncentrace [mol/l]	V sodná sůl ibuprofenu [μl]	V zásobní roztok [μl]	Absorbance
1	0	0	2000	-0,1058
2	$1,2 \cdot 10^{-4}$	400	1600	-0,0477
3	$2,4 \cdot 10^{-4}$	800	1200	0,0086
4	$3,6 \cdot 10^{-4}$	1200	800	0,0548
5	$4,8 \cdot 10^{-4}$	1600	400	0,1095
6	$6,0 \cdot 10^{-4}$	2000	0	0,1895

*Roztok sodné soli ibuprofenu o koncentraci  $6,0 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Zásobní směsný roztok hydroxidu sodného a chloridu sodného o koncentraci  $c(\text{NaOH}) = 0,5$  mol/l a  $c(\text{NaCl}) = 1$  mol/l. Koeficient spolehlivosti  $R = 0,9922$ .*

$$A = X \cdot c + Y$$

22

Absorbance u kalibračních roztoků č. 1 a č. 2 byla záporná, tudíž tzn., že vzorkem bez ibuprofenu – blankem prošlo méně světla než u kalibračních roztoků. Taktéž při

změření kvivety se vzorkem masti Ibalginu došlo k chybě, neboť absorpance tohoto roztoku byl zcela mimo kalibrační přímku. Je zřejmé, že došlo k hrubé chybě – k nesprávnému upořádání pokusu, a tento postup nebyl vhodný pro kvantitativní stanovení koncentrace ibuprofenu v masti Ibalginu, Z časových důvodů jsem se již dále změně uspořádání pokusu nevěnovala, nicméně toto téma je otevřené a může být dále dopracováno tak, aby úloha mohla být zařazena do výuky.

## **4.5 Úloha č. 5 – Kvalitativní analýza neznámých vzorků.**

### **4.5.1 Příprava vzorků – standardů**

Byl připraven standardní roztok kofeinu (**SK**) o koncentraci 30 mg/l rozpuštěním čistého kofeinu v rozpouštědle (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 : 1). Standardní roztok ibuprofenu (**SI**) o koncentraci 1463 mg/l rozpuštěním čistého ibuprofen v methanolu. A standardní roztok síranu měďnatého (**SCu**) o koncentraci 43,5 g/l. rozpuštěním modré skalice ve vodě.

### **4.5.2 Příprava vzorků na kvalitativní stanovení**

Byly připraveny tři vzorky. Vzorek roztoku síranu měďnatého (**Cu1**) ve vodě o koncentraci 30 g/l, vzorek kofeinu (**K**)v rozpouštědle (methanol : destilovaná voda v poměru 1 : 1).methanolu o koncentraci 15 mg/l a vzorek ibuprofenu (**I**) v methanolu o koncentraci 720 mg/l.

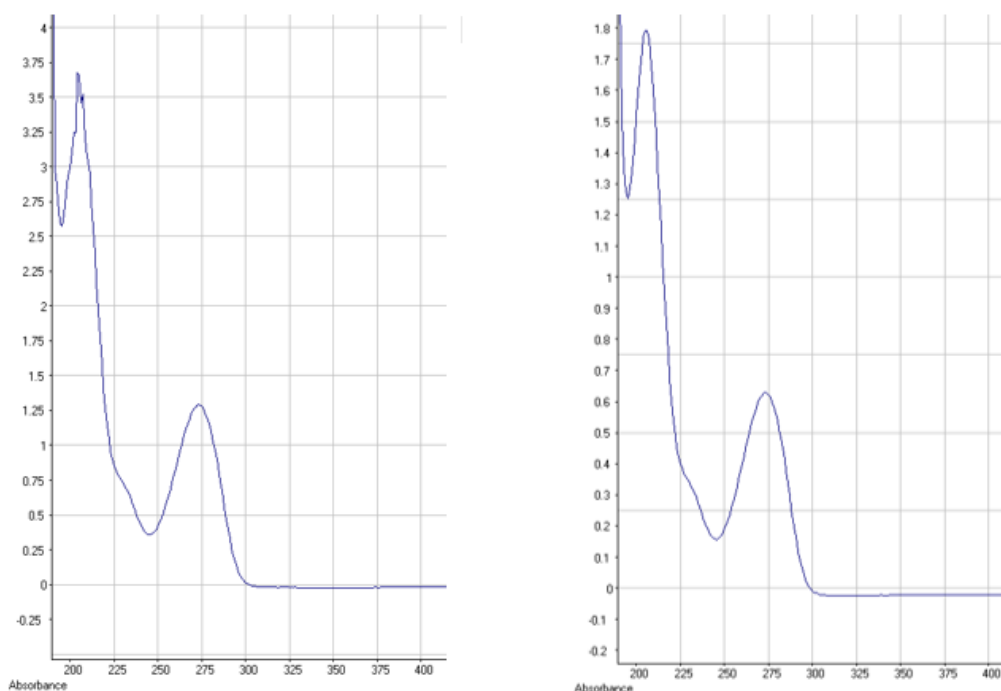
### **4.5.3 Kvalitativní analýza vzorků**

Nejprve byla změřena absorpční spektra standardů (viz kapitola 4.1.3), a poté byla změřena absorpční spektra vzorků (**Cu1**, **K** a **I**). Podle zrakové analýzy a spektrofotometrické analýzy a tvaru absorpčních spekter a jejich vzájemným porovnáním byly k vzorkům přiřazeny standardy známých látek.

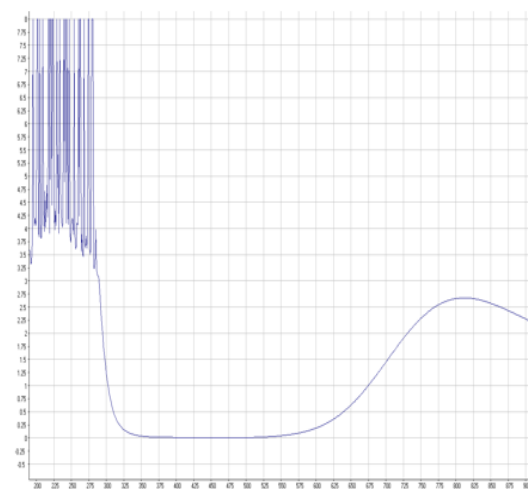
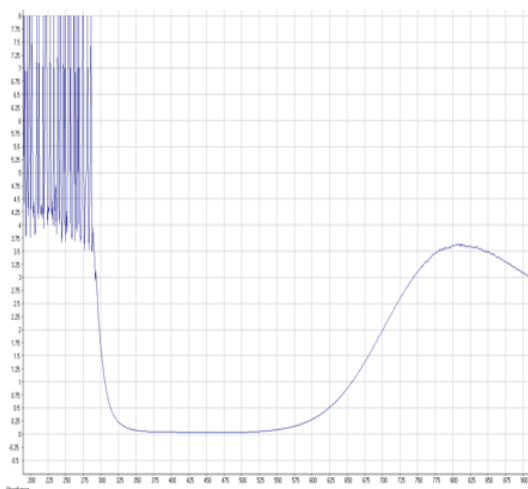
#### 4.5.4 Ověření a komentář k úloze

Pro kvalitativní analýzu byly připraveny roztoky ibuprofenu, kofeinu a síranu měďnatého o vhodných koncentracích a byly připraveny z roztoků použitých při kvalitativní analýze, viz kapitoly 4.1.1, 4.3.1, 4.4.1. U roztoků standardních látek byla změřena absorpční spektra.

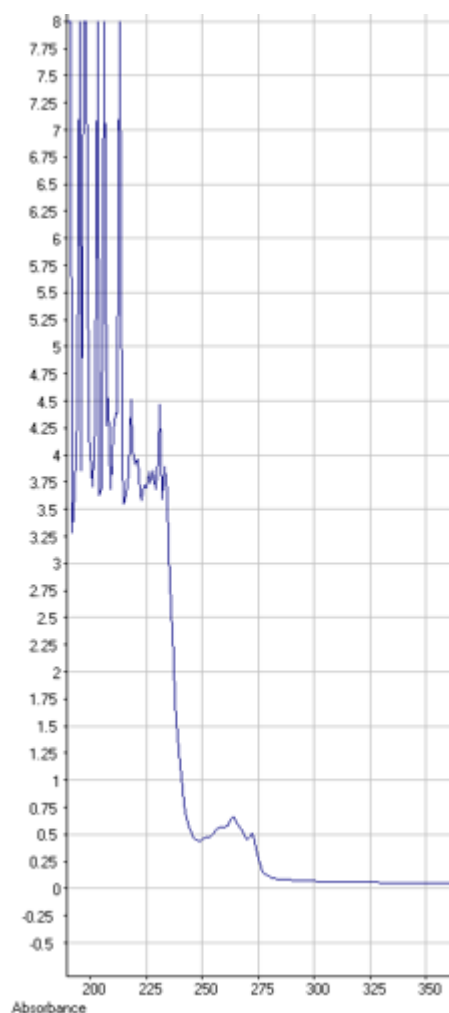
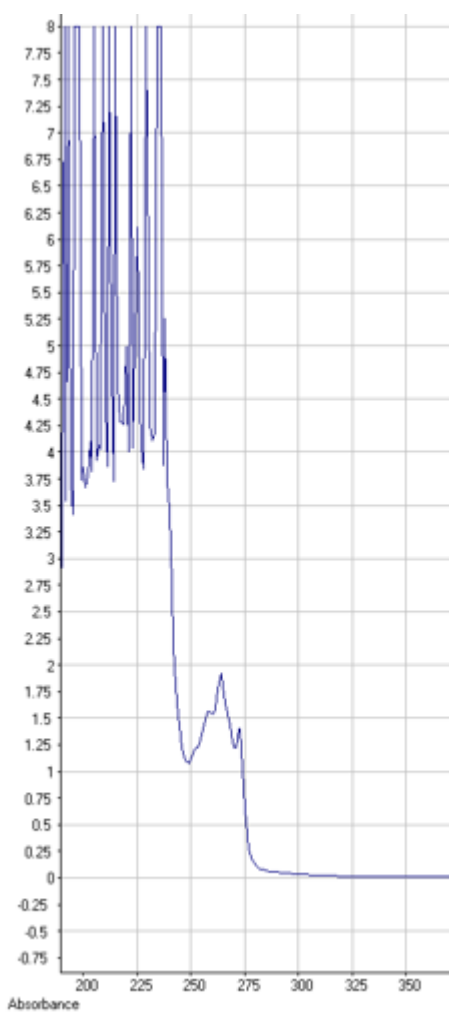
Absorpční spektra vzorků byla porovnána s absorpčními spektry standardů. Na Obr. 28 jsou spektra vzorku **SK** a **K** (kofein). Na Obr. 29 je absorpční spektrum **SCu** a **Cu1** (síran měďnatý). Absorpční spektra **SI** a **I** (ibuprofen) jsou uvedena na Obr. 30.



**Obr. 28. Absorpční spektra kofeinu**



Obr. 29. Absorpční spektra síranu měďnatého



Obr. 30. Absorpční spektra ibuprofenu

Pro tuto úlohu je vhodné připravit vzorek síranu měďnatého o nízké koncentraci, a to proto, aby modré zbarvení roztoku nebylo pozorovatelné a nedošlo k prozrazení výsledku dopředu. Spektra všech tří látek jsou dobře porovnatelná a úloha je tedy použitelná pro výuku.

## 5 Výsledky a diskuse

Cílem této diplomové práce bylo podat ucelené informace o spektrálních metodách s důrazem na UV/VIS spektrofotometrii a poukázat na možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie. Cílem byl i vhodný výběr úloh, jejich instrumentace a ověření možnosti jejich zařazení do výuky. Součástí zavedení do výuky bylo také vypracování podrobného návodu pro řešení úloh a práci se spektrofotometrem. Byly vybrány úlohy jak pro kvalitativní tak pro kvantitativní analýzu. S ohledem na praktické aplikace spektrofotometrie jsem vybrala práce týkající se analýzy kofeinu a ibuprofenu, pro jednoduchost pak analýzu síranu měďnatého.

Návody k vybraným úlohám byly sestaveny pro práci se spektrofotometrem Analytik Jena, SPECORD 210 PLUS, ale samozřejmě je lze využít i pro práci s jinými spektrofotometry, pouze obměněním návodu k ovládní softwaru, který bývá dodáván společně s přístroji.

Pro kvantitativní analýzu byly vybrány tři úlohy, pro kvalitativní analýzu byla vybrána jedna úloha.

Pro kvalitativní analýzu bylo vybráno stanovení čistého kofeinu v neznámém vzorku a stanovení kofeinu (teinu) v kávě a čaji. Obě úlohy byly ověřeny již v předmětu Instrumentální metody, jejich výsledky jsou dobře reprodukovatelné. Úlohu lze ještě rozšířit o analýzu instantní káva a instantní bezkofeinové kávy, což by mělo být pro studenty zajímavé, případně porovnat výluhy černého a zeleného čaje. Tato úloha navíc navazuje na kvalitativní a kvantitativní analýzu kofeinu metodou HPLC. Stanovení jednotlivými metodami lze tedy porovnávat a komplexně propojovat.

Kolorimetrické i spektrofotometrické stanovení koncentrace síranu měďnatého v roztoku se rovněž prokázalo jako použitelné a bylo ověřeno studenty opět v předmětu Instrumentální metody. I tato úloha poskytuje dobře reprodukovatelné výsledky a navíc kombinuje subjektivní metodu kolorimetrickou s objektivní metodou spektrofotometrickou.

Úloha pro kvalitativní analýzu je rovněž dobře reprodukovatelná, a ačkoliv nebyla ověřena ve výuce, poskytuje dobré výsledky. Do výuky ji lze tedy zařadit.

Jediný problém představuje úloha týkající kvantitativní analýzy ibuprofenu. Dobré výsledky byly získány při analýze čistého ibuprofenu, při analýze tablety i krému jsem zjistila, že je třeba dopracovat celý postup. V tabletě i krému se nacházejí další přídatné látky, které stanovení ruší a ani po převedení ibuprofenu na jeho sodnou sůl jsem nebyla schopna především z časových důvodů úlohu připravit tak, aby mohla být zařazena do výuky. Tato část tedy představuje prostor pro další práci a vypracování nové a lepší metodiky.

Práce se spektrofotometrem mohou být rovněž rozšířeny o úlohy na kinetiku, což by mohlo představovat další samostatné téma pro řešení diplomové práce.

Rovněž jsem vypracovala detailní návody jak pro jednotlivé úlohy, tak pro samotnou práci se spektrofotometrem (viz přílohy).



## 6 Závěr

V rámci řešení diplomové práce bylo sestaveno celkem 5 úloh pro zařazení do výuky Instrumentálních metod, konkrétně UV/VIS spektrofotometrie.

Úlohy pro kvantitativní analýzu (stanovení koncentrace kofeinu, stanovení koncentrace kofeinu v kávě a čaji, stanovení koncentrace ibuprofenu a stanovení koncentrace síranu měďnatého) byly ověřeny a mohou být pro dobrou reprodukovatelnost a správné výsledky zařazovány do výuky. Rovněž úloha pro kvalitativní analýzu byla ověřena a může být zařazena do výuky.

Úloha pro stanovení koncentrace ibuprofenu v tabletě Ibuprofenu a krému Ibalginu neposkytla dobré výsledky a je třeba přepracovat její uspořádání a podmínky stanovení.

Pro všechny úlohy byly vypracovány podrobné návody, podle kterých pracovali studenti v předmětu Instrumentální metody. Návody slouží jako podklad pro práci studentů i jako kontrolní materiál učitele. Rovněž byl vypracován podrobný návod pro práci s UV/VIS spektrofotometrem Analytik Jena, SPECORD 210 PLUS.

## 7 Seznam literatury

1. **MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY.** Harmonogram. *Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy.* [Online] [Citace: 16. 3 2016.] Dostupné na WWW: <<http://www.msmt.cz/vzdelavani/skolstvi-v-cr/skolskareforma/harmonogram>>.
2. **MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY.** RVP 2844M01. *Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy.* [Online] [Citace: 16. 3 2016.] Dostupné na WWW: <[http://www.msmt.cz/uploads/VKav\\_200/rvp\\_mat/RVP\\_2844M01\\_Aplikovana\\_chemie.pdf](http://www.msmt.cz/uploads/VKav_200/rvp_mat/RVP_2844M01_Aplikovana_chemie.pdf)>.
3. **NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P.** *Spektrometrické analytické metody.* Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
4. **MILATA, V. a SEGĀA, P.** *Spektrálne metody v chémii.* Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2004. ISBN 80-227-2049-6.
5. **VACÍK, J.** *Obecná chemie.* Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
6. **KLÁN, P.** *Organická fotochemie.* Brno : Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-210-2526-3.
7. **ROSINA, J. KOLÁŘOVÁ, H. a STANEK, J.** *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada, 2006. ISBN 978-80-247-1383-0.
8. **KLOUDA, P.** *Moderní analytické metody.* Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
9. **MONTWILL, A. and BRESLIN, A.** *Let there be light.* London : Imperial College Press, 2013. ISBN 9781848167582.
10. **KRATOCHVÍL, B. ŠVORČÍK, V. a VOJTĚCH, D.** *Úvod do studia materiálů.* Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-568-4.
11. **ČERNOHORSKÝ, T. a JANDERA, P.** *Atomová spektroskopie.* Pardubice : Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-719-4114-X.

12. **BENEŠ, J. KYMPLOVÁ, J. a VÍTEK, F.** *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory.* Praha : Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.
13. **ŠIKL, R.** *Zrakové vnímání.* Praha : Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3029-5.
14. **HRAZDIRA, I. a MORNSTEIN, V.** *Lékařská biofyzika a přístrojová technika.* Brno : Neptun, 2001. ISBN 80-902-8961-4.
15. **UHROVÁ, H.** *Laboratorní cvičení z fyziky. Vysoká škola chemicko-technologická.* [Online] [Citace: 9. 1 2016.] Dostupné na WWW:  
<[http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid\\_isbn-978-80-7080-845-0](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-845-0)>.  
ISBN 978-80-7080-845-0.
16. **MCMURRY, S.** *Organic chemistry.* Singapore : Brooks/Cole Cengage Learning, 2012. ISBN 978-084-0054-531.
17. **LÁZNÍČKOVÁ, A. a KUBÍČEK, V.** *Základy fyzikální chemie.* Praha : Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2791-5.
18. **PERKAMPUS, H.** *UV-VIS spectroscopy and its applications.* Berlin : Springer, 1992. ISBN 978-3-642-77479-9.
19. **GAUGLITZ, G. and MOORE, D.S.** *Handbook of spectroscopy.* Weinheim : Wiley-VCH, 2014. ISBN 978-3-527-32150-6.
20. **KOVÁČ, Š. LEŠKO, J a ILAVSKÝ, D.** *Metódy kontroly technologických procesov.* Bratislava : Alfa, 1987. ISBN.
21. **VOLKA, K. TKADLECOVÁ, M. a ZÁRUBA, K.** *Příklady z analytické chemie pro bakaláře. Vysoká škola chemicko-technologická.* [Online]. Dostupné na WWW:  
<[http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid\\_isbn-978-80-7080-743-9](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-743-9)>.  
ISBN 978-80-7080-743-9.
22. **SHEEHAN, D.** *Physical biochemistry.* Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-85603-1.
23. **MATUŠKA, T.** *Solární zařízení v příkladech.* Praha : Grada, 2013. ISBN 978-80-257-3525-2.

24. **SYNEK, S. a SKORKOVSKÁ, Š.** *Fyziologie oka a vidění*. Praha : Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3992-2.
25. **HOLČAPEK, M.** holcapek.upce.cz. *Michal Holčapek, Mass Spectrometry Group at University of Pardubice*. [Online] [Citace: 20. 1 2016.] Dostupné na WWW: <[http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska1\\_UVVIS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska1_UVVIS.pdf)>.
26. **THORNE, A., et al.** *Spectrophysics*. New York : Springer, 1999. ISBN 35-406-5117-9.
27. **DEPUY, CH. and CHAPMAN, O.** *Molekulové reakce a fotochemie*. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1978.
28. **JURSÍK, F.** *Anorganická chemie nekovů*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0417-3.
29. **JURSÍK, F.** *Anorganický chemie kovů*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0504-8.
30. **NOVOTNÁ, R. ŠILHA, T. a TRÁVNÍČEK, Z.** *Spektrální metody studia chemických látek. Katedra anorganické chemie Univerzity Palackého v Olomouci*. [Online] [Citace: 17. 3 2016.] Dostupné na WWW:<[http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Spektralni\\_metody.pdf](http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Spektralni_metody.pdf)>.
31. **PRAUS, P. a VONTOROVÁ, J.** *Analytická chemie II. Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství*. [Online] [Citace: 6. 11 2015.] Dostupné na WWW: <[http://katedry.fmfi.vsb.cz/617/Analyticka\\_chemie\\_II.pdf](http://katedry.fmfi.vsb.cz/617/Analyticka_chemie_II.pdf)>. ISBN 978-80-248-3734-5.
32. **WORKMAN, J. and SPRINGSTEEN, A.** *Applied spectroscopy*. San Diego : Academic Press, 1998. ISBN 0127640703.
33. **KÁŠ, J. KODÍČEK, M. a VALENTOVÁ O.** *Laboratorní techniky biochemie*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
34. **ŠETLÍK, I. SEIDLOVÁ, F a ŠANTRŮČEK, J.** *Fotosyntetická barviva a světlosběrné antény. Katedra experimentální biologie rostlin*. [Online] [Citace: 15. 12 2015.] Dostupné na WWW: <[http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220\\_S04.pdf](http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220_S04.pdf)>.

35. **HORÁKOVÁ, M.** *Analytika vody*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0391-6.
36. **VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ.** Koplík R.: Vysoká škola chemicko-technologická. *Vysoká škola chemicko-technologická*. [Online] [Citace: 26. 3 2016.] Dostupné na WWW: <<http://web.vscht.cz/~koplík/MI2012.pdf>>.
37. **ANALYTIK JENA AG.** SPECORD PLUS Applications in Environmental Analysis: Analytik Jena. *Analytik Jena AG*. [Online] Analytik Jena AG. [Citace: 21. 3 2016.] Dostupné na WWW: <[https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/pdf\\_analytical\\_instrumentation/UV\\_Vis/specord\\_plus/fl\\_UV\\_VIS\\_environmental\\_V03\\_en.pdf](https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/pdf_analytical_instrumentation/UV_Vis/specord_plus/fl_UV_VIS_environmental_V03_en.pdf)>.
38. **KEITH, L. and WALTERS, D.** *National Toxicology Program's chemical solubility compendium*. Boca Raton : Lewis Publishers, 1992. ISBN 0-87371-6531.
39. **HAYNES, W. and LIDE, D.** *CRC handbook of chemistry and physics*. Boca Raton : CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-5511-9.
40. **SIGMA-ALDRICH.** ProductInformation Sheet Copper(II) sulfate pentahydrate: Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich*. [Online] [Citace: 19. 3 2016.] Dostupné na WWW: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c3036pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c3036pis.pdf)>.
41. **SIGMA-ALDRICH.** ProductInformation Caffeine: Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich*. [Online] [Citace: 19. 3. 2016.] Dostupné na WWW: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product\\_Information\\_Sheet/c0750pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/c0750pis.pdf)>.
42. **SEDMIDUBSKÝ, D.** *Základy chemie pro bakaláře*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2011. ISBN 978-80-7080-790-3.
43. **JEDLIČKA, M.** *Fotonásobiče.. 6*, Praha : FCC Public s.r.o., 2009, Sv. 12. ISSN 1212-0812.

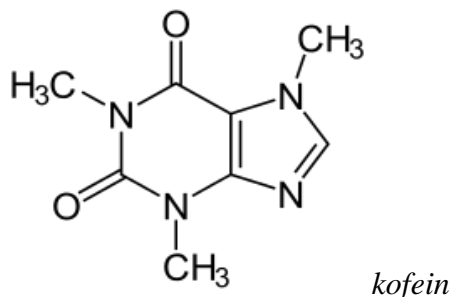
## 8 Seznam použitých zkratk

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy (atomová absorpční spektroskopie)
AES	Atomic Emission Spectroscopy (atomová emisní spektroskopie)
CCD	Charge Coupled Device (zařízení citlivé na elektrický náboj)
CT	Charge Transfer (přenos náboje)
IČ	Infračervená
NIR	Near Infrared (blízká infračervená)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (nukleární magnetická rezonance)
UV	Ultraviolet (ultrafialová)
UV/VIS	Ultraviolet/Visible (ultrafialová a viditelná)
VIS	Visible (viditelná)
NZ1	Neznámý vzorek kofeinu ( $c_{\text{kofein}} = 18 \text{ mg/l}$ )
NZ2	Neznámý vzorek kofeinu ( $c_{\text{kofein}} = 30 \text{ mg/l}$ )
Cu1	Neznámý vzorek síranu měďnatého ( $c_{\text{síran měďnatý}} = 30 \text{ g/l}$ )
I-1	Neznámý vzorek čistého ibuprofenu ( $c_{\text{ibuprofen}} = 600 \text{ mg/l}$ )
T-2	Neznámý vzorek tablety Ibuprofenu 400 ( $c_{\text{ibuprofen}} = 800 \text{ mg/l}$ )
K-1	Neznámý vzorek krému Ibalginu ( $c_{\text{ibuprofen}} = 1000 \text{ mg/l}$ )
K-2	Neznámý vzorek krému Ibalginu ( $c_{\text{ibuprofen}} = 1000 \text{ mg/l}$ )
K-3	Neznámý vzorek krému Ibalginu ( $c_{\text{ibuprofen}} = 25 \text{ mg/l}$ )
SK	Standardní roztok kofeinu ( $c_{\text{kofein}} = 30 \text{ mg/l}$ )
SI	Standardní roztok ibuprofenu ( $c_{\text{ibuprofen}} = 1463 \text{ mg/l}$ )
SCu	Standardní roztok síranu měďnatého ( $c_{\text{síran měďnatý}} = 43,5 \text{ g/l}$ )

## 9 Přílohy

### Příloha č. 1

#### Úloha č. 1 – stanovení koncentrace kofeinu v neznámém vzorku



#### **Použité pomůcky:**

analytická váha, mikropipeta (nastavitelný objem 100 – 1000  $\mu\text{l}$ ), křemenné kyvety pro UV/VIS spektrofotometrii, kádinky, odměrné baňky (100ml, 25ml), nálevka, filtrační papír

#### **Použité chemikálie:**

kofein, methanol, destilovaná voda, sypaný černý čaj, umletá zrnková káva

#### **Úkoly:**

- Zjistěte, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum kofeinu
- Vytvořte kalibrační křivku pro stanovení kofeinu
- Zjistěte koncentraci kofeinu ve vzorku

#### **Postup:**

- **Připravte referenční vzorek** (objem roztoku v kyvetách je 2 ml)
- **Do 100 ml odměrné baňky připravte zásobní roztok kofeinu o koncentraci 100 mg/l a z něho kalibrační roztoky o koncentracích 50,0 mg/l; 42,5 mg/l; 35,0 mg/l; 25,0 mg/l; 12,5 mg/l; a 5,0 mg/l.** K ředění použijte roztok methanolu a vody 1 : 1. K odměření používejte mikropipety a dbejte na to, abyste špičky od mikropipet správně měnily a nedošlo ke kontaminaci zásobního roztoku nebo

standardního roztoku v kyvetě (dostatečné množství roztoku k pipetování si odlijte do kádinky).

- **Zjistěte, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum kofeinu**
- **Vytvořte kalibrační křivku**
- **Zjistěte koncentraci kofeinu v neznámém vzorku**

#### **Návod:**

#### **Vyhledání absorpčního maxima**

Objem roztoku v kyvetách činí 2 ml, proto odpipetujte do kyvety s referenčním vzorkem 2 ml rozpouštědla (MeOH/voda 1:1). Poté si připravte kalibrační roztok o koncentraci 50,0 mg/l. Nesahejte na část kyvety, kterou bude procházet paprsek (hladké průhledné stěny), aby měření nebylo ovlivněno, případně nečistoty odstaňte buničinou. Obě kyvety uzavřete víčkem a vložte do autosampleru UV/VIS spektrofotometru. Referenční vzorek vložte do pozice 1, a kalibrační vzorek vložte do pozice 2. Při vkládání kyvet do přístroje se nebojte mírně zatlačit na víčko kyvety. Kyveta by neměla přesahovat o více než 1 cm nad úroveň autosampleru.

Pro ovládání spektrofotometru Analytik Jena SPECORD 210 PLUS slouží softwarový program WinAspect Plus. Po každém prvním zapnutí spektrofotometru a počítače je nutné provést inicializaci spektrofotometru se softwarovým programem. To lze provést kliknutím na položku *Initialize Device*, která se nachází v menu *Measurement* nebo klávesovou zkratkou *Ctrl+G*. Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“. Pokud již někdo před vámi inicializaci provedl, není potřebné tento krok provádět.

V tomto programu se parametry měření nastavují kliknutím myši na položku *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Po kliknutí na položku *Set Parameters* se otevře okno, kde se zadávají parametry měření. Protože hledáte, při které vlnové délce vzorek absorbuje nejvíce záření, je potřebné nastavit měření absorbance. V podokně *Display* tedy označte možnost *Absorbance*.



Abyste získali spektrum samotného vzorku, nikoliv spektrum roztoku vzorku v rozpouštědle, musí se změřit kyveta obsahující pouze rozpouštědlo (referenční vzorek). Změření referenčního vzorku navolte v podokně *Correction*, kde zatrhněte možnost *Reference*. Nyní je třeba vybrat oblast spektra, ve kterém se bude měřit. Oblast spektra zvolíte v záložce *Mode*, kde v *Meas. Mode* vyberte možnost *Spectral scan*. Nejvyšší možný rozsah vlnových délek je u tohoto přístroje od 190 nm do 1100 nm. Pro vzorek, u kterého nevíte, při jakých vlnových délkách bude ležet absorpční maximum, je nejlepší možností nechat změřit vzorek v celém tomto rozsahu vlnových délek.

V záložce *Accessories* zadejte počet vašich vzorků, které jste umístili do autosampleru spektrofotometru. Referenční vzorek byste měli mít vložený v pozici č. 1, proto nezapomeňte zaškrtnout možnost *1<sup>st</sup> position reference*. Po zadání všech potřebných údajů potvrďte tyto údaje kliknutím na tlačítko *OK*. Vlastní měření spustíte kliknutím na možnost *Start Measurement*. Tuto možnost lze najít jednak v menu *Measurement*, nebo lze použít rychlejší způsob, a to využitím postranního panelu *Measurement*, který se objeví po navolení kritérií měření.

Po změření vzorku program vytvoří jeho absorpční spektrum. Z vytvořeného absorpčního spektra vyčtete, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum. Při hledání absorpčního maxima nezapomeňte brát v úvahu Bouguerův–Lambertův–Beerův zákon (tzn., aby se hodnoty absorbance nacházely v rozmezí hodnot  $< 0, 3 >$ ).

### **Kalibrační křivka**

Referenční vzorek vložte opět do první pozice autosampleru ve spektrofotometru, do dalších pozic autosampleru vložte kyvety s kalibračními roztoky (Standard č. 1 – č. 6). Navolte vhodné parametry měření v položce *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Hodnotu vámi zjištěného absorpčního maxima (v nm) zadejte v záložce *Mode*, kde upravte režim měření na měření při určité vlnové délce nebo délkách: *Meas. Mode: wavelengths*. Po navolení režimu ze *Spectral Scan* na režim *Wavelengths* se objeví podokno. Jestliže je v podokně zadaná hodnota jiná, než je vaše hodnota absorpčního maxima, přepište tuto hodnotu kliknutím na tlačítko *Edit*. Nezapomeňte v záložce *Accessories* překontrolovat a popř. navolit správně všechny potřebné údaje

měření (zkontrolujte, zda odpovídá počet vzorků, které máte v autosampleru s počtem vzorků, které máte zadané právě v záložce *Accessories* a nezapomeňte zaškrtnout možnost referenčního vzorku v první pozici, jestliže ho máte v autosampleru). Všechny vaše změny potvrďte kliknutím na tlačítko – panel *OK*.

K vytvoření kalibrační křivky slouží položka *Calibration*, ke které se dostanete kliknutím na menu *Quant* a výběrem položky *Lab*. Po kliknutí na položku *Calibration* se otevře okno, kde navolíte parametry kalibrace. Jedná se o kalibrační křivku, proto zvolte regresní model *Regression Model:  $y = B * x$*  (lineární) Po zkontrolování dalších údajů, jako jsou odpovídající jednotky, odpovídající vlnová délka či odpovídající počet standardů, použijte tlačítko *Standards*. Objeví se další okno, kde do sloupce *Conc.* vepíšete koncentrace vašich standardů, a poté začnete měření kliknutím na panel *Start*. Po skončení měření, které může trvat pár minut, než se ukáží naměřené hodnoty absorbance vašich standardů a teprve po kliknutí na panel *OK*, program WinAspect vytvoří z naměřených údajů a vámi zadaných koncentrací kalibrační křivku. Vzniklou kalibrační křivku uložte (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Save as...*) a pojmenujte následovně: *kofeinSx* (x=číslo skupiny případně vaše iniciály apod.).

### **Zjištění koncentrace kofeinu v neznámém vzorku**

Neznámý vzorek (předá vám ho vyučující) odpipetujte do kyvety (2 ml) a vložte do spektrofotometru do pozice č. 2. V pozici č. 1 musí být umístěn referenční vzorek. Otevřete si v programu WinAspectPlus vámi uloženou kalibrační křivku *kofeinSx* (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Open*). Otevře se vybraný soubor s kalibrační křivkou a s ním i podokno, kde se parametry měření nastavují kliknutím na položku *Measurement parameters* nacházející se na panelu *Edit*. Otevře se okno s parametry měření, které už bylo popsáno výše. Všechny uvedené údaje zkontrolujte. Měření koncentrace neznámého vzorku spustíte kliknutím myši na panel *To concentration*, a poté kliknutím na tlačítko *OK*. Po změření vzorku přístrojem se objeví tabulka, kde je na základně závislosti absorbance na koncentraci ukázaná naměřená koncentrace. Vámi zjištěnou koncentraci neznámého vzorku zapište.

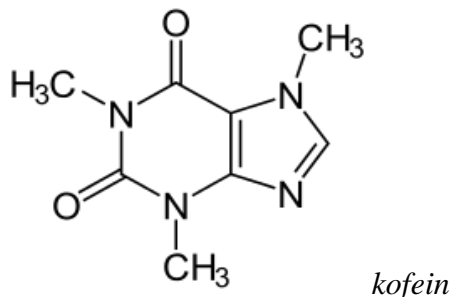
Pokud koncentrace neznámého vzorku nesedí na kalibrační křivce a je příliš vysoká, vzorek zřed'te rozpouštědlem nejprve 1:1, v případě nutnosti i vícekrát, dokud po

změření vzorku nebude koncentrace nalezena na kalibrační křivce. Ředění nezapomeňte zohlednit ve výpočtu koncentrace v neředěném vzorku.

**Po dokončení měření kyvety opatrně, ale důkladně vymyjte vodou. Poté je opláchněte acetonem a nechte vyschnout.**

## Příloha č. 2

### Úloha č. 2 – spektrofotometrické stanovení koncentrace kofeinu (teinu) ve vyluzích mleté kávy a černého čaje



#### **Použité pomůcky:**

analytická váha, mikropipeta (nastavitelný objem 100 – 1000  $\mu$ l), křemenné kyvety pro UV/VIS spektrofotometrii, kádinky, odměrné baňky (100ml, 25ml), nálevka, filtrační papír

#### **Použité chemikálie a materiály**

kofein, methanol, destilovaná voda, sypaný černý čaj, umletá zrnková káva

#### **Úkoly:**

- Zjistěte, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum kofeinu
- Vytvořte kalibrační křivku pro stanovení kofeinu
- Zjistěte koncentraci kofeinu (teinu) ve vyluzích mleté kávy a černého čaje.

#### **Postup:**

- **Připravte referenční vzorek** (objem roztoku v kyvetách je 2 ml)
- **Do 100 ml odměrné baňky připravte zásobní roztok kofeinu o koncentraci 100 mg/l a z něho kalibrační roztoky o koncentracích 50,0 mg/l; 42,5 mg/l; 35,0 mg/l; 25,0 mg/l; 12,5 mg/l; a 5,0 mg/l.** K ředění použijte roztok methanolu a vody 1 : 1. K odměření používejte mikropipety a dbejte na to, abyste špičky od mikropipet správně měnily a nedošlo ke kontaminaci zásobního roztoku nebo

standardního roztoku v kyvetě (dostatečné množství roztoku k pipetování si odlijte do kádinky).

**Připravte výluh kávy a černého čaje.** Na analytických vahách nejprve odvažte 1,0 g umleté zrnkové kávy, kvantitativně jej převedte do kádinky a přelijte cca 50 ml vroucí destilované vody. Po pěti minutách louhování směs přefiltrujte do kádinky. Po úplném vychladnutí převedte roztok do odměrné baňky (100ml) a doplňte po rysku destilovanou vodou. Totožným způsobem připravte vzorek černého čaje.

- **Zjistěte, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum kofeinu**
- **Vytvořte kalibrační křivku**
- **Zjistěte koncentraci kofeinu (teinu) ve výluzích mleté kávy a černého čaje.**

#### **Návod:**

##### **Vyhledání absorpčního maxima**

Objem roztoku v kyvetách činí 2 ml, proto odpipetujte do kyvety s referenčním vzorkem 2 ml rozpouštědla (MeOH/voda 1:1). Poté si připravte kalibrační roztok o koncentraci 50,0 mg/l. Nesahejte na část kyvety, kterou bude procházet paprsek (hladké průhledné stěny), aby měření nebylo ovlivněno, případně nečistoty odstaňte buničinou. Obě kyvety uzavřete víčkem a vložte do autosampleru UV/VIS spektrofotometru. Referenční vzorek vložte do pozice 1, a kalibrační vzorek vložte do pozice 2. Při vkládání kyvet do přístroje se nebojte mírně zatlačit na víčko kyvety. Kyveta by neměla přesahovat o více než 1 cm nad úroveň autosampleru.

Pro ovládání spektrofotometru Analytik Jena SPECORD 210 PLUS slouží softwarový program WinAspect Plus. Po každém prvním zapnutí spektrofotometru a počítače je nutné provést inicializaci spektrofotometru se softwarovým programem. To lze provést kliknutím na položku *Initialize Device*, která se nachází v menu *Measurement* nebo klávesovou zkratkou *Ctrl+G*. Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“. Pokud již někdo před vámi inicializaci provedl, není potřebné tento krok provádět.

V tomto programu se parametry měření nastavují kliknutím myši na položku *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Po kliknutí na položku *Set Parameters* se otevře okno, kde se zadávají parametry měření. Protože hledáte, při které vlnové délce vzorek absorbuje nejvíce záření, je potřebné nastavit měření absorbance. V podokně *Display* tedy označte možnost *Absorbance*.

Abyste získali spektrum samotného vzorku, nikoliv spektrum roztoku vzorku v rozpouštědle, musí se změřit kyveta obsahující pouze rozpouštědlo (referenční vzorek). Změřením referenčního vzorku navolte v podokně *Correction*, kde zatrhněte možnost *Reference*. Nyní je třeba vybrat oblast spektra, ve kterém se bude měřit. Oblast spektra zvolíte v záložce *Mode*, kde v *Meas. Mode* vyberte možnost *Spectral scan*. Nejvyšší možný rozsah vlnových délek je u tohoto přístroje od 190 nm do 1100 nm. Pro vzorek, u kterého nevíte, při jakých vlnových délkách bude ležet absorpční maximum, je nejlepší možností nechat změřit vzorek v celém tomto rozsahu vlnových délek.

V záložce *Accessories* zadejte počet vašich vzorků, které jste umístili do autosampleru spektrofotometru. Referenční vzorek byste měli mít vložený v pozici č. 1, proto nezapomeňte zaškrtnout možnost *1<sup>st</sup> position reference*. Po zadání všech potřebných údajů potvrďte tyto údaje kliknutím na tlačítko *OK*. Vlastní měření spustíte kliknutím na možnost *Start Measurement*. Tuto možnost lze najít jednak v menu *Measurement*, nebo lze použít rychlejší způsob, a to využitím postranního panelu *Measurement*, který se objeví po navolení kritérií měření.

Po změření vzorku program vytvoří jeho absorpční spektrum. Z vytvořeného absorpčního spektra vyčtěte, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum. Při hledání absorpčního maxima nezapomeňte brát v úvahu Bouguerův–Lambertův–Beerův zákon (tzn., aby se hodnoty absorbance nacházely v rozmezí hodnot  $< 0,3 >$ ).

### **Kalibrační křivka**

Referenční vzorek vložte opět do první pozice autosampleru ve spektrofotometru, do dalších pozic autosampleru vložte kyvety s kalibračními roztoky (Standard č. 1 – č. 6). Navolte vhodné parametry měření v položce *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Hodnotu vámi zjištěného absorpčního maxima (v nm) zadejte v záložce

*Mode*, kde poupravte režim měření na měření při určité vlnové délce nebo délkách: *Meas. Mode: wavelengths*. Po navolení režimu ze *Spectral Scan* na režim *Wavelengths* se objeví podokno. Jestliže je v podokně zadaná hodnota jiná, než je vaše hodnota absorpčního maxima, přepište tuto hodnotu kliknutím na tlačítko *Edit*. Nezapomeňte v záložce *Accessories* překontrolovat a popř. navolit správně všechny potřebné údaje měření (zkontrolujte, zda odpovídá počet vzorků, které máte v autosampleru s počtem vzorků, které máte zadané právě v záložce *Accessories* a nezapomeňte zaškrtnout možnost referenčního vzorku v první pozici, jestliže ho máte v autosampleru). Všechny vaše změny potvrďte kliknutím na tlačítko – panel *OK*.

K vytvoření kalibrační křivky slouží položka *Calibration*, ke které se dostanete kliknutím na menu *Quant a* výběrem položky *Lab*. Po kliknutí na položku *Calibration* se otevře okno, kde navolíte parametry kalibrace. Jedná se o kalibrační křivku, proto zvolte regresní model *Regression Model:  $y = B * x$*  (lineární) Po zkontrolování dalších údajů, jako jsou odpovídající jednotky, odpovídající vlnová délka či odpovídající počet standardů, použijte tlačítko *Standards*. Objeví se další okno, kde do sloupce *Conc.* vepište koncentrace vašich standardů, a poté začněte měření kliknutím na panel *Start*. Po skončení měření, které může trvat pár minut, než se ukáží naměřené hodnoty absorbance vašich standardů a teprve po kliknutí na panel *OK*, program WinAspect vytvoří z naměřených údajů a vámi zadaných koncentrací kalibrační křivku. Vzniklou kalibrační křivku uložte (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Save as...*) a pojmenujte následovně: *kofeinSx* (x=číslo skupiny případně vaše iniciály apod.).

### **Zjištění koncentrace kofeinu (teinu) ve výluzích mleté kávy a černého čaje.**

Odpipetujte do kyvety 100 µl výluhu kávy a 1900 µl rozpouštědla (methanol/voda 1 : 1) a vložte do spektrofotometru do pozice č. 2. Do pozice č. 3 vložte kyvetu obsahující 100 µl výluhu černého čaje a 1900 µl rozpouštědla (methanol/voda 1 : 1). V pozici č. 1 musí být umístěn referenční vzorek. Otevřete si v programu WinAspectPlus vámi uloženou kalibrační křivku *kofeinSx* (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Open*). Otevře se vybraný soubor s kalibrační křivkou a s ním i podokno, kde se parametry měření nastavují kliknutím na položku *Measurement parameters* nacházející se na panelu *Edit*. Otevře se okno s parametry měření, které už bylo popsáno výše. Všechny

uvedené údaje zkontrolujte. Měření koncentrace neznámého vzorku spustíte kliknutím myši na panel *To concentration*, a poté kliknutím na tlačítko *OK*. Po změření vzorků přístrojem se objeví tabulka, kde je na základně závislosti absorbance na koncentraci ukázaná naměřená koncentrace. Vámi zjištěnou koncentraci zapište a nezapomeňte spočítat koncentraci kofeinu ve vzorku před zředěním.

**Po dokončení měření kyvety opatrně, ale důkladně vymyjte vodou. Poté je opláchněte acetonem a nechte vyschnout.**



### Příloha č. 3

#### Úloha č. 3 – kolorimetrické a spektrofotometrické stanovení koncentrace síranu měďnatého

##### **Použité pomůcky**

Odměrné baňky (200ml), kyvety, stojan se zkumavkami, odměrný válec, mikropipeta (nastavitelný objem 100 – 1000  $\mu$ l), pipeta, filtrační papír, nálevka

##### **Použité chemikálie**

Modrá skalice, destilovaná voda

##### **Úkoly**

- Připravte kolorimetrickou stupnici z roztoků síranu měďnatého a kolorimetricky určete jeho koncentraci v neznámém vzorku.
- Pomocí UV/VIS spektrofotometrie vytvořte kalibrační křivku z roztoků síranu měďnatého a určete jeho koncentraci v neznámém vzorku.

##### **Postup:**

Protože pro obě metody budete potřebovat roztoky síranu měďnatého o koncentracích 100 g/l, 80 g/l, 60 g/l, 50 g/l, 40 g/l, 30g/l, 20 g/l a 10g/l, je lepší si připravit roztoky o uvedených koncentracích najednou.

- **Příprava roztoků**
  - **Připravte zásobní roztok síranu měďnatého o koncentraci 100 g/l do 200ml odměrné baňky**, pro přípravu roztoku použijte modrou skalici a destilovanou vodu. Roztok před použitím zbavte nerozpustných nečistot filtrací.
  - **Ze zásobního roztoku připravte roztoky síranu měďnatého o koncentraci 80 g/l, 60 g/l, 50 g/l, 40 g/l, 30 g/l, 20 g/l a 10 g/l. Každý roztok by měl mít objem alespoň 10 ml, nejlépe však 25 ml.** (Roztoky budete potřebovat na UV/VIS spektrofotometrii a kolorimetrii). K odměření používejte mikropipety a dbejte na to, abyste špičky od

mikropipet měnily a nedošlo k vzájemné kontaminaci připravených kalibračních roztoků. Roztoky k pipetování si vždy odlijte do malé kádinky, neodebírejte přímo z odměrné baňky.

- **Vytvoření kolorimetrické stupnice roztoků síranu měďnatého**
- **Určení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku o neznámé koncentraci metodou kolorimetrie**
- **Určení absorpčního maxima síranu měďnatého**
- **Vytvoření kalibrační křivky pomocí UV/VIS spektrofotometrie**
- **Určení koncentrace síranu měďnatého ve vzorku o neznámé koncentraci metodou kalibrační přímky za využití UV/VIS spektrometrie**

#### **Návod k přípravě kolorimetrické stupnice roztoků síranu měďnatého a ke kolorimetrickému určení koncentrace síranu měďnatého v neznámém vzorku:**

Připravte si stojan se zkumavkami a do každé zkumavky odpipetujte vždy 3 ml z jednoho z vašich připravených roztoků. (Do kolorimetrické stupnice zahrňte i roztok o koncentraci 100 g/l). Do poslední zkumavky odměřte 3 ml roztoku o neznámé koncentraci. Porovnávejte intenzitu zbarvení roztoku o neznámé koncentraci s vaší kolorimetrickou stupnicí. (Nejlépe se intenzita zbarvení pozoruje při mírném denním osvětlení a proti bílému papíru). Na základě podobnosti intenzity zbarvení odhadněte koncentraci vzorku o neznámé koncentraci a zapište.

#### **Vyhledání absorpčního maxima**

Objem roztoku v kyvetách činí 2 ml, proto odpipetujte do kyvety s referenčním vzorkem 2 ml rozpouštědla (destilované vody). Poté si do kyvety odpipetujte kalibrační roztok o koncentraci 80 g/l. Nesahejte na část kyvety, kterou bude procházet paprsek (hladké průhledné stěny, aby měření nebylo ovlivněné a tudíž nepřesné, případně nečistoty odstraňte buničinou. Obě kyvety uzavřete víčkem a vložte do autosampleru UV/VIS spektrofotometru. Referenční vzorek vložte do pozice 1 a jakýkoliv vámi zvolený kalibrační vzorek vložte do pozice 2. Při vkládání kyvet do autosampleru

přístroje se nebojte mírně zatlačit na víčko kyvety, kyveta by neměla přesahovat o více než 1 cm nad úroveň autosampleru.

Pro ovládání spektrofotometrů Analytik Jena SPECORD slouží softwarový program WinAspect Plus. Po každém prvním zapnutí spektrofotometru a počítače je nutné provést inicializaci spektrofotometru se softwarovým programem. To lze provést kliknutím na položku *Initialize Device*, která se nachází v menu *Measurement* nebo klávesovou zkratkou *Ctrl+G*. Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“. Pokud již někdo před vámi inicializaci provedl, není potřebné tento krok provádět.

V tomto programu se parametry měření se nastavují v položce *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Po kliknutí na položku *Set Parameters* se otevře okno, kde se zadávají parametry měření. V této úloze je jedním z úkolů najít absorpční maximum dané látky, proto je potřebné označit měření absorbance. V podokně *Display* tedy označte možnost *Absorbance*.

Abyste získali spektrum samotného vzorku, nikoliv spektrum roztoku vzorku v rozpouštědle, musí se změřit kyveta obsahující pouze rozpouštědlo (referenční vzorek). Změření referenčního vzorku se navolí v podokně *Correction*, kde zatrhněte možnost *Reference*. Nyní je třeba vybrat oblast spektra, ve kterém se bude měřit. Oblast spektra zvolíte v záložce *Mode*, kde v *Meas. Mode* vyberte možnost *Spectral scan*. Nejvyšší možný rozsah vlnových délek je u tohoto přístroje od 190 nm do 1100 nm. Pro vzorek, u kterého nevíte, při jakých vlnových délkách bude ležet absorpční maximum, je nejlepší možností nechat změřit vzorek v celém rozsahu vlnových délek.

V záložce *Accessories* zadejte počet vašich vzorků, které jste umístili do autosampleru spektrofotometru. Referenční vzorek by měl být vložen v pozici č. 1, proto nezapomeňte zaškrtnout možnost *1<sup>st</sup> position reference*. Po zadání všech potřebných údajů potvrďte tyto údaje kliknutím na tlačítko *OK*. Vlastní měření spustíte kliknutím na možnost *Start Measurement*. Tuto možnost lze najít jednak v menu *Measurement*, nebo lze použít rychlejší způsob, a to využitím postranního panelu *Measurement*, který se objeví po navolení kritérií měření.

Po přeměření vzorku program vytvoří jeho absorpční spektrum. Z vytvořeného absorpčního spektra vyčtete, při které vlnové délce se nachází absorpční maximum. Při hledání absorpčního maxima nezapomeňte brát v úvahu Bouguerův–Lambertův–Beerův zákon (tzn., aby se hodnoty absorbance nacházely v rozmezí hodnot  $< 0, 3 >$ ).

### **Kalibrační křivka**

Referenční vzorek vložte opět do první pozice autosampleru ve spektrofotometru, do dalších pozic autosampleru vložte kyvety s kalibračními roztoky (Standard č.1 – č. 7). Navolte vhodné parametry měření v položce *Set parameters*, která se nachází v panelu *Measurement*. Hodnotu vámi zjištěného absorpčního maxima (v nm) zadejte v záložce *Mode*, kde upravte režim měření měření při určité vlnové délce nebo délkách: *Meas. Mode: wavelengths*. Po navolení režimu ze *Spectral Scan* na režim *Wavelengths* se objeví podokno. Jestliže je v podokně zadaná hodnota jiná, než je vaše hodnota absorpčního maxima, přepište tuto hodnotu kliknutím na tlačítko *Edit*. Nezapomeňte v záložce *Accessories* překontrolovat a popř. navolit správně všechny potřebné údaje měření. (Zkontrolujte, zda odpovídá počet vzorků, které máte v autosampleru s počtem vzorků, které máte zadané právě v záložce *Accessories*. Nezapomeňte zaškrtnout možnost referenčního vzorku v první pozici, jestliže ho máte v autosampleru.) Všechny vaše změny potvrďte kliknutím na tlačítko – panel *OK*.

K vytvoření kalibrační křivky slouží položka *Calibration*, ke které se dostanete kliknutím na menu *Quant a* výběrem položky *Lab*. Po kliknutí na položku *Calibration* se otevře okno, kde navolíte parametry kalibrace. Jedná se o kalibrační křivku, proto zvolte *Regression Model: y = B \* x* (lineární). Po zkontrolování dalších údajů, jako jsou odpovídající jednotky, odpovídající vlnová délka či odpovídající počet standardů, použijte tlačítko *Standards*. Objeví se další okno, do sloupce *Conc.* vepište koncentrace vašich standardů, a poté začněte měření kliknutím na panel *Start*. Po skončení měření se ukáží naměřené hodnoty absorbance vašich standardů a teprve po kliknutí na panel *OK* program *WinAspect* vytvoří z naměřených údajů a vámi zadaných koncentrací kalibrační křivku. Vzniklou kalibrační křivku uložte (kliknutím na panel *File* a výběrem

položky *Save as...*) a pojmenujte následovně: *SíranSx* (x=číslo skupiny případně vaše iniciály apod).

### **Zjištění koncentrace síranu měďnatého v neznámém vzorku:**

Neznámý vzorek (předá vám ho vyučující) si odpipetujte do kyvety (2 ml) a vložte do spektrofotometru do pozice č. 2. V pozici č. 1 musí být umístěn referenční vzorek. Otevřete si v programu WinAspectPlus vámi uloženou kalibrační křivku *SíranSx* (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Open*). Otevře se vybraný soubor s kalibrační křivkou a s ním i podokno, kde se parametry měření nastavují kliknutím na položku *Measurement parameters* nacházející se na panelu *Edit*. Otevře se okno s parametry měření, které už bylo popsáno výše. Parametry měření překontrolujte. Měření koncentrace neznámého vzorku spustíte kliknutím myši na panel *To concentration*, a poté kliknutím na tlačítko *OK*. Po změření vzorku přístrojem se objeví tabulka, kde je na základě závislosti absorbance na koncentraci ukázaná naměřená koncentrace. Vámi zjištěnou koncentraci neznámého vzorku zapište.

Pokud koncentrace neznámého vzorku neseďí na kalibrační křivce a je příliš vysoká, vzorek zřed'te rozpouštědlem nejprve 1:1, v případě nutnosti i vícekrát, dokud po změření vzorku nebude koncentrace nalezena na kalibrační křivce. Ředění nezapomeňte zohlednit ve výpočtu koncentrace v neředěném vzorku.

Po dokončení měření kyvety opatrně, ale důkladně vymyjte vodou. Poté jej opláchněte acetonem a nechte vyschnout. (V případě, že používáte plastové kyvety, jenž jsou určeny pro měření látek ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra, vymyjte kyvety důkladně vodou a poté jej opláchněte ethanolem (pokud byste použili na plastové kyvety aceton, kyvety by se zničily).

#### **Příloha č. 4**

#### **Úloha č. 5 – Kvalitativní analýza neznámých vzorků – (materiál pro studenty a učitele)**

##### **Použité pomůcky:**

Odměrné baňky, mikropipeta (nastavitelný objem 100 – 1000  $\mu\text{l}$ ), kyvety

##### **Použité chemikálie:**

Kofein, methanol, modrá skalice, destilovaná voda, ibuprofen

##### **Úkoly:**

- **připravte vzorky standardů sloužící pro kvalitativní analýzu neznámého vzorku**
- **Změřte absorpční spektra standardů a neznámých vzorků UV/VIS spektrofotometrem**
- **Porovnáním získaných absorpčních spekter určete, které látky obsahují neznámé vzorky.**

##### **Postup:**

##### **Příprava standardů**

Aby bylo množství navážené látky vhodné, je nutné brát do úvahy rozpustnost látek a platnost Bouguerova–Lambertova–Beerova zákona a pohybovat se v koncentracích do  $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Připravte standardní roztok kofeinu o vhodné koncentraci navážením vypočteného množství kofeinu ve směsi methanol/voda v poměru 1 : 1. Standardní roztok ibuprofenu o vhodné koncentraci připravte navážením vypočteného množství ibuprofenu v methanolu. Standardní roztok síranu měďnatého o vhodné koncentraci připravte rozpuštěním vypočteného množství modré skalice v destilované vodě.

V následující tabulce 10, jsou uvedené rozpustnosti a relativní molekulové hmotnosti modré skalice, kofeinu a ibuprofenu.

**Tabulka 10.** Rozpustnosti a relativní molekulové hmotnosti modré skalice, kofeinu a ibuprofenu.

<b>Látka</b>	<b>Rozpustnost při teplotě v rozmezí 20 °C – 25 °C</b>	<b>Mr (g/mol)</b>
Modrá skalice	100 mg/ml ve vodě	249,7
Kofein	15–20 mg/ml ve vodě	194,2
Ibuprofen	50 mg/ml v methanolu	206,3

*Rozpustnosti a relativní molekulové hmotnosti modré skalice, kofeinu a ibuprofenu. [38, 39, 40, 41]*

#### **Návod:**

#### **Změření absorpčního spektra**

Protože jsou použity různá rozpouštědla, referenčním vzorkem bude kyveta obsahující pouze vzduch. Do druhé pozice autosampleru spektrofotometru vložte kyvetu obsahující 2 ml prvního standardu a změřte jeho absorbanci v rozsahu vlnových délek od 190 do 1100 nm. Stejně postupujte se zbývajících standardy. Nesahejte na část kyvety, kterou bude procházet paprsek, měření by tím bylo ovlivněné a tudíž nepřesné. (Pokud se otisky prstů či nečistoty nachází na vnější straně kyvety v části, kterou bude procházet paprsek, očistěte kyvetu buničinou.) Při vkládání kyvet do autosampleru přístroje se nebojte mírně zatlačit na víčko kyvety, kyveta by neměla přesahovat o více než 1 cm nad úroveň autosampleru.

Pro ovládání spektrofotometrů Analytik Jena SPECORD slouží softwarový program WinAspect Plus. Po každém prvním zapnutí spektrofotometru a počítače je nutné provést inicializaci spektrofotometru se softwarovým programem. To lze provést kliknutím na položku *Initialize Device*, která se nachází v menu *Measurement* nebo klávesovou zkratkou *Ctrl+G*. Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“. Pokud již někdo před vámi inicializaci provedl, není potřebné tento krok provádět.

V tomto programu se parametry měření se nastavují v položce *Set parameters*, která se nachází na panelu *Measurement*. Po kliknutí na položku *Set Parameters* se otevře okno, kde se zadávají parametry měření. V této úloze je úkolem vytvořit absorpční spektrum dané látky, proto je potřebné označit měření absorbance. V podokně *Display* tedy označte možnost *Absorbance*.

Aby bylo získáno spektrum samotného vzorku, nikoliv spektrum roztoku vzorku v rozpouštědle, musíte změřit kyvetu obsahující pouze rozpouštědlo (referenční vzorek), reference může být i vzduch. Změření referenčního vzorku se navolí v podokně *Correction*, kde zatrhněte možnost *Reference*. Nyní je třeba vybrat oblast spektra, ve kterém se bude měřit. Oblast spektra, zvolíte v záložce *Mode*, kde v *Meas. Mode* vyberte možnost *Spectral scan*. Nejvyšší možný rozsah vlnových délek je u tohoto přístroje od 190 nm do 1100 nm. V záložce *Accessories* zadejte počet vašich vzorků, které jste umístili do autosampleru spektrofotometru. Referenční vzorek by měl být vložen v pozici č. 1, proto nezapomeňte zaškrtnout možnost *1<sup>st</sup> position reference* a ve druhé pozici byste měli mít kyvetu obsahující standard. Po zadání všech potřebných údajů potvrďte tyto údaje kliknutím na tlačítko *OK*. Vlastní měření spustíte kliknutím na možnost *Start Measurement*. Tuto možnost lze najít jednak v menu *Measurement*, nebo lze použít rychlejší způsob, a to využitím postranního panelu *Measurement*, který se objeví po navolení kritérií měření. Po změření vzorků přístrojem program vytvoří absorpční spektrum. Získané absorpční spektrum si uložte a postupujte obdobně u zbylých standardů i u neznámých vzorků.

Po dokončení měření kyvetu opatrně, ale důkladně vymyjte vodou. Poté jej opláchněte acetonem a nechte vyschnout.



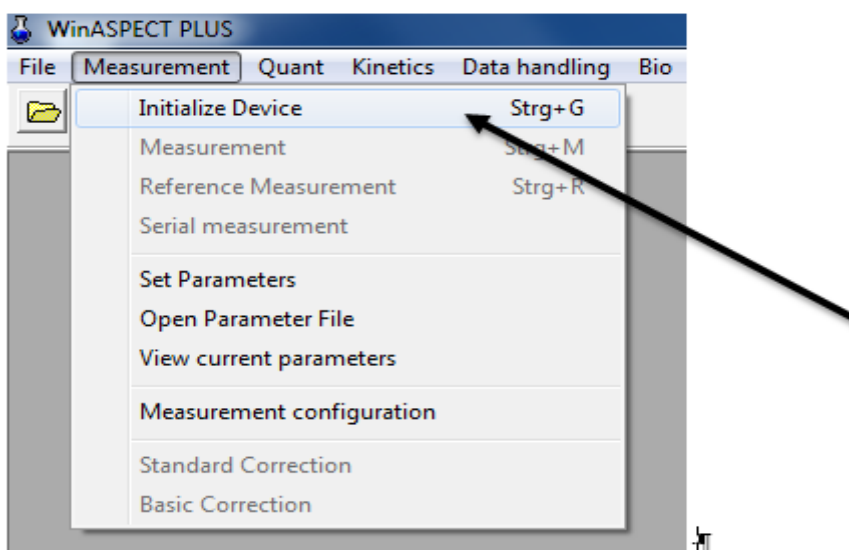
## Příloha č. 5

### Obecný popis stanovení neznámé koncentrace metodou kalibrační přímky v programu WinAspect Plus

Aby bylo možné úlohy modifikovat a nebylo potřebné znovu tvořit návod pro práci se softwarovým programem WinAspectPlus, byl vytvořen obecný popis pro stanovení koncentrace metodou kalibrační křivky, který kromě textu obsahuje i snímky z počítačové obrazovky vytvořené pomocí klávesy Printscreen.

#### **Návod pro práci se softwarovým programem WinAspect Plus**

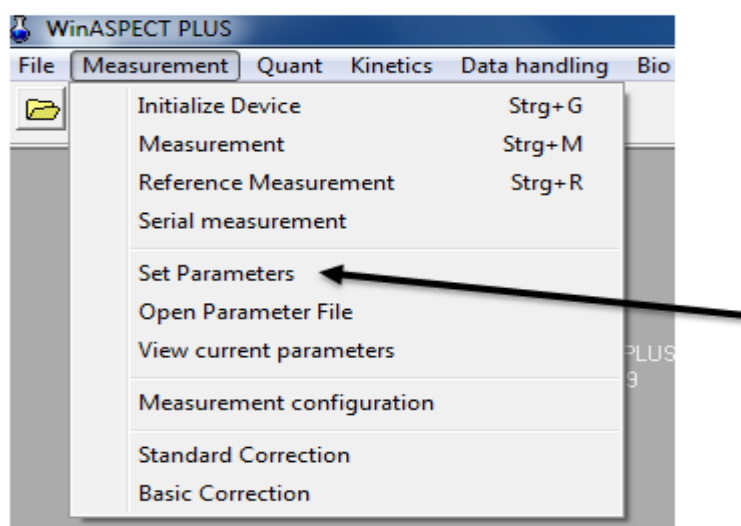
Pro ovládání spektrofotometrů SPECORD slouží softwarový program WinAspect Plus. Po každém prvním zapnutí spektrofotometru a zapnutí počítače je nejprve nutné provést inicializaci spektrofotometru se softwarovým programem. To lze provést kliknutím na položku *Initialize Device*, která se nachází v menu *Measurement* nebo klávesovou zkratkou *Ctrl+G*.



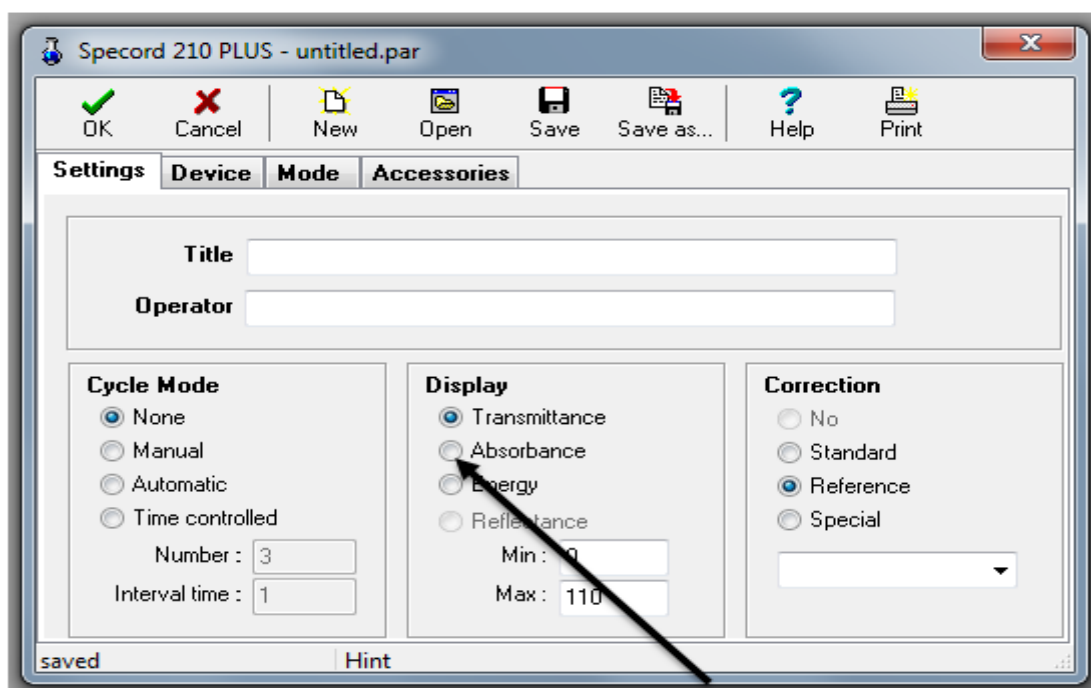
Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“.



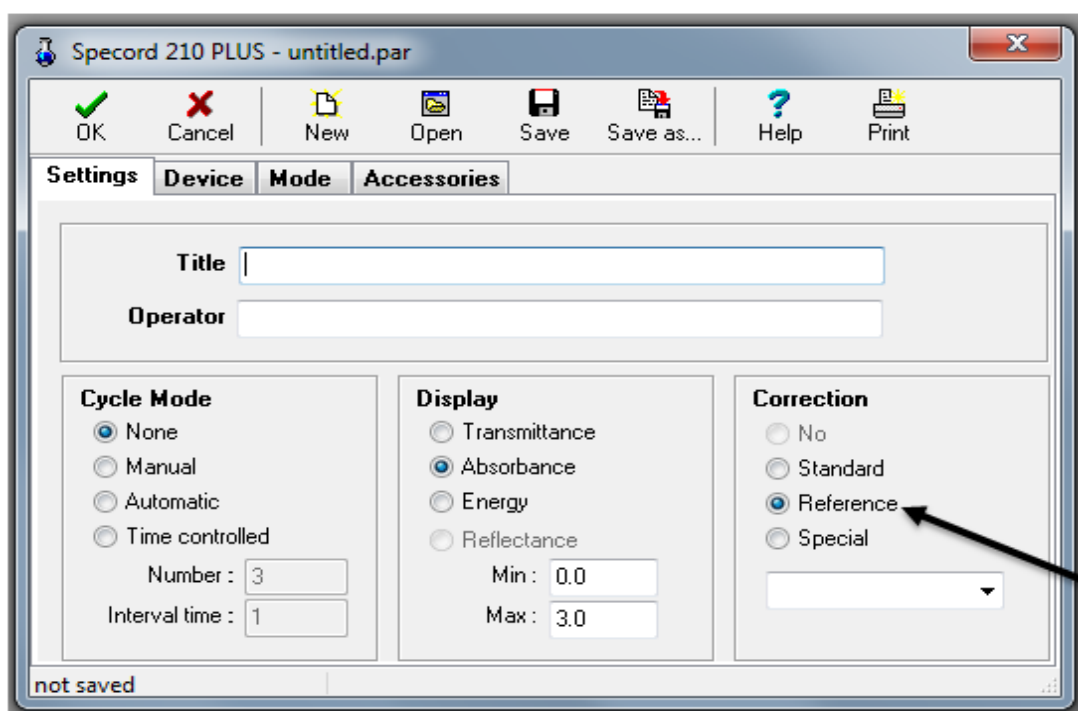
V tomto programu se parametry měření se nastavují v položce *Set parameters*, která je součástí menu *Measurement*.



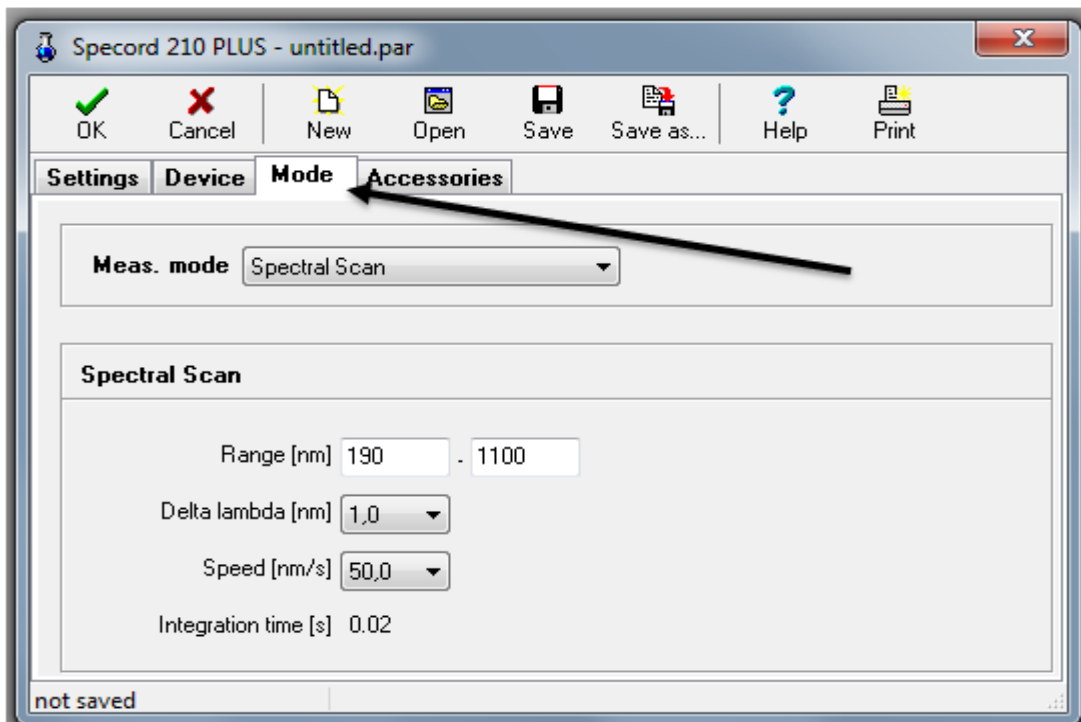
Po kliknutí na položku *Set Parameters* se otevře okno, kde se zadávají parametry měření. V této úloze je jedním z úkolů najít absorpční maximum dané látky, proto je potřebné označit měření absorbance. V podokně *Display* se tedy označí *Absorbance*.



Změření referenčního vzorku se navolí v podokně *Correction*, kde se zatrhne možnost *Reference*.

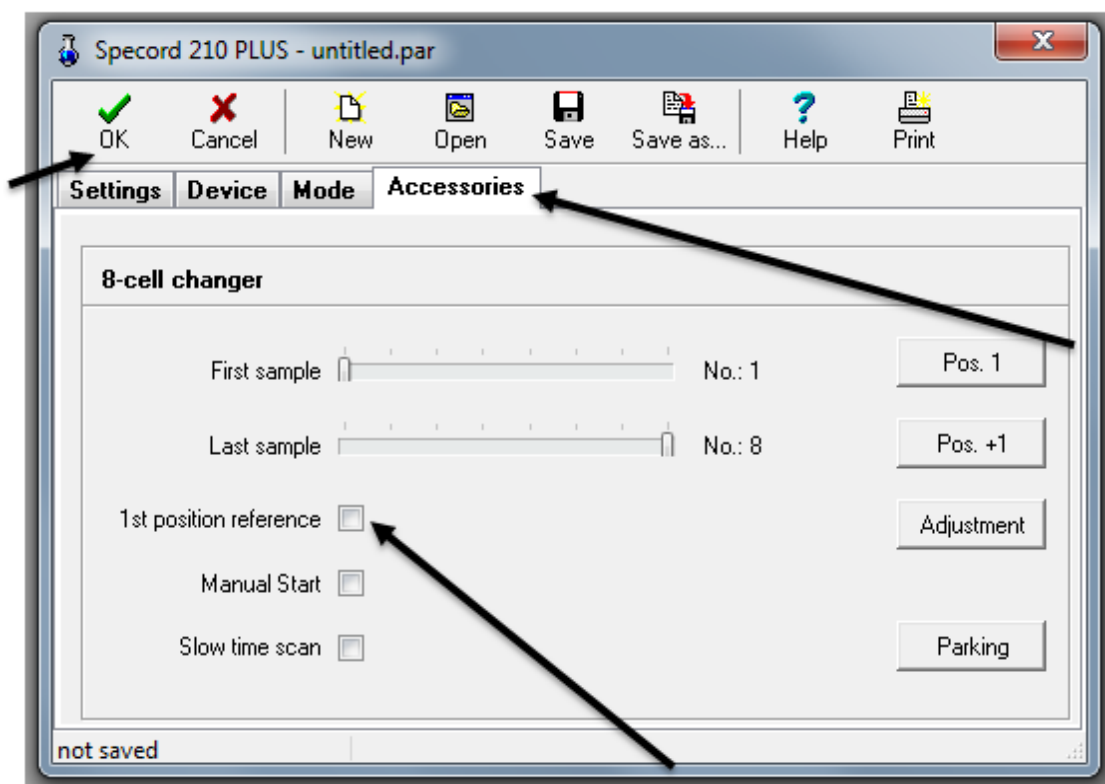


Oblast spektra, ve kterém se bude měřit, se navolí v záložce *Mode*.

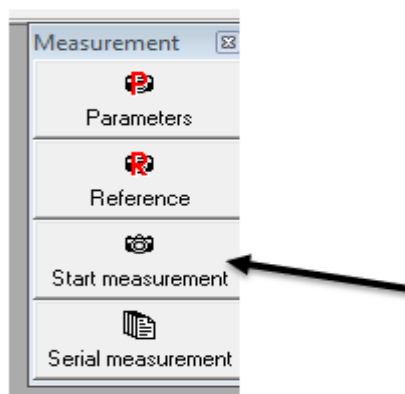


V této záložce při výběru *Meas. Mode Spectral Scan* je možné zadat rozmezí vlnových délek, ve kterém se bude měřit. Nejvyšší možný rozsah vlnových délek je u tohoto přístroje od 190 nm do 1100 nm. Pro vzorek, u kterého se neví, při jakých vlnových délkách bude ležet absorpční maximum, je nejlepší možností nechat změřit vzorek v nejvyšším možném rozsahu vlnových délek.

V záložce *Accessories* se zadává počet vzorků, které jsou umístěny v autosampleru spektrofotometru a které jsou požadovány na změření. Při použití referenčního vzorku je nutné vložit referenční vzorek do pozice č. 1 v autosampleru a v záložce *Accessories* zaškrtnout možnost *1<sup>st</sup> position reference*.



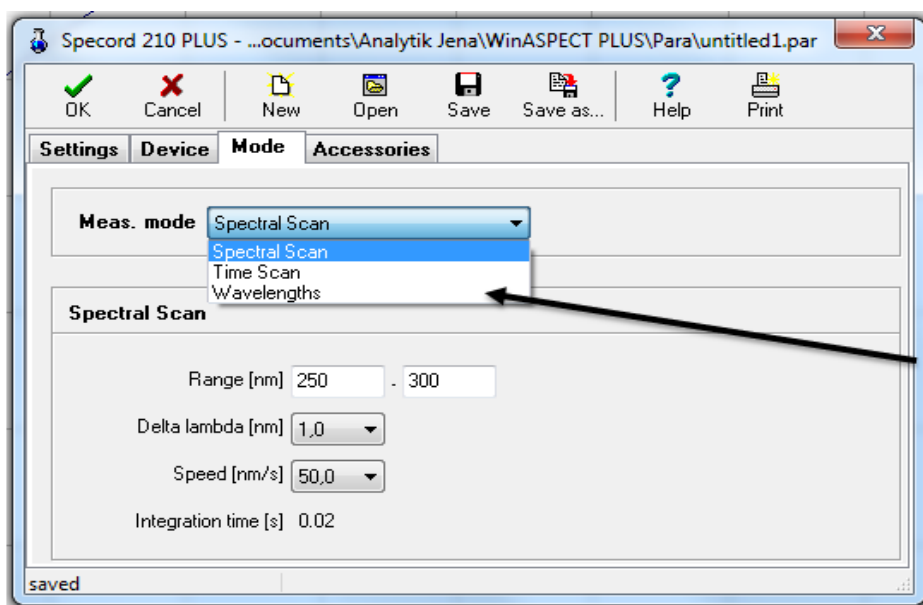
Navolené a zadané parametry měření se potvrdí kliknutím na panel s nápisem *OK*. Vlastní měření se spustí kliknutím na možnost *Start Measurement*. Tuto možnost lze najít jednak v menu *Measurement*, nebo lze použít rychlejší způsob, a to využitím postranního panelu *Measurement*, který se objev po navolení kritérií měření.



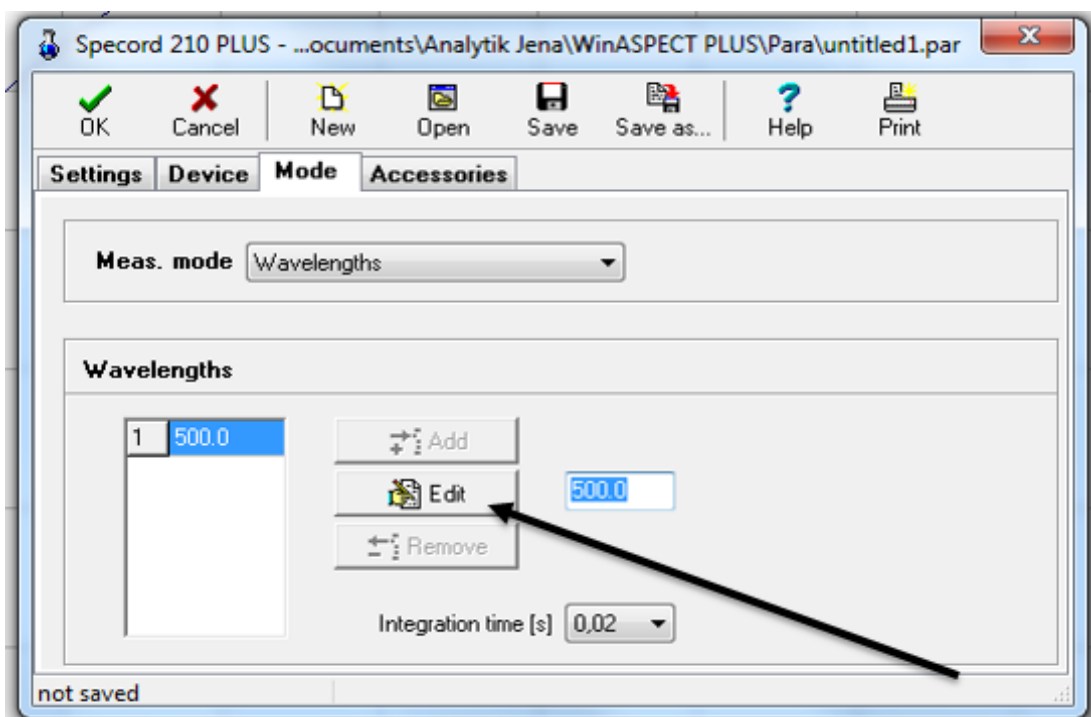
Po přeměření vzorků přístrojem program vytvoří graf, z kterého by mělo být možné vyčíst absorpční maxima. Při hledání absorpčního maxima je nutné brát do úvahy *Boguer–Lambert–Beerův zákon* (hodnoty absorbance byly v rozmezí hodnot  $< 0, 3 >$ ).

## Vytvoření kalibrační křivky

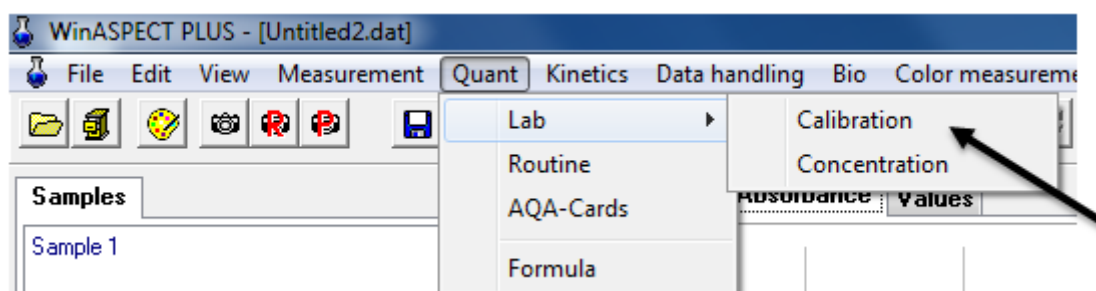
Referenční vzorek je nutné vložit do první pozice autosampleru ve spektrofotometru, do dalších pozicích se vkládají kyvety s kalibračními roztoky. Vhodné parametry měření se navolí v položce *Set parameters*, která se nachází v panelu *Measurement*. Hodnota zjištěného absorpčního maxima se zadává v záložce *Mode*, kde se poupraví režim měření *Meas. Mode* na změření vlnové délky *Wavelengths*.



Po navolení režimu ze *Spectral Scan* na režim *Wavelengths* se objeví podokno. Jestliže se v podokně ukáže hodnota jiná, než je hodnota nalezeného absorpčního maxima, lze tuto hodnotu jednoduše přepsat a poté kliknout na tlačítko *Edit*.

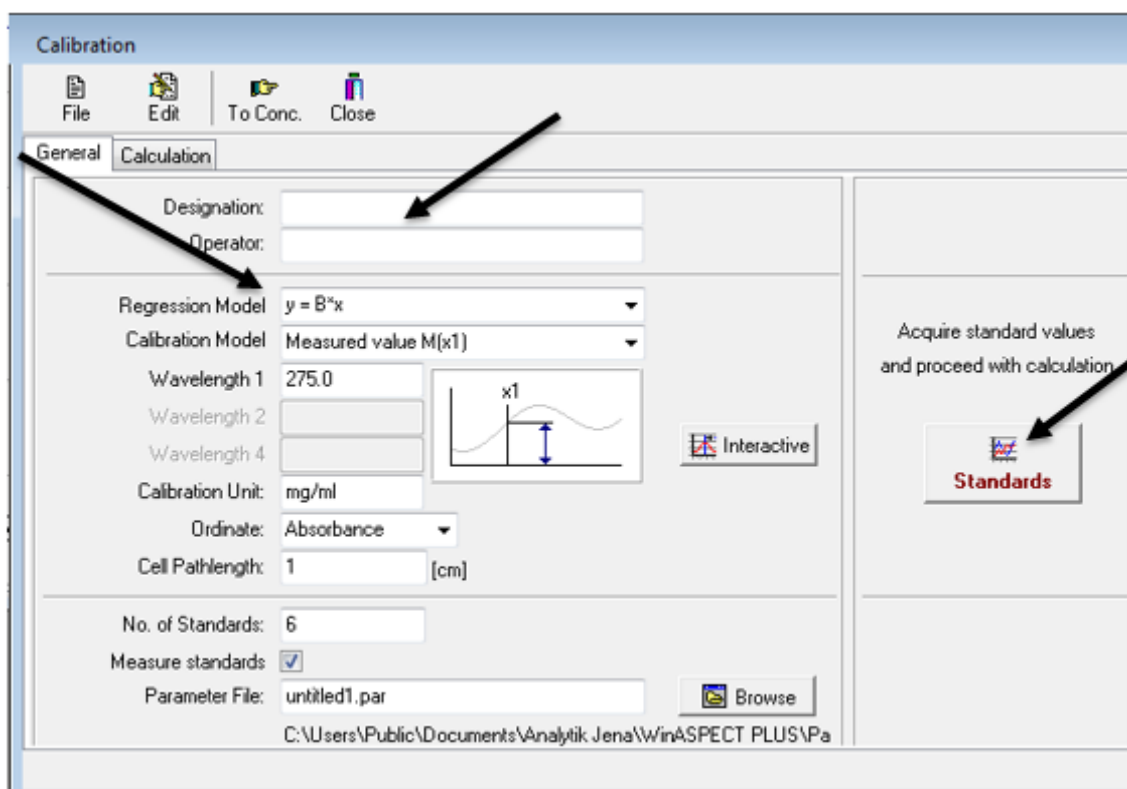


V záložce *Accessories* je potřebné ještě správně zadat počet kyvet v autosampleru a nezapomenout na zaškrtnutí možnosti referenčního vzorku. Po překontrolování všech údajů se změny potvrdí kliknutím na panel *OK*. K vytvoření kalibrační křivky slouží položka *Calibration*, ke které se lze dostat cestou na položku *Lab.* přes kliknutí v menu na *Quant* a poté přejetím kurzoru myši.

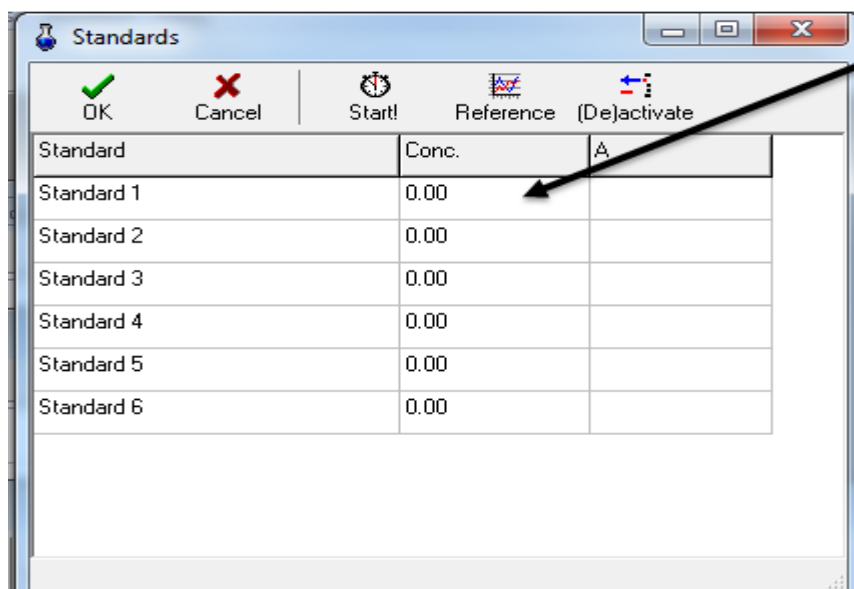


Po kliknutí na položku *Calibration* se otevře okno, kde se navolí parametry kalibrace. Protože se jedná o kalibrační přímku, je nutné zvolit *Regression Model:  $y = B * x$* .

Po zkontrolování dalších údajů, jako jsou jednotky, vlnová délka, režim měření, počet standardů se použije tlačítko *Standards*.

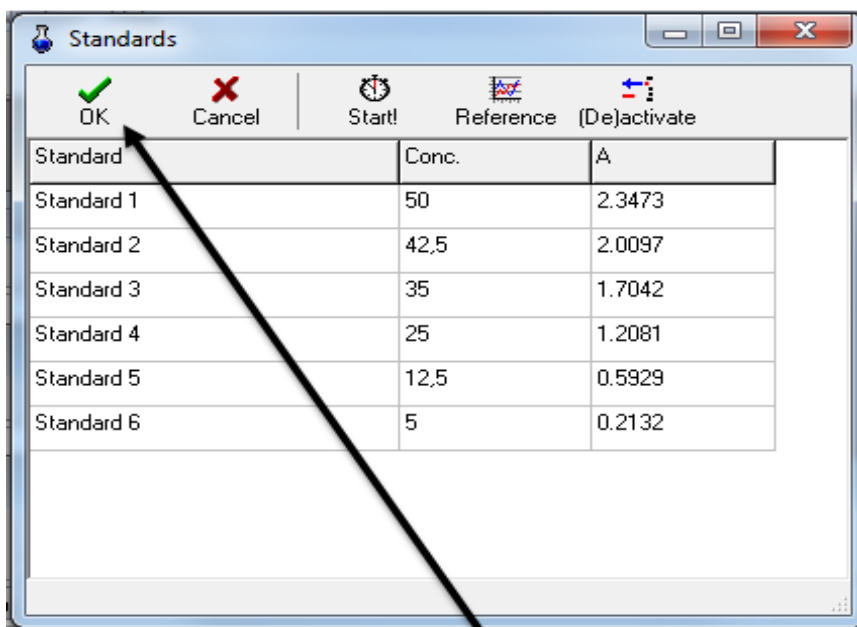


Objeví se další okno, ve kterém se navolí koncentrace připravených standardů. Koncentrace standardů se vpisují po kliknutí do dané buňky. Měření se začne kliknutím na panel *Start*.

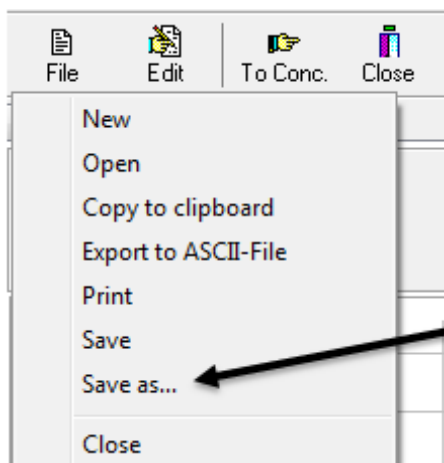




Po skončení měření, které může trvat pár minut, se ukáží naměřené hodnoty absorbance a teprve po kliknutí na tlačítko *OK* program WinAspect vytvoří z naměřených údajů a vámi zadaných koncentrací kalibrační křivku.



Vytvořenou kalibrační křivku lze uložit kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Save as...*, (tento panel se objeví společně s vytvořením kalibrační křivky).

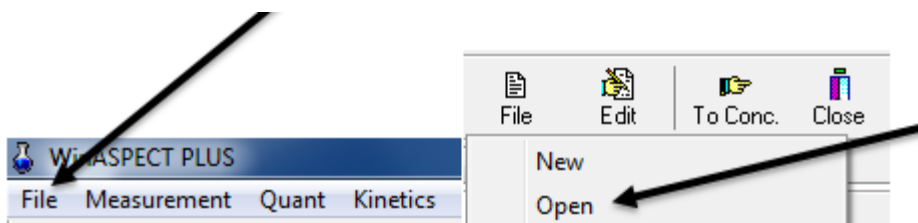


### **Zjištění koncentrace neznámého vzorku metodou kalibrační křivky**

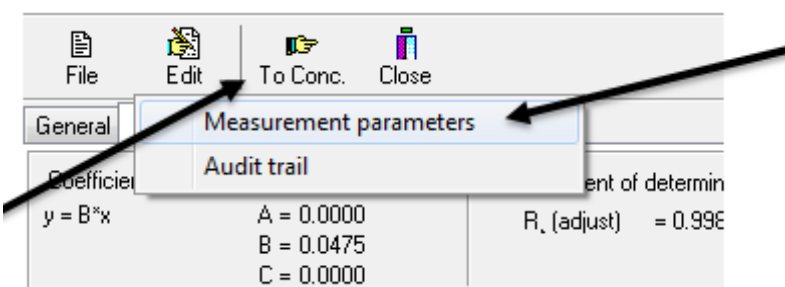
Poněvadž je objem roztoku v kyvetách 2 ml, je nutné odpipetovat do kyvety 2 ml z neznámého vzorku (vzorek o neznámé koncentraci je připraven v zásobní láhvi s příslušným označením). V první pozici autosampleru je nutné mít referenční vzorek

a neznámý vzorek se vkládá do dalších pozic, v tomto případě do druhé pozice v autosampleru.

Nyní je potřeba otevřít si soubor s kalibrační křivkou, to lze kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Open*, nebo pokud toto podokno není vyvolané, lze jej otevřít kliknutím na menu *File* a opět výběrem *Open*.

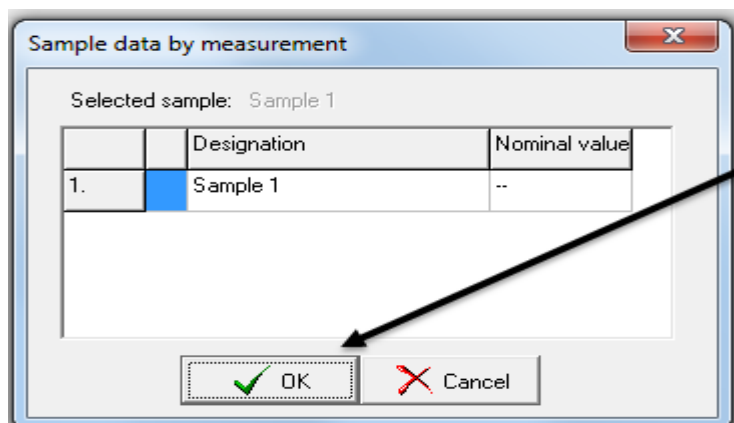


Otevře se vybraný soubor s kalibrační křivkou a s ním i podokno, kde se parametry měření nastavují kliknutím na položku *Measurement parameters* nacházející se na panelu Edit.



Otevře se okno s parametry měření, které už bylo popsáno výše.

Měření koncentrace neznámého vzorku se spustí kliknutím myši na panel *To concentration* a poté kliknutím na tlačítko *OK*.



Po změření vzorku přístrojem se objeví tabulka, kde je vypsána naměřená koncentrace.

File Edit Start (File) Start (Meas.) Reference Close					
Parameters		Concentrations		Calibration Data	
No.	Sample name	Date/Time	Conc.		
1	Sample 1	24.2.2016 11:04:15	31.32		

