

ABSORPCJA ROZTWORÓW BARWNIKÓW ORGANICZNYCH. ANALIZA SKŁADU ROZTWORU

Aparatura

1. Spektrofotometr
2. Roztwór fluoresceiny $2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ (200 μM)
3. Roztwór rózu bengalskiego $2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ (200 μM)

Przebieg ćwiczenia

I. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW BARWNIKÓW DO POMIARÓW

1. Stężenia wyjściowe wodnych roztworów dwóch barwników: fluoresceiny (**FL**) i rózu bengalskiego (**RB**) wynoszą $2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ (200 μM).
2. Z roztworu wyjściowego każdego barwnika sporządzić serię roztworów o stężeniach: **2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 $\mu\text{mol/dm}^3$** i końcowej objętości równej **10 cm^3** . Do rozcieńczania użyć wody destylowanej. Roztwory dokładnie wymieszać (cylinderek zatkać korkiem i kilkakrotnie ostrożnie przechylić go. Przed mieszaniem kolejnych roztworów korek należy osuszyć przy pomocy ligniny).

II. WYZNACZENIE MOLOWEGO WSPÓŁCZYNNIKA ABSORBANCJI DLA BADANYCH BARWNIKÓW

A. POMIARY

Włączyć spektrofotometr przełącznikiem znajdującym się z tyłu obudowy. Następnie odczekać co najmniej 15 minut. W tym czasie przygotowywać roztwory do pomiarów.

Przed pomiarami odczytać z wykresu widm absorpcyjnych analityczną długość fali (z dokładnością do 1 nm) dla pasma monomeru fluoresceiny (FL) i rózu bengalskiego (RB), a następnie wpisać je do tabeli I.

UWAGA 1: Podczas uruchamiania spektrofotometru nie podnosić pokrywy komory pomiarowej

UWAGA 2: kuwety należy wkładać (wyjmować) trzymając wyłącznie za boczne (matowe) ścianki.

UWAGA 3: Nie wylewać roztworów FL i RB o stężeniu 8 $\mu\text{mol/dm}^3$, użytych do sporządzania mieszaniny, będą potrzebne do dalszych pomiarów.

1. Wstawić do komory pomiarowej spektrofotometru kuwetę napełnioną wodą destylowaną w taki sposób, aby niewielki, matowy trójkąt znajdujący się na górnej części kuwety pokrywał się z białą linią wewnątrz komory pomiarowej. Zamknąć pokrywę.
2. Za pomocą klawisza „A/T/C” ustawić tryb pomiaru na absorpcję – w prawym dolnym rogu wyświetlacza powinna pojawić się wówczas duża litera A.
3. Przy pomocy przycisków oznaczonych „100”, „010” i „001” nastawić analityczną długość fali dla fluoresceiny odczytaną z wykresu i zapisaną w tabeli I. Pierwszy z tych przycisków służy do ustawienia długości fali rzędu setek nanometrów, drugi dziesiątek, a trzeci jedności.

4. Wyzerować aparat przy ustawionej długości fali przyciskając klawisz „BLANK”.
5. Wyciągnąć kuwetę z wodą destylowaną.
6. Napełnić drugą suchą kuwetę pomiarową wodnym roztworem fluoresceiny o **najniższym** ze sporządzonych stężeń i włożyć ją w miejsce, w którym znajdowała się kuweta z wodą destylowaną. Zamknąć pokrywę pomiarową, następnie po kilku sekundach odczytać wartość absorbancji z wyświetlacza i wpisać ją do odpowiedniego wiersza w tabeli 2.
7. Wylać roztwór z kuwety, odwrócić kuwetę do góry dnem i osuszyć ją poprzez przyciśnięcie jej do ligniny. Następnie należy wlać do kuwety roztwór o następnym, wyższym stężeniu i postąpić tak jak w poprzednim punkcie (6).
8. Analogiczne pomiary przeprowadzić dla roztworów rózu bengalskiego.

B. GRAFICZNE PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW POMIARÓW

1. Dane zebrane w tabeli 2 przedstawić **na jednym układzie współrzędnych** w formie wykres funkcji $A(c) = \epsilon \cdot l \cdot c$ (absorbancja od stężenia).
2. Na podstawie sporządzonego wykresu wyznaczyć graficznie wartość molowego współczynnika absorpcji (ϵ) dla badanych barwników i wpisać otrzymaną wartość w odpowiednie ramki, pod tabelą II.

III. ANALIZA ROZTWORU DWUSKŁADNIKOWEGO

1. Roztwór dwuskładnikowy należy przygotować przez zmieszanie **różnych** ściśle określonych objętości (większej objętości FL i mniejszej objętości RB) roztworów barwników o najwyższym stężeniu $c = 8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, sporządzonych w pkt. I.2. Wpisać te objętości do tabeli III.1.

2. Wyznaczanie stężenia fluoresceiny i rózu bengalskiego w roztworze dwuskładnikowym.

Analiza widm absorpcyjnych obu barwników dostarcza dwóch bardzo ważnych informacji:

- a. dla długości fal z zakresu od ok. 530 nm do ok. 560 nm absorpcja roztworu fluoresceiny jest praktycznie równa zero,
- b. dla długości fal z zakresu od ok. 450 nm do ok 520 nm absorpcja roztworu dwuskładnikowego jest sumą absorpcji rózu bengalskiego i fluoresceiny.

Z tego względu do obliczenia stężenia fluoresceiny (x_{FL}) i rózu bengalskiego (x_{RB}) w roztworze dwuskładnikowym **należy przygotować do pomiarów trzy roztwory w trzech kuetach**: roztwór dwuskładnikowy, roztwór RB ($8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i roztwór FL ($8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i następnie odczytać absorbancję tych trzech roztworów przy dwóch długościach fali: $\lambda_1 = 490 \text{ nm}$ i $\lambda_2 = 495 \text{ nm}$, **oraz dodatkowo** odczytać absorbancję roztworu dwuskładnikowego **przy długości fali, przy której położone jest maksimum pasma absorpcyjnego RB**.

- zmierzone wartości absorbancji roztworów wpisać do tabeli III.2 i III.3,
- obliczyć i zapisać brakujące wielkości w tabeli III.2.

Uwzględniając addytywność absorpcji obu barwników, zmierzone absorbancje tych roztworów spełniają równanie:

$$\frac{A(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)} = \frac{x_{\text{FL}}}{c_{\text{FL}}} + \frac{x_{\text{RB}}}{c_{\text{RB}}} \frac{A_{\text{RB}}(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)}$$

Należy zauważyć, że równanie to przedstawia funkcję liniową $y(k) = b + a \cdot k$, gdzie:

$$y(k) = \frac{A(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)}, \quad b = \frac{x_{\text{FL}}}{c_{\text{FL}}}, \quad a = \frac{x_{\text{RB}}}{c_{\text{RB}}}, \quad k = \frac{A_{\text{RB}}(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)}$$

Stężenie fluoresceiny i rózu bengalskiego w roztworze dwuskładnikowym oblicza się z zależności:

$$X_{\text{FL}} = b C_{\text{FL}} \qquad X_{\text{RB}} = c_{\text{RB}} \text{ tg } \alpha,$$

gdzie c_{FL} oraz c_{RB} są stężeniami roztworów barwników użytych do sporządzenia roztworu dwuskładnikowego oraz b i $\text{tg}\alpha$ są parametrami odczytanymi z wykresu.

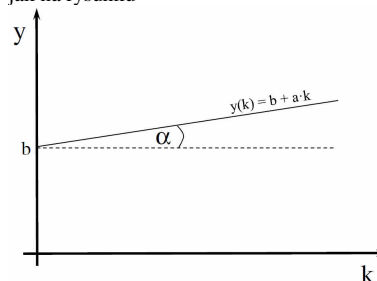
Wykres sporządza się na podstawie danych z tabeli III.2.

Prawidłowo wykreślona linia jest nachylona pod

kątem α spełniającym zależność: $\text{tg}\alpha = \frac{X_{RB}}{C_{RB}}$

i powinna przecinać oś pionową w punkcie $b = \frac{X_{FL}}{C_{FL}}$.

Przy prawidłowo przeprowadzonych pomiarach dla roztworu dwuskładnikowego, linia przechodząca przez dwa wyznaczone punkty powinna utworzyć z osią k kąt α , tak jak na rysunku



3. **Wyznaczenie stężenia różu bengalskiego w roztworze dwuskładnikowym na podstawie krzywej wzorcowej.** Na podstawie informacji III.2.a, stężenie różu bengalskiego w roztworze dwuskładnikowym można odczytać bezpośrednio z krzywej wzorcowej, sporządzonej dla tego barwnika w punkcie II.B.1.

W tym celu należy:

- zaznaczyć odczytaną absorbancję na krzywej wzorcowej dla RB, sporządzanej w punkcie II B.1 i odczytać z tej krzywej stężenie RB,
- odczytane stężenie RB w roztworze dwuskładnikowym zapisać w tabeli III.3 formularza.

Wyznaczone w ten sposób stężenie RB w roztworze dwuskładnikowym należy potraktować jako sprawdzenie wartości stężenia tego barwnika wyznaczone w punkcie III.2.

4. Na podstawie znajomości objętości i stężenia roztworów użytych do przygotowania roztworu dwuskładnikowego, obliczyć teoretyczne stężenie barwników w tym roztworze i wpisać je do tabeli III.4 formularza. Wartości stężeń RB i FL obliczone teoretycznie (tabela III.4) powinny być w przybliżeniu równe wartościom stężeń RB i FL wyznaczone zgodnie z procedurą opisaną w pkt. III.2 (tabela III.2).

Wymagane wiadomości teoretyczne

- Na czym polega metoda analityczna nazywana spektroskopią?
- Omówić typy wiązań chemicznych w cząsteczkach związków organicznych i podać nazwy orbitali molekularnych.
- Co nazywamy chromoforem w strukturze cząsteczki organicznej?
- Wyjaśnić pojęcia: stan podstawowy cząsteczki, stan wzbudzony cząsteczki.
- Wymienić rodzaje przejść elektronowych w cząsteczkach związków organicznych.
- Co nazywamy spektroskopią UV/VIS?
- Prawa absorpcji światła:
 - prawo Lamberta (I prawo absorpcji)
 - prawo Lamberta-Beera (II prawo absorpcji)
 - prawo addytywności absorpcji (III prawo absorpcji)
- Co nazywamy elektronowym widmem absorpcyjnym i przy pomocy jakich parametrów opisujemy takie widmo?
- Wyjaśnić pojęcie monomeru i agregatu barwnika organicznego w roztworze wodnym.
- Podać główny warunek, przy spełnieniu którego przy stałej temperaturze cząsteczki barwnika organicznego w roztworze będą występować w postaci monomeru.
- Wymienić przyczyny powodujące odstępstwa od stosowalności prawa Lamberta-Beera.

12. Analiza spektrofotometryczna mieszaniny dwuskładnikowej.
 - a. interpretacja i omówienie równania (zamieszczone we wstępie do ćwiczenia) wynikającego z addytywności absorpcji dwóch barwników organicznych
 - b. omówienie sposobu wyznaczania niewiadomego stężenia fluoresceiny (FL) i różu bengalskiego (RB) w mieszaninie

Zalecana literatura

1. Z. Kęcki, „Podstawy spektroskopii molekularnej”, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998.
2. E. Szyszko, „Instrumentalne metody analityczne”, PZWL, Warszawa 1975.
3. C.N.R. Rao, „Spektroskopia elektronowa związków organicznych”, PWN, 1982.
4. L. Sobczyk, A. Kiswa, „Chemia fizyczna dla przyrodników”, PWN, 1977.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii	Ćwiczenie 36 Absorpcja roztworów barwników organicznych. Analiza składu roztworu	
 Imiona i nazwiska studentów	Wydział: nr grupy: Data:
Ocena:	Podpis prowadzącego ćwiczenia	

I. Analiza widm absorpcyjnych barwników.

Tabela I. Analityczne długości fali odczytane z widm absorpcyjnych barwników.

λ_{\max} [nm]	FL	λ_{\max} [nm]	RB

II. Graficzne przedstawienie wyników pomiarów.

Tabela II. Zależność absorbancji od stężenia barwników.

Lp.	Stężenie FL [mol/dm ³]	Absorbancja (FL)	Stężenie RB [mol/dm ³]	Absorbancja (RB)
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				

$\epsilon_{FL} =$

$\epsilon_{RB} =$

III. Obliczenie stężenia barwników w roztworze dwuskładnikowym.

Tabela III.1. Zastosowane objętości barwników.

Zastosowana objętość FL	Zastosowana objętość RB

Tabela III.2. Wyznaczenie stężenia fluoresceiny i rózu bengalskiego w mieszaninie.

λ (nm)	Absorbancja roztworu dwuskładnikowego $A(\lambda)$	Absorbancja roztworu FL o stężeniu $8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ $A_{\text{FL}}(\lambda)$	Absorbancja roztworu RB o stężeniu $8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ $A_{\text{RB}}(\lambda)$	$\frac{A(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)}$	$\frac{A_{\text{RB}}(\lambda)}{A_{\text{FL}}(\lambda)}$
490					
495					

$$X_{\text{FL}} =$$

$$X_{\text{RB}} =$$

Tabela III.3. Wyznaczenie stężenia rózu bengalskiego w mieszaninie na podstawie krzywej wzorcowej.

λ (nm)	$A(\lambda)$	C_{RB}

Tabela III.4. Teoretyczne stężenie FL i RB w roztworze dwuskładnikowym

$$X_{\text{FL}}^{\text{teore}} =$$

$$X_{\text{RB}}^{\text{teore}} =$$