

5. KOLORYMETRIA

1. Wyznaczanie widma absorpcyjnego

Zasada:

Absorpcjometria wykorzystuje zdolność substancji chemicznych pozostających w roztworze do pochłaniania światła całą swą objętością. Zwykle różne substancje pochłaniają promieniowanie świetlne o odmiennej długości fali. Jeśli jednak pochłaniają fale tej samej długości, to z różną intensywnością. Absorpcję światła w zakresie widzialnym wykazują związki nieorganiczne, przede wszystkim jony mające niecałkowicie zapełniony orbital d osłonięty wyższymi orbitalami zapełnionymi elektronami, związki kompleksowe wszystkich pierwiastków przejściowych z niecałkowicie zapełnionym orbitalem d oraz barwne związki organiczne, np. wskaźniki pH stosowane w alkacymetrycznej analizie miareczkowej. Absorpcję światła w zakresie ultrafioletu wykazują bezbarwne związki organiczne, zawierające np. wiązania podwójne. Wielkością pozwalającą ocenić spadek natężenia wiązki światła po przejściu przez warstwę roztworu substancji pochłaniającej światło jest **absorbancja (A)**, zwana też ekstynkcją lub gęstością optyczną. Jest ona równa logarytmowi stosunku natężenia promieniowania padającego (I_0) do natężenia promieniowania przepuszczonego (I). Podstawowym prawem absorpcjometrii jest prawo **Bouguera-Lamberta-Beera**, zgodnie z którym absorbancja substancji pochłaniającej światło jest wprost proporcjonalna do stężenia i grubości warstwy roztworu.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

gdzie:

ϵ – współczynnik absorpcji,

c – stężenie,

l – grubość warstwy roztworu.

Krzywa, określająca zależność absorpcji promieniowania od długości fali, stanowi widmo absorpcyjne. Widmo absorpcyjne danej substancji pozwala określić długości fal promieniowania, które są przez nią absorbowane, oraz długość

fali, przy której absorbancja ma największą wartość (A_{\max}). Następnie przy tej długości fali mierzy się zarówno absorbancję wzorcowych roztworów danej substancji o znanych stężeniach (sporządzając wykres kalibracyjny) – jak również absorbancję roztworu oznaczanego o nieznanym stężeniu.

Wykonanie:

- Wykonujemy widmo absorpcyjne fenoloftaleiny w środowisku zasadowym, w zakresie długości fal 400–600 nm, mierząc absorbancję co 10 nm. Włączyć spektrofotometr i nastawić pierwszą długość fali.
- Do jednej kuwety wprowadzić roztwór fenoloftaleiny, a do drugiej jej rozpuszczalnik (etanol i 0,1 M NaOH w stosunku 1:40 – próba ślepa, czyli odczynnikowa).
- Obie kuwety wstawić do spektrofotometru i aparat wykalibrować wobec próby ślepej, ustawiając najpierw na transmitancję, która powinna wynosić 100%, po czym przełączyć na absorbancję, która powinna mieć wartość 0,00.
- Zmierzyć absorbancję roztworu fenoloftaleiny przy danej długości fali, zapisać wynik, po czym nastawić długość fali większą o 10 nm. Każdorazowo po zmianie długości fali nastawić zero absorbancji wobec próby ślepej. Mierzyć absorbancję, jak opisano wcześniej, aż do długości fali 600 nm.
- Wykreślić na papierze milimetrycznym widmo absorpcyjne roztworu fenoloftaleiny i podać długość fali, której odpowiada maksimum absorpcji światła.

2. Wyznaczanie wykresu kalibracyjnego i oznaczanie stężenia związku barwnego

Zasada:

Największą zaletą absorbancji jest jej wprost proporcjonalna zależność od stężenia. Wykres zależności absorbancji od stężenia w dostatecznie szerokim zakresie ma kształt krzywej logarymicznej. Prawo Bouguera-Lamberta-Beera stosuje się tylko do początkowego odcinka wykresu, który jest prostoliniowy i nazywa się **wykresem kalibracyjnym**. Można z niego odczytać szukane stężenie roztworu po zmierzeniu wartości jego absorbancji. W wykresie kalibracyjnym mogą zdarzać się ujemne lub dodatnie odchylenia od prostoliniowej zależności. Odchylenia od prawa Lamberta-Beera mogą być spowodowane zbyt wysokim stężeniem substancji, które powoduje, że jedne cząsteczki są „przesłaniane” przez inne, co daje efekt zmniejszonego pochłaniania światła. Innymi przyczynami odchylenia od tego prawa mogą być takie zjawiska, jak: dimeryzacja, dysocjacja lub asocjacja związków chemicznych, które wpływają na ich własności optyczne.

Metodą kolorymetryczną można oznaczać ilościowo substancje barwne, których stężenie w 1 ml roztworu jest rzędu kilkunastu nanomoli. Czułość metody pozwala określić najniższe stężenie roztworu wzorcowego, które należy przygotować do sporządzenia wykresu kalibracyjnego. Natomiast ustalenie zakresu stężeń (od najniższego do najwyższego) należy rozpocząć od określenia stężenia maksymalnego, tzn. najmniejszego stężenia, które przy pomiarze absorpcji powoduje maksymalne wychylenie wskazówki galwanometru lub wyświetlenie wartości maksymalnej na wskaźniku cyfrowym. W przypadku roztworu KMnO_4 , stężeniem, przyjmowanym jako maksymalne, jest $0,4 \mu\text{mol/ml}$ lub nieznacznie wyższe, ostateczna wartość zależy od jakości spektrofotometru i rodzaju substancji barwnej.

Wykonanie:

- Przygotować 11 ponumerowanych próbek (ostatnią opisać jako próbę ślepą).
- Z wodnego roztworu roboczego KMnO_4 o stężeniu $0,4 \mu\text{mol/ml}$ sporządzić szereg roztworów wzorcowych o różnych stężeniach, postępując zgodnie z danymi przedstawionymi w tabeli 1.
- Spektrofotometr nastawić na długość fali 530 nm. Do jednej kuwety włożyć próbę ślepą, do drugiej roztwór KMnO_4 o najniższym stężeniu. Aparat wykalibrować wobec próby ślepej, ustawiając najpierw na transmitancję, która powinna wynosić 100%, po czym przełączyć na absorpcję, która powinna mieć wartość 0,00.
- Odczytać absorpcję wszystkich roztworów wzorcowych KMnO_4 oraz roztworu o nieznanym stężeniu.
- Wykreślić na papierze milimetrowym krzywą kalibracyjną, z której odczytać stężenie oznaczanego roztworu na podstawie zmierzonej absorpcji.

Tabela 1. Przygotowanie stężeń wzorcowych roztworu KMnO_4 w celu sporządzenia wykresu kalibracyjnego

Nr próbki	Ilość roztworu roboczego [ml]	Ilość wody destylowanej [ml]	Stężenie KMnO_4 [$\mu\text{mol/ml}$]	Absorbancja przy 530 nm
1	0,2	1,8	0,04	
2	0,4	1,6	0,08	
3	0,6	1,4	0,12	
4	0,8	1,2	0,16	
5	1,0	1,0	0,20	
6	1,2	0,8	0,24	
7	1,4	0,6	0,28	
8	1,6	0,4	0,32	
9	1,8	0,2	0,36	

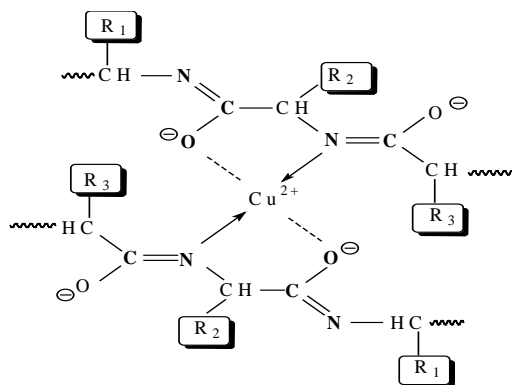
10	2,0	–	0,40	
Próba ślepa	–	2,0	–	

3. Wyznaczanie wykresu kalibracyjnego i oznaczanie stężenia związku bezbarwnego

Zasada:

Kolorymetrycznie można oznaczać również związki bezbarwne, lecz po przeprowadzeniu ich w barwne pochodne, na drodze stechiometrycznej reakcji chemicznej. Czułość tych metod jest równa lub większa od czułości oznaczania związków barwnych. Postępowanie przy ustalaniu zakresu stężeń substancji bezbarwnej i przy sporządzaniu wykresu kalibracyjnego jest podobne, jak w przypadku roztworów barwnych, poszerzone jednak o reakcję chemiczną z odczynnikiem wybarwiającym, po której dopiero można mierzyć absorbancję roztworu wobec próby ślepej. Skład próby ślepej różni się od jej składu w metodach oznaczania substancji barwnych, ponieważ poza rozpuszczalnikiem musi zawierać odczynnik wybarwiający. Metodą tą można oznaczać zarówno związki nieorganiczne, jak i organiczne.

Przykładem związku nieorganicznego, który można oznaczać ilościowo metodami kolorymetrycznymi, są ortofosforany (PO_4^{3-}). Reagują z odczynnikiem wybarwiającym, którym jest molibdenian amonowy w środowisku kwaśnym. Powstałe fosfomolibdeniany w obecności związków redukujących (eikonogenu, czyli kwasu 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowego lub chlorku cyny (II) lub amidoli i hydrochinonu) przechodzą w niebieskie połączenia zwane błękitem molibdenianowym (mieszanina niższych tlenków molibdenu), którego absorbancję można mierzyć przy 660 nm. Błękit molibdenianowy jest podstawą kolorymetrycznego oznaczania nieorganicznych ortofosforanów w metodzie Fiske-Subbarowa. Przykładem bezbarwnych związków organicznych, które mogą być oznaczane ilościowo metodami kolorymetrycznymi są białka. Istnieje wiele metod kolorymetrycznych służących do ich ilościowego oznaczania, różniących się czułością i specyficnością reakcji. Podstawową wśród nich jest metoda biuretowa, której zasada sprowadza się do reakcji barwnej pomiędzy atomami azotu wiązań peptydowych a jonami miedzi w środowisku zasadowym:



Reakcję tę dają wszystkie związki, mające co najmniej dwa wiązania peptydowe – w tym również biuret – i stąd nazwa metody. Środowisko zasadowe, które jest konieczne dla reakcji wybarwiającej, sprzyja wytrącaniu jonów miedzi w postaci wodorotlenku miedziowego. Aby tego uniknąć, do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się winian sodowo-potasowy, który kompleksuje jony miedzi. Intensywność powstałego zabarwienia jest proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych w cząsteczkach białkowych obecnych w analizowanym roztworze, a zatem do stężenia białka.

Tabela 2. Przygotowanie stężeń wzorcowych roztworu białka w celu sporządzenia wykresu kalibracyjnego do metody biuretowej

Nr próbówki	Ilość roztworu wzorcowego [ml]	Ilość soli fizjologicznej [ml]	Stężenie białka [mg/ml]	Absorbancja przy 540 nm
1	0,2	0,8	2	
2	0,4	0,6	4	
3	0,6	0,4	6	
4	0,8	0,2	8	
5	1,0	–	10	
P. ślepa	–	1,0	–	

Wykonanie:

- Przygotować 6 ponumerowanych próbek (ostatnią opisać jako próba ślepa). Z roboczego 1% roztworu wzorcowego białka w soli fizjologicznej przygotować szereg roztworów wzorcowych o różnych stężeniach, postępując zgodnie z danymi przedstawionymi w tabeli 2.
- Do wszystkich próbek dodać po 4 ml odczynnika biuretowego. Do 1 ml próby o nieznanym stężeniu białka wprowadzić 4 ml odczynnika biuretowego. Wszystkie próby wymieszać i pozostawić na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej przy 540 nm.
- Sporządzić krzywą kalibracyjną do metody biuretowej.
- Ze sporządzonej krzywej kalibracyjnej odczytać stężenie białka w próbce o nieznanym stężeniu na podstawie jej wartości absorbancji.

ODCZYNNIKI

0,1% roztwór fenoloftaleiny w etanolu rozcieńczony 40-krotnie 0,1 M NaOH, sporządzić tuż przed wyznaczaniem widma (ostateczne stężenie 0,0025%); 0,1 M roztwór NaOH; etanol; 0,4 μmol/ml wodny roztwór KMnO₄; 1% roztwór

białka w soli fizjologicznej; sól fizjologiczna (0,9% roztwór NaCl); odczynnik biuretowy: 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 6 g winianu sodowo-potasowego (czterowodnego) rozpuścić w 500 ml H_2O destylowanej, po czym mieszając dodać 300 ml 10% roztworu NaOH wolnego od węglanów i uzupełnić wodą do 1000 ml, należy przechowywać w ciemnej butelce (jest trwały przez kilka miesięcy, dopóki nie pojawi się osad).

NOTATKI