

Imię i nazwisko studenta	Data	Ocena	Podpis prowadzącego

KOLORYMETRIA

Na ćwiczeniach obowiązuje materiał zawarty w podręczniku:

R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2” –

rozdz. 1.4.2 (str. 21 – 23); 5.1 – 5.1.4 (str. 56 – 64);

5.5 – 5.5.5.5 (str. 83 – 104)

Spektrofotometria absorpcyjna, która dzieli się na absorpcjometrię w świetle widzialnym (kolorymetrię) oraz absorpcjometrię w nadfiolecie i podczerwieni zaliczana jest do metod optycznych analizy chemicznej.

Spektrofotometria absorpcyjna w zakresie światła widzialnego (kolorymetria) jest najszerszej stosowaną metodą instrumentalną ze względu na jej dużą precyzję, czułość i dostępność aparatury.

Podstawowym kryterium tej metody jest **selektywna absorpcja promieniowania** świetlnego przez roztwór badanej substancji.

Światło widzialne białe składa się z fal elektromagnetycznych o długościach 380 – 780 nm. Barwa ciała świadczy o tym, że przepuszcza ono lub absorbuje promieniowanie z zakresu widzialnego w sposób selektywny. Zabarwienie obserwowane jest dopełnieniem barwy promieniowania absorbowanego.

Do kolorymetrycznego oznaczania wykorzystuje się barwę własną jonu oznaczanego pierwiastka lub związku, w który został przeprowadzony w wyniku reakcji. Oznaczenie kolorymetryczne składa się z dwóch etapów:

1. otrzymywanie barwnego połączenia zawierającego oznaczany pierwiastek
2. wykonanie pomiaru absorpcji roztworu zawierającego badany związek.

Metodą spektrofotometrii absorpcyjnej można oznaczać prawie wszystkie pierwiastki w szerokim zakresie stężeń. Zaletą metod kolorymetrycznych jest duża szybkość wykonywania oznaczeń oraz możliwość oznaczania bardzo małych ilości substancji ze stosunkowo dużą dokładnością.

Spektrofotometria UV/VIS

Absorpcja promieniowania z zakresu światła widzialnego i ultrafioletu zależy od struktury cząsteczki. Absorpcja promieniowania powoduje przejścia elektronów ze stanów podstawowych na wyższe poziomy energetyczne – *stany wzbudzone*. Promieniowanie ultrafioletowe jest w stanie powodować przejścia elektronów wiązań typu $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (wiązania wielokrotne), a światło z zakresu widzialnego, niosąc jeszcze mniej energii, powoduje przejścia o jeszcze mniejszej różnicy między stanem podstawowym a wzbudzonym (sprzężone wiązania wielokrotne).

Jeżeli na próbkę (o grubości l) pada promieniowanie monochromatyczne (promieniowanie o jednej długości fali) o natężeniu I_0 to część tego promieniowania zostanie rozproszona I_x , część zostanie zaabsorbowana I_a , a część przejdzie przez badaną próbkę I_T .

$$I_0 = I_a + I_x + I_T$$

Promieniowanie rozproszone jest dużo mniejsze od promieniowania padającego stąd:

$$I_0 = I_a + I_T$$

Stosunek natężenia wiązki promieniowania po przejściu przez absorbujące środowisko I_T do natężenia wyjściowego I_0 wyrażony w procentach nazywamy **transmitancją** ($T = I_T / I_0$). Drugim ważnym pojęciem związanym z pochłanianiem energii promienistej przez substancje jest pojęcie **absorbancji** (A), którą definiujemy jako logarytm dziesiętny z odwrotności transmitancji

W zakresie światła widzialnego i ultrafioletu efekt absorpcji promieniowania występuje tylko w tych związkach, które posiadają ugrupowania atomów zawierające ruchliwe elektrony (π), bądź wiązania wielokrotne. W przypadku związków absorbujących światło z zakresu widzialnego (związki barwne dla oka ludzkiego), w cząsteczce muszą występować określone ugrupowania atomów. Noszą one nazwę chromoforu. **Chromofor** – część cząsteczki, która jest bezpośrednio odpowiedzialna za absorpcję promieniowania (w obrębie, której zachodzi zjawisko pochłonięcia energii). Przykładem grup chromoforowych są: grupa azowa, grupa nitrowa, pierścienie aromatyczne. Obok grup chromoforowych w cząsteczce mogą występować **ugrupowania auksochromowe**, do których zaliczamy między innymi grupę aminową czy hydroksylową. Są to podstawniki w cząsteczce, które same nie absorbują promieniowania, ale ich obecność powoduje wzrost intensywności

zabarwienia.

Istnieją dwa podstawowe **prawa absorpcji światła**, które dotyczą zależności natężenia światła przechodzącego od natężenia światła padającego, oraz od stężenia warstwy absorbującej i jej grubości.

Prawo Lamberta i Beera – istnieje proporcjonalna zależność pomiędzy stężeniem, grubością warstwy absorbującej i absorbancją.

(- molowy współczynnik absorpcji,
c – stężenie [mol/l],
l – grubość warstwy [cm].

Prawo addytywności – absorbancja jest wielkością addytywną tzn. absorbancja mieszaniny n składników jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników

Graficznym zapisem zmian absorbancji od długości fali przechodzącej przez roztwór jest **widmo absorpcji**.

Spektrofotometria UV/VIS znalazła szerokie zastosowanie w analizie chemicznej. Jednym z zastosowań jest analiza ilościowa. W celu wyznaczenia zawartości (stężenia) dowolnego związku najlepiej zastosować metodę krzywej wzorcowej. W tym celu należy przygotować serię roztworów badanego związku o znanym stężeniu (roztwory wzorcowe). Następnie wyznaczyć analityczną długość fali dla roztworu o największym stężeniu (długość fali, przy której absorbancja jest największa) i przy tej długości fali dokonać pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych oraz pomiaru absorbancji badanego roztworu (A_x). Na wykresie zależności absorbancji od stężenia wykreśla się prostą i odczytuje z niej stężenie badanego związku.

Rozwój spektrofotometrycznych metod oznaczania jest ściśle związany z rozwojem chemii kompleksów.

Metody spektrofotometryczne z zastosowaniem krzywej wzorcowej są metodami porównawczymi. Dokładność ich w dużej mierze zależy od dokładnego i właściwego przygotowania roztworów wzorcowych, które służą do przygotowania serii wzorców.

KOLORYMETRYCZNE OZNACZANIE Fe(III) METODĄ RODANKOWĄ

Wykonywane oznaczenie opiera się na powstawaniu krwisto-czerwonego kompleksu żelaza z rodankiem w środowisku kwaśnym. W wyniku stopniowego tworzenia się kompleksów w roztworze mogą powstawać żelazowo-rodankowe kompleksy o składzie $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{SCN})_2^+$ itd. aż do $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$. Stężenie reagentów i pH środowiska decydują, które z kompleksów przeważają w roztworze. Kompleksy o wyższym stosunku $\text{SCN}^-:\text{Fe(III)}$ wykazują intensywniejsze zabarwienie. Aby otrzymane wyniki były powtarzalne niezbędne jest stosowanie dużego nadmiaru rodanku i stałego pH ok. 1.

Zabarwienia wodnych kompleksów żelazowo-rodankowych nie są trwałe, co tłumaczy się redukującym działaniem rodanków na jony Fe(III). Należy wobec tego pomiary przeprowadzać bezpośrednio po przygotowaniu roztworów.

Odczynniki i aparatura:

Specol 11

Rodanek potasowy KSCN o c=10%

Kwas azotowy (1:3)

Roztwór podstawowy Fe(III) o $c=1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/l (0,1mg/ml)

Wykonanie oznaczenia:

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej należy do czterech kolb miarowych o pojemności 100 ml oznaczonych numerami 1, 2, 3, 4 odmierzyć pipetą 1, 2, 3, 4 ml roztworu podstawowego Fe(III). W kolbie oznaczonej X student otrzymuje od asystenta odmierzoną ilość roztworu Fe(III).

Do każdej kolbki należy dodać 3 ml kwasu azotowego (1:3) i 5 ml roztworu rodanku potasowego. Po ustaleniu się zabarwienia roztwory w kolbach uzupełnić do kreski wodą destylowaną. W kolbce oznaczonej numerem „0” przygotować odnośnik dodając roztwory wszystkich odczynników z wyjątkiem Fe(III) (tj. 3 ml HNO_3 i 5 ml KSCN) i uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Wszystkie roztwory starannie wymieszać.

Kuwetę o grubości $l=1$ cm napełnić roztworem o największym stężeniu (4), a drugą

odnośnikiem (0) i przeprowadzić pomiar absorbancji w zakresie długości fal od 400 nm do 600 nm zmieniając długość fali co 20 nm.

Aby dobrać optymalną długość fali, przy której ma być wykonywany pomiar absorbancji, należy znać przebieg krzywej absorpcji barwnego kompleksu.

Wyniki pomiarów absorbancji zamieścić w tabeli.

Długość fali [nm]	A
400	
420	
440	
460	
480	
500	
520	
540	
560	
580	
600	

Przy długości fali λ_{\max} dla której absorbancja ma największą wartość należy wykonać pomiary absorbancji roztworów (4, 3, 2, 1, X).

Wyniki zebrać w tabeli.

Kolba nr	Fe(III) mg/ml	A
1		
2		
3		
4		
X		

W maksimum pasma absorpcji absorbancja A jest wprost proporcjonalna do stężenia oznaczanego składnika (prawo Lamberta-Beera). Sporządzić wykres zależności absorbancji

od stężenia $A = f(c)$ i z wykresu odczytać nieznane stężenie Fe(III) roztworu X.

Imię i nazwisko studenta	Data	Ocena	Podpis prowadzącego

SPEKTROFOTOMETRYCZNE BADANIA ZMIAN KRZYWYCH ABSORPCJI W FUNKCJI pH

Na ćwiczeniach obowiązuje materiał zawarty w podręczniku:

R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2” –

rozdz. 1.4.2 (str. 21 – 23); 5.1 – 5.1.4 (str. 56 – 64);

5.5 – 5.5.5.5 (str. 83 – 104)

Aktywność biologiczna związków chemicznych jest ściśle związana z ich parametrami fizykochemicznymi. Decydują one bowiem o szybkości wchłaniania, dystrybucji, biotransformacji w organizmie oraz przebiegu zmian stężenia metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach.

Prawdopodobieństwo dotarcia leku do miejsca receptorowego jest zależne w znacznej mierze od równowagi kwasowo-zasadowej.

Większość związków biologicznie czynnych należy do grupy słabych elektrolitów ulegających w roztworach wodnych częściowej dysocjacji elektrolitycznej, a ich losy w organizmie są szczególnie uzależnione od wartości stałej dysocjacji K i pH środowiska, w którym się znajdują.

Wartość pH środowiska zmienia bowiem w zasadniczy sposób stopień jonizacji związków i ich rozpuszczalność, a co za tym idzie dostępność biologiczną.

Zatem wyznaczenie parametru pK związków biologicznie czynnych ma na celu ocenę właściwości kwasowo-zasadowych potencjalnych leków.

Wiadomo, że indykatory pod wpływem różnych wartości pH zmieniają zabarwienie, co powoduje zmiany w widmie absorpcji danego związku przy jego przejściu z formy niezdysocjowanej w formę zdysocjowaną.

Związki będące słabymi kwasami lub zasadami, mogą zmieniać swoją absorbancję w nadfiolecie w zależności od występowania związku w formie zdysocjowanej lub niezdysocjowanej. Zjawisko zmian absorpcji roztworów pod wpływem zmian pH występujące dość często, może być wykorzystane do wyznaczania stałych dysocjacji słabych, a nawet bardzo słabych kwasów i zasad. Związki, których stałe dysocjacji można wyznaczyć spektrofotometrycznie, muszą jednak spełniać określone warunki tzn. charakteryzować się odpowiednio dużymi wartościami współczynników absorpcji, oraz dużymi różnicami widm absorpcji formy zdysocjowanej i niezdysocjowanej.

Krzywe absorpcji tych dwóch form przecinają się w tzw. punkcie izozbestycznym.

Punkt izozbestyczny jest to punkt (przy określonej długości fali), w którym obie formy (zdysocjowana i niezdisocjowana) mają jednakowe molowe współczynniki absorpcji i wobec tego zmiana pH środowiska stężenia jednej z form kosztem drugiej nie wpływa na zmianę jego położenia.

Aldehyd p-hydroksybenzoesowy jest słabym kwasem organicznym i dysocjuje wg równania:

Przy niskich wartościach pH związek występuje tylko w formie kwasowej, przy wysokich wartościach pH – w formie anionowej (zasadowej), wobec czego w tych zakresach widma nie zależą od pH. Widma absorpcyjne zmieniają się tylko w obszarze bliskim pK, co wykorzystuje się do wyznaczania pK metodą spektrofotometryczną.

Ażeby utrzymać stałe i znane pH podczas wykreślenia krzywych absorpcyjnych mieszanin obu form, pomiary dokonuje się w odpowiednio dobranym roztworze buforowym. Długości fal dogodne do obliczeń wybiera się w ten sposób, aby leżały one w zakresie widma, w którym przy niewielkiej zmianie pH występują duże zmiany absorpcji (nie za blisko punktu izozbestycznego), a równocześnie, żeby w danym przedziale krzywe nie były zbyt strome.

W celu obliczenia wartości pK stosuje się równania wywodzące się ze stałej równowagi.

Równania 1 i 2 stosuje się wówczas, gdy grupą funkcyjną jest grupa kwasowa. Gdy grupa funkcyjna ma charakter zasadowy stosuje się równanie 3 i 4.

A_j – absorbancja formy zjonizowanej

A_m – absorbancja formy niezjonizowanej

A – absorbancja mieszanin

WYZNACZNIE pK NA PRZYKŁADZIE ALDEHYDU
p-HYDROKSYBENZOESOWEGO

Pomiary przeprowadzono na spektrofotetrze dwuwiązkowym UV-VIS PYE-4.

1. Przygotowano roztwory o właściwym stężeniu i odpowiednim pH wg tabeli:

	Numer kolby						
Kolby 25 ml	1	2	3	4	5	6	7
ml roztw.aldehydu $c=1 \cdot 10^{-3}$ mol/l	1	1	1	1	1	1	1
ml bufory	-	2	2	2	2	2	2
pH	-	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
ml HCl $c=0,1$ mol/l	2,5	-	-	-	-	-	-
ml KCl $c=0,1$ mol/l	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
pH roztworów po wymieszaniu							

Wszystkie kolbki uzupełnić wodą destylowaną do kreski, wymieszać, wykreślić krzywe absorpcji.

Odczytane z widma wartości absorpcji przy długości fali.....nm zebrano w tabeli.

c = const. =.....		nm =.....		$\mu = 0,1$	
Lp.	pH	A_j	A_m	A	pK
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					

Obliczenia wykonano wg wzoru.....

Obliczona średnia wartość pK aldehydu p-hydroksybenzoesowego wynosi: