

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A INFORMATIKY

Měření koncentrací roztoků spektrofotometrem

Petr Laštovička

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr LAŠTUVIČKA**  
Studijní program: **B2612 Elektrotechnika a informatika**  
Studijní obor: **Komunikační a mikroprocesorová technika**  
  
Název tématu: **Měření koncentrací roztoků spektrofotometrem**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu týkající se měření koncentrací roztoků metodou spektrální fotometrie.
2. Vypracujte na základě nabídek firem přehled dostupných fotometrů na trhu.
3. Prostudujte manuál Spektrofotometru 722 PC, popište jeho základní parametry a metodiku měření koncentrací roztoků.
4. Navrhněte metodiku fotometrické titrace chelatometrického indikátoru PH.
5. Proveďte experiment a měření na tomto fotometru na základě navržené metodiky.
6. Vypracujte návod laboratorní úlohy fotometrické titrace.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Váňa J.: **Analyzátory plynů a kapalin**. SNTL Praha 1984 Kolektiv autorů.:  
**Instrumentální analýza**, 1986, SNTL Praha. Vytřas K. a kol.: **Laboratorní  
cvičení z anal. chemie. Část II: Instrumentální analýza (skripta)**, 1996,  
UPa

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Miroslav Fribert, Dr.**  
Katedra elektrotechniky

Datum zadání bakalářské práce: 15. ledna 2009

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. května 2009



doc. Ing. Simeon Karamazov, Dr.

děkan



Ing. Zdeněk Němec, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 31. března 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 15. 5. 2009

Petr Laštovička

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce, Ing. Miroslavu Fribertovi, Dr., za odborné vedení v celém průběhu práce. Chtěl bych také poděkovat Ing. Pavlu Rozsivalovi za rady, připomínky a návrhy k laboratorním měřením.

## **Souhrn**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou měření koncentrací pomocí molekulové absorpční spektrometrie. Popisuje metody a přístroje používané k provedení kvantitativní analýzy neboli spektrofotometrie. Praktická část je zaměřena na návrh laboratorní úlohy z oblasti měření neelektrických veličin realizovatelné na spektrofotometru Labio 722 pro viditelnou oblast světelného spektra.

## **Klíčová slova**

Spektrofotometrie, absorbance, koncentrace roztoku, kalibrace

## **Title**

Concentrations measuring of solutions using spectrophotometer

## **Abstract**

This bachelor work deals with a concentrations measuring with the aid of molecular absorption spectrometry. It describes the method and devices used for performing of the quantitative analysis called also spectrofotometry. The practical part is focused on the concept of technological quantities measuring realized with the spectrophotometr Labio 722 for visible range luminous spectra.

## **Keywords**

Spectrophotometry, absorption, concentracion of solution, calibration

## Obsah

Úvod.....	11
1 Molekulová absorpční spektrometrie.....	12
1.1 Energetické hladiny molekul.....	13
1.2 Intenzita pásu a absorpční koeficient.....	14
2 Kvantitativní analýza – spektrofotometrie.....	16
2.1 Základní pojmy, absorpční Lambert-Beerův zákon.....	16
2.2 Spektrofotometrie.....	18
2.2.1 Využití spektrofotometrie v praxi.....	20
2.3 Spektrofotometrické systémy.....	21
2.3.1 Absorpční fotometry pro viditelnou oblast.....	21
2.3.2 Konstrukční prvky spektrálních fotometrů.....	24
3 Přehled fotometrů a spektrofotometrů na trhu.....	28
3.1 Stručný vývoj fotometrů a spektrofotometrů.....	28
3.2 Příklady některých fotometrů a spektrofotometrů dostupných na trhu kolem roku 1973.....	29
3.3 Současné fotometry a spektrofotometry dostupné trhu.....	31
4 Spektrofotometr Labio 722 pro viditelnou oblast.....	37
4.1 Hlavní způsoby použití.....	37
4.2 Základní specifikace.....	37
4.2.1 Princip funkce.....	37
4.2.2 Optické uspořádání.....	38
4.2.3 Vnější vzhled.....	40
4.2.4 Ovládací klávesy.....	40
4.2.5 Kalibrace přesnosti nastavení vlnové délky.....	41
5 Měření koncentrací.....	42
5.1 Určení neznámé koncentrace roztoku.....	42
5.1.1 Osnova postupu měření.....	42
5.1.2 Přístroje a pomůcky.....	42
5.1.3 Postup měření.....	43
5.1.4 Naměřené a vypočtené hodnoty.....	44
5.1.5 Příklady výpočtů.....	48
5.1.6 Závěry z měření.....	49
5.2 Návrh laboratorní úlohy na využití spektrofotometru pro měření koncentrací.....	49
6 Závěr.....	51

## Seznam obrázků:

Obr. 1 Diagram energetických hladin molekuly <sup>[4]</sup> .....	14
Obr. 2 Absorpční spektra feneanthernu v různých souřadnicích <sup>[4]</sup> .....	15
Obr. 3 Ukázka kalibrační křivky pro neznámý vzorek <sup>[7]</sup> .....	20
Obr. 4 Schéma jednopaprskového spektrofotometru UV/VID <sup>[4]</sup> .....	22
Obr. 5 Optické schéma dvoupaprskového spektrometru UV/VID <sup>[4]</sup> .....	23
Obr. 6 Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru <sup>[8]</sup> .....	25
Obr. 7 Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru <sup>[4]</sup> .....	27
Obr. 8 Fotometr SP-1300 Unicam <sup>[5]</sup> .....	29
Obr. 9 Langeho dvoupaprskový fotometr <sup>[5]</sup> .....	30
Obr. 10 Spektrofotometr Spekol VEB <sup>[5]</sup> .....	31
Obr. 11 Přenosný fotometr pFotoFlex <sup>[11]</sup> .....	32
Obr. 12 Spektrofotometr S800 <sup>[12]</sup> .....	33
Obr. 13 Spektrofotometr Spekol 1300 <sup>[12]</sup> .....	34
Obr. 14 Dvoupaprskový spektrofotometr T60 <sup>[13]</sup> .....	35
Obr. 15 Fotometr PhotoLab® Spektra <sup>[11]</sup> .....	36
Obr. 16 Procesní Spektrofotometr ER50 <sup>[14]</sup> .....	36
Obr. 17 Procházení světla kyvetou <sup>[6]</sup> .....	38
Obr. 18 Optické uspořádání spektrofotometru 722 <sup>[6]</sup> .....	39
Obr. 19 Vnější vzhled spektrofotometru 722 <sup>[6]</sup> .....	40
Obr. 20 Přístroje a pomůcky .....	43
Obr. 21 Kalibrační křivka $A = f(c)$ při vlnové délce $\lambda = 590 \text{ nm}$ .....	45
Obr. 22 Charakteristika absorpčního spektra destilované vody. $A_{(\text{vody})} = f(\lambda)$ .....	47
Obr. 23 Charakteristika absorpčního spektra roztoku $A_{(\text{roztoku})} = f(\lambda)$ .....	47
Obr. 24 Charakteristika absorpčního spektra roztoku $A_{(\text{RV})} = f(\lambda)$ .....	48



## Seznam tabulek:

Tab. 1 Barvy viditelného světla a barvy doplňkové.....	12
Tab. 2 Parametry fotometru SP-1300 Colorimeter Unicam .....	29
Tab. 3 Parametry Langeho fotometru .....	30
Tab. 4 Parametry spektrofotometru Spekol VEB .....	31
Tab. 5 Parametry dvoupraskového spektrofotometru T60.....	35
Tab. 6 Parametry spektrálního fotometru PhotoLab® Spektra.....	35
Tab. 7 Základní specifikace spektrofotometru 722.....	37
Tab. 8 Hodnoty naměřené absorbance A v závislosti na vlnové délce $\lambda$ .....	45
Tab. 9 Naměřené absorbance všech roztoků, při vlnové délce $\lambda = 590$ nm.....	46

## Seznam zkratk:

- UV.....viditelná oblast spektra
- VID.....ultrafialová oblast spektra
- LCD.....(Liquid Crystal Display) – displej z tekutých krystalů
- pH.....vodíkový exponent vyjadřující kyselost roztoků
- LED.....(Light Emitting Diode) – dioda vyzařující světlo
- RS 232C.....sériový port
- SW.....(Software) – programové vybavení
- PC.....(Personal Computer) – osobní počítač
- DNA.....deoxyribonukleová kyselina, která je nositelkou genetické informace
- PCMA.....(Peripheral Component Micro Architecture) – předprogramovatelné paměťové karty pro různé aplikace

# Úvod

Absorpční fotometrie náleží k nejstarším fyzikálně chemickým metodám. Dokazuje to i fakt, že první fotometrická měřící metoda byla popsána již v roce 1845. Nejintenzivnější vývoj absorpční fotometrie však nastal až po 2. světové válce a to jak v přístrojové technice, tak i v metodice. Na trhu se objevuje mnoho nových přístrojů, od jednoduchých až po ty nejsložitější spektrofotometry. Ultrafialová oblast se posunuje pod 200 nm, místo vodíkové výbojky nastupuje deuteriová, používají se dokonalejší filtry. Byla sestrojena také kyveta, jež se automaticky nasává i vyprazdňuje. Zdokonaluje se detekce i automatizovaný zápis spektra, a to i mimo viditelnou spektrální oblast.

Absorpční fotometrie prošla od této doby vývojem delším než kterákoli jiná fyzikálně chemická analytická metoda. V dnešní době, především díky rozvoji mikroprocesorové techniky, jde vývoj v této oblasti měření stále dopředu. Lze tedy vzhledem ke všem těmto okolnostem předpokládat, že budoucí perspektiva absorpční fotometrie je více než příznivá.

Tato bakalářská práce je zaměřena na seznámení se s problematikou molekulové absorpční spektrometrie a metodikou jejího stanovení. Jejím cílem je navrhnout měřící laboratorní úlohu realizovatelnou na spektrofotometru pro viditelnou oblast Labio 722.

V první kapitole jsou popsány základy molekulové absorpční spektrometrie a energetické hladiny molekul. Druhá kapitola se zabývá základními pojmy kvantitativní analýzy neboli spektrofotometrie a jejím využití v praxi. Kapitola uvádí, jak pracují spektrofotometrické systémy a jaké je jejich konstrukční provedení. Ve třetí kapitole je popsán stručný vývoj a přehled fotometrů a spektrofotometrů, které v minulosti byly a nyní jsou k dostání na našem trhu. Čtvrtá kapitola je věnována Spektrofotometru Labio 722 pro viditelnou oblast. Jsou zde uvedeny jeho základní specifikace, funkce, optické uspořádání a způsob ovládání. Pátá kapitola se zabývá praktickou částí práce, popisuje výsledky měření jednotlivých metod jak teoretických, tak praktických. V závěru je shrnut přínos a výsledky bakalářské práce.

# 1 Molekulová absorpční spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie je založena na měření a interpretaci změn, které nastávají v molekulách při absorpci elektromagnetického záření v oblasti blízké ultrafialové a viditelné části spektra, tj. v rozmezí vlnových délek asi 200 až 800 nm. Látky, které absorbují pouze ultrafialové záření, tj. o vlnové délce  $\lambda < 380$  nm, se jeví lidskému oku jako bezbarvé. Ty látky, které pohlcují z bílého slunečního světla záření o vlnových délkách mezi 380 až 770 nm, se jeví jako barevné. Například látka se jeví jako purpurová, když pohlcuje z bílého slunečního světla záření vlnových délek 500 až 550 nm, tedy záření zelené. Říkáme, že k barvě purpurové je doplňková čili komplementární barva zelená. Další příklady vlnových délek s odpovídající barvou světla a této barvě příslušející komplementární zbarvení absorbující látky jsou uvedeny v tabulce 1. Pokud roztok absorbuje určitou vlnovou délku viditelného spektra (viz. prostřední sloupec tab.1), jeví se nám tento roztok jako barevný. Ostatní vlnové délky roztokem projdou, avšak pozorované zbarvení roztoku je dáno doplňkovou (komplementární) barvou k barvě pohlcené (viz. sloupec vpravo tab.1).

Tab. 1 Barvy viditelného světla a barvy doplňkové

$\lambda/\text{nm}$	Barva – absorbovaná část VID spektra	Doplňkové zbarvení – propuštěná barva
400 - 435	fialová	žlutozelené
435 - 480	modrá	žluté
480 - 490	zelenomodrá	oranžové
490 - 500	modrozelená	červenooranžové
500 - 560	zelená	purpurové
560 - 580	zelenožlutá	fialové
580 - 595	žlutá-oranžová	modré
595 - 610	červenooranžová	zelenomodré
620 - 760	červená	modrozelené

Kvanta zářivé energie (řádově 200 až 600 kJ mol<sup>-1</sup>), dodávaná při absorpci molekulám, postačují k přechodu jejich elektronů z nižších do vyšších energetických hladin. Podle toho se uvedený obor měření také nazývá *oblast elektronových spekter*.

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami, z ostatních jsou to třeba energetické přechody způsobené rotacemi nebo

vibracemi molekul. Tyto přechody nám pak vytváří jednotlivé energetické podhladiny molekul.

Proměření elektronových spekter, tedy zjištění vlnových délek, na kterých dochází k přechodu do vyšší hladiny, umožňuje identifikaci určitých anorganických a zejména organických látek v jejich roztocích. Větší význam než pro kvalitativní a strukturní analýzu má však molekulová absorpční spektrometrie pro stanovení malých koncentrací látek. Tato kvantitativní analýza (spektrofotometrie) je založena na Lambert-Beerově zákoně.

## 1.1 Energetické hladiny molekul

Absorpci záření molekulami lze sledovat ve vzorcích všech skupenství. Za běžných laboratorních podmínek měření jsou molekuly v základní elektronové i vibrační hladině. Při pohlcení fotonu se celková energie molekuly (kterou lze uvažovat jako součet energie elektronové, vibrační a rotační) zvyšuje a molekula přechází do excitovaného stavu. Rozdíl energie mezi stavem excitovaným, jemuž odpovídá vyšší energetická hladina  $E_1$ , a stavem základním s energetickou hladinou  $E_0$  musí být roven přijatému kvantu záření podle rovnice:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = hc / \lambda \quad (1.1)$$

$\Delta E$  rozdíl energetických hladin molekuly

$E_1$  vyšší energetická hladina

$E_0$  základní energetická hladina

$\nu$  frekvence (vlnčet) fotonu

$h$  Planckova konstanta (v jednotkách SI:  $h = 6,62606896(33) \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ )

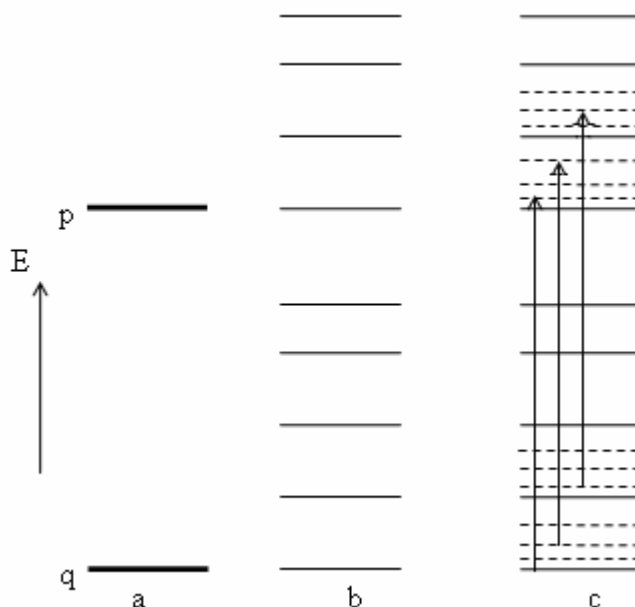
$c$  rychlost světla ( $299\,792\,458 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ )

$\lambda$  vlnová délka

Jak tedy vidíme z rov.1.1, vzdálenost dvou energetických hladin, mezi kterými molekula přechází, přímo určuje vlnovou délku elektromagnetického záření, které molekula pohlcuje.

Doba, po kterou molekula setrvává v excitovaném stavu, je nepatrná (řádově  $10^{-9}$  s). Různými nezářivými, popř. i zářivými deexcitačními mechanismy přechází

molekula zpět do základního stavu, čímž se udržuje rovnováha ve prospěch molekul v základním stavu.



Obr. 1 Diagram energetických hladin molekuly <sup>[4]</sup>  
a) elektronové hladiny: q – spodní, p – vrchní; b) vibrační podhladiny (vyznačeny slabou čarou); c) rotační podhladiny (vyznačeny čárkovaně)

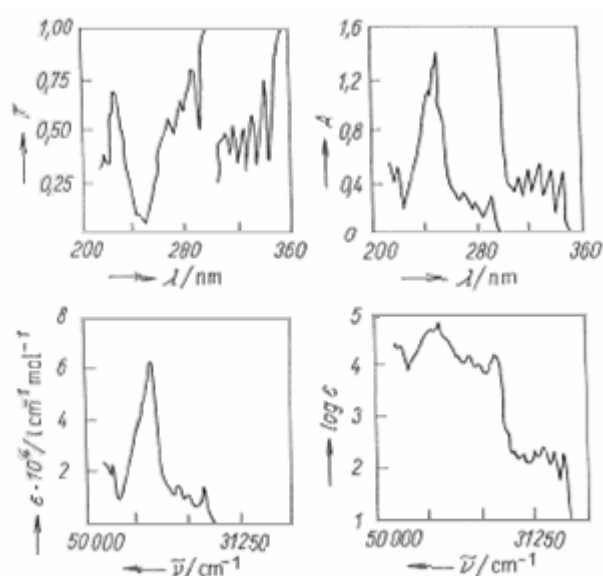
Schématické znázornění kvantitativních poměrů v energetických hladinách a rozdíly  $E_1 - E_0$  vyplývají z diagramu na obr.1. Pro velký počet jednotlivých podhladin, které se mohou při absorpci uplatnit, splývají při měření běžným spektrometrem v kapalném prostředí soustavy absorpčních čar odpovídající jednotlivým přechodům v plynulý pás. Tvar pásu je více či méně symetrický s maximem při určité vlnové délce  $\lambda_{\max}$ , kde je absorpce největší. Absorpční spektra složitých molekul mívají více absorpčních pásů, které se často navzájem překrývají a vytvářejí křivky s nevýraznými maximy.

## 1.2 Intenzita pásu a absorpční koeficient

Absorpční přechod je charakterizován energií, resp. vlnovou délkou příslušející maximu pásu  $\lambda_{\max}$  a intenzitou, tj. výškou pásu. Intenzita pásu čisté látky se v praxi vyjadřuje pomocí *molárního absorpčního koeficientu* v maximu pásu  $\epsilon_{\max}$ , jehož hodnota se vypočítá z absorpance  $A_{\max}$  zjištěné při  $\lambda_{\max}$  podle Lambert-Beerova zákona (rov.2.7). Jednotkou  $\epsilon$  v soustavě SI je  $\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$ . Při analýze roztoků se ale běžně vyjadřuje látková koncentrace v  $\text{mol l}^{-1}$  a tloušťka měrné kyvety v cm.

V tomto případě se hodnoty molárních absorpčních koeficientů udávají v jednotkách  $l\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ .

Hodnoty  $\varepsilon_{\max}$  jsou řádově  $10^3$  až  $10^4\text{ m}^2\text{ mol}^{-1}$ , tj.  $10^4$  až  $10^5\text{ l cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$  pro nejintenzivnější absorpční pásy. Hodnoty  $\varepsilon_{\max}$  pro přechody, které mají menší pravděpodobnost, jsou až o 4 řády nižší. Pro tyto řádové rozdíly se graficky znázorňují absorpční elektronová spektra čistých látek jako závislosti  $\log \varepsilon$  na vlnočtu. Takové závislosti se tradičně nazývají *typické barevné křivky* látek. Rozdíly v tvaru elektronového spektra při různém vyjádření absorpční intenzity jsou patrné z obr.2.



Obr. 2 Absorpční spektra feneanthernu v různých souřadnicích <sup>[4]</sup>  
T – transmittance, A – absorbance,  $\varepsilon$  – molární absorpční koeficient,  
 $\lambda$  – vlnová délka (nm),  $\tilde{\nu}$  – vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )

## 2 Kvantitativní analýza – spektrofotometrie

### 2.1 Základní pojmy, absorpční Lambert-Beerův zákon

Všechny absorpční metody v oboru optických spekter jsou založeny na měření propustnosti čili transmittance (popř. veličin od ní odvozených, absorptance a absorbance) monochromatického záření sledovanou soustavou částic. Propustnost čili *transmittance*  $T$  je definována poměrem toku záření soustavou propouštěného  $\Phi$  k toku vstupujícímu  $\Phi_0$ :

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (2.1)$$

$T$  transmittance

$\Phi$  tok záření propouštěný soustavou

$\Phi_0$  tok záření do soustavy vstupující

*Absorptance* je podíl absorbovaného záření:

$$\alpha = \frac{\Phi_0 - \Phi}{\Phi_0} = 1 - T \quad (2.2)$$

$\alpha$  absorptance

$T$  transmittance

*Absorbance* je definována vztahem

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = -\log T \quad (2.3)$$

$A$  absorbance

Hodnoty propustnosti se často uvádějí v procentech  $\{T\}\% = 100T$ , stejně tak absorptance. Z definic (2.1) a (2.3) vyplývají krajní hodnoty těchto veličin:  $T < 1 ; 0 >$  a  $A < 0 ; \infty >$ . Při měření propustnosti musí být měřené systémy čiré, aby se odstranily ztráty rozptylem na heterogenních suspendovaných částicích. V praxi se tok  $\Phi_0$  nestanovuje, ale měří se toky propouštěné, a to jednak roztokem se vzorkem ( $\Phi$ ), jednak roztokem referenčním ( $\Phi_R$ ), který neobsahuje absorbující částice. Poměr  $\Phi/\Phi_0$  je prakticky roven  $\Phi/\Phi_R$ . Tímto postupem se kompenzují ztráty toku způsobené



jednak odrazem od stěny kyvety, jednak absorpcí doprovodných látek včetně rozpouštědla (neselektivní absorpcí).

Transmitance, resp. absorbance vzorku se mění s vlnovou délkou záření a závisí i na počtu absorbujících částic v dráze paprsku, tedy na koncentraci částic a na tloušťce vrstvy, kterou paprsek prochází. Závislost T, resp. A na vlnové délce při konstantní koncentraci látky a tloušťce vrstvy představuje *absorpční spektrum látky*, které je charakteristické pro tuto látku. Pro zjištění koncentrace je důležitý vztah mezi ní a tloušťkou vrstvy a hodnotou absorbance (transmitance) měřené při určité vlnové délce. Tento vztah matematicky popisuje **Lambert-Beerův zákon**. Podle tohoto zákona klesá propouštěný tok záření  $\Phi_\lambda$  exponenciálně s tloušťkou vrstvy b a s počtem částic N v objemové jednotce, tj. s koncentrací:

$$\Phi_\lambda = \Phi_0 \cdot 10^{-a_\lambda b N} \quad (2.4)$$

$\Phi_\lambda$  propouštěný tok záření

$a_\lambda$  monochromatický absorpční koeficient ( $\text{cm}^2$ )

b tloušťka vrstvy (kyvety) (cm)

N počet částic v objemové jednotce ( $\text{cm}^{-3}$ )

V tomto vyjádření lze pohlížet na absorpční koeficient jako na „účinný průřez“ molekuly či atomu při absorpci fotonu. Z rovnice (2.4) plyne pro **transmitanci**:

$$T_\lambda = 10^{-a_\lambda b N} \quad (2.5)$$

a pro **absorbanci**

$$A_\lambda = a_\lambda b N \quad (2.6)$$

Při analýze roztoků se koncentrace vyjadřuje buď jako látková c ( $\text{mol l}^{-1}$ ) nebo hmotnostní  $\rho$  ( $\text{g l}^{-1}$  nebo  $\text{mg l}^{-1}$ ). **Lambert-Beerův zákon** pak píšeme:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda bc \quad (2.7)$$

$$A_\lambda = \alpha_\lambda b\rho \quad (2.8)$$

kde  $\varepsilon_\lambda$  je molární absorpční koeficient ( $\text{mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ ) pro čisté látky a  $b$  tloušťka kyvety (cm).

Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že je mezný a platí jen pro monochromatické záření a zředěné roztoky, v nichž absorbující částice nepodléhají žádným interakcím. V jiných případech často pozorujeme, že zjištěná závislost  $A$  na  $c$  se při větších hodnotách  $c$  ohýbá k ose koncentrací. Obsahuje-li roztok více druhů částic absorbujících záření při dané délce, platí aditivita absorbancí, tj. absorbance roztoku je součtem příspěvků absorbancí jednotlivých částic.

$$A_\lambda = b \sum_{i=1}^n (\varepsilon_\lambda)_i c_i \quad (2.9)$$

$A_\lambda$	absorbance roztoku
$i = 1, \dots, n$	absorbující složky
$b$	tloušťka kyvety (cm)
$\varepsilon_\lambda$	molární absorpční koeficient ( $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) jednotlivých složek
$c$	látková koncentrace (mol/ litr)

## 2.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrická stanovení koncentrací se provádějí téměř výhradně při hodnotách vlnových délek odpovídajících maximu absorpčního pásu, protože molární absorpční koeficient je zde nejméně závislý na spektrální šířce štěrbin a jeho hodnota zde bývá značně vysoká, což umožňuje citlivá stanovení. Často lze určovat i koncentrace spadající do oblasti stopové analýzy.

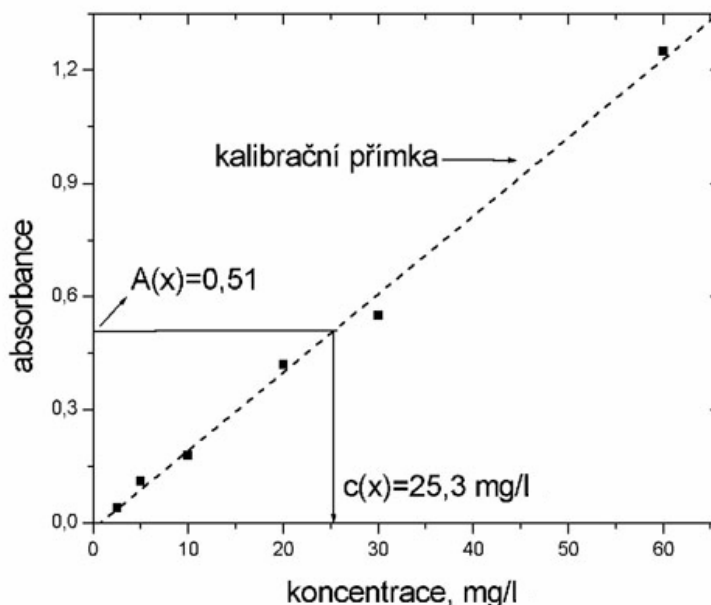
Kvantitativní neboli spektrofotometrické hodnocení je v podstatě vždy založeno na Lambert-Beerově zákoně. Základní podmínkou platnosti úměrnosti mezi absorbancí a koncentrací je konstantní hodnota molárního absorpčního koeficientu.

Jeho hodnota však závisí nejen na vlnové délce, ale i na druhu rozpouštědla a na přítomnosti dalších látek. Někdy závisí i na koncentraci samotné stanovené látky, např. když tato látka podléhá v analyzovaném roztoku rovnovážným reakcím (disociaci, asociaci, tvorbě komplexu s jinou látkou aj.), které vedou ke vzniku částic s odlišnými hodnotami  $\epsilon_\lambda$ . V těchto případech Lambert-Beerův zákon neplatí a při kvantitativní analýze je třeba s uvedenými vlivy počítat.

V nejjednodušším případě fotometrické analýzy přísluší hodnota naměřené absorbance jedné složce. Jsou-li v roztoku přítomny další složky, které absorbují při stejné vlnové délce, pak zjištěná hodnota absorbance je součinem hodnot příslušejících jednotlivým složkám. Platí-li pro všechny absorbující složky nezávisle Lambert-Beerův zákon, získáme po dosazení z rovnice (2.7) pro absorbanci roztoku výraz uvedený v rovnici (2.9).

Této aditivitu se využívá k současnému stanovení více složek ve směsi. K výpočtu jejich koncentrací je třeba změřit absorbanci téhož roztoku při tolika vlnových délkách, kolik je absorbujících složek (řešení soustavy  $n$  lineárních rovnic typu (2.7) pro  $n$  neznámých  $c_i$ ). Prakticky připadají v úvahu obvykle nejvýše tříložkové systémy. Optimální přesnosti se dosahuje, když se měří při vlnových délkách, při nichž jsou relativní rozdíly v molárních absorpčních koeficientech složek co největší, a když koncentrace složek jsou přibližně stejné.

Po metodické stránce lze rozlišit spektrometrická stanovení přímá a titrační. Při přímém fotometrickém stanovení jedné složky se zjišťuje kalibrační křivka, tj. závislost absorbance na koncentraci ve standardních roztocích. Koncentrace látky ve vzorku se zjistí interpolací z této křivky. Je-li kalibrační křivka přímková a prochází počátkem, lze k vyhodnocení použít i metodu standardního přídávku (viz. obrázek 3).



Obr. 3 Ukázka kalibrační křivky pro neznámý vzorek <sup>[7]</sup>  
(x = neznámý vzorek, A = absorbance, c = koncentrace)

Fotometrickou titrací se rozumí použití fotometrické indikace bodu ekvivalence. Ten je definován jako okamžik skončení chemické reakce (jde o dosažení stavu, kdy určovaná látka právě kvantitativně zreagovala s přidaným činidlem ve známém poměru). Titrační křivka je závislost absorbance roztoku na objemu titračního činidla. Absorbance se přitom sleduje při takové konstantní vlnové délce, při které má jedna z reagujících složek charakteristickou absorpci. V příznivém případě je bod ekvivalence určen průsečíkem dvou přímkových větví titrační křivky s různými směrnici. Při titraci v systému, který nejeví sám absorpci, je možno použít vhodný barevný indikátor, který je sám absorbující částí a indukuje bod ekvivalence změnou barvy.

### 2.2.1 Využití spektrofotometrie v praxi

Obecně lze říci, že absorpční spektrometrie našla velmi rozsáhlé použití v organické i anorganické analýze, při řešení některých problémů povahy fyzikálně chemické, např. získávání dat pro výpočty rychlosti reakcí v roztocích, nebo při měření barevnosti tisků. V řadě případů lze tuto metodiku výhodně využít k zjišťování koncentrací a rovnovážných konstant při disociačních, asociačních a komplexotvorných reakcích. K tomu účelu byla vypracována řada postupů, založených v podstatě na specifickém určení některé z částic v roztoku. Nejběžnější

je tzv. metoda kontinuálních variací, metoda poměru směrnic a metoda molárních poměrů, která je v podstatě totožná s fotometrickou titrací.

Nejdůležitější pro naše měření je fakt, že jednoduché analytické využití má spektrofotometrie zejména ve viditelné oblasti. Často se ovšem musí bezbarvé sloučeniny nejprve převést vhodnými činidly na barevné látky. Takové fotometrické metody našly uplatnění především v biochemické klinické analýze organických látek, při určování kationů a anionů ve vodách, při analýze potravin, léčiv a při stanovení stopových množství kovů v nejrůznějších materiálech.

## **2.3 Spektrofotometrické systémy**

K měření spekter molekul a ke stanovení jejich koncentrace ve vzorku se používají absorpční spektrometry UV/VID nebo spektrofotometry. Názvosloví přístrojů není jednotné, spektrometrem se však rozumí přístroj, kterým lze automaticky snímat absorpční křivku, tj, závislost propustnosti nebo absorpce na vlnové délce, zatímco název spektrofotometr se spíše používá pro přístroje určené zejména ke stanovení koncentrace látky z hodnot absorbancí změřených při určité vlnové délce, zpravidla v maximu pásu.

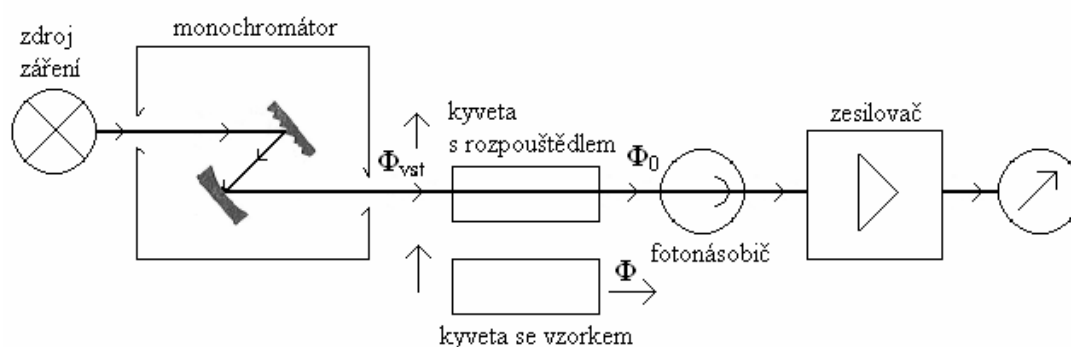
Laboratorní spektrometry a spektrofotometry pracují v oblasti vlnových délek od blízké ultrafialové ( $\lambda = 190$  nm) až po velmi blízkou infračervenou ( $\lambda = 1$  až  $2 \mu\text{m}$ ); pracovní interval vlnových délek jednotlivých přístrojů je různý a je dán účelem použití.

### **2.3.1 Absorpční fotometry pro viditelnou oblast**

Absorpční fotometry pro viditelnou oblast tvoří samostatnou skupinu. Jde většinou o jednoduché přístroje určené pro rychlá fotometrická stanovení, zejména kontrolní. U těchto přístrojů bývá někdy monochromátor nahrazen optickými filtry; v tomto případě jde o tzv. filtrové fotometry (objektivní kolorimetry) na rozdíl od spektrálních fotometrů, které vždy mají monochromátor. Filtrové fotometry jsou dnes nahrazovány jednoduchými spektrofotometry, ale mají stále své místo, např. v provozních analyzátoch nebo jako detektory v kapalinové chromatografii.

Každý spektrální absorpční fotometr má čtyři základní části:

1. zdroj záření se spojitým spektrem;
2. disperzní systém – mřížkový, popř. hranolový monochromátor;
3. absorpční systém, který tvoří roztok uzavřený v kyvetě;
4. fotometrický systém skládající se z fotoelektrického detektoru záření, elektrického obvodu a měřidla k odečítání hodnot propustnosti popř. absorbance.

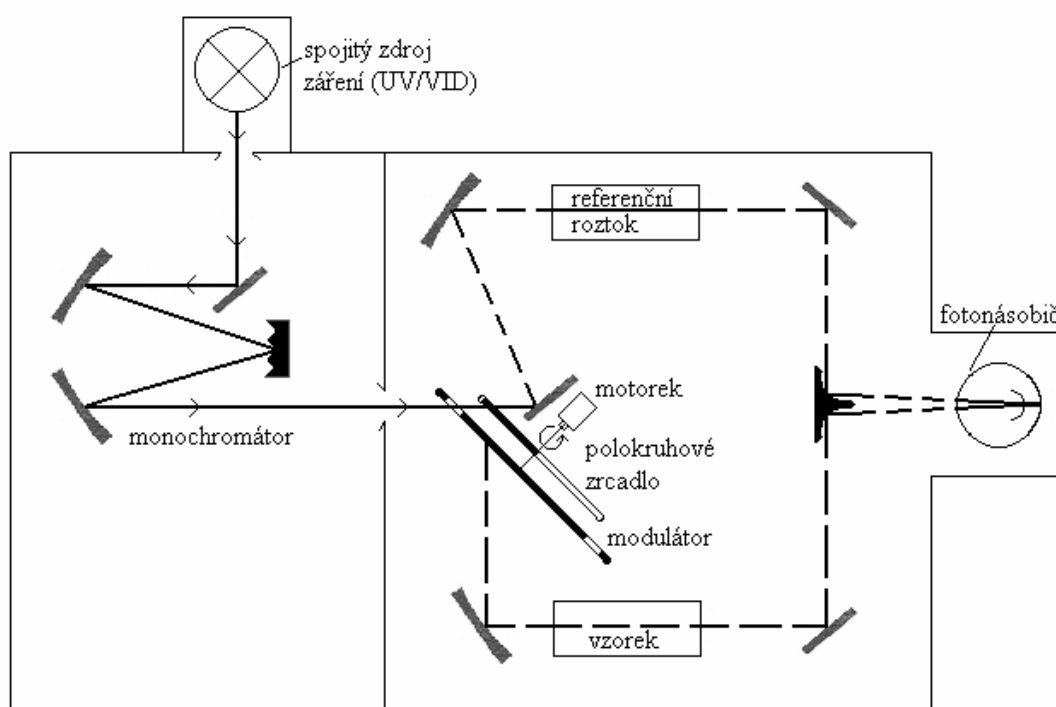


Obr. 4 Schéma jednopaprskového spektrofotometru UV/VID pro měření absorbance látky v roztoku <sup>[4]</sup>

Obecné schéma zapojení uvedených stavebních částí do kompletní aparatury je uvedeno na obr.4. Naznačené schéma reprezentuje *jednopaprskový fotometrický systém*. Paprsek záření zvolené a monochromátorem nastavené vlnové délky, toku záření  $\Phi_{vst}$  prochází kyvetou obsahující nejprve porovnávací, čili referenční roztok (slepý pokus). Složení referenčního roztoku je stejné jako u roztoku vzorku, kromě určované absorbující látky. Z kyvety vystupuje tok  $\Phi_0$ , který je o něco menší než tok  $\Phi_{vst}$ . Ztráty jsou způsobeny jednak odrazem od optických okének kyvety, jednak absorpcí vedlejších látek včetně rozpouštědla. Tok  $\Phi_0$  dopadá na detektor, kde vyvolá úměrně velký elektrický proud. Ten se zesílí a upraví na jednotkový signál, který lze odečíst na připojeném měřidle. Tím je nastavena horní krajní hodnota propustnosti, neboli transmittance pro daný systém,  $T = 1,000$ . Spodní krajní hodnota  $T = 0,000$  odpovídá stavu při úplně zcloněném detektoru. Po tomto seřízení fotometru se obsah kyvety nahradí roztokem vzorku. Za předpokladu že tok  $\Phi_{vst}$  se nemění, lze odečíst na měřidle přímo hodnotu propustnosti látky. Měření je zatíženo chybou způsobenou nestabilitou toku  $\Phi_{vst}$ . Proměřování spektra bod po bodu je zde sice možné, ale je časově náročné, protože je třeba při každém nastavení vlnové

délky před změřením propustnosti roztoku kontrolovat, popř. opravit krajní hodnoty propustnosti.

Vliv kolísání záře zdroje lze vyloučit měřením s *dvoupaprskovým fotometrickým systémem*, kde se poměr toků  $\Phi/\Phi_{vst}$  měří prakticky ve stejném okamžiku. Pracuje se se dvěma monochromatickými paprsky o stejném toku  $\Phi_{vst}$ , z nichž jeden prochází kyvetou se vzorkem (paprsek měrný) a druhý stejnou kyvetou s referenčním roztokem (paprsek srovnávací).



Obr. 5 Optické schéma dvoupaprskového spektrometru UV/VID <sup>[4]</sup>

Optické schéma dvoupaprskového spektrometru s jedním detektorem je na obr.5. Konstantní záření z monochromátoru se nejdříve přerušuje rotujícím modulátorem se stálou frekvencí řádově  $10^2$  Hz. Tím se získá pravidelně pulsující záření, jehož signál se po detekci lépe měří. Paprsek tohoto modulovaného záření je dále periodicky (10krát až 30krát za sekundu) rozdělován pomocí polokruhového rotujícího zrcadla na paprsek měrný a porovnávací. Světelné pulsy, střídavě procházející měřeným a porovnávacím prostředím, nejsou ve stejné fázi, ale jejich intenzita je na vstupu do kyvet stejná. Po výstupu z kyvet jsou oba paprsky opticky svedeny do jednoho, který je přiváděn na detektor. Detektor pracující bez setrvačnosti dává střídavý proud, který se elektronicky zpracuje na signál

odpovídající poměru toků  $\Phi/\Phi_{\text{vst}}$  tj. propustnosti. Mění-li se při měření konstantní rychlostí vlnová délka vstupujícího záření, lze takto plynule registrovat absorpční křivky propustnosti, popř. i absorbance v závislosti na vlnové délce. Takové proměření celého spektra látky trvá obvykle několik minut.

### 2.3.2 Konstrukční prvky spektrálních fotometrů

Jednotlivé konstrukční prvky používané u různých typů spektrálních fotometrů UV/VID jsou funkčně stejné, ale mohou se značně lišit ve svých parametrech. V přehledu zde uvádím nejpoužívanější prvky a požadavky kladené na jejich vlastnosti.

#### 1) Zdroje spojitého záření

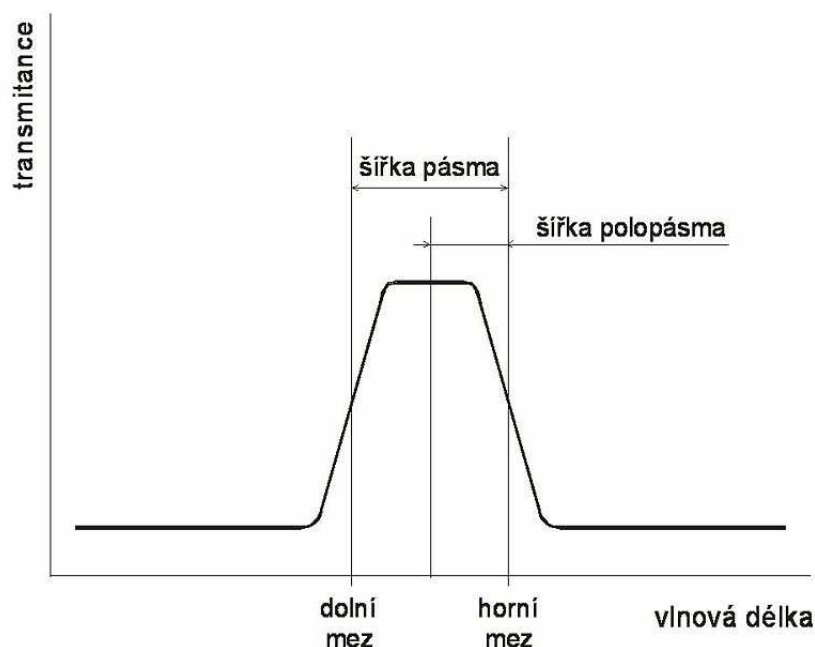
Jako zdroj světla slouží vhodná žárovka nebo výbojka. Žárovky a halogenové žárovky poskytují záření o spojitém spektru ve viditelné a infračervené oblasti (např. wolframová žárovka se používá v rozsahu nad 360 nm a generuje spojitě záření až do 3  $\mu\text{m}$ ), nelze je však použít pro měření v UV oblasti. Jako zdroje ultrafialového záření se používají nejčastěji vodíkové nebo deuteriové výbojky (rozsah 180 až 360 nm). Zdrojem UV i viditelného světla může být také např. xenonová výbojka, široký rozsah vlnových délek je však vyvážen některými nevýhodami: její světlo je složením spojitého a čárového spektra, takže jsou velké rozdíly mezi intenzitami při různých vlnových délkách, výbojka je velmi drahá a intenzita jejího světla není příliš stabilní.

#### 2) Monochromátor

Monochromátor vymezuje šířku pásma kolem nastavované vlnové délky. Nejjednodušší a nejlevnější možností je zařazení vhodného interferenčního filtru do optické dráhy. Komerčně dostupné jsou dnes filtry prakticky pro libovolnou vlnovou délku ultrafialové a viditelné oblasti. Rozlišuje se několik druhů interferenčních filtrů, jejichž vhodnou kombinací se sestaví filtr požadovaných vlastností. Low-pass filtry propouštějí světlo vlnových délek kratších, než je určitá mez (cut-off). High-pass filtry naopak propouštějí jen světlo, které má větší vlnovou délku, než je hraniční vlnová délka filtru. Pásmové filtry propouštějí určitý rozsah vlnových délek. Protože hranice nebývají zcela ostré, uvádí se jako dolní a horní mez zpravidla taková vlnová délka, pro kterou má filtr padesátiprocentní transmitanci ve srovnání s



vlnovou délkou, kterou propouští nejlépe. Někdy se také uvádí střední vlnová délka, kterou filtr propouští, a šířka pásma (nebo polopásma). Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru znázorňuje obrázek 6.



Obr. 6 Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru <sup>[8]</sup>

Dnes se obvykle dává přednost mřížkovému monochromátoru. Spektrální šířka štěrbin u kvalitních spektrometrů je i 0,1 nm. Naproti tomu jednoduché spektrofotometry VID mají spektrální šířku asi 10 nm. Zásadně by tato šíře měla být alespoň pětkrát menší, než je pološířka měřeného absorpčního pásu. Mají-li se měřit velké absorbance ( $A > 1,5$ ), nesmí být záření vystupující z monochromátoru znečištěno rozptylovým zářením o vlnových délkách, které nejsou absorbovány. Podstatného snížení rušivého rozptylového záření se dosahuje použitím holografické mřížky. Stupnice vlnových délek nebo vlnočtů monochromátoru se kalibruje pomocí absorpčních maxim standardních látek (pro oblast UV např. anthracen, pro oblast VID holmiové sklo).

### 3) Absorpční prostředí

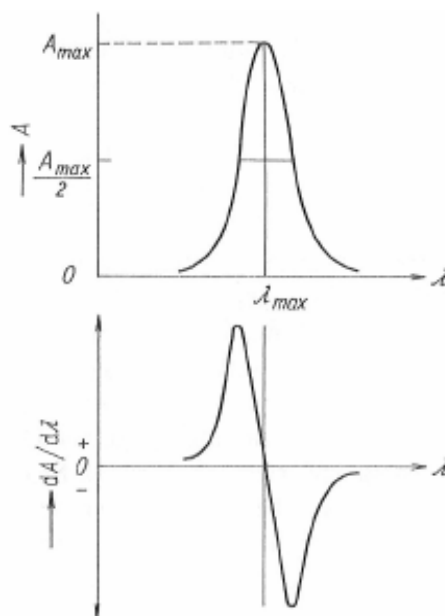
Absorpční prostředí je tvořeno měřeným systémem v kyvetě. Při měření se používá pár stejných kyvet, jedna je měrná, ta se plní roztokem vzorku, druhá je srovnávací a ta se plní referenčním roztokem. Při běžných měřeních se kyvety netemperují, protože malé kolísání laboratorní teploty nemá vliv na hodnotu

absorpčního koeficientu látek. Pouze pro některé speciální účely, jako jsou např. měření reakčních rychlostí, je nutné kyvety temperovat. Nejčastěji se měří zředěné kapalně roztoky, méně často vzorky plynné. Pro kapaliny se používají hranaté kyvety s propustnými planoparalelními okénky (křemenná pro oblast UV, skleněná pro oblast VID), tloušťka měřené vrstvy bývá 0,5 až 5 cm, obvykle 1 cm. Tloušťka kyvet se volí podle koncentrace a hodnoty absorpčního koeficientu tak, aby hodnota absorbance byla mezi 0,1 a 1. Pro kontinuální kvantitativní analýzu se užívají průtočné kyvety umožňující plynulou výměnu vzorku stálou rychlostí. Plyny se fotometrují ve speciálních válcových kyvetách s uzavíratelným plnicím a výstupním otvorem. Jejich tloušťka bývá větší, 10 i více cm.

#### **4) Detektory záření a způsoby odečítání propustnost**

Vesměs se používají fotoelektrické detektory citlivé na ultrafialové a viditelné záření. Pro dvoupaprskové spektrofotometry s jedním detektorem je to fotoelektrický násobič s vhodnou citlivou vrstvou fotokatody. V poslední době se čím dál více používají i křemíkové fotodiody. Starší jednopaprskové spektrofotometry UV/VID mají jako detektory dvě záměnné fotodiody: „modrou“ pro oblast 200 až 600 nm a „červenou“, citlivou na vlnové délky nad 600 nm. V nejjednodušších fotometrech pro viditelnou oblast se stále využívá selenový článek (hradlová fotonka). Fotovodivostní článek PbS je vhodný pro detekci velmi blízkého infračerveného záření od 2,5  $\mu\text{m}$ . Fotoelektrický proud z detektoru se zesiluje speciálními elektronickými zesilovači.

Způsoby odečtení optických veličin, tj. transmitance nebo absorbance, jsou různé. U jednopaprskových spektrofotometrů se měří buď můstkovou kompenzační metodou, nebo výhylkově mikroampérmetry.



Obr. 7 Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru <sup>[4]</sup>

Modernější spektrometry mohou registrovat kromě normálního spektra tj. křivky absorbance  $A$  proti vlnové délce  $\lambda$ , i derivační záznam, tj. křivku  $dA/d\lambda$  proti  $\lambda$ . Má-li absorpční pás tvar Gaussovy křivky má derivovaná křivka tvar patrný z obr. 7, průsečík derivační křivky se základní linií odpovídá  $\lambda_{max}$ . Tímto záznamem lze zlepšit rozlišení překrývajících se pásů u složitých systémů.

### 5) Rozpouštědla

Nejpoužívanějším rozpouštědlem je voda. Její výhoda je v tom, že neabsorbuje záření v celém rozsahu měření od 200 do 1000 nm. Její použitelnost je ale omezena rozpustností látek. Pro nepolární organické sloučeniny je třeba použít rozpouštědla organická. Pro oblast VID jsou vhodná prakticky všechna bezbarvá rozpouštědla. Pro oblast UV pod 350 nm je již výběr omezený. Až do 210 nm jsou použitelné nasycené uhlovodíky, nižší alkoholy a ethery. Nad 210 nm můžeme např. jmenovat chloroform, benzen a aceton.

## **3 Přehled fotometrů a spektrofotometrů na trhu**

V této kapitole bych rád uvedl stručný historický vývoj fotometrů a spektrofotometrů a blíže popsal několik příkladů konkrétních přístrojů se zaměřením na jejich srovnání po technické stránce. Tyto v minulosti buď byly nebo jsou k dostání na našem trhu.

### **3.1 Stručný vývoj fotometrů a spektrofotometrů**

Nejintenzivnější vývoj absorpční spektrofotometrie nastal po 2. světové válce a to jak v přístrojové technice, tak i v metodice. Dnes se na trhu objevuje mnoho nových přístrojů od jednoduchých fotometrů dokonce až po nejsložitější spektrofotometry. Po celém světě působí celá řada firem zabývajících se vývojem, prodejem a distribucí fotometrů a spektrofotometrů. Díky nim jde vývoj v této oblasti měření stále dopředu.

Základní princip moderních přístrojů zůstává sice stále stejný, ale s rozvojem mikroprocesorové techniky jsou dnes běžně k dostání plně digitální přístroje s integrovaným mikroprocesorem pro automatické provedení potřebných výpočtů a pamětí pro jejich zaznamenání. Nejmodernější přístroje mají v paměti též uložena všechna nutná nastavení pro provedení určité analýzy. Uživatelé pak stačí jen vložit vzorek a zvolit potřebnou analýzu. Přístroj potom celé měření provede sám. Často bývají takové fotometry a spektrofotometry vybaveny i LCD displeji a jako uživatelské rozhraní slouží jednoduchý operační systém.

Další velký krok je možnost si všechny tyto produkty snadno prohlédnout a popřípadě i objednat prostřednictvím Internetu. Na webových stránkách jednotlivých firem se snadno naleznou všechny potřebné informace a katalogové údaje k přístroji, který uživatele zajímá. Mohou se tak snadno srovnávat jejich parametry a porovnávat konkrétní produkty mezi sebou.

### 3.2 Příklady některých fotometrů a spektrofotometrů dostupných na trhu kolem roku 1973

#### Fotometr SP-1300 Colorimeter Unicam

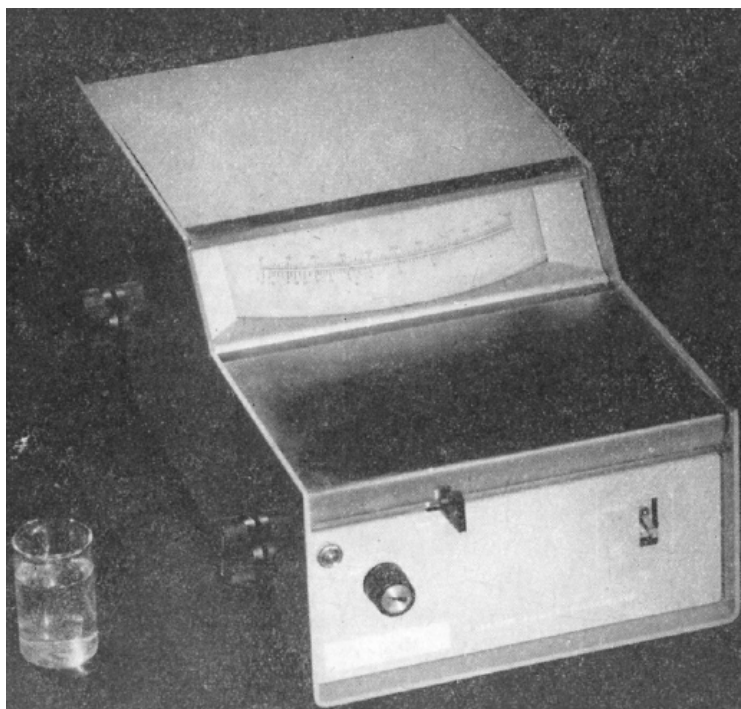
Jedná se o přístroj pracující pouze s jednou kyvetou, ke které je zapojena vakuová pumpička sloužící k nasávání a opětovnému vyprazdňování roztoků (obr.8). Na jeho přední desce se nachází plnicí rourka ve tvaru ohnuté páčky. Je-li vysunuta směrem nahoru, nasává potřebný objem analyzovaného roztoku do kyvety. Při poloze směrem dolů se kyveta vyprazdňuje tak, že po úplném vyprázdnění v ní nezůstane více než 1 % původního roztoku. Tento přístroj se zabudovanou kyvetou odstraňuje chyby vznikající nepřesností kyvety a velmi podstatně urychluje proces měření. Díky tomu je fotometr SP-1300 Colorimeter Unicam velmi vhodný pro rychlá sériová měření.

Další parametry jednopaprskového výchylkového fotometru SP-1300 Colorimeter Unicam shrnuje tabulka 2.

Tab. 2 Parametry fotometru SP-1300 Colorimeter Unicam

Typ	Monochromátor	Detektor	Další vybavení
Autocll Colorimeter Sp 1300	6 filtrů	fotonka	AK

AK = Automaticky se naplňující a vyprazdňující kyveta



Obr. 8 Fotometr SP-1300 Unicam <sup>[5]</sup>

## Langeho dvouprskový fotometr

Jde o klasický základní typ dvouprskového výchylkového fotometru (obr.9). Tento přístroj byl natolik úspěšný, že se vyráběl prakticky beze změny přes 30 let. Jeho počáteční série neměly zabudovaný galvanometr. Pozdější už samozřejmě měly bohatší a dokonalejší vybavení. Lze je také zapojit asi na desetkrát citlivější externí galvanometr Multiflex, který je potom vhodný hlavně při měření s málo propustnými nebo též interferenčními filtry. Jeho stupnice dělená na 100 dílků se může zaměňovat za jiné, se speciálním dělením.

Další parametry Langeho dvouprskového fotometru shrnuje tabulka 3.

Tab. 3 Parametry Langeho fotometru

Typ	Monochromátor	Detektor	Další vybavení
Lichtelektrisches Kolorimeter	3 filtry	2 selenové články	další doplňující filtry: IF, MK, Hg-V, Hg-F

IF = interferenční filtr; MK = mikrokyveta; Hg-V = rtuťová výbojka; Hg-F = rtuťové filtry



Obr. 9 Langeho dvouprskový fotometr <sup>[5]</sup>

## Spektrofotometr Spekol VEB

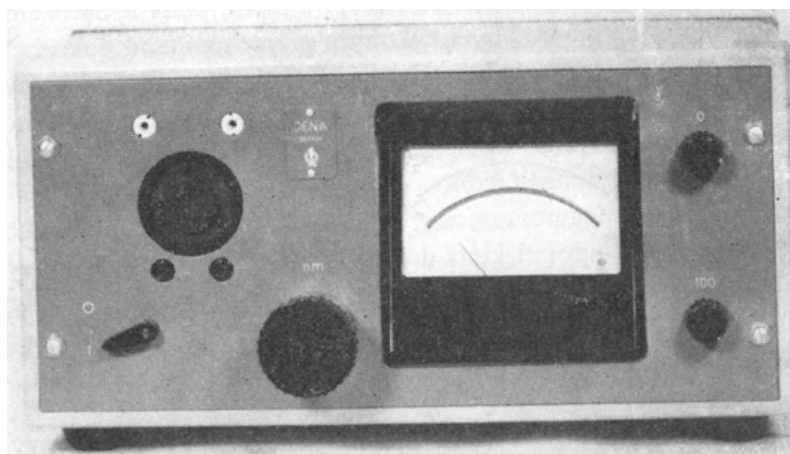
Jedná se o jednoduchý a ve své době velmi používaný výchylkový spektrofotometr. Indikace se u něj provádí selenovým fotočlánkem.

Základní parametry jednopaprskového výchylkového spektrofotometru Spekol VEB shrnuje tabulka 4.

Tab. 4 Parametry spektrofotometru Spekol VEB

Typ	Monochromátor	Detektor	Další vybavení
Spekol VEB	mřížka 365-750 nm	selenový článek	Z, F, FT, R

Z = měření zákalu; F = měření fluorescence; FT = fotometrická titrace; R = měření odraženého záření



Obr. 10 Spektrofotometr Spekol VEB <sup>[5]</sup>

### 3.3 Současné fotometry a spektrofotometry dostupné trhu

V dnešní době je nabídka fotometrů a spektrofotometrů na trhu velmi široká. K dispozici jsou přístroje od úzce specializovaných zpravidla kapesních, pro měření např. koncentrace chlóru nebo hodnoty pH, až po ty nejsložitější vysoce výkonné stolní, určené pro laboratoře a průmysl. Některé z této široké nabídky přístrojů si, jako příklady, představíme podrobněji.

#### Přenosný fotometr pFotoFlex

Tento kapesní fotometr u nás distribuuje firma WTW, nejčastěji se využívá při kontrolách čistoty životního prostředí a při sledování procesů na nejrůznějších místech. V paměti je přednastaveno více než 100 metod měření, včetně zabudované

funkce pH, která dovoluje měřit pH v rozmezí hodnot 0-16 pH a automatickou teplotní kompenzací. Fotometr pHotoFlex je vybaven robustní optikou, která je velmi odolná proti působení vnějších vlivů. Použité LED lampy + filtry pro 6 vlnových délek jsou krajně energeticky úsporné a poskytují přesné výsledky měření. Výhodou je i intuitivní menu nápověda, která umožňuje bezproblémové měření bez složitých návodů k obsluze.

Další parametry a výhody fotometru pHotoFlex shrnují tyto body:

- padne do ruky, je úsporný na energii a poskytuje vysoký nadstandard;
- zabudovaný kyvetový adaptér pro použití různých kyvet;
- podsvětlený displej a automatické úsporné vypínání;
- velký výběr sad testů pro všechny požadavky;
- možnost update metod a softwaru přes internet;
- měření zákalu s infračerveným zdrojem světla;
- 100 programových míst v paměti pro vlastní rutinní měření;
- bateriový provoz se 4 bateriemi (AA) pro více než 3000 měření;
- volitelně LabStation pro laboratorní provoz s komfortní správou dat.



Obr. 11 Přenosný fotometr pHotoFlex <sup>[11]</sup>

### **Rutinní VID spektrofotometr S800**

Jednopaprskový spektrofotometr, který do ČR dodává firma ChromSpec, je určen pro základní měření absorbance, transmitance a koncentrace v rozsahu 330-800 nm. Přístroj pochází od výrobce ze skupiny Biochrom navazujícího na



dlouholetou tradici výroby spektrofotometrů v anglické Cambridgi a je vhodný pro výuku, laboratorní praktika i rutinní laboratoře.

Další parametry a výhody, které má tento spektrofotometr shrnují tyto body:

- zabudovaný ovládací panel;
- velký, dobře čitelný displej se širokým pozorovacím úhlem;
- jednoduchá obsluha;
- monochromátor;
- standardní držák pravoúhlých kyvet o optické dráze 10 mm;
- standardní výstup RS 232C;
- analogový výstup pro zapisovač;
- standardně dodávaný SW Grafico pro přenos výsledků měření na PC, měření spekter, jejich tisk a přenos do Excelu;
- výukový kurz UV/VID spektrofotometrie v nápovědě SW Grafico;
- postup jednoduchých pokusů ke zjištění spektrofotometrických parametrů.



Obr. 12 Spektrofotometr S800<sup>[12]</sup>

### **Univerzální UV/VID spektrofotometr Spekol 1300**

Spekol 1300 k nám rovněž dodává firma ChromSpec. Jde o jednopaprskový UV/VID spektrofotometr, určený pro základní měření absorbance, transmittance a koncentrace, s rozsahem 190-1100 nm a šterbinou 4 nm. Vyniká jednoduchou obsluhou. Při nízké ceně nabízí vysokou spolehlivost a přesnost. Díky robustní

konstrukci je vhodný i pro provozní laboratoře a školy. K spektrometru lze připojit externí tiskárnu a počítač pro sběr dat. Ovládá se pomocí vodotěsné dotykové membránové klávesnice.

Další parametry a výhody spektrofotometru Spekol 1300 shrnují tyto body:

- koncentrace s kalibrační křivkou nebo faktorem;
- analýza DNA a bílkovin;
- křemenem potažená optika;
- grafický displej LCD;
- držák na čtyři kyvety v základní výbavě;
- volitelně široký výběr příslušenství;
- termostatovatelné držáky a držáky zkumavek;
- volitelné rozšíření o software WinAspekt.



Obr. 13 Spektrofotometr Spekol 1300 <sup>[12]</sup>

### **Spektrofotometr T60**

Dvoupaprskový spektrofotometr T60 pro UV/VID oblast s pevnou šířkou štěrbinou 2 nm distribuuje firma LAB MARK. Je připojitelný k PC přes UVSpec SW a přesto, že zabírá malou plochu, je výkonově srovnatelný s většími a dražšími přístroji. Standardně je k němu dodáván motorizovaný držák na 8 kyvet. Také do něj lze vkládat předprogramované PCMA karty pro různé aplikace např. absorbance, kinetika, kvantitativní měření, skenování spektra a analýza DNA.

Další parametry dvoupaprskového spektrofotometru T60 shrnuje tabulka 5.

Tab. 5 Parametry dvoupraskového spektrofotometru T60

Typ	Rozsah vln. délek	Optický systém	Šíře spektr. pásu	Počet kyvet
T60-1651F	190 - 1100 nm	Dvoupraskový	2 nm	8



Obr. 14 Dvoupraskový spektrofotometr T60 <sup>[13]</sup>

### PhotoLab® Spektra

Jedná se o přístroj pro nasazení v laboratoři o jeho distribuci se stará firma WTW. Fotometr photoLab® Spektral je plynule nastavitelný v rozsahu od 330 nm do 850 nm. Jádrem tohoto mřížkového spektrálního fotometru je vysoce kvalitní optický modul od firmy Zeiss. Vyniká technologií, která nepodléhá opotřebení. Fotometr provádí během provozu pravidelně AutoCheck a garantuje tak správné výsledky měření. Další funkce AutoSelect je určena pro automatické rozeznání testu podle kódovaných kyvet a volbu všech požadovaných nastavení pro vlnovou délku a kalibraci. Po vložení kyvety se ihned zobrazí naměřená hodnota ve vyžádané formě parametru na velkém přehledném grafickém displeji. Až 1000 uložených naměřených dat lze přenést do PC nebo vytisknout na sériové tiskárně. Tento fotometr má v sobě již z výroby uloženou kompletní paletu testů, které jsou k dispozici. Uložená data metod je možno kdykoli aktualizovat přes internet. Parametry spektrálního fotometru PhotoLab® Spektra shrnuje tabulka 6.

Tab. 6 Parametry spektrálního fotometru PhotoLab® Spektra

Typ	Rozsah vln. délek	Datová paměť	Rozhraní
spektrální fotometr s fotodiodovým polem	330 – 850 nm	1000 datových vět	RS 232C



Obr. 15 Fotometr PhotoLab® Spekra <sup>[11]</sup>

### Procesní spektrofotometr ER50

Distribuci toho procesního spektrofotometru pro bezkontaktní měření a regulaci barevného odstínu u nás zajišťuje firma BAS Rudice s.r.o. ER50 vlastně znamená systém včasného varování korekce barevných odchylek. Spektrofotometr ER50 je určen zejména pro bezkontaktní měření vybarvení pohybujících se produktů v náročných klimatických podmínkách. Jedná se o nejpřesnější procesní dvoukanálový spektrofotometrický systém modulární konstrukce pro OnLine měření a regulaci barevnosti. Součástí přístroje je výkonný koloristický software, který je dodáván v provedení pro procesní monitorování a regulaci barevnosti. Nejčastěji se spektrofotometr ER50 používá v průmyslu pro měření a OnLine regulaci odstínu papíru nebo skla. Další výhody, spektrofotometru ER50 shrnují tyto body:

- minimalizuje výrobní ztráty;
- snižuje výrobní náklady;
- zvyšuje celkový výkon výrobní linky minimalizací prostojů;
- 100% kontrola barevnosti finálního produktu.



Obr. 16 Procesní Spektrofotometr ER50 <sup>[14]</sup>

## 4 Spektrofotometr Labio 722 pro viditelnou oblast

Na tomto spektrofotometru pro viditelnou oblast bylo provedeno veškeré měření pro tuto práci. Proto bude popsán podrobněji.

### 4.1 Hlavní způsoby použití

Tento spektrofotometr, analytický přístroj často používaný ve fyzikálně chemických laboratořích pro kvalitativní a kvantitativní analýzu látek v blízké ultrafialové a viditelné oblasti spektra, nalézá četné použití v oblastech, jakými jsou školství, lékařství, klinické testování, biochemie, petrochemický průmysl, ochrana životního prostředí a kontrola jakosti.

### 4.2 Základní specifikace

Tab. 7 Základní specifikace spektrofotometru 722

Optický systém	Jednopaprskový, rytá difrakční mřížka 1200 rýh/mm
Spektrální šířka	6 nm
Vlnový rozsah	325 - 1000 nm
Zdroj	Wolframová halogenová žárovka 6 V/10 W
Přesnost nastavení vln. délky	$\pm 2,0$ nm
Reprodukovatelnost	1,0 nm
Údaj o vlnové délce	Čtyřmístný digitální LED
Parazitní světlo	$\leq 0,5\%$ T při 360 nm
Fotometrický rozsah	0 - 125% T, -0,097 - 2000A, 0 - 1999 C (0 - 1999F)
Fotometrická přesnost	$\pm 1,0$ T
Datový výstup	RS-232 sériové rozhraní
Napájení	110 - 220 V stř., 50 Hz $\pm$ 1 Hz
Výstup na tiskárnu	Sériový port
Rozměry	430 x 310 x 200 mm
Hmotnost	8kg

#### 4.2.1 Princip funkce

Přístroj využívá kolorimetrického principu Lambert-Beerova zákona (viz. odd. 2.1). Světelné záření excituje látku přítomnou v roztoku, čímž dochází k absorpci světla. Každá látka vykazuje své vlastní, charakteristické absorpční spektrum. Intenzita monochromatického záření procházejícího roztokem se v důsledku absorpce sníží úměrně koncentraci přítomné látky.

Platí zde rovnice (2.1) pro transmitanci (prostupnost světla) a rovnice (2.3) pro absorpenci upravené na:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4.1)$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} = K \cdot C \cdot L \quad (4.2)$$

T transmitance (prostupnost světla)

A absorpance

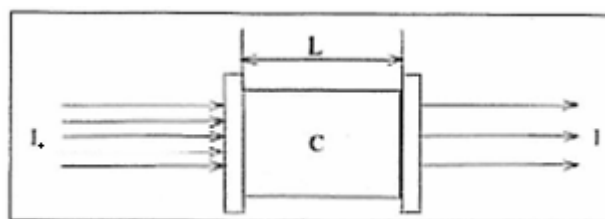
I je intenzita procházejícího světla

$I_0$  je intenzita dopadajícího světla

K je součinitel absorpce

L je délka kyvet

C je koncentrace látky v roztoku

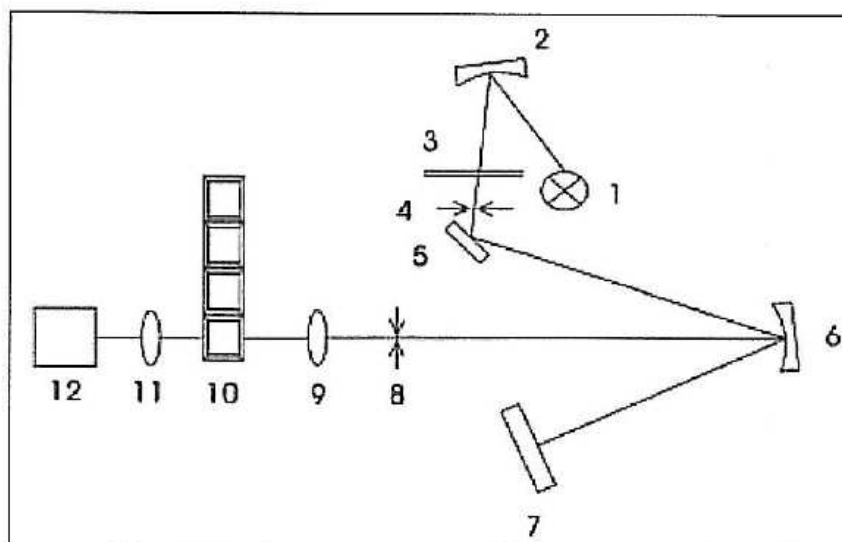


Obr. 17 Procházení světla kyvetou <sup>[6]</sup>

Pokud intenzita dopadajícího světla, součinitel absorpce a délka kyvety zůstávají konstantní, vzorec udává, že intenzita procházejícího světla závisí na koncentraci látky v roztoku.

#### 4.2.2 Optické uspořádání

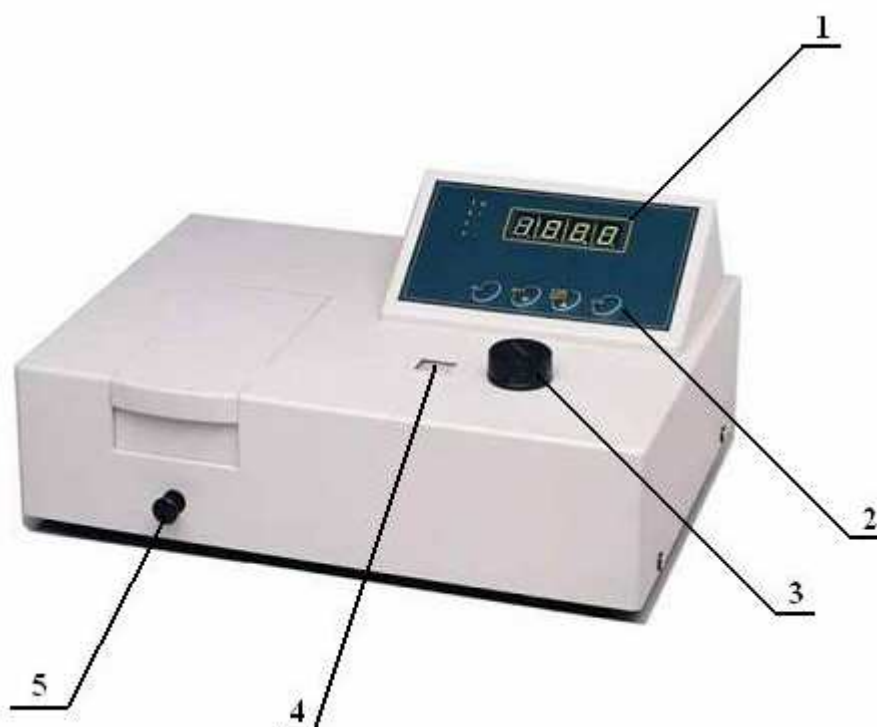
Přístroj využívá jednopaprskový optický systém s autokolimační difrakční mřížkou. Optické uspořádání je patrné z následujícího obrázku 18:



Obr. 18 Optické uspořádání spektrofotometru 722 <sup>[6]</sup>

- 1) Wolframová halogenová žárovka
- 2) Kolimační zrcadlo
- 3) Filtr
- 4) Vstupní štěrba
- 5) Zrcadlo
- 6) Kolimátor
- 7) Difrakční mřížka
- 8) Výstupní štěrba
- 9) Spojová čočka
- 10) Držák vzorku
- 11) Závěrka
- 12) Detektor

### 4.2.3 Vnější vzhled



Obr. 19 Vnější vzhled spektrofotometru 722 <sup>[6]</sup>

- 1) Výsledkový displej
- 2) Funkční klávesy
- 3) Nastavení vlnové délky
- 4) Displej vlnové délky
- 5) Táhlo držáku kyvet

### 4.2.4 Ovládací klávesy

Klávesnice obsahuje následující čtyři ovládací klávesy:

- 1) Klávesa ENTER má dvě funkce:
  - a) Používá se ve spojení se sériovým rozhraním RS232 a přenosem dat (jednosměrný přenos dat do počítače).
  - b) Je-li přístroj v módu F, potvrzuje okamžitou hodnotu faktoru F, a přepíná automaticky do módu C, kde se vypočte koncentrace ( $C = F \cdot A$ ). C je koncentrace látky v roztoku a A je absorbance.
- 2) Klávesa 0%T se používá takto:
  - a) nastavuje nulu jen v módu T. Do optické dráhy vložíme černý hranol, který je součástí příslušenství a stiskneme tuto klávesu – nastaví se hodnota 000,0;



- b) slouží ke snižování hodnoty. V módu F se každým stiskem této klávesy sníží hodnota o jednotku. Přidržením klávesy se probíhající změna urychlí. Dosáhne-li hodnota F nuly, dalším stiskem klávesy se nastaví hodnota 1999.
- 3) Klávesa 0ABS/100%T má tři funkce:
- a) V módu A nebo T uzavřeme prostor pro vzorky a stiskneme tuto klávesu: nastaví se hodnota 0,000 respektive 1000,0;
- b) Slouží ke snižování hodnoty (pouze v módu F); každým stiskem klávesy se hodnota F zvýší o jednotku. Přidržením klávesy se probíhající změna urychlí. Dosáhne-li F hodnoty 1999, nastaví se dalším stiskem klávesy hodnota 0, dalším stiskem 1 atd.
- 4) Klávesou A/T/C/F se přepíná mezi módy A, T, C a F
- A je absorbance  
T transmitance (prostupnost světla)  
C je koncentrace  
F je násobný faktor klávesy 100%T

#### **4.2.5 Kalibrace přesnosti nastavení vlnové délky**

Při kalibraci se ověřuje správnost nastavení vlnových délek dvou charakteristických absorpčních čar didymiového filtru (529nm a 808nm). Jestliže dvoubodové měření ukáže jiné hodnoty absorpčních čar didymiového filtru (maximální povolená odchylka je  $\pm 2\text{nm}$ ), sejmeme otočný knoflík ovladače vlnových délek, povolíme tři polohovací šrouby na stupnici vlnových délek, nastavíme ukazatel na charakteristické vlnové délky odpovídající uvedeným absorpčním čarám a polohovací šrouby utáhneme.

## 5 Měření koncentrací

V této kapitole jsou popsány dvě úlohy, které jsou proveditelné pomocí Spektrofotometru Labio 722. První je zaměřena na základní měření absorpčního spektra, vynesení kalibrační křivky a následné určení neznámé koncentrace roztoku barviva. Druhá je návrh laboratorní úlohy na využití spektrofotometru pro měření koncentrací v laboratoři měření neelektrických veličin.

### 5.1 Určení neznámé koncentrace roztoku

#### 5.1.1 Osnova postupu měření:

- 1) Připravíme řadu roztoků s klesající koncentrací (nejlépe v rozmezí jednoho řádu) ředěním.
- 2) Zjistíme vlnovou délku, která odpovídá maximu absorpce barvy violet.
- 3) Změříme absorpce všech koncentrací roztoků při vlnové délce odpovídající maximální absorpenci a vyneseme je v závislosti na koncentraci. Je-li splněn Lambert-Beerův zákon, musí být tato závislost přímková a směřovat do počátku souřadnicové soustavy. Získaný graf současně slouží jako kalibrační křivka, pomocí níž určíme koncentraci neznámého vzorku.
- 4) Připravíme vzorek roztoku barvy o neznámé koncentraci a změříme jeho absorpenci.
- 5) Pomocí kalibrační křivky a změřené absorpence vypočítáme koncentraci neznámého vzorku.

#### 5.1.2 Přístroje a pomůcky

Pro tuto úlohu je jako barvivo použit vodný roztok krystalické violeti pro mikroskopii o hmotnostní koncentraci 0,01 % tj. 100 mg/l. Jako vhodné rozpouštědlo je potom použita destilovaná voda.

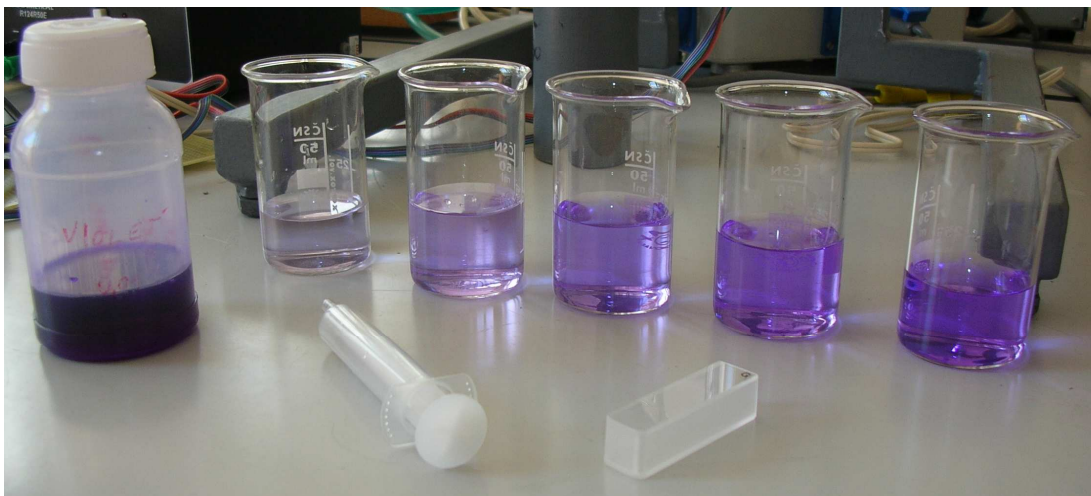
Další potřebné pomůcky jsou na obrázku 20:

5 x 50 ml odměrná baňka

1 x injekční stříkačka

1 x pipeta

1 x čistá kyveta



Obr. 20 Přístroje a pomůcky

### 5.1.3 Postup měření

Zapneme spektrofotometr Labio 722 a necháme jej po dobu 30 minut „temperovat“. Mezi tím si do kádinek s 50 ml destilované vody připravíme řadu roztoků, pipetováním 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 a 1 ml roztoku barviva krystalické violeti. Po zahřátí spektrofotometru provedeme jeho kalibraci. Za pomoci vloženého černého hranolu vynulujeme parametr transmitance (propustnost). Poté do přístroje umístíme kyvetu s destilovanou vodou a nastavíme nulovou hodnotu absorbance. Tímto máme spektrofotometr připraven k měření.

Pomocí injekční stříkačky naplníme kyvetu destilovanou vodou a vložíme ji do přístroje. Postupným nastavováním vlnové délky  $\lambda$  v celém rozsahu přístroje od 320 do 1020 nm provedeme měření absorpčního spektra vody  $A_{(\text{vody})} = f(\lambda)$ . Jeho hodnoty zaznamenává tabulka 8. Poté celé měření zopakujeme s kyvetou naplněnou nejkonzentrovanejším roztokem 1 ml barviva krystalické violeti na 50 ml destilované vody. Tím máme změřeny hodnoty absorpčního spektra roztoku  $A_{(\text{roztoku})} = f(\lambda)$ .

Abychom odstranili ztráty vzniklé odrazem od stěny kyvety a vliv rozpouštědla na přesnost měření, je zapotřebí odečíst od sebe naměřené absorbance roztoku a destilované vody viz. rovnice (5.1). Poté sestrojíme absorpční charakteristiku  $A_{RV} = f(\lambda)$ , která je na obrázku 24 a odečteme z ní takovou vlnovou délku  $\lambda$ , při které dosahuje zaznamenaná absorbance  $A$  maximální hodnoty. Při této

vlnové délce  $\lambda$  opět provedeme kalibraci přístroje a postupně změříme absorbance všech připravených roztoků (viz. tab.9) a vyneseme je v závislosti na koncentraci přepočtené na  $c(\text{mg/l})$  podle rovnice (5.2). Tím jsme sestrojili kalibrační křivku. Pomocí lineární regrese dostaneme její analytický tvar  $y = 0,1453 \cdot x$  (obrázek 21). Nyní si připravíme vzorek roztoku o neznámé koncentraci a při stejné vlnové délce  $\lambda$ , jako u roztoků známých změříme jeho absorbanci. Pomocí změřené hodnoty absorbance a rovnice získané lineární regrese sestrojené kalibrační křivky vypočítáme koncentraci neznámého roztoku.

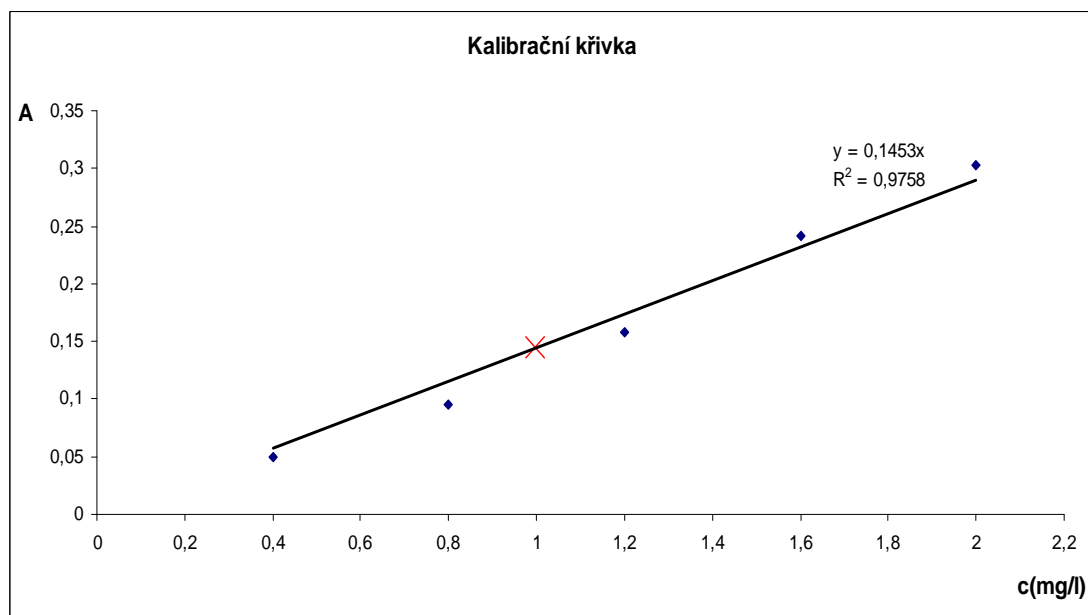
#### 5.1.4 Naměřené a vypočtené hodnoty

Hodnota absorbance neznámého roztoku byla při vlnové délce 590 nm naměřena  $A = 0,145$ . Provedením výpočtu podle upravené rovnice (5.2), získané z kalibrační křivky na obrázku 21, dostaneme hodnotu neznámé koncentrace roztoku, která vyšla  $c = 0,997935 \text{ mg/l}$ .

V tabulce 8 jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbance  $A_{(\text{roztoku})}$ , pro roztok violeti v destilované vodě o koncentraci  $c = 2 \text{ mg/l}$  a  $A_{(\text{vody})}$  pro samotnou destilovanou vodu. V závislosti na nastavované vlnové délce  $\lambda$ .  $A_{RV}$  pak vyjadřuje rozdíl těchto absorbancí, který je potřebný pro správnou korekci měření.

Tabulka 9 uvádí naměřené hodnoty absorbance všech připravených roztoků o různých koncentracích  $c$ , při vlnové délce  $\lambda = 590 \text{ nm}$ .

Na obrázku 21 je pomocí lineární regrese sestrojená kalibrační přímka s uvedenou rovnicí pro výpočet neznámé koncentrace roztoku z naměřené absorbance. Červený křížek na této přímce znázorňuje závislost naměřené absorbance roztoku o neznámé koncentraci na jeho dopočítané koncentraci.  $R^2$  nám zde pak vyjadřuje míru spolehlivosti měření. Čím je hodnota  $R^2$  bližší jedné, tím přesnější měření absorbance roztoků jsme provedli. V našem případě je  $R^2 = 0,9758$ .



Obr. 21 Kalibrační křivka  $A = f(c)$  při vlnové délce  $\lambda = 590 \text{ nm}$

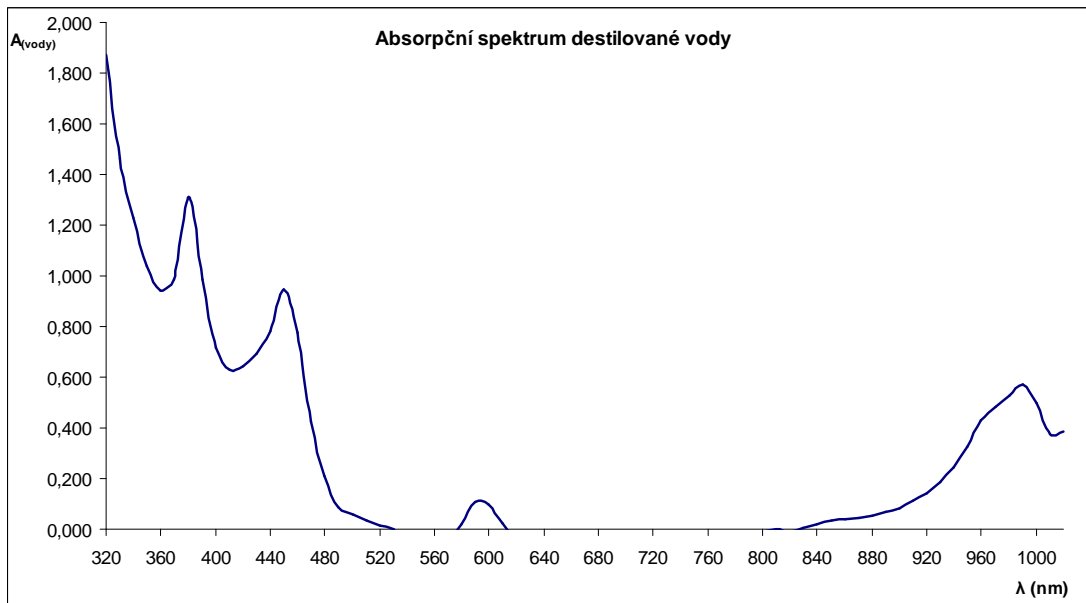
Tab. 8 Hodnoty naměřené absorpance  $A$  v závislosti na nastavované vlnové délce  $\lambda$

Č.M.	$\lambda(\text{nm})$	$A_{(\text{roztoku})}$	$A_{(\text{vody})}$	$A_{RV} = A_{(\text{roztoku})} - A_{(\text{vody})}$
1	320	1,800	1,875	-0,075
2	330	1,495	1,462	0,033
3	340	1,253	1,231	0,022
4	350	1,065	1,041	0,024
5	360	0,959	0,941	0,018
6	370	0,989	0,983	0,006
7	380	1,332	1,311	0,021
8	390	1,019	0,985	0,034
9	400	0,736	0,718	0,018
10	410	0,639	0,628	0,011
11	420	0,652	0,642	0,010
12	430	0,704	0,692	0,012
13	440	0,796	0,782	0,014
14	450	0,964	0,948	0,016
15	460	0,851	0,778	0,073
16	470	0,484	0,422	0,062
17	480	0,270	0,209	0,061
18	490	0,157	0,088	0,069
19	500	0,148	0,057	0,091
20	510	0,154	0,032	0,122
21	520	0,174	0,014	0,160
22	530	0,202	0,001	0,201
23	540	0,168	-0,061	0,229
24	550	0,142	-0,104	0,246
25	560	0,165	-0,093	0,258
26	570	0,232	-0,050	0,282
27	580	0,342	0,019	0,323
<b>28</b>	<b>590</b>	<b>0,445</b>	<b>0,107</b>	<b>0,338</b>
29	600	0,402	0,097	0,305
30	610	0,246	0,023	0,223

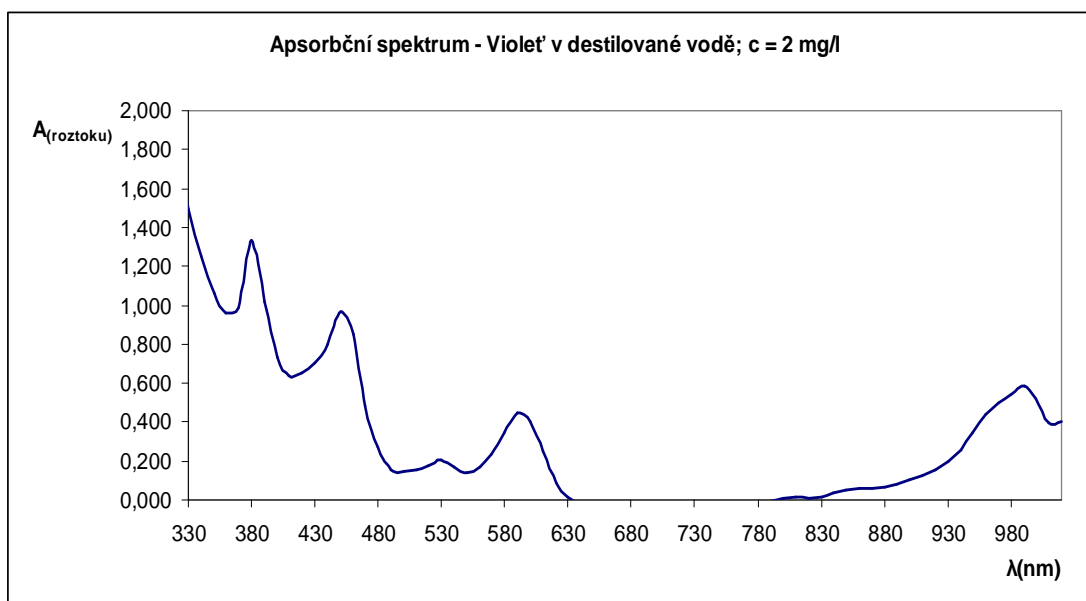
31	620	0,085	-0,044	0,129
32	630	0,014	-0,056	0,070
33	640	-0,019	-0,053	0,034
34	650	-0,034	-0,055	0,021
35	660	-0,049	-0,065	0,016
36	670	-0,057	-0,070	0,013
37	680	-0,061	-0,071	0,010
38	690	-0,063	-0,074	0,011
39	700	-0,067	-0,079	0,012
40	710	-0,068	-0,080	0,012
41	720	-0,063	-0,073	0,010
42	730	-0,054	-0,066	0,012
43	740	-0,050	-0,064	0,014
44	750	-0,052	-0,067	0,015
45	760	-0,053	-0,065	0,012
46	770	-0,049	-0,061	0,012
47	780	-0,041	-0,054	0,013
48	790	-0,009	-0,022	0,013
49	800	0,007	-0,008	0,015
50	810	0,016	-0,002	0,018
51	820	0,004	-0,012	0,016
52	830	0,017	0,003	0,014
53	840	0,033	0,021	0,012
54	850	0,048	0,033	0,015
55	860	0,056	0,038	0,018
56	870	0,061	0,043	0,018
57	880	0,069	0,053	0,016
58	890	0,082	0,067	0,015
59	900	0,099	0,085	0,014
60	910	0,123	0,110	0,013
61	920	0,156	0,142	0,014
62	930	0,198	0,184	0,014
63	940	0,258	0,243	0,015
64	950	0,341	0,327	0,014
65	960	0,442	0,427	0,015
66	970	0,499	0,483	0,016
67	980	0,545	0,529	0,016
68	990	0,588	0,573	0,015
69	1000	0,523	0,499	0,024
70	1010	0,396	0,378	0,018
71	1020	0,400	0,383	0,017

Tab. 9 Naměřené hodnoty absorbance všech připravených roztoků, při vlnové délce  $\lambda = 590 \text{ nm}$

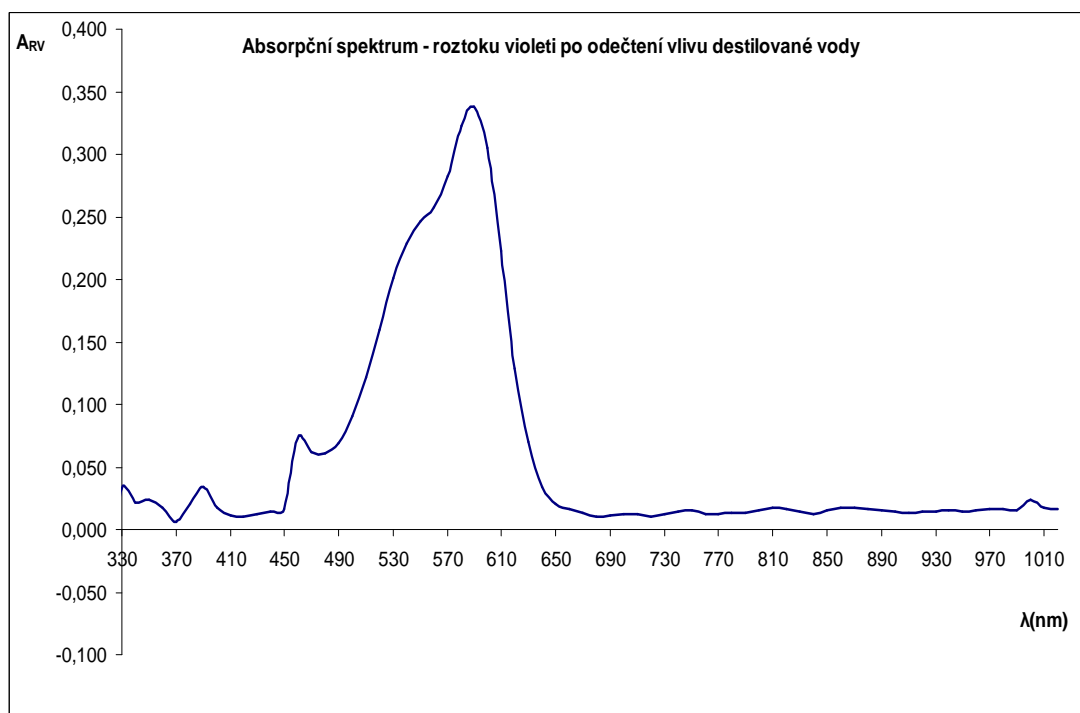
Č.M.	c roztoku violeti v ml na 50 ml destilované vody	c(mg/l)	A
1	1	2	0,303
2	0,8	1,6	0,242
3	0,6	1,2	0,158
4	0,4	0,8	0,095
5	0,2	0,4	0,049



Obr. 22 Charakteristika absorpčního spektra destilované vody.  $A_{(vody)} = f(\lambda)$



Obr. 23 Charakteristika absorpčního spektra roztoku violeti v destilované vodě o koncentraci  $c = 2 \text{ mg/l}$ .  $A_{(roztoku)} = f(\lambda)$



Obr. 24 Charakteristika absorpčního spektra roztoku violeti v destilované vodě o koncentraci  $c = 2 \text{ mg/l}$ , po odečtení absorpce destilované vody.  $A_{(RV)} = f(\lambda)$

### 5.1.5 Příklady výpočtů

#### Výpočet rozdílu absorbancí $A_{RV}$

Příklad výpočtu pro měření číslo 28 tj. při vlnové délce  $\lambda = 590 \text{ Hz}$ :

$$A_{RV} = A_{(\text{roztoku})} - A_{(\text{vody})} = 0,445 - 0,107 = \underline{0,338} \quad (5.1)$$

#### Přepočet jednotky koncentrace $c$ na $\text{mg/l}$

Příklad výpočtu pro měření číslo 2 tj. při koncentraci roztoku  $c = 0,8 \text{ ml}$  violeti v  $50 \text{ ml}$  destilované vody:

$$c(\text{mg} / \text{l}) = \frac{0,8}{50} \cdot 100 = 1,6 \text{ mg} / \text{l} \quad (5.2)$$

#### Výpočet neznámé koncentrace roztoku podle rovnice z kalibrační křivky na obrázku 21

Naměřená hodnota absorpce roztoku o neznámé koncentraci je  $A = 0,145$ .

$$y = 0,1453 \cdot x \Rightarrow c = \frac{A}{0,1453} = \frac{0,145}{0,1453} = 0,997935 \text{ mg} / \text{l} \quad (5.3)$$



### 5.1.6 Závěry z měření

Jak je patrné z obrázku 21, sestavená kalibrační křivka je přímková a směřuje do počátku souřadnicové soustavy. Z toho můžeme usoudit, že je zde splněn Lambert-Beerův zákon. Přesto, že je zde míra spolehlivosti měření celkem vysoká  $R^2 = 0,9758$ , neleží vynesené body charakteristiky přesně na přímce. To může být způsobeno vlivem různých chyb, jako například znečištěním skla kvivety nebo měřeného roztoku, odrazem od stěn kvivety a v neposlední řadě i teplotní nestálostí okolního prostředí.

Naměřená absorbance měřeného roztoku o neznámé koncentraci je  $A = 0,145$ . Po jejím dosazení do rovnice (5.3) nám vyšla koncentrace neznámého roztoku  $c = 0,997935$  mg/l. Koncentrace odečtena jen za pomoci kalibrační křivky je  $c = 0,99$  mg/l.

## 5.2 Návrh laboratorní úlohy na využití spektrofotometru pro měření koncentrací

Na tomto místě mé bakalářské práce měla být původně navržena a popsána laboratorní úloha fotometrické titrace, k jejíž realizaci je ale nutné pracovat s roztoky chemických látek. Tím vniká řada problémů, které by vedly ke značným komplikacím při jejím praktickém provádění. Mezi tyto problémy patří hlavně skutečnost, že spektrofotometr Labio 722 je umístěn v laboratoři pro měření neelektrických veličin, která není určená k manipulaci s chemickými látkami, dále pak zde chybí prostory pro jejich uskladnění. Důležitý je také fakt, že tato laboratorní úloha je určená především pro studenty Fakulty elektrotechniky a informatiky, kteří nemají postačující znalosti pro přípravou chemických roztoků. Proto by zde při každém měření byla nutná odborná asistence laborantů, kteří by roztoky chystali.

Vzhledem ke všem těmto skutečnostem jsem se rozhodl navrhnout a popsat zde laboratorní úlohu, k jejíž realizaci by nebylo potřeba přímé manipulace s chemickými látkami.

Jde o to, připravit celou úlohu pro měření koncentrací se vzorky ve formě ztuhlých roztoků. Na to jsou potřeba vzorky průsvitné pro viditelné světlo a stálé za pokojové teploty. Z dostupných materiálů se nejlépe pro tento účel hodí plexisklo,

které se dá koupit jako monomer v kapalné formě. Pak už stačí jen pomocí této kapaliny a barviva namíchat roztoky o požadované koncentraci, nechat je ztuhnout a upravit do vhodné velikosti pro měření ve spektrofotometru tj. zhruba do velikosti kyvet.

Tento způsob realizace měření přináší velkou řadu výhod, především snadnou manipulaci s měřenou látkou, bez nebezpečí jejího vylití či znečištění a dále pak možnost jejího opakovaného použití. Odpadá také i vliv některých chyb na měření například vliv teploty okolního prostředí na měřenou látku, nebo zkreslení výsledků způsobené odrazem od stěn kyvety či jejím znečištěním.

Princip a postup měřicí úlohy založené na těchto faktech je uveden v laboratorním předpisu v příloze A této bakalářské práce. Laboratorní úloha je zde rozdělena na dvě části podle její časové náročnosti. První část je zaměřena na analýzu koncentrace barviva v neznámém jednosložkovém vzorku. Druhá popisuje tuto analýzu pro vzorek obsahující dvě absorbující složky barviva.

## 6 Závěr

Pro měření koncentrací roztoků byl zvolen, katedrou elektrotechniky nově zakoupený, spektrofotometr Labio 722 pro viditelnou oblast světelného spektra. Proto je teoretická část mé práce zaměřena kromě obecného popisu metodiky kvantitativní analýzy neboli spektrofotometrie i na popis parametrů a funkce samotného přístroje. Z vypracovaného přehledu dostupných spektrofotometrů na našem trhu pak vyplývá, že se jedná o standardní analytický přístroj pro kvalitativní a kvantitativní analýzu látek, který se nejlépe hodí pro použití nejenom ve školství, ale například i v lékařství, nebo petrochemickém průmyslu.

Praktické měření bylo zaměřeno především na ověření správné funkce tohoto nového spektrofotometru. V jeho první části je uvedena a prakticky odměřena celá laboratorní úloha měření koncentrací roztoků. Jak dokládají uvedené výsledky, především pak sestavená kalibrační křivka, spektrofotometr Labio 722 je pro tento účel vhodný přístroj.

Ve druhé části pak měla být navržena laboratorní úloha fotometrické titrace, k jejíž realizaci je nutné pracovat s roztoky chemických látek. Hlavní překážkou pro vypracování této úlohy je fakt, že spektrofotometr Labio 722 je umístěn v laboratoři určené pro měření neelektrických veličin, ve které je zakázáno používat chemické látky. Proto jsem zde, po dohodě s vedoucím své bakalářské práce, navrhl a popsal laboratorní úlohu pro měření koncentrací, která místo chemických roztoků využívá obarvené a ztuhlé plexisklo, které se dá koupit v kapalné formě. Bohužel kvůli zpožděné dodávce tohoto druhu plexiskla se mi nepodařilo do data odevzdání této práce úlohu prakticky ověřit. V příloze mé práce je pak uveden celý laboratorní předpis této úlohy, rozdělený na dvě části podle její časové náročnosti.

Úloha, kterou jsem navrhl a popsal v této bakalářské práci, bude do budoucna použita jako jedna z laboratorních úloh pro předmět Senzory a měření neelektrických veličin, který se vyučuje ve čtvrtém semestru oboru Komunikační a mikroprocesorová technika na Fakultě elektrotechniky a informatiky.

## Použitá literatura

- [1] VÁŇA, J.: *Analyzátory plynů a kapalin*. 2. vyd. Praha : SNTL, 1984. 524 s.
- [2] VYTRÁS, K. aj.: *Laboratorní cvičení z analytické chemie část 2 : instrumentální analýza*. 1. vyd. Pardubice : Univerzita Pardubice, 1996. 16 s. ISBN 80-7194-048-8.
- [3] VLÁČIL, F.: *Příklady z chemické a instrumentální analýzy*. 2. vyd. Praha : Informatorium, 1991. 451 s. ISBN 80-85427-04-4.
- [4] ČŮTA, F., aj.: *Instrumentální analýza*. 1. vyd. Praha : SNTL, 1986. 295 s.
- [5] MALÁT, M.: *Absorpční anorganická fotometrie*. 1. vyd. Praha : Academia, 1973. 894 s.
- [6] *Referenční příručka : spektrofotometr pro viditelnou oblast 722*. [2008]. 8 s.
- [7] KVASNICOVÁ, V.; BALÍNOVÁ, P.: *Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie : Stanovení koncentrace kreatininu v moči* [online]. 2006 [cit. 2009-05-04]. Dostupný z WWW:  
<[http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha\\_B1.htm](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B1.htm)>.
- [8] Spektrofotometr. Wikipedie : otevřená encyklopedie [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikimedia Foundation, strana naposledy edit. 2008-11-25 [cit. 2009-05-04]. Česká verze. Dostupný z WWW:  
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometr>>.
- [9] Bod ekvivalence. Wikipedie : otevřená encyklopedie [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikimedia Foundation, strana naposledy edit. 2009-03-07 [cit. 2009-05-04]. Česká verze. Dostupný z WWW:  
<[http://cs.wikipedia.org/wiki/Bod\\_ekvivalence](http://cs.wikipedia.org/wiki/Bod_ekvivalence)>.
- [10] ŘEZANKA, Pavel.: *Spektrální metody v chemii : Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. KSICHT [online]. 2006 [cit. 2009-05-04]. Dostupný z WWW:  
<[http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id\\_serie=1](http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id_serie=1)>.
- [11] WTW. *Řada fotometrů photoLab®* [online]. [2008] [cit. 2009-05-04]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.wtwkucerova.cz/fotom.html>>.
- [12] CHROMSPEC. *Produkty : Jednopaprskové UV-VIS spektrofotometry Bi-ochrom* [online]. [2008] [cit. 2009-05-04]. Text v češtině. Dostupný z WWW:  
<<http://www.chromspec.cz/produkty/>>.

- [13] LAB MARK. *Molekulární biologie : Spektrofotometry* [online]. c2007 [cit. 2009-05-04]. Text v češtině. Dostupný z WWW:  
<<http://www.polymeraza.cz/spektrofotometry-fluorometry-luminometry/>>.
- [14] BAS. *Procesní spektrofotometr pro bezkontaktní měření a regulaci barevného odstínu* [online]. c2007 [cit. 2009-05-04]. Text v češtině. Dostupný z WWW:  
<[http://www.bas.cz/x-rite/xrite\\_er50.php](http://www.bas.cz/x-rite/xrite_er50.php)>.

# Příloha A – Laboratorní předpis

## Část 1.

### Spektrofotometrická analýza koncentrace barviva v neznámém vzorku

**1. Úkol:** Spektrofotometricky proměřte vzorky roztoků ve formě obarveného plexiskla. Sestrojte kalibrační křivku a dopočítejte koncentraci neznámého vzorku.

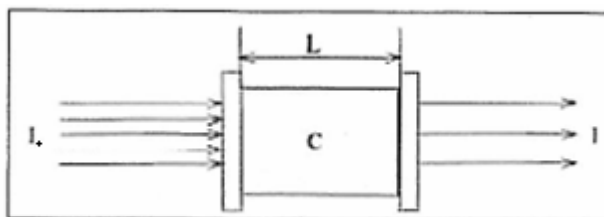
#### 2. Princip úlohy:

Při spektrofotometrii vycházíme z Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje vztah mezi koncentrací barevné látky v plexiskle a její absorbcí, tj. schopností molekul látky pohlcovat elektromagnetické záření o dané vlnové délce. Při průchodu světelného toku obarveným plexisklem (viz. obr.1) tak dochází k jeho zeslabení, protože částice látek barviva přítomných v plexiskle část elektromagnetického záření pohltní (absorbují). Záření, které projde vzorkem dopadá na detektor, který měří jeho intenzitu. Z tohoto důvodu je zavedena veličina zvaná **transmittance** (propustnost), která je definována vztahem:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

kde  $I_0$  = intenzita záření vstupujícího do vzorku;  $I$  = intenzita záření po průchodu vzorkem.

Transmittance (T) nabývá hodnot 0 až 1: nulovou hodnotu má pokud je veškeré záření pohlceno, hodnotu 1 naopak tehdy, pokud vzorkem veškeré záření projde. Někdy se transmittance vyjadřuje v procentech:  $T = (I / I_0) \times 100$  tj. nabývá hodnot 0 až 100 %.



Obr.1 Procházení světla vzorkem

Množství absorbovaného záření lze vypočítat z hodnoty transmittance:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Veličina A se nazývá **absorbance** a je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus transmittance. Nabývá hodnot od nuly výše, většinou měříme v rozmezí 0 až 1,5 (nebo méně). Vyšší hodnoty absorbance již bývají málo přesné, měření vždy závisí na citlivosti detektoru.

### Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon Lc \quad (3)$$

kde  $A$  je absorbance;  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient ( $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ );  $L$  tloušťka vzorku (cm) a  $c$  molární koncentrace.

Lambert-Beerův zákon platí pro monochromatické záření a obor nízkých koncentrací, řádově menších než  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vyplývá z něj, že čím je koncentrace látky v roztoku vyšší, tím je vyšší hodnota naměřené absorbance (tj. absorbance je přímo úměrná koncentraci a naopak). Tato závislost je lineární, neboť Lambert-Beerův zákon připomíná rovnici přímky ( $A = \varepsilon \cdot L \cdot c \approx y = kx + q$ , kde  $x$  odpovídá hodnotě  $c$ , hodnota  $\varepsilon \cdot L$  odpovídá  $k$ , tj. směrnici přímky;  $q = 0$ , tj. závislost absorbance na koncentraci prochází počátkem).

Transmitance (propustnost) je nepřímo úměrná koncentraci: čím vyšší je koncentrace látky, tím méně záření vzorek propustí, tj. méně záření dopadne na detektor.

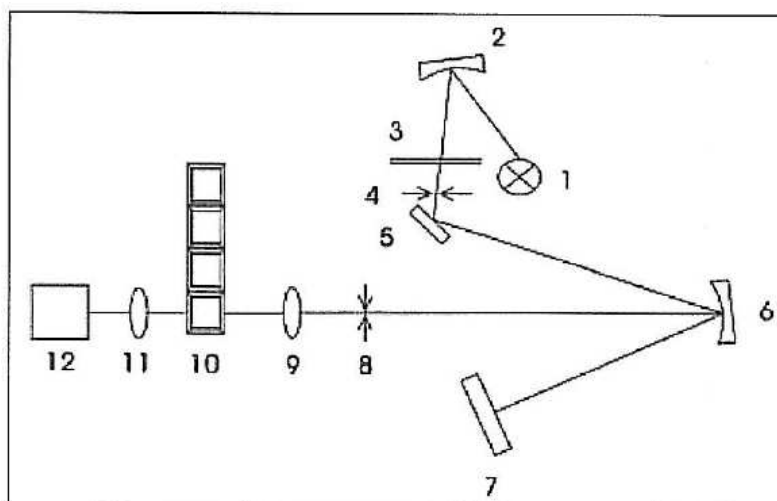
### 3. Zařízení a příslušenství:

Vzorek čirého (neobarveného) plexiskla; vzorky obarveného plexiskla o známé koncentraci přidané barevné látky; vzorek obarveného plexiskla o neznámé koncentraci přidané barevné látky.

Spektrofotometr Labio 722 pro měření ve viditelné oblasti spektra.

#### Popis přístroje:

Spektrofotometr Labio 722 je analytický přístroj používaný ve fyzikálně chemických laboratořích pro kvalitativní a kvantitativní analýzu látek v blízké ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Přístroj využívá jednopaprskový optický systém s autokolimační difrakční mřížkou. Optické uspořádání je patrné z následujícího obrázku 2:

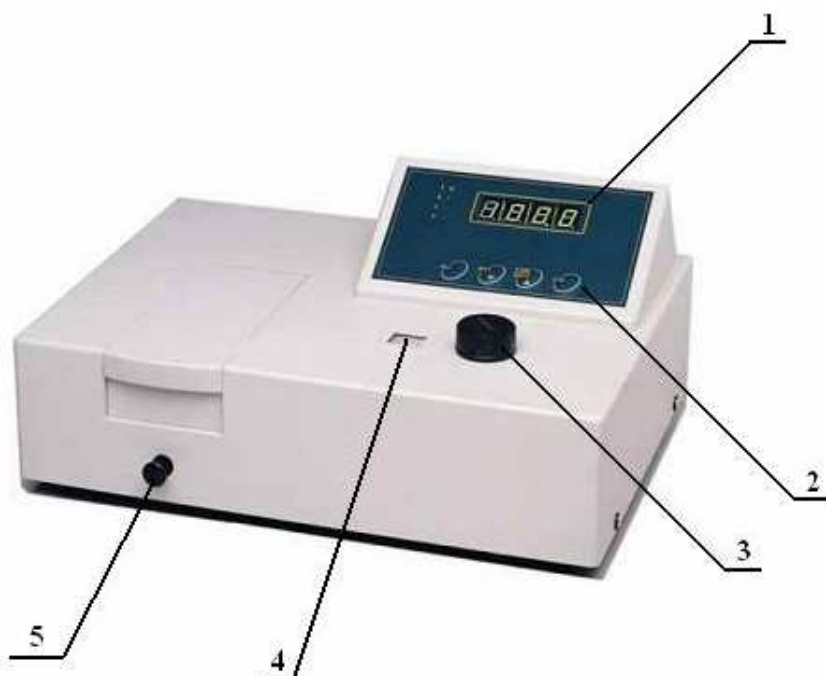


Obr. 2 Optické uspořádání spektrofotometru 722

- 1 – wolframová halogenová žárovka; 2 – kolimační zrcadlo; 3 – filtr; 4 – vstupní štěrba; 5 – zrcadlo; 6 – kolimátor; 7 – difrakční mřížka; 8 – výstupní štěrba; 9 – spojová čočka; 10 – držák vzorku; 11 – závěrka; 12 – detektor

### ***Návod na obsluhu přístroje:***

1. Zapněte spektrofotometr tlačítkem na jeho zadní straně a ponechte jej po dobu 30 minut „temperovat“.
2. Nastavte požadovanou vlnovou délku měření (viz. obrázek 3 – bod 3).
3. Klávesou přepínání mezi módy (A/T/C/F) přepněte přístroj na mód A, který umožňuje měření absorbance.
4. Do držáku kyvet umístěte vzorek čírého plexiskla a stiskem klávesy *0ABS/100%T* nastavte na displeji spektrofotometru nulovou hodnotu.
5. Do držáku kyvet umístěte měřený vzorek plexiskla a na displeji spektrofotometru odečtete příslušnou hodnotu absorbance.



Obr. 3 Vnější vzhled spektrofotometru 722

- 1 – výsledkový displej; 2 – funkční klávesy; 3 – nastavení vlnové délky; 4 – displej vlnové délky; 5 - táhlo držáku kyvet



## 4. Pracovní postup

### *Osnova postupu měření:*

- 1) Změřte barevnou křivku čirého plexiskla.
- 2) Změřte barevnou křivku vzorku obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva.
- 3) Proveďte odečtení naměřených hodnot absorbance čirého plexiskla  $A_{(p)}$  od naměřených hodnot absorbance obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva  $A_{(b)}$ ;  $A_{(pb)} = A_{(p)} - A_{(b)}$ .
- 4) Vyneste charakteristiku absorpčního spektra vzorku obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva po odečtení absorbance čirého plexiskla.  $A_{(pb)} = f(\lambda)$
- 5) Z vynesené charakteristiky  $A_{(pb)} = f(\lambda)$  odečtěte takovou vlnovou délku  $\lambda_1$ , při níž je hodnota absorbance  $A_{(pb)}$  největší.
- 6) Při této vlnové délce proveďte kalibraci spektrofotometru.
- 7) Změřte hodnoty absorbancí všech vzorků obarveného plexiskla.
- 8) Změřte absorbanci vzorku o neznámé koncentraci.
- 9) Sestrojte kalibrační křivku a z kalibrační přímky dopočítejte koncentraci neznámého vzorku.

### *Postup měření:*

Vzorek čirého plexiskla vložte do spektrofotometru. Postupným nastavováním vlnové délky  $\lambda$  v celém rozsahu přístroje od 320 do 1020 nm proveďte měření barevné křivky čirého plexiskla  $A_{(p)} = f(\lambda)$ , jeho hodnoty zaznamenávejte do tabulky 1. Poté celé měření zopakujte se vzorkem obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva a vše opět zaznamenejte do tabulky 1. Tím jsou změřeny hodnoty barevné křivky obarveného plexiskla  $A_{(b)} = f(\lambda)$ .

Aby se odstranil vliv čirého plexiskla na přesnost měření je zapotřebí odečíst od sebe naměřené absorbance čirého plexiskla  $A_{(p)}$  a absorbance obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva  $A_{(b)}$ ;  $A_{(pb)} = A_{(p)} - A_{(b)}$ . Poté sestrojte absorpční charakteristiku  $A_{(pb)} = f(\lambda)$  a odečtěte z ní takovou vlnovou délku  $\lambda_1$ , při které dosahuje zaznamenaná absorbance  $A$  maximální hodnoty.

Takto získanou vlnovou délku  $\lambda_1$  nastavte na přístroji a proveďte jeho kalibraci. Za pomoci vloženého černého hranolu vynulujte transmitanci (propustnost), poté do přístroje umístěte kyvetu vzorek čirého plexiskla a nastavte nulovou hodnotu i absorbance. Tímto je spektrofotometr připraven k měření hodnot kalibrační křivky.

Při stejné vlnové délce  $\lambda_1$  změřte absorbance všech vzorků obarveného plexiskla a hodnoty zaznamenejte do tabulky 2. Tyto hodnoty absorbance  $A$  pak vyneste v závislosti na koncentraci  $c$  (mg/l) měřených vzorků obarveného plexiskla. Tím jste sestrojili kalibrační křivku.

Nyní při stejné vlnové délce  $\lambda_1$ , jako u vzorků obarveného plexiskla o známých koncentracích změřte absorbanci vzorku o neznámé koncentraci. Pomocí změřené hodnoty absorbance a upravené rovnice  $y = k \cdot x$  získané lineární regresí, sestavené kalibrační křivky dopočítejte neznámou koncentraci vzorku.

## 5. Pokyny pro zpracování výsledků

- 1) Naměřené hodnoty absorpčních uveďte do protokolu v tabulce s tímto záhlavím:

Tab. 1 Hodnoty naměřené absorpce  $A$  v závislosti na nastavované vlnové délce  $\lambda$

Č.M.	$\lambda(\text{nm})$	$A_{(p)}$	$A_{(b)}$	$A_{(pb)} = A_{(p)} - A_{(b)}$
1	320			
2	330			
3	340			
.	.			
.	.			
.	.			
71	1020			

- 2) Sestrojte absorpční křivku čírého plexiskla  $A_{(p)} = f(\lambda)$ .
- 3) Sestrojte absorpční křivku obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva  $A_{(b)} = f(\lambda)$ .
- 4) Sestrojte charakteristiku absorpčního spektra obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva po odečtení absorpce čírého plexiskla.  $A_{(pb)} = f(\lambda)$ .
- 5) Údaje pro sestavení kalibrační křivky uveďte do protokolu v tabulce s tímto záhlavím:

Tab. 2 Naměřené hodnoty absorpce všech vzorků obarveného plexiskla

$\lambda_1 =$		
Č.M.	$c(\text{mg/l})$	$A$
1		
.		
.		
.		
x		

- 6) Sestrojte charakteristiku  $A = f(c)$ . Je-li splněn Lambert-Beerův zákon, musí být tato závislost přímková a směřovat do počátku souřadnicové soustavy. Získaný graf současně slouží jako kalibrační křivka, pomocí níž určíte koncentraci neznámého vzorku.
- 7) Pomocí změřené hodnoty absorpce neznámého vzorku a upravené rovnice získané lineární regrese sestavené kalibrační křivky dopočítejte neznámou koncentraci vzorku.

## Část 2.

### Spektrofotometrická analýza koncentrace barviva v neznámém vícesložkovém vzorku

**1. Úkol:** Stejnou metodou jako v předchozí úloze proměřte vzorek obsahující dvě absorbující složky a vypočtěte jejich koncentraci.

#### 2. Princip úlohy:

V nejjednodušším případě fotometrické analýzy přísluší hodnota naměřené absorbance jedné složce. Jsou-li ve vzorku přítomny další složky, které absorbují při stejné vlnové délce, pak zjištěná hodnota absorbance je součinem hodnot příslušejících jednotlivým složkám. Platí-li pro všechny absorbující složky nezávisle Lambert-Beerův zákon, získáme po dosazení z rovnice (3) pro absorbanci roztoku výraz:

$$A_{\lambda} = L \sum_{i=1}^n (\varepsilon_i)_{\lambda} c_i \quad (4)$$

kde  $A_{\lambda}$  je absorbance vzorku;  $\varepsilon_i$  je molární absorpční koeficient ( $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) jednotlivých složek;  $L$  tloušťka vzorku (cm) a  $c_i$  látková koncentrace (mol/ litr).

Této aditivity se využívá k současnému stanovení více složek ve směsi. K výpočtu jejich koncentrací je třeba změřit absorbanci téhož roztoku při tolika vlnových délkách, kolik je absorbujících složek (řešení soustavy  $n$  lineárních rovnic typu (3) pro  $n$  neznámých  $c_i$ ). Prakticky připadají v úvahu obvykle nejvýše tříložkové systémy. Optimální přesnosti se dosahuje, když se měří při vlnových délkách, při nichž jsou relativní rozdíly v molárních absorpčních koeficientech složek co největší, a když koncentrace složek jsou přibližně stejné.

V našem případě budou výsledné koncentrace absorbujících složek ve vzorku dány touto soustavou rovnic:

$$\begin{aligned} A_1 &= c_1 \cdot k_{11} + c_2 \cdot k_{12} \\ A_2 &= c_1 \cdot k_{21} + c_2 \cdot k_{22} \end{aligned} \quad (5)$$

kde  $A$  jsou změřené absorbance; koncentrace  $c$  je neznámá a  $k_{11}$ - $k_{22}$  jsou směrnice přímk získané lineární regresi kalibračních křivek.

#### 3. Zařízení a příslušenství:

Vzorek čirého (neobarveného) plexiskla; vzorky obarveného plexiskla o známé koncentraci přidané barevné látky, jiné než v první části úlohy, vzorek obarveného plexiskla o neznámé koncentraci dvou předešlých barevných látek.

Spektrofotometr Labio 722 pro měření ve viditelné oblasti spektra.

#### 4. Pracovní postup

##### Osnova postupu měření:

- 1) Vezměte kalibrační křivku z první části úlohy a pojmenujeme ji  $K_{11}$ .
- 2) Stejným postupem jako v první části úlohy najděte vlnovou délku  $\lambda_2$ , při níž je největší hodnota absorbance  $A_{(pb)}$  nového vzorku s největší barevnou koncentrací a sestrojte kalibrační křivku s názvem  $K_{22}$ .
- 3) Při stejné vlnové délce  $\lambda_2$  sestrojte novou kalibrační křivku i pro vzorky z první části úlohy a pojmenujte ji  $K_{12}$ .
- 4) Při vlnové délce z první části úlohy  $\lambda_1$  sestrojte kalibrační křivku  $K_{21}$  i pro vzorky s této úlohy.
- 5) Při vlnové délce  $\lambda_1$  změříme absorbanci  $A_1$  vzorku o neznámé koncentraci.
- 6) Při vlnové délce  $\lambda_2$  opět změříme absorbanci  $A_2$  vzorku o neznámé koncentraci.
- 7) Proveďte lineární regresi všech čtyř kalibračních křivek a vyhodnoťte z nich absorpční koeficienty.
- 8) Dosad'te vše do soustavy rovnic (5) a vypoč'tete hledané koncentrace  $c_1$  a  $c_2$  neznámého vzorku.

#### 5. Pokyny pro zpracování výsledků

- 1) Naměřené hodnoty absorbancí uveďte do protokolu v tabulce s tímto záhlavím:

Tab. 3 Hodnoty naměřené absorbance  $A$  v závislosti na nastavované vlnové délce  $\lambda$

Č.M.	$\lambda(\text{nm})$	$A_{(p)}$	$A_{(b)}$	$A_{(pb)} = A_{(p)} - A_{(b)}$
1	320			
2	330			
3	340			
.	.			
.	.			
.	.			
71	1020			

- 2) Sestrojte charakteristiku absorpčního spektra obarveného plexiskla s největší koncentrací barviva po odečtení absorbance čirého plexiskla.  $A_{(pb)} = f(\lambda)$ .
- 3) Naměřené údaje pro sestrojení kalibračních křivek uveďte do protokolu v tabulce s tímto záhlavím:

Tab. 4 Naměřené hodnoty absorbance všech vzorků obarveného plexiskla

Č.M.	$K_{11}$ při $\lambda_1 =$		$K_{22}$ při $\lambda_2 =$		$K_{12}$ při $\lambda_2 =$		$K_{21}$ při $\lambda_1 =$	
	$c(\text{mg/l})$	$A$	$c(\text{mg/l})$	$A$	$c(\text{mg/l})$	$A$	$c(\text{mg/l})$	$A$
1								
.								
.								
.								
x								

- 4) Sestrojte všechny čtyři kalibrační křivky  $A = f(c)$ .
- 5) Změřené hodnoty absorbancí  $A_1$  a  $A_2$  a směrnice kalibračních přímků získané lineární regresi dosad'te do rovnice (5) a vypoč'tete hledané koncentrace  $c_1$  a  $c_2$  neznámého vzorku.