

Chemie – úloha č. 14



Autor: Tomáš Feltl

Kolik železa spolykáme

Cíle

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

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 Fe^{3+} , nikoli však pro ionty Fe^{2+} , které mohou být v roztoku také obsaženy (časté např. v případě podzemních vod obohacených o ionty železa). Je proto nezbytné před provedením barevné reakce ionty Fe^{2+} zoxidovat na Fe^{3+} . Postup v této úloze zahrnuje i krok vedoucí právě k oxidaci iontů Fe^{2+} na 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 NH_4SCN , 10% roztok 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

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-Beerově 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_λ je absorbance světla, E_λ absorpční koeficient dané látky, l je dráha světla uražená v roztoku (délka dráhy), c_M je koncentrace látky v roztoku. Absorpční koeficient E_λ nabývá různých hodnot a je

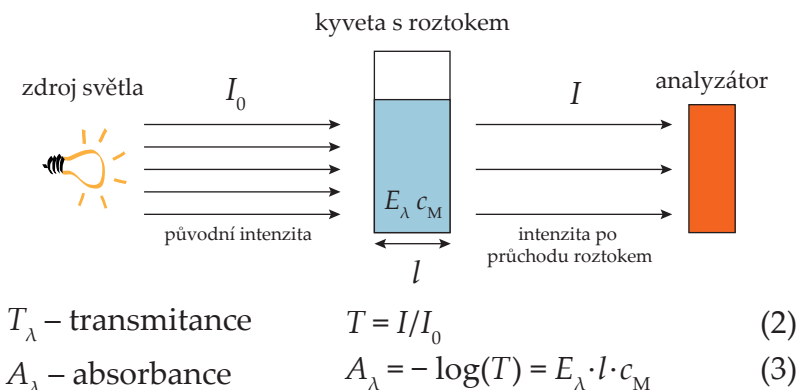
evropský
sociální
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVYOP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

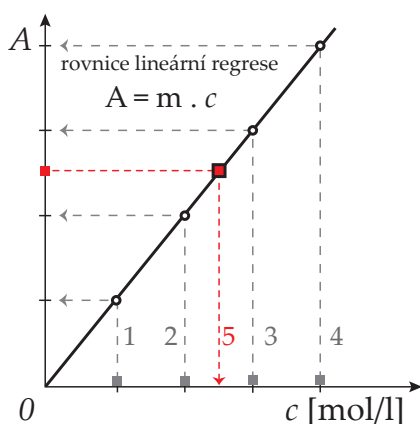
specifický pro danou rozpuštěnou látku. Jeho stanovení je většinou provedeno experimentálně. Z tohoto zákona je patrná přímá závislost absorpance světla látkou na její **koncentraci** (c_M) v roztoku a na **tloušťce** prostředí (l), ve kterém je roztok látky umístěn (**kyveta**). Známe-li tedy l a $E\lambda$, můžeme stanovit koncentraci látky v roztoku na základě množství absorbovaného světla (**absorbance**).



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

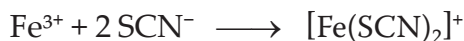
Namísto přímého výpočtu se v praxi častěji využívá určení koncentrace s využitím **kalibrační křivky**, při kterém není třeba znát konstantu $E\lambda$ ani tloušťku kyvety l . Experimentální postup je v takovém případě následující:

- 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 sestavené kalibrační křivky je následně možné určit neznámou koncentraci (viz graf na obr. 2).

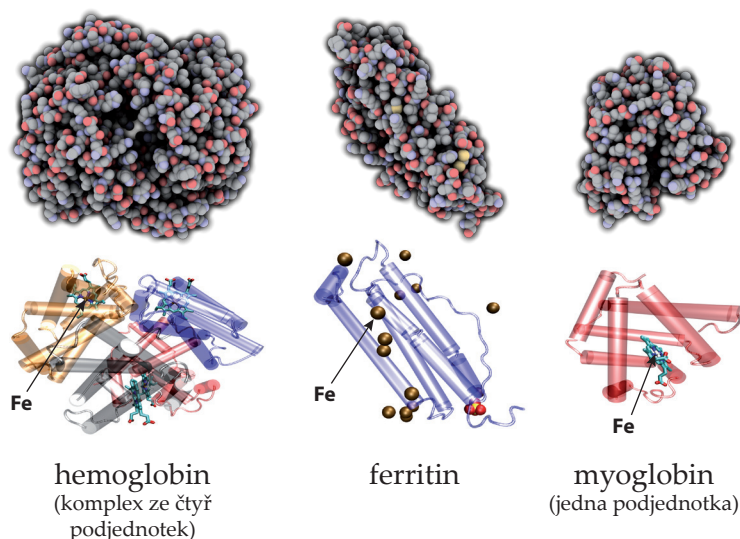


Obr. 2: Určení koncentrace dané látky v neznámém vzorku pomocí sestavené kalibrační přímky. U roztoků se známou koncentrací (1–4) je stanovena absorbance a ze získaných bodů sestavena kalibrační křivka. U roztoku s neznámou koncentrací (5) je na základě zjištěné absorbance obráceně stanovena koncentrace.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

Principem našeho stanovení je komplexotvorná reakce iontů Fe^{3+} s ionty SCN^- . Vzniká tak intenzivně červený komplex, který, je-li dostatečně koncentrován, 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 příchut' 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 Fe^{2+} iontů a až na povrchu je vzdušným kyslíkem oxidováno na ionty Fe^{3+} . Oxidaci iontů Fe^{2+} mohou také jako **zdroj energie** využívat některé bakterie (železité bakterie). Přeměna Fe^{2+} iontů na Fe^{3+} vede v obou případech ke tvorbě železitých sloučenin, např. $Fe(OH)_3$, které tvoří typické **rezavě-hnědé sraženiny**. To je také nejčastějším indikátorem zvýšené koncentrace železa ve vodě.



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

Železo je významným **biogenním prvkem**, který je nedílnou součástí např. hemoglobinu (červeného krevního barviva), myoglobinu, enzymů (cytochromoxidázy, peroxidázy atd.), zásobních proteinů (ferritinu) – obr. 3. 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 Fe^{3+} iontů ve vodě není pokládán za optimální.

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.

NH_4SCN (Xn, R 20/21/22-32-52/53, S 13-61)

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 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 Fe^{3+}

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

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

Pro přípravu 100 ml roztoku 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 rozpustíte s využitím 100 ml odměrné baňky a dopočítejte skutečnou koncentraci připraveného roztoku.

c) Vzniklý roztok použijte v dalším kroku pro přípravu kalibračních roztoků.



Obr. 4: 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 Fe^{3+} .
- Přidejte 5 ml zředěné HNO_3 (10%), 1 ml roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 3 ml 20% roztoku NH_4SCN .
- Každou odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po rysku a promíchejte několikanásobným otočením baňky.
- Pokud jste při přípravě standardního roztoku 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 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
⊙ HNO_3	5	5	5	5	5	5
⊙ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	1	1	1	1	1	1
⊙ NH_4SCN	3	3	3	3	3	3
výsledná koncentrace Fe [mg/ml]	0	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

↓

H_2O ← doplnit dest. vodou do 25 ml

Obr. 5: Schéma přípravy kalibračních roztoků

3) Příprava vzorku

- Ve třecí 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.

- c) Do 25 ml odměrné baňky odpipetujte 10 ml vašeho vzorku.
 - d) Přidejte 5 ml zředěné HNO_3 (10%), 1 ml roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 3 ml 20% roztoku NH_4SCN .
 - e) Odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po rysku a promíchejte několikanásobným otočením baňky.
 - f) 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

- 1) Pro všechna následující měření je třeba připravit spektrofotometr AMADEUS. Zapojení a nastavení proveďte dle obrázku č. 6 na následující straně.
- 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.



Obr. 6: Fotografie zapojení spektrofotometru

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.)
- 2) V další části budete proměřovat absorpance kalibračních roztoků. K tomu využijete soubor **ch14-spektrofotometrie_Fe-sablona-kalibrace+vzorky.spk** (dostupný na portálu 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

- Zkontrolujte, zda je spektrofotometr PASCO Amadeus korektně zapojen.
- Otevřete si soubor **ch14-spektrofotometrie_Fe-sablona_max.spk**.
- Na datalogetu PASCO SPARK klikněte na tlačítko *Nástroje experimentu*. (Nachází se vpravo dole.)
- Klikněte na tlačítko *Konfigurace senzorů* a pokračujte tlačítkem *Upravit vlastnosti Spectrometru*.
- 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“.
- Vyjměte černý hranolek a vložte kyvetu s destilovanou vodou. Klikněte na tlačítko *Uložit referenci*.
- Klikněte na tlačítka *Uložit* a následně *Hotovo*.
- Nyní kyvetu naplňte prostředním kalibračním roztokem a vložte ji do měřicí cely.
- Stiskněte tlačítko *Start* a vyčkejte zobrazení absorpčního spektra. Poté stiskněte tlačítko *Stop*.
- Zobrazte *Nástroje grafu* a pomocí *Výběru datové oblasti (šipka)* vyberte bod s nejvyšší hodnotou absorpance na křivce v rozmezí 450–700 nm.
- Hodnotu zobrazenou nahoře jako **x: ---** si poznamenejte v pravé spodní části (nástroj *Klávesnice*) jako absorpční maximum.
- Soubor si uložte pod jiným názvem pro případný pozdější tisk protokolu.

2) Zjištění absorpancí kalibračních roztoků

- Zkontrolujte, zda je spektrofotometr PASCO Amadeus korektně zapojen.
- Otevřete si soubor **ch14-spektrofotometrie_Fe-sablona-kalibrace+vzorky.spk**.
- Proveďte nastavení spektrofotometru stejně jako v předchozích bodech c)–f) v části „Proměření absorpčního maxima komplexu Fe“.
- Z nabídky dále vyberte *Akvizice času* a změňte hodnotu *Vlnová délka* na hodnotu zjištěného absorpčního maxima.
- Klikněte na tlačítka *Uložit* a následně *Hotovo*.
- 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.
- Klikněte na tlačítko *Další stránka*. Pokud jste pracovali správně, uvidíte sestrojenou kalibrační křivku.

3) Zjištění absorpancí roztoků neznámých vzorků

- Měřením vzorků s neznámou koncentrací iontů Fe navažte ihned na předchozí část.
- Klikněte na tlačítko *Další stránka*. Zobrazí se třetí stránka, kterou použijete pro odečtení hodnot absorpancí vzorků.
- Naplňte kyvetu vzorkem a stiskněte tlačítko *Start*. Po ustálení hodnoty stiskněte tlačítko *Stop*. Postup opakujte se všemi neznámými vzorky.
- Hodnota absorpance neznámého vzorku by měla ležet zhruba uprostřed kalibrační křivky. Pokud tomu tak není a absorpance vzorku je příliš velká, je třeba vzorek naředit.
- Výsledný soubor si uložte pod jiným názvem pro případný pozdější tisk protokolu.

Analýza naměřených dat

Sestrojení kalibrační přímky a stanovení neznámé koncentrace

- Z naměřených absorpancí kalibračních roztoků vytvořte kalibrační křivku, tzn. závislost absorpance na obsahu/koncentraci iontů železa.

- 2) Jednotlivé body kalibrační křivky proložte přímkou lineární regrese, jejíž rovnici spolu s grafem zaznamenejte do protokolu.
- 3) Z hodnot absorbance neznámých vzorků pomocí kalibrační křivky zpětně určete obsah železa v těchto vzorcích. Využijte k tomu rovnici regresní přímky. (Použít 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 .)
- 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.

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%BDlezo>
- GREENWOOD, N a Alan EARNSHAW. *Chemie proků*. 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-ktterou-se-stanovi-hygienicke-pozadavky-na-pitnou-a-teplou-vodu-a-cetnost-a-rozsah-kontroly-pitne-vody>)