

# SPEKTROFOTOMETRIA ABSORPCYJNA UV-VIS

## ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

Natura promieniowania elektromagnetycznego: charakter falowy i korpuskularny; oddziaływanie materii z promieniowaniem elektromagnetycznym (światłem widzialnym); pasma spektralne (widma absorpcji); zasada Francka-Conzona; diagram Jabłońskiego; chromofory; prawa absorpcji; absorbancja; transmitancja; krzywa wzorcowa; wykorzystanie metod spektrofotometrycznych;

## APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY

- Spektrofotometr Cary50 Bio (Varian), kuwety z tworzywa sztucznego, worteks;
- pipeta automatyczna (1 ml), statyw na próbówki, korki, pisaki do szkła, falkon (15 ml), końcówki do pipet niebieskie
- szkło laboratoryjne (zlewki, próbówki);

## ODCZYNNIKI

błękit bromofenolowy (BPB), 1M HCl, woda destylowana,

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### **1. Wyznaczenie maksimum absorpcji ( $A_{\max}$ ) błękitu bromofenolowego.**

1.1 Przygotować roztwór wyjściowy błękitu bromofenolowego (BPB) poprzez 3-krotne rozcieńczenie roztworu standardowego. Obserwując kolor otrzymanego roztworu określić zakres promieniowania pochłanianego i przepuszczanego przez próbkę. Oszacować, w jakim zakresie promieniowania należy spodziewać się maksymalnej absorpcji światła.

1.2 Włączyć spektrofotometr, uruchomić program „SimpleReads”, ustawić parametry pomiarowe ( $A$  – absorbancja, długość fali 360 nm), kuwetę napełnioną wodą destylowaną umieścić w komorze pomiarowej, wyzerować instrument.

1.3. Napełnić kuwetę wyjściowym roztworem BPB, odczytać  $A$  próbki przy zadanej długości fali.

1.4. Zmieniść ustawienia długości fali (380 nm), kuwetę z wodą destylowaną umieścić w komorze pomiarowej, wyzerować instrument. Przeprowadzić pomiar próbki przy kolejnej długości fali. Postępować w analogiczny sposób przeprowadzając pomiary w zakresie 400-660 nm co 20 nm. Określić położenie  $A_{\max}$ .

1.5. Uruchomić program „Scan”. Ustawić parametry pomiarowe, wyzerować instrument, przeprowadzić pomiar tła. Potwierdzić słuszność wcześniejszych obserwacji dokonując pomiaru widma absorpcji w zakresie 360-660 nm. Wyznaczyć dokładne położenie  $A_{\max}$ .

## 2. Wpływ stężenia na absorpcję błękitu bromofenolowego.

- 2.1. Przygotować 6 probówek, ponumerować je.
- 2.2. W probówkach 2-6 umieścić po 2 ml wody destylowanej.
- 2.3. Do probówki nr 1 przenieść 4 ml wyjściowego roztworu BPB.
- 2.4. Przenieść 2 ml roztworu z probówki nr 1 do probówki nr 2, wymieszać na wortexie.
- 2.5. Przenieść 2 ml roztworu z probówki nr 2 do probówki nr 3, wymieszać jw.
- 2.6. Przenieść 2 ml roztworu z probówki nr 3 do probówki nr 4, wymieszać jw.
- 2.7. Przenieść 2 ml roztworu z probówki nr 4 do probówki nr 5, wymieszać jw.
- 2.8. Przenieść 2 ml roztworu z probówki nr 5 do probówki nr 6, wymieszać jw.
- 2.9. W programie „SimpleReads” ustawić parametry pomiarowe ( $A$  – absorbancja;  $A_{\max}$ ).  
kufetę napełnioną wodą destylowaną umieścić w komorze pomiarowej, wyzerować instrument.
- 2.10. Zarejestrować wartość  $A$  dla próbki nr 6, a następnie próbek 5-1.
- 2.11. Zarejestrować wartość  $A$  próbki X o nieznanym stężeniu.

## 3. Wpływ środowiska na widmo absorpcyjne BPB

- 3.1. Do 2 probówek przenieść po 2 ml wyjściowego roztworu BPB;
- 3.2. Do jednej z nich dodać 2 krople 1 M HCl, delikatnie zamieszać, obserwować zmianę zabarwienia.
- 3.3. Uruchomić program „Scan”. Zarejestrować widma absorpcyjne obu roztworów w zakresie 360-660 nm. Wyznaczyć  $A_{\max}$ .

### OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. W tabeli 1 umieścić zarejestrowane wartości  $A$  dla danych długości fal. Na podstawie otrzymanych wyników wykreślić widmo absorpcyjne BPB. Porównać je z widmem absorpcji zmierzonym zgodnie z wytycznymi z punktu 1.5. Omówić różnice.
2. W tabeli 2 umieścić dane według schematu przedstawionego poniżej.

Numer próbki	Rozcieńczenie	Stężenie BPB [mol/l]	Abs
1			
2			
3			
4			
5			
6			

3. Na podstawie danych umieszczonych w tabeli 2 skonstruować krzywą wzorcową (wykres zależności absorbancji przy danej długości fali od stężenia BPB), wyznaczyć równanie prostej, a następnie wyznaczyć molowy współczynnik absorpcji ( $\epsilon$ ) BPB.

4. Korzystając z prawa Lamberta-Beera (dla  $l = 1$  cm,  $\epsilon$  wyznaczonego w punkcie 3) obliczyć stężenie BPB w próbce X.
5. Korzystając z prawa Lamberta-Beera (dla  $l = 1$  cm) obliczyć molowy współczynnik absorpcji ( $\epsilon$ ) stosując dane otrzymane dla próbki numer 1 (ćwiczenie 2). Porównać otrzymany wynik z wynikiem z punktu 3.
6. Opisać zarejestrowane widma absorpcji, omówić wpływ środowiska.
7. Sformułować wnioski.

#### LITERATURA:

1. W. Szczepaniak „Metody instrumentalne w analizie chemicznej” Wyd. Naukowe PWN, 2011 (lub wydanie wcześniejsze);
2. D. Wróbel "Spektroskopia układów molekularnych" w "Biofizyka dla biologów" praca zbiorowa pod redakcją M. Bryszewskiej i W. Leyko, Wyd. Naukowe PWN, 1997;
3. A. Kozik, M. Rapała-Kozik, I. Guevara-Lora "Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej" seria wydawnicza IBM UJ, 2001;