

Kolorymetria

Kolorymetria jest działem analizy chemicznej, w której za podstawę ilościowego oznaczania substancji w roztworze brana jest prosta **zależność między intensywnością zabarwienia roztworu** (absorpcja światła o określonej długości fali), **a stężeniem zawartej w nim substancji**. Metodami kolorymetrycznymi można oznaczać zarówno stężenia substancji posiadających własną barwę, jak i substancji bezbarwnych, które za pomocą odpowiednich reakcji chemicznych przeprowadza się w barwne związki pochodne. W tym wypadku reakcja barwna musi przebiegać szybko i do końca, a powstałe zabarwienie powinno być trwałe, niewrażliwe na działanie światła i mało zależne od zmian pH, temperatury, nadmiaru odczynnika. Jednym z najważniejszych warunków jest to, aby odczynnik reagował jedynie z substancją badaną i nie dawał barwy z inną obecną w roztworze, zatem żeby reakcja była specyficzna.

Metody kolorymetryczne należą do najszybszych, najłatwiejszych. Oznaczają się uniwersalnością, dokładnością i czułością sięgającą $0,05 \mu\text{g}/1 \text{ cm}^3$ roztworu.

Barwa substancji zależy od aktywnego wchłaniania, czyli absorpcji światła przez tę substancję. W czasie obserwacji światła przechodzącego przez daną substancję, do naszych oczu dochodzą promienie, które nie zostały przez nią zaabsorbowane. Widzi się więc barwę dopełniającą, na którą składają się poszczególne rodzaje przepuszczonych fal elektromagnetycznych. Barwa niebieska roztworu oznacza, że dana substancja pochłania barwę żółtą, przepuszczając te długości fal, które tworzą widzianą przez nas barwę dopełniającą tj. niebieską. Jeśli żaden z rodzajów promieni widzialnych nie ulegnie pochłonięciu przez substancję odnosi się wrażenie światła białego - roztwory takie będą bezbarwne.

Istnieje ścisły związek pomiędzy zabarwieniem substancji a jej strukturą elektronową. Częsteczką lub jon wykazuje absorpcję w części widzialnej widma lub w nadfiolecie, gdy pod wpływem promieniowania elektrony jej zostaną przeniesione ze stanu podstawowego do jednego ze stanów wzbudzonych. Powstanie barwy lub jej zmiana są zawsze związane ze zmianą normalnej struktury elektronowej cząsteczki.

Przy zachowaniu stałej grubości warstwy przez którą przechodzi światło oraz stałego stężenia roztworu ilość światła pochłanianego jest proporcjonalna do intensywności zabarwienia.

Według prawa Bouguera-Lamberta i Beera absorbancja światła monochromatycznego jest proporcjonalna do stężenia substancji absorbującej oraz grubości warstwy jej roztworu (drogi promieni świetlnych w roztworze). Konsekwencją tego prawa jest prostoliniowa zależność między stężeniem roztworu i jego absorbancją, pod warunkiem, że jej pomiary zostały wykonane przy tej samej długości fali i dla identycznych warstw roztworu.

W zakresie widzialnym promieniowania elektromagnetycznego (400-750 nm) można oznaczać te wszystkie substancje, które są barwne i tworzą przezroczyste roztwory (np. jony MnO_4^- , hemoglobinę, karoteny, i inne barwniki roślinne i sztuczne).

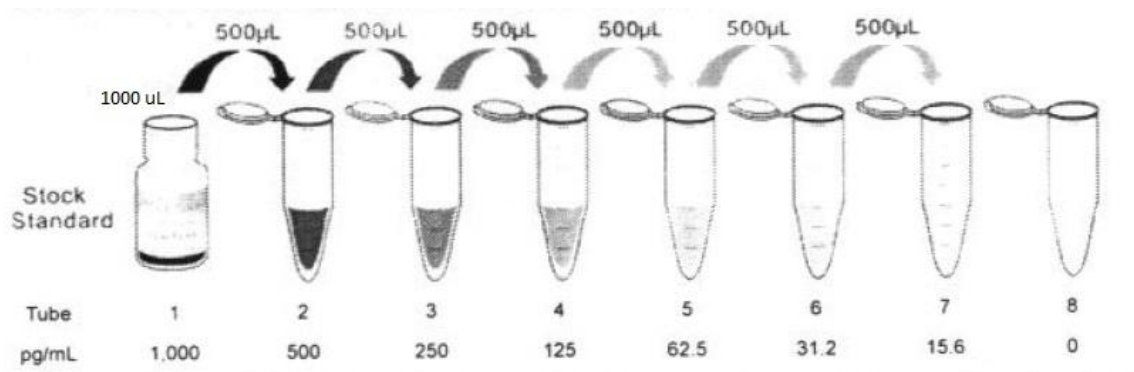
Metody kolorymetryczne wykorzystują:

- metoda serii wzorców - próbkę badaną porównuje się z zestawem wzorców w probówkach kolorymetrycznych zawierających roztwory badanej substancji w określonych stężeniach lub ze skalą barw we wzorniku - stosowana w przeszłości,
- oznaczenie stężenia w kolorymetrach wykorzystując liniową zależność pomiędzy intensywnością zabarwienia a grubością warstwy roztworu.

Krzywa wzorcowa

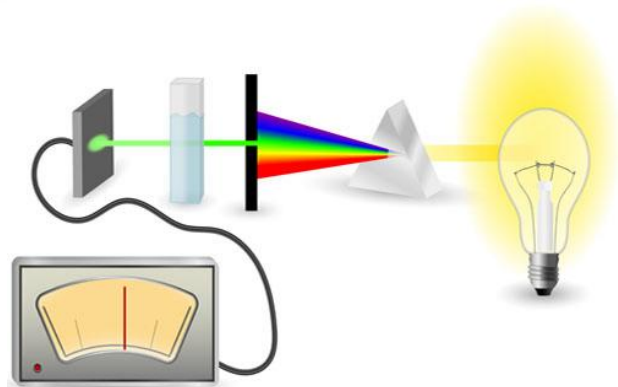
W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowuje się serię probówek ze znanym stężeniem badanej substancji i dokonuje się pomiaru absorbancji w celu przyporządkowania poszczególnym stężeniom odpowiedniej wartości absorbancji, co pozwala wykreślić krzywą zależności stężenia od intensywności zabarwienia. Na oś rzędnych nanosi się absorbancję, a na oś odciętych wartości stężeń. Na podstawie krzywej wzorcowej wyznacza się współczynnik „a” pozwalający na dalsze przeliczenia. Rozcieńczenia roztworów wzorcowych można przygotować na dwa sposoby - jak poniżej w tabeli, lub poprzez serie rozcieńczeń jak poniżej na rysunku.

Nr próbki	Standard (1 mg/cm ³)	Woda Destylowana	Stężenie	Absorbancja
0	-	1 cm ³	-	0,000
1	1,0 cm ³	-	1%	
2	0,8 cm ³	0,2 cm ³	0,8%	
3	0,6 cm ³	0,4 cm ³	0,6%	
4	0,4 cm ³	0,6 cm ³	0,4%	
5	0,2 cm ³	0,8 cm ³	0,2%	



Aparatura

Podstawowymi elementami typowego spektrofotometru są: źródło światła, monochromator, miejsce umieszczenia próbki i wzorca (w przypadku próbek ciekłych i gazowych stosuje się kuwety pomiarowe) oraz fotodetektor.



Do zbadania absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w paśmie światła widzialnego oraz w nadfiolecie wykorzystywane są spektrofotometry UV-VIS. Źródłem promieniowania mogą być:

- wysokociśnieniowe łukowe lampy ksenonowe;
- lampy deuterowe;
- lampy wolframowo-halogenowe.

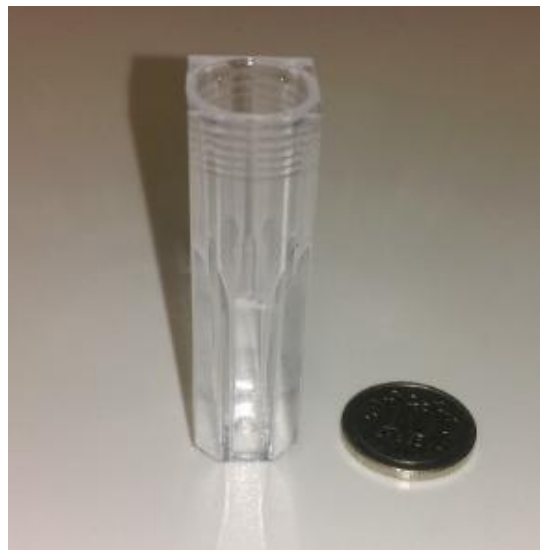
Zwykle stosuje się źródła promieniowania ciągłego, przy czym w zakresie do 380 - 400 nm stosuje się lampy wodorowe lub deuterowe, natomiast w zakresie od 350 - 380 stosuje się lampy wolframowe lub wolframowo-halogenowe.

Do wydzielenia właściwego pasma z szerokiego zakresu spektralnego źródła stosuje się monochromatory. Monochromator składa się z elementu dyspersyjnego (rozszerzającego) oraz dwóch szczelin. Szczelina wejściowa wydziela wiązkę kierowaną na element dyspersyjny, szczelina wyjściowa wycina właściwe pasmo z rozszczepionego widma. Elementem dyspersyjnym może być pryzmat kwarcowy lub siatka dyfrakcyjna. Wadą pryzmatu jest to, że dyspersja nie jest równomierna w całym zakresie widma, przez co szerokość pasma przy ustalonej szerokości szczeliny zależy od długości fali. W przypadku siatek dyfrakcyjnych zwykle stosuje się siatki odbiciowe, które cechują się wydajnością optyczną większą niż siatki transmisyjne.

W przypadku badania próbek ciekłych lub gazowych stosuje się kuwety pomiarowe. Kuwety pomiarowe muszą być starannie wykonane, zapewniać dokładnie znaną grubość warstwy absorbującej, wykazywać odporność na działanie chemikaliów i dużą transmisję promieniowania. Stosuje się głównie kuwety o grubości 10 mm, spotyka się jednak również kuwety o mniejszej lub większej grubości.

W przypadku badań w nadfiolecie stosuje się kuwety kwarcowe lub krzemionkowe, natomiast w świetle widzialnym kwarcowe lub ze szkła optycznego, niekiedy z tworzyw sztucznych. Stosuje się też specjalne typy kuwet, na przykład przepływowe lub z płaszczem wodnym.

Kuwety - po lewej kwarcowa do pomiarów w ultrafiolecie, po prawej z tworzywa sztucznego do pomiarów w świetle widzialnym.



Detektory i układy pomiarowe

Detektor służy do zamiany padającego promieniowania elektromagnetycznego na sygnał elektryczny. Do tego celu stosuje się głównie fotokomórki, fotopowielacze i fotodiody półprzewodnikowe. Sygnał z detektora kierowany jest do układu pomiarowego, którym może być odpowiednio wyskalowany galwanometr. W nowoczesnych spektrofotometrach stosuje się systemy elektroniczne, często sprzężone z układami komputerowymi, pełniącymi różnorodne funkcje w zakresie prezentacji, analizy, obróbki i zapisu danych.

Spektrofotometr ćwiczeniowy

