

## ELEMENTY ANALIZY INSTRUMENTALNEJ

### Ćwiczenie 3

#### Temat: Spektrofotometria UV/Vis

### SPEKTROFOTOMETRIA – podstawy teoretyczne

**SPEKTROFOTOMETRIA** jest techniką instrumentalną, w której do celów analitycznych wykorzystuje się przejścia energetyczne zachodzące w cząsteczkach, spowodowane absorpcją promieniowania elektromagnetycznego w zakresie nadfioletu (UV, 200-380 nm), widzialnym (VIS, 380-780 nm) lub bliskiej podczerwieni (0,78-30000  $\mu\text{m}$ ). W analizie nieorganicznej zastosowanie znajduje głównie spektrofotometria UV i Vis.

Metodą spektrofotometrii UV-Vis można oznaczać substancje organiczne (np. wiele związków posiadających wiązanie  $\pi$  lub elektrony n, w tym węglowodory aromatyczne, aldehydy, ketony, kwasy i aminy) i nieorganiczne (np. pierwiastki ziem rzadkich, ozon,  $\text{SO}_2$ ) wykazujące absorpcję w nadfiolecie, związki absorbujące promieniowanie w zakresie widzialnym, w tym barwne związki organiczne (barwniki) i barwne sole metali (np.  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ) oraz substancje, których formy absorbujące promieniowanie uzyskuje się na drodze reakcji chemicznych. Do celów tych najczęściej wykorzystuje się reakcje kompleksowania. Opracowano wiele procedur oznaczeń kationów metali w formie barwnych związków kompleksowych z ligandami organicznymi.

#### I prawo absorpcji (prawo Lamberta)

Wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości  $b$  ulega osłabieniu zgodnie z równaniem

$$I = I_0 \cdot e^{-kb}$$

Gdzie:  $I_0$  - natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego padającego na jednorodny ośrodek absorbujący,  $I$  - natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący,  $k$  - współczynnik absorpcji,  $e$  - podstawa logarytmów naturalnych. Stąd:

$$\ln \frac{I_0}{I} = kb = A \quad \text{lub} \quad A = \log \frac{I_0}{I} = ab$$

gdzie:  $a = 0,4343k$ , a  $A$  - zdolność pochłaniania promieniowania zwana **absorbancją**.

***I prawo absorpcji można zatem sformułować w sposób następujący: absorbancja jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, jeśli wiązka promieniowania monochromatycznego przechodzi przez jednorodny ośrodek absorbujący.***

#### II prawo absorpcji (prawo Lamberta-Beera)

Prawo to dotyczy absorpcji promieniowania przez roztwory. Jeśli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny roztwór substancji absorbującej o stężeniu  $c$  ulega osłabieniu zgodnie z równaniem

$$I = I_0 \cdot e^{-kbc}$$

Stąd, po przekształceniach:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = abc$$

**II prawo absorpcji można sformułować w sposób następujący: jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu  $c$  i do grubości warstwy absorbującej  $b$ .**

Wielkość  $a$  jest **właściwym współczynnikiem absorpcji**, gdy stężenie wyrażamy w  $\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}$  lub  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Natomiast gdy stężenie  $c$  wyrażamy w  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , równanie to przybiera postać:

$$A = \epsilon cb$$

gdzie  $\epsilon$  - **molowy współczynnik absorpcji**, a jego wymiar podawany jest [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] lub w jednostkach SI [ $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ].

Wartość absorbancji  $A$  i wartość molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  zależy od długości fali  $\lambda$  promieniowania padającego. **Wykres zależności  $A$  lub  $\epsilon$  od długości fali  $\lambda$  określa się mianem krzywej absorpcji lub elektronowym widmem absorbcyjnym.**

**Prawo addytywności absorbancji (III prawo absorpcji)** wykorzystuje się w spektrofotometrycznej analizie układów wieloskładnikowych. *Jeżeli w roztworze jest więcej substancji, które absorbują promieniowanie przy wybranej długości fali, to absorbancja tego roztworu jest równa sumie absorbancji jego poszczególnych składników:*

Zależność tą zapisuje się jako:

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \epsilon_3 c_3 + \dots + \epsilon_n c_n) \cdot l$$

gdzie:  $\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$  i  $\epsilon_n$  - współczynniki absorpcji odpowiednich substancji obecnych w roztworze;  $c_1, c_2, c_3$  i  $c_n$  - stężenia tych substancji;  $l$  - grubość warstwy absorbującej.

### **Ograniczenia w stosowaniu prawa Lamberta-Beera (L- B)**

W myśl II prawa absorpcji zależność absorbancji od stężenia powinna mieć charakter liniowy. Jednak w praktyce należy liczyć się z odstępstwami od takiej zależności. Spotykamy się zarówno z **ujemnymi**, jak i z  **dodatnimi odchyleniami** od przebiegu prostoliniowego. Odchylenia takie są wywołane przez:

#### **1. podstawowe ograniczenia praw**

- występują inne oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego
- L–B odnosi się do roztworów rozcieńczonych ( $c < 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), bowiem przy większych stężeniach wartość współczynnika absorpcji zależy zwykle od stężenia oznaczanej substancji. Zależność pomiędzy absorbancją a stężeniem analitu, w warunkach gdy badany układ spełnia prawo L–B ma charakter prostoliniowy i można ją wykorzystać do wyznaczenia stężenia analitu w próbce.

#### **2. czynniki chemiczne**

- powodujące odchylenia od prostoliniowego przebiegu absorbancji są związane z reakcjami chemicznymi zachodzącymi w analizowanym roztworze
- zmiana pH roztworu,
- zachodzenie w badanym roztworze reakcji dysocjacji, asocjacji, polimeryzacji, solwatacji, a także różne reakcje kompleksowania. Takim reakcjom towarzyszą zmiany właściwości optycznych analizowanych roztworów.

#### **3. czynniki aparaturowe**

- niedostateczna monochromatyzacja promieniowania,
- występowanie promieniowania rozproszonego.

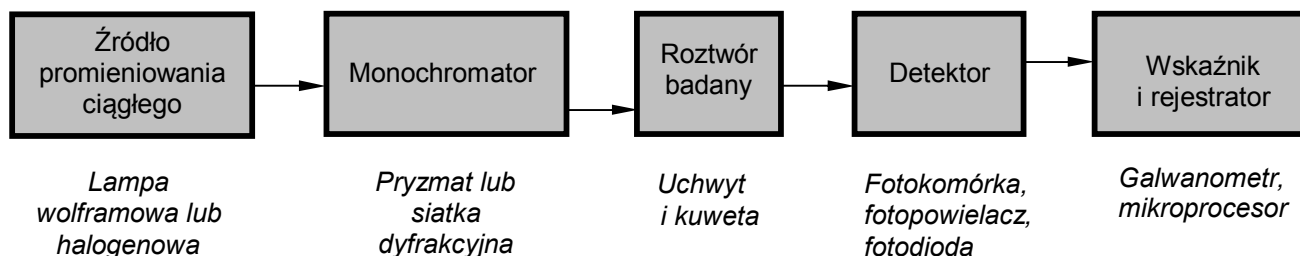
## Kalibracja

W spektrofotometrii do wyznaczenia stężenia oznaczanej substancji wykorzystuje się zwykle pomiar absorbancji roztworu zawierającego dany analit. W zależności od środowiska chemicznego, w którym znajduje się analit, jak również ustalonych warunków pomiarowych wartość sygnału mierzonego dla danego stężenia analitu może ulegać zmianie i stąd nie może jednoznacznie świadczyć o ilości analitu w próbce. Dlatego konieczne jest przeprowadzanie kalibracji danego oznaczenia.

Istnieją różne **metody kalibracji**, do najczęściej stosowanych należy **metoda interpolacyjna** (tzw. metoda serii wzorców). W metodzie tej przygotowuje się roztwory wzorcowe, czyli syntetyczne roztwory o znanych, ściśle ustalonych stężeniach analitu. Po poddaniu tych roztworów pomiarom, przedstawia się otrzymane wyniki w układzie współrzędnych sygnał (w przypadku spektrofotometrii jest to zazwyczaj absorbancja) – stężenie analitu, a następnie dopasowuje się do nich określoną funkcję (zazwyczaj linię prostą). Pomiar wykonuje się zwykle przy określonej długości fali, najczęściej odpowiadającej maksimum absorpcji oznaczanej substancji oraz względem roztworu odniesienia (tzw. ślepej próbki), czyli roztworu przygotowanego analogicznie jak roztwory wzorcowe i roztwór próbki, lecz nie zawierającego analitu. Prostoliniowy przebieg zależności  $A=f(c)$  świadczy o spełnieniu przez badany układ prawa Lamberta-Beera. Wyznaczenie współczynnika kierunkowego tej prostej umożliwia obliczenie współczynnika absorpcji oznaczanej substancji. W celu wyznaczenia stężenia analitu w próbce rejestruje się odpowiadający jej sygnał i odnosi się go do linii kalibracyjnej. Roztwór próbki powinien być przygotowany w taki sposób, by maksymalny zakres stężeń analitu w roztworach wzorcowych obejmował przewidywane jego stężenie w próbce.

## Aparatura

Do badania absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w nadfiolecie i zakresie widzialnym widma służą spektrofotometry UV-VIS. Schemat blokowy spektrofotometru przedstawiono na poniższym rysunku.



Rys.1. Schemat blokowy spektrofotometru UV/Vis

## SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZENIE FE(III) METODĄ RODANKOWĄ

Jony rodankowe (tiocyanianowe) w kwaśnym środowisku reagują z Fe(III) tworząc czerwono zabarwione kompleksy żelazowo-rodankowe ( $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$ ). W wyniku stopniowej reakcji kompleksowania w roztworze mogą powstać kompleksy  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{SCN})_2^+$  itd., aż do  $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ . Stężenia reagentów i pH środowiska decydują, które z kompleksów przeważają w roztworze. W roztworach o małych (mikrogramowych na mL) stężeniach Fe(III) przeważa pierwszy kompleks w szeregu. Kwasowość roztworu powinna być co najmniej taka, aby nie dopuścić do hydrolizy jonów Fe(III), która zaczyna się już przy pH ok. 3.

**Metodą rodankową można oznaczać Fe(III) lub całkowitą zawartość żelaza, po utlenieniu Fe(II).**

Oznaczeniu przeszkadzają aniony tworzące z Fe(III) trwałe kompleksy: fluorki, fosforany, cytryniany i szczawiany. Przeszkadzają również jony metali tworzących w warunkach reakcji barwne kompleksy (Co, Mo, Bi, Ti).

## Zadanie 6.

### Oznaczenie żelaza(III) metodą spektrofotometrii UV/VIS

#### Aparatura:

- spektrofotometr LAMBDA XLS plus firmy Perkin Elmer

#### Odczynniki i naczynia:

- **roztwór podstawowy soli Fe<sup>3+</sup>** o stężeniu **1 mg Fe<sup>3+</sup>/mL**
- **roztwór pośredni soli Fe<sup>3+</sup>** o stężeniu **10 µg Fe<sup>3+</sup>/mL**
- 0,4% (0,1 mol/L) HCl
- 0,1% (0,028 mol/L) HCl
- 20 % roztwór KSCN
- kolba miarowa o poj. 100 mL
- mikrobiureta (25 mL)
- 6 kolbek (50 mL)
- lejek szklany

#### Próbka:

- roztwór żelaza (III) o nieznanym stężeniu

#### Wyznaczenie analitycznej długości fali dla kompleksu Fe<sup>3+</sup>z tiocyjanianem:

Dla roztworu wzorcowego (sporządzonego przy użyciu **6 ml** roztworu pośredniego soli Fe<sup>3+</sup>, zgodnie z zamieszczonym niżej przepisem) zbadać absorbancję w zakresie 350-550 nm, dokonując pomiarów przy długościach fali różniących się o 10 nm.

#### Przygotowanie roztworów wzorcowych i sporządzenie wykresu kalibracyjnego:

1. Z roztworu podstawowego o stężeniu 1mg Fe<sup>3+</sup>/mL sporządzić roztwór roboczy o stężeniu 10 µg Fe /mL przez 100-krotne rozcieńczenie (w kolbie miarowej na 100 mL) żelaza(III) 0,1% roztworem HCl
2. Z wykorzystaniem roztworu roboczego przygotować roztwory wzorcowych żelaza(III) w następujący sposób:
  - do każdej kolbki, używając cylinder i lejek, nalać 20 mL kwasu solnego.
  - następnie za pomocą mikrobiurety odmierzyć odpowiednie ilości roztworu roboczego o stężeniu 10 µg/mL : 0 (ślepa próbka), 2,00; 4,00; **6,00**; 8,00 i 10,00 mL,
  - następnie dodać 5,0 mL 20% roztworu tiocyjanianu potasu\* ,
  - uzupełnić do kreski 0,4% HCl.
3. Roztwory dokładnie wymieszać
4. Następnie kolejno roztwory wlewać do kuwety i zmierzyć ich absorbancję przy długości fali λ=480 nm stosując jako odnośnik roztwór ślepej próbki.

**Oznaczenie żelaza w badanej próbce:**

1. Próbkę żelaza (III) w kolbce miarowej o poj 100 mL rozcieńczyć wodą 2 x destylowaną (uzupełnić kolbkę wodą do kreski)
2. Z otrzymanego wyżej roztworu odpipetować porcje po 25 mL do trzech kolbek miarowych o poj. 50 mL
3. Do każdej kolbki dodać 10,0 mL 20% roztworu tiocyjanianu potasu i uzupełnić 0,4% HCl do kreski
4. Roztwory dokładnie wymieszać
5. Następnie przelać kolejno do kuwety i zmierzyć trzykrotnie absorbancję przy długości fali 480 nm, stosując jako odnośnik roztwór ślepej próbki

Na podstawie wyznaczonego równania krzywej kalibracyjnej obliczyć stężenie żelaza w badanym roztworze, a następnie obliczyć ilość żelaza (w mg) w próbce wyjściowej, stosując odpowiedni wzór:

$$X = (c \cdot V \cdot W) / 1000 \text{ [mg]}$$

gdzie: c – stężenie żelaza obliczone na podstawie równania wykresu kalibracyjnego [ $\mu\text{g/mL}$ ]

V – objętość próbki (50 mL)

W – współmierność kolby i pipety

**\*Uwaga:**

**Kompleks żelazo-tiocyanian jest nietrwały, dlatego należy dodawać tiocyjanian do wszystkich próbek (zarówno wzorcowych jak i analizowanych) bezpośrednio przed pomiarem absorbancji.**

**Opracowanie wyników:**

- Na papierze milimetrowym lub w dowolnym programie komputerowym narysować wykres zależności A od  $\lambda$  w zakresie badanym (350-550 nm). Na podstawie otrzymanego wykresu krzywej absorpcji określić długość, przy której absorbancja osiąga maksimum.
- Na podstawie uzyskanych wyników sporządzić wykres kalibracyjny  $A=f(c)$
- Dla badanego roztworu żelaza (III) wyznaczyć stężenie analitu z równania regresji oraz obliczyć zawartość żelaza(III) w wyjściowej próbce w [mg].