

J. Bačkovský

Příspěvek ke kvalitativní a kvantitativní analýze pomocí absorpčních spekter

Časopis pro pěstování matematiky a fyziky, Vol. 70 (1941), No. 3-4, 122--132

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/122290>

Terms of use:

© Union of Czech Mathematicians and Physicists, 1941

Institute of Mathematics of the Academy of Sciences of the Czech Republic provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This paper has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://project.dml.cz>

ČÁST FYSIKÁLNÍ.

Příspěvek ke kvalitativní a kvantitativní analýze pomocí absorpčních spekter.

J. Bačkovský, Praha.

(Došlo dne 2. ledna 1941.)

Výhodnost užití selektivní absorpce v ultrafialovém oboru pro studium atomů nebo kombinací atomů, u nichž elektrony jsou schopny zaujmouti více než jednu posici. — Vodíková trubice s Paschenovými elektrodami (Dolejšek-Zadkevič). — Optimální podmínky pro vznik plynulého kontinuálního spektra. — Porovnání s výsledky N. D. Smithe, A. E. Smithe a R. D. Fowlera. — Užití reflexe na aluminii v křemenném spektrografu. — Křivka reflexe ultrafialového záření na Al vypařeném ve vysokém vakuu a na Ag (dvacetinásobná reflexe Al proti Ag pro $\lambda=3160 \text{ \AA}$). — Ukázky užití selektivní absorpce pro kvantitativní analýzu některých hormonů a vitamínů. — Některé nové absorpční pásy nalezeny a diskutovány.

Vedle některých nových fyzikálních metod (polarograf, adsorpce a pod.) užívá se nyní stále častěji ke kvantitativní a kvalitativní analýze chemických sloučenin spekter molekulárních (a k nim se řadí spekter luminiscenčních a Ramanových), jež jsou zároveň cennou pomůckou pro stanovení strukturních vzorců u komplikovaných sloučenin.

Molekulární spektra související s rotací atomových jader kolem společného těžiště a s kmitavým pohybem jader, t. zv. spektra rotační a rotačně-vibrační, užívají se výhradně pro studium molekulární struktury a nikoli pro analýzu, protože leží v infračervené části spektra pro experimentální obtíže těžce dostupné. Účelům běžné analýsy vyhovují spektra v části viditelné nebo ultrafialové, kde se dá užití dobře vypracovaných metod s fotografickou registrací. Mecke¹⁾ sice již užil fotografické registrace i v infračervené části spektra, avšak tímto způsobem lze registrovat jen paprsky blízko viditelné části; pro registraci delších vlnových délek jest dosud nutno užívat thermočlánu nebo bolometru.

V oblasti viditelných a ultrafialových vlnových délek leží molekulární spektra, která odpovídají energetickým změnám vněj-

¹⁾ R. Mecke: Handbuch der Phys., 21, Berlin 1929. — Zs. f. wiss. Photogr., 30 (1931), 77.

ších elektronů, t. j. pásová spektra emisní, absorpční a luminiscenční a dále Ramanova.

Rozhodnutí, která z těchto metod je pro analysu dané látky nejvhodnější, závisí na mnoha různých faktorech. Užití spekter luminiscenčních jest omezeno jen na látky vysílající luminiscenční záření ve značné intenzitě a vyžaduje silných zdrojů budícího záření a světelných spektrografů, což platí i o spektrech Ramanových. Metoda emisních spekter molekulárních je dostatečně známa; užívá se při ní stejných prostředků pro buzení, jako pro spektra atomová.

V některých případech, jde-li o analysu sloučenin, které obsahují chromofory, t. j. podle Brodeho²⁾ takové atomy nebo kombinace atomů, u nichž neúplnost elektronů je taková, že elektrony jsou v nich schopny zaujmouti více než jednu posici, je výhodné užití absorpčních spekter, která dovolují zkoušení malých množství látek bez citelné ztráty materiálu a bez změn v molekulární struktuře.

Hlavní význam má tato metoda při analyse komplikovaných sloučenin víceatomových, jako na př. vitaminů, hormonů, bílkovin, uhlohydrátů, barviv a pod., pokud tyto sloučeniny vykazují charakteristické selektivní absorpční pruhy.

Pro analysu kvalitativní stačí ve většině případů stanovení polohy absorpčních maxim a minim. Jde-li však o analysu směsi více než dvou látek, nelze obyčejně již metody absorpčních spekter užití.

Při kvantitativní analyse některých biologicky důležitých látek užívá se dosud biologických testů, které jsou proti metodě absorpčních spekter velmi zdoluhavé a nákladné a dávají výsledky velmi nepřesné. K biologickým účelům často postačující přesnosti lze touto metodou dosáhnouti i bez použití fotometru jen visuelním odhadem¹⁾ (viz obr. 6, 7, 8) tím způsobem, že se absorpční spektrum roztoku o neznámé koncentraci zařadí mezi dvě absorpční spektra téhož roztoku o známé koncentraci o něco vyšší a o něco nižší a interpolací se odhadne koncentrace hledaná.

Z d r o j z á ř e n í. Ke stanovení extinkce pro různé vlnové délky absorpčního spektra dané látky se užívá zdrojů vysílajících co možná spojitě záření. Jde-li však o studium absorpčních pásů, které mají jemnou strukturu, nebo o rychlou orientaci při kvalitativní analyse, kde postačí visuelní stanovení polohy charakteristických pásů, je bezpodmínečně nutno užití záření spektrálně úplně plynulého. V takovém případě působí čáry ve spojitěm spektru velmi rušivě tím, že posunují hodnoty vlnových délek maxim i minim absorpce, a jednak tím, že rozeznání slabých a jemných absorpčních pruhů docela znemožňují.

²⁾ W. R. Brode, Journ. Apl. Phys., 10 (1939), 751.

Ve viditelné části lze požadavku kontinuity zdroje snadno vyhověti, užije-li se těles rozzhavených na vysokou teplotu. V ultrafialovém oboru se nejlépe osvědčila vodíková trubice, která za určitých podmínek vysílá spojitě spektrum molekulárního vodíku. Nyní se uvádí, že toto spektrum vzniká při přechodu z nejhlubšího $^3\Sigma_n$ -termu do disociovaného $^3\Sigma_n$ -termu, při čemž se štěpí molekula vodíku na dva normální vodíkové atomy.

V literatuře³⁾ se uvádí několik typů vodíkových trubic, které se značně liší konstrukcí i zatížitelností. Rovněž údaje o nejvhodnějším tlaku bývají značně různé. Užil jsem konstrukce vypracované Dolejškem a Žadkevičem⁴⁾ s některými změnami, které umožnily dlouhou životní dobu trubice, aniž bylo nutno trubici znovu vyčerpání a naplnění.

Vodíková trubice byla z resistantního skla „Palex“ s křemenými okénky a s Paschenovými dutými elektrodami ze železa. Čištění a odplynění, které je důležité pro správnou funkci trubice, musí být velmi pečlivé. Po obvyklém proplachování chromovou směsí byla provedena dekapitace vnitřních stěn parami alkoholu a po vyčerpání a naplnění trubice vodíkem výbojem o značné intenzitě za stálého vyměňování vodíku až do zmizení posledních parazitních čar. Při tom se ukázala výhoda resistantního skla. Trubici bylo možno výbojem značně zahřátí (asi na 400° C), aniž bylo nebezpečí prasknutí. Plnění trubice bylo provedeno velmi čistým vodíkem, který byl získán difusí rozzhaveným palladiem ve vodíkovém plameni.

K pokusům bylo užito trubic přibližně stejného průměru 18 mm, u nichž vzdálenost elektrod byla 20 a 50 cm. Podle orientačních pozorování přímohledným spektroskopem se ukázalo, že spojitě spektrum molekulární bez čar Balmerovy serie, odpovídajících vodíkovému atomu, vzniká hlavně v anodovém sloupci v blízkosti elektrod. Koncentrace nedisociovaných vodíkových molekul je patrně v této části anodového sloupce větší než v částech ostatních.

K nalezení optimálních podmínek pro vznik kontinuálního spektra byly provedeny snímky při různém zatížení trubice. Na obr. 1 je spektrum trubice se vzdáleností elektrod 50 cm při intenzitě proudu 10, 20 až 70 mA. Exponiční doba byla 1 min. Ze snímku je patrné, že intenzita kontinuálního spektra nejprve stoupá, ale

³⁾ J. Bay—W. Steiner, Zs. f. Phys., 45 (1927), 337. — Zs. f. Phys., 59 (1930), 48.

E. Lau, Zs. f. Instr., 48 (1928), 284.

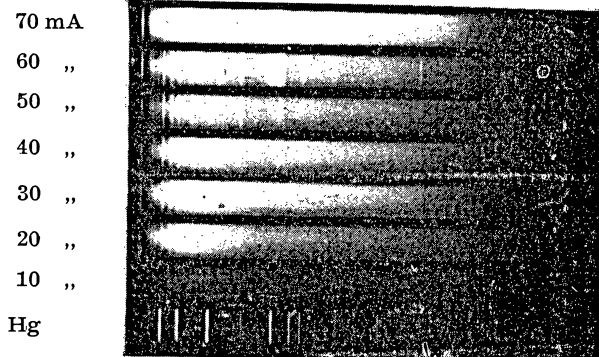
W. Weizel—H. Rohleder—H. Finken, Zs. f. techn. Phys., 21 (1940), 101.

W. Finkelnburg, Kontinuierliche Spektren, Berlin 1938.

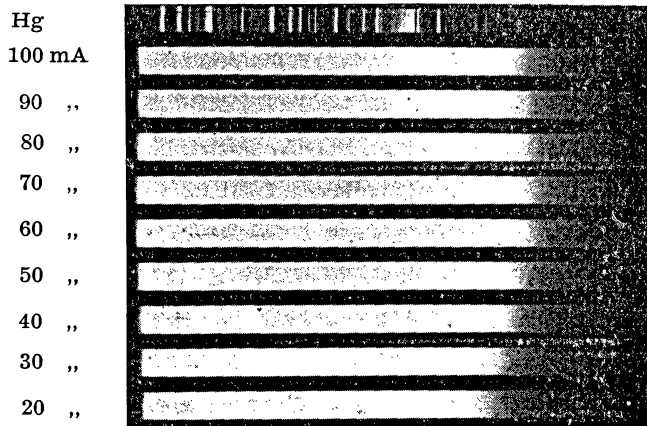
S. Stevens, Rev. Sci. Instr., 6 (1935), 40, 266.

⁴⁾ V. Dolejšek—K. Žadkevič, Acta fac. rer. nat., 167 (1939). Collection, 11 (1939), 196.

již při 30 mA se zastaví a při 40 mA je kontinuum dokonce slabší. Zároveň se však začínají objevovat čáry vodíku. Při dalším zvyšování intenzity proudu stoupá sice poněkud intenzita kontinua, ale intenzita vodíkových čar stoupá daleko rychleji. Optimální intenzita pro vznik kontinua leží tedy mezi 20 až 30 mA při rozměrech trubice zde užitých.



Obr. 1. Spektrum vodíkové trubice (vzdálenost elektrod 50 cm) při různých intenzitách.



Obr. 2. Spektrum vodíkové trubice (vzdálenost elektrod 20 cm) při různých intenzitách.

Spektra vodíkové trubice se vzdáleností elektrod 20 cm jsou uvedena v obr. 2. Exponováno 0,5 min. při postupně stoupající intenzitě proudu 20, 30 až 100 mA. Na rozdíl od trubice s větší

vzdáleností elektrod neobjevují se u této trubice vodíkové linie ani při větších intenzitách a kontinuum je až do 220 m μ úplně plynulé. Intensity kontinua přibývá se stoupající intenzitou proudu až do 60 mA, potom začíná intenzita kontinua opět velmi mírně klesati. Ve srovnání s delší vodíkovou trubicí dávala kratší trubice za optimálních podmínek asi třikrát větší intenzitu kontinua. Z těchto výsledků je patrné, že zvyšování délky anodového sloupce a zvyšování intenzity proudu přes určitou hodnotu při této konstrukci trubice nemá smyslu.

K tomu poznamenávám, že obě trubice snášely krátkodobě (několik minut) i zatížení 350 mA, ale takové zatížení se ukázalo pro vznik kontinua nevýhodné. Toto zjištění, že maximální zatížení není optimální, odporuje pozorování M. D. Smitha a A. D. Smitha a R. D. Fowlera⁵⁾, že intenzita kontinua je lineárně závislá na intenzitě proudu. Ovšem toto pozorování bylo zjištěno na trubici jiného typu a srovnání výsledků u trubic různých typů co do emise ultrafialového záření je obtížné, protože doba expozice, i když je některými autory udávána, záleží také na světelnosti a dispersi užitého spektrografu. Zatím nelze říci, je-li možno u některého typu trubice vypracovat podmínky tak, aby zvyšování elektrického zatížení trubice mělo význam. Zatím se zdá, že tento typ trubice o menším zatížení (120 W) dává stejnou plošnou svítivost jako jiné trubice při zatížení větším (až 2 kW).

Užití reflexe na aluminii v ultrafialovém oboru. K získání optimálních výsledků ve spektroskopii je velmi důležitá volba správného spektrografu. K registraci spekter v ultrafialovém a optickém oboru se dnes užívá jednak spektrografů mřížkových (s mřížkou na odraz), jednak hranolových s křemennou optikou.

Spektrografy s konkávní mřížkou předčí dispersí a rozlišovací mohutností spektrografy hranolové a jsou jediné, jichž je možno užití pro extrémní spektrální obory. Jejich vadou však proti spektrografům hranolovým je poměrně menší světelnost a překládání spekter vyšších řádů.

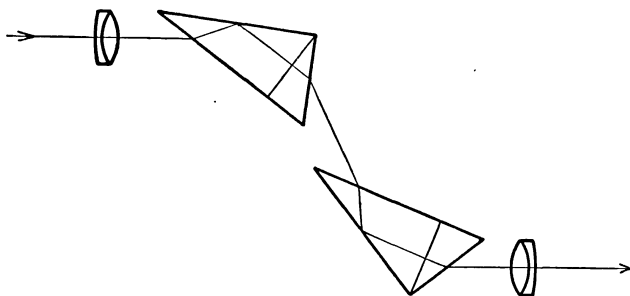
Účelům absorpční spektroskopie vyhovují lépe spektrografy hranolové s prostřední dispersí, protože veliká disperse spektrografů mřížkových nemá u širokých absorpčních pruhů význam, ba dokonce je spíše na škodu, protože snižuje nejen světelnost, ale i přehlednost snímků. Jeden z obvyklých typů hranolových spektrografů pro ultrafialové paprsky je dnes spektrograf s Cornuho hranolem o základní hraně asi 37 mm, s čočkami o ohniskové vzdálenosti $f = 40$ cm a průměru 2 cm, a s achromatickým kolimátorem. Objektívem bývá jednoduchá křemenná čočka s chro-

⁵⁾ N. D. Smith, J. Opt. Soc. Am., 2 (1938), 40.

A. S. Smith—R. D. Fowler, J. Opt. Soc. Am., 2 (1936), 79.

matickou vadou. Proto je nutno stavěti fotografickou desku šikmo k dopadajícím paprskům, aby byly ostře zobrazeny čáry v dosti širokých mezích vlnových délek. Světelnost (relativní otvor) u tohto spektrografu je $f/20$.

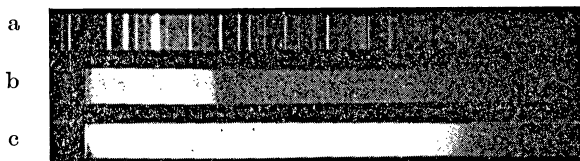
Tento typ se hodí dobře pro emisní spektra v ultrafialovém oboru, avšak pro spektra absorpční by bylo výhodné zvýšiti světelnost při zachování stejné úhlové disperse a rozlišovací mohutnosti. Těmto požadavkům lépe vyhovuje typ spektrografu, kte-



Obr. 3. Chod paprsků ve spektrografu se dvěma polovičními hranoly.

rého jsem užil v této práci. Chod paprsku u tohoto typu je znázorněn na obr. č. 3.

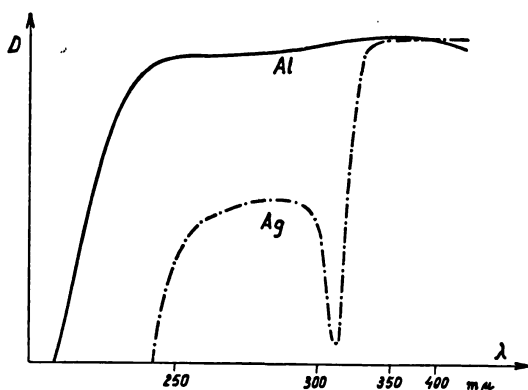
Jak je patrné ze schematu, nastává rozklad světla na dvou polovičních hranolech s konstantní deviací o hraně 7 cm. U kolimátoru i u objektivu je použito achromatické kombinace fluorit-křemen; proto je fotografická deska postavena kolmo k dopada-



Obr. 4. a) Spektrum rtuti. b) Spektrum vodíkového kontinua při reflexi na stříbře. c) Spektrum vodíkového kontinua při reflexi na aluminii.

jícím paprskům. Tím sice klesne lineární disperse, ale úhlová disperse zůstane stejná a světelnost stoupne. Zadní stěna polovičních hranolů musí ovšem paprsky odrážet. Původně byly hranoly na vlnové délky $316 \text{ m}\mu$ minimum reflexe, která při tom klesá až na 4,2%. Tento fakt činil spektrograf pro účely absorpční spektroskopie naprosto nepoužitelným. Z toho důvodu jsem odstranil vrstvu stříbra na zadních plochách hranolů a nahradil jsem ji

zadní stěně postříbřeny. Avšak stříbro má, jak je známo, v okolí vrstvou alumina, vypařeného ve vysokém vakuu. Průběh intenzity záření, které vysílá vodíková trubice, po reflexi na stříbre a na aluminium je viděti na snímku v obr. č. 4 a z fotometrické křivky na obr. č. 5. Na osu pořadnic je nanášena relativní hustota černání v závislosti na vlnové délce obou snímků na deskách Foma-Hyperia. Jak je zřejmé z průběhu křivky v ultrafialové části spektra, má aluminium od vlnové délky 400 $m\mu$ proti stříbru vyšší reflexi, jež s klesající vlnovou délkou jen mírně klesá a nejeví diskontinuit, což je pro absorpční spektra velmi důležité.



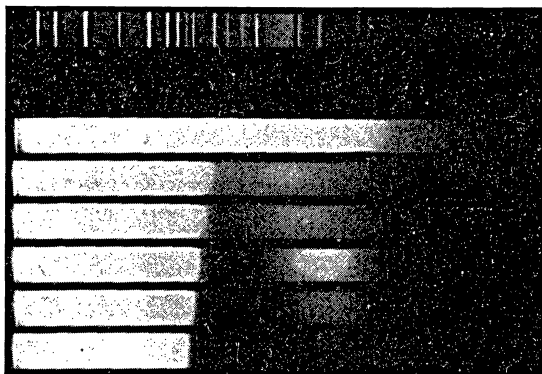
Obr. 5. Fotometr. křivka spektra vodíkového kontinua při reflexi na Al a Ag.

Po těchto úpravách ukázal se popsany spektrograf pro studium absorpčních spekter velmi výhodný, neboť svou světelností, úhlovou dispersí i rozlišovací mohutností předčí obvyklé typy spektrografů, jichž se k těmto účelům užívá. Světelnost u tohoto spektrografu (relativní otvor) je $f/12$, zatím co u výše popsaného spektrografu s Cornuho hranolem činí $f/20$. Stejně i rozlišovací mohutnost, která jest úměrná základové hraně hranolu, je u tohoto spektrografu se dvěma hranoly téměř čtyřikrát větší, neboť každá ze základů má proti hranolu Cornuho skoro dvojnásobnou délku. Úhlová disperse je dvakrát větší. Nevýhodou jest, že se část záření ztrácí reflexí na plochách hranolů a čoček u složených optických systémů, ale tato ztráta je vyvážena kolmým dopadem paprsků do fotografické emulze. Ve spojení s vodíkovou trubicí uvedené konstrukce byly expoziční doby na tomto spektrografu pro vodíkové kontinuum 0,5 min, pro absorpční spektra 3 min. Vzhledem k času, který vyžaduje příprava různých koncentrací

roztoků, nepřispělo by již další zkrácení expoziční doby k podstatnému zkrácení času, který vyžaduje zhotovení celého snímku.

Jako příklad užití absorpčních spekter pro kvantitativní analýsu některých hormonů, u nichž se dosud užívá biologických testů, uvádím spektra insulinu a folikulinu a spektrum laktoflavinu (vitamin B₂).

Spektra hormonů a vitaminů. Ze snímku v obr. č. 6 je vidět absorpční spektrum insulinu PZH ve vodním roztoku. Absorpční spektra byla provedena s kyvetou o tloušťce 2 cm absorbující vrstvy roztoku. Při koncentraci 0,6 U/cm³ insulinu je



Obr. 6. Absorpční spektra insulinu.

dobře viděti dva charakteristické absorpční pruhy u 278 m μ a 270 m μ . Při větší koncentraci tyto pruhy splynou v jediný široký pás. Stejně charakteristická jsou absorpční minima, která mají vlnové délky 274 a 244 m μ . Tato měření souhlasí s hodnotami udávanými v literatuře*), které se vzájemně poněkud liší podle původu preparátu. Kuhn, Eyer a Freudenberg⁶⁾ našli pruh u 280 m μ a Sims a Scott⁷⁾ maxima absorpce při 289—282, 277,5—270 a 244 m μ pro 1% roztok krystalického preparátu.

Snímek na obr. č. 7 ukazuje absorpční spektrum čistého folikulinu ve vodném roztoku. Tloušťka absorbující vrstvy byla v tomto případě 1 cm. Koncentrace se mění podle exponenciální řady se základem 1,4, aby méně kontrastní pásy folikulinu lépe

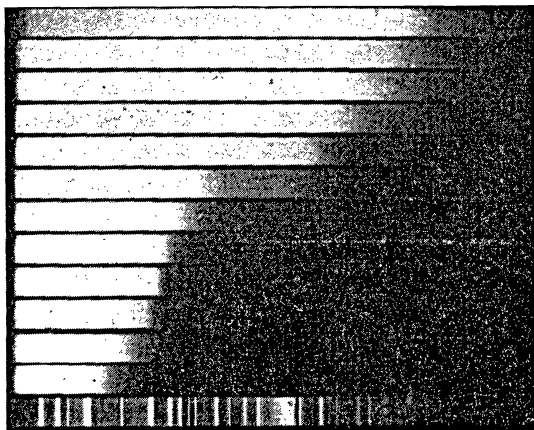
*) Pokud byla přístupná.

⁶⁾ W. Kuhn—H. Eyer—K. Freudenberg, Zs. f. physiol. Chem., **202** (1931), 97; Chem. Zs. **1** (1932), 87.

⁷⁾ H. B. Sims—D. A. Scott, Trans. Roy. Soc. Canada, **24** (1930), 117; Chem. Zs., **1** (1931), 2077.

vynikly. Absorpční maxima leží při 298, 285, 278, 264 244 $m\mu$, minima při 292, 283, 273, 259 $m\mu$.

A. Butenand—J. Störmer⁸⁾ našli max. 284 $m\mu$, min. ca 250 $m\mu$. Pulkki⁹⁾ etc. měřili max. 280 $m\mu$ ve vodním roztoku. Tento pruh se rozpadá v alkoholu na dva při 278 a 289 $m\mu$. Morton¹⁰⁾ uvádí extinkční křivku s maximy při 274 a 279,5 $m\mu$. Pro přehled různých měření uvádím tabulku 1.



Obr. 7. Absorpční spektra folikulinu.

Tabulka 1.

Autoři	Vlnové délky abs. maxim folikulinu v $m\mu$					
Butenand—Störmer						284
Pulkki etc.				280		
Morton			274	279,5		
Bačkovský	244	264		278	285	298

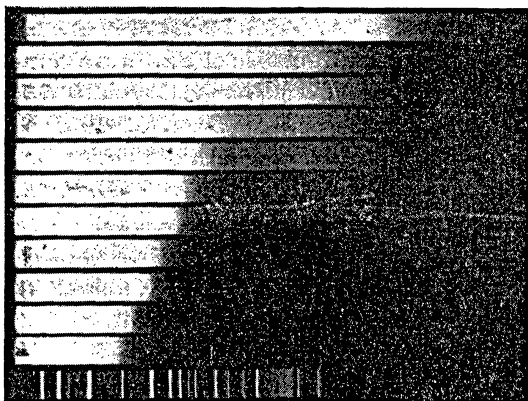
Jak je z tabulky patrné, souhlasí nalezená maxima absorpce jen pro vlnové délky 278 a 285 $m\mu$ s hodnotami nalezenými jinými autory. Ostatní nově nalezené hodnoty absorpčních maxim (také maximum 274 $m\mu$ nalezené Mortonem) bude nutno dalšími pokusy s jinými preparáty folikulinu ověřiti, protože mohou náležeti nečistotám po př. rozpadným produktům.

⁸⁾ A. Butenand—J. Störmer, Zs. f. physiol. Chem., 208 (1932), 129; Chem. Zs., 2 (1932), 726.

⁹⁾ Euler—Hellström—Pulkki—Burström, Arkiv f. Kemi, 11B (1932), 5.

¹⁰⁾ R. A. Morton, The application of Abs. Spectra etc., London 1935.

Na dalším snímku obr. č. 8 jest absorpční spektrum laktoflavinu (vitamin B₂) od firmy Bayer, rozpuštěného v metylalkoholu. Tloušťka absorpční vrstvy byla v tomto případě 2 cm a koncentrace se měnila podle exponenciální řady se základem 1,4. Absorpční maxima na snímku vystupující, leží při 445, 373 a 269 m μ , minimum u 305 m μ . Tyto hodnoty souhlasí velmi dobře s hodnotami měřenými Kuhnem a jeho spolupracovníky¹¹⁾, podle nichž má laktoflavin absorpční maxima u 445, 372, 269 a 225 m μ . Absorpční spektrum tohoto vitamínu značně přispělo též při stanovení jeho strukturního vzorce¹²⁾.



Obr. 8. Absorpční spektra laktoflavinu.

Citlivost metody absorpčních spekter je různá pro různé látky a závisí na tom, jak výrazné jsou u jednotlivých látek absorpční pruhy. V některých případech dosahuje absorpční analýsa organických sloučenin citlivosti spektrální analýsy emisní. Tak na př. výše uvedený laktoflavin na snímku obr. č. 7 by bylo možno zjistiti v roztoku i při koncentraci 0,0001%.

Uvedená vysoká citlivost metody absorpčních spekter umožňuje analýsu nepatrných množství látek, pokud mají charakteristické absorpční pásy, beze ztrát a bez změn v molekulární struktuře a pro tyto výhody se jí dnes stále více užívá.

Prof. Dr. V. Vojtěchovi a prof. Dr. V. Dolejškovi jsem zavázán upřímným díkem za přátelské rady a zapůjčení prostředků

¹¹⁾ R. Kuhn—T. Wagner—Jauregg, Ber. Ber., 66 (1933), 1034, 1577.

R. Kuhn, Zs. f. angew. Chem., 49 (1936), 6.

T. Wagner—Jauregg, Zs. f. angew. Chem., 47 (1934), 318.

¹²⁾ H. Rudy, Naturwiss., 24 (1936), 497.

k této práci. Rovněž děkuji sl. J. Skorkovské a sl. B. Bačkovské za pomoc při exposicích.

Provedeno s podporou Českého badatelského fondu při Národní radě badatelské v Praze.

Obrázky J. Bačkovský. Archiv JČMF.

*

Beitrag zur qualitativen und quantitativen Absorptionsspektralanalyse.

(Inhalt des vorigen Artikels.)

Bei der qualitativen Absorptionsanalyse begrenzt die Kontinuirlichkeit der benützten Strahlung die Erkennbarkeit und Genauigkeit der Lagefeststellung der Absorptionsbanden. Aus diesem Grunde erwies sich als ultraviolette Strahlungsquelle eine Konstruktion der Wasserstoffröhre aus dem resistenten Glas „Palex“ mit Paschen'-Hohlelektroden zweckmäßig.

Bei der Registration der ultravioleten Bandenspektren wurde auf die Vorteile eines Quarzspektrografen mit zwei Halbprismen hingewiesen, die auf der Rückseite mit einer, unter Hochvakuum ausgedämpften Aluminiumschicht, bedeckt wurden. Auf diese Weise wurde in der Umgebung der Wellenlänge 300 m μ 20fache Reflexionsvermögen gegenüber Silber erzielt.

Als Beispiel der Analyse wurden Spektren von Folikulin, Insulin und Laktoflavin in verschiedenen Konzentrationen und Messungen ihrer Maxima und Minima angeführt. Es sind einige neue Absorptionsbanden gemessen und diskutiert worden. Zugleich wird auf die vorteilhafte Verwendbarkeit dieser Methode für die quantitative Analyse der biologisch wichtigen Stoffe an Stelle der schwierigen und viel ungenaueren biologischen Testen aufmerksam gemacht.