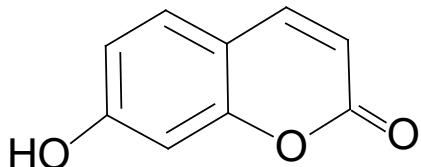


## Esercitazione 2: analisi spettrofotometrica di una miscela

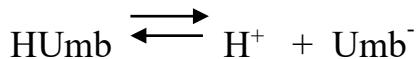
### Principio del metodo

L'esercitazione consiste nel determinare il  $pK_a$  dell'**umbelliferone (7-idrossi-cumarina)**:



misurando le concentrazioni delle sue forme indissociata ( $HUmb$ ) e dissociata ( $Umb^-$ ), presenti in miscela, per via spettrofotometrica.

Per l'equilibrio:



valgono le relazioni:

$$K_a = \frac{[H^+][Umb^-]}{[HUmb]} \quad \text{ossia} \quad pK_a = pH + \log \frac{[HUmb]}{[Umb^-]}$$

I valori di  $[HUmb]$  e  $[Umb^-]$  vengono calcolati da misure dell'assorbanza delle loro miscele a vari pH, usando le lunghezze d'onda **323 nm** ( $\lambda_{max}$  per  $HUmb$ ) e **365 nm** ( $\lambda_{max}$  per  $Umb^-$ ) e risolvendo il sistema delle equazioni:

$$A(323) = \epsilon^{HUmb}(323) [HUmb] + \epsilon^{Umb^-}(323) [Umb^-]$$

$$A(365) = \epsilon^{HUmb}(365) [HUmb] + \epsilon^{Umb^-}(365) [Umb^-]$$

Poiché la somma delle concentrazioni delle due forme dell'indicatore è nota (essendo fissata dall'operatore):  $[HUmb] + [Umb^-] = c$ , si può in alternativa usare il sistema:

$$A(365) = \epsilon^{HUmb}(365) [HUmb] + \epsilon^{Umb^-}(365) [Umb^-]$$

$$c = [HUmb] + [Umb^-]$$

**Entrambi i metodi** devono essere applicati per i calcoli nella relazione sull'esercitazione.

## Strumentazione

Spettrofotometro UV-VIS  
Shimadzu UV-1601;

pH-metro portatile



## Reagenti disponibili

1) Soluzione standard di Umbelliferone  $5 \times 10^{-4}$  M;

2) Sei soluzioni tampone a diverso pH:

Tampone  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (pH prossimo a 9)

Tampone  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  (pH prossimo a 6)

Tamponi a base di TRIS - tris(idrossimetil)amminometano e HCl  
(pH prossimi a 7.3, 7.5, 7.7 e 8.1)

## Procedura

Preparare le **soluzioni di umbelliferone** ai diversi pH di cui al punto 2 prelevando con una pipetta in vetro 2 mL di ciascuna soluzione tampone e trasferendoli in un matraccio da 10 mL, aggiungendo a ciascuna soluzione **1 mL della soluzione standard di umbelliferone**, prelevati con una micropipetta, e portando a volume con acqua deionizzata.

Porre ESTREMA cura nel prelevare di volta in volta il volume della soluzione di umbelliferone; dalla sua riproducibilità dipenderà fortemente l'esito dell'esercitazione.

**Dopo aver preparato le varie soluzioni di umbelliferone misurare accuratamente con un pH-metro il pH di quelle preparate con i tamponi a pH 7.3, 7.5, 7.7 e 8.1 e prenderne nota.**

**Le istruzioni per l'uso del pH-metro saranno disponibili sul banco di laboratorio.**

**NOTA:** il pH di ciascuna soluzione potrebbe essere leggermente inferiore (al massimo di 0.2-0.3 unità) rispetto a quello della soluzione tampone con cui è stata preparata, a causa della dissociazione dell'umbelliferone.

## Misure con lo spettrofotometro

Lo spettrofotometro Shimadzu UV-1601 è gestito da un computer, con il quale è possibile visualizzare gli spettri di assorbimento nello stesso grafico, facilitando la valutazione del punto isosbestico.

All'inizio dell'esercitazione lo spettrofotometro e il computer saranno già accesi e pronti all'uso e il software **UVPC**, che servirà ad acquisire gli spettri, sarà già aperto.

Per fissare i parametri di acquisizione occorrerà andare nel menu **Configure** del software e scegliere l'opzione **Parameters...**

Apparirà una nuova finestra in cui vanno impostati i seguenti parametri:

Measuring Mode	Abs
Recording Range	Low 0      High 1
Wavelength Range	Start 450      End 280
Scan Speed	Medium
Sampling Interval	Auto

Al termine di quest'operazione premere il tasto OK con il puntatore. Il programma ritornerà alla schermata di partenza, caratterizzata da una serie di tasti nella parte inferiore, azionabili con il puntatore.

**Inserire negli appositi alloggiamenti dello spettrofotometro le due cuvette (di quarzo) presenti sulla postazione, entrambe riempite con acqua deionizzata.**

Tornare al programma, scegliere l'opzione **Baseline** e premere il tasto **Start**: lo spettrofotometro eseguirà la correzione della linea di base nell'intervallo di lunghezze d'onda impostato.

Al termine dell'operazione rimuovere la cuvetta posta nell'alloggiamento più vicino all'operatore (ossia quello del campione) e sostituire al suo interno l'acqua deionizzata con la prima soluzione di umbelliferone da analizzare.

**Analizzare per prime la soluzione più acida e quella più basica (il loro ordine è indifferente), poi passare alle altre.**

Premendo nuovamente **Start** si effettuerà l'acquisizione del relativo spettro, che verrà visualizzato sullo schermo.

Al termine dell'acquisizione automaticamente si aprirà una finestra per il salvataggio del file. Scegliere un nome opportuno, che indichi il nome del gruppo, e salvare il file nella directory già impostata.

Prima di passare ad una nuova acquisizione occorre **leggere i valori di assorbanza alle lunghezze d'onda 323 e 365 nm**, che serviranno per il calcolo delle concentrazioni delle due forme dell'umbelliferone dai sistemi di equazioni indicati in precedenza.

A tal fine occorre scegliere sul video l'opzione **Go To WI** e specificare i due valori di lunghezza d'onda, prendendo nota dei relativi valori di assorbanza che compariranno sul video.

La stessa sequenza di operazioni andrà ripetuta per tutte le varie soluzioni di umbelliferone ai diversi pH, **SENZA MAI CHIUDERE IL SOFTWARE**.

Al termine di tale operazione saranno disponibili le assorbanze a 323 e 365 nm della miscela di Humb e Umb<sup>-</sup>, oltre agli spettri registrati sul computer.

Per la risoluzione dei sistemi di equazioni occorre però conoscere anche i valori di  $\epsilon$  per le due forme dell'indicatore alle due lunghezze d'onda.

Tali assorbività si potranno ricavare dalle assorbanze misurate a 323 e 365 nm per le soluzioni di umbelliferone nei tamponi H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>; nella prima soluzione, che è la più acida, si può ritenere che l'umbelliferone sia presente solo come HUmb, per cui si può scrivere la legge di Lambert-Beer come (il cammino ottico è unitario):

$$A(323) = \epsilon^{HUmb}(323) c$$

$$A(365) = \epsilon^{HUmb}(365) c$$

dove **c** è la concentrazione totale, nota, di indicatore.

Per la soluzione di umbelliferone in tampone NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>, che è la più basica, si può ritenere che predomini la forma Umb<sup>-</sup> e quindi risulta:

$$A(323) = \epsilon^{\text{Umb}^-}(323) c$$

$$A(365) = \epsilon^{\text{Umb}^-}(365) c$$

Note  $c$  e le varie assorbanze misurate sperimentalmente per le due soluzioni si possono dunque calcolare le assorbività molari delle due forme dell'umbelliferone a 323 e 365 nm e procedere poi con gli ulteriori calcoli, arrivando alla determinazione del pK<sub>a</sub> dell'umbelliferone, come illustrato a lezione.

Nel caso specifico i punti del grafico di interpolazione dei valori di log ([HUm<sup>b</sup>]/[Um<sup>b</sup><sup>-</sup>]) in funzione dei valori di pH con segno meno saranno 4.

**Alla relazione andrà anche allegata l'immagine del grafico contenente i vari spettri acquisiti, ottenuta fotografando con lo smartphone il monitor del computer, o la stampa degli spettri ottenuta in laboratorio.**