

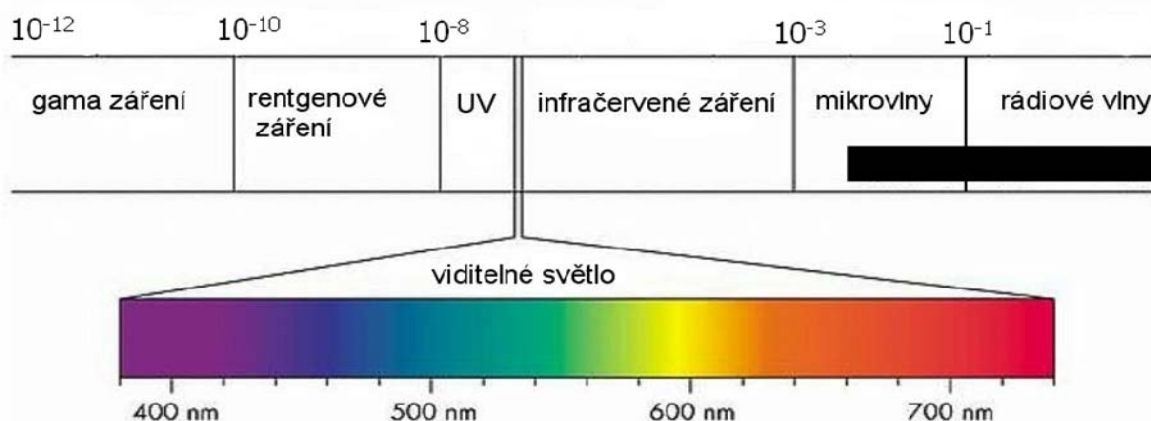
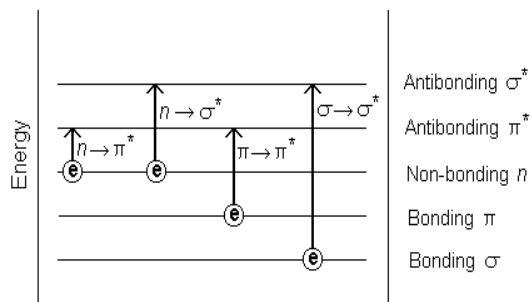
UV-VIS fotometrie

Spektrofotometrické stanovení mědi Chelatonem III s optimalizací podmínek

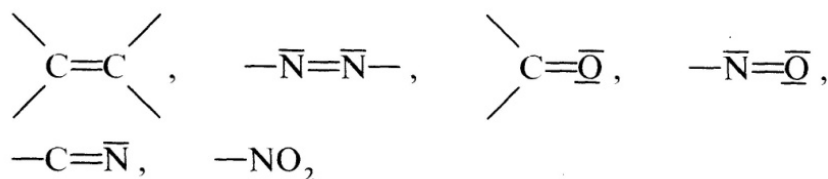
Teorie

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:

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

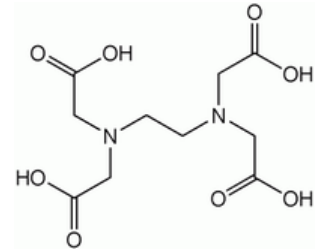
Výraz $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ je specifická absorbance, která vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g/l měřenou v 1cm vrstvě při definované vlnové délce:

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

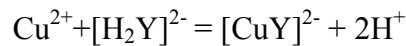
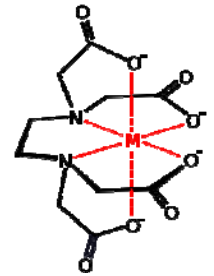
Optimalizace podmínek stanovení

Význam pH pro tvorbu chelátů

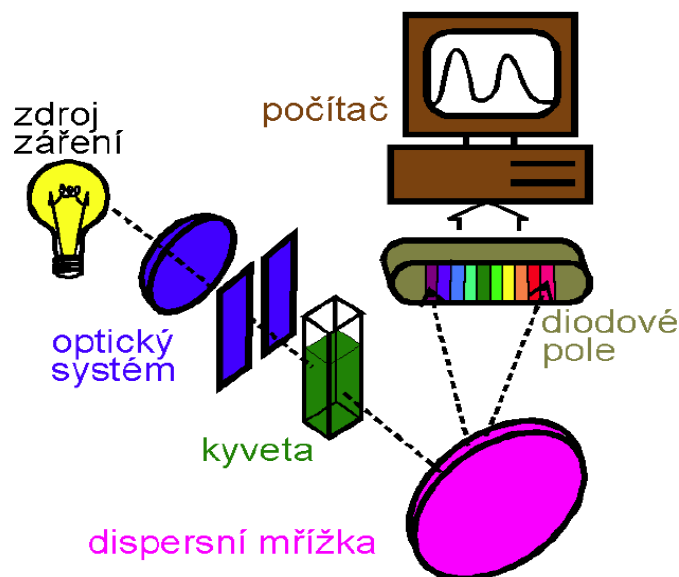
Komplexace kovových iontů je pro kvantitativní analýzu významná především u kyseliny ethylen-diamin-tetraoctové (EDTA), viz chelatometrie. Protože se jedná o čtyřsytou karboxylovou (slabou) kyselinu, její stupeň disociace α je silně ovlivněn pH prostředí.



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+}).



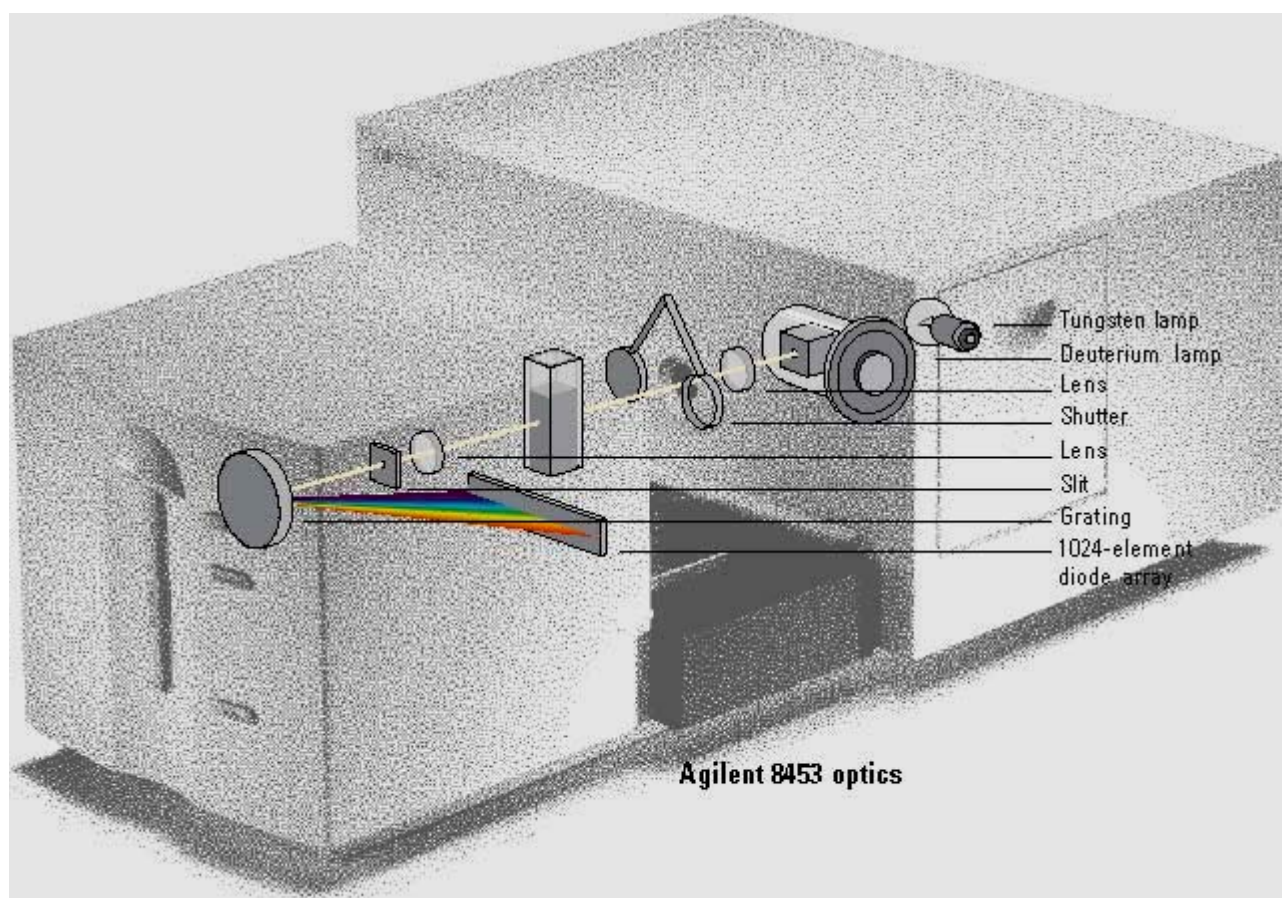
V našem případě komplex [Cu-Y] absorbuje ve viditelné oblasti spektra (je modrý), a proto lze s výhodou měřit jeho absorpenci v oblasti kolem 700 nm, kde už neabsorbují ani ostatní složky roztoku (především činidla), ani samotný Cu^{2+} , protože je kvantitativně vázán. Absorpční maximum komplexu [Cu-EDTA] 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 absorpance komplexu na koncentraci analytu (Cu).



Obr.3 Fotometr s diodovým polem HP 8453



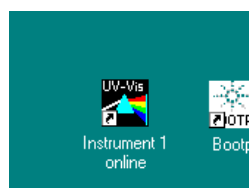
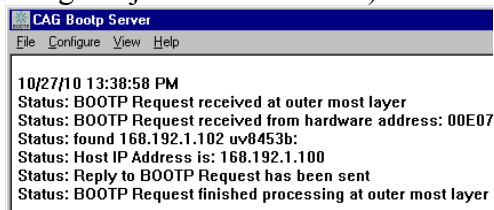
Obr. 4 Popis fotometru Hewlett Packard 8453



<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)

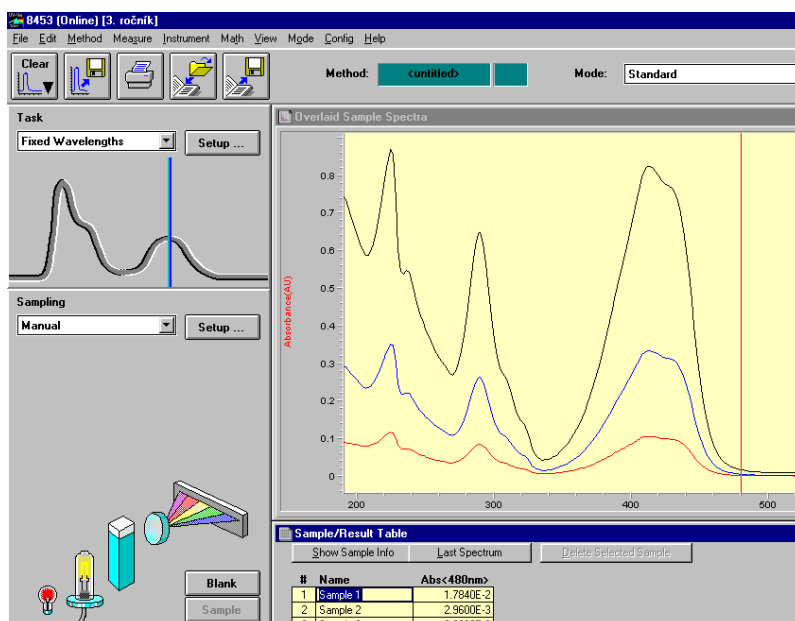


a pak teprve spustíme ovládací software Chemstation.

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 - pufrý (pH 3,0; 4,6; 6,0; 9,2 a 10,2).

Úkoly

- změření absorpčního spektra komplexu Cu-EDTA (400-740 nm) – výběr $\lambda(\max)$
- změření závislosti absorpance na pH – výběr pH
- změření závislosti absorpance na koncentraci Chelatonu3 – výběr $c(\text{Ch3})$
- změření kalibrační závislosti A vs. $c(\text{Cu})$ za optimálních podmínek
- stanovení Cu²⁺ v neznámém vzorku fotometricky
- srovnání se stanovením Cu přímou potenciometrií (ISE)

pozn.:

- měření absorpance 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 pufrým 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 absorpanci 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 $A = f(\text{pH})$: do pěti 50ml odměrných baňek odpipetujte po 5,00 ml základního roztoku CuSO₄ a 10,00 ml roztoku Chelatonu III. Odměrné baňky doplňte po rysku jednotlivými připravenými pufrými a promíchejte. Ke každému vzorku připravte odpovídajícím způsobem i porovnávací roztok (blank). Změřte absorpanci všech pěti roztoků proti příslušným slepým vzorkům (blankům) při vlnové délce λ_{\max} . Naměřené hodnoty vyhodnoťte graficky.

3. Závislost $A = f(c_{\text{Ch3}})$: 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).

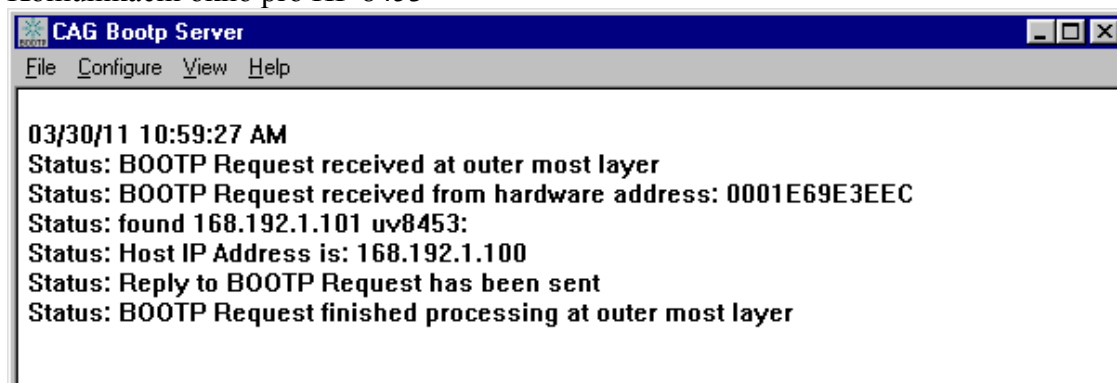
Stanovení Cu přímou potenciometrií (iontově selektivní elektrodou, ISE)

4. Podobně jako v bodě 4 připravte kalibrační roztoky CuSO_4 , ale doplňte do 50 ml vodou. Změřte potenciál všech kalibračních roztoků. Zkonstruujte kalibrační křivku: E (mV) vs. $c(\text{Cu})$
5. Podobně jako v bodě 5 připravte 10 x zředěný vzorek, doplňte do 50 ml vodou. Změřte pomocí ISE potenciál a hledanou koncentraci odečtete z kalibrační křivky. Přepočítejte na mg Cu ve 100 ml roztoku, který jste dostali k analýze. Porovnejte obě hodnoty.

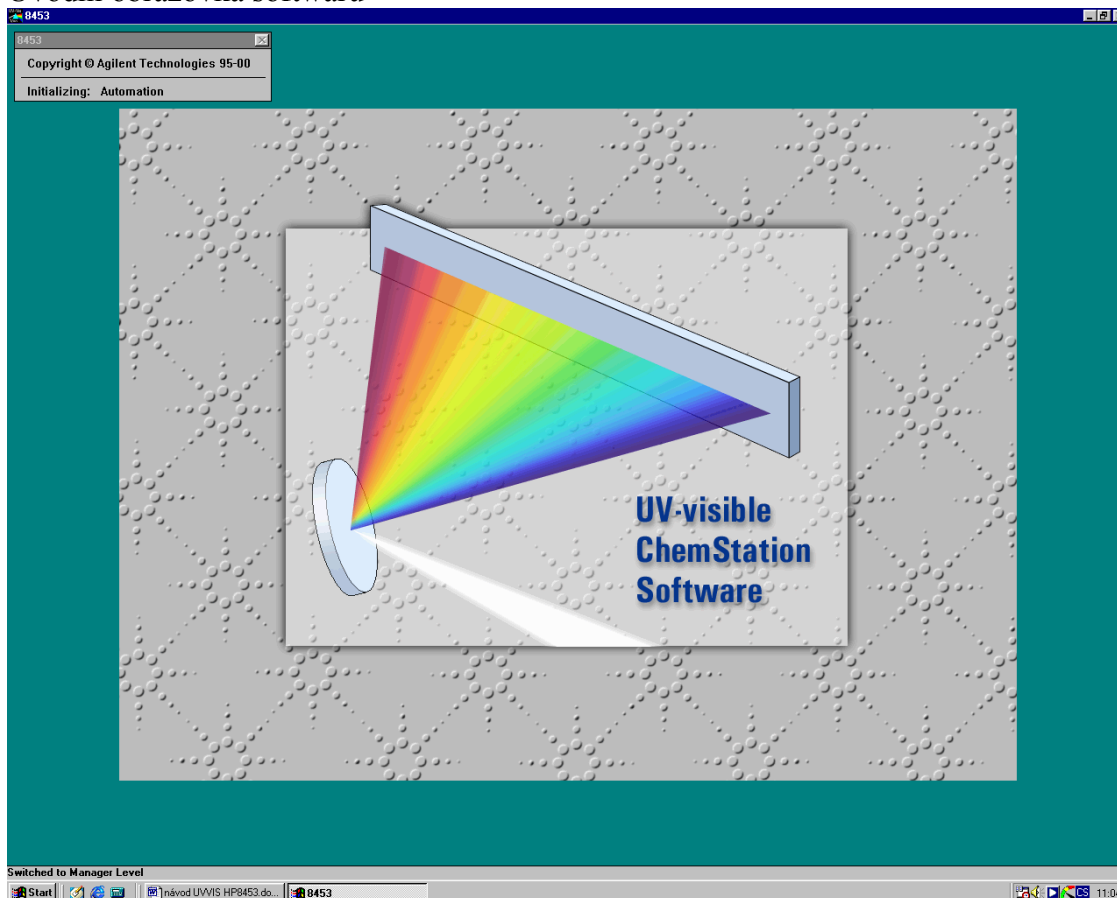
Příloha



Komunikační okno pro HP 8453



Úvodní obrazovka softwaru



Nastavení módu pro snímání spekter

The screenshot shows the HP8453 software interface. The title bar reads "8453 (Online) [3. ročník]". The menu bar includes File, Edit, Method, Measure, Instrument, Math, View, Mode, Config, and Help. The toolbar contains icons for Clear, Save, Print, and other functions. The main window is titled "Method: SPEKTRUM.M Mod" and "Mode: Standard".

The interface is divided into several sections:

- Task:** A dropdown menu set to "Spectrum/Peaks" with a "Setup ..." button. Below it is a small plot showing two peaks with blue arrows pointing to their maxima.
- Sampling:** A dropdown menu set to "Manual" with a "Setup ..." button.
- Automation:** A section with a diagram of a spectrometer and buttons for "Blank" and "Sample".
- Overlay Sample Spectra:** A large plot area with a yellow background and axes ranging from 0 to 0.9.
- Sample/Result Table:** A table with columns: #, Name, Peaks(nm), Abs(AU), Valleys(nm), Abs(AU). Buttons above the table include "Show Sample Info", "Last Spectrum", "Delete Selected Sample", and "All Peaks/Valleys".

The status bar at the bottom indicates "UV-Visible ChemStation, Rev. A.08.03 [71], ready to use" and shows the system tray with the time 11:04.

Načtení metody

The "Load Method ..." dialog box is shown. It has a title bar with "Load Method ..." and a close button. The dialog is organized into several sections:

- File Name:** A text field containing ".m".
- Directories:** A list box showing the path "c:\hpchem\1\methods".
- List Files of Type:** A dropdown menu set to "Method(*.M)".
- Drives:** A dropdown menu set to "c: system".
- File Information:** A large empty text area.

On the right side of the dialog, there are buttons for "OK", "Cancel", "Help", and "Network...". The file list on the left contains the following entries:

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

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).

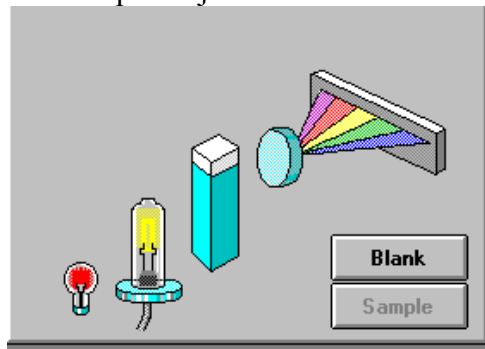
Warning

Loading this method will change current Lamp settings!

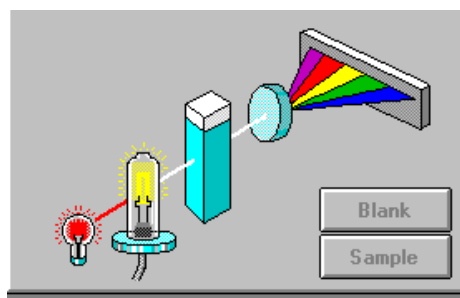
	Current	New
Deuterium Lamp	ON	ON
Tungsten Lamp	ON	OFF

Use Current Use New

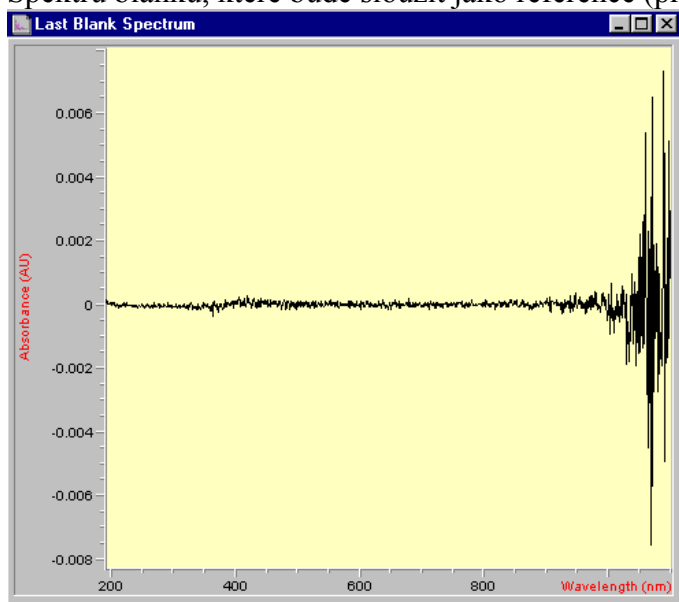
Schéma přístroje s oběma světel. zdroji zapnutými



a při měření (blanku)



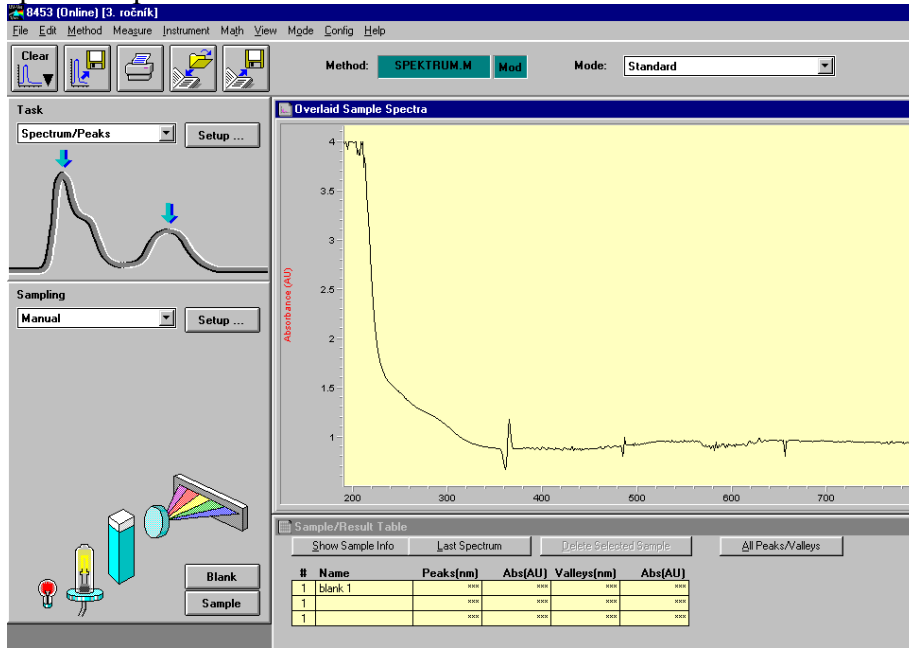
Spektru blanku, které bude sloužit jako reference (pro každou vlnovou délku)



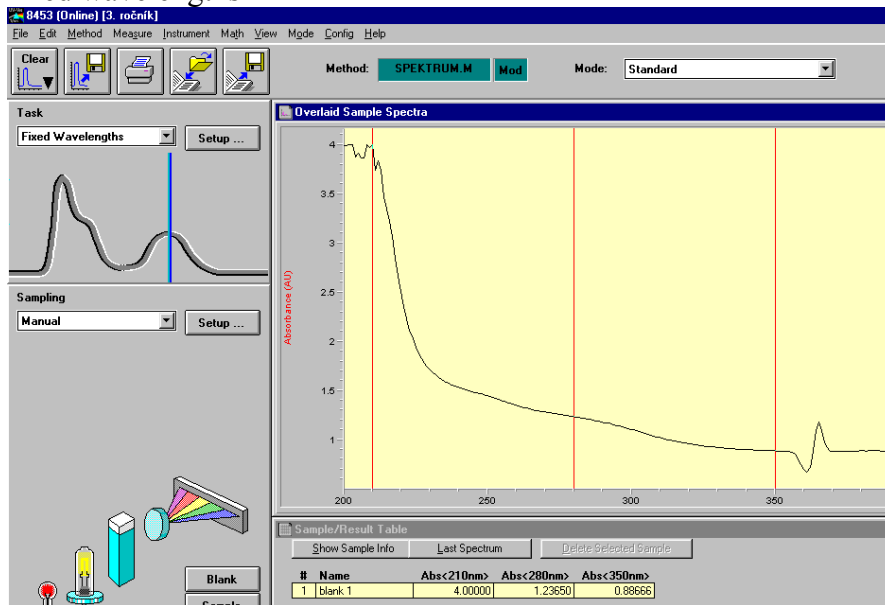
Dialog pro zadání textového popisu při měření vzorku

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 are 'OK' and 'Cancel' buttons.

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	-8.88007E-4	4.49683E-5
217.0	-1.01662E-3	4.92645E-5

dvojklik na spektrum →

Dialog před ukončením činnosti softwaru.

