WYZNACZENIE STAŁEJ DYSOCJACJI BŁĘKITU BROMOTYMOLOWEGO METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

WSTĘP

Spektrofotometria jest techniką pomiarową polegająca na ilościowym pomiarze transmisji lub absorbancji światła przez próbkę. Stanowi główne narzędzie spektroskopii absorpcyjnej i odbiciowej w bliskim nadfiolecie i świetle widzialnym, a dawniej również w podczerwieni, znajdując szerokie zastosowanie w chemii analitycznej, biologii, medycynie i badaniach materiałowych.
Typowe spektrofotometry UV-VIS (rys.1) umożliwiają pomiar w całym zakresie światła widzialnego oraz bliskim nadfiolecie, a więc w przedziale 180–1100 nm. Zakres nadfioletu dalekiego (próżniowego) jest zwykle pomijany, gdyż występuje wówczas absorpcja promieniowania przez powietrze i wymagane jest stosowanie spektrofotometrów próżniowych. Niektóre spektrofotometry umożliwiają pomiar w zakresie fal krótszych, aż do 165 nm, oraz bliskiej podczerwieni aż do 3000 nm.
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.

Źródło promieniowania

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.
- Niekiedy stosuje się również wysokociśnieniowe ksenonowe lampy łukowe, obejmujące cały zakres UV-VIS.

Wprowadza się także przestrajalne lasery barwnikowe, które zwiększają zdolność rozdzielczą i czułość pomiarów.

Monochromator i inne elementy systemu optycznego

Do wydzielenia właściwego pasma z szerokiego zakresu spektralnego źródła stosuje się monochromatory. Monochromator składa się z elementu dyspersyjnego (rozszczepiającego) oraz szczeliny. 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. Często stosuje się układ kilku monochromatorów, w którym wiązkę rozdziela się wstępnie za pomocą pryzmatu lub siatki małej rozdzielczości (tzw. premonochromatora). W skład monochromatora wchodzi też kolimator, który zamienia wiązkę w wiązkę równoległą; w spektrofotometrach UV-VIS rolę tę pełnią zwierciadła.
W spektrofotometrach z matrycą diodową rolę klasycznego monochromatora przejmuje polichromator (patrz rys.1)

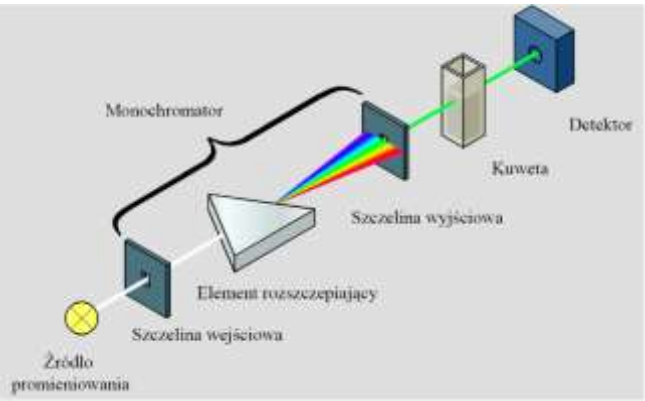
Kuweta

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

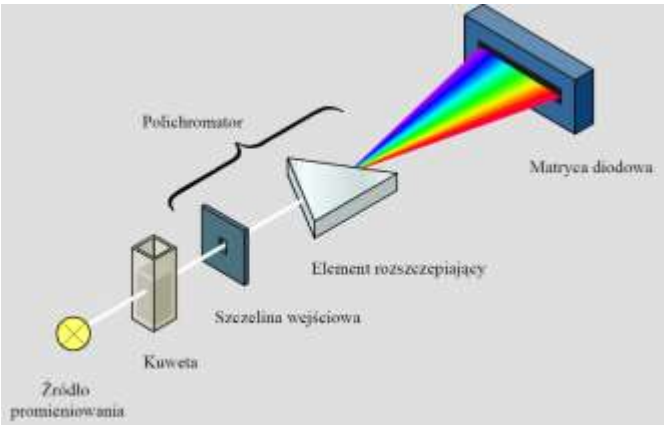
grubości. W przypadku badań w nadfiolecie stosuje się kuwety kwarcowe lub krzemionkowe, natomiast w świetle widzialnym kwarcowe ze szkła optycznego, lub z tworzyw sztucznych. Stosuje się też specjalne typy kuwet, na przykład przepływowe lub z płaszczem wodnym.

Detektory i układy pomiarowe

Detektor służy do zamiany padającego promieniowania elektromagnetycznego na sygnał elektryczny. Głównie stosuje się, fotopowielacze i fotodiody półprzewodnikowe lub matryce diodowe. Sygnał z detektora kierowany jest do układu pomiarowego. Stosuje się również układy kompensacyjne, w których pomiaru dokonuje się za pomocą obniżenia natężenia wiązki porównawczej do wielkości równej natężeniu wiązki przechodzącej przez próbkę. W unowocześnionych spektrofotometrach stosuje się systemy elektroniczne, często sprzężone z układami komputerowymi, pełniącymi różnorakie funkcje w zakresie prezentacji, analizy, obróbki i zapisu danych. Zasadę działania typowego spektrofotometru z pojedynczym detektorem przedstawia rysunek 1. Budowę spektrofotometru z matrycą detekcyjną, matrycą diodową i polichromatorem przedstawia rysunek 2.



Rys.1. Schemat konstrukcji spektrofotometru z pojedynczym detektorem światła.

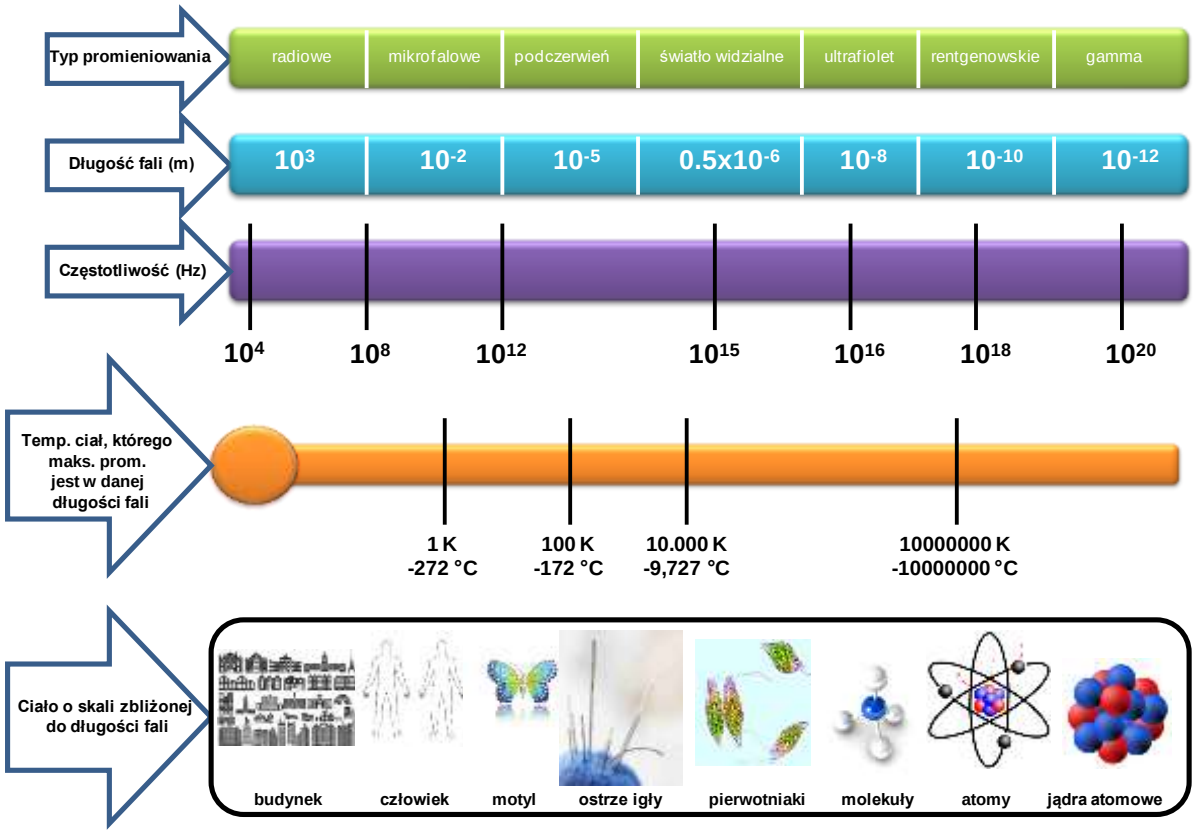


Rys.2. Schemat konstrukcji spektrofotometru z pojedynczym detektorem światła.

Barwa

Widzenie barw przez człowieka związane jest z wrażliwością na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego (ok. 400-700 nm,) specjalnych fotoreceptorów – pręcików i czopków, umiejscowionych w siatkówce oka. Wbrew pozorom to, jak widzimy pomarańczę, nie oznacza, że

emituje ona promieniowanie barwy pomarańczowej. Barwnik pomarańczy pochłania (absorbuje) całe promieniowanie − za wyjątkiem zakresu częstości łącznie postrzeganych jako kolor pomarańczowy właśnie (rys. 3). W rezultacie oko ludzkie rejestruje tzw. barwę dopełniającą obiektu czy substancji.:



Rys.3. Zakresy falowe promieniowania elektromagnetycznego.

Mechanizm zmiany barwy błękitu bromotymolowego – popularnego wskaźnika pH, jest związany z dysocjacją elektrolityczną tego słabego kwasu, w uproszczeniu:

$$HA + H_2O \leftrightarrow A^- + H_3O^+ \tag{1}$$

Stałą dysocjacji opisuje równanie:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \tag{2}$$

W roztworach o kwaśnym odczynie równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku formy niezdysocjowanej *HA* (o barwie żółtej, Tabela 1), natomiast w roztworach o odczynie zasadowym – w kierunku formy zdysocjowanej A^- (o barwie błękitnej). Dzięki różnicy barw między obiema formami, stałą dysocjacji tego kwasu można wyznaczyć przy pomocy pomiaru sumarycznej absorpcji roztworów o różnych wartościach pH w zakresie światła widzialnego.

Tabela 1. Zakres długości fal promieniowania widzialnego odpowiadającego grupom barwowym.

BARWA ŚWIATŁA	ZAKRES DŁUGOŚCI FALI, nm
fioletowa	380-436
niebieska	436-470
niebieskozielona	470-500
zielona	500-530
zielonożółta	530-566
żółta	566-589
pomarańczowa	589-620
czerwona	620-780

Promieniowanie elektromagnetyczne przechodząc przez roztwór o grubości l i stężeniu c ulega absorpcji zgodnie z równaniem:

$$I = I_o e^{-klc} \tag{3}$$

I – jest natężeniem promieniowana po przejściu przez roztwór, I_o – natężenie promieniowania padającego, l – grubość warstwy absorpcyjnej, c – stężenie, k – współczynnikiem proporcjonalności.

Miarą absorpcji promieniowania jest absorbancja (A) - wielkość wyrażająca logarytm stosunku natężenia światła padającego I_0 do natężenia światła przepuszczonego I, definiowana zależnością:

$$A = \log \frac{I_o}{I} \tag{4}$$

Zgodnie z prawem Lamberta-Beera, wartość absorbancji A roztworu jest proporcjonalna do stężenia substancji absorbującej c i grubości warstwy roztworu l:

$$A = \varepsilon l c \tag{5}$$

Przy czym współczynnik proporcjonalności ε – molowy współczynnik absorpcji – określa absorpcję roztworu o stężeniu 1 M (mol dm^{-3}) przy grubości warstwy absorbującej l = 1 cm.

W praktyce zależność absorbancji od stężenia jest liniowa tylko w pewnym zakresie. Wynika to w dużej mierze z następujących przybliżeń przyjętych przy wyprowadzaniu praw absorpcji:

- cząsteczki absorbujące nie oddziałują między sobą, nawet przy wzroście stężenia roztworu;
- cząsteczki absorbujące są rozmieszczone w nieabsorbującym roztworze w ten sposób, że ich przekroje czynne nie nakładają się na siebie i nie zmieniają się przy zmianie stężenia roztworu, grubości warstwy absorbującej czy temperatury.

W rzeczywistości, niezależnie od rodzaju roztworu, przy wyższych stężeniach można spodziewać się odchyleń od prawa Lamberta-Beera, wynikających z nakładania się przekrojów czynnych cząsteczek, czy z pojawienia się oddziaływań międzycząsteczkowych (np. słabych sił van der Waalsa). Znaczne odstępstwa od liniowości, obserwowane dla zależności absorpcji od stężenia, wynikają ze zmian zachodzących w roztworze o wyższym stężeniu. W tych warunkach zwiększa się prawdopodobieństwo tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, hydrolizy, hydratacji, kompleksowania, polimeryzacji i innych procesów, mogących zmieniać jakościowo skład badanego układu. Odchylenia od praw absorpcji mogą wynikać również z warunków wykonywania pomiaru. Niestarannie wymieszana próbka czy monochromator przepuszczający zamiast promieniowania ściśle monochromatycznego, szerszy zakres promieniowania, również zaburzą wyniki. Przyjmuje się, że najmniejszych odstępstw od praw Lamberta-Beera można spodziewać się tak dobierając stężenie badanego roztworu, by wartości absorbancji mieściły się w granicach 0,1-1,0.

Jeśli w roztworze znajduje się więcej niż jedna substancja absorbująca (jak np. w rozważanym przykładzie: żółta forma [HA] i błękitna forma [A^-]), absorbancja całkowita jest sumą absorbancji poszczególnych składników. Dla błękitu bromotymolowego PRAWO ADDYTYWNOŚCI ABSORPCJI można zapisać następująco:

$$A = A_{HA} + A_{A^-} = \varepsilon \cdot l \cdot c = \left(\varepsilon_{HA} c_{HA} + \varepsilon_{A^-} c_{A^-}\right) l \tag{6}$$

W stanie równowagi mamy następujące zależności:

$$c_{HA} = [HA] \tag{7}$$

$$c_{A^-} = [A^-] \tag{8}$$

stężenie całkowite:

$$c = [HA] + [A^-] \tag{9}$$

Po wyznaczenie c z równanie (6) i podstawieniu do równania (9) otrzymujemy odpowiednią zależność:

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{(\varepsilon - \varepsilon_{HA})}{(\varepsilon_{A^-} - \varepsilon)} \tag{10}$$

Którą podstawiamy do równania na stałą dysocjacji (2) i otrzymujemy:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} = [H_3O^+]\frac{(\varepsilon - \varepsilon_{HA})}{(\varepsilon_{A^-} - \varepsilon)} \tag{11}$$

Co prowadzi do równania:

$$\log K_a = -pH + \log \frac{(\varepsilon - \varepsilon_{HA})}{(\varepsilon_{A^-} - \varepsilon)} \tag{12}$$

Gdy pH roztworu jest bardzo niskie, możemy założyć, że absorbuje wyłącznie forma niezdysocjowana HA, wobec czego $\varepsilon \approx \varepsilon_{HA}$. Analogicznie, dla roztworu silnie zasadowego: $\varepsilon \approx \varepsilon_{A^-}$. Mając graniczne parametry ε_{HA} oraz ε_{A^-} do obliczenia poszukiwanej stałej dysocjacji wystarczy jedynie wyznaczenie molowego współczynnika absorpcji ε dla roztworu o znanym *pH*, przy tej samej długości fali, dla której otrzymaliśmy parametry ε_{HA} oraz ε_{A^-}.

LITERATURA

1. Mieczysław Obiedziński: *Wybrane zagadnienia z analizy żywności,* Wyd. SGGW, 2009,
2. Zbigniew Kęcki: *Podstawy spektroskopii molekularnej*. Wyd. III. Warszawa: PWN, 1992.
3. Naftaly Menn: *Practical optics*. Elsevier, 2004, s. 193–195.
4. Jurgen R. Meyer-Arendt: *Wstęp do optyki*. Warszawa: PWN, 1977.
5. Walenty Szczepaniak: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wyd. IV.Warszawa: PWN, 2002.
6. Wojciech Zieliński, Andrzej Rajca (red.): *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*. Wyd. II. Warszawa: WNT, 2000

CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stałej dysocjacji barwnika błękitu bromotymolowego.

APARATURA

- Pehametr
- Mieszadło magnetyczne
- Komputer
- Spektrofotometr UV-VIS, Biosens 6000

SZKŁO

- Zlewka szeroka – 1 dm^3
- Zlewka wąska 25 cm^3 (1szt)
- Fiolki z zakrętkami do przygotowania roztworów buforów - 20 cm^3 (6 szt)
- Fiolki bez nakrętek do przygotowania roztworów barwnych - 20 cm^3 (6 szt)
- Pipety:
  5 cm^3 - 2 szt
  2 cm^3 – 1 szt
  1 cm^3 - 1 szt

ODCZYNNIKI

- Roztwór buforowy (RB) – bufor fosforanowy Brittona-Robinsona:
  (0,04M H_3PO_4 : 0,04M H_3BO_4 : 0,04M CH_3COOH)
- Roztwór błękitu bromotymolowego – $6{,}41 \cdot 10^{-4}$ M
- Roztwór NaOH - 0,2 M

WYKONANIE ĆWICZENIA

W celu wyznaczenia stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego należy:

1. Wykonać miareczkowanie roztworu buforowego RB za pomocą roztworu 0,2 M NaOH. W tym celu do zlewki o objętości 25 cm^3 odmierzamy 10 cm^3 roztworu buforowego, zlewkę umieszczamy na mieszadle magnetycznym, a w zlewce umieszczamy mieszadełko oraz zanurzamy sondę pH-metryczną. Po ustabilizowaniu się wskazań miernika odczytujemy wartość pH. Po pomiarze pH do zlewki dodajemy 2 cm^3 0,2 M NaOH i ponownie odczytujemy wartość pH. Następnie kontynuujemy dodawanie 0,2 M NaOH w ilości 0,5 cm^3, zapisując wyniki pomiarów pH, aż do osiągnięcia sumarycznej objętości 7 cm^3 NaOH.

Tabela 2. Wartości pH serii roztworów w zależności od objętości 0,2 M NaOH

Numer próbki	Objętość NaOH [ml]	pH
1	0	2,12
2	2,0	3,39
3	2,5	4,22
4	3,0	4,68
5	3,5	5,12
6	4,0	5,76
7	4,5	6,33
8	5,0	6,78
9	5,5	7,27
10	6,0	7,92
11	6,5	8,47
12	7,0	9,06

Rys. 4. Barwa roztworów z błękitem bromotymolowym w zależności od pH

2. W następnym etapie na podstawie własnych pomiarów wybieramy i przygotowujemy 6 roztworów o określonym pH (wskazówek udzieli prowadzący zajęcia). Pipetą należy odmierzyć do fiolek po 5 cm^3 roztworu buforowego (bufor RB), a następnie dodać do nich ***połowę objętości*** 0,2 M NaOH zgodnie z wybranym numerem próbki.
3. W kolejnych 6 fiolkach przygotować roztwory błękitu bromotymolowego. Należy odpowiednio pobrać po 5 cm^3 roztworów buforowych przygotowanych w pkt 2 i

dodać 0,2 cm^3 wyjściowego roztworu błękitu o stężeniu $6{,}41 \times 10^{-4}$ M. Rysunek 4 przedstawia przykładowe barwne roztwory uzyskane finalnie.

4. Przygotowane roztwory przelewać do czystych kuwet pomiarowych (**nie stawiać kuwet na spektrofotometrze**).
5. Przy pomocy spektrofotometru należy zarejestrować widma absorpcyjne roztworów – zależności absorbancji roztworów błękitu bromotymolowego od długości fali w zakresie od 700 do 350 nm względem buforu podstawowego jako odnośnika.

Poprawne wykonanie widm wymaga następujących czynności:

a. Wybrać zakres od 700 do 350 nm
b. Dokonać kalibracji spektrofotometru za pomocą roztworu podstawowego buforu jako odnośnika.
c. Wykonać 6 pomiarów widm roztworów barwnika w określonym pH w zakresie od 700 do 350 nm
d. Zapisać wyniki.

Instrukcja szczegółowa znajduje się na końcu opracowania

OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć stężenie błękitu bromotymolowego w badanych roztworach.
   a. Następnie, korzystając z równania (5), na podstawie zmierzonych wartości absorpcji A, obliczyć molowe współczynniki absorpcji ε dla kolejnych długości fal λ: 350, 370, 390….700 nm.
2. Wykreślić zależności $A = f(\lambda)$ dla wszystkich 6 próbek na jednym wykresie.
3. Zilustrować na jednym wykresie zależność $\varepsilon = f(\lambda)$ dla wszystkich roztworów.
4. Na podstawie wykresu $\varepsilon = f(\lambda)$ wybrać długość fali – nie w maksimum absorpcji i nie w punkcie izozbestycznym*, np. 540 nm.

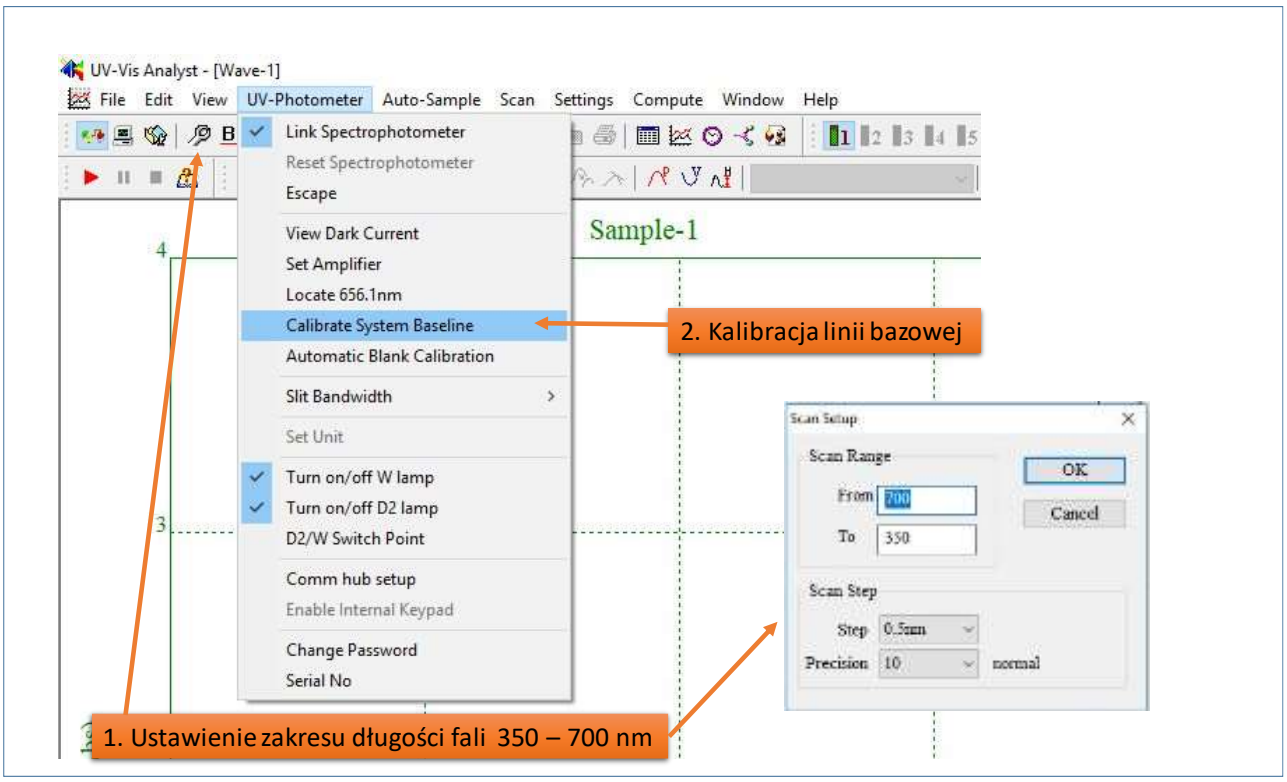
(*Punkt izozbestyczny (izozbastyczny) – jest to punkt odpowiadający określonej długości fali powstały z przecięcia się krzywych wykreślonych w układzie absorbancja-długość fali promieniowania elektromagnetycznego, w którym obie formy związku w roztworze (zdysocjowana i niezdysocjowana) mają jednakowe molowe współczynniki absorpcji i wobec tego zmiana pH jednej z form kosztem drugiej nie wpływa na zmianę jego położenia. W zależności od właściwości kwasowo-zasadowych związek może posiadać wiele punktów izozbestycznych. Dla jednoprotonowego kwasu dysocjującego zgodnie z równaniem: $HA \rightleftharpoons A^- + H^+$ w układzie absorbancja-długość fali obserwować będziemy jeden punkt izozbestyczny. Dla *n*-protonowego kwasu obserwować będziemy *n* punktów izozbestycznych. Na podstawie punktu izozbestycznego, znając molowy współczynnik absorpcji (ekstynkcji) oznaczanego składnika, możemy stosując prawo Lamberta-Beera wyznaczyć jego stężenie.)

5. Dla wybranej długości fali obliczyć stałe dysocjacji K_a dla roztworów od 2-5, korzystając ze równania (12). Na podstawie uzyskanych wartości stałej K_a obliczyć średnią wartość stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego oraz średnie odchylenie standardowe wartości stałej *K*.

6. Porównać uzyskany wynik z wartością literaturową, skomentować ewentualne różnice.

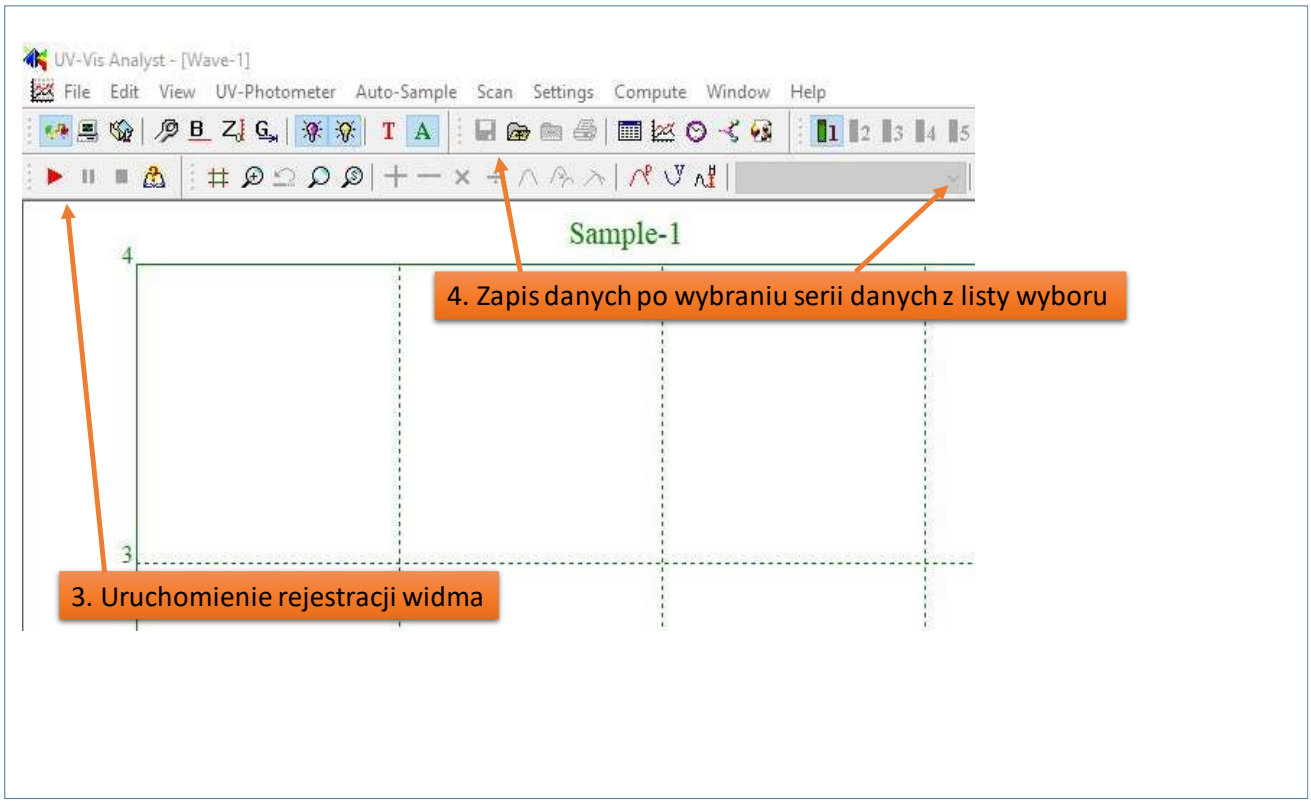
Instrukcja obsługi spektofotometru

a. Uruchomić komputer i spektrofotometr (spektrofotometr powinien być włączony co najmniej 15 min przed pomiarami w celu wygrzania/stabilizacji pracy lampy)
b. Uruchomić aplikację UV-Analyst - skrót znajduje się na pulpicie.
c. Po uruchomieniu upewnić się że komputer nawiązał połączenie ze spektrofotometrem. (na panelu spektrofotometru powinien być wyświetlony komunikat a w lewym górnym rogu, w pasku aplikacji powinna być aktywna czerwona ikonka)
d. W komorze spektrofotometru umieścić kuwetę z buforem podstawowym, wybrać zakres pomiarowy od 700 do 350 nm i dokonać kalibracji linii zerowej na ten roztwór (patrz rys. 5)



Rys. 5. Fragmenty panelu aplikacji UV-Analyst. Wybór zakresu pomiarowego i wykonanie kalibracji linii bazowej.

e. Po kalibracji linii bazowej, umieszczać w uchwycie spektrofotometru kuwety z kolejnymi roztworami barwnika w buforze o odpowiednim pH. Zarejestrować widma 6 roztworów (zgodnie ze wskazówkami z rysunek 6).
f. Po zakończeniu pomiarów zapisać pliki z wynikami. Wypłukać kuwety pomiarowe wodą, osuszyć. Wyłączyć program, i komputer. Spektrofotometr wyłącza prowadzący!!!



Rys. 6. Uruchomienie rejestracji widma i zapis danych na dysk.

Opracowanie studenta powinno zawierać nagłówek w postaci tabeli, której wzór umieszczono poniżej, ze stosownymi informacjami.

…….. *Wydział* …….. *Kierunek* *Studia niestacjonarne/stacjonarne*	…… *Imię i Nazwisko studenta*	…….. *Data wykonywania ćwiczenia:*
Nr grupy: …… *Nr zespołu:* ……..	……..…… *Nr ćwiczenia:*	…….. *Nazwisko Prowadzącego:*

1. Temat ćwiczenia:
2. Cel ćwiczenia:
3. Wstęp teoretyczny (2 strony)
4. Pomiary:
5. Obliczenia:
6. Wykresy:
7. Wnioski: