

## SPEKTROFOTOMETRIA

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.

Analiza ilościowa metodą spektrofotometrii UV-VIS oparta jest na pomiarze absorbancji  $A_\lambda$  badanego roztworu przy określonej długości fali  $\lambda$  i wykorzystaniu prawa Lamberta-Beera, zgodnie z którym:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

gdzie  $\varepsilon_\lambda$  jest współczynnikiem absorpcji przy długości fali  $\lambda$ ,  $l$  grubością warstwy absorbującej, a  $c$  stężeniem analitu w badanym roztworze.

Absorbancję definiuje się jako:

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

gdzie  $I_0$  to natężenie promieniowania padającego na ośrodek absorbujący a  $I$  to natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący. *Prawo Lamberta-Beera* dotyczy absorpcji promieniowania przez roztwory i można je sformułować następująco: *jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia  $c$  roztworu i do grubości warstwy absorbującej  $l$ .*

Zależność pomiędzy absorbancją a stężeniem analitu, w warunkach gdy badany układ spełnia prawo Lamberta-Beera ma charakter prostoliniowy i można ją wykorzystać do wyznaczenia stężenia analitu w próbce. Prawo Lamberta-Beera stosuje się do roztworów rozcieńczonych, bowiem przy większych stężeniach wartość współczynnika absorpcji zależy zwykle od stężenia oznaczanej substancji. Na wykresie obrazującym zależność absorbancji roztworu od jego stężenia uwidacznia się to w zakrzywieniu linii kalibracyjnej w zakresie wyższych stężeń w górę lub w dół, które określa się odpowiednio jako dodatnie lub ujemne odstępstwa od prawa Lamberta-Beera. Odstępstwa te mogą być natury chemicznej lub instrumentalnej. Odstępstwa natury chemicznej występują, gdy zachodzą oddziaływania cząsteczek substancji rozpuszczonej pomiędzy sobą (dysocjacja asocjacja) lub z cząsteczkami rozpuszczalnika natomiast zasadniczym czynnikiem aparaturowym powodującym odstępstwa od prawa jest niedostateczna monochromatyzacja promieniowania.

Prawo Lamberta-Beera odnosi się do przypadku, gdy w roztworze znajduje się jedna substancja absorbująca. *Jeżeli w roztworze jest więcej substancji, które absorbują promieniowanie przy wybranej długości fali, to absorbancja tego roztworu jest równa sumie absorbancji jego poszczególnych składników:*

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = (\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \varepsilon_3 c_3 + \dots + \varepsilon_n c_n) \cdot l$$

gdzie  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3$  i  $\varepsilon_n$  to współczynniki absorpcji odpowiednich substancji obecnych w roztworze,  $c_1, c_2, c_3$  i  $c_n$  oznaczają stężenia tych substancji, a  $l$  jest grubością warstwy absorbującej. Powyższa zależność to *prawo addytywności absorbancji*, z którego korzysta się w spektrofotometrycznej analizie układów wieloskładnikowych.

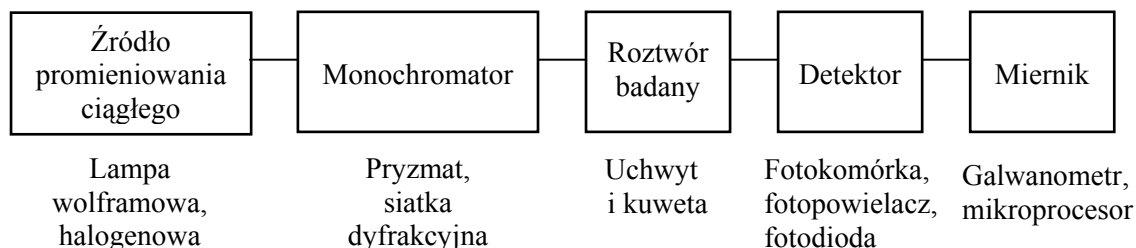
### Kalibracja

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 serii wzorców. W metodzie serii wzorców 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 próby), 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 umożliwi 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 rysunku 1.



Rys. 1. Schemat blokowy spektrofotometru

Do pomiarów wykorzystywany będzie spektrofotometr Spekol 11 firmy Carl Zeiss Jena. Spekol 11 wyposażony jest w halogenową żarówkę projektorową stanowiącą źródło promieniowania, monochromatorem jest precyzyjna siatka dyfrakcyjna (651 szczelin/mm), zaś do detekcji promieniowania służą dwie fotokomórki: niebieskoczuła (340-620 nm) oraz czerwonoczuła (620-850 nm). Aparat wyposażony jest we wskaźnik cyfrowy.

### **Spektrofotometryczne oznaczenie Fe(III) metodą rodankową**

Jony rodankowe (tiocyanianowe) w niezbyt kwaśnym środowisku reagują z Fe(III) tworząc czerwono zabarwione kompleksy żelazowo-rodankowe ( $\lambda_{\max} = 480$  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 mikrogramowych 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 wcześniejszym utlenieniu Fe(II). Oznaczaniu 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).

#### *Odczynniki:*

roztwór podstawowy soli  $\text{Fe}^{3+}$  o stężeniu 1 mg  $\text{Fe}^{3+}$ /mL;  
0,1% roztwór HCl;  
0,1 M roztwór HCl;  
20 % roztwór KSCN.

#### Przygotowanie roztworów wzorcowych i sporządzenie wykresu kalibracyjnego

Roztworem wykorzystywanym do przygotowania serii roztworów wzorcowych jest roboczy roztwór wzorcowy soli  $\text{Fe}^{3+}$  o stężeniu 10  $\mu\text{g Fe}^{3+}$ /mL sporządzony przez 100-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego żelaza(III) o stężeniu 1mg  $\text{Fe}^{3+}$ /mL 0,1%-wym roztworem HCl. Roztwór roboczy należy przygotować w kolbie o pojemności 100 mL po wcześniejszym jej przepłukaniu 0,1% roztworem HCl.

W celu sporządzenia serii roztworów wzorcowych do wyznaczenia zależności kalibracyjnej 6 kolbek miarowych o pojemności 50,00 mL należy przepłukać 0,1M roztworem HCl. Do każdej z nich odpipetować następujące objętości roboczego wzorcowego, tj. o stężeniu 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 0 (ślepa próba), 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 i 10,00 mL, następnie dodać 5,0 mL 20% roztworu tiocyanianu potasu\* i uzupełnić do kreski 0,1 M roztworem HCl. Roztwory dokładnie wymieszać, następnie kolejno przelać do kuwety i zmierzyć ich absorbancję przy długości fali  $\lambda=480$  nm stosując jako odnośnik roztwór ślepej próby. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzić wykres kalibracyjny.

#### Oznaczanie żelaza w badanej próbce

Otrzymany roztwór przenieść ilościowo do skalibrowanej kolby miarowej na 100 mL, dopełnić wodą destylowaną do kreski, wymieszać, a następnie pobrać kalibrowaną pipetą trzy porcje po 25 mL do kolbek miarowych o pojemności 50,00 mL. Do każdej kolbki dodać 5,0 mL 20% roztworu tiocyanianu potasu\* i uzupełnić do kreski 0,1 M roztworem HCl.

Roztwory dokładnie wymieszać, następnie kolejno przelać do kuwety i zmierzyć ich absorbancję przy długości fali  $\lambda=480$  nm stosując jako odnośnik roztwór ślepej próby.

Odczytać stężenie żelaza(III) w barwnym roztworze z krzywej kalibracyjnej i obliczyć oznaczaną ilość żelaza (w mg) ze wzoru:

$$x = \frac{c \cdot v}{1000} \text{ [mg]}$$

gdzie: c – stężenie żelaza odczytane z krzywej kalibracyjnej ( $\mu\text{g/mL}$ ),  
v – objętość badanego roztworu żelaza (tu 50,00 mL).

Zawartość żelaza w otrzymanej próbce wynosi:  $m_{\text{Fe}} = x \cdot W$  [mg] (W - współmierność kolby z pipetą).

**\*Uwaga:**

**Kompleks żelazo-tiocyanian jest nietrwały, dlatego należy dodawać tiocyanian do wszystkich próbek (zarówno wzorcowych jak i analizowanych) bezpośrednio przed pomiarem absorbancji. Pomiary spektrofotometryczne wzorców i analizowanych próbek należy wykonać bezpośrednio po sobie.**