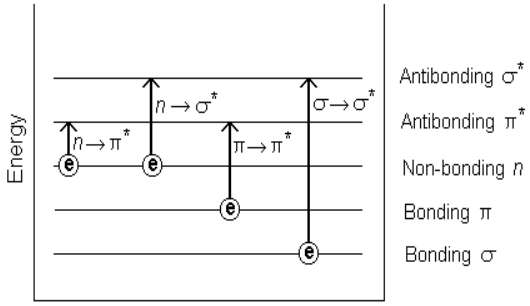
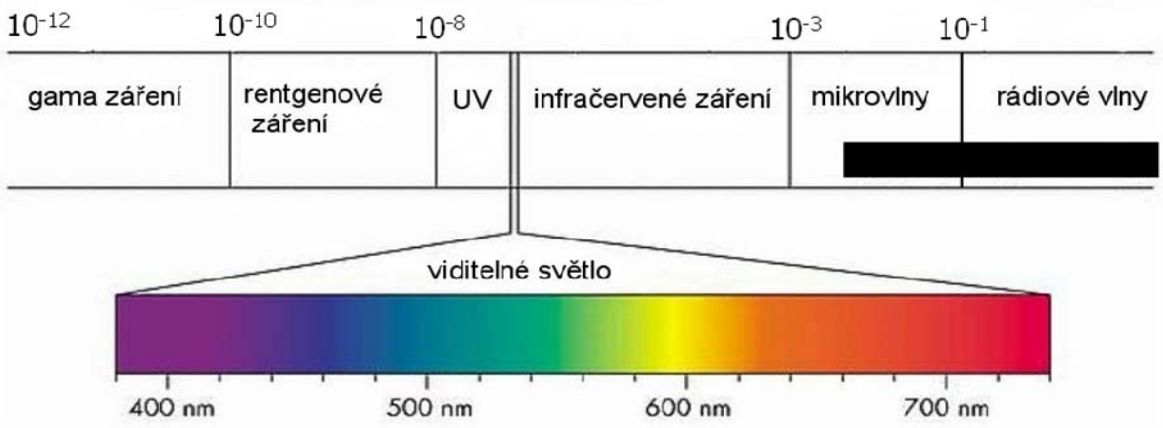
UV-VIS fotometrie

Spektrofotometrické stanovení fenazonu v Antipyrinu železitými ionty pomocí kalibrační křivky

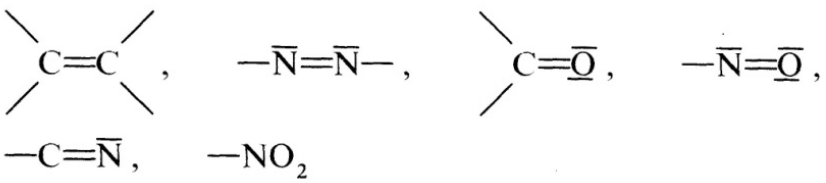
Teorie

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

Definice absorbance a Lambert-Beerův zákon (ČL 2009)

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 transmitance *(T)* pro monochromatické záření a je vyjádřena vzorcem:

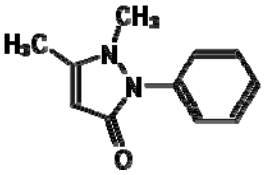
$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right),$$

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:

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

Tvorba komplexu s fenazonem

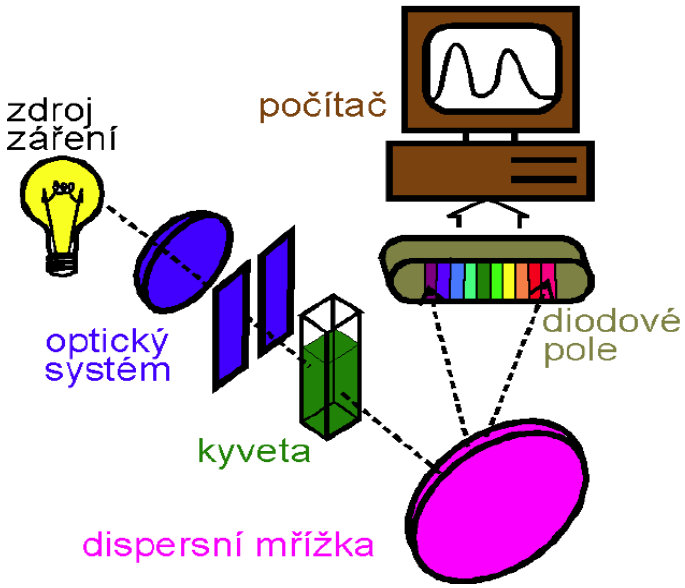


Fenazon (l,5-dimethyl-2-fenyl-2,3-dihydro-pyrrazol-3-on) tvoří se železitými ionty v kyselém prostředí oranžově červený komplex $[Fe_2(fenazon)_3]^{6+}$, který poskytuje charakteristické absorpční spektrum s maximem přibližně 460 nm a který lze využít pro identifikaci a stanovení fenazonu.

Využití komplexů ke kvantitativnímu stanovení je typické pro analyty kovové ionty (M^{n+}), které vytvoří donor-akceptorovou vazbu s tzv. ligandem (L) a vznikne komplex [M-L], někdy i ML_2 nebo dokonce M_2L_3 (viz stanovení Cu s Chelatonem III). Ovšem v tomto případě je analytem právě ligand a Fe(3+) je činidlem.

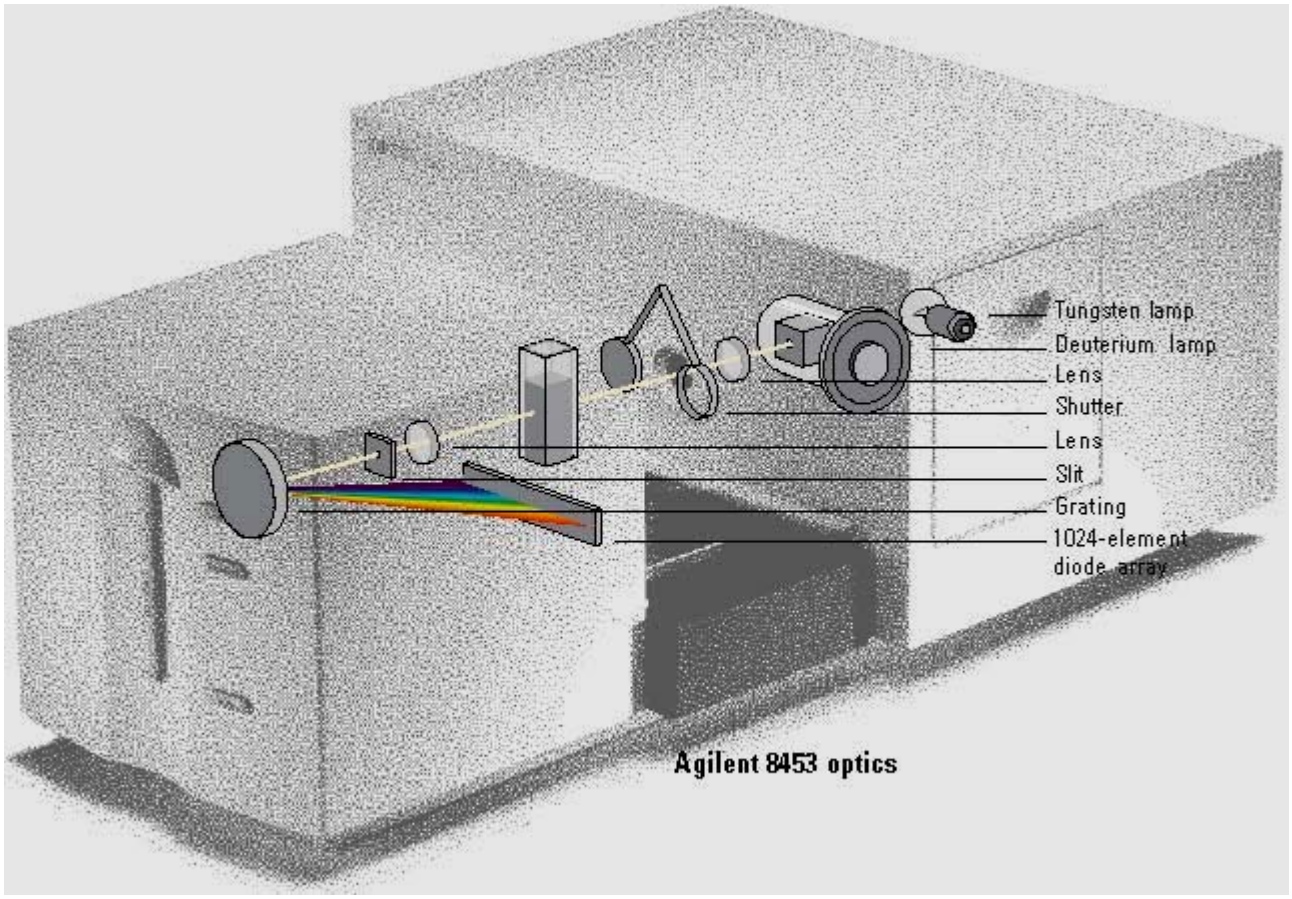
Přístrojové vybavení

Jednopaprskový fotometr HP8453



Obr.3 Fotometr s diodovým polem HP 8453

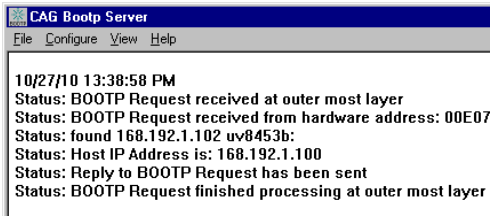
Obr. 4 Popis fotometru Hewlett Packard 8453



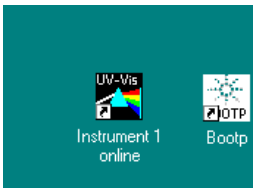
http://www.p-forster.com/english/themes/Spectroscopy/BASICS/

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.



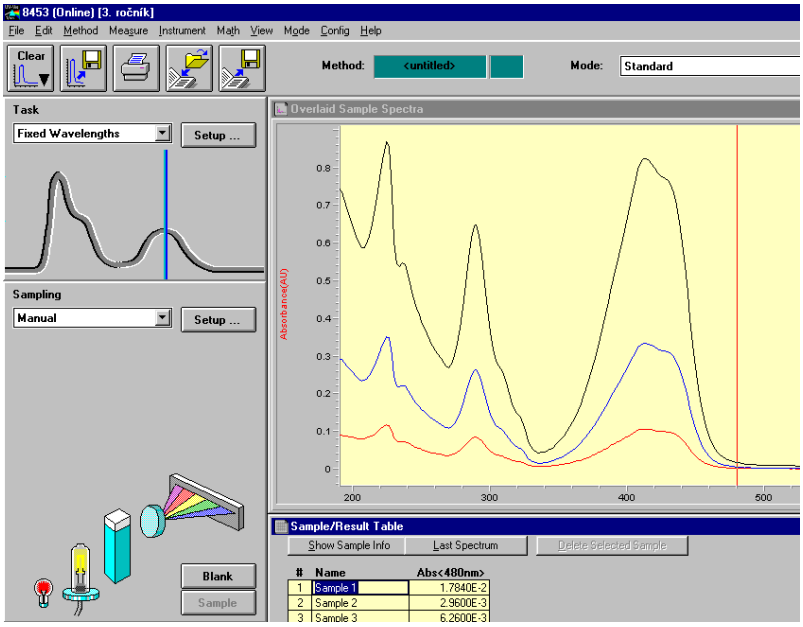
a pak teprve spustíme ovládací software Chemstation.



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).

Software Chemstation, modul UV-VIS

Obsluha je velmi jednoduchá a umožňuje přehledně srovnávat více spekter, odečítat hodnoty maxim i absorbancí (kliknutím pravého tlačítka myši). Zapisujme 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.



Postup
(úloha 3, str. 15-16, ROZDÍLY od Skript: měří se na fotometrech HP8453, do 50 ml odměrky splachujeme **0,2** g fenazonu)

Chemikálie: čištěná voda, okyselený základní roztok $Fe(NO_3)_3$ ***(c = 0,0125 M).***

Úkoly

- Příprava základního roztoku činidla
- Naředění kalibračních roztoků
- změření kalibrační závislosti A vs. c(fenazon) při 460 nm – udělat 3x (15 bodů)
- stanovení antipyrinu v neznámém vzorku

pozn.:
měření absorbance vždy proti slepému vzorku!

Postup:

kalibrační závislost =z ávislost A = f**(c_fenazon)**

do 50-ml odměrné baňky navažte na analytických vahách **0,20 g** fenazonu a rozpusťte ve 30 ml destil. vody. Po rozpuštění doplňte vodou po rysku a promíchejte.
Z takto připraveného základního roztoku přesně odpipetujte postupně do pěti 25ml baněk 2,00; 3,00; 5,00; 7,00 a 10,00 ml základního roztoku. Přidejte byretou 5,00 ml roztoku $Fe(NO_3)_3$, doplňte vodou po rysku a promíchejte. Porovnávací roztok připravte doplněním 5,00 ml roztoku $Fe(NO_3)_3$ ve 25ml odměrné baňce vodou.
Změřte absorbanci všech pěti roztoků proti slepému roztoku při vlnové délce 460 nm.
Tento postup opakujte 3x (včetně nové navážky) – ověříte si tak přesnost celého postupu.
Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky na milimetrový papír.

Stanovení obsahu fenazonu v neznámém vzorku

do 25ml odměrné baňky kvantitativně převeďte roztok vzorku, přidejte 5,00 ml roztoku $Fe(NO_3)_3$, doplňte vodou po rysku a promíchejte. Změřte absorbanci připraveného roztoku proti slepému roztoku při vlnové délce 460 nm.

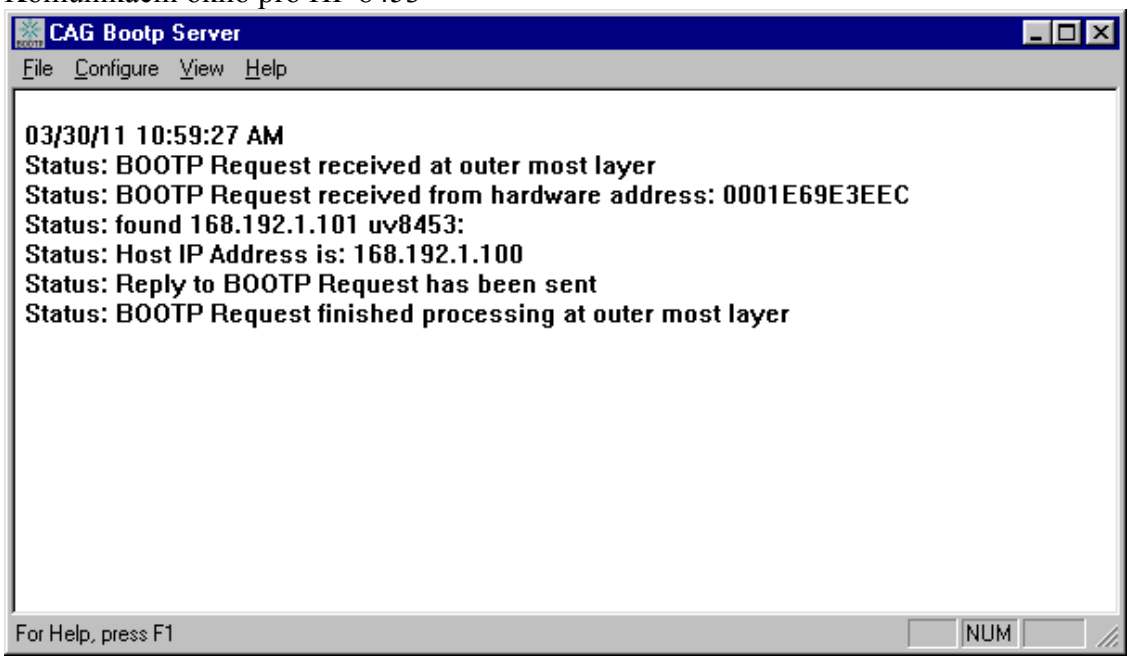
Po skončení všech měření přístroj vypněte, kyvety vyndejte z přístroje, omyjte a osušte.

Vyhodnocení: koncentraci neznámého roztoku vzorku fenazonu stanovte odečtením z kalibrační závislosti.

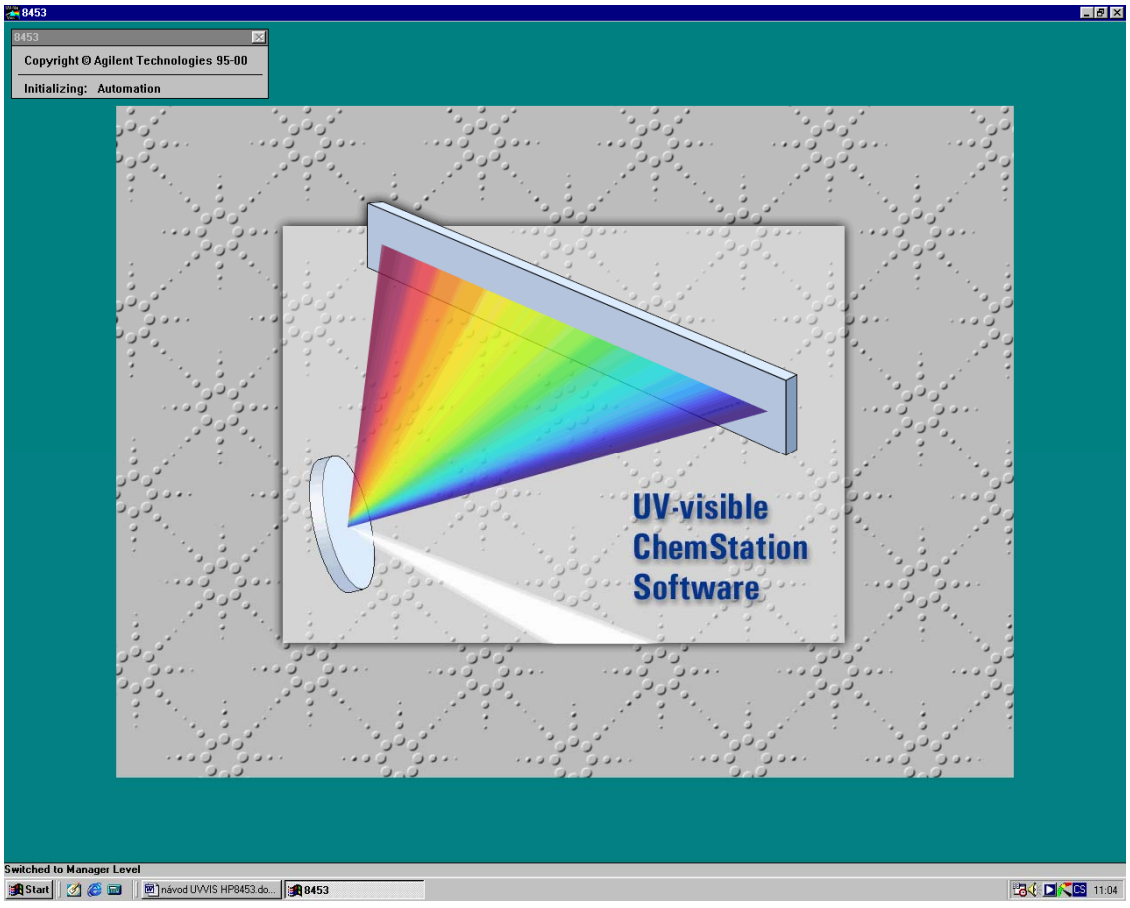
Jako výsledek udávejte: mg fenazonu ve vzorku

Příloha

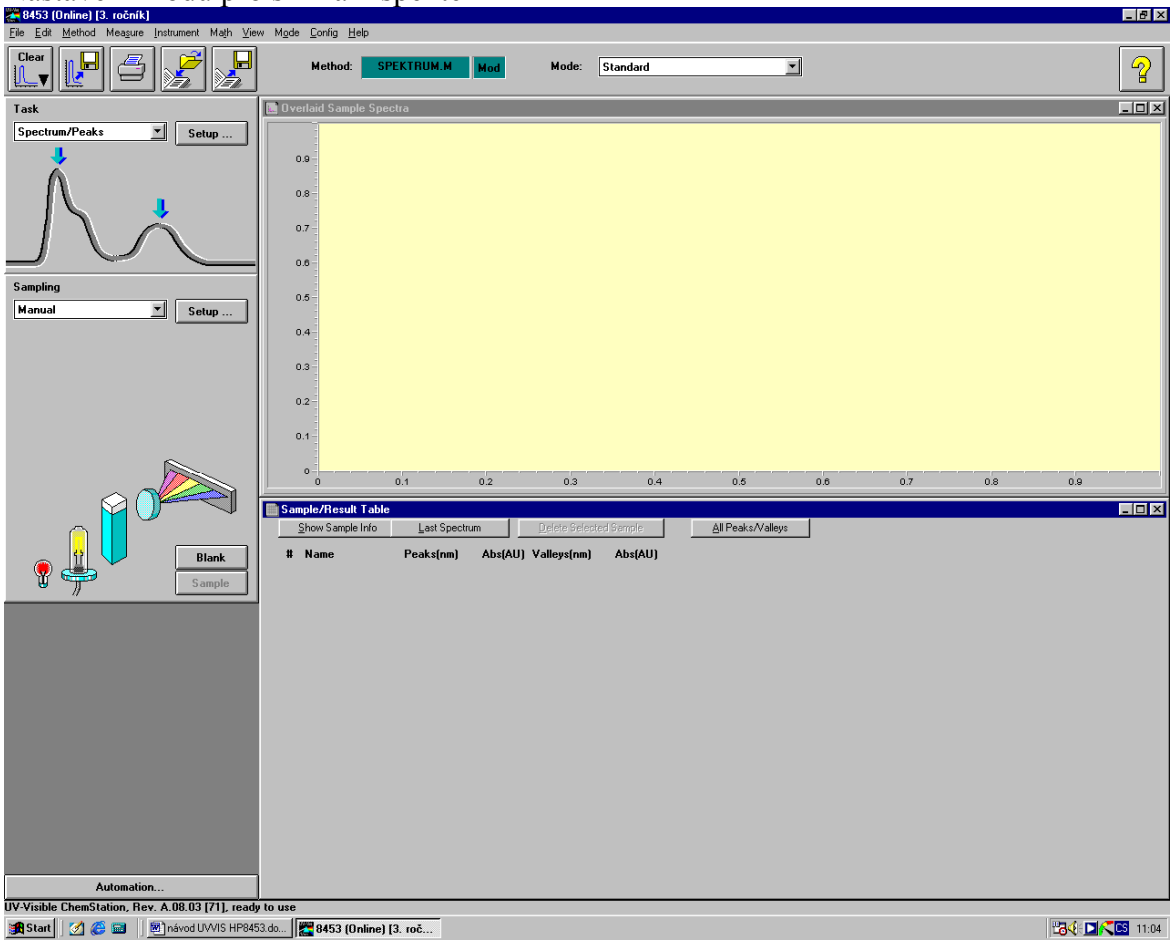
Komunikační okno pro HP 8453



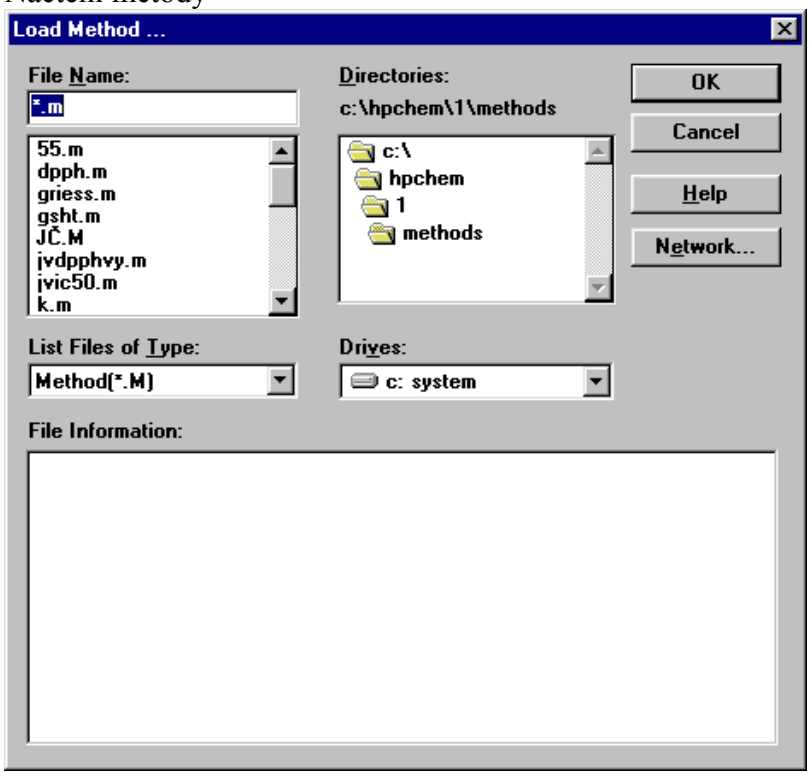
Úvodní obrazovka softwaru



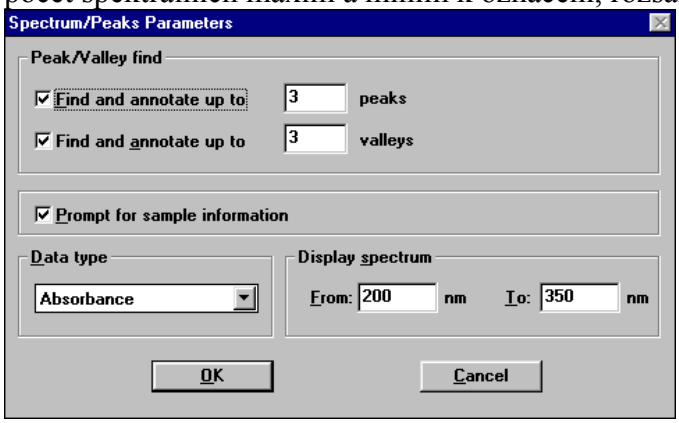
Nastavení módu pro snímání spekter



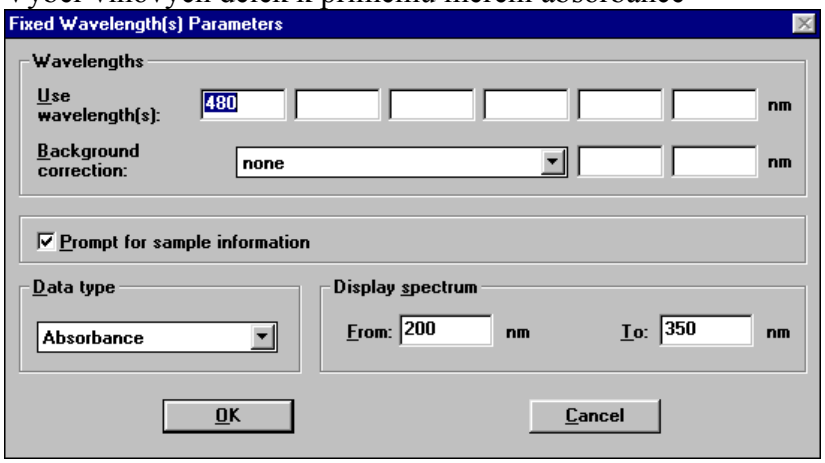
Načtení metody



Method setup:
počet spektrálních maxim a minim k označení, rozsah měření



Výběr vlnových délek k přímému měření absorbance



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

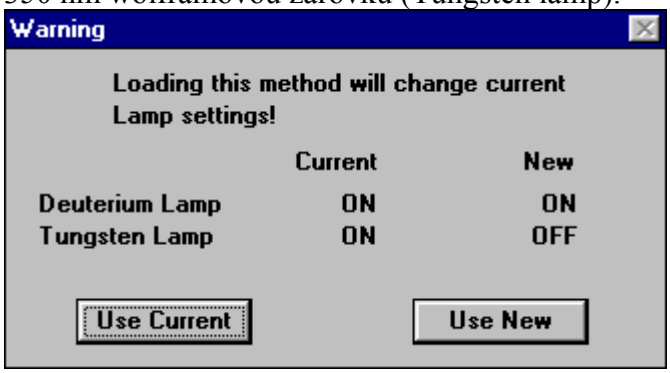
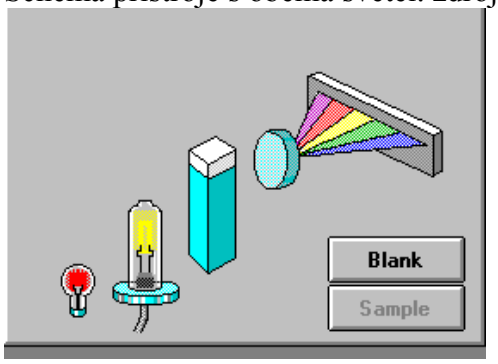
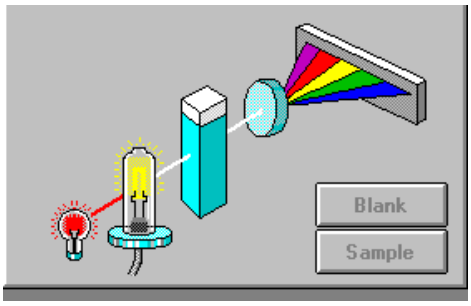
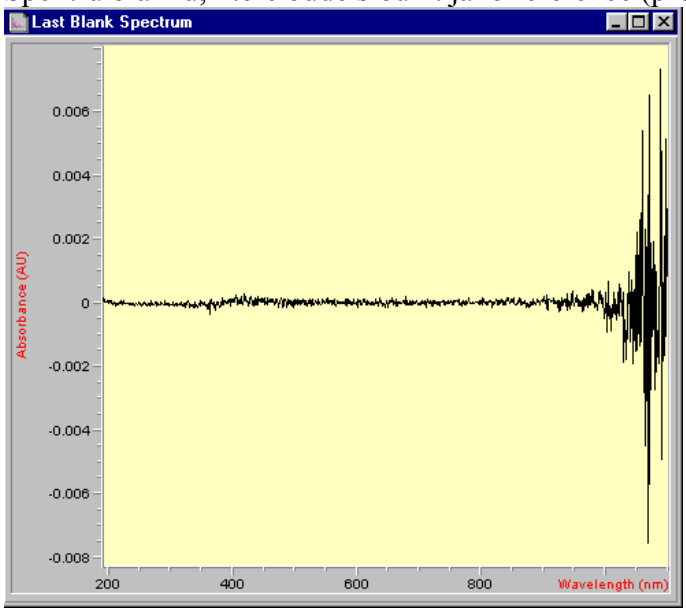


Schéma přístroje s oběma světel. zdroji zapnutými a při měření (blanku)

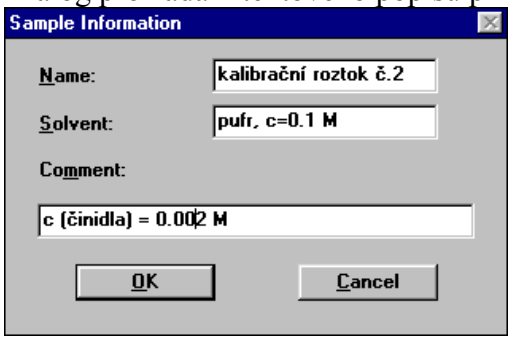




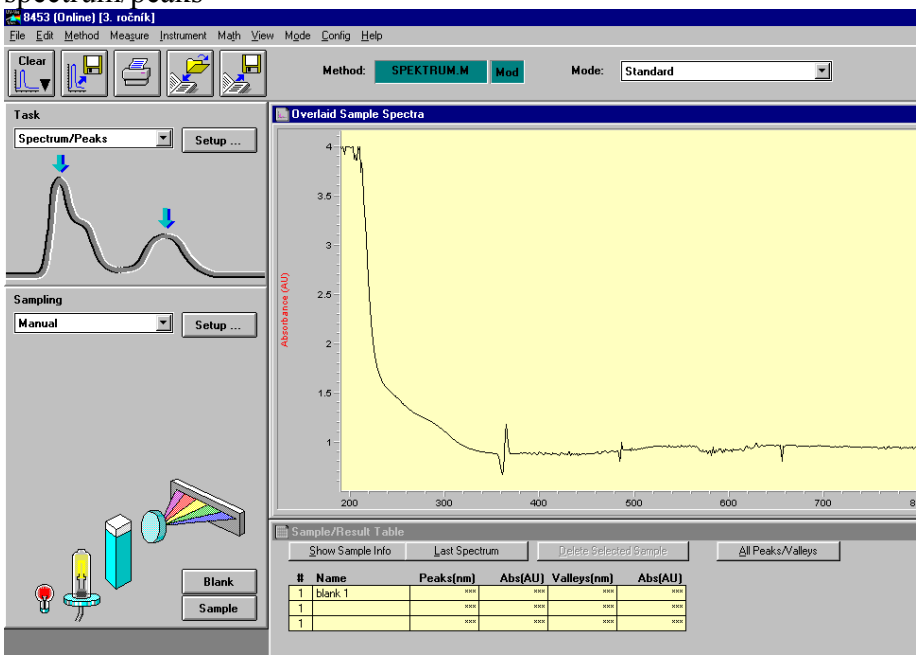
Spektru blanku, které bude sloužit jako reference (pro každou vlnovou délku)



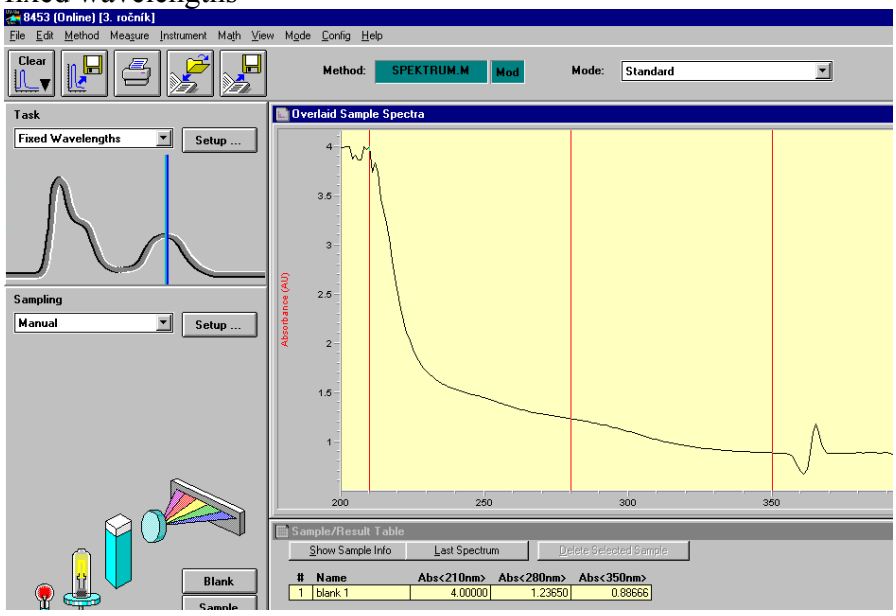
Dialog pro zadání textového popisu při měření vzorku



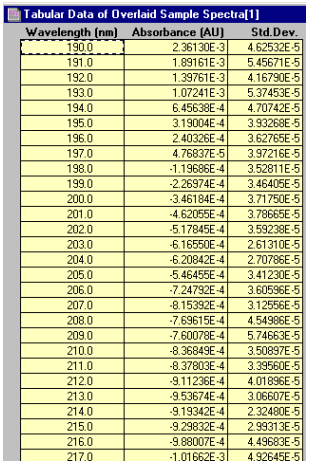
spectrum/peaks



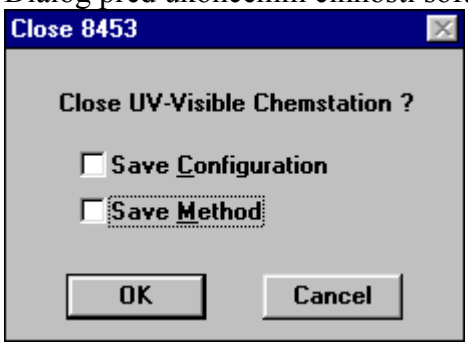
fixed wavelengths



dvojklik na spektrum →



Tabular Data of Overlaid Sample Spectra[1]

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	4.76837E-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	-4.62055E-4	3.78665E-5
202.0	-5.17845E-4	3.59238E-5
203.0	-6.16550E-4	2.61310E-5
204.0	-6.20842E-4	2.70786E-5
205.0	-5.46455E-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

Dialog před ukončením činnosti softwaru.