

## UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIE

Molekulová absorpční spektrální analýza je jednou z nejméně propracovaných analytických metod a uplatňuje se v mnoha oblastech, jako jsou analýza léčiv, kontrola složek životního prostředí, klinická analýza nebo kontrola kvality technických výrobků.

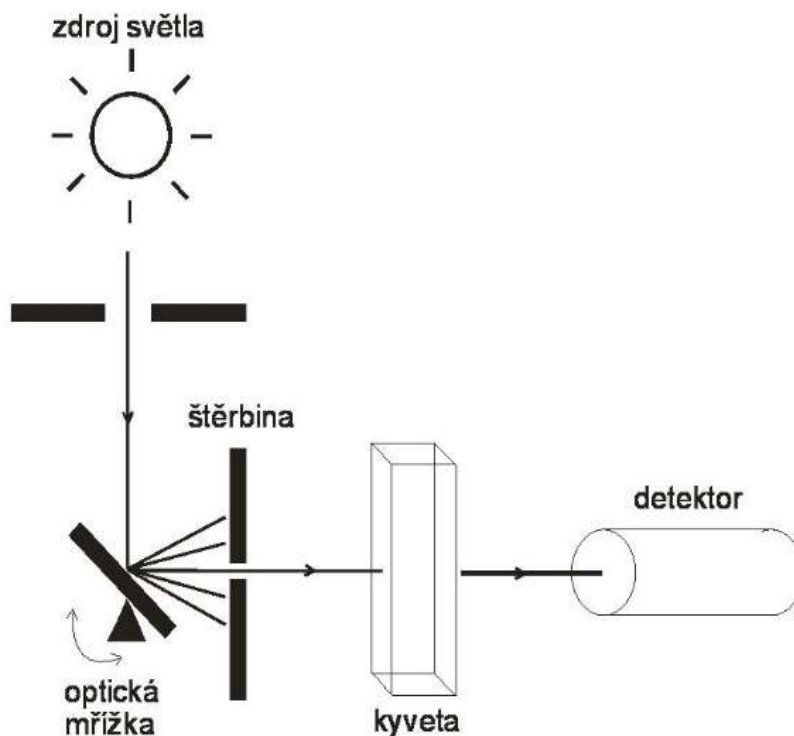
Základem této metody je absorpce zářivé energie molekulami nebo ionty v roztoku. Absorbencí ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) záření (200 až 740 nm) se excituje elektronový systém atomu nebo molekuly. Tato oblast záření se proto nazývá i oblastí elektronových spekter. Molekuly se z excitovaného stavu dostávají do základního stavu deaktivací – ta může být zářivá, spojená s emisí sekundárního záření (využití např. ve fluorescenční analýze), nebo nezářivá (srážkami molekul s jinými částicemi, např. rozpouštědla, nebo vnitromolekulovým mechanismem – zvyšováním vibrační a rotační energie).

V důsledku velkého počtu vibračních a rotačních hladin částic chemické soustavy, je velký počet povolených frekvencí UV-VIS záření, které mohou částice absorbovat, a proto není možné rozlišit jednotlivé blízké přechody (absorpční čáry). Molekulová absorpční spektra jsou proto pásová. Vlnové délky maxim absorpčních pásů odpovídají nejpravděpodobnějším přechodům.

### Instrumentace

Zařízení na spektrofotometrické měření v UV a VIS oblasti mají tyto hlavní části (Obr. 1):

- Zdroj světla – zpravidla spojitého záření v sledované oblasti vlnových délek; deuteriová výbojka pro UV oblast, wolframová nebo halogenová žárovka pro viditelnou oblast
- Monochromátor – skládá se z disperzního zařízení (hranol, mřížka), vstupní a výstupní štěrbin, a pomocných částí (čochky, kolimátor)
- Kyvety na vzorek – skleněné pro oblast záření 350-2500 nm, křemenné pro oblast 200-4000 nm
- Detektor (např. fotoelektrický) s digitálním záznamovým zařízením, může být propojen s PC



Obr. 1 Schéma jednoduchého spektrofotometru

## Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza je založena na platnosti Lambert-Beerova zákona, podle něhož je hodnota absorbance  $A$  při určité vlnové délce přímo úměrná molární koncentraci  $c$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ]:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

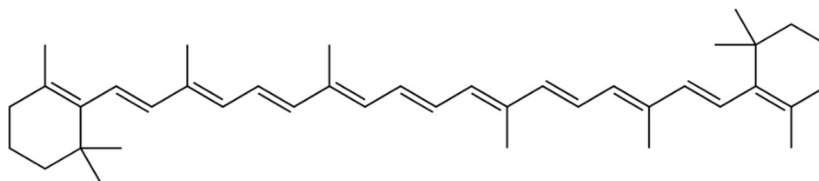
kde  $\varepsilon$  = molární absorpční koeficient [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ] a  $d$  = tloušťka absorbující vrstvy [cm]

Při kvantitativní analýze se obvykle měří při vlnové délce absorpčního maxima, kde je měřená absorbance nejvyšší. Vyhodnocování výsledků se provádí metodou kalibrační křivky, proměřením absorbancí srovnávacích roztoků o známé koncentraci nebo metodou standardních přídavek.

Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že kalibrační závislost bude mít lineární průběh, avšak platnost zákona je omezena řadou odchylek způsobených např. změnou chemické rovnováhy v roztoku v důsledku měnící se koncentrace nebo nedostatečnou monochromaticností záření.

## Karotenoidy

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy mnoha různých druhů ovoce a zeleniny. Většina karotenoidních látek se řadí mezi terpenoidy. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb. Karotenoidy reagují s volnými radikály, a proto působí jako antioxidanty. Hlavním zástupcem této skupiny látek je  $\beta$ -karoten (Obr. 2).  $\beta$ -karoten je nejvýznamnějším provitaminem A. Je převládajícím pigmentem v mrkvi, meruňkách, mangu, ale také v listové zelenině, kde je jeho přítomnost maskována chlorofylovými barvivy. Široce využívanou technikou pro stanovení obsahu  $\beta$ -karotenu v potravinách je UV-VIS spektrofotometrie.



Obr. 2 Struktura  $\beta$ -karotenu

---

## ÚKOL: SPEKTROFOTOMETRICKY STANOVIT OBSAH $\beta$ -KAROTENU V MRKVI

### Přístroje a pomůcky:

UV-VIS spektrofotometr, spektrofotometrické kyvety (1 cm), 10 odměrných baněk (10 ml), pipety, dělicí nálevka (500 ml), filtrační nálevka, kádinky, odměrná baňka (50 ml)

### Chemikálie:

dichroman draselný p.a., ethanolový roztok NaOH, kyselina chlorovodíková (1:1), *n*-heptan p.a., bezvodý síran sodný p.a.

### Princip:

$\beta$ -karoten se po uvolnění ethanolovým roztokem hydroxidu a po extrakci do organické fáze stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Obsah  $\beta$ -karotenu v mrkvi se určí metodou kalibrační křivky proměřením absorbancí standardních roztoků dichromanu draselného.

### Pracovní postupy:

**Příprava ethanolového roztoku hydroxidu draselného:** 10 g NaOH rozpustíme v 20 ml vody, doplníme na 100 ml 96% ethanolom a promícháme. Roztok připravujeme vždy čerstvý.

**Příprava standardního roztoku dichromanu draselného:** 1,25 g dichromanu draselného, předem vysušeného při 105 °C (2 hodiny), převedeme do 1000 ml odměrné baňky a rozpustíme v destilované vodě. Přidáme asi 5 ml koncentrované kyseliny sírové, doplníme vodou po rysku a promícháme. 1 ml tohoto roztoku odpovídá 0,0080 mg  $\beta$ -karotenu.

### Příprava kalibračních roztoků

Do 10 odměrných baněk o objemu 10 ml diferencovaně odpipetujeme určené množství standardního roztoku dichromanu draselného, doplníme vodou po rysku a promícháme. Při navážce 1 g vzorku odpovídají tyto roztoky koncentracím uvedeným v tabulce:

<b>Dichroman draselný [ml]</b>	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
<b>Koncentrace <math>\beta</math>-karotenu [mg/kg]</b>	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80

### Zpracování vzorku

Do kádinky odvážíme 1 g nastrouhané mrkve a přidáme 20 ml ethanolového roztoku NaOH. Po promíchání tyčinkou kádinku se směsí necháme 10 minut stát. Poté přidáme 20 ml HCl (1:1) a opět promícháme. Obsah kádinky kvantitativně převedeme na filtr a promýváme acetonem tak dlouho, až je nerozpustná část zcela bezbarvá. Filtrát kvantitativně převedeme do dělicí nálevky (500 ml), přidáme 40 ml heptanu a doplníme do  $\frac{3}{4}$  objemu vodou. Kroužením (netřepat) obsah promícháme. Po několikaminutovém stání vodnou fází až na malý zbytek vypustíme. Do dělicí nálevky přilijeme 20 ml ethanolového roztoku NaOH (rozhraní obou vrstev se vyčeří) a dělicí nálevku doplníme opět na  $\frac{3}{4}$  objemu vodou. Kroužením obsah promícháme a po usazení vodnou fází opět odpustíme. Celý postup opakujeme ještě 2-3x, až je vodně ethanolová fáze bezbarvá. Heptanový extrakt, přesušený bezvodým síranem sodným, převedeme do 50 ml odměrné baňky a doplníme heptanem po rysku.

### Spektrofotometrické měření

Kalibrační řadu standardních roztoků dichromanu draselného proměříme na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm proti destilované vodě. Při stejné vlnové délce rovněž proměříme vzorek proti čistému heptanu. Obsah  $\beta$ -karotenu v mg/kg mrkve přímo odečteme z kalibrační křivky.

---

### OTÁZKY:

1. Co je to UV-VIS spektrofotometrie a jaké je její využití?
  2. Jaký je princip této metody?
  3. Vysvětlete pásový charakter molekulových spekter.
  4. V jaké oblasti vlnových délek měříme UV a VIS záření?
  5. Napište Lambert-Beerův zákon a popište jednotlivé veličiny.
  6. Definujte veličiny absorbance a transmitance.
  7. Jaké mohou být příčiny odchylek od Lambert-Beerova zákona?
  8. Čemu vděčí  $\beta$ -karoten za svou barevnost a kde všude ho můžeme nalézt?
  9. Jakou funkci plní monochromátor a jaké druhy monochromátorů známe?
  10. Jakou chemikálii použijeme pro konstrukci kalibrační závislosti na stanovení  $\beta$ -karotenu a proč je možné ji použít?
-

## REFERENCE

A. Hercegová a kol.: Praktikum z analytickej chémie. Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, 2011.

<https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometr#/media/Soubor:Spektrofotometr.jpg>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-carotene-2D-skeletal.png>

P. Javorský a kol.: Chemické rozbory v zemědělských laboratořích, Ministerstvo zemědělství a výživy ČR.

A. K. Biswas, J. Sahoo, M. K. Chatli: LWT - Food Science and Technology, 44 (2011) 1809-1813.

J. Velíšek, J. Hajšlová: Chemie potravin II, 3. vydání. OSSIS, Tábor 2009, str. 512.