

# Kolik železa spolykáme

pracovní návod s metodickým komentářem pro učitele připravil T. Feltl

chemie

14

úloha číslo

## Cíle

Seznámení se s teoretickým a praktickým základem spektrofotometrických metod na příkladu stanovení koncentrace iontů železa v tabletě a v pitné vodě.

### Podrobnější rozbor cílů

- Seznámit se s teorií (Lambertův-Beerův zákon, absorbance, popř. transmittance).
- Zvládnout zjistit, jaké je absorpční spektrum stanovené látky.
- Vybrat optimální vlnovou délku pro další měření absorbance.
- Připravit kalibrační roztoky a zjistit jejich absorbanci.
- Sestrojit kalibrační křivku.
- Stanovit koncentraci iontů Fe v neznámých vzorcích.

## Zadání úlohy

Zjistěte, jaká je koncentrace iontů železa v multivitaminové tabletě s obsahem Fe a v běžné „kohoutkové vodě“.

### Technická úskalí, tipy a triky

Použitá komplexotvorná reakce je velice citlivá pro stanovení přítomnosti iontů  $\text{Fe}^{3+}$ , nikoli však pro ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , které mohou být v roztoku také obsaženy (časté např. v případech podzemních vod obohacených o ionty železa). Je proto nezbytné před provedením barevné reakce ionty  $\text{Fe}^{2+}$  zoxidovat na  $\text{Fe}^{3+}$ . Postup v této úloze zahrnuje i krok vedoucí právě k oxidaci iontů  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ .

## Pomůcky

spektrofotometr PASCO Amadeus s příslušenstvím (SE-7183), PASCO SPARK, popř. počítač se SW SPARKvue či Xplorer GLX (s instalovaným klíčem pro použití s PASCO Amadeus, odměrná baňka 25 ml (6×), odměrná baňka 50 ml (2×), odměrná baňka 100 ml, kádinka 50 ml, kádinka 400 ml, pipeta 1–5 ml, navažovací lodička, váhy (rozlišení alespoň 0,001 g), třecí miska s tloučkem, laboratorní lžička, stříčka s destilovanou vodou, roztoky a chemikálie (dest. voda, 20% roztok  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , 10% roztok  $\text{HNO}_3$ , 2% roztok  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), vzorek multivitaminového/minerálního přípravku s uvedeným obsahem iontů Fe, vzorek „kohoutkové vody“, popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

### Zařazení do výuky

Experiment je vhodné zařadit v rámci učiva o Fe a jeho sloučeninách (včetně komplexních sloučenin), o roli Fe v živých organizmech (biochemie), ale např. také v rámci analytické chemie či obecné chemie (roztoky, koncentrace).

ZŠ: demonstrace; SŠ: lab. cvičení

### Časová náročnost

Dvě vyučovací hodiny (2 × 45 min).

### Návaznost experimentů

Pro tuto úlohu je nutné zvládnutí práce v laboratoři (vážení, příprava roztoků).

### Mezipředmětové vztahy

biologie (role Fe v organismu); zeměpis (geologie – minerály, rudy s obsahem Fe); výtvarná výchova (barevné pigmenty – sloučeniny Fe); dějepis (nástěnné jeskynní malby – barviva s obsahem Fe)

### Technická úskalí, tipy a triky

Alternativně je možné použít spektrofotometr Amadeus přímo s počítačem a SW **Quantum**. Tento software umožňuje nejen detailnější nastavení spektrofotometru, ale také obsahuje tzv. „koncentračního průvodce“.

## Teoretický úvod

Jistě jste si všimli, že koncentrace barevných látek rozpuštěných ve vodě se dá odhadnout podle intenzity zbarvení. Pohledem do šálku čaje tak můžeme odhadnout, zda bude čaj „silný“ či „slabý“. Co se v šálku čaje odehrává? Procházející světlo interaguje s rozpuštěnou látkou a určitá část světla (o konkrétních vlnových délkách) je pohlcena neboli **absorbována**. Zbylé vlnové délky, které čajem projdou, pak ve výsledku odpovídají za barvu čaje, kterou vidíme. Čím více je barevné látky rozpuštěno, tím intenzivnější zbarvení roztoku vnímáme. Tohoto faktu využijeme při našem laboratorním bádání – půjde o tzv. **spektrofotometrické stanovení koncentrace** určité látky.

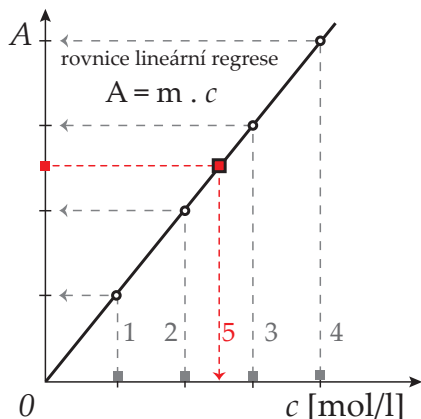
Použitá spektrofotometrická metoda je založena na **Lambertově-Beero-vě zákonu**, který definuje vztah mezi absorpcí světla a vlastnostmi určité látky, kterou světlo prochází. Tato závislost je vyjádřena matematicky následujícím vztahem:

$$A_{\lambda} = E_{\lambda} \cdot l \cdot c_M, \quad (1)$$

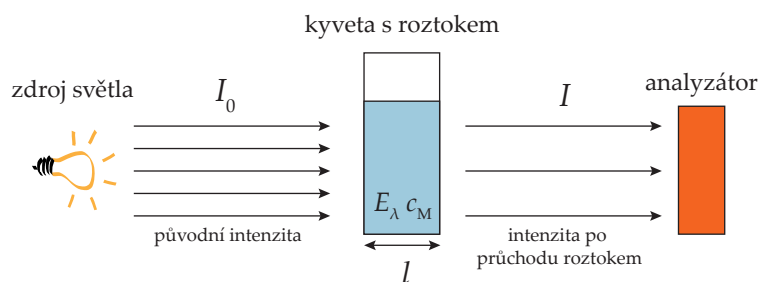
kde  $A_{\lambda}$  je absorbance světla,  $E_{\lambda}$  absorpční koeficient dané látky,  $l$  je dráha světla uražená v roztoku (délka dráhy),  $c_M$  je koncentrace látky v roztoku. Absorpční koeficient  $E_{\lambda}$  nabývá různých hodnot a je specifický pro danou rozpuštěnou látku. Jeho stanovení je většinou provedeno experimentálně. Z tohoto zákona je patrná přímá závislost absorbance světla látkou na její **koncentraci** ( $c_M$ ) v roztoku a na **tloušťce** prostředí ( $l$ ), ve kterém je roztok látky umístěn (**kyveta**). Známe-li tedy  $l$  a  $E_{\lambda}$ , můžeme stanovit koncentraci látky v roztoku na základě množství absorbovaného světla (**absorbance**).

### Transmittance

V případě semináře (vyšší ročníky) je vhodné zavést podrobněji také pojmy jako transmittance (viz obr. 1).



Obr. 2: Určení koncentrace dané látky v neznámém vzorku pomocí sestrojené kalibrační přímky. U roztoků se známou koncentrací (1–4) je stanovena absorbance a ze získaných bodů sestavena kalibrační křivka. U roztoku s neznámou koncentrací (5) je na základě zjištěné absorbance obráceně stanovena koncentrace. V praxi se využívá lineární regrese (proložení přímky kalibračními body) a následné dopočítání koncentrace z rovnice lineární regrese.



$$T_{\lambda} - \text{transmittance} \quad T = I/I_0 \quad (2)$$

$$A_{\lambda} - \text{absorbance} \quad A_{\lambda} = -\log(T) = E_{\lambda} \cdot l \cdot c_M \quad (3)$$

Obr. 1: Schéma průchodu světla kyvetou. Transmittance vyjadřuje úbytek světla (vzorec č. 2), vzájemný vztah transmittance a absorbance je ve vzorci č. 3.

Namísto přímého výpočtu se v praxi častěji využívá určení koncentrace s využitím **kalibrační křivky**, při kterém není třeba znát konstantu  $E_{\lambda}$  ani tloušťku kyvety  $l$ . Experimentální postup je v takovém případě následující:

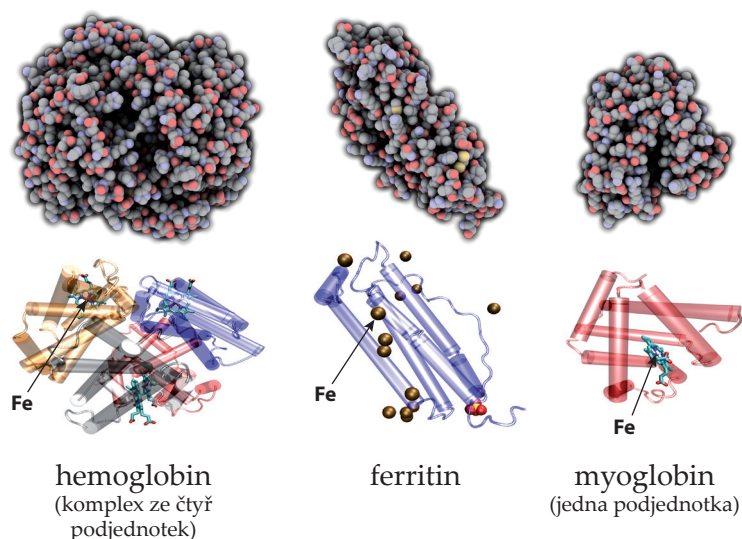
- Experimentátor stanoví absorbance několika roztoků o známé koncentraci stanovované látky.
- Tyto absorbance jsou brány jako tzv. absorbance kalibračních roztoků (standardů) a jsou použity pro stanovení kalibrační křivky (graf závislosti absorbance na koncentraci, obr. 2).
- Pomocí sestrojené kalibrační křivky je následně možné určit neznámou koncentraci (viz graf na obr. 2).

Principem našeho stanovení je komplexotvorná reakce iontů  $\text{Fe}^{3+}$  s ionty  $\text{SCN}^-$ . Vzniká tak intenzivně červený komplex, který, je-li dostatečně koncentrovaný, barvou připomíná krev:



Železo je v podobě železnatých a železitých iontů běžně přítomno ve vodě. Množství těchto iontů ovšem značně kolísá. V **povrchových vodách** se u nás pohybuje koncentrace iontů Fe většinou v rozmezí 0,01–0,4 mg/l. Najdeme ale prameny, kde obsah železa dosahuje značných koncentrací. Pokud je obsah iontů železa vyšší než 10 mg/l, zařazujeme takovou vodu mezi **minerální vody** se zvýšeným obsahem železa (železnaté či železité). V pitné vodě se jako mezní přípustná hodnota uvádí koncentrace 0,2 mg/l. Zhruba od koncentrace 0,5 mg/l se již přítomnost iontů Fe projevuje **chuťově** jako tzv. „železitá příchuť vody“. Pokud si zajedete do Mariánských lázní a ochutnáte vodu z **Rudolfova pramene**, ucítíte „železitou“ chuť velice intenzivně – koncentrace iontů železa je zde kolem 16 mg/l! V bezkyslíkatých podzemních vodách (popř. u dna hlubších nádrží) se železo vyskytuje ve formě  $\text{Fe}^{2+}$  iontů a až na povrchu je vzdušným kyslíkem oxidováno na ionty  $\text{Fe}^{3+}$ . Oxidaci iontů  $\text{Fe}^{2+}$  mohou také jako **zdroj energie** využívat některé bakterie (železité bakterie). Přeměna  $\text{Fe}^{2+}$  iontů na  $\text{Fe}^{3+}$  vede v obou případech ke tvorbě železitých sloučenin, např.  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , které tvoří typické **rezavě-hnědé sraženiny**. To je také nejčastějším indikátorem zvýšené koncentrace železa ve vodě.

Železo je významným **biogenním prvkem**, který je nedílnou součástí např. hemoglobinu (červeného krevního barviva), myoglobinu, enzymů (cytochromoxidázy, peroxidázy atd.), zásobních proteinů (ferritinu) – obr. 3 a 4.



Obr. 3: Molekuly obsahující Fe: hemoglobin, ferritin, myoglobin

Celkové množství „železa“ v těle člověka je něco kolem 3–4 g. Doporučená denní dávka „železa“ činí 20 mg, přičemž hlavním zdrojem je maso, vnitřnosti, ale také třeba luštěniny. Dlohodobý příjem vysokých koncentrací „železa“ ve formě  $\text{Fe}^{3+}$  iontů ve vodě není pokládán za optimální.

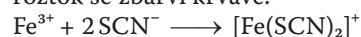
## Motivace

Základním předpokladem pro pochopení použité metody je demonstrace vztahu mezi intenzitou zbarvení určitého roztoku a koncentrací rozpuštěné látky. K tomu můžeme využít libovolný roztok barevné látky (modrá skalice, manganistan, čaj, ...), který před žáky naředíme 1:1. Necháme pak stát původní a zředěný roztok vedle sebe. Zeptáme se, který z roztoků obsahuje více „barviva“ a následně rozvineme diskusi ohledně zjištění skutečné koncentrace daného barviva v roztoku. Tím se dostaneme k teoretickému úvodu spektrofotometrického stanovení koncentrace.

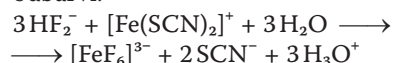
### Další hrátky s komplexem Fe

Vzniklé zbarvení je možné odstranit přidávkem fluoridu či hydrogenfluoridu. Ke zpětnému zbarvení dojde přidáním hlinité soli. Tyto reakce se někdy používají v různých varietních a kouzelnických vystoupeních.

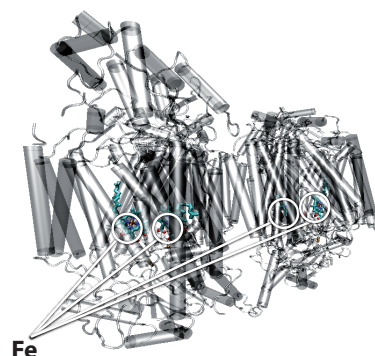
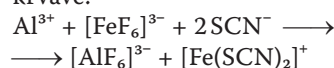
a) Železitá sůl reaguje s thiokyanatanem na dithiokyanatoželezitou sůl – roztok se zbarví krvavě:



b) Hydrogenfluorid reaguje s dithiokyanatoželezitou solí na hexafluoroželezitan a thiokyanatan – roztok se odbarví:



c) Hlinitá sůl reaguje s hexafluoroželezitanem a thiokyanatanem na hexafluorohlinitan a dithiokyanatoželezitou sůl – roztok se znovu zbarví krvavě:



Obr. 4: Model enzymu cytochrom c oxidázy

## Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Většina chemikálií v tomto praktickém cvičení je vysoce hořlavá. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť, a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

$\text{NH}_4\text{SCN}$  (Xn, R 20/21/22-32-52/53, S 13-61)

$\text{HNO}_3$  (O, C, R 8-35, S 23-26-36-45)

$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (O, Xn, R 8-22-36/37/38-42/43, S 22-24-26-37)

## Příprava úlohy

**Spektrofotometr** je citlivé zařízení vyžadující odpovídající zacházení. Je nezbytné chovat se k němu šetrně – vyvarovat se zbytečných otřesů, přílišného ohýbání světlovodičů (nebezpečí zlomení skleněného vlákna), znečištění měřicí cely (např. vyteklým roztokem, krystalky látky atd.). Úloha umožňuje pracovat paralelně na několika částech. Ideální jsou **tříčlenné pracovní skupiny**. První žák pracuje na bodu č. 4 – **Příprava HW a nastavení SW**. Druhý žák připravuje **standardní roztok  $\text{Fe}^{3+}$**  – bod č. 1, a následně pokračuje bodem č. 2 – **Příprava kalibračních roztoků**. Třetí student pak pracuje na bodu č. 3 – **Příprava vzorku**. Dva následující body (tedy 5–6) pak řeší všichni společně.

## Postup práce

Úlohu můžeme rozdělit do několika kroků:

### 1) Příprava standardního roztoku $\text{Fe}^{3+}$

- a) Připravte standardní roztok, který bude obsahovat 25 mg Fe na 1 l. (Tento roztok připravte nejlépe z dodekahydrátu síranu železitoamonného  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , který se pro svou stálost používá jako standardní sloučenina železa.

$M_r(\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}) = 482,19$ ;  $A_r(\text{Fe}) = 55,85$

Pro přípravu 100 ml roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  o obsahu 0,025 mg/ml Fe je třeba navážit přesně přibližně 21,58 mg  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .)

- b) Navážené množství rozpusťte s využitím 100 ml odměrné baňky a dopočítejte skutečnou koncentraci připraveného roztoku.
- c) Vzniklý roztok použijte v dalším kroku pro přípravu kalibračních roztoků.

### Pozor na světlovodiče

Při použití světlovodného kabelu je třeba dbát na ochranu jeho koncových částí i šroubovacích míst pro napojení na spektrofotometru a na měřicí cele (k ochraně slouží gumové čepičky).

### Navazování a výpočty

Pokud nemáte dostatečně přesné váhy, použijte odměrnou baňku o objemu 1000 ml.

K přípravě kalibračního roztoku může být použita i jiná železitá, ve vodě dobře rozpustná, stálá sůl.

Je vhodné zadat výpočet navážky jednotlivým studentským pracovním skupinám a následně výsledky porovnat. Stejně tak může být početním úkolem výpočet ředění pro přípravu kalibrační řady.



Obr. 5: Pracovní místo před zahájením přípravy kalibračních roztoků

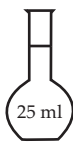
**2) Příprava kalibračních roztoků**

- Do šesti 25 ml odměrných baněk odpipetujte 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml standardního roztoku  $\text{Fe}^{3+}$ .
- Přidejte 5 ml zředěné  $\text{HNO}_3$  (10%), 1 ml roztoku  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 3 ml 20% roztoku  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .
- Každou odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po rysku a promíchejte několikanásobným otočením baňky.
- Pokud jste při přípravě standardního roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  navážili přesně 21,58 mg  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , získáte jeho ředěním roztoky o koncentraci 0,001; 0,002 ... 0,005 mg/ml. (První roztok, který neobsahuje  $\text{Fe}^{3+}$ , je srovnávací.) Pokud jste přesně navážili jiné množství standardu, musíte koncentrace vzniklé naředěním standardního roztoku dopočítat!

pipetováno [ml] (zásobní roztoky)	číslo kalibračního roztoku					
	1	2	3	4	5	6
⊙ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$	0	1	2	3	4	5
⊙ $\text{HNO}_3$	5	5	5	5	5	5
⊙ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	1	1	1	1	1	1
⊙ $\text{NH}_4\text{SCN}$	3	3	3	3	3	3
výsledná koncentrace Fe [mg/ml]	0	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

↓

$\text{H}_2\text{O}$  ← doplnit dest. vodou do 25 ml



Obr. 6: Schéma přípravy kalibračních roztoků

**3) Příprava vzorku**

- Ve třetí misce rozetřete tabletu, ve které budete stanovovat obsah Fe. V případě, že je tableta přímo určena k rozpuštění, můžete tento krok vynechat.
  - Z tablety připravte v odměrné baňce 100 ml roztoku.
  - Do 25 ml odměrné baňky odpipetujte 10 ml vašeho vzorku.
  - Přidejte 5 ml zředěné  $\text{HNO}_3$  (10%), 1 ml roztoku  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 3 ml 20% roztoku  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .
  - Odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po rysku a promíchejte několikanásobným otočením baňky.
  - Stejným způsobem zpracujte také vzorek vody „z kohoutku“.
- 4) **Nastavení HW a SW**
- Tato část předchází vlastnímu měření a je popsána v následujících samostatných kapitolách „Nastavení HW a SW“ a „Příprava měření“.
- 5) **Spektrofotometrická měření**
- Tato část je popsána v následující kapitole „Vlastní měření“.
- 6) **Sestrojení kalibrační přímky a stanovení neznámé koncentrace**
- Tato část je popsána v kapitole „Analýza naměřených dat“.

**Nastavení HW a SW**

- Pro všechna následující měření je třeba připravit spektrofotometr AMADEUS. Zapojení a nastavení proveďte dle obrázku č. 7 na následující straně.

**Železnaté a železité ionty**

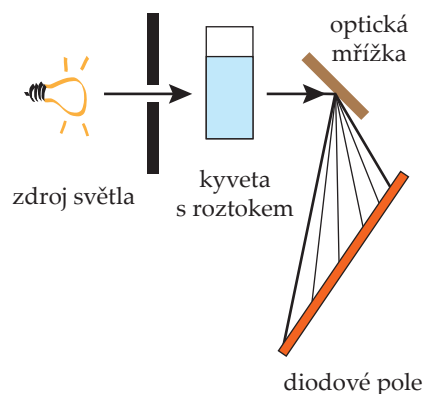
Pokud nejsou ve vašich vzorcích obsaženy ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , není nutné přidávat ke vzorkům roztok  $\text{HNO}_3$  a  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Stejně tak je možné tento krok vypustit v případě, že nemáte dostatek času a potřebujete práci žákům zjednodušit. Na druhou stranu je možné záměrně připravit roztoky obsahující různý poměr iontů  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Některé pracovní skupiny pak mohou provést postup bez provedení oxidace železnatých iontů a jiné včetně oxidace iontů železnatých na železité. Porovnání výsledků jednotlivých skupin pak odhalí přítomnost železnatých iontů v původním vzorku.

**Další vzorek k analýze**

Zajímavé může být zařazení třetího vzorku, který připravíme tak, že necháme v kádince s destilovanou vodou zrezivět např. hřebík či jiný železný předmět. Takto získaný roztok můžete také podrobit testování.

**Diodové pole?**

Spektrofotometr Amadeus disponuje detektorem typu diodového pole (diode array). Tím je umožněno současné sledování absorpance v rozsahu vlnových délek zhruba od 350 do 800 nm. Princip tohoto detektoru je na následujícím obrázku.

**Soubory do dataloggeru SPARK**

Uvedené soubory je třeba do všech dataloggerů SPARK nahrát před začátkem praktického cvičení.

V prvním souboru je pouze jedna stránka, která obsahuje základní instrukce k proměření absorpčního spektra a pole pro zapsání výsledné hodnoty. Těto hodnoty využijete následně ve druhém souboru, kde je předpřipraveno několik stránek: KALIBRACE, GRAF KALIBRACE, MĚŘENÍ NEZNÁMÝCH VZORKŮ. Soubor je opět doplněn instrukcemi a prostorem pro zápis výsledných hodnot.

Alternativně je možné použít spektrofotometr Amadeus přímo s počítačem a SW Quantum. Tento software umožňuje nejen detailnější nastavení spektrofotometru, ale také obsahuje tzv. „koncentračního průvodce“.

**Nezhasínejte žárovku**

Není vhodné odpojovat elektrický zdroj. Nejen že tím snižujete životnost žárovky, ale po zapnutí vždy nějakou dobu trvá, než se výkon žárovky ustálí.



Obr. 7: Fotografie zapojení spektrofotometru

- 2) Ke svému počítači (netbooku) připojte USB kabel (konektor A) dodávaný se spektrofotometrem Amadeus. Druhou stranu kabelu připojte ke spektrofotometru (konektor B).
- 3) Dále propojte světlovodičem analyzátor se zdrojem s měřicí celou. Dbejte na to, abyste propojovací místa neznečistili.
- 4) Pomocí přiloženého adaptéru připojte zdroj elektrického napětí k měřicí cele se světelným zdrojem. Pokud je vše v pořádku, je šachtou měřicí cely vidět rozsvícené světlo.

**Příprava měření**

- 1) V první části musíte zjistit, jaké je **absorpční maximum** vašeho barevného komplexu. K tomu budete potřebovat soubor **ch14-spektrofotometrie\_Fe-sablona\_max.spk**. (Soubor je dostupný na portálu [www.expoz.cz](http://www.expoz.cz).)
- 2) V další části budete proměřovat absorpance kalibračních roztoků. K tomu využijete soubor **ch14-spektrofotometrie\_Fe-sablona-kalibrace+vzorky.spk**. (Soubor je dostupný na portálu [www.expoz.cz](http://www.expoz.cz).)
- 3) V rámci výše uvedeného souboru provedete také proměření absorpance vašich neznámých vzorků.

**Vlastní měření a záznam dat**

- 1) **Proměření absorpčního maxima komplexu Fe**
  - a) Zkontrolujte, zda je spektrofotometr PASCO Amadeus korektně zapojen.
  - b) Otevřete si soubor **ch14-spektrofotometrie\_Fe-sablona\_max.spk**.
  - c) Na datalogetu PASCO SPARK klikněte na tlačítko *Nástroje experimentu*. (Nachází se vpravo dole.)
  - d) Klikněte na tlačítko *Konfigurace senzorů* a pokračujte tlačítkem *Upravit vlastnosti Spectrometru*.
  - e) Z nabídky vyberte *Referenční čáry*. Do měřicí cely zasuňte černý hranolek, který zabrání průchodu světla k detektoru. Klikněte na tlačítko *Uložit tmavou*. Tím jste si uložili tzv. „temné spektrum“.
  - f) Vyjměte černý hranolek a vložte kyvetu s destilovanou vodou. Klikněte na tlačítko *Uložit referenci*.

- g) Klikněte na tlačítka *Uložit* a následně *Hotovo*.
- h) Nyní kyvetu naplňte prostředním kalibračním roztokem a vložte ji do měřicí cely.
- i) Stiskněte tlačítko *Start* a vyčkejte zobrazení absorpčního spektra. Poté stiskněte tlačítko *Stop*.
- j) Zobrazte *Nástroje grafu* a pomocí *Výběru datové oblasti (šipka)* vyberte bod s nejvyšší hodnotou absorbance na křivce v rozmezí 450–700 nm.
- k) Hodnotu zobrazenou nahoře jako **x**: --- si poznamenejte v pravé spodní části (nástroj *Klávesnice*) jako absorpční maximum.
- l) Soubor si uložte pod jiným názvem pro případný pozdější tisk protokolu.
- 2) **Zjištění absorbancí kalibračních roztoků**
- a) Zkontrolujte, zda je spektrofotometr PASCO Amadeus korektně zapojen.
- b) Otevřete si soubor **ch14-spektrofotometrie\_Fe-sablona-kalibrace+vzorky.spk**.
- c) Proveďte nastavení spektrofotometru stejně jako v předchozích bodech c)–f) v části „Proměření absorpčního maxima komplexu Fe“.
- d) Z nabídky dále vyberte *Akvizice času* a změňte hodnotu *Vlnová délka* na hodnotu zjištěného absorpčního maxima.
- e) Klikněte na tlačítka *Uložit* a následně *Hotovo*.
- f) Nyní kyvetu naplňte nejméně koncentrovaným kalibračním roztokem a vložte ji do měřicí cely. Stiskněte tlačítko *Start*. Po ustálení hodnoty stiskněte tlačítko *Stop*. Postup opakujte se všemi kalibračními roztoky.
- g) Klikněte na tlačítko *Další stránka*. Pokud jste pracovali správně, uvidíte sestrojenou kalibrační křivku.
- 3) **Zjištění absorbancí roztoků neznámých vzorků**
- a) Měřením vzorků s neznámou koncentrací iontů Fe navažte ihned na předchozí část.
- b) Klikněte na tlačítko *Další stránka*. Zobrazí se třetí stránka, kterou použijete pro odečtení hodnot absorbancí vzorků.
- c) Naplňte kyvetu vzorkem a stiskněte tlačítko *Start*. Po ustálení hodnoty stiskněte tlačítko *Stop*. Postup opakujte se všemi neznámými vzorky.
- d) Hodnota absorbance neznámého vzorku by měla ležet zhruba uprostřed kalibrační křivky. Pokud tomu tak není a absorbance vzorku je příliš velká, je třeba vzorek naředit.
- e) Výsledný soubor si uložte pod jiným názvem pro případný pozdější tisk protokolu.

## Analýza naměřených dat

### Sestrojení kalibrační přímky a stanovení neznámé koncentrace

- Z naměřených absorbancí kalibračních roztoků vytvořte kalibrační křivku, tzn. závislost absorbance na obsahu/koncentraci ionů železa.
- Jednotlivé body kalibrační křivky proložte přímkou lineární regrese, jejíž rovnici spolu s grafem zaznamenejte do protokolu.
- Z hodnot absorbance neznámých vzorků pomocí kalibrační křivky zpětně určete obsah železa v těchto vzorcích. Využijte k tomu rovnici regresní přímky. (Použit můžete přímo křivku z dataloggeru SPARK < druhá strana > – u této křivky jsou schválně prohozeny osy  $x$  a  $y$ , čímž získáte rovnici regresní přímky v takovém stavu, že pouze dosadíte naměřenou absorbanci za  $x$ .)

#### Kalibrace a vyhodnocení

K vyhodnocení výsledků je možné žákům poskytnout soubor **ch14-spektrofotometrie\_Fe-vypocty.xlsx**. (Tento soubor je dostupný na portálu [www.expoz.cz](http://www.expoz.cz).)

**Hodnocení výsledků**

Popsaná metoda je velice citlivá a umožňuje stanovit skutečně malé koncentrace iontů Fe. Pokud žáci pracovali správně, měli by se přiblížit běžným udávaným hodnotám jak u vitamínového přípravku, tak u „kohoutkové vody“. Musíte počítat s tím, že hodnota u „kohoutkové vody“ může být v různých regionech značně odlišná, a to v souvislosti s použitým vodním zdrojem.

Případné nepřesnosti jsou nejčastěji žáky zaneseny v průběhu ředění kalibračních roztoků. Problémem může být také použitá destilovaná (deionizovaná) voda znečištěná ionty Fe.

**Syntéza a závěr**

Na závěr je vhodné žákům shrnout:

- Jaký je význam Fe pro náš organizmus.
- Spektrofotometrie – princip, postupy, příklady.
- Co je to absorpční spektrum.
- Lambertův-Beerův zákon – definice, vzorec, vysvětlení.
- Co znamená kvantifikace metodou kalibrační křivky?
- Lineární regrese – co to je, jak se sestrojí, jaké je její využití.
- Jaké množství iontů Fe povoluje norma pro pitnou vodu.
- Vyhověl váš vzorek „kohoutkové vody“ této normě?
- Jaká je doporučená denní dávka Fe (pro dospělého, pro dítě).
- Obsahuje studovaná tableta vitamínového přípravku doporučenou denní dávku Fe?

- 4) Vypočítejte, jaké koncentrace Fe jsou v původních vzorcích – vitamínovém/minerálním přípravku a „kohoutkové vodě“. Nezapomeňte korektně započítat všechna případná ředění, která jste při zpracování vzorků provedli.

**Hodnocení práce žáků**

- Nastudovali si žáci teorii předem?
- Sestavili a použili žáci měřicí aparaturu správně?
- Postupovali žáci korektně podle pracovního návodu?
- Porozuměli žáci uvedené problematice?
- Vypracovali žáci správně své pracovní listy?
- Získali žáci předpokládané výsledky?
- Interpretovali žáci výsledky správně?
- Shrnuli žáci nové poznatky v závěru?

**Informační zdroje**

- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie>
- *Educational Spectrometer system: Software and Application Guide* (PDF manual, <http://www.spectroscopy101.com>)
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDelezo>
- GREENWOOD, N a Alan EARNSHAW. *Chemie prvků*. 1. vyd. Praha: Informatorium, 1993. ISBN 80-85427-38-9.
- Vyhláška č. 252/2004 Sb (dostupná např. na adrese <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-252-2004-sb-kterou-se-stanovi-hygienicke-pozadavky-na-pitnou-a-teplou-vodu-a-cetnost-a-rozsah-kontroly-pitne-vody>)