

- I. Wpływ pH na widmo absorpcyjne w zakresie widzialnym.**
- II. Wybór analitycznej długości fali.**
- III. Spektrofotometryczne oznaczenie substancji barwnej.**
- IV. Wyznaczenie molowego współczynnika absorpcji.**

Aparatura: spektrofotometr

Szkło: kolbki miarowe a'50 mL, pipety: a'10 mL, a'5 mL,
kuwety szklane

Odczynniki:

1. zieleń bromokrezolowa stężenie =10 mg%, m.cz. = 698g/mol,
oranż metylowy stężenie =10 mg%, m.cz. = 327g/mol,
czerwień krezolowa stężenie = 8 mg%, m.cz. = 382 g/mol,
błękit bromofenolowy stężenie =10 mg%, m.cz. = 670 g/mol
2. bufor uniwersalny pH = 2
bufor uniwersalny pH = 5
bufor uniwersalny pH = 9

Podstawą bezpośredniego oznaczenia ilościowego substancji barwnych jest absorpcja światła w zakresie widzialnym, wykazywana przez ich wodne roztwory. Widma absorpcyjne wielu substancji np. wskaźników alkacymetrycznych zależą od pH środowiska. Wynika to z równowagi form protonizowanej i nieprotonizowanej, z której każda ma inne widmo absorpcji. W celu oznaczenia zawartości takich substancji w analizowanej próbce, należy wykreślić widma każdej z nich przy różnych wartościach pH i wybrać takie środowisko, w którym widmo charakteryzuje się wyraźnie zaznaczonym maksimum absorpcji i długość fali przy której molowy współczynnik absorpcji posiada największa wartość.

Ad.I, II.

1. Przygotowanie prób zerowych.
Do trzech kolbek miarowych o pojemności 50 mL dodać po 2,5 mL kolejnych roztworów buforowych i uzupełnić wodą do kreski.
2. Do trzech kolbek miarowych o pojemności 50 mL dodać po 2,5 mL kolejnych roztworów buforowych, po 10 ml roztworów substancji barwnej i uzupełnić wodą do kreski. Po dokładnym wymieszaniu zawartości kolbek zmierzyć absorbancję roztworów wobec roztworów odpowiednich prób zerowych w zakresie od 400 nm do 800 nm. Na podstawie uzyskanych wykresów wybrać bufor o odpowiednim pH i analityczną długość fali, przy której będzie oznaczana substancja barwna.

Na podstawie wykresu zależności $A = f(\lambda)$ dla
w środowisku o pH = , wybrana analityczna długość fali wynosi $\lambda_{\max} = \dots \text{nm}$.
Punkt izobestyczny (długość fali, dla której absorbancja roztworu substancji badanej nie zależy od pH roztworu) występuje przy $\lambda = \dots \text{nm}$.

Ad.III, IV.

1. Sporządzenie krzywej wzorcowej.

Do 6 kolbek miarowych o pojemności 50 mL dodać kolejno: 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 mL roztworu substancji barwnej oraz 2,5 mL odpowiedniego roztworu buforowego i uzupełnić wodą do kreski. Zmierzyć absorbancję uzyskanych roztworów przy analitycznej długości fali. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 1 i w oparciu o nie wykreślić krzywą zależności $A = f(c)$ oraz wyznaczyć równanie prostej zależności $A=f(c)$.

2. Wykonanie oznaczenia.

Do otrzymanej próbki w kolbce miarowej o pojemności 50 mL dodać 2,5 mL odpowiedniego roztworu buforowego i uzupełnić wodą do kreski. Zmierzyć absorbancję otrzymanego roztworu przy analitycznej długości fali.

Tabela 1.

lp.	Obj. roztworu wzorcowego [mL]	Stężenie subst. barwnej [mg%]	Stężenie subst. barwnej [mmol/l]	Absorbancja A
1.	0			
2.	2			
3.	4			
4.	6			
5.	8			
6.	10			
7.	próbka badana			

3. Obliczenia.

a). Na podstawie równania prostej zależności $A=f(c)$ obliczyć stężenie substancji barwnej w otrzymanej do analizy próbce.

b). Obliczyć molowy współczynnik absorpcji ε i współczynnik $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$, a następnie w oparciu o wyliczone współczynniki obliczyć zawartość barwnika w analizowanej próbce.

$$\varepsilon = \frac{\sum_{i=1}^6 A_i}{\sum_{i=1}^6 (c_i \cdot 10^{-3})}$$

gdzie:

c_i – stężenie i-tego roztworu wzorcowego [mmol/L]

A_i – absorbancja i-tego roztworu wzorcowego

$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{\sum_{i=1}^6 A_i}{\sum_{i=1}^6 (c_i \cdot 10^{-3})}$$

gdzie:

c_i – stężenie i-tego roztworu wzorcowego [mg%]

A_i – absorbancja i-tego roztworu wzorcowego

$$x = \frac{A \cdot 1000}{A_{1cm}^{1\%} \cdot 2}$$

gdzie:

A – absorbancja próbki badanej

2 – współczynnik wynikający z rozcieńczenia

x – zawartość substancji barwnej w badanej próbce [mg]

$$x = \frac{A}{\varepsilon \cdot 20} \cdot M \cdot 1000$$

gdzie:

A – absorbancja próbki badanej

20 – współczynnik wynikający z rozcieńczenia

M – masa molowa substancji barwnej [g/mol]

x – zawartość substancji barwnej w badanej próbce [mg].