

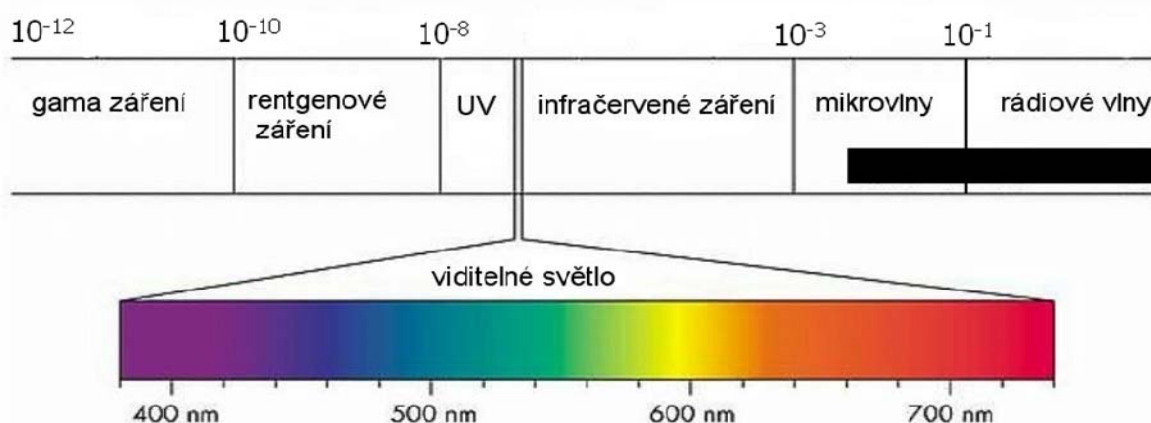
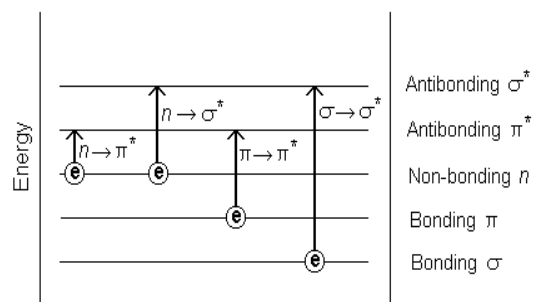
UV-VIS fotometrie

Spektrofotometrické stanovení mědi Chelatonem III s optimalizací podmínek

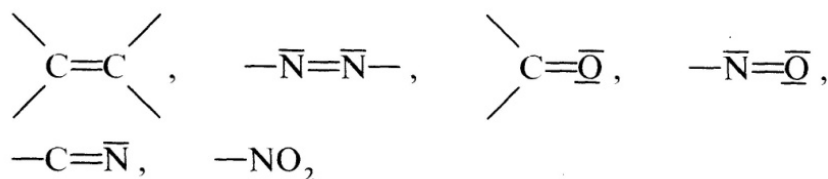
Teorie

Molekuly vzorku absorbují z dopadajícího záření fotony vhodné vlnové délky λ (tj. ty, které odpovídají jejich energetickým hladinám) a přecházejí do vyššího energetického stavu. V UV-VIS oblasti mají fotony energii dostatečnou k tomu, aby jejich absorpce způsobila přechod vnějších elektronů (200-600 kJ/mol). Skupiny, v kterých se realizuje takový elektronový přechod, se nazývají *chromofory*.

U koordinačně kovalentních sloučenin (vazba donor-akceptor) se jedná o energetické přechody v *d* a *f* orbitalech



Obr. 1 Vlnové délky elektromagnetického záření



Obr. 2 Některé chromofory

2.2.25 ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

6.0:0225

Stanovení absorbance. Absorbance (A) roztoku je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance (T) pro monochromatické záření a je vyjádřena vzorcem:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right),$$

v němž značí:

T – I/I_0 ;

I_0 – intenzitu dopadajícího monochromatického záření;

I – intenzitu prošlého monochromatického záření.

V homogenním prostředí je měřená absorbance (A) úměrná tloušťce vrstvy (b), kterou záření prochází, a koncentraci (c) látky v roztoku podle vzorce:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b,$$

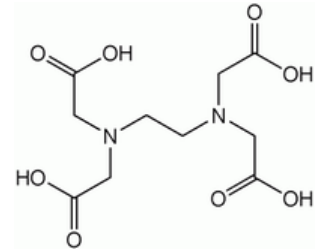
Výraz $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ je specifická absorbance, která vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g/l měřenou v 1cm vrstvě při definované vlnové délce:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{M_r},$$

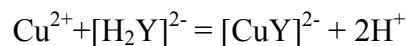
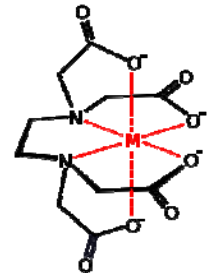
Optimalizace podmínek stanovení

Význam pH pro tvorbu chelátů

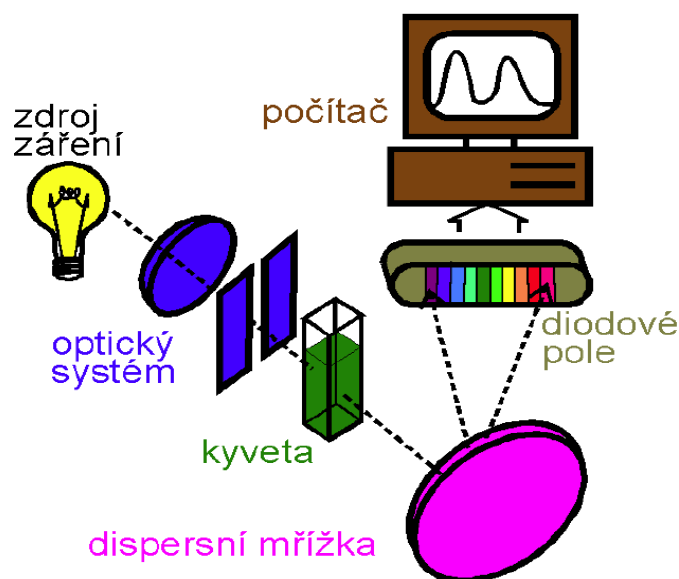
Komplexace kovových iontů je pro kvantitativní analýzu významná především u kyseliny ethylen-diamin-tetraoctové (EDTA), viz chelatometrie. Protože se jedná o čtyřsytou karboxylovou (slabou) kyselinu, její stupeň disociace α je silně ovlivněn pH prostředí.



U chelátů [kov-EDTA] je typické koordinační číslo 6 (viz obrázek), čili kov interaguje s činidlem na šesti místech: s dvěma volnými elektronovými páry na dusících a se čtyřmi kyslíky karboxylových skupin. Je tedy zřejmé, že stabilita komplexu roste se stupněm disociace kyseliny a tedy s rostoucím pH. Některé kovové ionty tvoří stabilní komplexy již v kyselém prostředí (Bi^{3+} , Ti^{4+}), většina kationtů v prostředí neutrálním a některé kationty k tomu potřebují pH až silně alkalické (Mg^{2+} , Ca^{2+}).



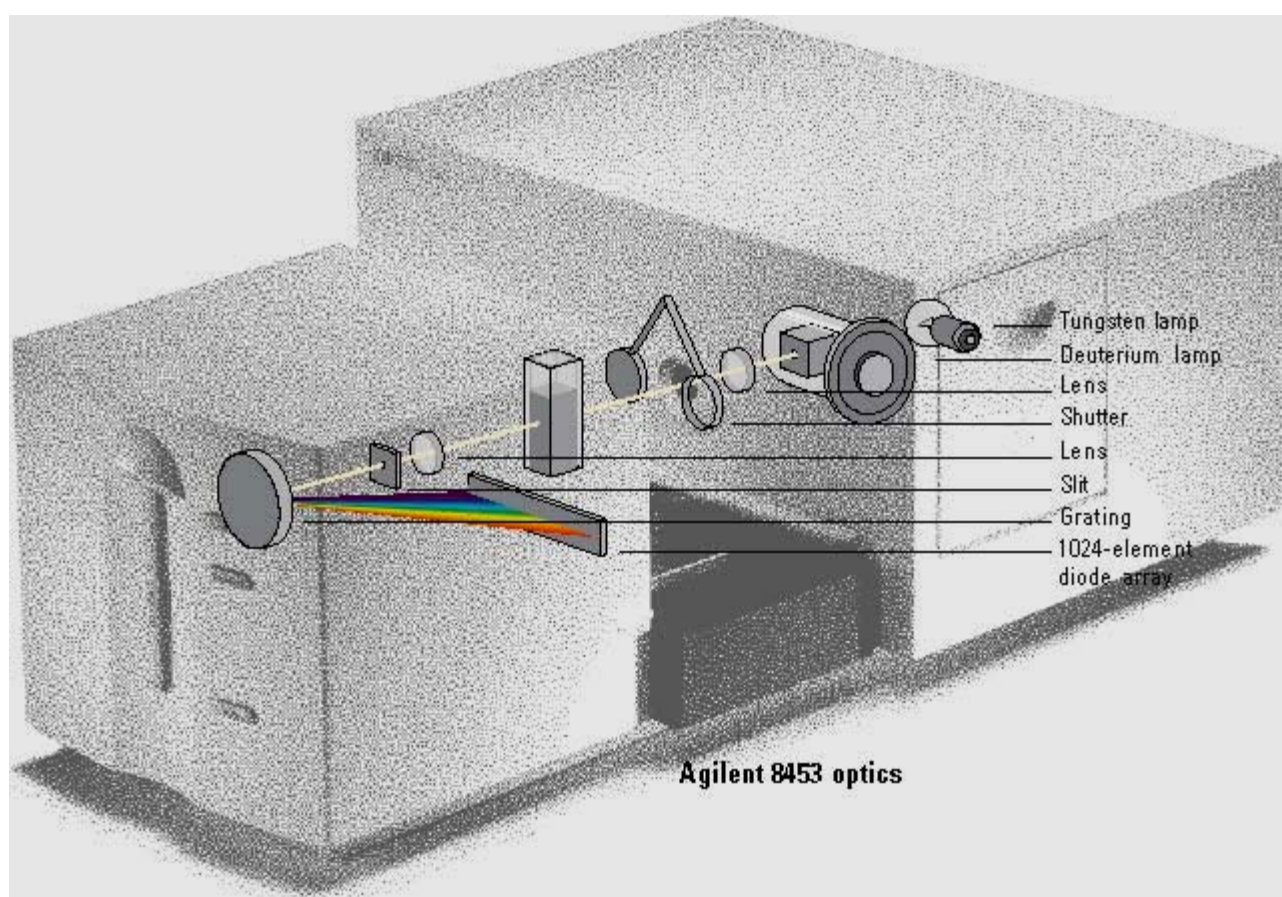
V našem případě komplex [Cu-Y] absorbuje ve viditelné oblasti spektra (je modrý), a proto lze s výhodou měřit jeho absorbanci v oblasti kolem 700 nm, kde už neabsorbují ani ostatní složky roztoku (především činidla), ani samotný Cu^{2+} , protože je kvantitativně vázán. Absorpční maximum komplexu [Cu-EDTA] zjistíme z naměřených spekter (graficky). Zjištění vhodného pH a koncentrace činidel (Chelaton i pufr v nadbytku) je nezbytné pro **kvantitativní vytvoření komplexu** – v opačném případě bychom nemohli usuzovat z absorbance komplexu na koncentraci analytu (Cu).



Obr.3 Fotometr s diodovým polem HP 8453



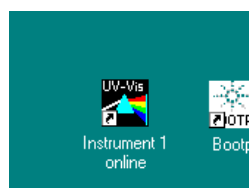
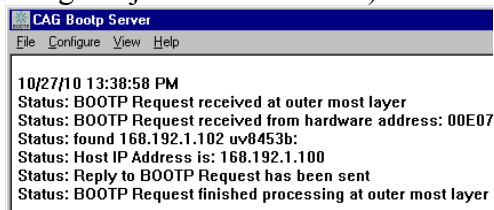
Obr. 4 Popis fotometru Hewlett Packard 8453



<http://www.p-forster.com/english/themes/Spectroscopy/BASICS/>

Obsluha přístroje

Nejprve zkontrolujeme, zda je přístroj zapojen do elektrické sítě, a zapneme fotometr - v levé spodní části spektrofotometru se nachází tlačítko. V pravém horním rohu fotometru začne blikat kontrolka. Po jejím ustalém na žluté barvě lze spustit počítač. Vyčkáme, až systém počítače připojí fotometr (komunikační CAG Bootp Server - okno zaregistruje zařízení uv8453)

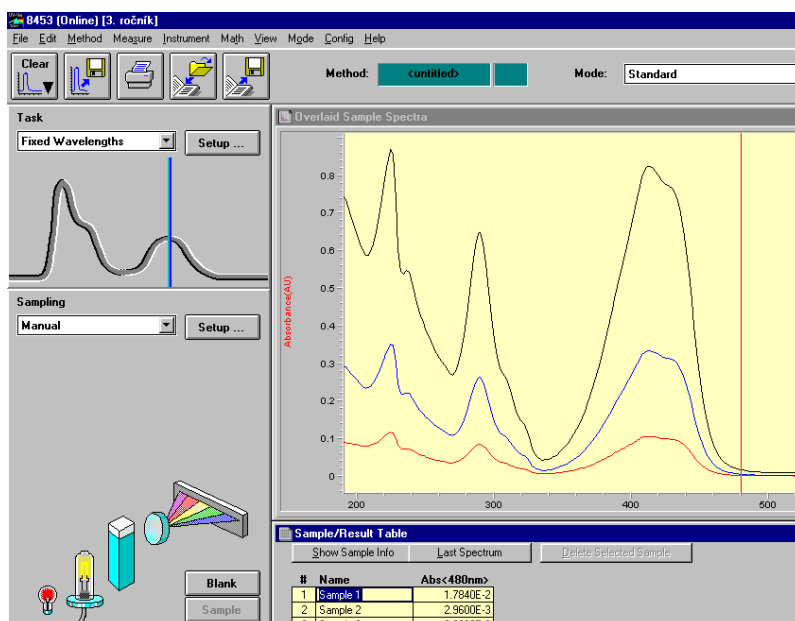


a pak teprve spustíme ovládací software Chemstation.

Jedná se o ovládání jednopaprskového přístroje, a proto každá série měření začíná změřením „blanku“ – obvykle rozpouštědla, ve kterém budu provádět následující měření analytu (Tlačítko BLANK). Pak už můžeme měřit libovolný počet vzorků (SAMPLE). Pokud nám některé naměřené spektrum nevyhovuje, po označení (klepnutím myši) jej můžeme odstranit (Delete) a změřit znovu (z nového roztoku).

Software Chemstation, modul UV-VIS

Obsluha je velmi jednoduchá a umožňuje přehledně srovnávat více spekter, odečítat hodnoty maxim i absorbancí (kliknutím pravého tlačítka myši). Zapisujeme do tabulky maximum informací o příslušném vzorku kvůli pozdější orientaci. Budeme pracovat v modu **Standard**. Můžeme exportovat spektrální data do excelovského sešitu a detailně je zpracovat doma na počítači.



Fotometrické stanovení mědi Chelatonem III pomocí kalibrační křivky s optimalizací podmínek

(Skripta - úloha 2, str. 13-14, ROZDÍLY od Skript: měří se na fotometrech HP8453)

Přístrojové vybavení

Jednopaprskový fotometr HP8453

Chemikálie

0,05M CuSO₄, 0,05M Chelaton III, tlumivé roztoky - pufrů (pH 3,0; 4,6; 6,0; 9,2 a 10,2).

Úkoly

- změření absorpčního spektra komplexu Cu-EDTA (400-740 nm) – výběr A(max)
- změření závislosti absorpce na pH – výběr pH
- změření závislosti absorpce na koncentraci Chelatonu3 – výběr c(Ch3)
- změření kalibrační závislosti A vs. c(Cu) za optimálních podmínek
- stanovení Cu²⁺ v neznámém vzorku

pozn.:

- měření absorpce vždy proti slepému vzorku (ne proti vodě)!
- grafy vynášet na **milimetrový papír** nebo zpracovat v Excelu a vytisknout

výsledek: mg mědi / 100 ml roztoku, který dostali

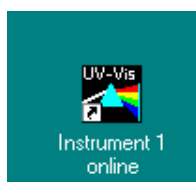
Postup:

1. Závislost $A = f(\lambda)$: do 50ml odměrné baňky odpipetujte 5,00 ml základního roztoku CuSO₄, 10,00 ml roztoku Chelatonu III a baňku doplňte po rysku pufrů pH 6,0 a promíchejte. Porovnávací roztok (blank) připravte stejným způsobem, pouze místo 5,0 ml základního roztoku CuSO₄ použijte 5,00 ml vody. Změřte absorpenci připraveného roztoku v oblasti 400-900 nm (absorpční spektrum). Vlnová délka (λ_{max}), při které se nachází vrchol křivky (kolem 700 nm), udává absorpční maximum vytvořeného chelátu.
2. Závislost $A = f(pH)$: do pěti 50ml odměrných baněk odpipetujte po 5,00 ml základního roztoku CuSO₄ a 10,00 ml roztoku Chelatonu III. Odměrné baňky doplňte po rysku jednotlivými připravenými pufrů a promíchejte. Ke každému vzorku připravte odpovídajícím způsobem i porovnávací roztok (blank). Změřte absorpenci všech pěti roztoků proti příslušným slepým vzorkům (blankům) při vlnové délce λ_{max} . Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.

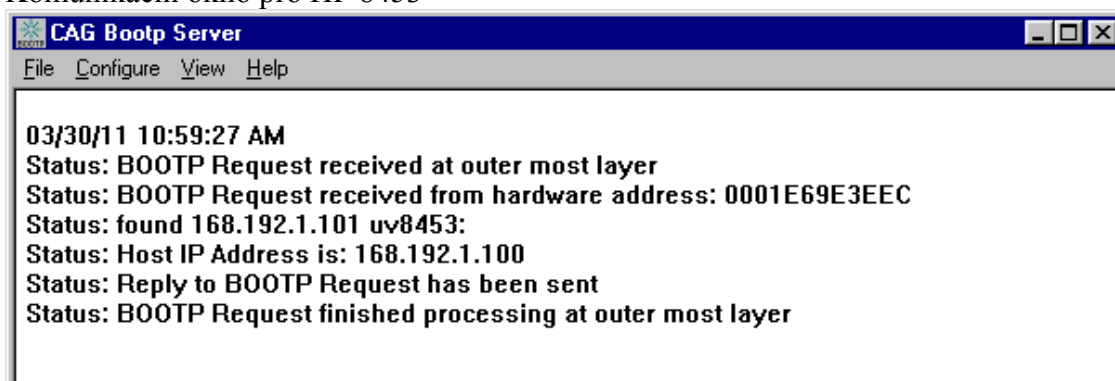
3. Závislost $A = f(c_{\text{Ch}})$: do pěti 50ml odměrných baněk napipetujte po 5,00 ml základního roztoku CuSO_4 . Do první baňky přidejte pomocí byrety 2,00 ml roztoku Chelatonu III, do druhé 2,50 ml, do třetí 5,00 ml, do čtvrté 8,00 ml a do páté 10,00 ml. Odměrné baňky doplňte po rysku pufrem zvoleným podle výsledku předcházejícího měření a promíchejte. Ke každému vzorku připravte odpovídajícím způsobem porovnávací roztok (blank). Změřte absorbanci všech pěti roztoků proti příslušným slepým vzorkům při vlnové délce $\lambda(\text{max})$. Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky **na milimetrový papír**.
4. Závislost $A = f(c_{\text{Cu}})$ - kalibrační závislost: do pěti 50ml odměrných baněk odměřte byretou 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 a 5,00 ml základního roztoku CuSO_4 a přidejte dvojnásobek potřebného množství Chelatonu III zjištěného v předchozím měření. Odměrné baňky doplňte po rysku zvoleným pufrem a promíchejte. Porovnávací roztok připravte stejným způsobem, pouze místo 5,00 ml základního roztoku CuSO_4 použijte 5,00 ml vody. Změřte absorbanci všech pěti roztoků proti slepému roztoku při vlnové délce $\lambda(\text{max})$. Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky **na milimetrový papír**.
5. Stanovení obsahu Cu^{2+} v neznámém vzorku: odpipetujte 5,00 ml z roztoku vzorku do 50-ml odměrné baňky, přidejte dvojnásobek potřebného množství Chelatonu III, doplňte po rysku zvoleným pufrem a promíchejte. Změřte absorbanci připraveného roztoku proti slepému roztoku při vlnové délce $\lambda(\text{max})$.

Vyhodnocení: koncentraci roztoku vzorku mědi stanovte odečtením z kalibrační závislosti (pomocí rovnice lineární regrese).

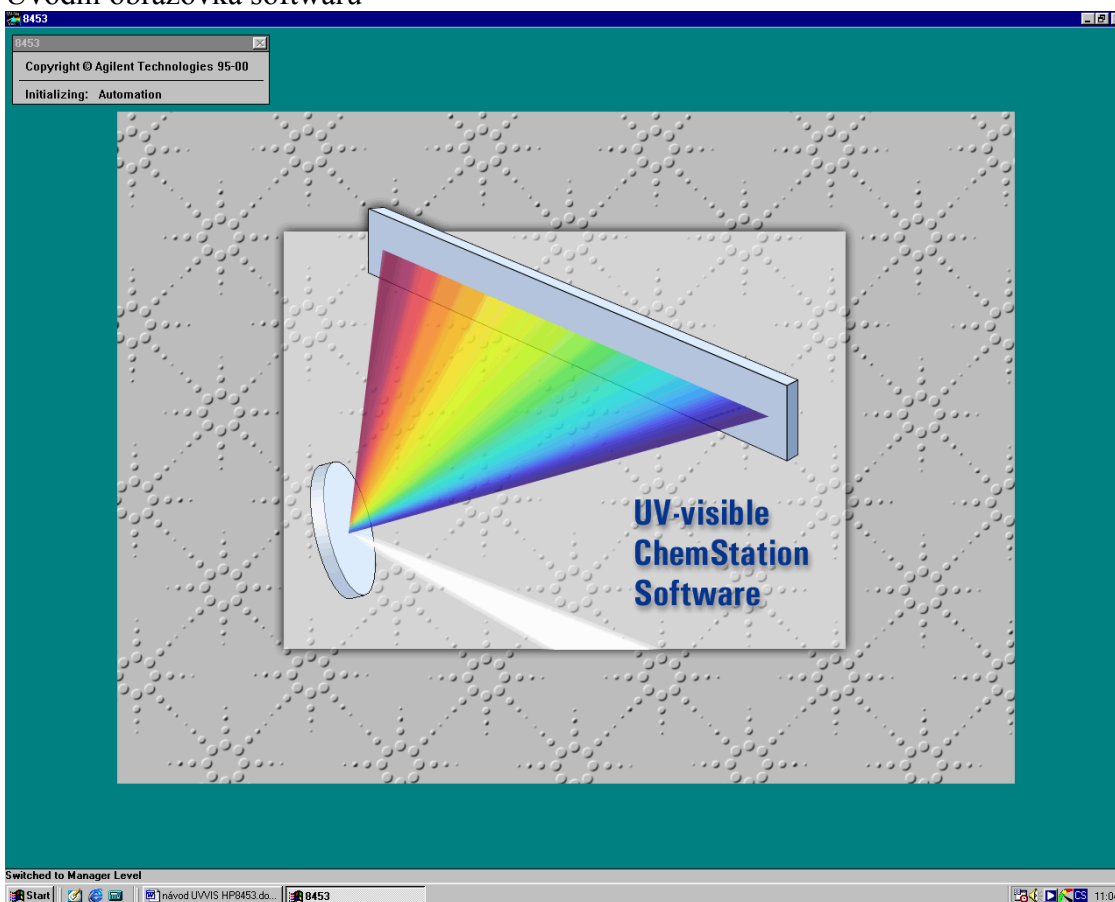
Příloha



Komunikační okno pro HP 8453



Úvodní obrazovka softwaru



Nastavení módu pro snímání spekter

8453 (Online) [3. ročník]

File Edit Method Measure Instrument Math View Mode Config Help

Method: SPEKTRUM.M Mod Mode: Standard

Task: Spectrum/Peaks Setup ...

Sampling: Manual Setup ...

Blank Sample

Automation...

UV-Visible ChemStation, Rev. A.08.03 [71], ready to use

Načtení metody

Load Method ...

File Name: .m

Directories: c:\hpchem\1\methods

55.m
dpph.m
griess.m
gsht.m
JČ.M
jvdpphvy.m
jvic50.m
k.m

List Files of Type: Method(*.M)

Drives: c: system

File Information:

OK
Cancel
Help
Network...

Method setup:

počet spektrálních maxim a minim k označení, rozsah měření

Spectrum/Peaks Parameters

Peak/Valley find

Find and annotate up to peaks

Find and annotate up to valleys

Prompt for sample information

Data type:

Display spectrum: From: nm To: nm

OK Cancel

Výběr vlnových délek k přímému měření absorbance

Fixed Wavelength(s) Parameters

Wavelengths

Use wavelength(s): nm

Background correction: nm

Prompt for sample information

Data type:

Display spectrum: From: nm To: nm

OK Cancel

Neshoda v použití zdrojů: pro UV oblast nutno použít Deuteriovou výbojku, pro měření nad 350 nm wolframovou žárovku (Tungsten lamp).

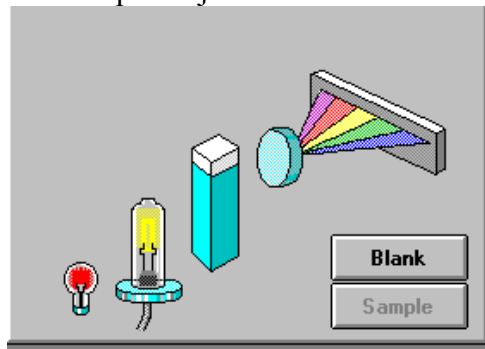
Warning

Loading this method will change current Lamp settings!

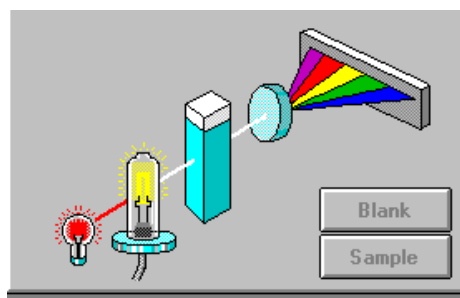
| | Current | New |
|----------------|---------|-----|
| Deuterium Lamp | ON | ON |
| Tungsten Lamp | ON | OFF |

Use Current Use New

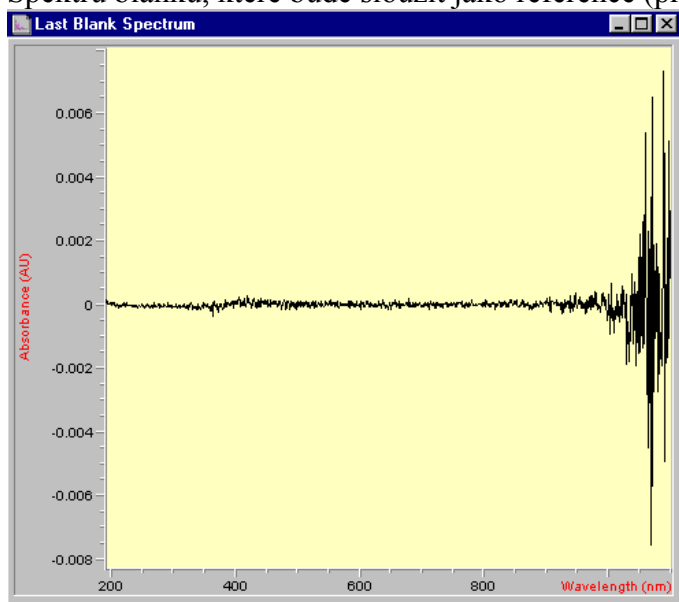
Schéma přístroje s oběma světel. zdroji zapnutými



a při měření (blanku)



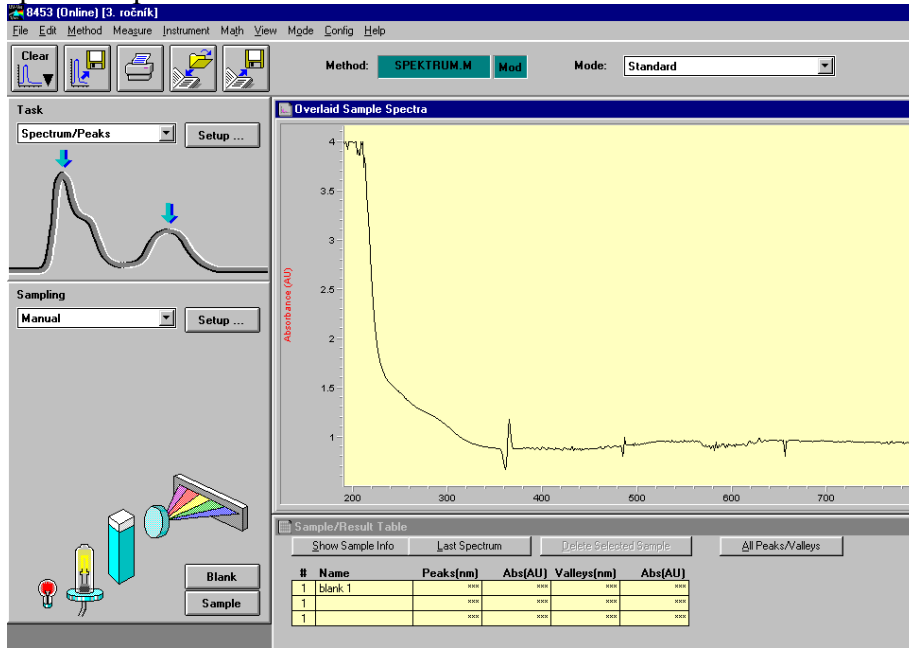
Spektru blanku, které bude sloužit jako reference (pro každou vlnovou délku)



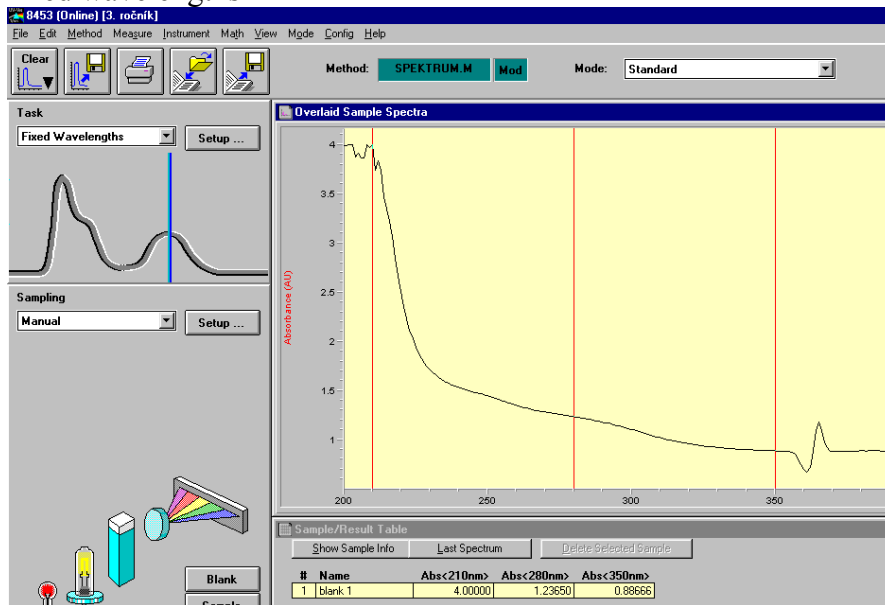
Dialog pro zadání textového popisu při měření vzorku

A dialog box titled 'Sample Information'. It contains three input fields: 'Name' with the text 'kalibrační roztok č.2', 'Solvent' with the text 'pufr, c=0.1 M', and 'Comment' with the text 'c (čínidla) = 0.002 M'. At the bottom, there are two buttons: 'OK' and 'Cancel'.

spectrum/peaks



fixed wavelengths



| Wavelength (nm) | Absorbance (AU) | Std.Dev. |
|-----------------|-----------------|------------|
| 190.0 | 2.36130E-3 | 4.62532E-5 |
| 191.0 | 1.89161E-3 | 5.45671E-5 |
| 192.0 | 1.39761E-3 | 4.16790E-5 |
| 193.0 | 1.07241E-3 | 5.37453E-5 |
| 194.0 | 6.45638E-4 | 4.70742E-5 |
| 195.0 | 3.19004E-4 | 3.93268E-5 |
| 196.0 | 2.40326E-4 | 3.62765E-5 |
| 197.0 | 4.76937E-5 | 3.97216E-5 |
| 198.0 | -1.19686E-4 | 3.52811E-5 |
| 199.0 | -2.26974E-4 | 3.46405E-5 |
| 200.0 | -3.46184E-4 | 3.71750E-5 |
| 201.0 | -4.62095E-4 | 3.78665E-5 |
| 202.0 | -5.17845E-4 | 3.55238E-5 |
| 203.0 | -6.16550E-4 | 2.61310E-5 |
| 204.0 | -6.20842E-4 | 2.70788E-5 |
| 205.0 | -5.46459E-4 | 3.41230E-5 |
| 206.0 | -7.24792E-4 | 3.60596E-5 |
| 207.0 | -8.15392E-4 | 3.12556E-5 |
| 208.0 | -7.69615E-4 | 4.54986E-5 |
| 209.0 | -7.60078E-4 | 5.74663E-5 |
| 210.0 | -8.36849E-4 | 3.50897E-5 |
| 211.0 | -8.37803E-4 | 3.39560E-5 |
| 212.0 | -9.11236E-4 | 4.01896E-5 |
| 213.0 | -9.53674E-4 | 3.06607E-5 |
| 214.0 | -9.19342E-4 | 2.32480E-5 |
| 215.0 | -9.29832E-4 | 2.99313E-5 |
| 216.0 | -9.88007E-4 | 4.49683E-5 |
| 217.0 | -1.01662E-3 | 4.92645E-5 |

dvojklik na spektrum →

Dialog před ukončením činnosti softwaru.

