

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 różu 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 różu 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 MOŁOWEGO 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 różu bengalskiego (RB), a następnie wpisać je do tabeli 1.

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 wlać do kuwety roztwór o następnym, wyższym stężeniu i postąpić tak jak w poprzednim punkcie (6).
8. Analogiczne pomiary przeprowadzić dla roztworów różu bengalskiego.

B. GRAFICZNE PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW POMIARÓW

1. Dane zebrane w tabeli 1 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 2.

III. WYZNACZANIE STĘŻENIA RÓŻU BENGAŁSKIEGO W ROZTWORZE DWUSKŁADNIKOWYM

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

2. Wyznaczanie stężenia różu 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 różu bengalskiego i fluoresceiny.

Biorąc pod uwagę addytywność absorpcji oraz powyższe informacje, możemy wyznaczyć stężenie RB w roztworze dwuskładnikowym na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla tego barwnika w punkcie II.B.1.

W tym celu należy:

- a. odczytać absorbancję roztworu dwuskładnikowego przy długości fali, przy której położone jest maksimum pasma absorpcyjnego RB i wpisać ją do tabeli 4,
- b. 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 4 formularza.

3. Teoretyczne wyznaczenie stężeń barwników

Na podstawie znajomości objętości i stężenia roztworów użytych do przygotowania roztworu dwuskładnikowego, obliczyć teoretyczne stężenia FL i RB w tym roztworze i wpisać je do tabeli 5 formularza. Należy porównać wartość obliczoną stężenia RB z wartością wyznaczoną w punkcie III.2.

Wymagane wiadomości teoretyczne

1. Na czym polega metoda analityczna nazywana spektroskopią?
2. Omówić typy wiązań chemicznych w cząsteczkach związków organicznych i podać nazwy orbitali molekularnych.
3. Co nazywamy chromoforem w strukturze cząsteczki organicznej?
4. Wyjaśnić pojęcia: stan podstawowy cząsteczki, stan wzbudzony cząsteczki.
5. Wymienić rodzaje przejść elektronowych w cząsteczkach związków organicznych.
6. Co nazywamy spektroskopią UV/VIS?
7. Prawa absorpcji światła:
 - a. prawo Lamberta (I prawo absorpcji)
 - b. prawo Lamberta-Beera (II prawo absorpcji)
 - c. prawo addytywności absorpcji (III prawo absorpcji)
8. Co nazywamy elektronowym widmem absorpcyjnym i przy pomocy jakich parametrów opisujemy takie widmo?
9. Wyjaśnić pojęcie monomeru i agregatu barwnika organicznego w roztworze wodnym.
10. Podać główny warunek, przy spełnieniu którego przy stałej temperaturze cząsteczki barwnika organicznego w roztworze będą występować w postaci monomeru.
11. 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 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. Kisa, „Chemia fizyczna dla przyrodników”, PWN, 1977.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii	Ćwiczenie 21 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 1. Analityczne długości fali odczytane z widm absorpcyjnych barwników.

$\lambda_{\max}$ [nm]	FL	$\lambda_{\max}$ [nm]	RB

II. Graficzne przedstawienie wyników pomiarów.

Tabela 2. 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.				

$\epsilon_{\text{FL}} =$

$\epsilon_{\text{RB}} =$

III. Wyznaczanie stężenia różu bengalskiego w roztworze dwuskładnikowym

Tabela 3. Zastosowane objętości barwników.

Zastosowana objętość FL	Zastosowana objętość RB

Tabela 4. Wyznaczanie stężenia RB na podstawie krzywej wzorcowej

λ (nm)	$A(\lambda)$	C_{RB}

Tabela 5. Teoretyczne stężenie FL i RB w roztworze dwuskładnikowym

$$X_{FL}^{teore.} =$$

$$X_{RB}^{teorel} =$$