

HANA CÍDLOVÁ, LUDĚK JANČÁŘ

## **VÍCESLOŽKOVÁ SPEKTROFOTOMETRICKÁ ANALÝZA: SOUČASNÉ STANOVENÍ VYBRANÝCH POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV V NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH**

*Katedra chemie Pedagogické fakulty Masarykovy univerzity v Brně, Poříčí 7, 603 00 Brno, cidlova@centrum.cz, jancar@ped.muni.cz*

### **Úvod**

Díky grantu FRVŠ č. 429/04 „Inovace laboratorního cvičení z analytické chemie“ bylo pro laboratoř získáno nové technické vybavení, mimo jiné i zátkou uzavíratelné kyvety a mikropipety. Jedním z cílů cvičení je totiž také přiblížit studentům práci s malými množstvími vzorků, neboť práce s takovým vybavením je běžná nejen ve výzkumných chemických i molekulárně biologických pracovištích, ale je samozřejmostí i na vysokých školách ve vyspělejších zemích a používá se také na vysokých školách v naší zemi. Širšímu využití mikropipet (ačkoli práce s nimi je mnohem rychlejší a bezpečnější než s klasickými pipetami skleněnými) však dosud brání především jejich relativně vysoká cena. Příspěvek obsahuje návod pro novou laboratorní úlohu v základní laboratorní cvičení z analytické chemie, která využívá výše uvedené vybavení. Dále pak informuje o využití téže problematiky v semináři Moderní metody chemického výzkumu (obojí ve výuce na PdF MU v Brně).

### **Návod k provedení úlohy**

#### **Vícesložková spektrofotometrická analýza: současné stanovení vybraných potravinářských barviv v nealkoholických nápojích**

#### **Úkol:**

Spektrofotometricky stanovit koncentraci potravinářských barviv tartrazin (E 102), azorubin (E 122) a brilantní modř (E 133) v některém z následujících nápojů:

HELLO sirup – malina, RELAX vinný, červený, HELLO sirup – lesní jahoda, HELLO sirup – kiwi (určí vyučující).

#### **Potřeby:**

#### **Chemikálie:**

Některý z následujících nápojů (určí vyučující): HELLO sirup – malina, RELAX vinný, červený, HELLO sirup – lesní jahoda, HELLO sirup – kiwi, dále pak vodné roztoky potravinářských barviv tartrazin (E 102), azorubin (E 122) a brilantní modř (E 133) – standardy, vše vodné roztoky o koncentraci barviva  $0,2 \text{ mg cm}^{-3}$ , ethanol na proplach kyvet.

#### **Pomůcky:**

Zátkou uzavíratelné kyvety s optickou délkou 1 cm, mikropipeta 20-200 µl, mikropipeta 100-1000 µl, špičky k mikropipetám, stříčka, tampony na leštění okének kyvet.

**Přístrojové vybavení:**

Spektrofotometr, počítač, fén.

**Princip:**

Hlavním úkolem vícesložkové spektrofotometrické analýzy je současné stanovení koncentrací několika látek (komponent, složek) v roztoku vedle sebe. Metody vícesložkové analýzy je možno rozdělit do dvou základních skupin:

- a) První skupina (**klasické metody** vícesložkové analýzy) vyžaduje pro nalezení uspokojivě správných hodnot koncentrací komponent platnost Bouguer-Lambert-Beerova zákona pro každou ze složek v celém rozsahu koncentrací a nijak se neovlivňující složky.
- b) Druhou skupinu tvoří **novější metody**, které jsou více či méně schopné řešit problematiku vícesložkové analýzy i při omezené platnosti Bouguer-Lambert-Beerova zákona a případné interakci složek.

**ad a) Klasické metody vícesložkové analýzy**

Obsahuje-li roztok větší počet absorbujících složek, které vzájemně neinteragují a pro každou složku samostatně platí Bouguer-Lambert-Beerův zákon, je výsledná absorbance  $A_i$  (při dané vlnové délce  $i$ ) dána součtem všech dílčích absorbancí jednotlivých komponent ( $1, \dots, n$ ):

$$A_i = \varepsilon_{i,1}c_1L + \varepsilon_{i,2}c_2L + \dots + \varepsilon_{i,n}c_nL, \text{ kde} \tag{1}$$

$A_i$  ..... absorbance roztoku při vlnové délce  $i$

$i$  ..... označení zvolené vlnové délky pro měření

$n$  ..... počet složek (komponent)

$L$  ..... optická délka kyvety (pro zjednodušení v další práci jednotková),

$\varepsilon_{i,1}, \dots, \varepsilon_{i,n}$  ..... absorpční koeficienty komponent 1, 2, ...,  $n$  při různých vlnových délkách

$c_1, \dots, c_n$  ..... koncentrace jednotlivých komponent.

Zápis (1) je soustavou  $i$  rovnic o  $n$  neznámých.

Stanovit koncentraci jednotlivých komponent je možné tehdy, pokud  $i \geq n$ , tedy změříme-li absorbanci neznámého roztoku (vzorku) směsi při:

- a) tolika vlnových délkách, kolik je absorbujících látek (komponent) ve směsi (tzv. **přesně určené systémy**) nebo
- b) při více vlnových délkách než je počet absorbujících složek ve směsi (tzv. **přeurčené systémy**).

Přeurčené systémy mají oproti přesně určeným systémům některé výhody. Měříme-li pouze pro tolik vlnových délek, kolik je počet komponent ( $i = n$ ), pak experimentální chyba v měřené hodnotě absorbance ovlivní konečný výsledek vícesložkové spektrofotometrické analýzy relativně podstatně více než při měření v přeurčených systémech ( $i > n$ ). Také v případech, kdy jednotlivé komponenty mají členitější spektra (např. více maxim), je pro dosažení přesnějších výsledků výhodnější měřit hodnoty absorbancí ve všech těchto maximech, tedy v přeurčených systémech. V této úloze tedy budeme pracovat se systémem přeurčeným.

### **Přeurčené systémy**

Spektrofotometrická data, naměřená v přeurčených systémech ( $i > n$ ), mohou být zpracována různými způsoby, velmi často např. metodou vícenásobné lineární regrese.

### **Vícenásobná lineární regrese**

Nejznámější z metod lineární regrese je tzv. *metoda nejmenších čtverců*. Tato metoda nahrazuje skutečné hodnoty hodnotami vypočtenými, přičemž toto nahrazení provádí tak, aby součet druhých mocnin (čtverců) odchylek mezi skutečnou a ideální nahrazující (vypočtenou) hodnotou byl co nejmenší.

V našem případě skutečnými hodnotami jsou naměřené absorbance  $A_{i,exp}$ , zatímco hodnotami počítanými jsou absorbance  $A_{i,vyp}$  vypočtené podle vztahu

$$A_{i,vyp} = \epsilon_{i,1}c_1L + \epsilon_{i,2}c_2L + \dots + \epsilon_{i,n}c_nL \quad (2)$$

Hodnoty  $\epsilon_i$  známe (zjistíme proměřením spektra čistých barviv), hodnota  $L$  je tloušťka kyvety (pro zjednodušení volíme  $L = 1$  cm, proto se hodnota  $L$  v dalším textu neobjevuje). Hodnoty  $c_1$  až  $c_n$  jsou hledané konstanty (koncentrace komponent). V našem případě víme (je sděleno vyučujícím), že analyzovaný vzorek obsahuje některá z dříve uvedených tří potravinářských barviv, proto budeme hledat pouze hodnoty  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$  (některá z těchto tří hodnot může vyjít velmi nízká, v tom případě jsme zřejmě zjistili, že náš vzorek toto barvivo neobsahuje).

Pro nejvhodnější hledané hodnoty  $c_1$ ,  $c_2$  a  $c_3$  tedy musí platit:

$$(A_{1,vyp} - A_{1,exp})^2 + (A_{2,vyp} - A_{2,exp})^2 + \dots + (A_{i,vyp} - A_{i,exp})^2 + \dots = \min.$$

Po dosazení (2) s přihlédnutím ke skutečnosti, že  $L = 1$ , dostaneme:

$$U = (\epsilon_{1,1}c_1 + \epsilon_{1,2}c_2 + \epsilon_{1,3}c_3 - A_{1,exp})^2 + (\epsilon_{2,1}c_1 + \epsilon_{2,2}c_2 + \epsilon_{2,3}c_3 - A_{2,exp})^2 + \dots + (\epsilon_{i,1}c_1 + \epsilon_{i,2}c_2 + \epsilon_{i,3}c_3 - A_{i,exp})^2 + \dots = \min. \quad (3)$$

Požadavku, že daný součet musí být co nejmenší číslo (označeno *min.*), vyhovíme tak, že vztah (3) zderivujeme, výsledek položíme roven nule a výslednou rovnici vyřešíme. Protože hledáme tři neznámé, musíme derivování provést třikrát (zvlášť pro každou koncentraci  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ) a na závěr vyřešit soustavu tří rovnic o třech neznámých. Derivováním obdržíme:

$$\begin{aligned}\frac{\partial U}{\partial c_1} &= 2(\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,3}c_3 - A_{1,\text{exp}})\varepsilon_{1,1} + 2(\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,3}c_3 - A_{2,\text{exp}})\varepsilon_{2,1} + \dots + 2(\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,3}c_3 - A_{i,\text{exp}})\varepsilon_{i,1} + \dots = 0 \\ \frac{\partial U}{\partial c_2} &= 2(\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,3}c_3 - A_{1,\text{exp}})\varepsilon_{1,2} + 2(\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,3}c_3 - A_{2,\text{exp}})\varepsilon_{2,2} + \dots + 2(\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,3}c_3 - A_{i,\text{exp}})\varepsilon_{i,2} + \dots = 0 \\ \frac{\partial U}{\partial c_3} &= 2(\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,3}c_3 - A_{1,\text{exp}})\varepsilon_{1,3} + 2(\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,3}c_3 - A_{2,\text{exp}})\varepsilon_{2,3} + \dots + 2(\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,3}c_3 - A_{i,\text{exp}})\varepsilon_{i,3} + \dots = 0\end{aligned}$$

Řešením výše uvedené soustavy tří rovnic o třech neznámých získáme hledané co nejlepší hodnoty  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ .

Úpravou (vydělením číslem 2, roznásobením) dostaneme:

$$\begin{aligned}\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,3}c_3 - \varepsilon_{1,1}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,3}c_3 - \varepsilon_{2,1}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,3}c_3 - \varepsilon_{i,1}A_{i,\text{exp}} + \dots &= 0 \\ \varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,3}c_3 - \varepsilon_{1,2}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,3}c_3 - \varepsilon_{2,2}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,3}c_3 - \varepsilon_{i,2}A_{i,\text{exp}} + \dots &= 0 \\ \varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,3}c_3 - \varepsilon_{1,3}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,1}c_1 + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,2}c_2 + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,3}c_3 - \varepsilon_{2,3}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,1}c_1 + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,2}c_2 + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,3}c_3 - \varepsilon_{i,3}A_{i,\text{exp}} + \dots &= 0\end{aligned}$$

Seřazením podle neznámých (koncentrace  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ) dostaneme:

$$\begin{aligned}(\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,1}c_1 + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,1}c_1) + (\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,2}c_2 + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,2}c_2) + (\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,3}c_3 + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,3}c_3 + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,3}c_3) &= \varepsilon_{1,1}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,1}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,1}A_{i,\text{exp}} \\ (\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,1}c_1 + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,1}c_1) + (\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,2}c_2 + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,2}c_2) + (\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,3}c_3 + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,3}c_3 + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,3}c_3) &= \varepsilon_{1,2}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,2}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,2}A_{i,\text{exp}} \\ (\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,1}c_1 + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,1}c_1 + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,1}c_1) + (\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,2}c_2 + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,2}c_2 + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,2}c_2) + (\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,3}c_3 + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,3}c_3 + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,3}c_3) &= \varepsilon_{1,3}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,3}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,3}A_{i,\text{exp}}\end{aligned}$$

Vytknutím neznámých (koncentrace  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ) dostaneme:

$$(\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,1} + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,1} + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,1})c_1 + (\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,2} + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,2} + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,2})c_2 + (\varepsilon_{1,1}\varepsilon_{1,3} + \varepsilon_{2,1}\varepsilon_{2,3} + \dots + \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,3})c_3 = \varepsilon_{1,1}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,1}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,1}A_{i,\text{exp}}$$

$$(\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,1} + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,1} + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,1})c_1 + (\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,2} + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,2} + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,2})c_2 + (\varepsilon_{1,2}\varepsilon_{1,3} + \varepsilon_{2,2}\varepsilon_{2,3} + \dots + \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,3})c_3 = \varepsilon_{1,2}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,2}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,2}A_{i,\text{exp}}$$

$$(\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,1} + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,1} + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,1})c_1 + (\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,2} + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,2} + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,2})c_2 + (\varepsilon_{1,3}\varepsilon_{1,3} + \varepsilon_{2,3}\varepsilon_{2,3} + \dots + \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,3})c_3 = \varepsilon_{1,3}A_{1,\text{exp}} + \varepsilon_{2,3}A_{2,\text{exp}} + \dots + \varepsilon_{i,3}A_{i,\text{exp}}$$

Nahrazením zápisu součtů ve výše uvedených rovnicích obvyklou symbolikou pro sumy dostaneme ( $i$  je označení vlnové délky, při níž bylo provedeno měření):

$$c_1 \sum_i \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,1} + c_2 \sum_i \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,2} + c_3 \sum_i \varepsilon_{i,1}\varepsilon_{i,3} = \sum_i \varepsilon_{i,1}A_{i,\text{exp}} \quad (4a)$$

$$c_1 \sum_i \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,1} + c_2 \sum_i \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,2} + c_3 \sum_i \varepsilon_{i,2}\varepsilon_{i,3} = \sum_i \varepsilon_{i,2}A_{i,\text{exp}} \quad (4b)$$

$$c_1 \sum_i \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,1} + c_2 \sum_i \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,2} + c_3 \sum_i \varepsilon_{i,3}\varepsilon_{i,3} = \sum_i \varepsilon_{i,3}A_{i,\text{exp}} \quad (4c)$$

Hodnoty jednotlivých součtů (sum) určíme snadno některým tabulkovým procesorem, např. programem Excel. Výsledkem je vždy nějaké číslo. Označme si je např.  $S_1$  až  $S_{12}$ . Výše uvedené rovnice pak můžeme zjednodušeně zapsat ve tvaru:

$$c_1S_1 + c_2S_2 + c_3S_3 = S_4 \quad (5a)$$

$$c_1S_5 + c_2S_6 + c_3S_7 = S_8 \quad (5b)$$

$$c_1S_9 + c_2S_{10} + c_3S_{11} = S_{12} \quad (5c)$$

Soustava (5a), (5b), (5c) je soustava tří rovnic o třech neznámých, kterou vyřešíme libovolným vhodným způsobem, např. postupným dosazováním.

Následující tabulka uvádí příklad zápisu v Excelu. Horní řádek udává označení sloupců v Excelu, levý sloupec udává označení řádků v Excelu, zápis v sloupci  $F$  a dalších ukazuje potřebné výpočty v Excelu, poslední řádek, tj. sumy, ukazuje součty  $S_1$  až  $S_{12}$  pro dosazení do rovnic (5a), (5b), (5c). Modře označené hodnoty jsou vstupní měřená data, žlutě označené hodnoty jsou mezivýpočty, červeně označené hodnoty jsou hodnoty  $S_1, S_2$  atd. pro dosazení do rovnic (5a), (5b), (5c). U žlutě označených dat se předpokládá kopie vzorce do všech žlutých polí v celém sloupci. V témže sloupci dole je pak součet hodnot z daného sloupce, zadaný v Excelu příkazem *SUMA*. Šedě značená pole obsahují pouze popis a slouží k orientaci v datech.

**Tab. 1: Znázornění souboru \*.xls v programu Excel, pomocí kterého lze snadno vyhodnotit naměřená data.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q				
1	vln. délka (nm)	$A_{i,1}$	$A_{i,2}$	$A_{i,3}$	$A_i$	$\epsilon_{i,1}$	$\epsilon_{i,2}$	$\epsilon_{i,3}$	$\epsilon_{i,1}\epsilon_{i,1}$	$\epsilon_{i,2}\epsilon_{i,2}$	$\epsilon_{i,3}\epsilon_{i,3}$	$\epsilon_{i,1}\epsilon_{i,2}$	$\epsilon_{i,1}\epsilon_{i,3}$	$\epsilon_{i,2}\epsilon_{i,3}$	$\epsilon_{i,1}A_i$	$\epsilon_{i,2}A_i$	$\epsilon_{i,3}A_i$				
2	koncentrace:	$c_{st1}$	$c_{st2}$	$c_{st3}$																	
3	400	spektrum prvního barvíva (standardu)	spektrum druhého barvíva (standardu)	spektrum třetího barvíva (standardu)	spektrum vzorku (širupu)	$+B3/B\$2$	$+C3/C\$2$	$+D3/D\$2$	$+(F3*F3)$	$+(G3*G3)$	$+(H3*H3)$	$+(F3*G3)$	$+(F3*H3)$	$+(G3*H3)$	$+(F3*E3)$	$+(G3*E3)$	$+(H3*E3)$				
4	410					...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
5	420																				
...	...																				
...	...																				
...	680																				
...	690																				
...	700																				
...	...																				
...	součet:												$S_1$	$S_6$	$S_{11}$	$S_2 = S_5$	$S_3 = S_9$	$S_7 = S_{10}$	$S_4$	$S_8$	$S_{12}$

Popsané metody vícesložkové analýzy používají jako vstupních dat hodnoty absorpčních koeficientů vypočtených z kalibračních závislostí v jednosložkových systémech, a proto dávají uspokojivé výsledky jen v případě přísné aditivity absorbancí, kdy se jednotlivé složky vzájemně neovlivňují. V případě odchylek od linearit lze jednotlivé postupy modifikovat tak, aby byly pomocí stejných algoritmů počítány nejprve „korigované“ hodnoty absorpčních koeficientů jednotlivých komponent pro dané vlnové délky, a to z naměřených hodnot absorbancí několika vhodně připravených směsí kalibračních roztoků. Tímto způsobem bývá dosaženo často správnějších výsledků, neboť „korigované“ hodnoty absorpčních koeficientů částečně simulují vzájemné ovlivňování jednotlivých komponent či jiné odchylky od linearit.

### ad b) Novější metody vícesložkové analýzy

Pokud nemůžeme předpokládat přesnou platnost Bouguer-Lambert-Beerova zákona nebo pokud složky vzorku spolu mohou vzájemně interagovat, mohou klasické metody selhat. K získání výsledků zatížených velkou chybou jsou náchylná data také v případě multikolinearity (např. značná podobnost či překryv spekter jednotlivých komponent). V takových případech se dají s výhodou využít novější, složitější, avšak spolehlivější metody vícesložkové analýzy. Mezi tyto metody řadíme např. různé postupy obecné (nelineární) regrese; metody Kalmanova filtru, metody faktorové analýzy a řadu jiných projekčních metod, jako je apř. regrese hlavních komponent, partial least squares (PLS) a jiné.

Tato problematika velmi přesahuje rámec základního laboratorního cvičení z analytické chemie, bude však (včetně praktické ukázky) probrána v semináři Moderní metody chemického výzkumu.

### Postup:

Standardní roztoky barviv vyjmeme z mrazničky a při laboratorní teplotě je necháme rozmrazit. Zapneme spektrofotometr a necháme nejméně 20 minut žhavit. Zapneme počítač, pustíme program Excel a vytvoříme si svůj soubor (označený např. naším příjmením). Nachystáme si první řádek a první sloupec souboru podle vzoru v tabulce č. 1 tohoto návodu (v návodu značeno šedě).

Po rozmrazení roztoků s barvivý mikrozkumavky pořádně uzavřeme a jejich obsah prudkým třepáním a převrácením důkladně promícháme. Lesklá okénka kyvet uzavíratelných zátkou s optickou délkou 1 cm zvenku opláchneme destilovanou vodou a tamponem vyleštíme dosucha. Jednu kyvetu naplníme vodou (blank), do druhé připravíme první roztok barviva podle rozpisu v následující tabulce. Nejprve pipetujeme destilovanou vodu, potom standardní roztok barviva z mikrozkumavky. Kyvetu uzavřeme zátkou a převrácením (zátka je nutno držet) její obsah důkladně promícháme.

**Tab. 2: Příprava roztoků standardů pro měření.**

vzorek	objem vody (μl)	objem standardního roztoku barviva (μl)
tartrazin (E 102)	2 350	150
azorubin (E 122)	2 350	150
brilantní modř (E 133)	2 450	50

Pak proměříme absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 400 až 700 nm po 10 nm proti destilované vodě (blank). Naměřenou absorbanci zapisujeme do sloupce *B* našeho souboru v programu Excel. Soubor během doplňování dat často ukládáme.

Po proměření absorpčního spektra kyvetu vyprázdníme, propláchneme napřed destilovanou vodou a následně ethanolem. Poté ji vysušíme pomocí fénu (střední stupeň, cca 10 minut). Dobře vysušenou kyvetu poznáme podle toho, že při postříkání okének destilovanou vodou při leštění již uvnitř kyvetky nekondenzuje kapalina.

Měření stejným způsobem opakujeme pro druhý i třetí standard barviva, data zapisujeme postupně do sloupce *C* a sloupce *D*.

Vzorek nápoje určený k analýze nejprve proměříme orientačně (změříme absorbanci v absorpčních maximech všech tří standardů). Pak roztok sirupu zředíme tak, aby se jeho absorpční maximum pohybovalo v rozmezí absorbancí 0,5-0,7. Naředěný roztok ještě jednou změříme orientačně (při vlnových délkách uvedených tří absorpčních maxim). Pokud se absorpční maximum nachází v požadovaném rozmezí hodnot 0,5-0,7, proměříme celé absorpční spektrum stejně jako u standardů barviv, data zapisujeme v Excelu do sloupce *E*. Způsob ředění si pečlivě zapíšeme.

### Vyhodnocení výsledků

- Vypočteme koncentraci každého ze standardů barviva v kyvetě při měření spekter standardů (v jednotkách  $\text{mg cm}^{-3}$ ) a zapíšeme ji do polí v tabulce č. 1 označených žlutě na řádku č. 2.
- Provedeme výpočty naznačené v tabulce č. 1 (tj. s využitím služeb tabulkového procesoru Excel doplníme obsah žlutě vyznačených polí) a zjistíme hodnoty součtů  $S_1$  až  $S_{12}$  (pomocí funkce *SUMA*).
- S konkrétními číselnými hodnotami  $S_1$  až  $S_{12}$  zapíšeme soustavu rovnic (5a), (5b), (5c).
- Tuto soustavu vyřešíme.

- Určíme barvivo (barviva), ježhož koncentrace nám vyšla velmi nízká, což signalizuje, že toto barvivo zřejmě v nápoji nebylo obsaženo.
- Regresní analýzu (výpočet) provedeme na novém listu Excelového souboru znova pouze s těmi barvivy (standardy), které podle předběžného výpočtu v nápoji skutečně jsou obsaženy.
- S využitím údajů o ředění vzorku nápoje zjistíme koncentraci barviv v původním koncentrovaném nápoji.
- Zapíšeme slovní odpověď, tedy údaj o tom, jakou koncentraci kterého barviva nápoj obsahoval.

**Literatura:**

1. Cídllová, H.: Skrytá rizika (školní) chemické laboratoře. Teachers and Health 5. Nakladatelství Pavel Křepela, Brno 2003 (433-441).
2. Hammerová, A.: Spektrofotometrické stanovení syntetických potravinářských barviv v nápojích. Diplomová práce. PdF MU, Brno 2002.
3. Jančář, L., Langová, M.: Vyhodnocování spektrofotometrických kalibračních závislostí. Chemické listy (86), 420-437 (1992).
4. Vránská, P.: Spektrofotometrické stanovení syntetických potravinářských barviv v bonbónech. Diplomová práce. PdF MU, Brno 2001.