

# Derivační spektrofotometrie a rozklad absorpčního spektra

## Teorie:

Derivační spektrofotometrie, využívající derivace absorpční křivky, je obecně používanou metodou pro zvýraznění detailů průběhu záznamu, ke zvýraznění překrývajících se pásů v absorpčních spektrech, k přesnému odečtu vlnové délky maxima absorpčního pásu, pro kvantitativní a kvalitativní analýzu multikomponentních směsí a pro zlepšení detekčního limitu.

Základem, z něhož se vychází, je opět Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \log \frac{\Phi}{\Phi_0} = \varepsilon c l$$

Derivujeme-li tento vztah podle  $\Phi$  ( $\Phi_0$  je konstanta), dostaneme:

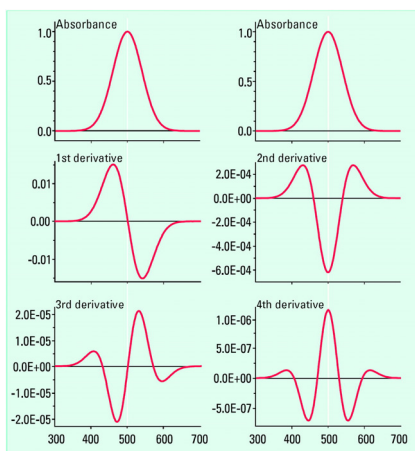
$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{2,303}{\Phi_0} \frac{1}{\Phi} d\Phi = c l \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

a pro vyšší derivaci:

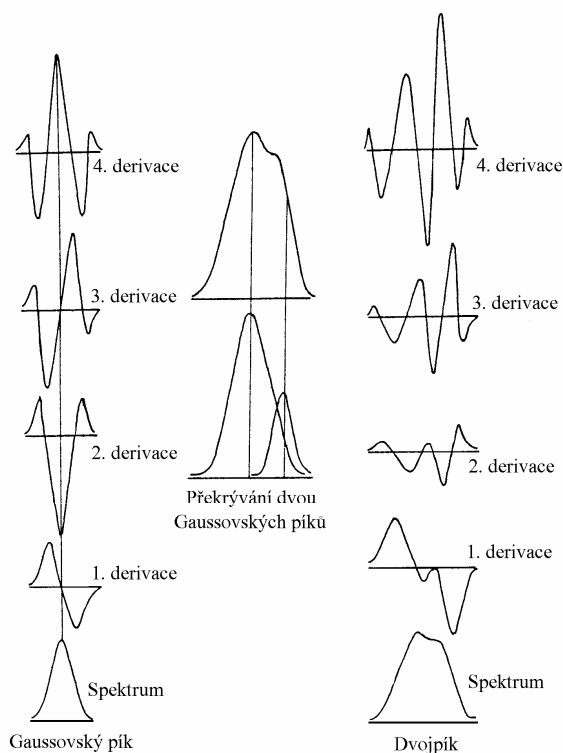
$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} \propto \frac{d^n \Phi}{d\lambda^n} \frac{1}{\Phi}$$

První derivace je tedy lineární funkcí molární koncentrace látky. Situace není tak jednoduchá u vyšších derivací získaných elektronicky, přesto můžeme i tady ve většině případů předpokládat lineární závislost derivačního signálu na koncentraci.

Na obr. č. 1 jsou zaznamenány signály 1. až 4. derivace jednak gaussovského absorpčního píku, jednak absorpčního dvojpíku složeného ze dvou gaussovských píků. Z obrázku je velmi dobře patrné, jak jsou derivační spektra vysoce citlivá na malé rozdíly v průběhu absorpčního spektra. Z obrázku je dále patrné, že v případě 1. a 3. (liché) derivace prochází derivační signál nulovou hodnotou v místě vlnové délky odpovídající absorpčnímu maximu píku; naopak v případě 2. a 4. (sudé) derivace má derivační záznam extrém (u 2. derivace minimum a u 4. derivace maximum) v místě vlnové délky odpovídající minimum) v místě vlnové délky odpovídající absorpčnímu maximu píku.



**Obr. č. 1:** Záznam spektra a 1. až 4. derivace gaussovského píku a dvojpíku



Derivační záznam spektra je dnes získáván elektronicky, použitím derivačních členů u klasických registračních spektrofotometrů. V tomto případě se derivace podle vlnové délky nahrazuje derivací podle času:

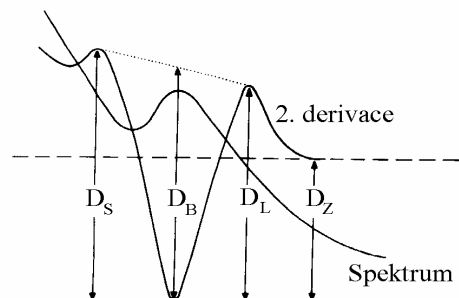
$$\frac{dA}{dt} = \frac{dA}{d\lambda} \frac{d\lambda}{dt}, \quad \text{kde } \frac{d\lambda}{dt} = S \quad \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n A}{dt^n} \frac{1}{S^n}$$

Musí být však splněna podmínka, že posun vlnových délek  $S$  je v čase přísně konstantní. Výhodou tohoto způsobu je možnost získat derivační záznamy vyšších řádů.

Druhou možností je numerický výpočet derivace podle vlnové délky. Vlastní diferenciaci předchází získání spektra v digitální formě, výpočet derivace spektra je pak počítačem prováděn bod po bodu nebo složitějším matematickým postupem. Tímto způsobem produkují derivační záznam diode-array spektrofotometry.

Pro kvantitativní analýzu vzorku nebo analytu ve směsi je nejčastěji používána druhá nebo čtvrtá derivace signálu. Pro sestavení kalibrační přímky se použije pík z derivačního záznamu určující přesnou polohu maxima absorpčního pásu analytu (viz obr. č. 1). Na osu y kalibrační závislosti je možné vynášet (obr. č. 2) buď výšku derivačního píku vzhledem k nulové hodnotě derivace  $D_z$ , nebo výšku tohoto píku vzhledem k výšce postranního satelitu při nižší vlnové

délce  $D_S$  nebo vyšší vlnové délce  $D_L$ , či případně vzhledem k průměru výšek obou těchto satelitů  $D_B$ .



**Obr. č. 2:** *Kvantitativní vyhodnocení derivačního záznamu*

Významná je u derivační spektrometrie malá citlivost k rušivému vlivu matrice; to se např. projeví eliminací vlivu rozptylu světla u kalných roztoků. Rušivý vliv matrice vzorku klesá u derivační spektrometrie s řádem derivace. Rozsáhlé využití nachází derivační spektrometrie v biochemii, např. při studiu jednodušších směsí aminokyselin. Pomocí derivační spektrometrie je také možné vedle sebe stanovit strukturně blízké deriváty farmaceutik.

Nevýhodou derivační spektrometrie je poměrně silná expanze šumu a rušivý vliv satelitních maxim. Obecně můžeme o této metodě říci, že nezvyšuje množství informací obsažených v původním spektru, činí je však přístupnějšími.

## Úkol:

Ověřte hodnoty vlnových délek maxim všech absorpčních pásů vodného roztoku manganistanu draselného ve viditelné oblasti spektra a porovnejte je s výstupem matematického rozkladu spektra např. pomocí programu PeakFit. Porovnejte kalibrační závislosti získané z klasických spekter a ze záznamů 2. a 4. derivace.

## Chemikálie a přístroje:

Diode-array spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard, U.S.A.) s řídicím počítačem a ovládacím softwarem UV-VIS ChemStation; skleněná kyveta s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 ml.  $KMnO_4$ , odměrné baňky.

## **Pracovní postup:**

1. Připravte kalibrační řadu roztoků  $\text{KMnO}_4$  v rozsahu  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .
2. Proměřte absorpční spektrum a 1., 2., 3. a 4. derivaci absorpční křivky roztoku  $\text{KMnO}_4$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve viditelné oblasti spektra v intervalu vlnových délek 450 – 600 nm.
3. Pomocí klasických spekter a záznamů 2. a 4. derivace absorpční křivky proměřte připravenou kalibrační sadu.

## **Ovládání spektrofotometru a řídicího software:**

K proměřování klasických spekter a derivačních záznamů použijeme spektrofotometr s diodovým polem 8453 firmy Hewlett-Packard. Přístroj je řízen počítačem přes řídicí software UV-VIS ChemStation.

Postup ovládání přístroje v dané úloze je následující: nejdříve zapneme spektrometr hlavním vypínačem a počkáme na proběhnutí testovacího programu; ukončení se projeví zeleným zabarvením kontrolní LED diody. Zapneme řídicí počítač a přihlásíme se do profilu „Praktika“; na ploše spustíme ovládací software ikonou „UV-VIS on-line“. Při inicializaci programu se přihlásíme jako uživatel „Praktika“ (bez hesla). Po skončení inicializace musíme nastavit parametry měření: standardní měření spektra, rozsah vlnových délek pro sběr dat: 450 – 600 nm, integrační čas 5 s, maximální rozlišení spektrometru (0,5 nm), zobrazení spekter v intervalu 450 – 600 nm, případně dále vybrat derivační záznam a řád derivačního záznamu. Do spektrometru vložíme měřící kyvetu s destilovanou vodou a spektrometr vynulujeme v měřeném rozsahu stlačením tlačítka „Blank“; potom již můžeme proměřovat jednotlivé vzorky a to vždy stlačením tlačítka „Sample“. Změřená spektra a jednotlivé derivační záznamy ukládáme na harddisk počítače; zároveň tato naměřená spektra a derivační záznamy musíme exportovat do formátu přístupného pro tabulkový procesor: pravým tlačítkem myši klikneme na křivku získaného spektra (tím označíme křivku) a z nabídky „File“, „Export selected data“ vybereme možnost „Export .csv“; spektrum opět pomocí pravého tlačítka myši odoznačíme a můžeme proměřovat další vzorek. Po proměření každého spektra nám spektrometr odečte absorpční maxima a minima jednotlivých piků; tyto hodnoty si zapíšeme pro pozdější porovnání.

## Vyhodnocení výsledků:

1. Ze záznamu 3. a 4. derivace (případně 1. a 2. derivace) absorpčního signálu odečtěte polohy jednotlivých absorpčních pásů  $\text{KMnO}_4$ .
2. Z proměřených kalibračních závislostí pomocí klasického spektra a jeho 2. a 4. derivace vyhodnoťte a porovnejte směrnice kalibrací (citlivost stanovení). U derivačních záznamů volte různé možnosti odečítání výšek píků (viz teoretická část).
4. Porovnejte získané hodnoty vlnových délek maxim jednotlivých absorpčních pásů pomocí derivačních záznamů s hodnotami odečtenými přímo spektrometrem a s hodnotami získanými počítačovým rozkladem naměřeného spektra pomocí programů PeakFit nebo Bigaus. Ovládání těchto programů vám vysvětlí dozor praktika.