

ABSORPCJA ROZTWORÓW BARWNIKÓW ORGANICZNYCH. **ANALIZA SKŁADU ROZTWORU**

Aparatura

1. Spektrofotometr
2. Roztwór fluoresceiny $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ (200 μM)
3. Roztwór różu bengalskiego $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ (200 μM)

Przebieg ćwiczenia:

1. Włączyć spektrofotometr przełącznikiem znajdującym się z tyłu obudowy.
Nie podnosić pokrywy komory pomiarowej podczas uruchamiania spektrofotometru.
2. Odczekać około 15 minut. W tym czasie przygotowywać roztwory do pomiarów.

I. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW BARWNIKÓW DO POMIARÓW

1. Stężenia wyjściowe wodnych roztworów dwóch barwników: fluoresceiny (**FL**) i różu bengalskiego (**RB**) wynoszą **$2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ (200 μM)**.
2. Na pipetę **2** nałożyć końcówkę z pudełka **2**, ustawić odpowiednią objętość na pipecie używając górnego pokrętkła.
3. Sporządzić z roztworu wyjściowego każdego barwnika serię roztworów o stężeniach: **2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 μmol/dm³** i końcowej objętości równej **10 cm³**. Do rozcieńczania użyć wody destylowanej.
Do sporządzenia roztworów drugiego barwnika należy użyć nowej końcówki.
4. Roztwory dokładnie wymieszać za pomocą szklanej bagietki lub korka (cylinderek zatkać korkiem i kilkakrotnie ostrożnie przechylić go). Przed mieszaniem kolejnych roztworów bagietkę lub korek należy osuszyć ligniną.

II. WYZNACZENIE MOŁOWEGO WSPÓŁCZYNNIKA ABSORBANCJI DLA BADANYCH BARWNIKÓW

1. 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.
2. Nalać wodę destylowaną do kuwety pomiarowej (do ok. $\frac{3}{4}$ jej objętości).
3. Wstawić kuwetę do komory pomiarowej spektrofotometru w taki sposób, aby niewielki, matowy trójkąt znajdujący się na górnej części kuwety pokrywał się z białą linią wewnątrz komory pomiarowej. i zamknąć pokrywę.
Kuwetę należy wkładać (wyjmować) trzymając wyłącznie za boczne (matowe) ścianki.
4. Za pomocą klawisza „A/T/C” ustawić tryb pomiaru na absorpcję – w prawym dolnym rogu wyświetlacza powinna pojawić się wówczas duża litera A.

5. Przy pomocy przycisków oznaczonych „100”, „010” i „001” nastawić analityczną długość fali dla fluoresceiny odczytaną z wykresu i zapisaną w tabeli 1. Pierwszy z tych przycisków służy do ustawienia długości fali rzędu setek nanometrów, drugi dziesiątek, a trzeci jedności.
6. Wyzerować aparat przy ustawionej długości fali przyciskając klawisz „BLANK”.
7. Wyciągnąć kuwetę z wodą destylowaną.
8. Napełnić drugą suchą kuwetę pomiarową roztworem fluoresceiny o **najniższym** ze sporządzonych stężeń i włożyć ją w miejsce, w którym znajdowała się kuweta z wodą destylowaną.
9. Zamknąć pokrywę pomiarową, następnie po kilku sekundach odczytać wartość absorbancji z wyświetlacza i wpisać ją do odpowiedniego wiersza w tabeli 2.
10. Wylać roztwór z kuwety, odwrócić kuwetę do góry dnem i osuszyć ją poprzez przyciśnięcie jej do ligniny.
11. Wlać do kuwety roztwór o następnym, wyższym stężeniu i postąpić tak jak w punktach od 8 do 10.
12. Analogiczne pomiary przeprowadzić dla roztworów różu bengalskiego.
Nie wylewać roztworów FL i RB o stężeniu $8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, będą potrzebne do dalszych pomiarów.
13. Dane zebrane w tabeli 2 przedstawić **na jednym układzie współrzędnych** w formie wykresu funkcji $A(c) = \varepsilon \cdot l \cdot c$ (absorbancja od stężenia).
Wykres należy sporządzić na papierze milimetrowym.
14. 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 BENGALSKIEGO 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 $c = 8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, sporządzonych w pkt. I.3. 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.
3. 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.13. 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.13 i odczytać z tej krzywej stężenie RB. Odczytane stężenie RB w roztworze dwuskładnikowym zapisać w tabeli 4 formularza.
4. **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. Kisza, „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

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

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