

Spektrofotometrické stanovení celkového Fe a jeho oxidačních forem v přípravcích doplňkové výživy

Princip stanovení:

Spektrofotometrické metody patří v soudobé chemické analýze mezi nejrozšířenější metody, což je dáno jejich specifičností, citlivostí a zejména experimentální a časovou nenáročností. Velká část praktických aplikací těchto metod spadá do oblasti stanovení anorganických látek, zejména kovů. To je dáno tím, že v těchto případech je k dispozici dostatečný výběr činidel, poskytujících se stanovovanou látkou barevný produkt s vysokou hodnotou absorpčního koeficientu, nutnou pro citlivé stanovení příslušného analytu. Spektrofotometrické stanovení koncentrace je založeno na platnosti Lambert-Beerova zákona, který říká, že intenzita zabarvení roztoku (měřená jako **absorbance A**) dané sloučeniny je při konstantní **tloušťce vrstvy** měřeného roztoku **d** (rozměr kyvety) a konstantní vlnové délce záření přímo úměrná **molární koncentraci c** barevné sloučeniny v roztoku:

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

kde ε v jednotkách $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ je tzv. **molární absorpční koeficient**, vyjadřující absorbanci (rel. vyjádření množství pohlceného světla) roztoku o molární koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyvetě o tloušťce 1 cm při konstantní vlnové délce dopadajícího monochromatického záření.

Jedním z nejrozšířenějších a technicky nejvyužívanějších kovů je železo, které je zároveň důležitým biogenním prvkem. Stanovení jeho obsahu jak v materiálech tak v jednotlivých složkách životního prostředí či doplňcích výživy představuje jednu z nejčastějších úloh v analytickém využití spektrofotometrie. Ionty Fe reagují s mnoha anorganickými i organickými látkami za vzniku intenzivně zabarvených sloučenin, úspěšně použitelných ve spektrofotometrii ke stanovení jejich koncentrace. Asi nejznámější je reakce Fe^{3+} s rhodanidovým aniontem za vzniku intenzivně červeně zabarveného komplexního iontu $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ s maximem absorbance při 495 nm ve vodě. Vzhledem k malé stabilitě tohoto komplexu jsou ovšem v praxi používány jiné, organické ligandy - zejména heterocyklické sloučeniny typu 1,10-fenanthrolinu (phen) nebo 2,2'-bipyridylu (bipy). Protože barevný (intenzivně červený) komplex $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ resp. $[\text{Fe}(\text{bipy})_3]^{2+}$ vzniká v tomto případě pouze s iontem Fe^{2+} , je při stanovení celkového obsahu Fe ve vzorku nutno nejprve provést redukci Fe^{3+} iontů na dvojmocné. Nejčastěji se k této redukci používá hydroxylamin v kyselém prostředí. Komplexní ion $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ má ve vodě absorpční maximum u vlnové délky 512 nm a molární absorpční koeficient okolo hodnoty $1,1 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$, takže jej lze ve spektrofotometrii využít k vysoce citlivému stanovení železa. Díky tomu, že v kyselém prostředí 1,10-fenanthrolin netvoří barevné komplexní sloučeniny s většinou iontů dalších kovů, je toto stanovení i dostatečně specifické. Využitím ligandů reagujících s různě oxidovanými formami Fe pak lze určit podíl jednotlivých forem ve vzorku.

Pomůcky a chemikálie:

Spektrofotometr Helios ε , polystyrenové kyvety o tloušťce 1 cm , váhy s přesností na 1 mg , 2 ks kádinka $100\text{--}150 \text{ ml}$, 3 ks kádinka 50 ml , 3 ks pipeta 5 ml dělená, 1 ks pipeta 10 ml nedělená, 8 ks odměrná baňka 50 ml , 1 ks odměrná baňka 250 ml , nálevka, skleněná tyčinka, pipetovací balonek.

20% roztok KSCN, $0,25\%$ roztok 1,10-fenanthrolinu v $0,1 \text{ M-HCl}$, 10% roztok hydroxylamin hydrochloridu, acetátový pufr $\text{pH}=4$, $0,1 \text{ M-HCl}$, 1 mM-HCl , 30% peroxid vodíku, vzorek doplňkové výživy s výrobcem udaným obsahem železa, standardní roztok železa o koncentraci $50 \mu\text{g Fe}/1 \text{ ml}$.

Pracovní postup:

Kalibrace:

Kalibrace pro stanovení Fe^{3+} : Do kádinek o objemu 50 ml si odměříme pipetou 0; 1; 2; 3; 4 a 5 ml standardního roztoku Fe a poté přidáme 10 ml 0,1 M-HCl. Poté do kádinek přidáme po 2 kapkách 30 %ního roztoku peroxidu vodíku (oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+}) a obsah kádinek krátce povaříme (1-3 min). Obsah kádinek kvantitativně převedeme do 50 ml odměrných baněk a přidáme 10 ml roztoku KSCN. Baňky doplníme po značku 0,1 M-HCl a uzavřeme. Po důkladném promíchání obsahu baněk je necháme 5 min stát. Poté pomocí roztoku s nulovým obsahem železa - tzv. "slepý" či referentní roztok - nastavíme nulovou hodnotu absorbance spektrofotometru a pak měříme absorbanci připravených kalibračních roztoků, vše při vlnové délce 495 nm (s nejkonzentrovanejším roztokem proměříme celé spektrum v rozsahu 400 - 700 nm).

Kalibrace pro stanovení Fe^{2+} : Do odměrných baněk o objemu 50 ml si odměříme pipetou 0; 0,5; 1; 1,5; 2 a 2,5 ml standardního roztoku Fe a poté do každé baňky přidáme přibližně 10 ml acetátového pufru. Poté do baněk přidáme po 2 ml roztoku hydroxylaminu a 5 ml roztoku 1,10-fenathrolinu. Baňky doplníme po značku acetátovým pufrem a baňky uzavřeme. Po důkladném promíchání obsahu baněk je necháme 5 min stát. Poté pomocí roztoku s nulovým obsahem železa - tzv. "slepý" či referentní roztok - nastavíme nulovou hodnotu absorbance spektrofotometru a pak měříme absorbanci připravených kalibračních roztoků, vše při vlnové délce 512 nm (s nejkonzentrovanejším roztokem opět proměříme celé spektrum v rozsahu 400 - 700 nm).

Z hodnot naměřených absorbancí a spočtených hodnot koncentrace kalibračních roztoků sestojíme kalibrační přímky a podle Lambert-Beerova zákona spočteme absorpční koeficienty v jednotkách $\text{mg}^{-1}\text{cm}^2$. Ty posléze použijeme pro výpočet množství železa ve stanovovaném vzorku.

Vlastní stanovení:

Na vahách odvážíme v kádince 100-150 ml takové množství výživového doplňku, aby po jeho převedení do 250 ml odměrné baňky obsahoval přibližně 10-15 μg železa na 1 ml vzniklého roztoku. Po odvážení vhodného množství rozmícháme vzorek v kádince s přibližně 50 ml 1 mM roztoku HCl a kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 250 ml. Roztok v baňce doplníme po rysku 1 mM-HCl a po uzavření obsah baňky promícháme.

Z odměrné baňky nejprve odebereme 5 ml roztoku do odměrné baňky 50 ml, přidáme 10 ml roztoku KSCN a doplníme po značku roztokem 0,1 M-HCl. Po promíchání obsahu baňky a 5 min stání odlijeme měřený vzorek do kyvety a po nastavení nuly přístroje na slepý vzorek (slepý vzorek použijeme z kalibrace) změříme při vlnové délce 495 nm absorbanci měřeného roztoku vzorku. Z této hodnoty se určí obsah Fe^{3+} na základě Lambert-Beerova zákona.

Dále z odměrné baňky se zásobním roztokem vzorku odebereme 10 ml vzorku do odměrné baňky o objemu 50 ml. Do této baňky přidáme 2 ml roztoku hydroxylaminu a 5 ml roztoku 1,10-fenathrolinu. Doplníme po značku acetátovým pufrem. Po promíchání obsahu baňky a 5 min stání odlijeme měřený vzorek do kyvety a po nastavení nuly přístroje na slepý vzorek (slepý vzorek opět použijeme z kalibrace) změříme při vlnové délce 512 nm absorbanci měřeného roztoku vzorku. Za pomoci zjištěné hodnoty molárního absorpčního koeficientu z vlastní kalibrace pak podle Lambert-Beerova zákona spočteme koncentraci celkového Fe v měřeném vzorku. Tento výsledek přepočteme na skutečný obsah Fe ve výživovém doplňku v jednotkách udávaným výrobcem doplňku. V závěru porovnáme údaj výrobce s experimentálně stanovenou hodnotou a uvedeme i obsah jednotlivých oxidačních forem Fe.

Na závěr práce zásobní roztok i slepý vzorek včetně dalších vodných roztoků zbylých po stanovení železa přidáme do 2 l kádinky obsahující 1 l pitné vody. Vzniklou odpadní vodu zlikvidujeme spláchnutím větším množstvím vody ve výlevce.