



Netradiční spektrofotometrie s přístroji Vernier a mobilními telefony

Bakalářská práce

Studijní program: B1407 – Chemie
Studijní obory: 7504R009 – Chemie se zaměřením na vzdělávání
7504R015 – Matematika se zaměřením na vzdělávání

Autor práce: **Radim Jeník**
Vedoucí práce: Mgr. Martin Slavík, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radim Jeník**
Osobní číslo: **P12000563**
Studijní program: **B1407 Chemie**
Studijní obory: **Chemie se zaměřením na vzdělávání**
Matematika se zaměřením na vzdělávání
Název tématu: **Netradiční spektrofotometrie s přístroji Vernier a mobilními
telefony**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

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

Navrhnout a ověřit jednoduché spektrofotometrické experimenty s levnými přístroji firmy Vernier, popř. mobilním telefonem, které jsou použitelné pro výuku chemie.

1. Jedno vybrané stanovení vyhodnotit různými prostředky (vizuálně, kolorimetricky, kamerou na mobilním telefonu).
2. Zhotovit funkční plamenový fotometr ze spektrofotometru Vernier SpectroVis Plus, optického kabelu a kahanu.
3. Optimalizovat uspořádání přístroje a vypočítat mez stanovení alkalických kovů.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná


Seznam odborné literatury:

- Anon. Kolorimetr Vernier COL-BTA: podrobné informace, <http://www.vernier.cz/produkty/podrobne-informace/kod/COL-BTA/> . [online]. [vid. 20. 4. 2015]
- Anon. Spektrometr SpectroVis PlusVernier: podrobné informace, <http://www.vernier.cz/produkty/podrobne-informace/kod/SVIS-PL>. [online]. [vid. 20. 4. 2015]
- Meloun, M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat - v chemometrii, biometrii, ekonometrii a v dalších oborech přírodních, technických a společenských věd, 2. vydání ACADEMIA Praha 2004, 980 stran, ISBN 80-200-1254-0. TriloByte Statistical Software. QC Expert 3.3 [software]. Dostupné z: <http://www.trilobyte.cz/Nase-Produkty/QC-Expert.html>

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Martin Slavík, Ph.D.
Katedra chemie


Datum zadání bakalářské práce: 10. října 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 3. května 2017



prof. RNDr. Jan Pícek, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 10. října 2016 -

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Mé poděkování patří Mgr. Martinu Slavíkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Anotace

Práce se zabývá jednoduchými spektrofotometrickými experimenty (stanovení Fe^{2+}) s levnými přístroji firmy Vernier, popř. mobilním telefonem, které jsou použitelné ve výuce chemie. Hlavní část práce představuje svépomocné zhotovení funkčního plamenového fotometru ze spektrofotometru Vernier SpectroVis Plus, optického kabelu a kahanu. Byl zvolen nejvhodnější zdroj plamene, optimalizováno uspořádání přístroje a vypočtena mez stanovení alkalických kovů.

Klíčová slova

Vernier, spektrofotometr, plamenový fotometr, modifikace, školní experiment, mez stanovení

Annotation

This work deals with easy spectrophotometric experiments suitable for school (determination of Fe^{2+}) with cheap instruments made by Vernier, Inc. or mobile phones. Main part is devoted to do-it-yourself assembly of flame photometer from Vernier SpectroVis Plus spectrophotometer, optical fibre and burner. The best flame source was selected, instrument was optimized, and limit of quantification for alkali metals was determined.

Keywords

Vernier, spectrophotometer, flame photometer, modification, school, experiment, do-it-yourself, limit of quantification

Obsah

1. ÚVOD	7
2. TEORIE	8
2.1. Výhody metod optické spektroskopie	9
2.2. Historický vývoj optické spektrometrie	10
2.2.1. <i>Počátky a experimentální vývoj spektroskopie</i>	10
2.2.2. <i>Úspěchy spektroskopie</i>	12
2.3. Klasifikace metod optické spektroskopie	12
2.3.1. <i>Podle druhu energie</i>	12
2.3.2. <i>Podle povahy interakce</i>	13
2.3.3. <i>Podle druhu materiálu</i>	15
2.4. Metody optické spektroskopie.....	16
2.4.1. <i>Atomová emisní spektrometrie</i>	16
2.4.2. <i>Atomová absorpční spektrometrie</i>	17
2.4.3. <i>Atomová fluorescenční spektrometrie</i>	22
2.4.4. <i>Další metody optické spektrometrie</i>	25
3. PRAKTICKÁ ČÁST	27
3.1. Jednoduché demonstrační spektroskopické experimenty	27
3.1.1. <i>Fluorescence přísad v balených nápojích</i>	30
3.2. Stanovení koncentrací roztoků Fe ²⁺ spektrometricky	31
3.2.1. <i>Princip a výpočty</i>	31
3.2.2. <i>Orientační stanovení vizuální kolorimetrií (od oka)</i>	32
3.2.3. <i>Zjištění koncentrací kolorimetrem z kalibrační přímky</i>	33
3.2.4. <i>Zjištění koncentrací pomocí hodnot H, S, V a R, G, B</i>	37
3.3. Plamenový spektrofotometr.....	44
3.3.1. <i>Příprava plamenového spektrofotometru k měření</i>	45
3.3.2. <i>Výběr zdroje plamene</i>	45
3.3.3. <i>Optimalizace uspořádání spektrometru</i>	47
3.3.4. <i>Optimalizace parametrů měření</i>	48
3.3.5. <i>Stanovení analytických parametrů metody</i>	50
3.3.6. <i>Závěr</i>	67
3.4. Ověření obsahu draslíku v potravinách	68
3.4.1. <i>Průběh měření</i>	68
3.4.2. <i>Výsledek měření</i>	69
3.4.3. <i>Závěr</i>	70
4. ZÁVĚR	71
5. LITERATURA	72

1. Úvod

Motivací práce bylo nalezení jednoduchých pokusů, z oblasti spektroskopie, které mohou rozšířit možnosti tradiční výuky chemie.

V průběhu práce došlo ke změně tématu z původního, týkajícího se využití svépomocně vyrobeného papírového spektrometru pro viditelnou oblast. Podle návodu (Foldable Mini-Spectrometer, 2016) byl sestrojen papírový spektrometr, bohužel se nepodařilo sehnat totožný typ ploché flexibilní webové kamery, který byl uveden v návodu, proto bylo následně potřeba nalézt optimální uspořádání součástí spektrometru a vyřešit řadu problémů: s velikostí štěrbiny, upevněním dílů... Zhotoveným přístrojem se podařilo získat spektrum zářivky, ale snaha využít papírový spektrometr jako detektor v plamenové fotometrii nebo pro stanovení koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona byla neúspěšná. Lze konstatovat, že svépomocně vyráběný papírový spektrometr, pokud by nebyl sestaven z dostupné stavebnice (Desktop Spectrometry Kit 3.0, 2016), nelze bohužel rutinně a spolehlivě používat pro výukové účely, z důvodu časových nároků stavby i trvanlivosti.

Proto bylo zvoleno nové téma zahrnující porovnávací kolorimetrii s vizuální detekcí lidským okem a také kamerou v mobilním telefonu a dále experimenty s USB spektrofotometrem Vernier SpectroVis Plus (SpectroVis Plus 2016) pro viditelnou oblast. Tento přístroj byl zvolen vzhledem k ceně, která i s optickým kabelem a kahanem nepřevyšuje 30 000 Kč a možností měřit absorpční, emisní i fluorescenční spektra.

V teoretické části jsou vysvětleny principy vybraných spektroskopických metod. V praktické části bylo pro porovnávací kolorimetrii použito stanovení iontů Fe^{2+} hexakyanidoželezitanem draselným. Z USB spektrofotometru Vernier s optickým kabelem a plynového kahanu jsme sestrojili plamenový emisní fotometr, který byl po optimalizaci parametrů využit ke stanovení alkalických kovů ve vzorcích. Použitelnost byla ověřena stanovením meze detekce a meze stanovení alkalických kovů.

2. Teorie

Spektroskopie a spektrografie jsou často používané metody pro měření intenzity záření v závislosti na vlnové délce a jsou často používány k popisu experimentálních spektroskopických metod. Zařízení pro spektrální měření se označují jako spektrometry, spektrofotometry, spektrografy nebo spektrální analyzátory. Každodenní pozorování barev může být spojeno se spektroskopií. Neonové osvětlení je přímé použití atomové spektroskopie. Neon a další vzácné plyny mají charakteristické emisní frekvence (barvy). Doutnavky (výbojky s nízkým tlakem plněné plynem) využívají kolizi elektronů s plynem k excitaci těchto emisí. Inkousty, barviva a barvy zahrnují chemické sloučeniny, které jsou vybrané pro své spektrální charakteristiky za účelem vytvoření určité barvy a odstínu. Běžně se setkáváme s molekulovým spektrem oxidu dusičitého. Plynný oxid dusičitý má charakteristické červené absorpční spektrum, které dává vzduchu znečištěnému o oxid dusičitý červeno-hnědé zbarvení. Rayleighův rozptyl na molekulách plynu popřípadě na jiných malých částicích, jejichž vlnová délka je menší než vlnová délka světla, způsobuje, že barva atmosféry Země je modrá.

Spektroskopické studie byly zásadní pro rozvoj kvantové mechaniky a jsou zahrnuty ve vysvětlení Maxe Plancka o záření absolutně černého tělesa, ve vysvětlení Alberta Einsteina týkajícího se fotoelektrického jevu a vysvětlení Nielse Bohra o atomových strukturách a spektrech. Spektroskopie se nejvíce používá ve fyzikální a analytické chemii, protože atomy a molekuly mají jedinečná spektra. Výsledkem je to, že tyto spektra mohou být použita k detekci, identifikaci a kvantifikaci informací o atomech a molekulách. Spektroskopie se také používá v astronomii při pozorování vesmíru dalekohledy. Výzkumné dalekohledy mají většinou spektrografy. Naměřená spektra se používají k určení chemického složení a fyzikálních vlastností astronomických objektů (například jejich teplota a rychlost). (W. Schmidt, 2005)

Jedním z hlavních aspektů spektroskopie je rezonance a její odpovídající rezonanční frekvence. Rezonance se nejprve vyznačovala u mechanických systémů, jako je kyvadlo. Mechanické systémy, které vibrují nebo oscilují, vykazují amplitudy oscilace, pokud jsou poháněny na své rezonanční frekvenci. Graf amplitudy v závislosti na excitační frekvenci bude mít vrchol se středem v rezonanční frekvenci. Tento děj představuje jeden z typů spektra, vrchol je často označován jako spektrální čára a většina spektrálních čar má podobný vzhled. (T. Černohorský, 1997)

V kvantové mechanice systémů je rezonance chápána jako spojka dvou kvantových mechanických stacionárních stavů, jednoho systému, jako je například atom a zdroje oscilační energie, jako je foton. Spojení těchto dvou stavů je nejsilnější, pokud se energie zdroje rovná energetickému rozdílu mezi těmito dvěma stavy. Energie fotonu souvisí s jeho frekvencí ν podle vztahu: $E = h \cdot \nu$, kde h je Planckova konstanta, a proto spektrum odezvy systému ν závislosti na fotonové frekvenci dosáhne vrcholu na rezonanční frekvenci. Částice, jako jsou elektrony a neutrony mají srovnatelné vlastnosti, je zde de Broglieho vztah mezi jejich kinetickou energií a jejich vlnovou délkou a frekvencí, a proto mohou také rozrušit rezonanční interakce. Spektra atomů a molekul se často skládají z řady spektrálních čar, z nichž každá představuje rezonanci mezi dvěma různými kvantovými stavy. Vysvětlení těchto sérií a spektrálních vzorů, které jsou s nimi spojeny, bylo jednou z experimentálních záhad, které vedly k rozvoji a vnímání kvantové mechaniky. Spektrum vodíku bylo nejprve úspěšně vysvětleno pomocí Rutherford-Bohrova kvantového modelu atomu vodíku. V některých případech jsou spektrální čáry dobře odděleny a jsou snadno odlišitelné, ale spektrální čáry se mohou také překrývat. Pojmenovaná řada čar zahrnuje jistinu, ostrost, difúzní a základní série. (L. Sommer, 1986)

2.1. Výhody metod optické spektroskopie

Mezi největší výhody metod optické spektroskopie oproti ostatním analytickým metodám patří asi tyto:

- rozsah vzdáleností na jakou můžeme zkoumaný vzorek měřit, vzdálenost se při měření může pohybovat v řádech milimetrů či metrů,
- měření může probíhat bez fyzického kontaktu se vzorkem, proto můžeme zkoumat i nebezpečné vzorky,
- nezávisí na skupenství, „optická vlastnost“ je vždy stejná ať už máme vzorek v plynné, kapalně nebo pevné fázi,
- laserová spektroskopie nám umožňuje měřit i velmi rychlé reakce, které probíhají v řádech 10^{-15} s,
- luminiscenční metody nám zase umožňují měřit nízké koncentrace až 10^{-18} mol,
- radioaktivní indikátory používané především u biologických a biochemických procesů se nahrazují jednoduššími a levnějšími luminiscenčními indikátory.

2.2. Historický vývoj optické spektrometrie

Historie spektroskopie se datuje od 17. století. K rozvoji výrazně přispěly pokroky v optice, konkrétně vznik optického hranolu, který umožnil systematické pozorování slunečního spektra. Isaac Newton nejprve použil slovo spektrum jako popis barev duhy, které vznikají jako rozklad světla na jeho jednotlivé barevné složky. Během začátku 18. století Joseph von Fraunhofer zaznamenal experimentálně pokrok rozptylu spektrometrů, který umožnil spektroskopii, aby se stala přesnější a kvantitativní vědeckou metodou. Od té doby, spektroskopie hrála a nadále hraje významnou roli v chemii, fyzice a astronomii. (W. Schmidt, 2005)

2.2.1. Počátky a experimentální vývoj spektroskopie

Newton je tradičně považován za zakladatele spektroskopie, ale nebyl první vědec, který studoval spektrum slunečního záření. Již Římané uměli pomocí hranolu vytvářet barevnou duhu. Práce Athanasiuse Kirchera (1646), Jana Marka Marcia (1648), Roberta Boylea (1664) a Francesca Maria Grimaldiho (1665) předcházela Newtonovým optickým experimentům z let 1666–1672. Newton popsal své experimenty a teoretické vysvětlení rozptylu světla v knize „Optika“. Jeho experimenty prokázaly, že světlo může být rozděleno do dílčích barevných složek pomocí optického hranolu a tyto složky mohou být znovu spojeny za vytvoření paprsku světla. Newton demonstroval, že hranol barvy nevytváří, ale spíše odděluje základní složky světla. (W. Schmidt, 2005)

Vědci pozorovali různé barvy plamene (emisní spektra), když přidávali různé soli k hořícímu alkoholu. Následné pokusy s hranoly ukázaly, že barva plamene jedinečným způsobem závisí na chemické látce, která je spalována. Joseph von Fraunhofer nahradil optický hranol mřížkou. Fraunhoferovu teorii o světelné interferenci rozvinuli následně Thomas Young, François Arago a Augustin-Jean Fresnel. Fraunhofer prováděl své vlastní experimenty, které prokázaly účinek průchodu světla pomocí jediné obdélníkové štěrbin, dvěma štěrbinami, a tak dále, pokračoval až k rozdělení na tisíce štěrbin s těsnými mezerami pro vytvoření difrakční mřížky. Použití difrakční mřížky zlepšilo oproti hranolu spektrální rozlišení. Fraunhofer vyzpozoval (spojením dalekohledu s difrakční mřížkou) a publikoval sluneční spektrum, pozoroval v něm tmavé pruhy a specifikoval jejich vlnové délky, které jsou dnes známy jako Fraunhoferovy čáry. (H. Bings, 2006)

V první polovině 18. století se celá řada vědců zabývala spektroskopií. V roce 1820 John Herschel a William H. F. Talbot zkoumali soli pomocí plamenové spektroskopie. Charles Wheatstone v roce 1835 objevil, že různé kovy lze snadno rozlišit podle různých světlých

čar v emisních spektrech jejich jisker. V roce 1849 J. B. L. Foucault experimentálně prokázal, že absorpční a emisní čáry stejného prvku se objeví na stejné vlnové délce, rozdíl mezi těmito dvěma spektry je jen v teplotě světelného zdroje. V roce 1853 švédský fyzik Anders Jonas Ångström prezentoval, nezávisle ne Foucaultovi, pozorování a teorii o spektru plynu ve své práci: *Optiska Undersökningar* („Termín optika“) na Královské švédské akademii věd. Ångström postuloval, že žhavý plyn emituje světelné paprsky na stejné vlnové délce, jako je může absorbovat. Zároveň George Stokes a William Thomson (Kelvin) diskutovali o podobných postulátech. Ångström také změřil emisní spektrum vodíku, později Balmer uvedl vzorec pro výpočet vlnových délek spektrálních čar vodíku. V roce 1854 a 1855 David Alter publikoval připomínky ke spektrům kovů a plynů včetně nezávislého pozorování Balmerových čar vodíku. (W. Schmidt, 2005)

Se systematickým měřením spekter chemickým prvkům začali v roce 1860 německý fyzik Gustav Kirchhoff a chemik Robert Bunsen, který vylepšil zdroj plamene. Tím byly položeny základy techniky analytické spektroskopie. V roce 1860 publikovali své poznatky o spektrech osmi prvků a identifikovali přítomnost těchto prvků v několika přírodních látkách. Prokázali také, že spektroskopie by mohla být použita pro chemickou analýzu a objevili několik chemických prvků, které nebyly dosud známy. Kirchhoff a Bunsen také definitivně stanovili souvislost mezi absorpčními a emisními čarami. Kirchhoff dále pokračoval příspěvkem o povaze absorpčních a emisních spekter, včetně toho, co je nyní známo jako Kirchhoffův zákon tepelného záření. Kirchhoffovy aplikace tohoto zákona na spektroskopii jsou zachyceny ve třech zákonech spektroskopie:

1. Žhavé pevné, kapalné nebo plynné látky pod vysokým tlakem emitují spojité spektrum.
2. Horký plyn pod nízkým tlakem emituje emisní čáry spektra.
3. Světlo při průchodu chladným plynem s nízkou hustotou produkuje spektrum absorpčních čar. (History of spectroscopy, 2015)

V roce 1860 William Huggins a jeho manželka Margaret použili spektroskopii k důkazu toho, že hvězdy jsou složeny ze stejných prvků, které byly nalezeny na zemi. Manželé Hugginsovi použili tzv. relativistický Dopplerův jev a rovnici tohoto jevu aplikovali na hvězdu Sírius v roce 1868 za účelem zjištění její axiální rychlosti. Hugginsovi jsou dnes nejvíce známy kvůli jejich průkopnické práci na poli spektroskopické astronomie.

Johann Balmer přišel v roce 1885 na to, že výpočet vlnových délek spektrálních čar vodíku lze vyjádřit pomocí vzorce. Za přínos tohoto vzorce je dodnes oceňován. Tato myšlenka byla

následně rozvedena o několik let později pomocí Rydbergovy formule, která popisuje další čáry. (H. Bings, 2006)

2.2.2. Úspěchy spektroskopie

Na počátku dvacátého století výzkum spektroskopie významně přispěl k rozvoji kvantové mechaniky. Kvantová mechanika poskytla vysvětlení a teoretický rámec pro pochopení spektroskopických pozorování. (W. Schmidt, 2005)

Laser a jeho předchůdce maser, byly vynalezeny díky spektroskopii. Lasery posléze významně pomohly k pokroku v experimentální spektroskopii. (W. Schmidt, 2005)

2.3. Klasifikace metod optické spektroskopie

Spektroskopie je dostatečně široká oblast na to, aby existovalo mnoho dílčích disciplín, každá s četnými způsoby provedení konkrétních spektroskopických technik. Různé provedení a techniky mohou být rozděleny několika způsoby.

2.3.1. Podle druhu energie

Zpracováno podle (J. W. Robinson, 1994)

Spektroskopii můžeme dělit podle typu zářivé energie, která se podílí na interakci. V mnoha případech je spektrum určeno měřením změn intenzity nebo frekvence této energie. Dělení je následující:

- **Elektromagnetické záření** bylo použito jako první zdroj energie sloužící k spektroskopické studii. Techniky využívající elektromagnetické záření jsou obvykle klasifikovány podle oblasti vlnových délek spektra a zahrnují mikrovlnné záření, infračervené záření, viditelné záření, ultrafialové záření, rentgenové záření a gama záření. (viz Tabulka 1: Typy záření)
- **Částice**, vzhledem k jejich de Broglieho vlnové délce, mohou být také zdrojem zářivé energie a jak elektrony, tak neutrony se takto běžně používají. U částic platí, že jejich kinetická energie určuje jejich vlnovou délku.
- **Mechanické metody** mohou být použity pro dodání vyzařované energie do pevných materiálů.

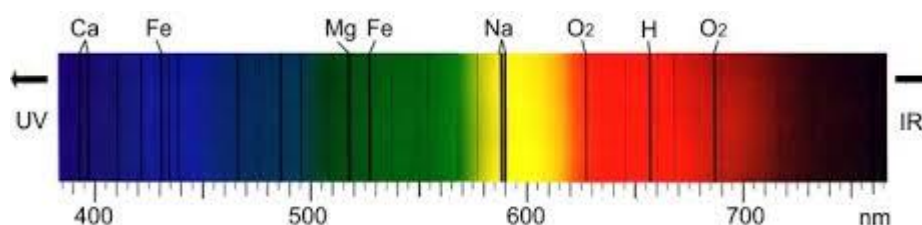
Typ záření	Vlnčet [cm^{-1}]	Frekvence [Hz]	Energie [kJ/mol]	Interakce s hmotou
Záření gama (γ)	10^8 – 10^{10}	3×10^{18} Hz – 3×10^{20} Hz	10^6 – 10^8	Rozpady atomových jader
Rentgenové záření (RTG)	10^6 – 10^8	3×10^{16} Hz – 3×10^{18} Hz	10^4 – 10^6	Ionizace
Ultrafialové záření (UV)	10^4 – 10^6	3×10^{14} Hz – 3×10^{16} Hz	100 – 10^4	Přechody elektronů
Viditelné záření (VIS)	100 – 10^4	3×10^{12} Hz – 3×10^{14} Hz	1 – 100	Přechody elektronů
Infračervené záření (IR)	1 – 100	30 GHz – 3×10^{12} Hz	$0,01$ – 1	Vibrace molekul
Mikrovlnné záření (MW)	$0,01$ – 1	300 MHz – 30 GHz	10^{-4} – $0,01$	Rotace molekul

Tabulka 1: Typy záření

2.3.2. Podle povahy interakce

Druhy spektroskopie lze rovněž rozlišit podle povahy interakce mezi energií a materiálem. Tyto interakce dělíme takto:

- **Absorpční** – vznikají při průchodu spojitého záření látkou. Absorpční spektrum je charakteristické vytvořením černých čar na pozadí spojitého záření, které jsou samozřejmě charakteristické pro každý prvek. (K. Doerffel, 1985) Výhodou oproti emisní spektroskopii je to, že nemusíme zkoumaný vzorek zahřát na velmi vysokou teplotu. (Beckman, 1977)

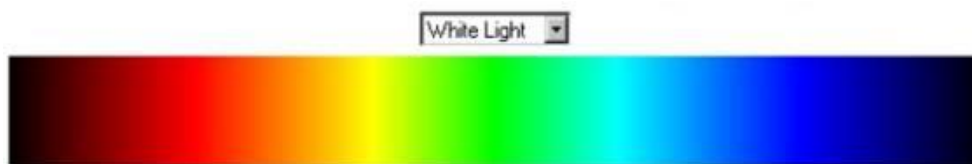


Obrázek 1: absorpční spektrum

Dělíme je na dvě skupiny: – čárová
– pásová

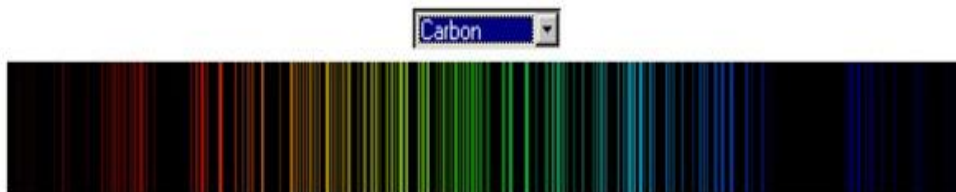
- **Emisní** – vzorek je působením dodané energie (vysoké teploty) rozložen na volné atomy a ty jsou poté převedeny do excitovaného stavu. Při návratu těchto částic do energeticky chudších stavů vyzařují elektromagnetické záření ve vlnových délkách, které jsou charakteristické pro jednotlivé prvky. Emisní spektra dělíme na:

- spojité – souvislý pruh barev, kde jednotlivé barvy plynule přecházejí jedna v druhou, nejčastěji ho získáme u rozžhavených látek v pevném a kapalném stavu (např. vlákno žárovky, roztavené kovy,...)



Obrázek 2: Emisní spektrum – spojité

- čárová – spektra, se kterými se nejčastěji setkáváme u plynů zahřátých na vysoké teploty nebo u plynů zářících ve výbojových trubcích; spektra jsou poskládány z jednotlivých barevných čar oddělených od sebe tmavými mezerami, které jsou typické pro jednotlivé prvky.



Obrázek 3: Emisní spektrum – čárové (uhlík)

- pásová – vytvořená velkým množstvím velmi blízkých čar; tyto shluky vytvářejí charakteristické pásy, které jsou oddělené tmavými pásy. Jsou charakteristická pro zářící molekuly látek. (J. W. Robinson, 1961)
- **Pružný rozptyl** – zjišťuje, jak je dopadající záření odražené nebo rozptýlené zkoumanou látkou, rozptýlené světlo si zachovává původní vlnovou délku. Krystalografie využívá rozptyl vysokého energetického záření, jako je například rentgenové záření. (H. Bings, 2006)
- **Impedanční spektroskopie** – zkoumá schopnost látky bránit či zpomalit propustnost energie. U optických aplikací je charakterizována indexem lomu. (H. Bings, 2006)

- **Nep pružný rozptyl** – jevy zahrnují výměnu energie mezi zářením a hmotou, která posune vlnovou délku rozptýleného záření – v různých směrech, různá vlnová délka. Patří mezi ně Ramanův a Comptonův rozptyl. (H. Bings, 2006)

2.3.3. Podle druhu materiálu

Spektroskopické studie jsou navrženy tak, aby energie záření interagovala se specifickými typy hmoty.

- **Atomy**

Atomová spektroskopie byla vyvinutá jako první aplikace spektroskopie. Atomová absorpční spektroskopie (AAS) a atomová emisní spektroskopie (AES) zahrnují viditelné a ultrafialové světlo. Tyto absorpce a emise, často označované jako atomové spektrální čáry, existují v důsledku elektronových přechodů vnějších vrstev elektronů, jak stoupají a klesají z jedné elektronové oběžné dráhy na druhou. Atomy mají také výrazná rentgenová spektra, která se vztahují k excitaci elektronů vnitřní vrstvy.

Atomy různých prvků mají odlišná spektra, a proto atomová spektroskopie umožňuje identifikaci a kvantifikaci elementárního složení vzorku. Robert Bunsen a Gustav Kirchhoff objevili nové prvky tím, že sledovali jejich emisní spektra. Atomové absorpční čáry jsou pozorovány i ve slunečním spektru a jmenují se Fraunhoferovy čáry po svém objeviteli. Komplexní vysvětlení vodíkového spektra byl první velký úspěch kvantové mechaniky a vysvětlení Lambova posuvu (nepatrný posuv některých energetických hladin vodíku způsobený interakcí elektronu s vakuovými páry virtuálních částic) pozorovaného ve vodíkovém spektru vedl k vývoji kvantové elektrodynamiky. (L. Sommer, 1986)

Moderní využití atomové spektroskopie ke studiu viditelných a ultrafialových přechodů zahrnuje plamenovou emisní spektroskopii, ICP-OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem), spektroskopii doutnavého výboje, mikrovlnnou indukovanou plazmovou spektroskopii a jiskru nebo oblouk u emisní spektroskopie. Mezi techniky pro studium rentgenových spekter patří rentgenová spektroskopie a rentgenová fluorescence (XRF). (P. Klouda, 2003)

- **Molekuly**

Kombinace atomů do molekul vede k vytváření jedinečných typů energetických stavů a tudíž k vytváření unikátních spekter přechodů mezi těmito stavy. Molekulární spektra lze získat díky spinu elektronových stavů (elektronová paramagnetická rezonance), molekulárním rotacím a molekulárním vibracím. Rotace jsou hromadné pohyby atomových jader a obvykle vedou k mikrovlnným spektrům nebo k vzniku milimetrových vln oblastech

spektra; rotační spektroskopie a mikrovlnná spektroskopie jsou synonyma. Vibrace jsou relativní pohyby atomových jader a jsou studovány jak infračervenou, tak Ramanovou spektroskopií. Elektronové excitace jsou studovány pomocí viditelné a ultrafialové spektroskopie, stejně tak i pomocí fluorescenční spektroskopie.

Studie v molekulární spektroskopii vedly k vývoji prvního maseru a přispěly k dalšímu vývoji laseru. (L. Sommer, 1986)

- **Krystaly a rozšířené materiály**

Kombinace atomů nebo molekul v krystalech nebo jiných strukturách vede k vytváření dalších energetických stavů. Tyto stavy jsou časté, a proto mají vysokou hustotu stavů. Tato vysoká hustota často dělá spektra slabší a méně zřetelná, tedy širší. Například, záření černého tělesa existuje z důvodu tepelných pohybů atomů a molekul v materiálu. Akustické a mechanické odezvy jsou kvůli hromadným pohybům stejné. Uspořádání krystalů má také velký vliv na pozorovaná molekulární spektra.

Pravidelná mřížková konstrukce krystalů rozptyluje rentgenové paprsky, elektrony a neutrony umožňující krystalografické studie. (P. Klouda, 2003)

- **Jádra**

Jádra mají také různé energetické stavy, které jsou daleko od sebe a vedou ke vzniku gama spekter. Zřetelné jaderné spinové stavy mohou mít své energie oddělené magnetickým polem a to umožňuje spektroskopii NMR (Nukleární Magnetická Rezonance). (P. Klouda, 2003)

2.4. Metody optické spektroskopie

2.4.1. Atomová emisní spektrometrie

- **Úvod**

Atomová emisní spektrometrie (AES) je metoda chemické analýzy, která využívá intenzitu světla vyzařovaného z plamene, plazmy, atd. při určité vlnové délce, aby se stanovilo množství prvku ve vzorku. Vlnová délka atomové spektrální čáry udává identitu prvku, zatímco intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná počtu atomů prvku.

- **Plamenová emisní spektrometrie**

Vzorek materiálu (analytu) se přivede do plamene buď jako plyn, vstříknutý roztok nebo se přímo vloží do plamene za použití malého drátěného oka. Tepelná energie vybudí atomy do excitovaných elektronových stavů, které následně vyzařují světlo. Každý prvek emituje světlo charakteristické vlnové délky, které se rozptýlí pomocí mřížky nebo hranolu a následně je detekováno ve spektrometru.

Plamenová emisní spektrometrie je často využívána ve farmaceutické analýze ke stanovení alkalických kovů. (J. Dědina, 1987)

- **ICP-OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)**

ICP-OES používá indukčně vázanou plazmu k produkci excitovaných atomů a iontů, které emitují elektromagnetické záření o charakteristických vlnových délkách.

Výhody ICP-OES jsou – vynikající mez detekce, lineární dynamický rozsah, schopnost víceprvkové analýzy, stabilní a reprodukovatelný signál. Nevýhody – spektrální interference (mnoho emisních čar), cena a provozní náklady. (J. W. Robinson, 1961)

- **Atomová emisní spektroskopie využívající elektrický oblouk a jiskru**

Tato atomová emisní spektroskopie se používá pro analýzu kovů v pevných vzorcích. U nevodivých materiálů je vzorek smíchán s grafitovým práškem, aby se stal vodivým. U tradičních metod využívajících ke spektroskopii elektrický oblouk, je běžně pevný vzorek zničen během analýzy. Elektrický oblouk nebo jiskra projdou vzorkem, zahřejí ho na vysokou teplotu, což vede k excitaci jeho atomů. Vybuzené atomy analytu vyzařují světlo o charakteristických vlnových délkách. V minulosti nebylo toto měření dobře zvládnuté především kvůli zapalovacím strojům a analýza prvků ve vzorku byla pouze kvalitativní. Nicméně tyto problémy dnes už neřešíme.

Jak kvalitativní, tak kvantitativní analýza jiskrou jsou používány pro kontrolu kvality výroby ve slévárnách. (J. W. Robinson, 1961)

2.4.2. Atomová absorpční spektrometrie

- **Úvod**

Atomová absorpční spektroskopie (AAS) je analytický postup pro kvantitativní stanovení chemických prvků pomocí absorpce optického záření (světla) volnými atomy v plynném stavu.

V analytické chemii se tato technika používá pro stanovení koncentrace určitého prvku (analytu) ve vzorku, který má být analyzován. AAS může být použita pro stanovení více než 70 různých prvků v roztoku nebo přímo v pevných vzorcích. (L. Sommer, 1978)

Atomová absorpční spektrometrie byla poprvé použita jako analytická technika a základní principy byly založeny ve druhé polovině 19. století Robertem Wilhelmem Bunsenem a Gustavem Robertem Kirchhoffem, oba profesori působili na univerzitě v Heidelbergu, Německo. (J. Komárek, 2000)

Moderní forma AAS byla velmi rozvinuta během roku 1950 týmem australských chemiků, kteří byli vedeni sirem Alanem Walshem.

Atomová absorpční spektrometrie má mnoho použití v různých oblastech chemie, jako je klinická analýza kovů v biologických tekutinách a tkáních, jako jsou například krev, plazma, moč, sliny, mozkové tkáně, játra, svalové tkáně, sperma a v některých farmaceutických výrobních procesech ke zjištění množství katalyzátoru, které zůstává v konečném formě léčiva. (Beckman, 1977)

- **Teorie**

Tato technika využívá absorpční spektrometrie k posouzení koncentrace analytu ve vzorku. To vyžaduje standardy se známým obsahem analytu k navázání vztahu mezi naměřenou absorpční a koncentrací stanovované složky a spoléhá tudíž na Beer-Lambertův zákon.

Stručně řečeno, elektrony atomů v atomizéru mohou být vybuzeny do vyšších orbitalů (excitovaný stav) na krátkou dobu (nanosekundy), tím, že absorbují definované množství energie (záření o dané vlnové délce). Toto množství energie, tj. vlnová délka, je specifické pro konkrétní elektronové přechody v určitém prvku. Obecně platí, že každá vlnová délka odpovídá pouze jednomu prvku a šířka absorpční čáry je pouze v řádu několika málo pikometrů (pm). Tok záření bez vzorku a se vzorkem v atomizéru se měří pomocí detektoru a poměr mezi těmito dvěma hodnotami (absorbancemi) je převeden na koncentraci analytu nebo hmotnosti, za použití Beer-Lambertova zákona. (K. Doerffel, 1985)

- **Přístrojové vybavení**

zpracováno podle (H. Bings, 2006)

Aby bylo možné analyzovat vzorek kvůli jeho atomovému složení, musí být atomizován. Nejčastěji používané atomizátory v současné době jsou plameny a elektrotermické atomizátory (grafitová trubka). Další způsoby atomizace, které se provádí např. pomocí výboje nebo pomocí studených par jsou používány pouze pro zvláštní účely. Atomy by měly být ozářeny světlem. Záření dále prochází monochromátorem, aby se oddělil specifický prvek záření od jiného záření emitovaného zdrojem světla, který je nakonec měřený detektorem.

Plamenné atomizátory

Nejstarší a nejčastěji používané atomizátory v AAS jsou plameny, hlavně kyslíko-acetylenový (stlačený vysoce čistý kyslík + C₂H₂) plamen s teplotou asi 2 300 °C a systém využívající spalování směsi oxidu dusného (N₂O) a acetylenu k dosažení plamene s teplotu přibližně 2 700 °C. Tento plamen navíc nabízí redukční prostředí a je ideální pro analyty s vysokou afinitou ke kyslíku. Kapalné nebo rozpuštěné vzorky se obvykle přivádí k atomizaci plamenem. Roztok vzorku se odsaje do rozprašovače, dále je rozprašovaný roztok zaváděn do rozprašovací komory, kde se mísí s plamenem a tento postup je upraven

tak, že se pouze nejmenší aerosolové částice (<10 μm) dostanou k plamenu. Tato úprava je zodpovědná za to, že jen asi 5 % z nasávaného roztoku vzorku dosáhne plamene, ale také zajišťuje relativně vysoký odstup signálu od šumu.

V horní části rozprašovací komory je hlava hořáku, která vytváří plamen, který je obvykle dlouhý 5–10 cm a pouze několik mm široký. Záření prochází tímto plamenem v jeho nejdelší ose a průtoková rychlost plamene může být upravována pro dosažení, co nejvyšší koncentrace volných atomů. Výška hořáku může být také upravována tak, aby záření procházelo zónou nejvyšší hustoty vstříkovaného roztoku do plamene, což má za následek nejvyšší možnou citlivost. Procesy v plamenu zahrnují různé etapy: *desolvatace* (sušení) – rozpouštědlo se odpaří a zůstávají nanočástice suchého vzorku, *odpařování* (převod do plynné fáze) – pevné částice jsou převedeny do plynné molekuly, *rozprašování* – molekuly jsou odděleny na volné atomy a ionizace (v závislosti na ionizačním potenciálu atomů látky a energie dostupné v určitém plamenu) – atomy mohou být částečně převedeny na plynné ionty. Každá z těchto fází zahrnuje riziko interference v případě, že je stupeň fázového přenosu pro daný analyt odlišný v kalibračním standardu a vzorku. Ionizace je obecně nežádoucí jev, neboť se tak snižuje počet atomů, které jsou k dispozici pro měření, tj. citlivost.

Elektrotermické atomizátory

Elektrotermickou AAS s použitím grafitové trubky se zabýval Boris V. L'vov v Saint Petersburgském polytechnickém institutu, Rusko a Hans Massmann na Ústavu spektrochemie a aplikovaného spektroskopie (ISA) v německém Dortmundu. Ačkoliv byla v průběhu let použita celá řada návrhů grafitové trubky, tak jsou v dnešní době používány tyto rozměry: 20–25 mm na délku a 5–6 mm vnitřní průměr. Odměřený objem vzorku – typicky 10 až 50 μl nebo odvážená hmotnost – typicky kolem 1 mg z pevného vzorku se vloží do grafitové trubky a nastaví se vhodný teplotní program. Ten se obvykle skládá z fází, jako jsou *sušení* – rozpouštědlo se odpaří, *pyrolýza* – většina složek matrice se odstraní, *atomizace* – prvek je uvolněn do plynné fáze a *čištění* – případné zbytky v grafitové trubici jsou odstraněny za vysoké teploty.

Grafitové trubice, se značným elektrickým odporem se po průchodu vysokého proudu v důsledku Jouleova tepla zahřejí, teplota v jednotlivých fázích procesu je řízena, přičemž teplotní rozdíly mezi jednotlivými stupni usnadňují separaci vzorku. Trubky mohou být zahřívány příčně nebo podélně, kde příčné zahřívání má tu výhodu, že rozložení teploty je více homogenní po celé délce. Používá se STPF koncept (Stabilized Temperature Platform Furnace), ten zahrnuje: rychlý ohřev, zastavení toku vnitřního inertu během atomizace,

vyhodnocení absorbance pomocí plochy píku. Vzorek se atomizuje z grafitové plošiny vložením do grafitové trubky, aby se oddálila atomizace tak dlouho, dokud se neustálí teplota plynné fáze v atomizéru. Použitím chemického modifikátoru za účelem stabilizace analytu na teplotu, která je dostatečná k odstranění většiny složky matrice a integrací absorbance po dobu přechodného absorpčního signálu místo použití výšek píků se dále zlepšují parametry metody.

V ET AAS se vytváří přechodný signál, což je oblast, která je přímo úměrná hmotnosti analytu (ne jeho koncentraci) zavedeného do grafitové trubky. Tato technika má tu výhodu, že jakýkoliv druh vzorku (pevný, kapalný nebo plynný) může být analyzován přímo. Jeho citlivost je o 2–3 řády vyšší než u plamenné AAS. Má velmi nízký stupeň rušení, takže ET AAS by mohla být považována za nejrobustnější techniku, která je k dispozici v současné době, pro stanovení stopových prvků ve složitých maticích.

Zdroje záření

Rozlišujeme mezi AAS zdroji čárovými (LS AAS) a zdroji spojitými AAS (CS AAS). V klasické LS AAS, jak bylo navrženo Alanem Walshem, je nutné vysoké spektrální rozlišení, což zajišťuje zdroj záření poskytující spektrální čáry analytu, které jsou užší než absorpční čáry. Zdroje spojitého záření jako jsou deuteriové výbojky, jsou používány pouze pro účely provedení korekce na pozadí. Výhodou LS AAS je, že je nutné pouze střední rozlišení monochromátoru pro měření AAS. Nicméně to má tu nevýhodu, že je obvykle vyžadována samostatná výbojka pro každý prvek, který má být stanoven.

V CS AAS stačí použít jednu výbojku, která emituje spojitě záření v celém spektrálním rozsahu, pro všechny stanovované prvky. Je zřejmé, že je pro tuto techniku nutné použít spektrometr s vysokým rozlišením.

Duté katodové výbojky

Duté katodové výbojky (HCL) jsou nejčastěji používány jako zdroj záření v LS AAS. Uvnitř uzavřené výbojky, naplněné argonem nebo neonem za nízkého tlaku, je válcová kovová katoda obsahující zkoumaný prvek a anoda. Vysoké napětí je aplikováno přes anodu s katodou, což vede k ionizaci plnicího plynu. Plynové ionty jsou urychlovány směrem ke katodě a při nárazu na katodu začne prvek katody prskat, který je vybuzen doutnavým výbojem k emisi záření zkoumaného prvku. Většina výbojek zpracovává pouze 5–8 prvků.

Bezelektrodové výbojky

Bezelektrodové výbojky (EDL) obsahují malé množství analytu ve formě kovu nebo soli v křemíkové baňce společně s inertním plynem, typicky argon, při nízkém tlaku. Žárovka se vloží do závitu výbojky, což generuje elektromagnetické vysokofrekvenční pole, které vede

k nízkotlakému výboji ve výbojce. Emise z EDL jsou vyšší než z HCL a šířka čar je obecně užší.

Deuteriové výbojky

Deuteriové a vodíkové výbojky jsou používány v LS AAS za účelem korekce pozadí. Intenzita záření vysílaného těmito výbojkami se výrazně snižuje s rostoucí vlnovou délkou, takže mohou být použity pouze v rozsahu vlnových délek mezi 190–320 nm.

Zdroje spojitého záření

Je-li zdroj spojitého záření používán pro AAS, je nutné použít spektrometr s vysokým rozlišením. Kromě toho, že je nutné, aby světelný zdroj emitoval záření o intenzitě alespoň o řád vyšší, než HCL v celém rozsahu vlnových délek od 190 nm do 900 nm. Speciální vysokotlaké xenonové obloukové výbojky, byly vyvinuty tak, aby tyto požadavky splňovali.

Spektrometry

zpracováno podle (K. Doerffel, 1985)

Jak již bylo uvedeno výše, existuje rozdíl mezi spektrometry se středním rozlišením, které se používají pro LS AAS a spektrometry s vysokým rozlišením, které jsou navrženy pro CS AAS. Spektrometr obsahuje spektrální třídicí zařízení (monochromátor) a detektor.

Spektrometry pro LS AAS

V LS AAS postačuje monochromátor s rozlišením 0,2–2 nm. Další vlastnost, která je pro LS AAS specifická je modulace zdroje záření a použití lock-in zesilovačů naladěných na frekvenci zdroje. Tímto způsobem může být vyloučeno jakákoliv záření vyzářené například nezbytným atomizérem.

Spektrometry pro CS AAS

Je-li pro měření používáno spojitě záření AAS, je nezbytné pracovat s monochromátorem s vysokým rozlišením. Rozlišení musí být stejné nebo lepší, než je pološířka atomové absorpční linie (2 pm), aby se zabránilo ztrátám citlivosti a linearity kalibrační křivky. Kontinuální AAS spektrometry s vysokým rozlišením (HR) CS AAS používají kompaktní dvojitý monochromátor s hranolem před monochromátorem a schodovitou echele mřížku s vysokým rozlišením. Lineární CCD (Charge Coupled Device) pole s 200 pixely se používá jako detektor. Druhý monochromátor nemá výstupní štěrbinu, a proto se stává spektrální prostředím na obou stranách analytické linie viditelným ve vysokém rozlišení. Obvykle se používá k měření absorpce jen 3–5 bodů, ostatní body jsou k dispozici pro účely korekce. (H. Bings, 2006)

2.4.3. Atomová fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektrometrie je druh elektromagnetické spektroskopie, která analyzuje fluorescenci ze vzorku. Používáme paprsek záření, obvykle ultrafialového, které excituje elektrony v molekulách některých sloučenin a způsobuje, že samy vyzáří záření (často viditelné světlo). (Zdeněk Fišar)

- **Teorie**

zpracováno podle (Zdeněk Fišar)

Molekuly mají různé stavy označované jako energetické hladiny. Fluorescenční spektroskopie se primárně zabývá elektronickými a vibračními stavy.

Fluorescence využívá první excitace, aby byla umožněna absorpce fotonu z jeho základního elektronického stavu do jednoho z mnoha vibračních stavů v excitovaném elektronickém stavu. Srážky s jinými molekulami způsobují ztrátu vibrační energie molekul, která pokračuje, dokud nedosáhne nejnižšího vibračního stavu excitovaného elektronického stavu.

Molekule opět klesne elektronický stav na jednu z různých vibračních úrovní, což je doprovázeno vyzářením fotonu. Jak molekuly mohou klesnout dolů do jedné z několika vibračních úrovní v základním stavu, tak vyzářené fotony mají různé energie a tím pádem i různé frekvence. Proto na základě analýzy různých frekvencí světla emitovaného fluorescenční spektroskopii, může být určena struktura jednotlivých vibračních hladin.

U atomů je postup podobný; nicméně protože atomy nemají energetické vibrační hladiny, tak mají emitované fotony často stejnou vlnovou délku jako dopadající záření. Tento proces znovu vyzáření absorbovaného fotonu je nazýván „rezonanční fluorescence“.

- **Přístrojové vybavení**

zpracováno podle (J. W. Robinson, 1961)

Existují dva hlavní typy přístrojů: *fluorimetry*, které používají k izolaci dopadajícího a fluorescenčního záření filtry a *spektrofluorimetry*, které používají k izolaci těchto dvou záření ohybové mřížky – monochromátory.

Oba typy používají následující schéma: záření z excitačního zdroje prochází filtrem nebo monochromátorem a zasahuje vzorek. Část dopadajícího záření je absorbována vzorkem a některé molekuly ve vzorku začnou fluoreskovat. Fluorescenční záření je vyzářováno ve všech směrech, část světla prochází přes druhý filtr nebo monochromátor až k detektoru, který je obvykle umístěn v úhlu 90° k dopadajícímu světelnému paprsku, aby se minimalizovalo riziko dopadu excitačního nebo odraženého záření dopadajícího na detektor.

Mohou být použity různé zdroje excitačního záření, včetně laserů, LED a výbojek – xenonové a rtuťové. Laser emituje pouze světlo s vysokou intenzitou záření ve velmi úzkém rozmezí vlnových délek, typicky pod 0,01 nm, pro což nejsou potřeba filtry. Nevýhodou této metody je, že vlnová délka laseru nelze o moc změnit. Rtuťové výbojky vyzařují čárové světlo, což znamená, že emitují světlo v blízkosti špiček vlnových délek. Naproti tomu xenonový oblouk má kontinuální emisní spektrum s téměř konstantní intenzitou v rozmezí 300–800 nm.

Monochromátor propouští světlo o nastavitelné vlnové délce s nastavitelnou tolerancí. Nejčastěji využívaným typem monochromátoru jsou ohybové mřížky, to znamená, že světlo projde přes mřížku a odrazí se pod různým úhlem v závislosti na vlnové délce. Pro umožnění měření anizotropie je nutné přidání dvou polarizačních filtrů: jeden za excitační monochromátor nebo filtr a jeden před emisní monochromátor nebo filtr.

Detektor může být buď jednobáňový, může detekovat pouze intenzitu záření o jedné vlnové délce, zatímco multibáňový detekuje intenzitu všech vlnových délek současně, takže monochromátor nebo filtr jsou zbytečné. Různé typy detektorů mají své výhody i nevýhody.

Nejvšestrannější fluorimetry s duálními monochromátory a kontinuálními světelnými zdroji umožňují měření excitačního i fluorescenčního spektra. Při měření fluorescenčního spektra se vlnová délka excitačního záření udržuje konstantní. Pro měření excitačního spektra je vlnová délka filtru nebo monochromátoru udržována konstantní a excitace monochromátoru je skenována. Excitační spektrum je obecně shodné s absorpčním spektrem, intenzita fluorescence je úměrná absorpci.

- **Analýza dat**

Při nízkých koncentracích je fluorescenční intenzita přímo úměrná koncentraci fluoroforu.

Několik faktorů má vliv na narušení spektra a jsou nezbytné určité opravy k dosažení pravdivých výsledků. Intenzita zdroje světla a vlastnosti vlnové délky se při každém pokusu a mezi každým experimentem mění v průběhu času. Kromě toho, žádná výbojka nemá konstantní intenzitu při všech vlnových délkách. Pro nápravu tohoto stavu využijeme dělič paprsků, který může být aplikován za excitační monochromátor nebo filtr, pro nasměrování části světla do referenčního detektoru.

Kromě toho je třeba vzít v úvahu účinnost přenosu monochromátorů a filtrů. Ta se může také měnit v průběhu času. Účinnost přenosu monochromátoru se také liší v závislosti na

vlnové délce. To je důvod, proč by měl být volitelný referenční detektor umístěn za monochromátor nebo filtr. (J. W. Robinson, 1961)

Dalším důležitým faktorem je vybrat vhodný materiál kyvet. Pro většinu měření v UV, viditelné oblasti a IR je nutné použití přesných křemenných kyvet. Je důležité vybrat materiály, které mají relativně malou absorpci v rozmezí vlnových délek, které nás zajímají. Křemen je ideální, protože propouští záření od 200 nm do 2 500 nm, zatímco absorpční vlastnosti jiných materiálů mohou maskovat fluorescenci vzorku. Oprava všech těchto instrumentálních faktorů pro získání základního spektra je zdlouhavý proces, který se uplatňuje pouze v praxi, kdy je to nezbytně nutné. To je případ, kdy měříme kvantový výtěžek, nebo při hledání vlnové délky s nejvyšší emisní intenzitou. Další aspekty ke zvážení jsou vnitřní filtrové efekty. Patří mezi ně opakovaná absorpce. Opakovaná absorpce proto, že jiná molekula nebo část makromolekuly absorbuje při vlnových délkách, při které fluorofor září. Pokud se jedná o tento případ, některé nebo všechny z fotonů emitovaných fluoroforem mohou být znovu absorbovány. K dalšímu vnitřnímu efektu filtru dochází v důsledku vysokých koncentrací absorbujících molekul, včetně fluoroforu. Výsledkem je, že intenzita excitačního světla není konstantní v celém roztoku. Celkově vzato jen malé procento světla dosáhne fluoroforů, které jsou viditelné na detekčního systému. Vnitřní filtrové efekty mění spektrum a intenzitu vyzařovaného světla, a proto je třeba vzít v úvahu při analýze emisní spektrum zářivky. (Beckman, 1997)

- **Aplikace**

Fluorescenční spektroskopie se používá mj. v biochemii, lékařství a v chemických oblastech výzkumu pro analýzu organických sloučenin, kde je využíván také v rozlišování zhoubných a nezhoubných kožních nádorů.

Techniky atomové fluorescenční spektroskopie (AFS) jsou užitečné v jiných druzích analýzy – měření sloučenin přítomných ve vzduchu nebo ve vodě nebo použití pro detekci těžkých kovů, například rtuti.

Navíc fluorescenční spektroskopie může být přizpůsobena mikroskopické úrovni za použití mikrofluorimetrů. (Beckman, 1977)

2.4.4. Další metody optické spektrometrie

Ramanova spektroskopie

zpracováno podle (Raman spectroscopy, 2016)

Ramanova spektroskopie je spektroskopická technika používaná ke studiu vibračních, rotačních módů systémů. Ramanova spektroskopie se běžně používá při detekci molekul pomocí charakteristických spekter v oblasti otisků prstů (fingerprint).

Základem je nepružný, Ramanův rozptyl, monochromatického záření, obvykle z laseru vyzařujícího ve viditelné, blízké infračervené nebo blízké ultrafialové oblasti. Laserové záření reaguje s molekulárními vibracemi nebo fonony, což má za následek, že energie laserových fotonů je posunuta nahoru nebo dolů. Posun v oblasti energetiky poskytuje informace o vibračních módech v systému. Infračervená spektroskopie poskytuje podobné, ale komplementární informace.

Vzorek je osvětlen laserovým paprskem. Elektromagnetické záření z osvětleného místa je shromažďováno za pomoci objektivu a odesláno prostřednictvím monochromátoru. Pružné rozptýlené záření o vlnové délce, odpovídající laserovému paprsku (Rayleighův rozptyl) se odfiltruje, zatímco zbytek shromažďeného světla je rozptýlen do detektoru úzkopásmového filtru.

Spontánní Ramanův rozptyl je obvykle velmi slabý a v důsledku toho je hlavní potíž Ramanovy spektroskopie oddělení slabého rozptýleného světla od intenzivního Rayleighova rozptýleného laserového světla.

Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IR spektroskopie nebo vibrační spektroskopie) je spektroskopie, která se zabývá infračervenou oblastí elektromagnetického spektra, což je světlo s delší vlnovou délkou a nižší frekvencí než viditelné světlo. Stejně jako u všech spektroskopických technik, tak IR spektroskopie může být použita k identifikaci a studiu chemických látek (plynných, kapalných i pevných). Základní IR spektrum je v podstatě závislost absorpance (propustnosti) infračerveného záření na frekvenci nebo vlnové délce záření. Typické jednotky frekvence používané v infračerveném spektru jsou reciproké centimetry, značené [cm^{-1}]. Jednotky vlnové délky jsou obvykle uvedeny v mikrometrech [μm]. Běžný laboratorní přístroj, který využívá tuto techniku je infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FTIR) (H. Bings, 2006)

Spektrometrie ve viditelné oblasti*zpracováno podle (P. Klouda, 2003)*

Viditelné spektrum je část elektromagnetického spektra, která je viditelná pro lidské oko. Elektromagnetické záření v tomto rozsahu vlnových délek se nazývá viditelné světlo nebo jednoduše světlo. Typické lidské oko reaguje na vlnové délky od 390 do 700 nm. Pokud jde o frekvenci, tak odpovídá pásu v blízkosti 430–770 THz.

Spektrum obsahuje všechny barvy, které lidské oko a mozek dokáže rozlišit. Barvy jako růžová, fialová nebo purpurová chybí proto, že tyto barvy lze vyjádřit pouze prostřednictvím kombinace násobků vlnové délky. Barvy, které obsahují pouze jednu vlnovou délku, jsou také nazývány čisté barvy nebo spektrální barvy.

Barva	Vlnová délka	Frekvence	Energie fotonů
fialová	380–450 nm	668–789 THz	2,75–3,26 eV
modrá	450–495 nm	606–668 THz	2,50–2,75 eV
zelená	495–570 nm	526–606 THz	2,17–2,50 eV
žlutá	570–590 nm	508–526 THz	2,10–2,17 eV
oranžová	590–620 nm	484–508 THz	2,00–2,10 eV
červená	620–750 nm	400–484 THz	1,65–2,00 eV

Tabulka 2: Barvy různých vlnových délek

Viditelné vlnové délky procházejí „optickým oknem“, oblastí elektromagnetického spektra, která umožňuje vlnovým délkám projít do značné míry přes zemskou atmosféru. Příkladem tohoto jevu je, že čistý vzduch rozptyluje modré světlo více než červené, a tak se denní obloha jeví modrá. Optické okno je také označována jako „viditelné okno“, protože překrývá spektrum viditelné lidským okem.

3. Praktická část

3.1. Jednoduché demonstrační spektroskopické experimenty

Výběr experimentů pro zařízení firmy Vernier je dostupný na: (*Experimenty s Vernierem: Chemie, 2016*), my jsme se snažili nalézt další experimenty, které nejsou v návodech uvedeny. Mezi zajímavé experimenty patří např. stanovení humusu podle Simse a Habyho (*Kolorimetrické stanovení obsahu humusu, 2016*), to je ale komplikované použitím koncentrované kyseliny sírové. Dichroman se v prostředí koncentrované H_2SO_4 redukuje na ionty Cr^{3+} , jejichž množství je úměrné množství oxidovaného uhlíku v humusu C. Ionty Cr^{3+} stanovíme měřením absorpance při 600 nm.

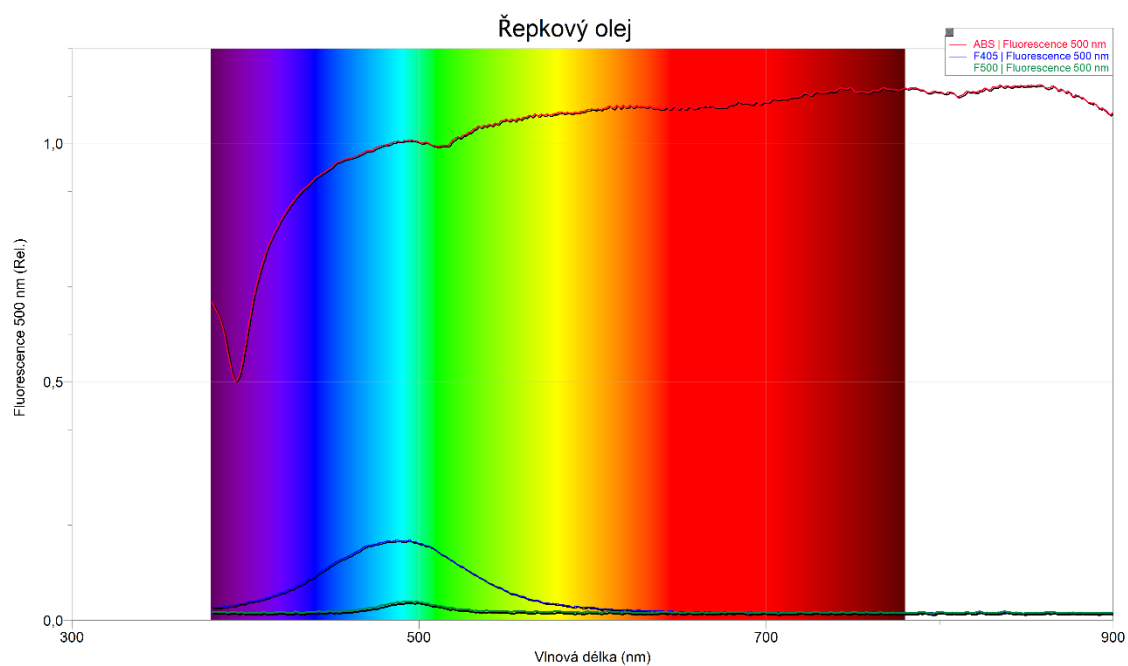
Další jednoduchý pokus představuje červená fluorescence roztoku chlorofylu po vystavení UV záření. Experiment je možné provést prosvícením nádoby (kyvety) s extraktem chlorofylu modrým laserovým ukazovátkem (vlnová délka světla 405 nm), jak je vidět na následujícím obrázku.



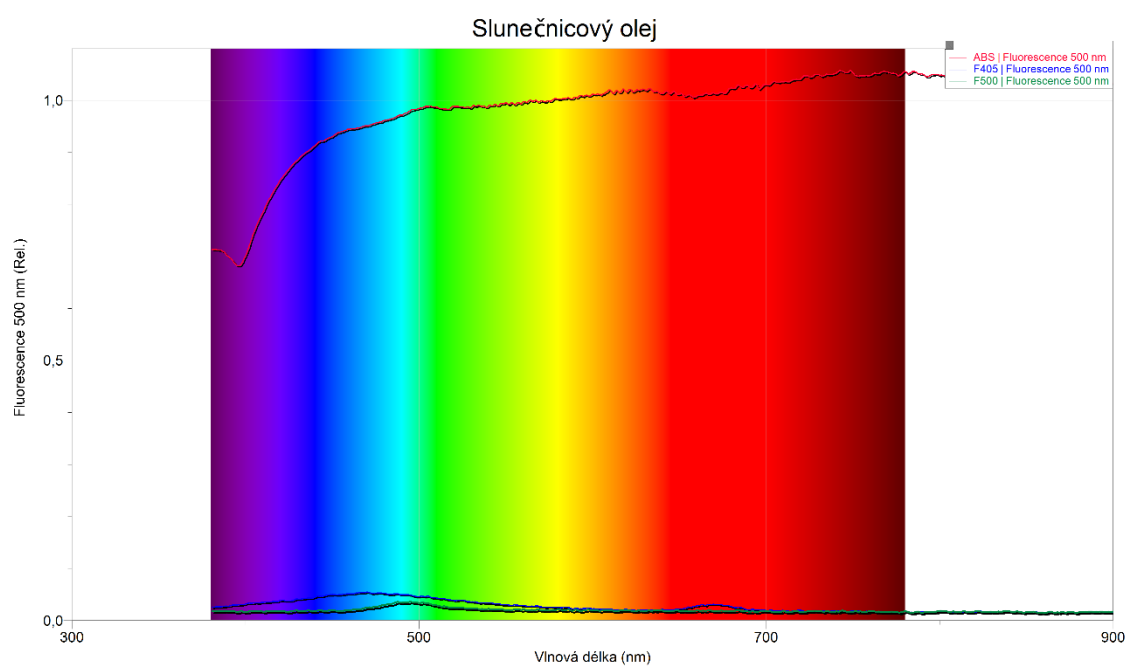
obrázek 4: Fluorescence olejů

(zleva – olivový olej, řepkový, slunečnicový, vazelínový, silikonový olej)

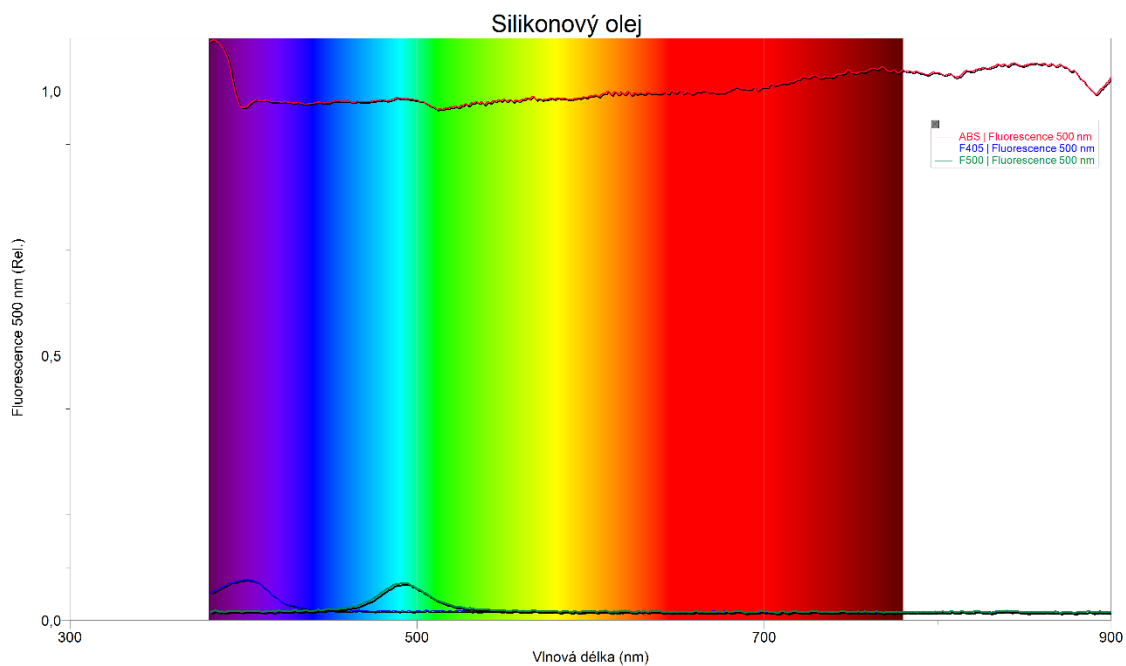
Problém může být s plastovými kyvetami, které použité organické rozpouštědlo rozpouští. Alternativně lze použít panenský olivový olej, který chlorofyl také obsahuje. Tak můžeme odlišit minerální a rostlinné oleje a dokonce stanovit kvalitu olivového oleje podle míry červené fluorescence (*Public Lab: Detection of Olive Oil Adulteration, 2016*). Rozdíl mezi fluorescencí minerálních a rostlinných olejů není příliš výrazný vzhledem k rozptylu laseru na postranních vroubkovaných stranách kyvet.



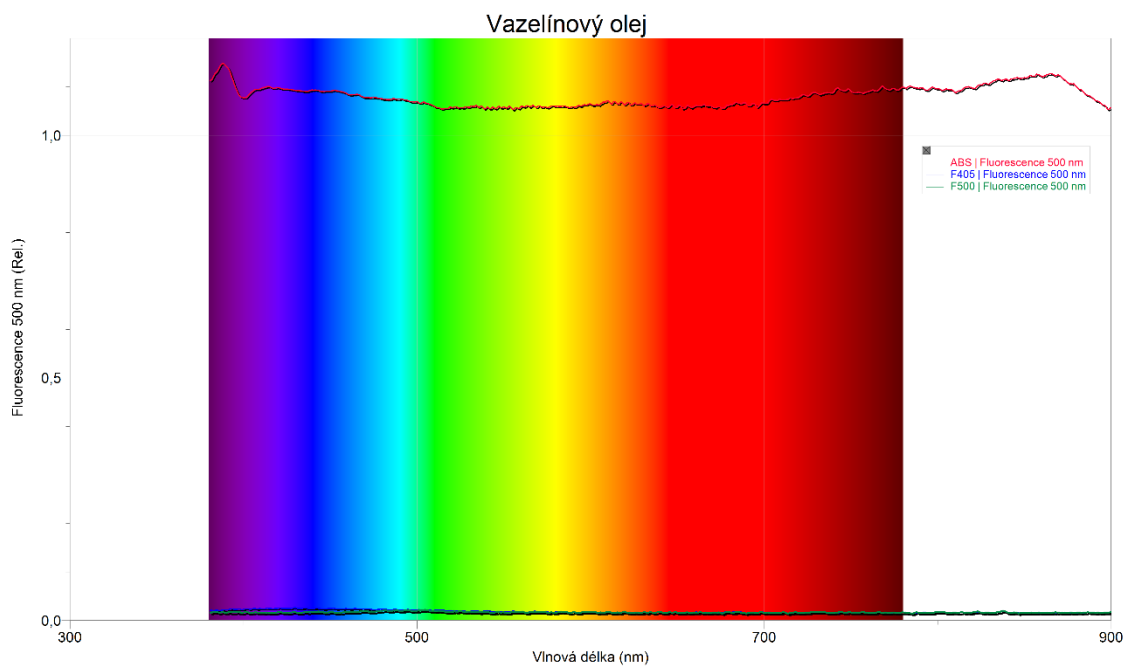
obrázek 5: Fluorescenční (F405 nm, F500 nm) a absorpční spektrum řepkového oleje



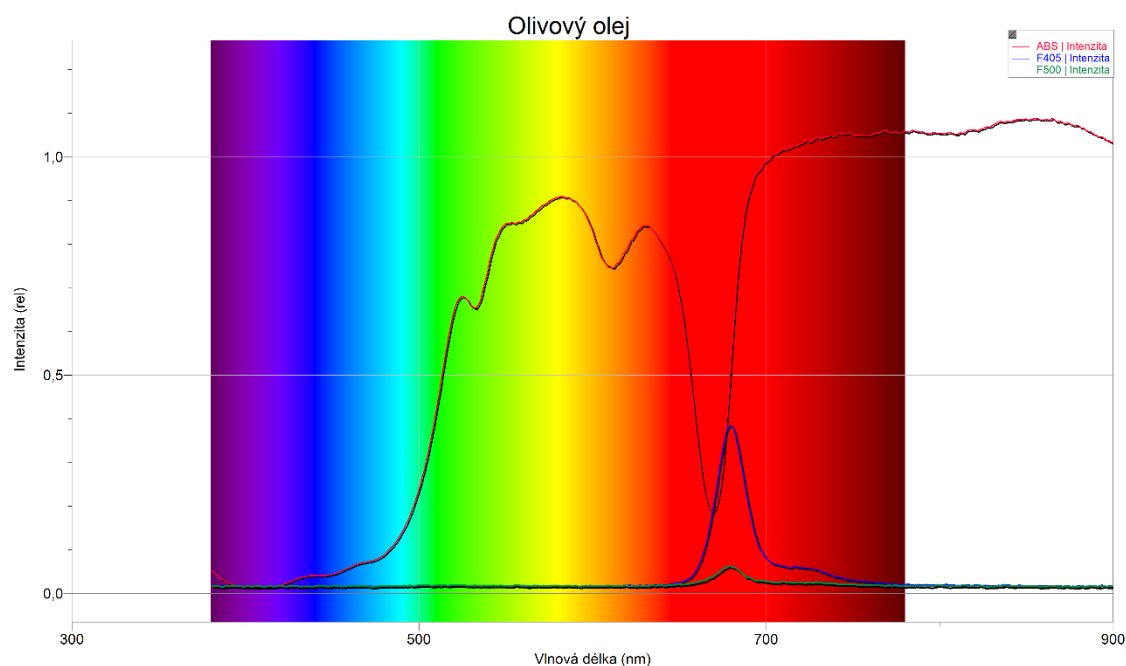
obrázek 6: Fluorescenční (F405 nm, F500 nm) a absorpční spektrum slunečnicového oleje



obrázek 7: Fluorescenční (F405 nm, F500 nm) a absorpční spektrum silikonového oleje



obrázek 8: Fluorescenční (F405 nm, F500 nm) a absorpční spektrum vazelinového oleje



obrázek 9: Fluorescenční (F405 nm, F500 nm) a absorpční spektrum olivového oleje

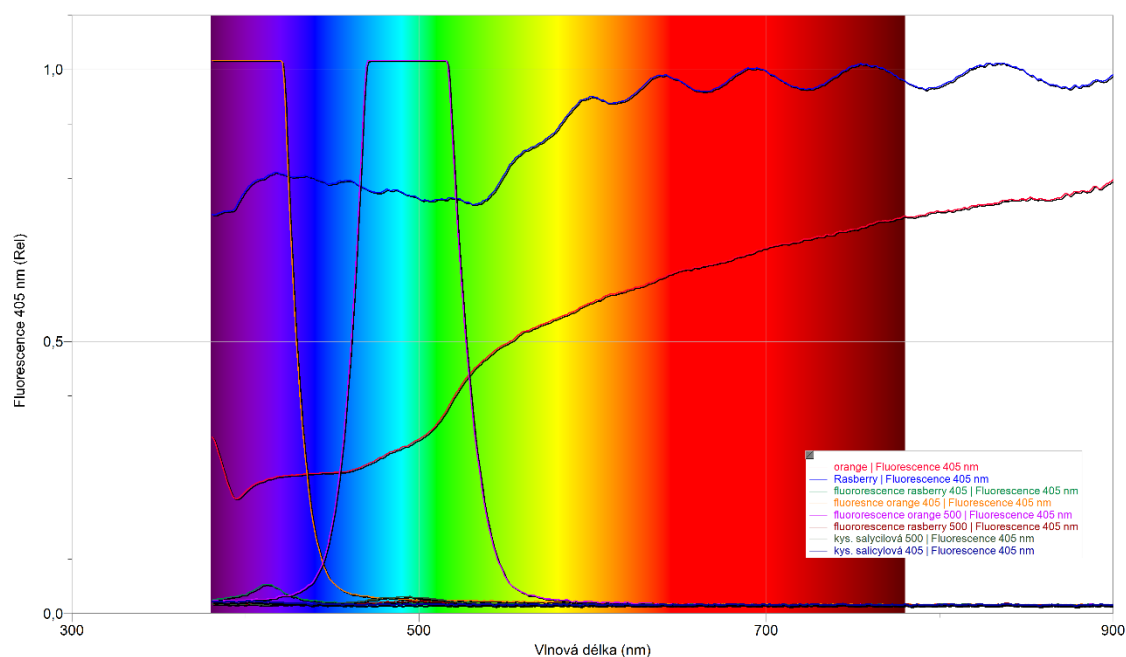
Použili jsme spektrometr *SpectroVis Plus* s excitací při 405 nm a 500 nm pro zkoumanou pětici olejů. Z obrázků spekter je patrné, že vazelinový olej nevykazuje téměř žádnou fluorescenci. Naopak nejvíce fluoreskují silikonový a olivový olej. Olivový olej, ale vykazuje ve fluorescenčním spektru výrazný pík v červené oblasti, který odpovídá pozorované červené barvě po ozáření modrým laserovým ukazovátkem. Zbývající dva oleje, tedy řepkový a slunečnicový, jsou na tom zhruba stejně, určitou fluorescenci vykazují, ale není tolik výrazná jako u dvou předchozích.

Žlutá barva rostlinných olejů je patrná na spektru jako absorpční pás ve fialové oblasti, která je komplementární ke žluté barvě, kterou slunečnicový a řepkový olej propouští.

Bezbarvé minerální oleje žádné absorpční pásy ve spektru neobsahují. Zelenožlutý olivový olej poznáme podle transmisního pásu ve žluté a zelené oblasti, čemuž odpovídá absorpční pás v komplementární červené barvě.

3.1.1. Fluorescence přísad v balených nápojích

Experiment je opět možné provést prosvícením nádoby (kyvety) s roztokem modrým laserovým ukazovátkem (vlnová délka světla 405 nm) nebo pomocí spektrometru Vernier. Použity byly balené vody Orange a Raspberry.



obrázek 10: Fluorescence nápojů

Při pohledu na spektra vidíme, že i balené nápoje mohou fluoreskovat, vzorek Orange vykazuje extrémní fluorescenci při obou vlnových délkách excitace (405 i 500 nm). Zkoumaný vzorek Raspberry nevykazuje téměř žádnou fluorescenci ani při jedné vlnové délce. Rozdíl je způsoben odlišným složením, nepřítomností umělého sladidla nebo konzervantu, který vyvolává fluorescenci.

3.2. Stanovení koncentrací roztoků Fe^{2+} spektrometricky

3.2.1. Princip a výpočty

Spektrofotometrické měření je založeno na platnosti Lambert-Beerova zákona. Zákon říká, že intenzita zbarvení roztoku (tzv. absorbance) je při konstantní tloušťce vrstvy měřeného roztoku (délka kyvety) a konstantní vlnové délce záření přímo úměrná molární koncentraci c . $A = \epsilon \cdot c \cdot d$; kde A je absorbance roztoku, ϵ je molární dekadický absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrace roztoku [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], d je délka kyvety [cm]. Absorbance vzorku $A = \log(I_0/I)$, kde I_0 je intenzita vstupujícího paprsku, I je intenzita vystupujícího paprsku.

Jedním z nejvyužívanějších kovů je Fe, je důležitým biogenním prvkem a velice často se tedy spektrofotometricky stanovuje v životním prostředí, jako složka doplňků výživy apod. (Beckman, 1997)

Příprava standardního roztoku

$$M(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) = 392,158 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{Fe}) = 55,842 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl Fe v } \text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 55,842/392,158 = 0,1424 \rightarrow 14,24 \%$$

$$14,24 \% \qquad 250 \text{ mg/l}$$

$$100 \% \qquad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 250 \cdot (100/14,24) = 1755,62 \text{ mg / l}$$

$$\text{na } 100 \text{ ml} - 1755,62 \text{ mg} / 10 = \mathbf{175,6 \text{ mg}}$$

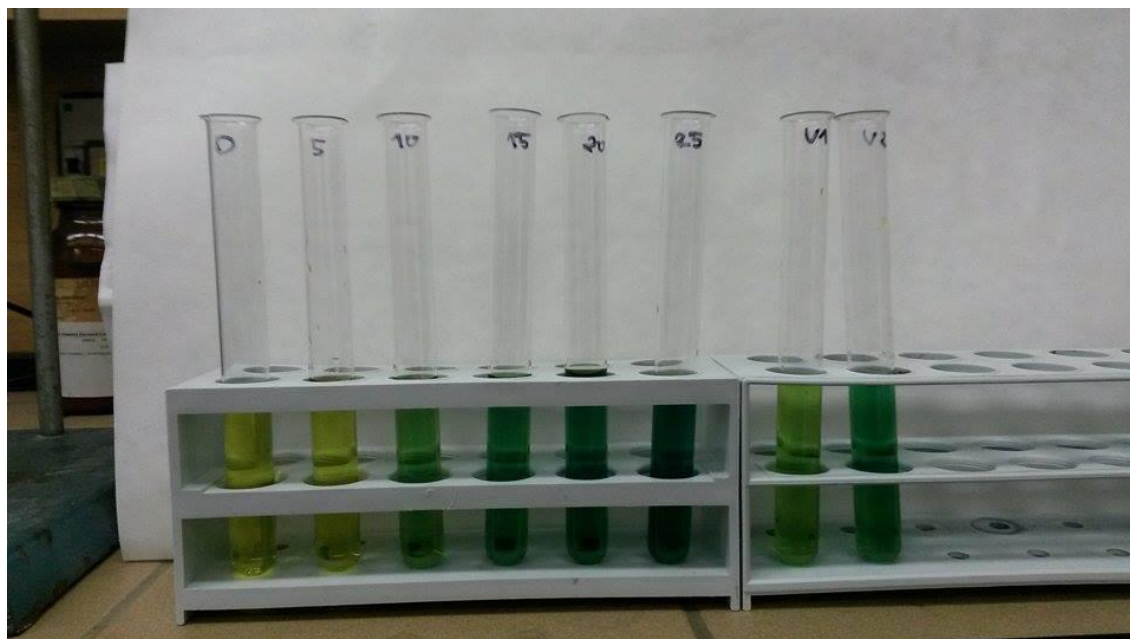
Pro přípravu 100 ml tohoto roztoku je třeba navážit 175,6 mg síranu železnato-amonného. Toto množství se tedy naváží přesně na analytických vahách, převede se do odměrné baňky obsahu 100 ml a doplní destilovanou vodou po značku. Roztok se použije pro přípravu kalibračních roztoků.

Příprava kalibračních roztoků

Do šesti zkumavek se odpipetuje 5 ml roztoku $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ o koncentraci 0,5 mol/l, určité množství standardního roztoku Fe^{2+} naředěného vodou tak, aby roztoky měly koncentraci 5, 10, 15, 20 a 25 ppm. Jeden roztok o nulové koncentraci se použije jako srovnávací. Zároveň se připraví i 2 roztoky o neznámé koncentraci, kterou později zjistíme. Skutečná koncentrace vzorků, kterou jsem neznal byla 7,5 ppm a 20 ppm.

3.2.2. Orientační stanovení vizuální kolorimetrií (od oka)

Porovnáním barvy zkoumaných vzorků a barev kalibračních roztoků, můžeme pouhým okem provést orientační určení koncentrace, což vidíme na následujícím obrázku. V dalších měřeních už budeme alespoň orientačně vědět, kde by se měly pohybovat výsledné hodnoty.



obrázek 11: Orientační zjištění koncentrace okem (vizuální kolorimetrií)

Z obrázku 4 vidíme, že vzorek V1 nám zcela jistě patří mezi roztoky o koncentracích 5 ppm a 10 ppm, vzorek V2 už poté není tak snadné zařadit, ale při pozornějším pohledu ho zařadíme mezi koncentrace 15 ppm a 20 ppm. V dalších měřeních tedy víme, že koncentrace V1 by se měla pohybovat v hodnotách 5–10 ppm a V2 v hodnotách 15–20 ppm. Pro porovnání výsledků byly koncentrace určená kolorimetrií vypočtena jako průměr z obou krajních hodnot, tedy $c(V1) = 7,5$ ppm, $c(V2) = 17,5$ ppm

3.2.3. Zjištění koncentrací kolorimetrem z kalibrační přímky

Kalibrační přímku zhotovíme z naměřených absorbancí roztoků o známých koncentracích, změříme také absorbanci vzorků V1 a V2. Měření provedeme pomocí kolorimetru Vernier a při měření postupujeme podle návodu výše.

Technické parametry (Kolorimetr Vernier, COL-BTA, 2016)

Kolorimetr Vernier, COL-BTA

rozsah (absorbance): 0,05 až 1

rozsah (transmittance): 10 % až 90 %

vlnové délky: 430 nm, 470 nm, 565 nm, 635 nm

rozlišení: 0,14 % (transmittance)

Pro sestavení kalibrační křivky potřebujeme několik roztoků o různých koncentracích, od nejvyšších až po ty nejjednodušší. K dispozici je šest kalibračních roztoků, každý změřený

alespoň dvakrát. Z kalibrační křivky určíme kritické úrovně, meze detekce, meze stanovitelnosti. Mez detekce a mez stanovitelnosti analytu jsou dvě ze základních charakteristik analytických metod.

Výpočty byly provedeny a grafy vytvořeny pomocí programu QC Expert 3.3. Všechny protokoly z programu QC Expert jsou přiloženy na CD-ROM.

Předpokládáme lineární kalibrační závislost: $Y = B_0 + B_1(X)$ kde Y je odezva fotometru (A) a X je koncentrace analytu (ppm). Lineární regrese je provedena metodou nejmenších čtverců.

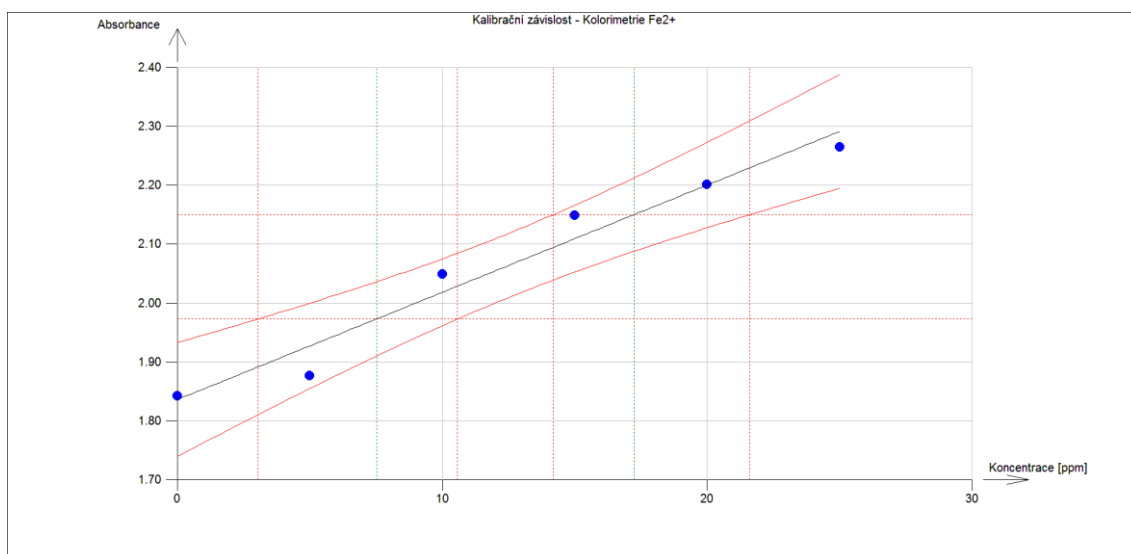
– **naměřené hodnoty**

koncentrace [ppm]	absorbance
0	1,842
5	1,877
10	2,049
15	2,149
20	2,201
25	2,265
Vzorek 1	1,973
Vzorek 2	2,15

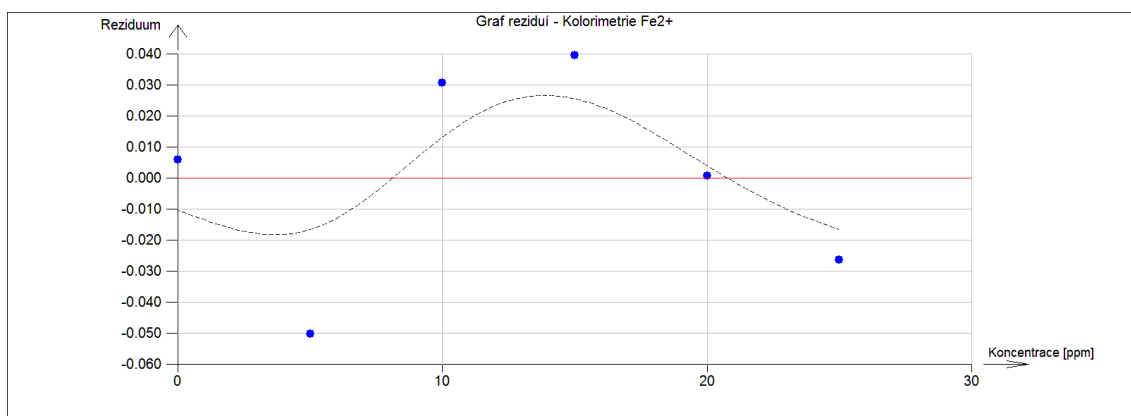
Tabulka 3: Kolorimetrické stanovení Fe^{2+} – naměřené absorbance

Naměřené hodnoty vyneseme do grafu a následně proložíme regresní přímkou, která vyjadřuje kalibrační přímkou. Pro kontrolu proložení je uveden také graf reziduí i diagnostické grafy.

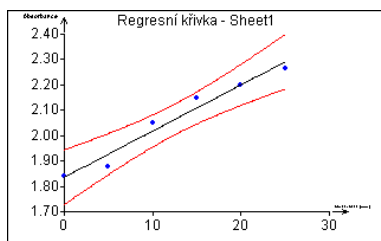
Všechny předpoklady metody nejmenších čtverců byly splněny. Podle Fisher-Snedecorova testu je model významný, podle Scottova kritéria multikolinearity je model korektní, Cook-Weisbergův test heteroskedasticity potvrdil homoskedascitu reziduí, Jarque-Berrův test potvrdil normalitu reziduí, podle Waldova i Durbin-Watsonova testu není autokorelace reziduí významná, znaménkový test prokázal, že v reziduích není trend. Odlehlé body nejsou přítomny.



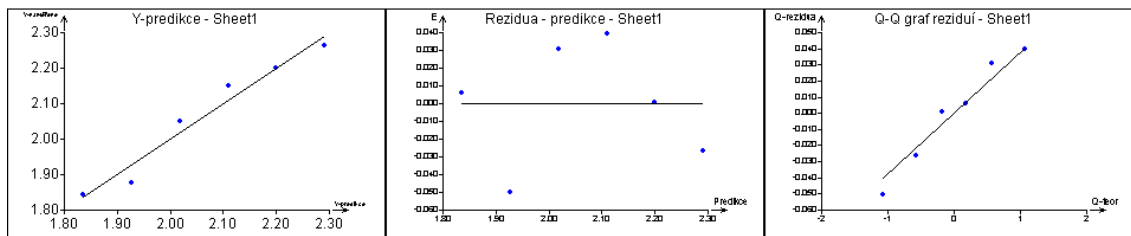
Zpětné odhady koncentrace vzorků jsou znázorněny tečkovanými čarami zelené barvy, odpovídající koncentrace jsou: 7,5 ppm a 17,2 ppm.



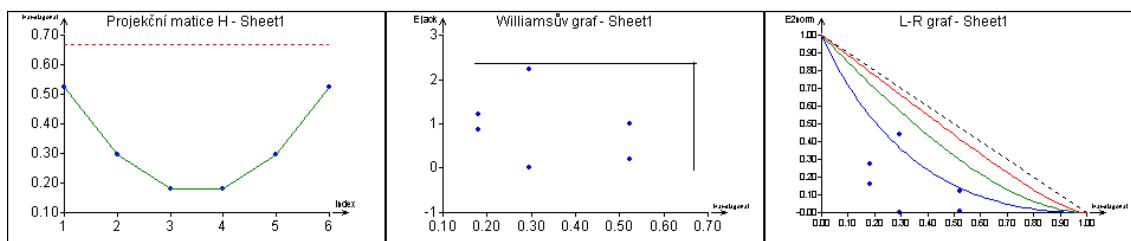
obrázek 12: Stanovení Fe²⁺ kolorimetricky, kalibrační křivka, graf reziduí



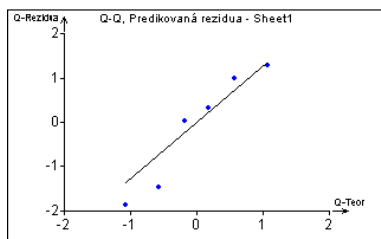
Rezidua



Vlivná data



Rankitové grafy



obrázek 13: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, diagnostické grafy

Odhady parametrů

Proměnná	Odhad	Směrodatná odchylna	Závěr	Pravděpodobnost	Spodní mez	Horní mez
Úsek na ose y	1,836	0,027	Významný	3,01E-07	1,760	1,913
Směrnice	0,018	0,002	Významný	0,000556	0,013	0,02

Statistické charakteristiky regrese						
Vícenásobný korelační koeficient R:				0,981		
Koeficient determinace R^2 :				0,962		
Predikovaný korelační koeficient R_p :				0,846		
Střední kvadratická chyba predikce MEP:				0,002		
Akaikeho informační kritérium:				-37,678		

Tabulka 4: Kolorimetrické stanovení Fe^{2+} – statistické charakteristiky regrese

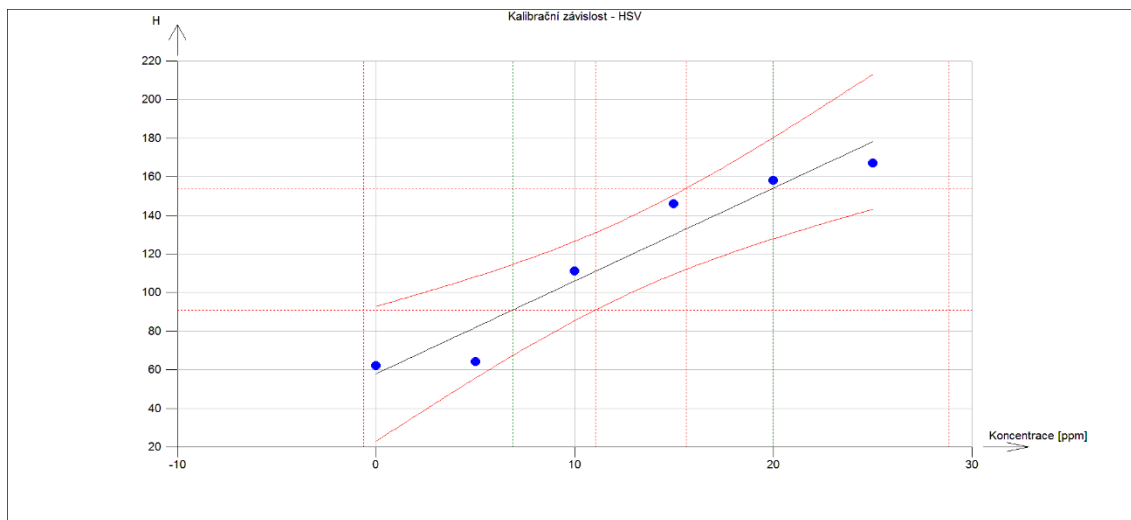
3.2.4. Zjištění koncentrací pomocí hodnot H, S, V a R, G, B

Ke zjištění hodnot H, S, V a R, G, B roztoku ve zkumavce využijeme mobilní aplikaci ColorGrab (ColorGrab, 2016), která je volně ke stažení téměř pro všechny mobilní telefony. Následujícím měřením také ověříme použitelnost této aplikace. Pomocí ColorGrab můžeme všechny hodnoty zjistit buď tak, že máme vzorek při ruce a pomocí fotoaparátu na mobilním telefonu zjistíme výsledné hodnoty anebo můžeme všechny tyto hodnoty zjistit zpětně z fotografií, které máme v telefonu uloženy třeba několik let.

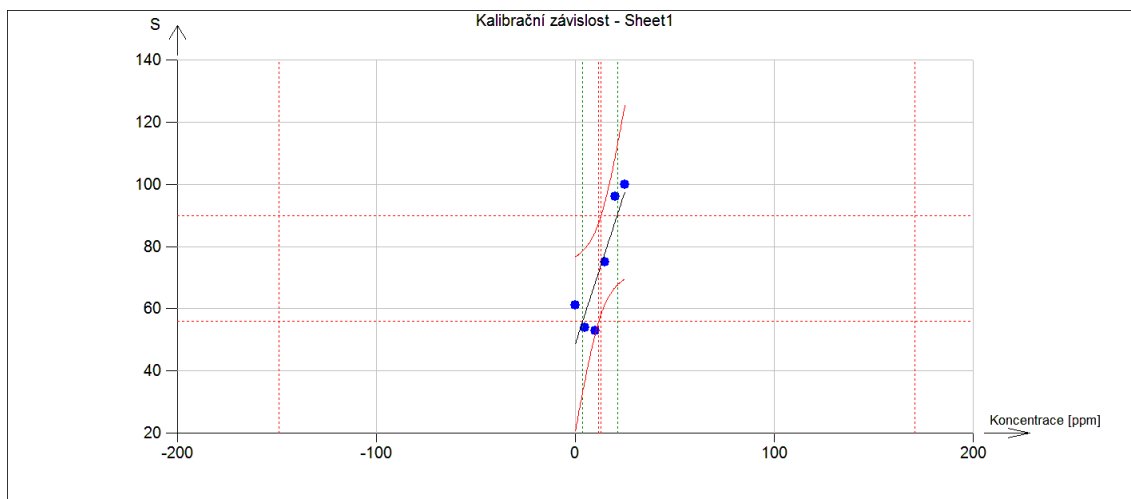
Naměřené hodnoty opět vyneseme do grafu a následně je proložíme regresní přímkou, z které poté zjistíme koncentrace. Lineární regresi provedeme zvlášť pro hodnoty H, S a V.

koncentrace [ppm]	H	S	V
0	62	61	75
5	64	54	70
10	111	53	51
15	146	75	47
20	158	96	37
25	167	100	24
Vzorek 1	91	56	60
Vzorek 2	154	90	41

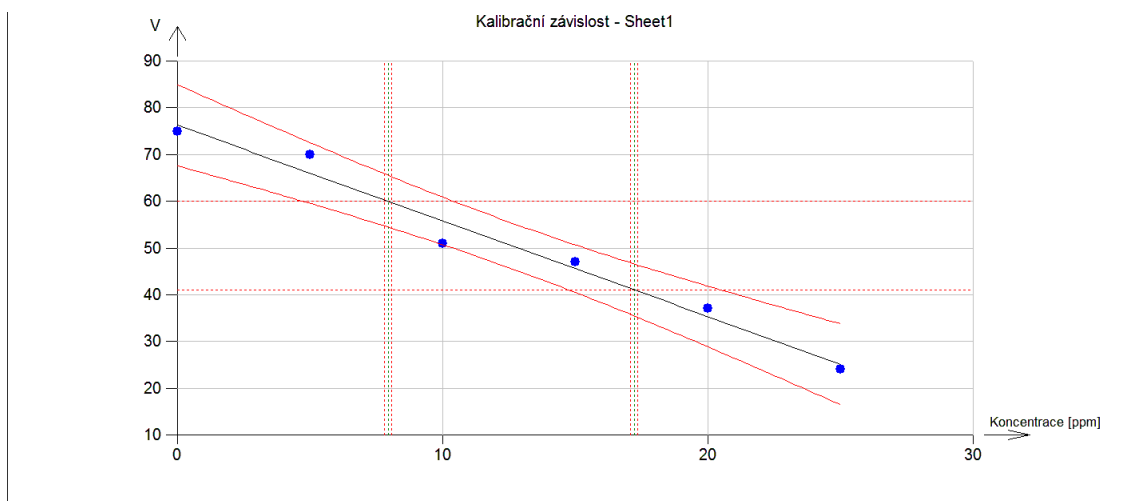
Tabulka 5: Naměřené hodnoty H, S, V



obrázek 14: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči H



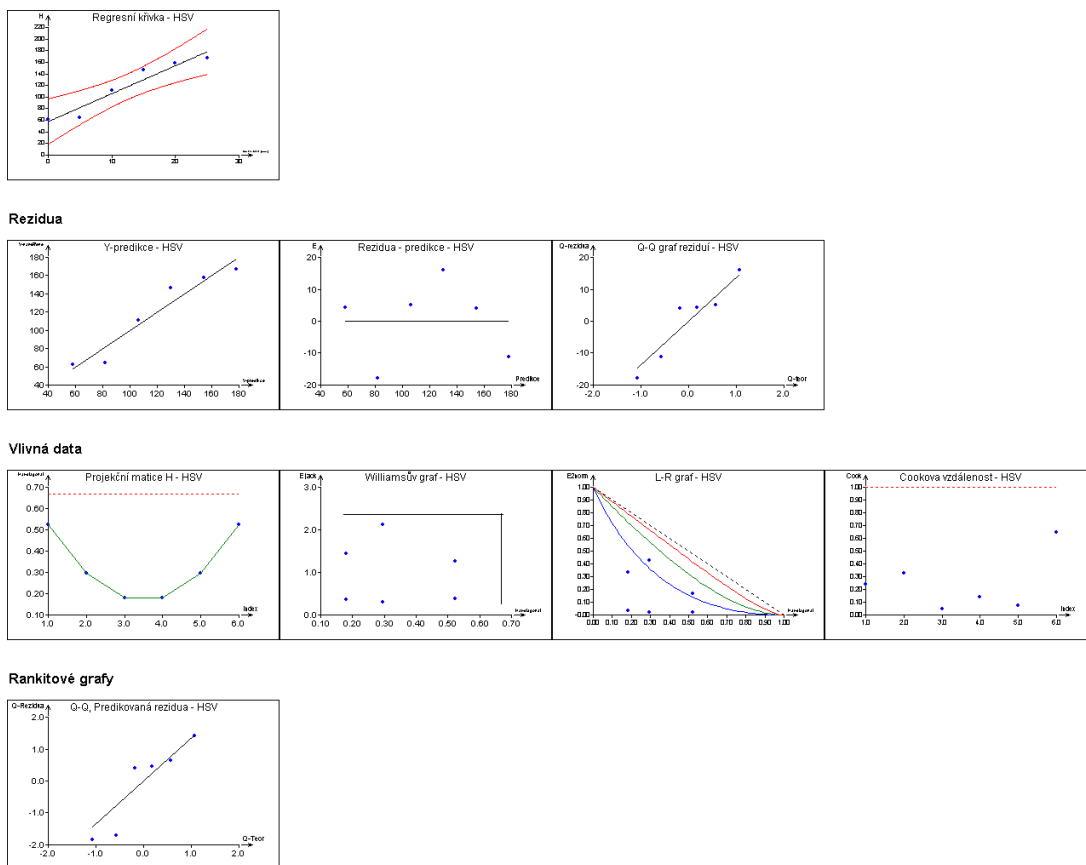
obrázek 15: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči S



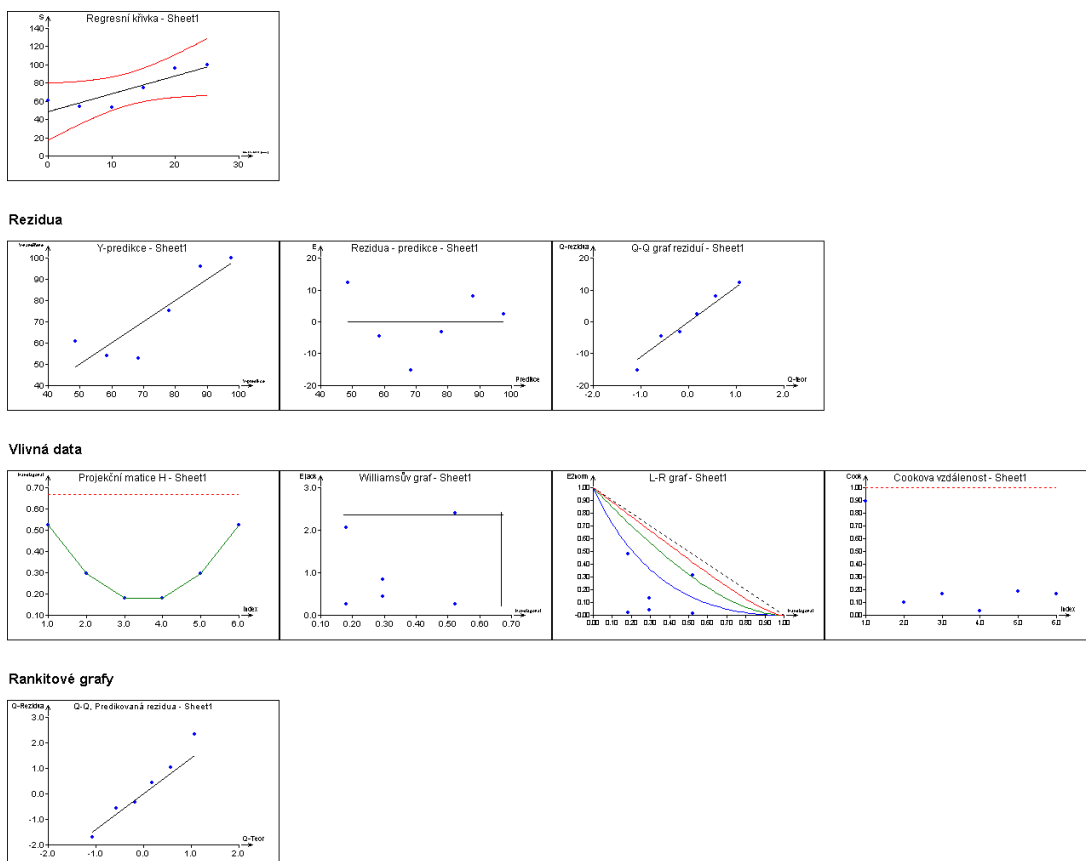
obrázek 16: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči V

Následují diagnostické grafy pro jednotlivé regrese, z kterých je patrné, že nejsou přítomny žádné odlehle body: všechny body v projekční matici jsou pod čárkovanou mezí, ve Williamsově grafu mezi oběma mezemi, v grafu Cookovy vzdálenosti pod čárkovanou mezí. (Meloun, 2004)

Pro přehlednost je porovnání všech regresí pro výpočet koncentrace neznámých vzorků uvedeno ve společné tabulce za grafy



obrázek 17: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, diagnostika regrese vůči H

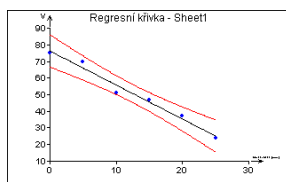


obrázek 18: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, diagnostika regrese vůči S

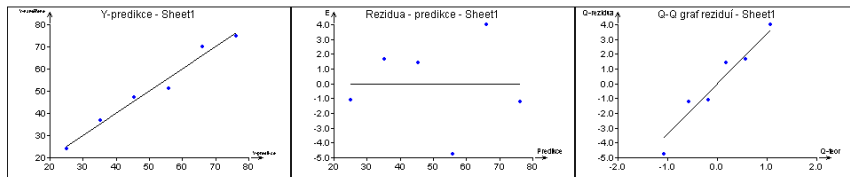
Pro úplné ověření zkusíme regresi pomocí hodnot R, G, B získaných opět stejným programem.

koncentrace [ppm]	R	G	B
0	186	190	75
5	172	178	81
10	71	131	61
15	30	121	70
20	4	94	61
25	0	62	49
Vzorek 1	108	153	67
Vzorek 2	10	104	63

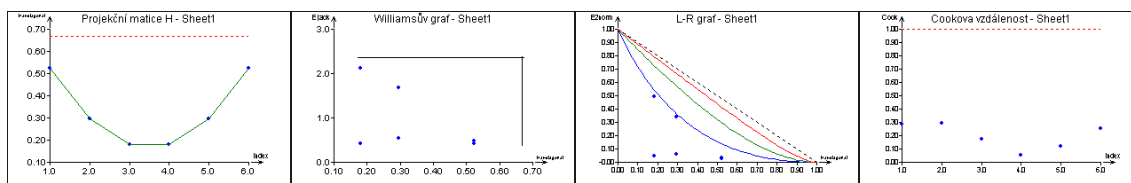
Tabulka 6: Změřené R, G, B hodnoty



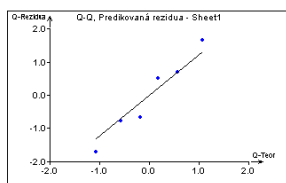
Rezidua



Vlivná data



Rankitové grafy



obrázek 19: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, diagnostika regrese vůči V

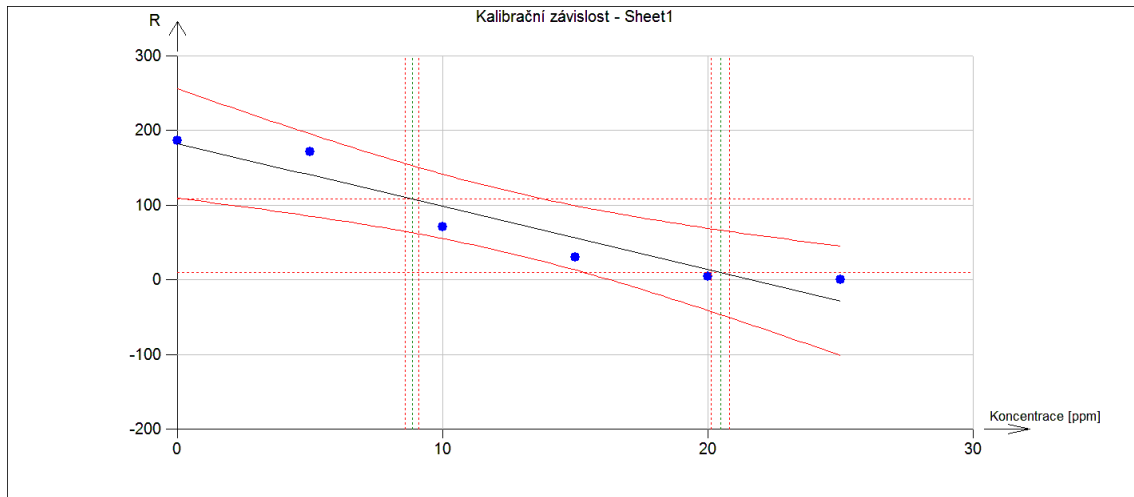
Z hodnot RGB je možné vypočítat intenzitu šedého obrazu, I_{BW} podle vzorce (Hess, 2007):

$$I_{BW} (\text{Red}) (\text{Green}) (\text{Blue}) = 0,2989 \text{ Red} + 0,5870 \text{ Green} + 0,1140 \text{ Blue.}$$

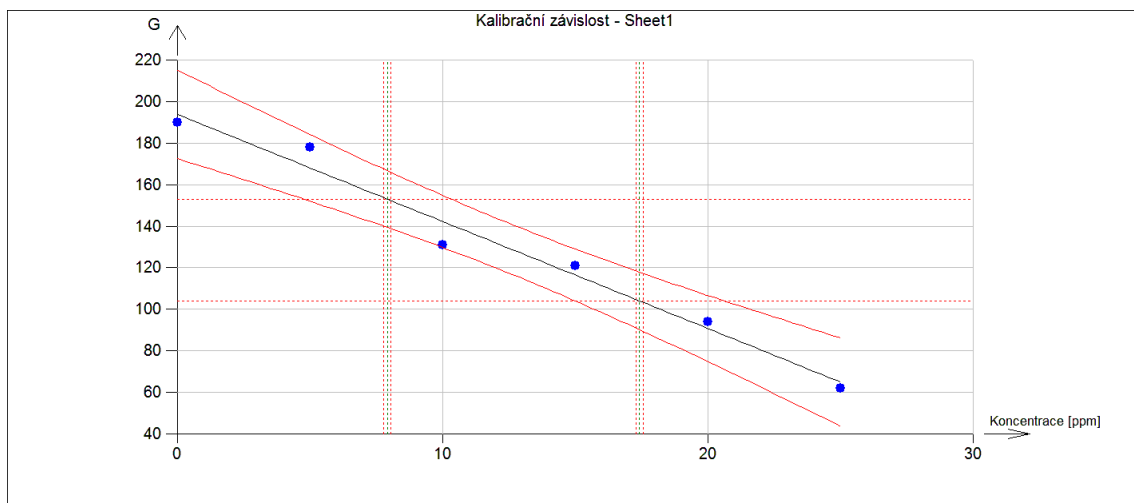
A dále optickou hustotu, D opět podle vzorce (Hess, 2007):

$$D = 1 - I_{BW}/255.$$

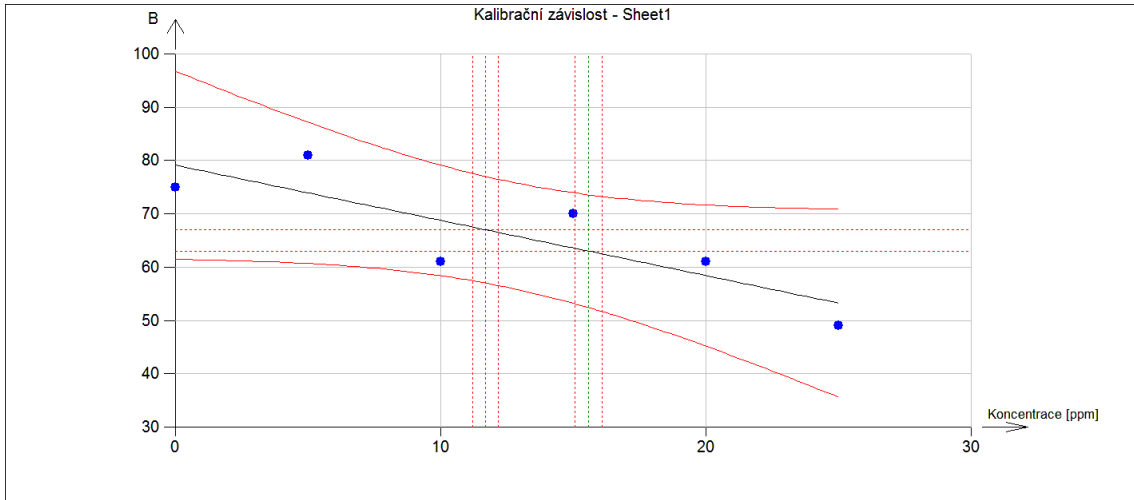
Nyní vyneseme naměřené hodnoty RGB i intenzity šedého obrazu a optické hustoty postupně do grafu vůči koncentraci a provedeme lineární regresi s následným výpočtem koncentrací.



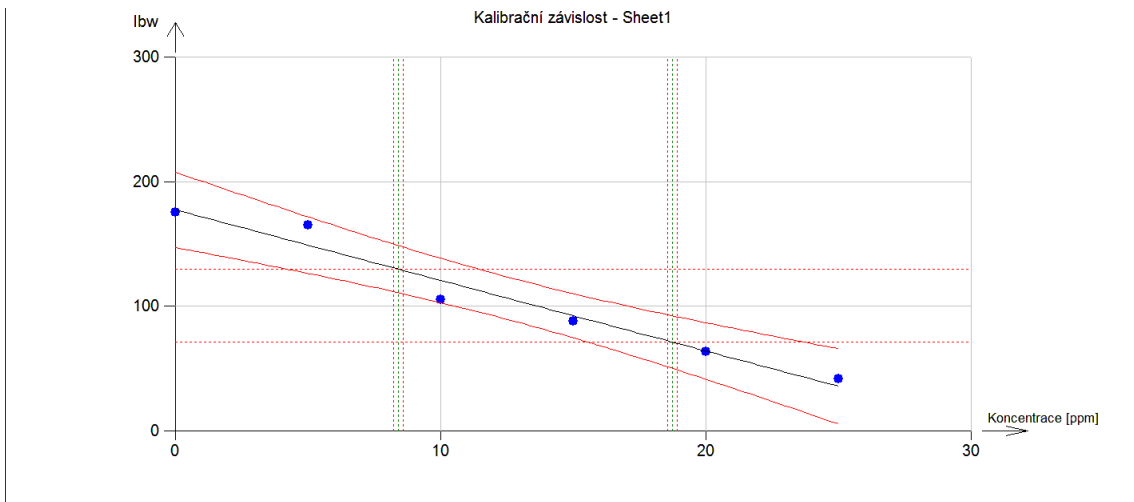
obrázek 20: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči R



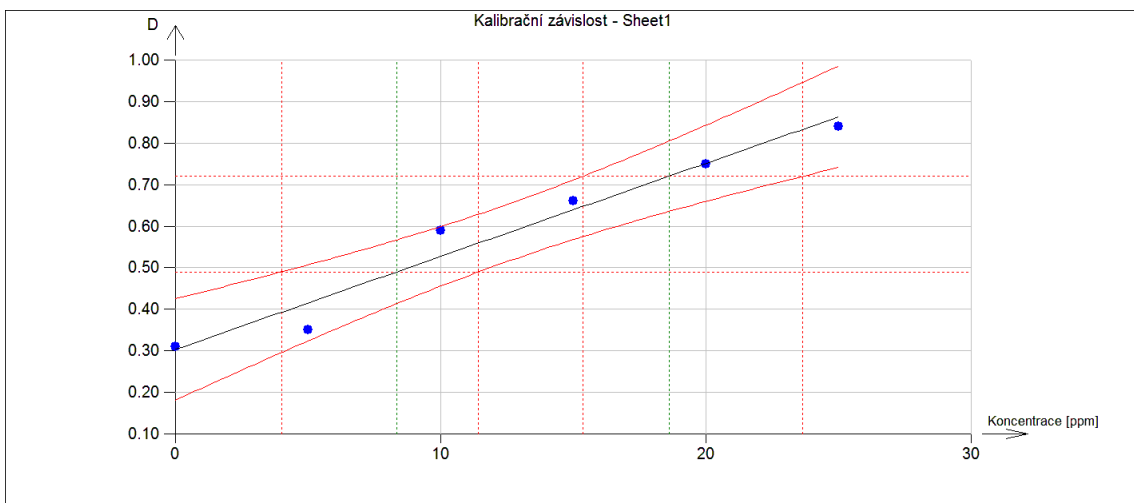
obrázek 21: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči G



obrázek 22: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči B



obrázek 23: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči intenzitě šedého obrazu



obrázek 24: Stanovení Fe^{2+} kolorimetricky, regrese vůči optické hustotě

Všechny předpoklady metody nejmenších čtverců byly u všech regresí splněny. Odlehlé body nejsou přítomny.

Výpočet koncentrace neznámých vzorků všemi uvedenými způsoby je sumarizován v následující tabulce.

Koncentrace [ppm]	Vzorek 1	IS 95 %	Chyba	Rozpětí IS	Vzorek 2	IS 95 %	Chyba	Rozpětí IS
skutečná	7,5	7,4–7,6	–	–	20,0	19,9–20,1	–	–
okem	7,5	2,5–12,5	0,0	10,0	17,5	12,5–22,5	-2,5	10,0
kolorimetr	7,5	3,1–10,6	0,0	7,5	17,2	14,2–21,6	-2,8	7,4
<i>H</i>	6,9	0,0–11,0	-0,6	11,0	20,0	15,6–28,8	0,0	13,2
<i>S</i>	3,7	0,0–11,8	-3,8	11,8	21,1	13,0–170,8	1,1	157,8
<i>V</i>	7,9	8,1–7,8	0,4	0,3	17,2	17,4–17,1	-2,8	0,3
<i>R</i>	8,8	9,1–8,6	1,3	0,5	20,5	20,8–20,1	0,5	0,7
<i>G</i>	7,9	8,0–7,8	0,4	0,3	17,4	17,5–17,3	-2,6	0,3
<i>B</i>	11,7	12,2–11,2	4,2	1,0	15,6	16,1–15,1	-4,4	1,0
<i>I_{BW}</i>	8,4	8,6–8,2	0,9	0,4	18,7	18,9–18,5	-1,3	0,4
<i>D</i>	8,3	4,0–11,4	0,8	7,4	18,6	15,4–23,7	-1,4	8,3

Tabulka 7: Porovnání kolorimetrických měření

IS 95 % – interval spolehlivosti; Chyba – rozdíl mezi predikovanou a skutečnou koncentrací vzorku; Rozpětí IS – rozdíl mezi maximální a minimální hodnotou intervalu spolehlivosti. *I_{BW}* – intenzita šedého obrazu, *D* – optická hustota.

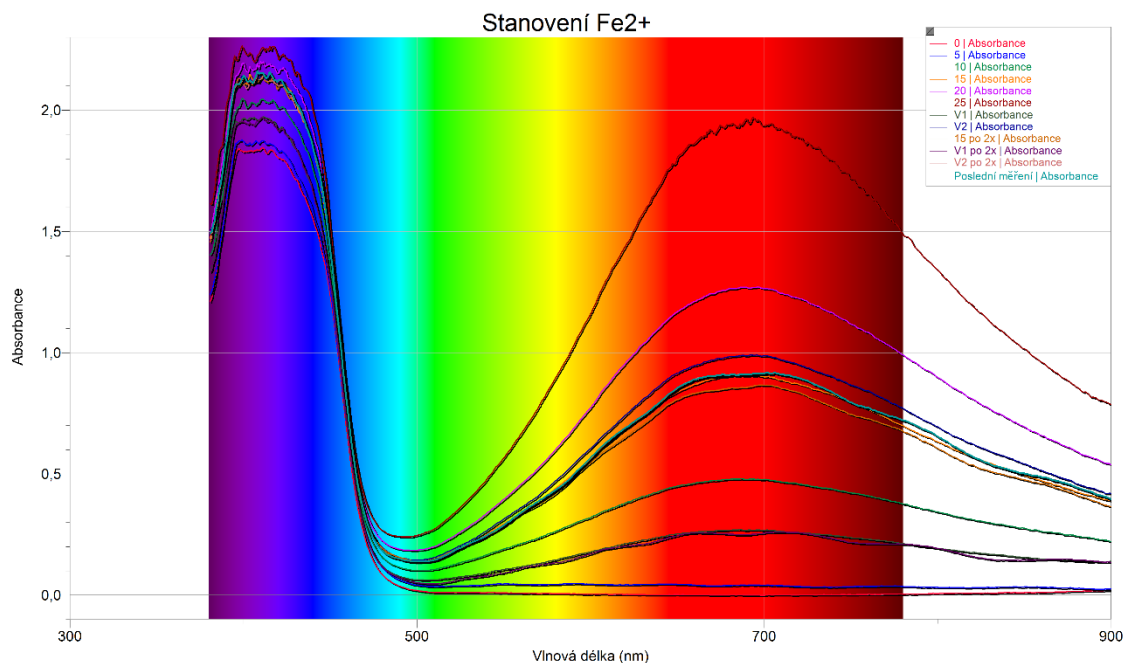
Interval spolehlivosti pro skutečnou koncentraci představuje expertní odhad.

Interval spolehlivosti pro koncentraci určenou okem je hodnota $\pm (5 \text{ ppm}/2) \cdot 1,96$

Okem i kolorimetrem se podařilo úspěšně stanovit koncentraci obou vzorků a to s minimálními rozdíly mezi sebou. Z tabulky vidíme, že koncentrace podle *H* je určena s minimální chybou a lze tedy doporučit určení koncentrace podle hodnoty *H*, také stanovení koncentrace ze závislosti optické hustoty na koncentraci není špatné, protože interval spolehlivosti zahrnuje skutečnou koncentraci. Toto zjištění odpovídá (Hess, 2007). Naopak koncentrace podle *S* nejsou nepoužitelné vzhledem k strmosti závislosti *S* vůči koncentraci, což také vede k extrémně velké hodnotě rozpětí intervalu spolehlivosti. Hodnoty koncentrace určené z *V*, *R*, *G*, *B*, *I* nezahrnují správnou hodnotu, což je zapříčiněné úzkým rozpětím.

Celkově vzato aplikace nepracuje, až tak špatně a některé výsledky se dají použít i ke zpřesnění vizuální kolorimetrie. Software ColorGrab je hezky zpracován s jednoduchým ovládáním a navíc je zcela zdarma. Myslím si, že pro běžné používání je zcela dostačující, při přesných měřeních však musíme počítat s nepřesnostmi.

Koncentraci iontů Fe^{2+} můžeme určit i z měření spekter spektrofotometrem, jak ukazuje následující obrázek. Dobře je patrný nárůst velikosti absorpčních pásů s koncentrací. Pokud používáme počítač je výhodná možnost zobrazení spektrálních barev na pozadí změřeného spektra v programu LoggerPro, bohužel tento program není volně dostupný. Pokud používáme pro měření rozhraní Vernier LabQuest, barvy se zobrazují přímo na displeji zařízení.



obrázek 25: Stanovení Fe^{2+} spektrofotometrem

3.3. Plamenový spektrofotometr

Nejdříve si řekneme pár slov o spektrometru, který je používán v průběhu celé praktické části. Jedná se o spektrofotometr SpectroVis Plus, což je přenosný spektrometr, pomocí kterého můžeme měřit absorbanci, transmitanci, fluorescenci a emisní spektrum, pro které je třeba přidat optické vlákno. Snadno a rychle ho můžeme propojit s počítačem pomocí USB, poté už stačí jen nainstalovat program LoggerPro a měření může začít.

Technické parametry (SpectroVis Plus, 2016)

Rozsah: 380 nm – 950 nm

Rozlišení: 1 nm

Přesnost: ± 3 nm při 650 nm, ± 7 nm při 450 nm

Rychlost proměření celého spektra: cca 2 s

Vlnové délky excitačních zdrojů pro fluorimetrii: 405 nm a 500 nm

Rozměry: 15 cm \times 9 cm \times 4 cm

3.3.1. Příprava plamenového spektrofotometru k měření

- zapnutí přístroje a počítače – otevření příslušného programu
- počkat na dostatečné nažhavení výbojky, kalibrace přístroje
- nastavení závislosti měřených veličin (měřené veličiny na osách, tj. spektrum, intenzita při vlnové délce nebo časová závislost intenzity při vlnové délce)
- nastavení parametrů měření (integrační čas, průměrování a vyhlazení spekter)
- nastavení snímače do správné oblasti měření
- zkušební měření (ověření, zdali nejsou měřené údaje nesmyslné)

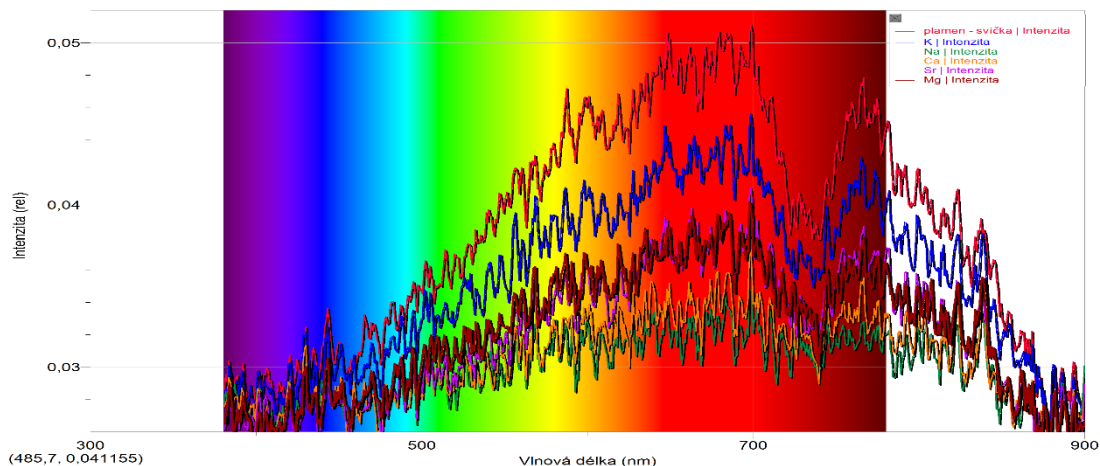
3.3.2. Výběr zdroje plamene

Plamenová spektroskopie vyžaduje, co nejlepší zdroj světla v našem případě plamene, tedy plamene s nejvyšší teplotou, pro dosažení, co nejvyšších výsledků. Z volně dostupných zdrojů jsem se rozhodl vybrat 3 nejpoužívanější a podle mě i běžně dostupné téměř ve všech laboratořích tedy – plynový hořák, lihový kahan a svíčku. Na první pohled je patrné, že nejlepším zdrojem bude zřejmě plynový hořák, ale je tomu opravdu tak? Tuto otázku jsem objasnil měřením, kde jsem měřil intenzitu plamene jednotlivých prvků u těchto 3 zdrojů.

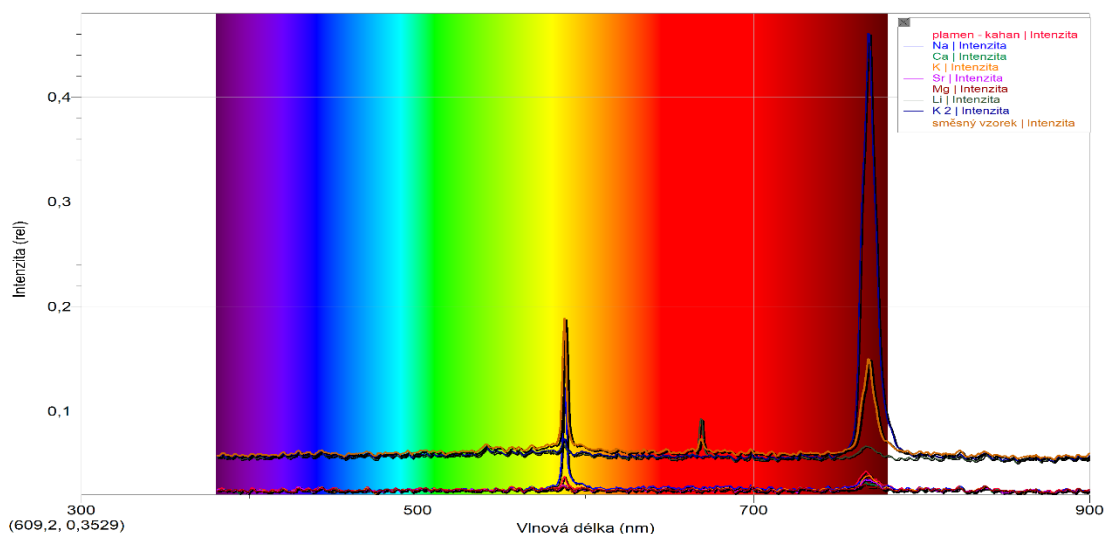
Výsledky měření:

- svíčka (měřeno při integračním čase 500 ms)

Na spektru výše můžeme vidět, že intenzita světla ze svíčky je opravdu velmi malá, kdy nejvyšší pík nedosahuje ani hodnoty 0,1.



obrázek 26: Svíčka – intenzita záření při integračním čase 500 ms



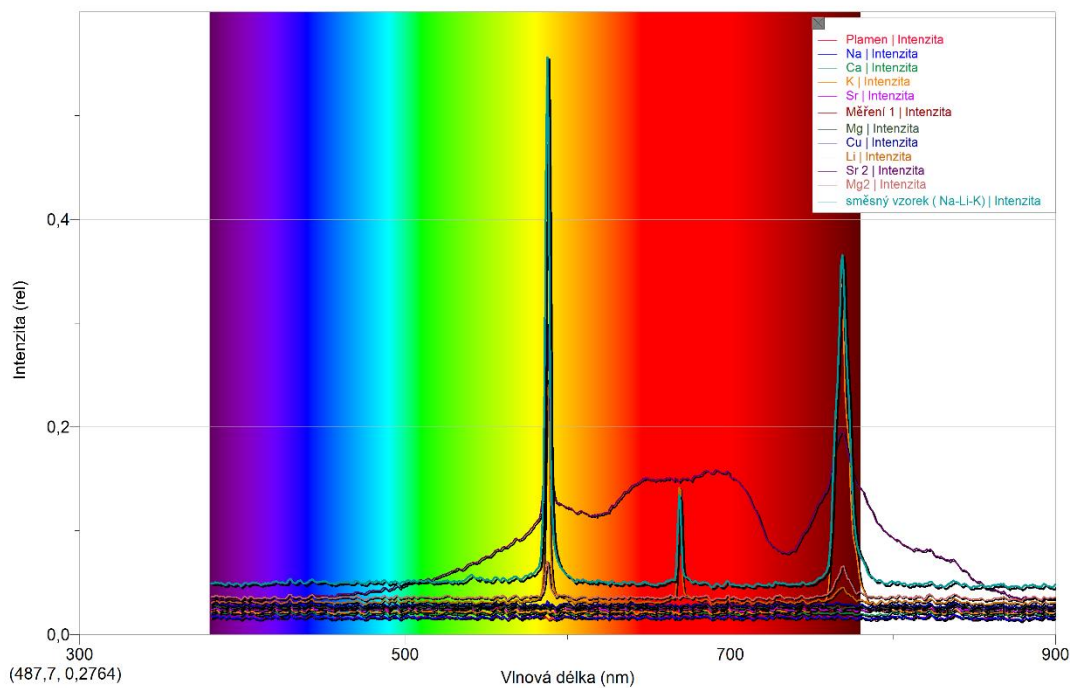
obrázek 27: Lihový kahan – intenzita záření při integračním čase 500 ms

Zde už můžeme pozorovat lepší výsledky – vyšší intenzity, kdy nejvyšší intenzita dosahuje cca 0,45. Výsledky z lihového kahanu už začínají být uspokojující a nějaká přibližná měření by určitě šla pomocí tohoto zdroje uskutečnit.

- plynový hořák, Meckerův kahan (měřeno při integračním čase 500 ms)

Je patrné, že u plynového hořáku dosahují 2 píky výrazných intenzit a intenzita 3. píku je také nejvyšší ze všech tří měření. Při vzájemném porovnání dosažených výsledků vidíme,

že nejideálnější zdroj světla (plamen) je plynový hořák, který předčil jak lihový kahan, tak i svíčku, která je pro měření úplně nevhodná. Předpoklad se tedy vyplnil a plynový hořák dosahující nejvyšších teplot plamene je pro měření nejlepší.



obrázek 28: Plynový hořák – intenzita záření při integračním čase 500 ms

3.3.3. Optimalizace uspořádání spektrometru

V plamenové fotometrii je velmi důležitá vzdálenost rozprašovače od plamene, vzdálenost snímače od plamene a samozřejmě také výška, ve které je roztok vstřikován do plamene.

Pokud se budeme nejdříve zabývat druhou vzdáleností, tedy vzdáleností snímače od plamene, tak asi každého napadne, že čím blíže je snímač plamenu, tím lépe a dostane se do něho tak více světla. Ale nemůžeme umístit toto zařízení zase hodně blízko plamenu, neboť může hrozit poškození tohoto snímače buď přímo plamenem, nebo vysokou teplotou z něj vycházející. Pokud bychom přeci jen chtěli, co nejlepší výsledky a tedy chtěli mít senzor v těsné blízkosti od plamene, musíme senzor nějakým způsobem ochránit. Při mých měřeních byl snímač chráněn tabulkou tvrzeného skla, které bylo chlazeno vzduchem z ventilátoru přiváděným trubicí na konkrétní místo.

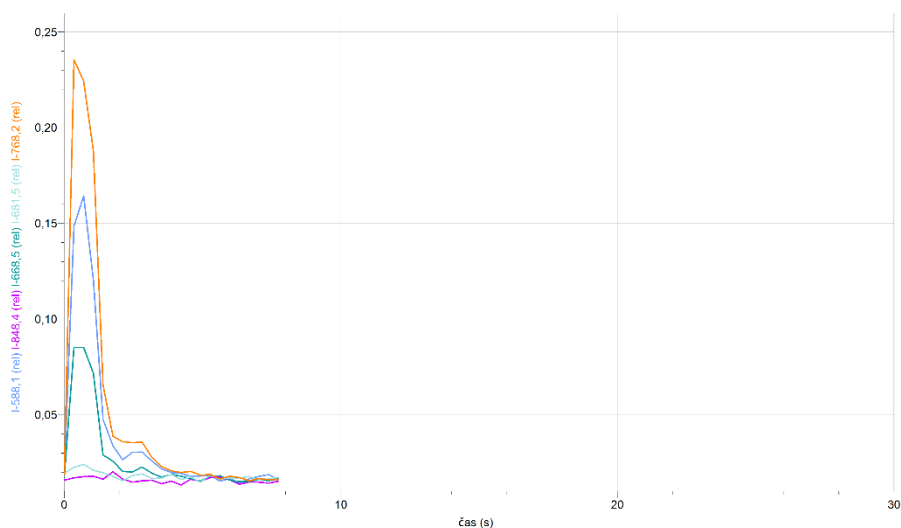
Výška, kde je roztok vstřikován do plamene, je rovněž velmi důležitá pro dosažení, co nejlepších výsledků. Člověka by napadlo, že nejideálnější místo bude asi tam, kde je nejvyšší teplota plamene a ano, je tomu opravdu tak. Nejlepší místo, kam vpravit rozstříknutý roztok

je vrcholový kužel plamene, kde je u plynové hořáku dosahováno nejvyšších teplot cca 1550 °C. Jelikož vháníme roztok právě do tohoto místa plamene a tedy zde i shoří, pak je logické, že snímač musíme umístit do podobné výšky.

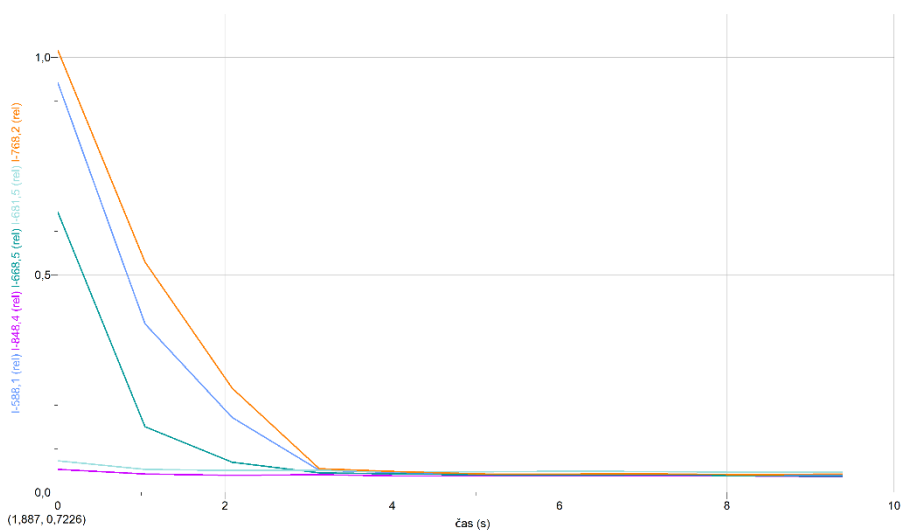
Stanovení správné vzdálenosti odkud je roztok vstříkován pomocí rozprašovače do plamene, je pro výsledek měření také velmi důležitá. Buď se „mlha“ do plamene dostane pouze v omezeném množství a poté je zaznamenána pouze malá intenzita zjišťovaného vzorku nebo se rozprašený roztok do plamene nedostane vůbec. Při opačném problému, kdy vstříkujeme roztok do plamene z moc malé vzdálenosti, může „mlha“ projít plamenem takřka nespálená a výsledky opět nejsou ideální nebo může dojít k deformaci plamene vzduchem vyfouknutým z rozprašovače společně s roztokem a poté budou výsledky opět zkreslené, protože máme snímač nastaven na konkrétní místo, kde se běžně nachází plamen. Pro tuto optimalizaci jsem provedl měření, ze kterého mi optimální vzdálenost vyšla cca 32 cm a roztok byl vstříkován tak, aby se „mlha“ volně snášela do plamene, což znamená z výšky cca 5 cm nad plamenem.

3.3.4. Optimalizace parametrů měření

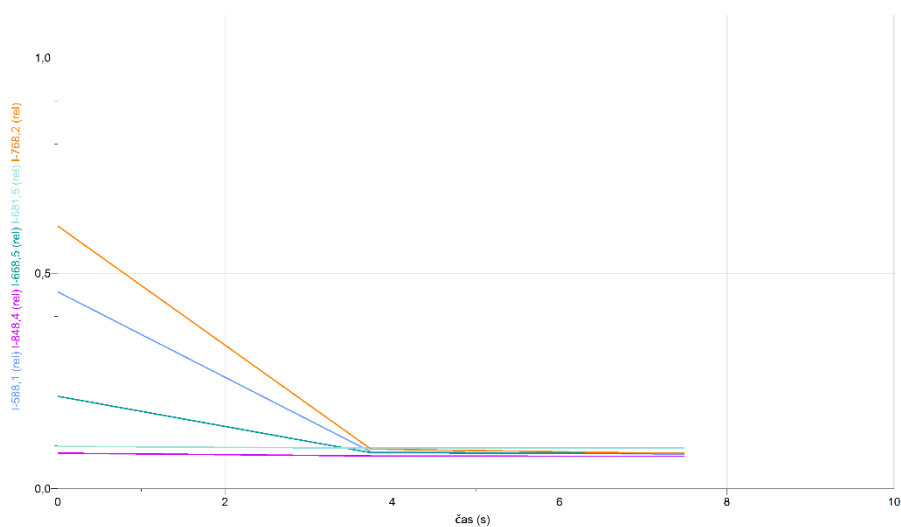
Jedná se především o integrační čas, průměrování a vyhlazení spekter. V základním nastavení je integrační čas 100 ms a lze čekat, že jeho prodloužením dojde k růstu intenzity signálu. Pro testování byla použita časová závislost signálu při vlnových délkách pro roztok o koncentraci 1 g/l kovů; integrační čas: 100 ms, 500 ms, 1 000 ms; průměrování: žádné, 2, 4 spektra; vyhlazení nebylo použito. Podíváme-li se na grafy, dojdeme ke zjištění, že delší čas vede zcela zřejmě k vyšší intenzitě, nejvyšší intenzity proto vidíme u grafu 500 ms a 1000 ms, které jsou téměř totožné, protože 500 ms je už dostatečný čas k průběhu, a proto se už dále nezvyšuje. Průměrování evidentně snižuje intenzitu, protože při něm vypočítáváme průměr i v případě, kdy může být vzorek už spálen a signál je nulový. Vidíme tedy, že při průměrování 2× se intenzita snížila méně než u průměrování 4×, kdy jsou následné intenzity velmi rozdílné.



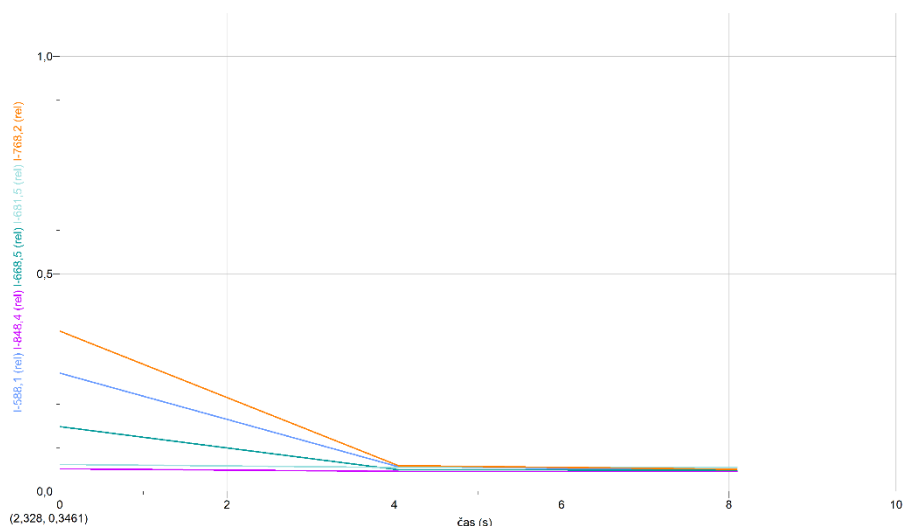
obrázek 29: časová závislost intenzity – integrační čas 100 ms, neprůměrováno



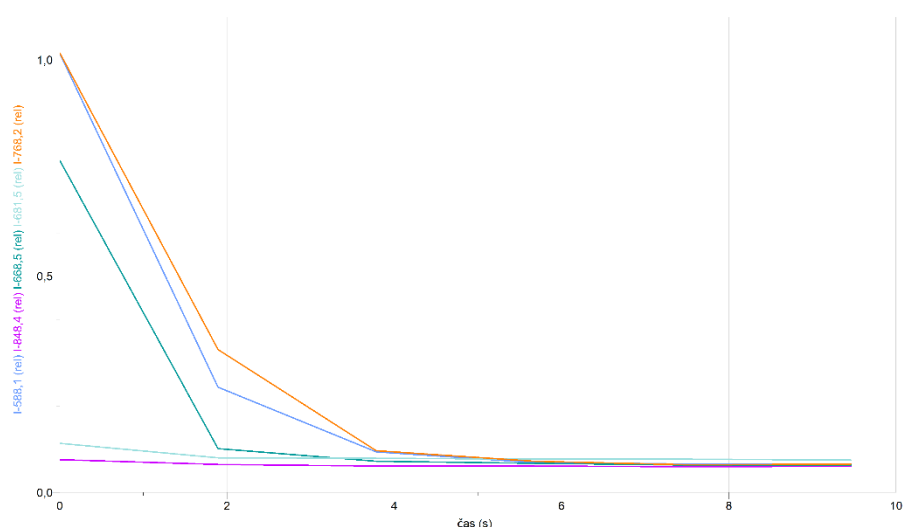
obrázek 30: časová závislost intenzity – integrační čas 500 ms, neprůměrováno



obrázek 31: časová závislost intenzity – integrační čas 500 ms, průměr ze 2



obrázek 32: časová závislost intenzity – integrační čas 500 ms, průměr ze 4



obrázek 33: časová závislost intenzity – integrační čas 1 000 ms, neprůměrováno

3.3.5. Stanovení analytických parametrů metody

Pro sestavení kalibrační křivky potřebujeme několik roztoků o různých koncentracích, od nejvyšších až po ty nejjednodušší. K dispozici je šest kalibračních roztoků, každý změřený alespoň dvakrát. Z kalibrační křivky určíme kritické úrovně, meze detekce, meze stanovitelnosti. Mez detekce a mez stanovitelnosti analytu jsou dvě ze základních charakteristik analytických metod.

Předpokládáme lineární kalibrační závislost: $Y = B_0 + B_1(X)$ kde Y je odezva fotometru (A) a X je koncentrace analytu (ppm). Lineární regrese je provedena metodou nejmenších čtverců. Kritická úroveň Y_c je horní mez 95% intervalu spolehlivosti predikce absorbance. Teprve nad hodnotou Y_c lze odlišit signál od šumu. Mez detekce Y_d odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez 95% intervalu spolehlivosti rovna Y_c , tedy kritické

úrovni. Mez detekce udává skutečnou úroveň absorbance, která umožňuje ještě detekci koncentrace. X_d udává hodnotu koncentrace, kterou lze ještě s pravděpodobností 95 % odlišit od nuly. Mez detekce pro danou kalibraci dané metody tedy charakterizuje nejnižší koncentraci, která je vůbec ještě metodou zachytitelná. Mez stanovení Y_s je nejmenší hodnotou signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a rovna zvolenému číslu. Mez stanovení charakterizuje spodní mez použitelnosti kalibrace pro danou relativní směrodatnou odchylku. Vždy platí, že kritická úroveň \leq mez detekce \leq mez stanovení. (Meloun, 2004)

Příprava standardů

1) Na z NaCl

$$Mr(\text{NaCl}) = 58,44 \text{ g/mol}$$

$$Mr(\text{Na}) = 22,98 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl Na v NaCl} \rightarrow 22,98/58,44 = 0,39322 \rightarrow 39,322 \%$$

$$39,322 \% \qquad \qquad \qquad 5 \text{ g}$$

$$100 \% \qquad \qquad \qquad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 5 \cdot (100/39,322) = 12,7115 \text{ g/l}$$

$$\text{na } 100 \text{ ml} - 12,7115 \text{ g} / 10 = \mathbf{1,2712 \text{ g}}$$

2) Cu z $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$$Mr(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 249,68 \text{ g/mol}$$

$$Mr(\text{Cu}) = 63,546 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl Cu v } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 63,546/249,68 = 0,2545 \rightarrow 25,45 \%$$

$$25,45 \% \qquad \qquad \qquad 5 \text{ g}$$

$$100 \% \qquad \qquad \qquad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 5 \cdot (100/25,45) = 19,646 \text{ g/l}$$

$$\text{na } 100 \text{ ml} - 19,646 \text{ g} / 10 = \mathbf{1,9646 \text{ g}}$$

3) K z KCl

$$Mr(\text{KCl}) = 74,56 \text{ g/mol}$$

$$Mr(\text{K}) = 39,0983 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl K v KCl} \rightarrow 39,0983/74,65 = 0,5244 \rightarrow 52,44 \%$$

$$52,44 \% \quad \quad \quad 5 \text{ g}$$

$$100 \% \quad \quad \quad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 5 \cdot (100/52,44) = 9,5329 \text{ g/l}$$

$$\text{na 100 ml} - 9,5329 \text{ g} / 10 = \mathbf{0,95329 \text{ g}}$$

4) Ca z CaCl₂

$$Mr(\text{CaCl}_2) = 110,99 \text{ g/mol}$$

$$Mr(\text{Ca}) = 40,078 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl Ca v CaCl}_2 \rightarrow 40,078/110,99 = 0,3611 \rightarrow 36,11 \%$$

$$36,11 \% \quad \quad \quad 5 \text{ g}$$

$$100 \% \quad \quad \quad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 5 \cdot (100/36,11) = 13,8465 \text{ g/l}$$

$$\text{na 100 ml} - \mathbf{13,8465 \text{ g} / 10 = 1,3847 \text{ g}}$$

5) Li z LiCl

$$Mr(\text{LiCl}) = 42,394 \text{ g/mol}$$

$$Mr(\text{Li}) = 6,941 \text{ g/mol}$$

$$\text{podíl Li v LiCl} \rightarrow 6,941/42,394 = 0,1637 \rightarrow 16,37 \%$$

$$16,37 \% \quad \quad \quad 5 \text{ g}$$

$$100 \% \quad \quad \quad x \text{ g}$$

$$\Rightarrow x = 5 \cdot (100/16,37) = 30,543 \text{ g/l}$$

$$\text{na 100 ml} - \mathbf{30,543 \text{ g} / 10 = 3,0543 \text{ g}}$$

Příprava směsných vzorků

Pro přípravu směsných vzorků o různých koncentracích postupujeme podle tabulky:

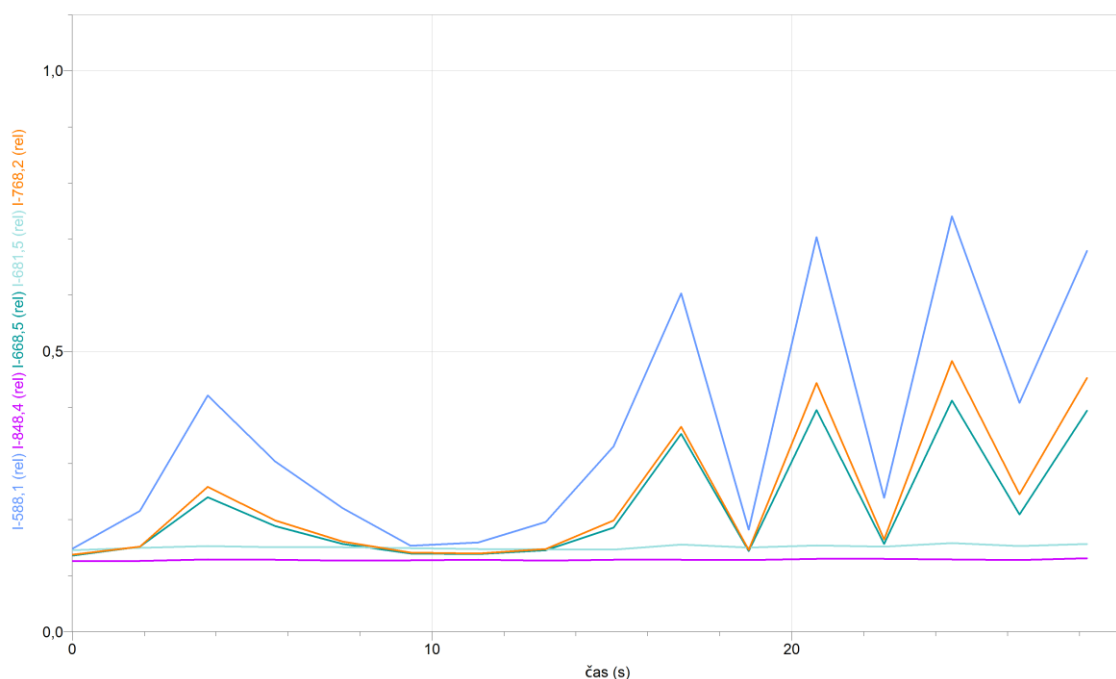
Koncentrace [g/l]	Počet ml standardů
1	5
0,8	4
0,6	3
0,5	2,5
0,4	2
0,3	1,5

Tabulka 8: Směsné vzorky

Do 25 ml odměrných baňky odpipetujeme počet ml (podle tabulky) jednotlivých standardů. Do každé baňky odpipetujeme vždy stejný počet ml všech standardů a doplníme destilovanou vodou po rysku, kromě koncentrace 1 g/l. Tímto jsme vytvořili směsné roztoky, které následně použijeme pro měření.

Vlastní měření

Pro měření opět použijeme plamenový fotometr, kdy roztok vpravujeme do plamene 2 způsoby – pomocí drátku s očkem, který vždy ponoříme do roztoku a poté vsuneme do plamene, tímto tedy zaručíme stejné dávkování; pomocí spreje, kdy je roztok vstřikován do plamene. Provedeme více stejných měření a následně je zprůměrujeme pro přesnější výsledky. Intenzita signálu byla získána při vlnových délkách odpovídajícím emisním čarám prvků, ty uvádí Tabulka 10: Přiřazení vlnové délky ke stanovovanému prvku, byl použit integrační čas 1000 ms, bez průměrování. Protože docházelo ke značnému kolísání signálu podle toho, kdy bylo měření zahájeno, měřili jsme časovou závislost intenzity signálu (28 s) během níž byl vzorek několikrát dávkován, ať už pomocí očka na kancelářské sponce nebo stříknutím z tlakového rozprašovače do plamene, zpracovány byly vždy maximální hodnoty intenzity při dané vlnové délce.



obrázek 34: Časová závislost intenzity – integrační čas 1000 ms, dávkování rozprašovač, směsný vzorek 0,3 g/l kovu

Kromě uvedených způsobů zmlžování byly také použity vyrobené fixírky a to s přívodem vzduchu:

- 1) pomocí kompresoru na huštění automobilových pneumatik;
- 2) pomocí motorku pro vzduchování akvárií;
- 3) pomocí lidského dechu;
- 4) pomocí laboratorní pumpy/vývěvy, kdy fixírku tvořila kapilára.
- 5) vyzkoušeli jsme speciální ultrazvukový zmlžovač zapůjčený doc. Ing. Pavlem Pokorným Ph.D. z katedry netkaných a nanovlákných materiálů

Žádná fixírka neposkytla dostatečně reprodukovatelné hodnoty intenzity. Tento problém souvisí patrně s nekonstantním tlakem vzduchu, ať už dechu nebo pístového kompresoru. Vzduchovací motorek neměl dostatečný tlak pro nasátí roztoku a to ani při použití kapiláry. Nejspolehlivější byla fixírka uvedená v bodě 4), ve všech případech byl problém s tím, že vzduch s rozprášeným vzorkem mířil kolmo na osu plamene, čímž docházelo k deformaci plamene a nestabilitě signálu. U komerčních plamenových fotometrů je uspořádání zmlžovače souosé, ale to by v našem případě vyžadovalo zásah do kahanu, což jsme z bezpečnostních důvodů i nedostatku času neudělali.

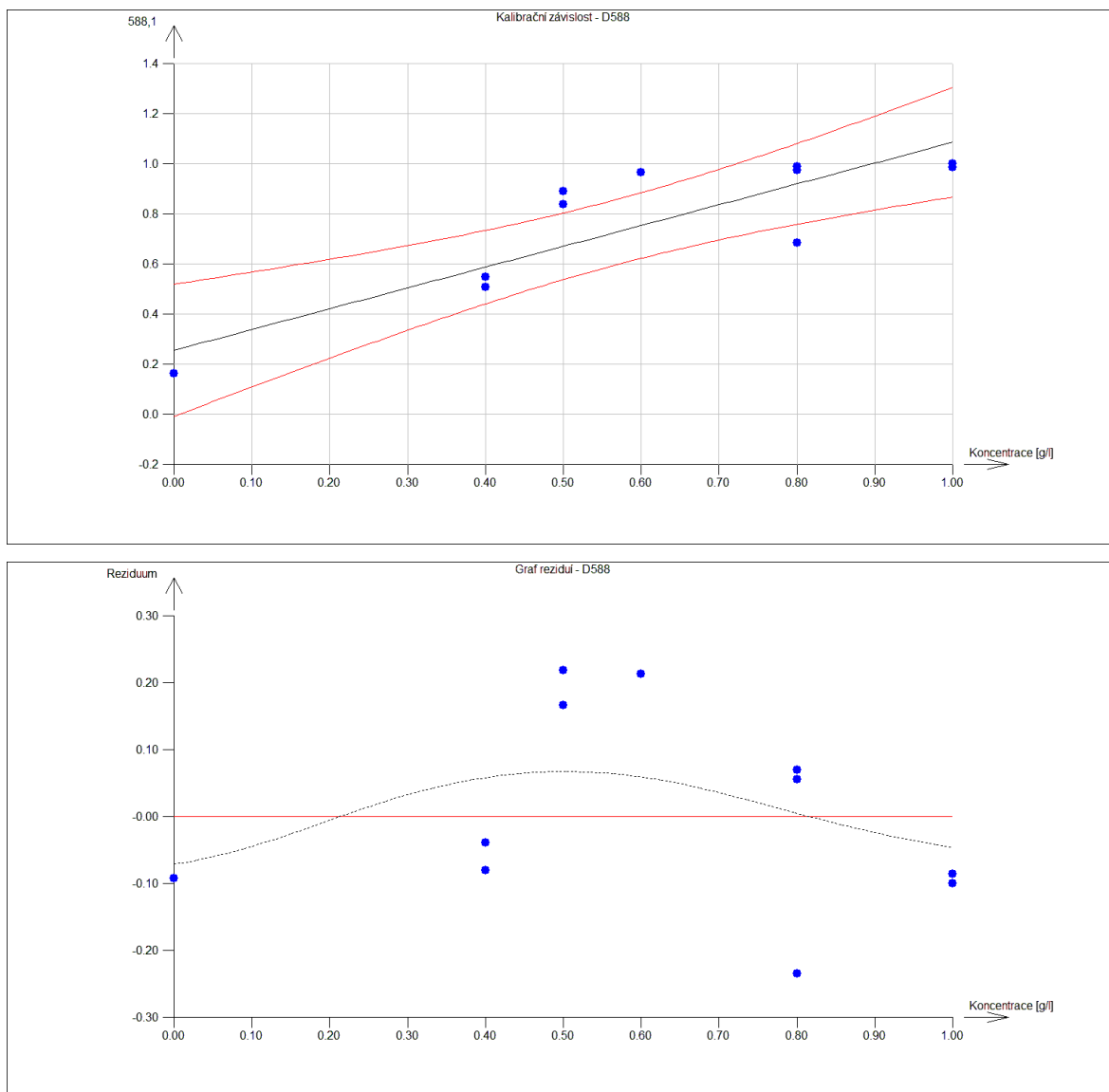
Ultrazvukový zmlžovač obsahuje bariéru srážející velké kapky a po připojení ventilátoru z počítače produkuje velmi jemnou mlhu, a tedy poskytuje intenzivní signál. Jeho nevýhodou ale bylo velké množství vzorku potřebné pro ponoření ultrazvukového generátoru a zejména kontaminace způsobená velkým množstvím mlhy, která ulpívala na všech površích. Ani volbou nižších otáček nebylo možné kontaminaci zabránit, proto nebyl tento zmlžovač dále použit. Pro zajímavost: po několikanásobném umytí kahanu trvalo 30 minut, než byl plamen bez viditelných stop sodíku, jehož roztok byl použit pro měření intenzit záření. I zde byl problém s tím, že uspořádání nebylo souosé s kahanem a docházelo k nestabilitě plamene .

Výsledky měření

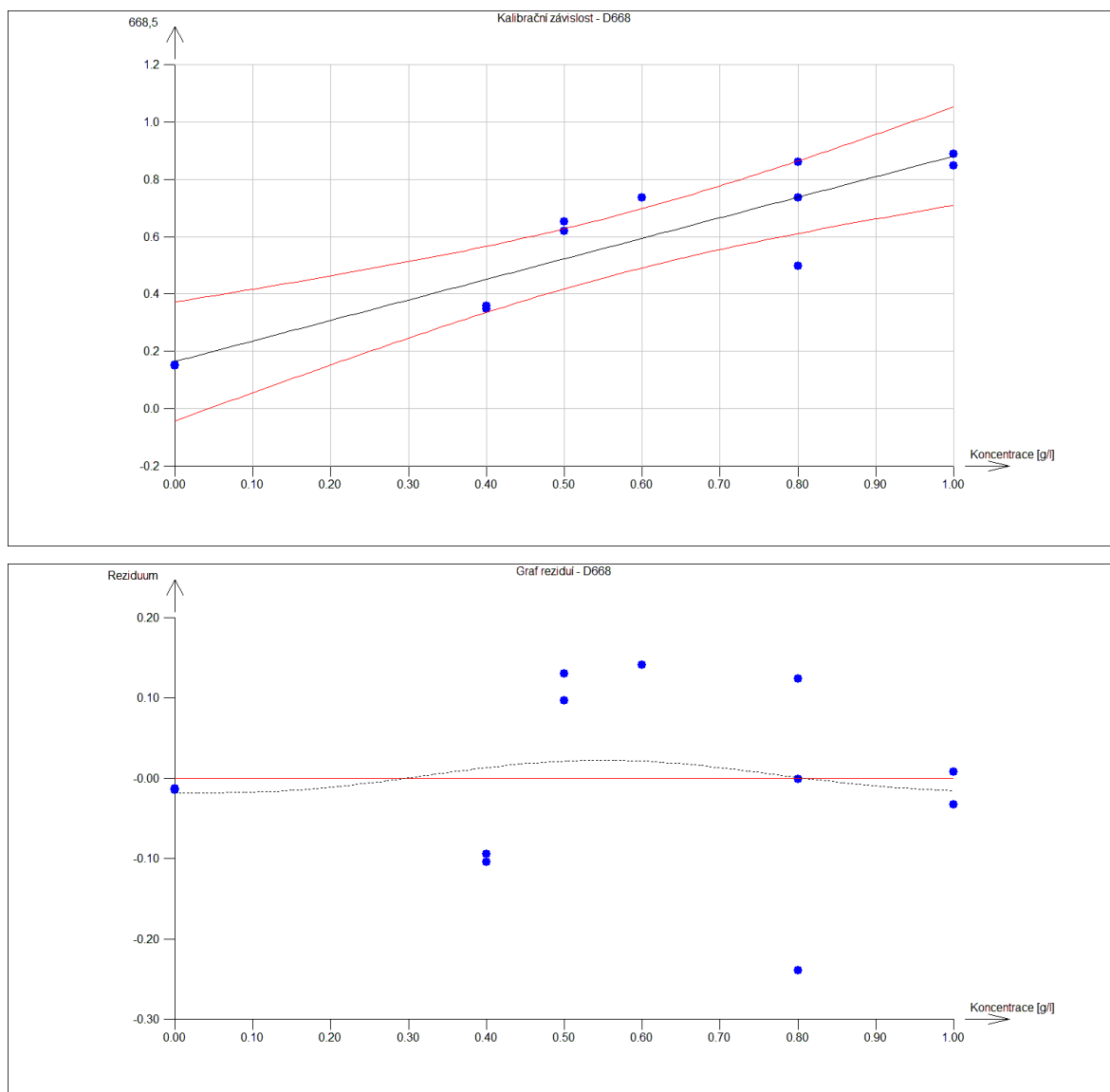
		vlnová délka – intenzita						
způsob	koncentrace	588,1	668,5	681,5	768,2	848,4		
drátek	1 g/l	0,986	0,848	0,200	0,885	0,149	průměr	
		1,000	0,889	0,218	0,972	0,153		
		0,993	0,869	0,209	0,929	0,151		
	0,8 g/l	0,989	0,861	0,190	0,946	0,148	průměr	
		0,685	0,498	0,182	0,518	0,145		
		0,975	0,736	0,189	0,804	0,147		
	0,6 g/l	0,966	0,735	0,174	0,806	0,139	průměr	
		0,966	0,735	0,174	0,806	0,139		
	0,5 g/l	0,837	0,619	0,178	0,649	0,141	průměr	
		0,889	0,653	0,180	0,675	0,142		
		0,863	0,636	0,179	0,662	0,142		
	0,4 g/l	0,548	0,357	0,162	0,363	0,137	průměr	
		0,507	0,347	0,161	0,357	0,138		
		0,528	0,352	0,162	0,360	0,138		
	0 g/l	0,163	0,150	0,166	0,152	0,146	průměr	
		0,163	0,152	0,167	0,154	0,140		
		0,163	0,151	0,167	0,153	0,143		
	sprej	1 g/l	0,560	0,190	0,165	0,416	0,144	průměr
			0,910	0,379	0,164	0,733	0,154	
			0,811	0,327	0,163	0,615	0,149	
			0,760	0,299	0,164	0,588	0,149	
		0,8 g/l	0,971	0,578	0,164	0,850	0,153	průměr
			0,974	0,628	0,166	0,778	0,150	
			0,691	0,461	0,164	0,516	0,147	
0,879			0,556	0,165	0,715	0,150		
0,6 g/l		0,975	0,342	0,146	0,943	0,145	průměr	
		0,975	0,342	0,146	0,943	0,145		
0,5 g/l		0,927	0,291	0,161	0,746	0,147	průměr	
		0,978	0,313	0,160	0,922	0,153		
		0,534	0,176	0,156	0,422	0,143		
		0,813	0,260	0,159	0,697	0,148		
0,3 g/l		0,610	0,230	0,156	0,430	0,141	průměr	
		0,557	0,176	0,156	0,397	0,135		
		0,584	0,203	0,156	0,414	0,138		
0 g/l		0,161	0,149	0,164	0,150	0,144	průměr	
		0,165	0,149	0,163	0,152	0,142		
		0,163	0,149	0,164	0,151	0,143		

Tabulka 9: Výsledky měření integrační čas 500 ms – zprůměrováno

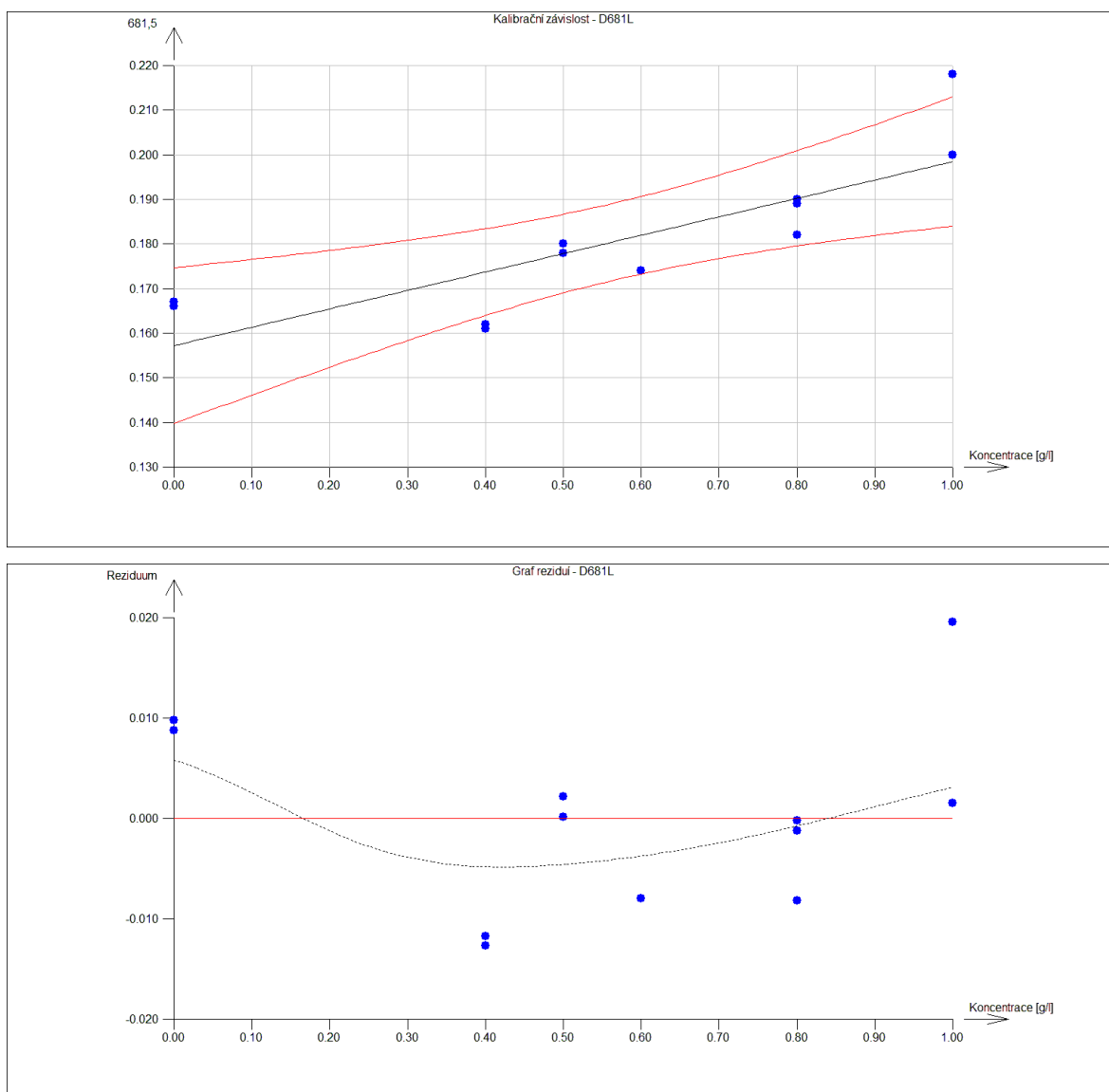
Následně vyneseme naměřené hodnoty do grafů



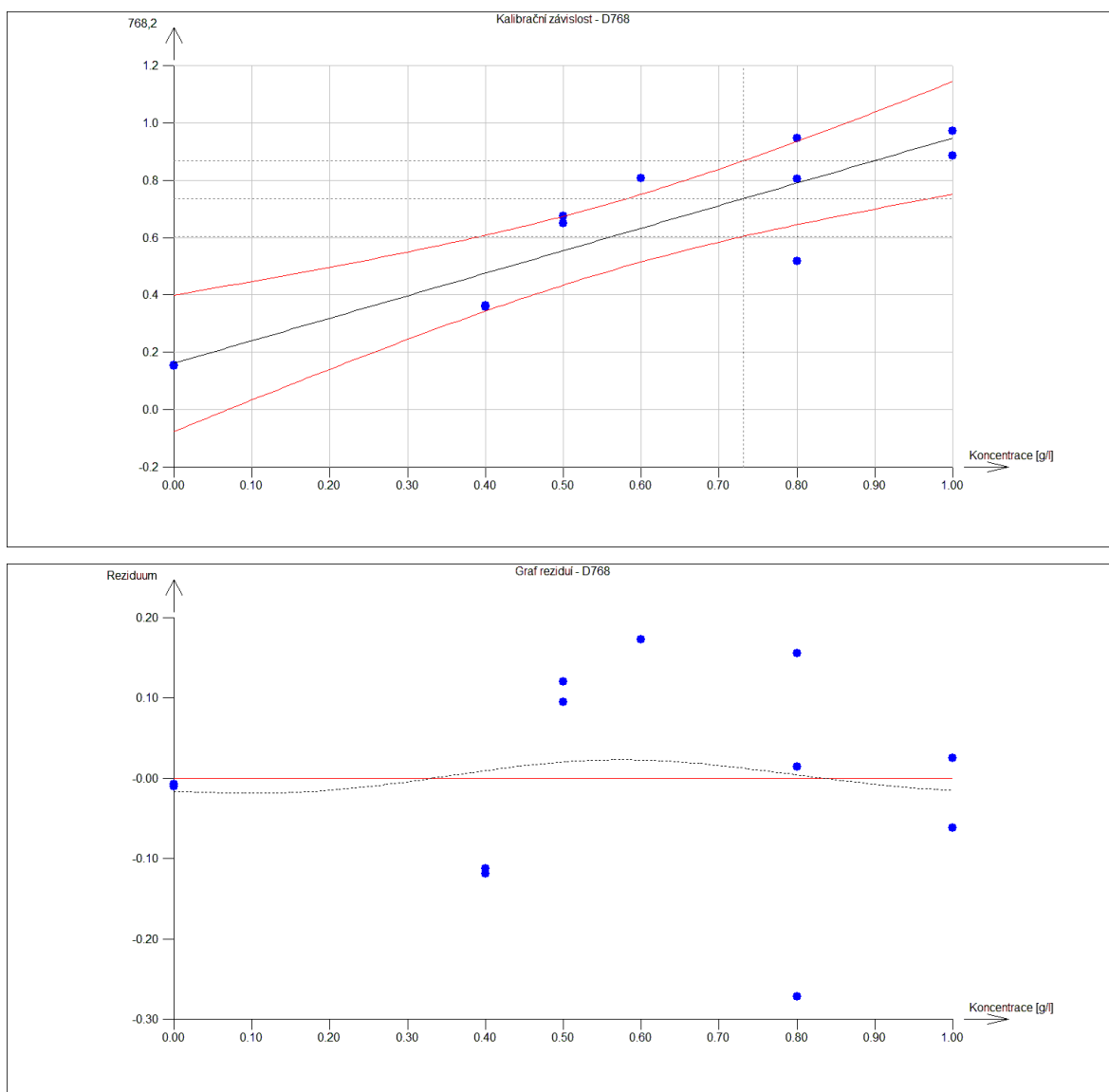
obrázek 35: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 588 nm, Na, drátek



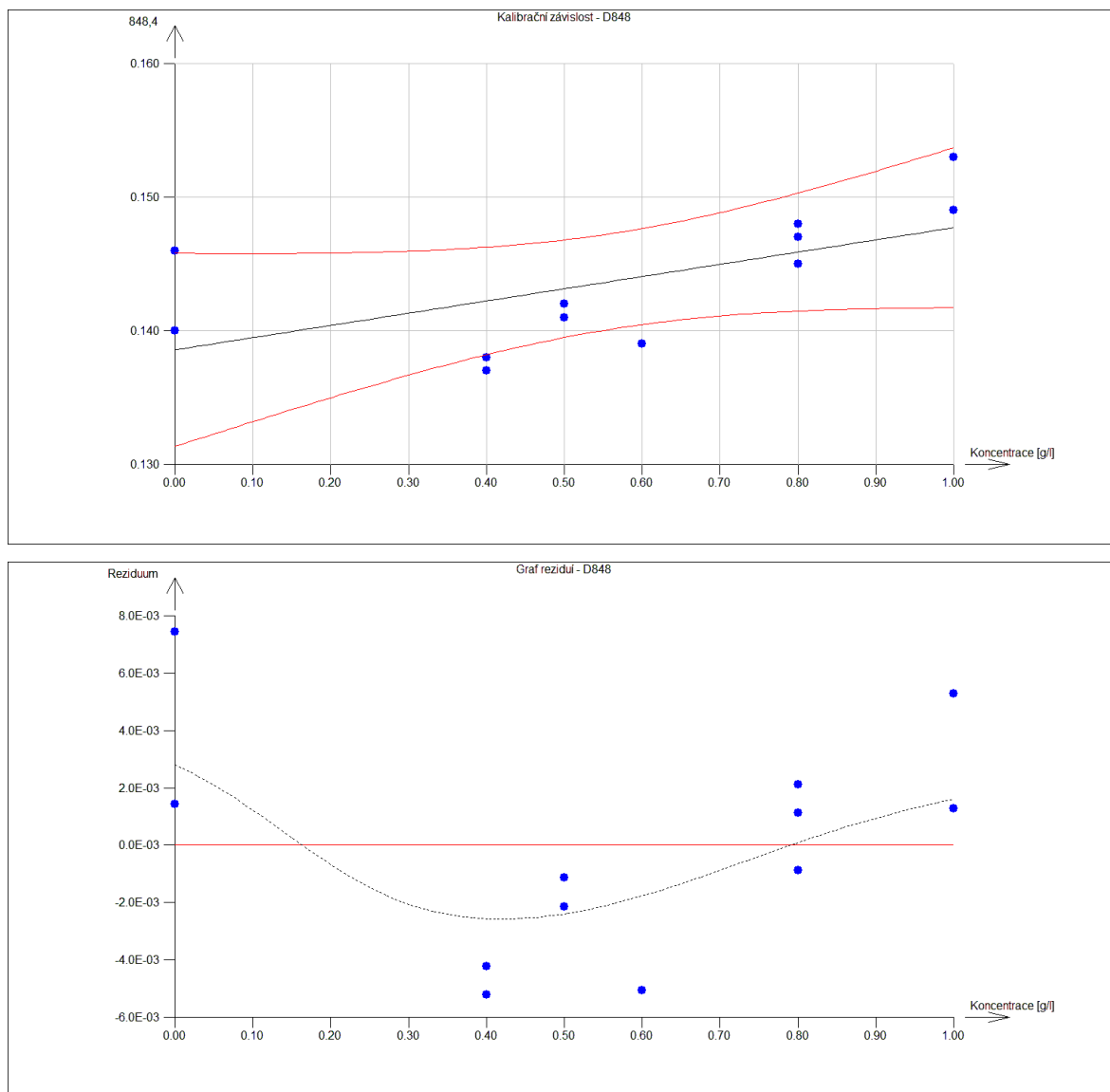
obrázek 36: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 668 nm, Li, drátek



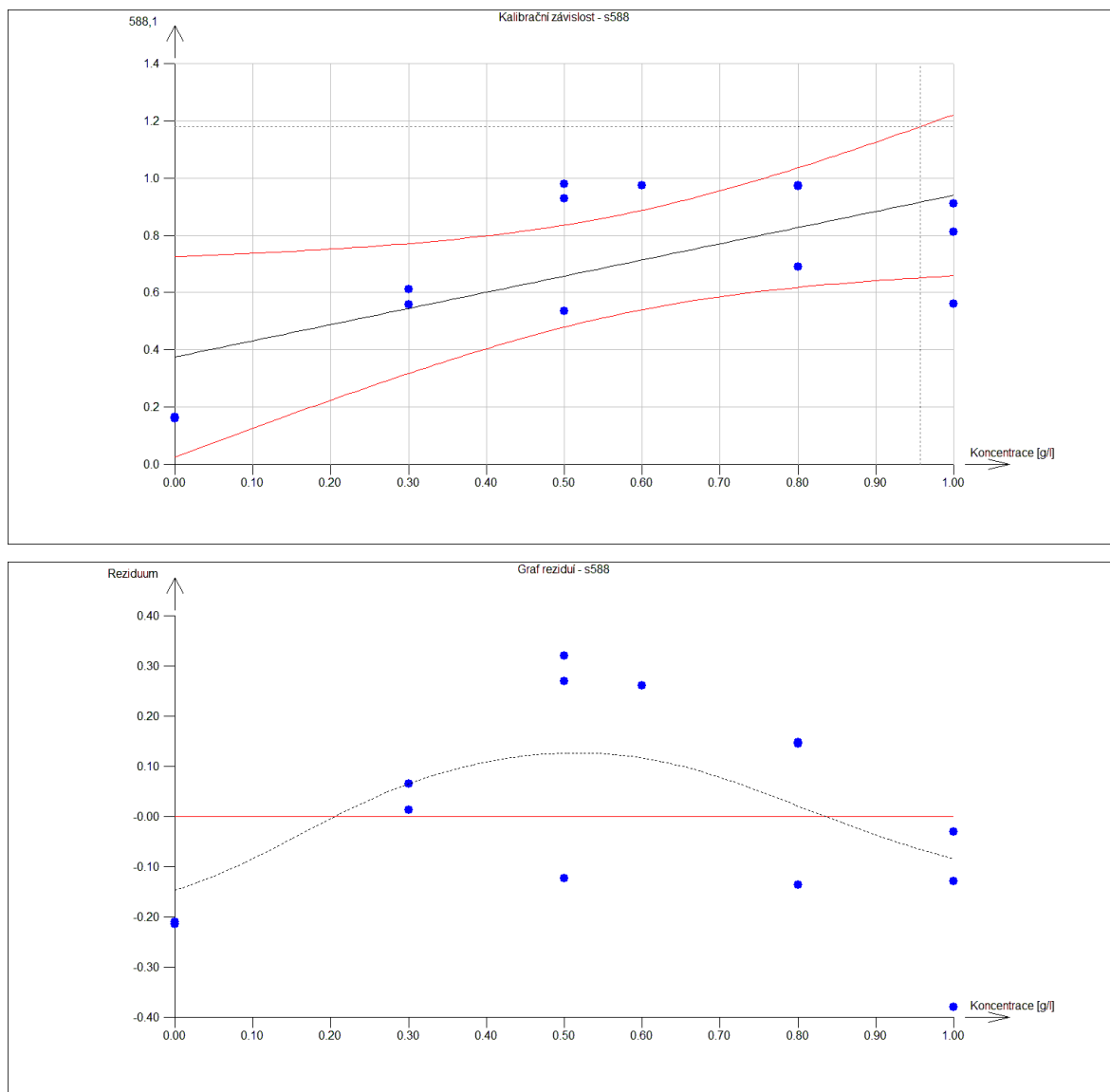
obrázek 37: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 681 nm, Sr, drátek



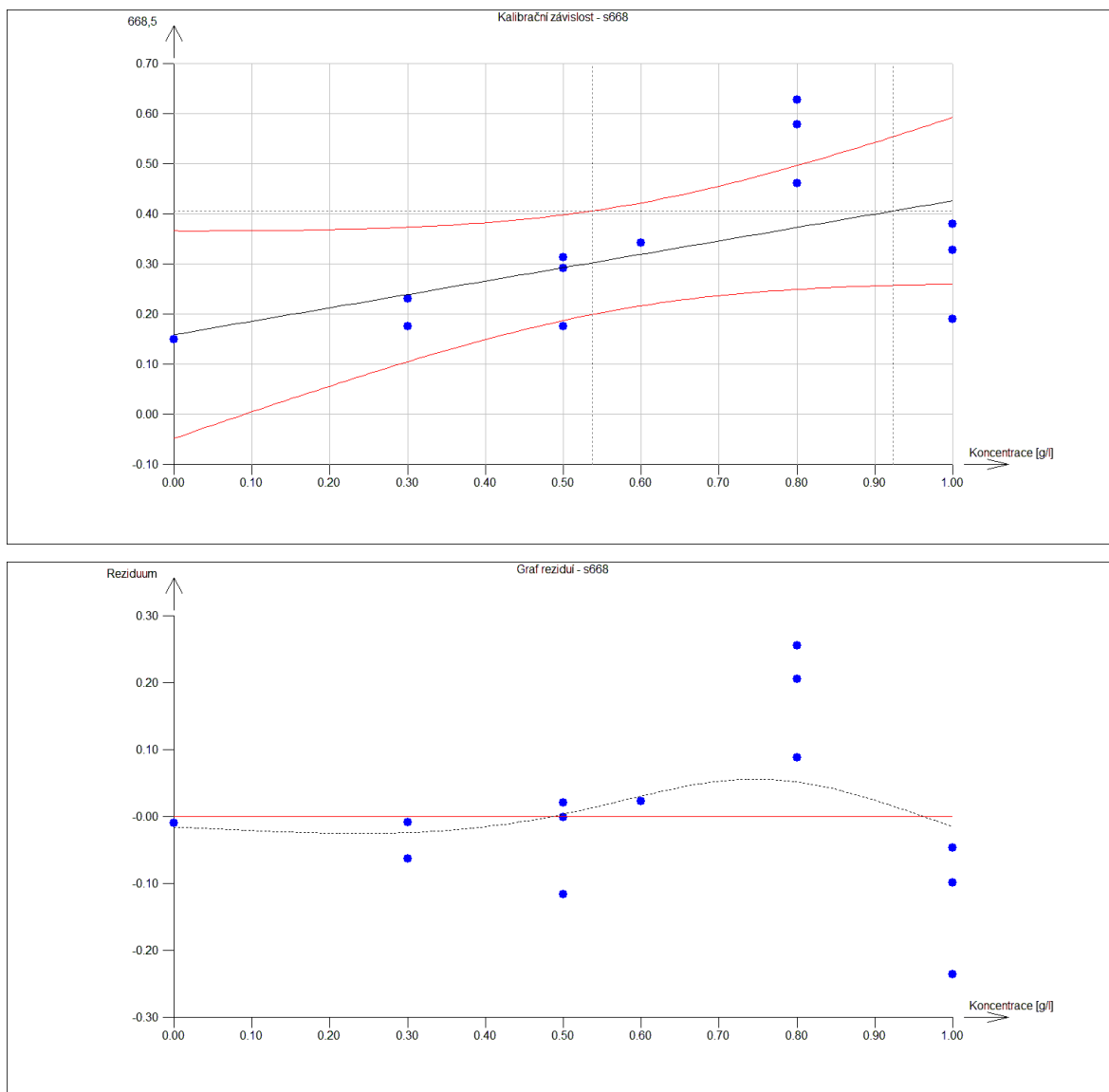
obrázek 38: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 768 nm, K, drátek



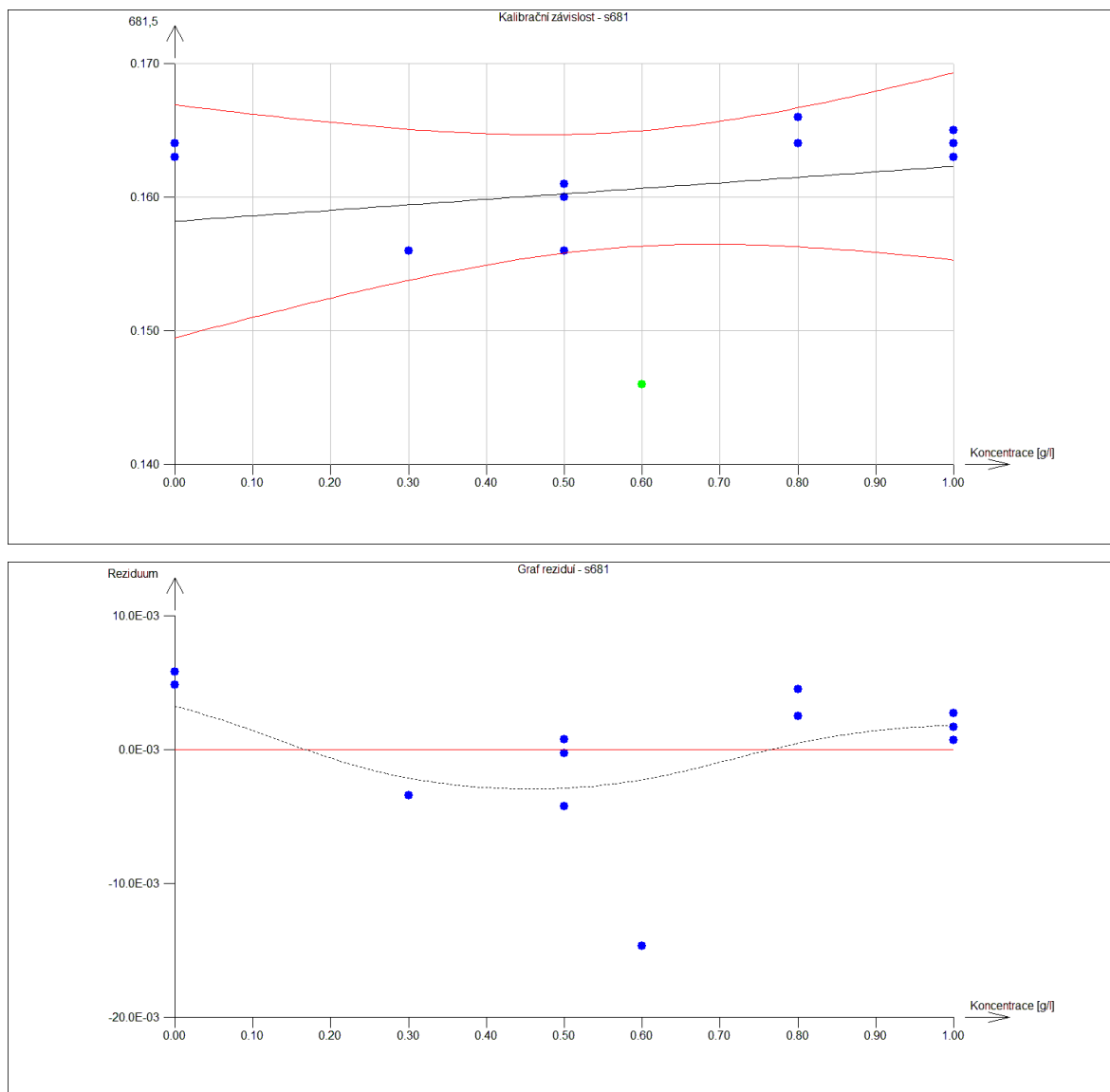
obrázek 39: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 848 nm, Cs, drátek



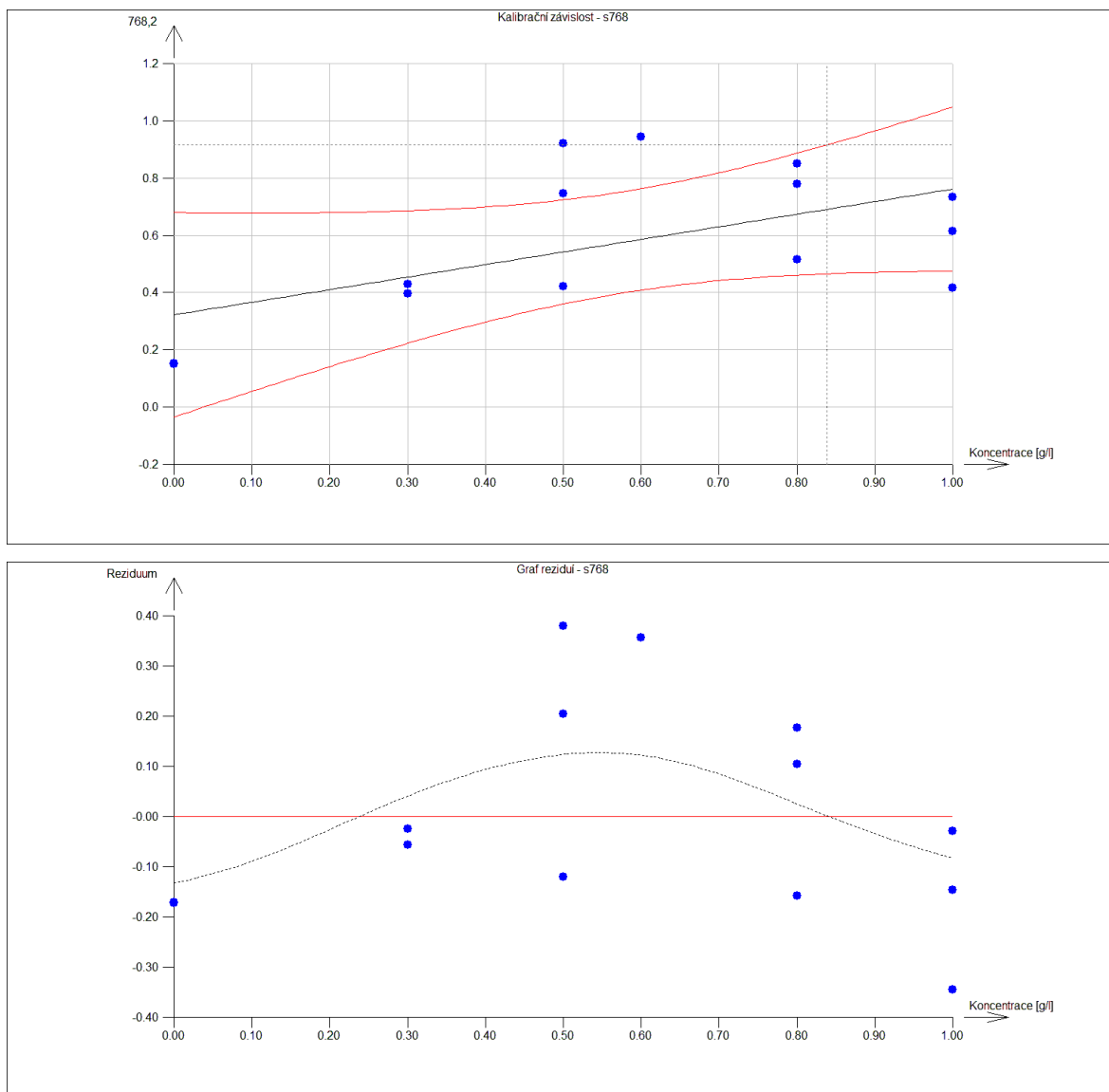
obrázek 40: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 588 nm, Na, sprej



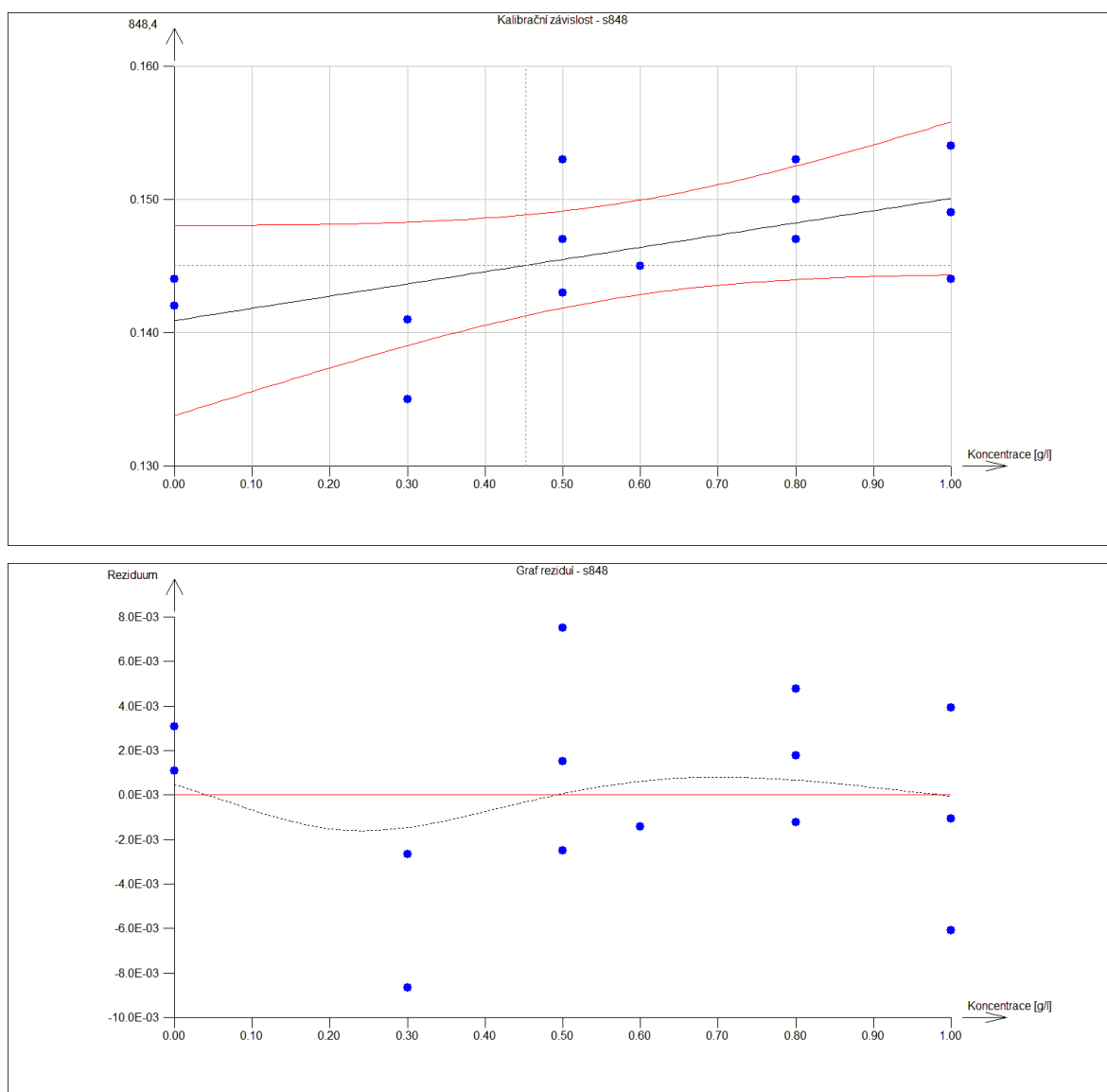
obrázek 41: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 668 nm, Li, sprej



obrázek 42: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 681 nm, Sr, sprej



obrázek 43: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 768 nm, K, sprej



obrázek 44: Kalibrace a graf reziduí, plamenový fotometr při 848 nm, Cs, sprej

Pro usnadnění orientace obsahuje následující tabulka přiřazení kovů k vlnové délce.

Vlnová délka [nm]	Stanovovaný prvek
588,0	Sodík – Na
668,5	Lithium – Li
681,5	Stroncium – Sr
768,2	Draslík – K
848,4	Cesium – Cs

Tabulka 10: Přiřazení vlnové délky ke stanovovanému prvku

Bohužel se nám nepodařilo detekovat baryum, vápník ani měď. Píky těchto látek se ve spektrech vůbec neobjevily ani při vysokých koncentracích těchto kovů, kdy už by měly být patrné.

Hlavním výstupem je následující tabulka, která uvádí meze detekce X_d a meze stanovení (kvantifikace) X_q vypočtené z kalibrací obsahujícími všechny koncentrace pomocí software QC Expert 3.3.

Prvek	Výpočet / Meze [g/l]	drátek		sprej	
		X_d	X_q	X_d	X_q
Na	Metoda podle ISO 11843-2	1,00	1,45	1,94	2,91
	Přímá metoda analytu	0,48	0,64	1,77	17,63
	Přímá metoda signálu, IUPAC	0,52	0,67	0,93	1,38
	Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0,46	0,61	0,73	3,05
	Metoda K*Sigma z regrese	0,63	0,95	1,24	1,86
	Metoda K*Sigma, ACS	1,09	1,63	2,33	3,49
Li	Metoda podle ISO 11843-2	1,05	1,19	3,24	2,43
	Přímá metoda analytu	0,44	0,59	23,12	1335,9
	Přímá metoda signálu, IUPAC	0,48	0,63	1,22	2,06
	Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0,43	0,57	0,85	25,64
	Metoda K*Sigma z regrese	0,58	0,87	1,55	2,32
	Metoda K*Sigma, ACS	0,99	1,49	2,91	4,37
Sr	Metoda podle ISO 11843-2	6,37	8,60	1,94	61,10
	Přímá metoda analytu	0,64	0,98	252,83	40410,4
	Přímá metoda signálu, IUPAC	0,65	0,87	7,13	27,99
	Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0,56	0,83	441,44	70626,5
	Metoda K*Sigma z regrese	0,85	1,27	4,24	6,36
	Metoda K*Sigma, ACS	1,45	2,17	7,96	11,94
K	Metoda podle ISO 11843-2	1,05	1,15	2,43	3,45
	Přímá metoda analytu	0,46	0,61	25,52	1549,38
	Přímá metoda signálu, IUPAC	0,50	0,65	1,31	2,28
	Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0,44	0,59	0,88	27,98
	Metoda K*Sigma z regrese	0,61	0,91	1,63	2,44
	Metoda K*Sigma, ACS	1,03	1,55	3,05	4,58
Cs	Metoda podle ISO 11843-2	0,74	28,46	0,71	23,53
	Přímá metoda analytu	24,64	1486,38	23,44	1363,43
	Přímá metoda signálu, IUPAC	1,27	2,20	1,23	2,09
	Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	0,85	27,03	0,85	25,95
	Metoda K*Sigma z regrese	1,58	2,37	1,56	2,34
	Metoda K*Sigma, ACS	2,71	4,06	2,93	4,39

Tabulka 11: Meze detekce a meze stanovení plamenového fotometru

3.3.6. Závěr

Nejdříve se podíváme na grafy, kdy jsme pro vpravení roztoku do plamene používali drátek s očkem. Kalibrace je lineární, ale rozptyl bodů je poměrně velký, některé hodnoty se hodně vzdalují od kalibrační křivky.

Grafy při použití spreje jsou také lineární, ale rozptyl bodů je mnohem vyšší, to souvisí s horší reprodukovatelností při dávkování.

V Tabulce 11: vidíme, že většina metod pro výpočet mezí detekce (X_d) a mezí stanovení (X_q) poskytuje kromě Přímé metody analytu a Kombinované metody Ebel, Kamm podobné hodnoty. Obě zmíněné metody poskytují řádově vyšší hodnoty mezí, to je způsobeno tím, že při výpočtu zohledňují spolehlivost určení hodnoty Y [Meloun, 2014], tedy v našem případě intenzity. Abychom porovnání zjednodušili, vybereme jako základní meze stanovené Přímou metodou signálu, podle IUPAC (v tabulce zvýrazněné **tučně**).

Při dávkování drátkem jsou kromě cesia všechny meze stanovení podobné, pod 1 g/l, u cesia 2,2 g/l. Dávkování sprejem zvýší mez stanovení dvojnásobně na 2 g/l, s výjimkou stroncia, kde vychází hodnota 28 g/l. Protože ionizační energie stroncia 549,5 kJ/mol (*Wolfram Alpha, Ionization energy*) je z měřených prvků nejvyšší, je pravděpodobné, že energie použitého plamene spojená se způsobem atomizace není dostatečná pro kvantitativní stanovení. Stroncium tedy není možné stanovit spolehlivě.

Meze stanovení jsou poměrně vysoké, je zřejmé, že bez dalších úprav, např. koaxiálního uspořádání zmlžovače, jak navrhuje [NÉEL, 2014] není tento plamenový fotometr použitelný.

3.4. Ověření obsahu draslíku v potravinách

Pro ověření obsahu draslíku ve vybraných potravinách využijeme opět plamenovou fotometrii. Část zkoumaného vzorku vložíme pomocí kleští do vrcholového kužele plamene a zapálíme ho, jako zdroj plamene používáme plynový hořák, který je pro měření nejlepší. Nastavíme snímač měřící absorpci záření tak, aby byl kolmo k plameni a ve výšce odpovídající vrcholovému kuželu plamene.

Použité přístroje, zařízení a pomůcky: laboratorní kleště, vzorek zkoumané potraviny, plynový hořák, spektrofotometr Vernier SpectroVis plus, senzor pro měření plamenné spektroskopie, počítač – program Logger Pro.

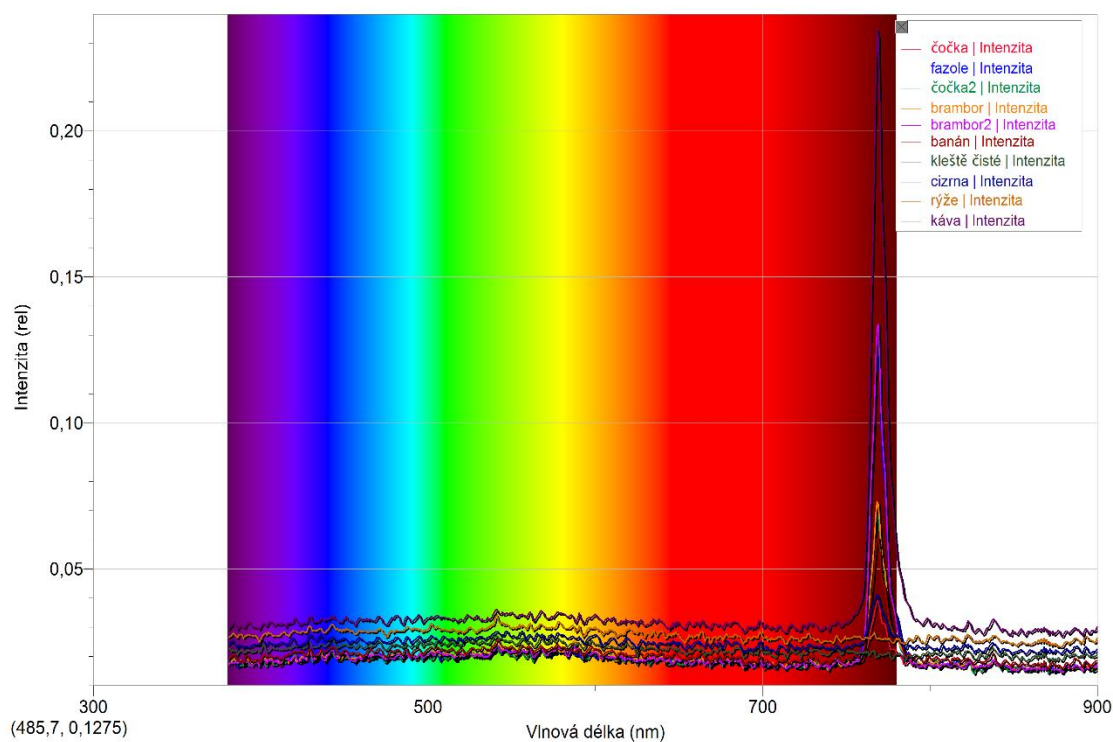
3.4.1. Průběh měření

Po nastavení všech přístrojů a případné optimalizaci lze přistoupit k vlastnímu měření. Postupně dáváme do plamene vzorky zkoumaných potravin, výsledky zaznamenáváme do spuštěného programu, který nám vše vykresluje do grafu, důležité je ještě vědět, že vlnová délka odpovídající draslíku je okolo 770 nm. Pro toto měření jsem použil následující potraviny – káva, rýže, cizrna, banán, brambor, čočka, fazole.

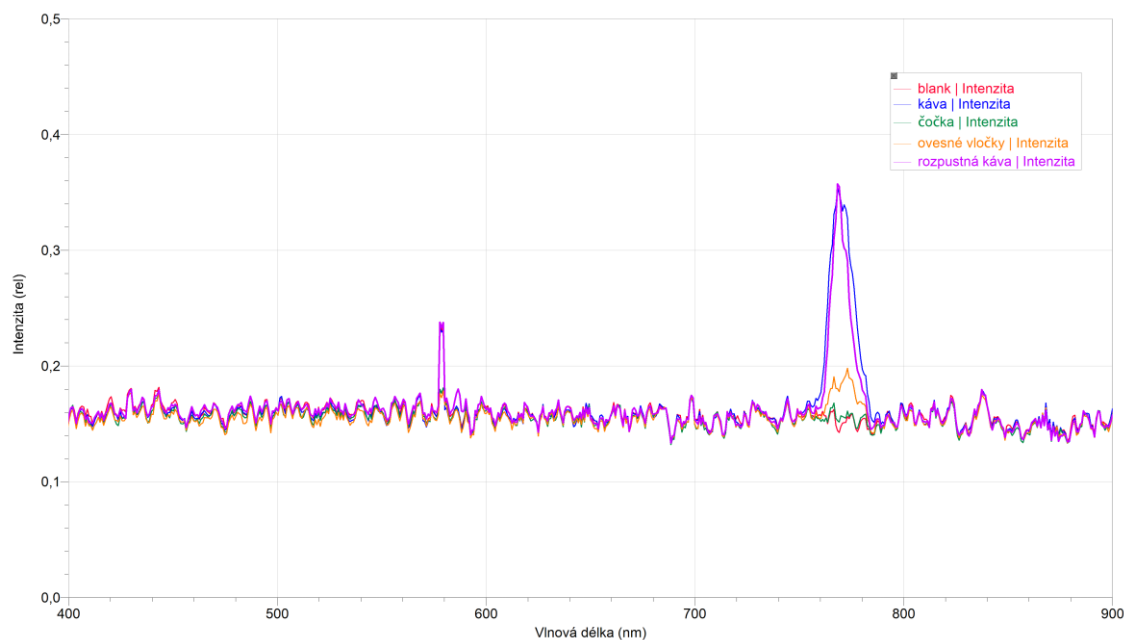
3.4.2. Výsledek měření

potravina	intenzita	Obsah draslíku podle (<i>Draslík – potraviny</i>) [mg.kg ⁻¹]	Obsah sodíku podle (<i>Sodík – potraviny</i>) [mg.kg ⁻¹]
rýže	0,03	1 000	60
cizrna	0,04	2 984	neuvedeno
banán	0,06	3 500	10
čočka	0,07	6 700–8 100	40–550
brambor	0,13	4 400–5 700	30–280
fazole	0,13	12 000	20–400
káva	0,24	20 200	740

Tabulka 12: Výsledek měření – obsah draslíku a sodíku v potravinách



Obrázek 45: Výsledek měření – obsah K v potravinách (integrační čas 500 ms)



Obrázek 46: Výsledek měření – obsah K v potravinách 2 (integrační čas 500 ms)

3.4.3. Závěr

Z výsledků měření je tedy patrné, že největší obsah draslíku je v kávě, kde intenzita záření dosahovala 0,24 a nejméně v rýži, kde nám intenzita vystoupala na hodnotu pouhých 0,03. Seřadíme-li naměřené intenzity podle velikosti, a pokud seřadíme i množství draslíku v potravinách, potom se tyto 2 řady relativně shodují a měření tedy potvrzuje naměřené hodnoty draslíku v námi zkoušených potravinách. Vyšší intenzita v případě brambor, je patrně způsobena použitím slupek, ve kterých je koncentrace draslíku vyšší, než v hlíze. (Subramanian, N. K., et al. 2011). Také poměry intenzit a obsahů draslíku si vzájemně odpovídají, např. u dvojic, kde první potravinu má dvojnásobný obsah draslíku oproti druhé, jsou intenzity také dvojnásobné: banán a rýže, brambor banán, fazole čočka, káva a fazole. Protože v Obrázku 47 není patrný pík sodíku, bylo původní měření opakováno a je zobrazeno v Obrázku 48. Pík sodíku se objevil pouze u rozpustné kávy, která má podle Tabulky 12 také nejvyšší obsah sodíku. Výsledky jsou logické, protože obsah sodíku je v uvedených potravinách 10–35× nižší než obsah draslíku a tak i přes vyšší citlivost plamenového fotometru pro sodík než pro draslík není ve spektru patrný pík odpovídající sodíku.

4. Závěr

Všechny požadavky na práci byly splněny. Vyhodnotil jsem jedno stanovení pomocí třech různých způsobů – vizuálně, kolorimetricky a pomocí kamery na mobilním telefonu. Zhotovení funkčního plamenového fotometru ze spektrometru Vernier SpectroVis Plus, optického kabelu a kahanu se také zdařilo, včetně optimalizace nastavení, ale bohužel tento fotometr bez spolehlivého zmlžovače nefungoval úplně podle našich představ, protože mez stanovení alkalických kovů vnášených do plamene pomocí drátku nebo spreje se pohybuje kolem vysoké prakticky nepoužitelné hodnoty 1, resp. 2 g/l. Cíl bakalářské práce, tedy navrhnout a ověřit jednoduché spektrofotometrické experimenty s levnými přístroji firmy Vernier, popř. mobilním telefonem, které jsou použitelné pro výuku chemie, byl splněn. Jako doplněk obsahuje práce v příloze pracovní list kolorimetrické stanovení Fe^{3+} . Prokázali jsme, že kolorimetrie s pomocí mobilního telefonu je možná a poskytuje pravdivé výsledky. Ve výuce chemie by se toto stanovení dalo použít, obzvlášť v dnešní době, kdy většina dětí vlastní chytré telefony.

5. Literatura

- ANON., nedatováno. *ColorGrab*, aplikace v GooglePlay, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.loomatix.colorgrab&hl=cs>
- ANON., nedatováno. *Draslík v potravinách*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <http://www.prvky.com/draslik-potraviny.html>
- ANON., nedatováno. *Sodík v potravinách* [online] [vid. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.prvky.com/sodik-potraviny.html>
- ANON., nedatováno. *Experimenty s Vernierem: Chemie*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <http://www.vernier.cz/experimenty/prehled/oblast/chemie>
- ANON., nedatováno. *History of spectroscopy*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/History_of_spectroscopy.
- ANON., nedatováno. *Kolorimetr Vernier COL-BTA: podrobné informace*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <http://www.vernier.cz/produkty/podrobne-informace/kod/COL-BTA/>
- ANON., nedatováno. *Kolorimetrické stanovení obsahu humusu*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: https://home.czu.cz/storage/78834_Kolorimetrick%C3%A9%20stanoven%C3%AD%20obsahu%20humusu-p%C5%AFdy.pdf
- ANON., nedatováno. *Public Lab: Detection of Olive Oil Adulteration (with Peanut Oil) Using Visual Light Spectroscopy* [online] [vid. 2016-07-14]. Dostupné z: <https://publiclab.org/notes/ygzstc/04-30-2014/detection-of-olive-oil-adulteration-with-peanut-oil-using-visual-light-spectroscopy>
- ANON., nedatováno. *PublicLab: Desktop Spectrometry kit*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <http://publiclab.org/wiki/desktop-spectrometry-kit-3-0>.
- ANON., nedatováno. *PublicLab: Foldable Spectrometer*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <https://publiclab.org/wiki/foldable-spec>.
- ANON., nedatováno. *Raman spectroscopy*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy.
- ANON., nedatováno. *Spektrometr SpectroVis Plus Vernier: podrobné informace*, [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: <http://www.vernier.cz/produkty/podrobne-informace/kod/SVIS-PL>.
- ANON., nedatováno. *Wolfram Alpha, Ionization energy* [online] [vid. 2016-07-07]. Dostupné z: [http://www.wolframalpha.com/input/?i=ionization+energy+\(Lithium,+Sodium,+Potassium,+Rubidium,+Cesium,+Strontium\)](http://www.wolframalpha.com/input/?i=ionization+energy+(Lithium,+Sodium,+Potassium,+Rubidium,+Cesium,+Strontium))
- BECKMAN, A. O. et al. *Anal. Chem.*, 1977, 49 (3), pp 280A–300A.
- BINGS, H., BOGAERTS, A., BROEKAERT, J. A. C. *Anal. Chem.* 2006, 78, 12, 3917–3946.
- ČERNOHORSKÝ, T. JANDERA, P. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-7194-114-X.
- DĚDINA, J., a kol.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Československá spektroskopická společnost, Praha 1987.
- DOERFFEL, K., ECKSCHLAGER, K. *Optimální postup chemické analýzy*, Praha (1985).
- FIŠAR, Zdeněk. *Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. [cit. 2013-27-11]

- HESS, A. V. I., 2007. Digitally enhanced thin-layer chromatography: an inexpensive, new technique for qualitative and quantitative analysis. *J. Chem. Educ* [online]. roč. 84, č. 5, s. 842 [vid. 2016-07-13]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p842>
- KLOUDA, P. Moderní analytické metody, Pavel Klouda (2003).
- KOMÁREK J.: Atomová absorpční spektrometrie. Masarykova univerzita, Brno 2000.
- MALÁT M. Absorpční anorganická fotometrie, Academia, Praha (1973)
- MELOUN, M., MILITKÝ J.: Statistické zpracování experimentálních dat – v chemometrii, biometrii, ekonometrii a v dalších oborech, 2. vydání ACADEMIA Praha 2004, 980 stran, ISBN 80-200-1254-0.
- NÉEL, Bastien, Gastón A. CRESPO, Didier PERRET, Thomas CHERUBINI a Eric BAKKER, 2014. Camping Burner-Based Flame Emission Spectrometer for Classroom Demonstrations. *Journal of Chemical Education* [online]. **91**(10), 1655–1660 [vid. 2017-04-12]. ISSN 0021-9584, 1938-1328. Dostupné z: doi:10.1021/ed4008149
- ROBINSON, J. W. *Anal. Chem.* 1994, 66 (8), pp 472A–477A.
- ROBINSON, J. W. Recent Advances in Atomic Absorption Spectroscopy, *Anal. Chem.* 1961, 33, 8, 1067–1071. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60176a004>.
- SCHMIDT, W. *Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences*, 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN 3-527-29911-4.
- SOMMER, L. et al. *Teorie a praxe vybraných optických analytických metod*, Praha (1978)
- SOMMER, L. *Analytická spektrometrie I.*, Praha (1986).
- SUBRAMANIAN, N. K., et al. 2011. The three-dimensional distribution of minerals in potato tubers. *Annals of Botany* [online]. 1. 4., roč. 107, č. 4, s. 681–691 [vid. 2016-07-18]. ISSN 0305-7364, 1095-8290. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mcr009
- TriloByte Statistical Software. *QC Expert 3.3* [software]. Dostupné z: <http://www.trilobyte.cz/Nase-Produkty/QC-Expert.html>

Přílohy: Pracovní list kolorimetrické stanovení Fe³⁺

Úkol: Kolorimetricky určit množství železa

Pomůcky: 6 zkumavek, 10ml pipeta, 2 ks 50ml odměrných baněk, stříčka, bílý papír, odměrný váleček

Chemikálie: roztok KSCN 0,1 mol/l; roztok železitých iontů Fe³⁺ 0,1 mol/l

Teoretický základ pokusu: v kolorimetrickém stanovení určuje neznámou koncentraci roztoku jeho zabarvení v porovnání s kolorimetrickou srovnávací řadou.

Pracovní postup: Připravte kolorimetrickou srovnávací řadu 5 roztoků postupným ředěním.

1. Z roztoku železitých iontů Fe³⁺ 0,1 mol/l odměřte 5 ml odměrným válečkem a přelijte do 1. zkumavky.
2. Z roztoku o koncentraci 0,1 mol/l železité soli odpipetujte pipetou 10 ml roztoku do 50ml odměrné baňky. Odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po rysku, uzavřete zátkou a důkladně protřepejte, tím se její obsah důkladně promíchá. Tímto krokem jste roztok 50/10, tj. pětkrát zředili → 0,02 mol/l.
3. Odměrným válečkem odměřte 5 ml z připraveného roztoku 0,02 mol/l a přelijte do další zkumavky.
4. Z odměrné baňky opět odpipetujte pipetou 10 ml připraveného roztoku do druhé 50ml odměrné baňky a doplňte jí destilovanou vodou po rysku. Roztok jsme tímto zředili pětkrát → 0,004 mol/l.
5. Odměrným válečkem odměřte 5 ml z připraveného roztoku 0,004 mol/l a přelijte do 3. zkumavky.
6. Stejným postupem pokračujte v ředění tak dlouho, dokud nebudete mít připraveno 5 zkumavek. Poté do každé zkumavky přidejte 5 ml roztoku KSCN a pozorujte barevnou změnu.
7. Do čisté zkumavky odměřte 5 cm³ roztoku o neznámé koncentraci, přidejte 5 ml roztoku KSCN a jeho zabarvení porovnejte se zabarvením kolorimetrické srovnávací řady, nejlépe proti bílému pozadí.

Závěr: Zapište stanovenou koncentraci roztoku a doplňte tabulky na druhé straně pracovního listu.

Zkontrolujte a případně dopište do tabulky barvy používaných roztoků a také počty iontů účastnících se reakce:



Doplňte tabulku a odhadněte podle ní množství železitých iontů ve vzorku:

Zkumavka	Koncentrace železitých iontů [mol/l]	Koncentrace železitých iontů [g/l]	Vzorek
1	0,1	5,59 = 0,1×55,845	
2	0,02	1,12 = 5,59/5	
3	0,004	0,22 = 1,12/5	
4	0,000 8	0,045 =	
5	0,000 _	0,009 0 =	
6	0,000 __	0,004 5 =	