

## WYZNACZENIE STAŁEJ DYSOCJACJI BŁĘKITU BROMOTYMOŁOWEGO METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

### WSTĘP

**Spektrofotometria** jest techniką pomiarową polegającą na ilościowym pomiarze transmisji lub absorpcji 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 (rozszerzającego) oraz szczeliny. Szczelina wejściowa wydziela wiązkę kierowaną na element dyspersyjny, szczelina wyjściowa wycina właściwe pasmo z rozszerzonego 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)

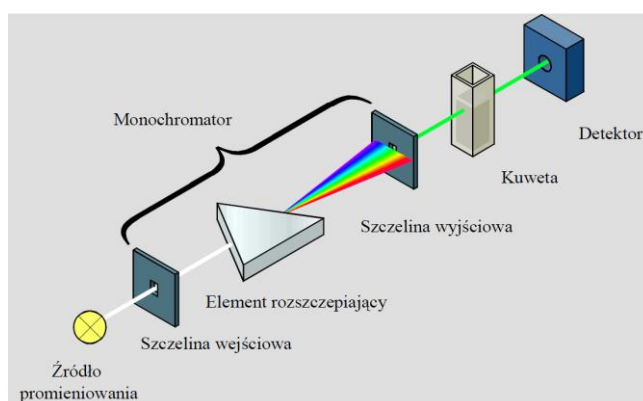
### Kuweta

W przypadku badania próbek ciekłych lub gazowych stosuje się kuwety pomiarowe. Kuwety pomiarowe muszą być starannie wykonane, zapewniać dokładnie znaną grubość warstwy

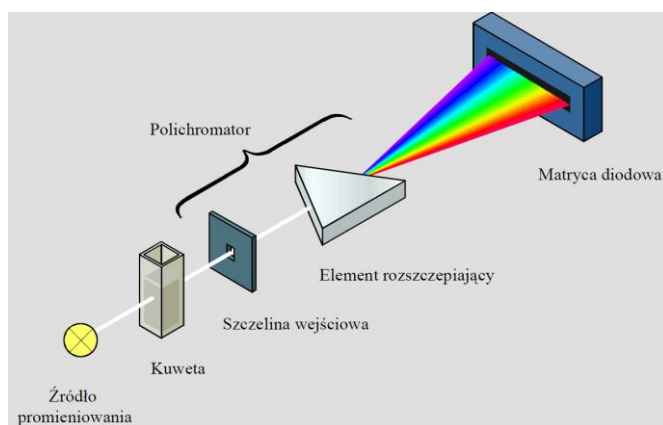
absorbującej, wykazywać odporność na działanie chemikaliów i dużą transmisję promieniowania. Stosuje się głównie kuwety o grubości 10 mm, spotyka się jednak również kuwety o mniejszej lub większej grubości. W przypadku badań w nadfiolecie stosuje się kuwety kwarcowe lub krzemionkowe, natomiast w świetle 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.



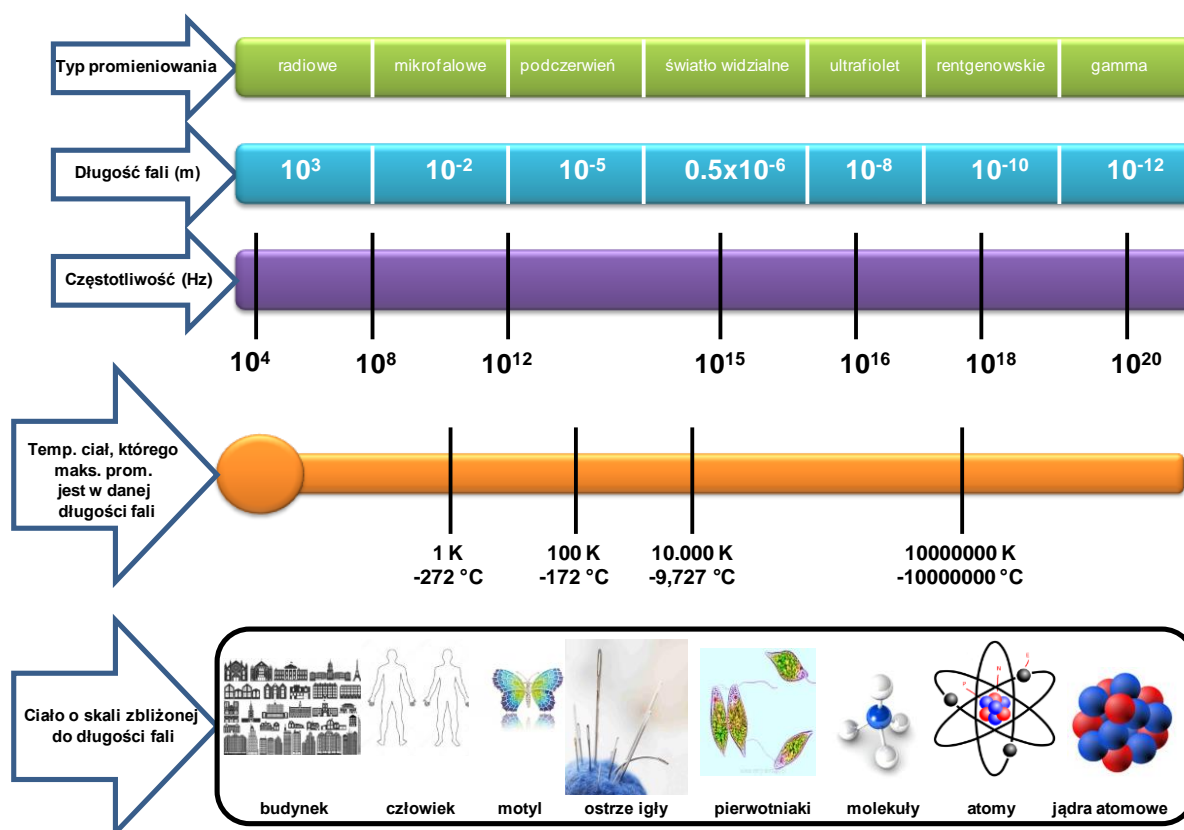
**Rys.1.** Schemat konstrukcji spektrofotometru z pojedynczym detektorem światła.



**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:



Stałą dysocjacji opisuje równanie:

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

W roztworach o kwaśnym odczynie równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku formy niezdisocjowanej  $HA$  (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:

$$I = I_0 e^{-klc} \quad (3)$$

$I$  – jest natężeniem promieniowania po przejściu przez roztwór,  $I_0$  – 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:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (4)$$

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

$$A = \epsilon lc \quad (5)$$

Przy czym współczynnik proporcjonalności  $\epsilon$  – molowy współczynnik absorpcji – określa absorpcję roztworu o stężeniu 1 M ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) 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 odchyień 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 zaburzają 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:

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

W stanie równowagi mamy następujące zależności:

$$c_{HA} = [HA] \quad (7)$$

$$c_{A^-} = [A^-] \quad (8)$$

stężenie całkowite:

$$c = [HA] + [A^-] \quad (9)$$

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

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

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

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

Co prowadzi do równania:

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

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

## 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. Jürgen 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<sup>3</sup>
- Zlewka wąska 25 ml (1szt), 50 ml (1szt)
- Fiolki z zakrętkami do przygotowania roztworów buforów - 20 ml (6 szt)
- Fiolki bez nakrętek do przygotowania roztworów barwnych - 20 ml (6 szt)
- Pipety: 5 ml - 2 szt; 2 ml – 1 szt; 1 ml - 1 szt

## ODCZYNNIKI

- Roztwór buforowy (RB) – Bufor fosforanowy Brittona-Robinsona:  
(0,04M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 0,04M H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> : 0,04M CH<sub>3</sub>COOH)
- Roztwór błękitu bromotymolowego – 6,41·10<sup>-4</sup> M
- Roztwór NaOH - 0,2 M

## WYKONANIE ĆWICZENIA

W celu wyznaczenia stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego należy:

- Wykonać miareczkowanie roztworu buforowego RB za pomocą roztworu NaOH. W tym celu, w zlewce o objętości 25 ml umieszczamy 10 ml podstawowego roztworu buforowego, zlewkę umieszczamy na mieszadle magnetycznym, w zlewce umieszczamy mieszadelko oraz zanurzamy sondę pH-metryczną. Po ustabilizowaniu się wskazań miernika odczytujemy wartość pH. Po pomiarze pH do zlewki dodajemy 2 ml 0,2M NaOH i ponownie odczytujemy wartość pH, następnie kontynuując, dodajemy po 0,5 ml 0,2 NaOH, zapisując wyniki pomiarów pH, aż do osiągnięcia sumarycznej objętości 11 ml NaOH. Odczyty wartości pH Przewidywane wartości pH w zależności od dodanej objętości NaOH przedstawiona w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Proponowane przygotowanie próbek do miareczkowania pH-metrycznego.

Bufor	V <sub>NaOH</sub> (cm <sup>3</sup> )	pH buforu	BARWA
1*	0	1,87	Słomkowo-żółty
2	2,0	2,9	żółty
3	2,5	3,65	
4	3,0	4,23	
5	3,5	4,62	
6	4,0	4,98	
7	4,5	5,4	
8	5,0	5,89	Zielono-żółty
9	5,5	6,28	zielony
10	6,0	6,58	zielony
11	6,5	6,84	turkusowy
12	7,0	7,11	
13	7,5	7,45	
14	8,0	7,94	
15	8,5	8,45	niebieski
16	9,0	8,79	
17	9,5	9,07	
18	10,0	9,3	
19	10,5	9,53	
20	11,0	9,75	

\*Roztwór podstawowy pobrany bezpośrednio z butelki.

- W następnym etapie, na podstawie *własnych* pomiarów wybieramy i przygotowujemy 6 roztworów buforowych o określonym pH. Sugerowane wartości pH zaznaczono w Tabeli 1. Pipetą należy odmierzyć do fiolek po 5 cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego (połowa objętości z tabeli nr 2), a następnie dodać do nich odpowiednią objętość 0,2 M NaOH zgodnie z wynikami własnych wcześniejszych pomiarów.
- W kolejnych 6 fiolkach przygotować roztwory błękitu bromotymolowego. Należy odpowiednio pobrać po 5 cm<sup>3</sup> roztworów buforowych przygotowanych w pkt 2 i dodać

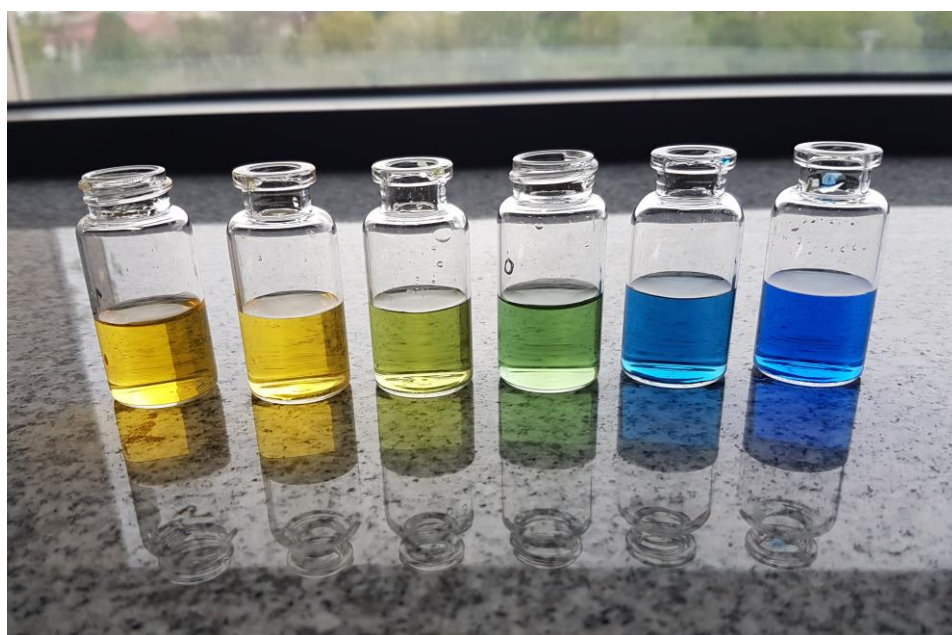
0,2 cm<sup>3</sup> wyjściowego roztworu błękitu o stężeniu  $6,41 \times 10^{-4}$  M. Rysunek 4 przedstawia przykładowe barwne roztwory uzyskane finalnie.

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

Poprawne wykonanie widm wymaga następujących czynności:

- a. Wybrać zakres od 350 do 700 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 350 do 700 nm
- d. Zapisać wyniki.

**Instrukcja szczegółowa znajduje się na końcu opracowania**



Rys. 4. Przykładowe barwne roztwory błękitu bromotymolowego w różnych pH.

## 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  $\epsilon$  dla kolejnych długości fal  $\lambda$ : 350, 370, 390...700 nm.
2. Wykreślić zależności  $A = f(\lambda)$  dla wszystkich 6 próbek na jednym wykresie.
3. Zilustrować na jednym wykresie zależność  $\epsilon = f(\lambda)$  dla wszystkich roztworów.



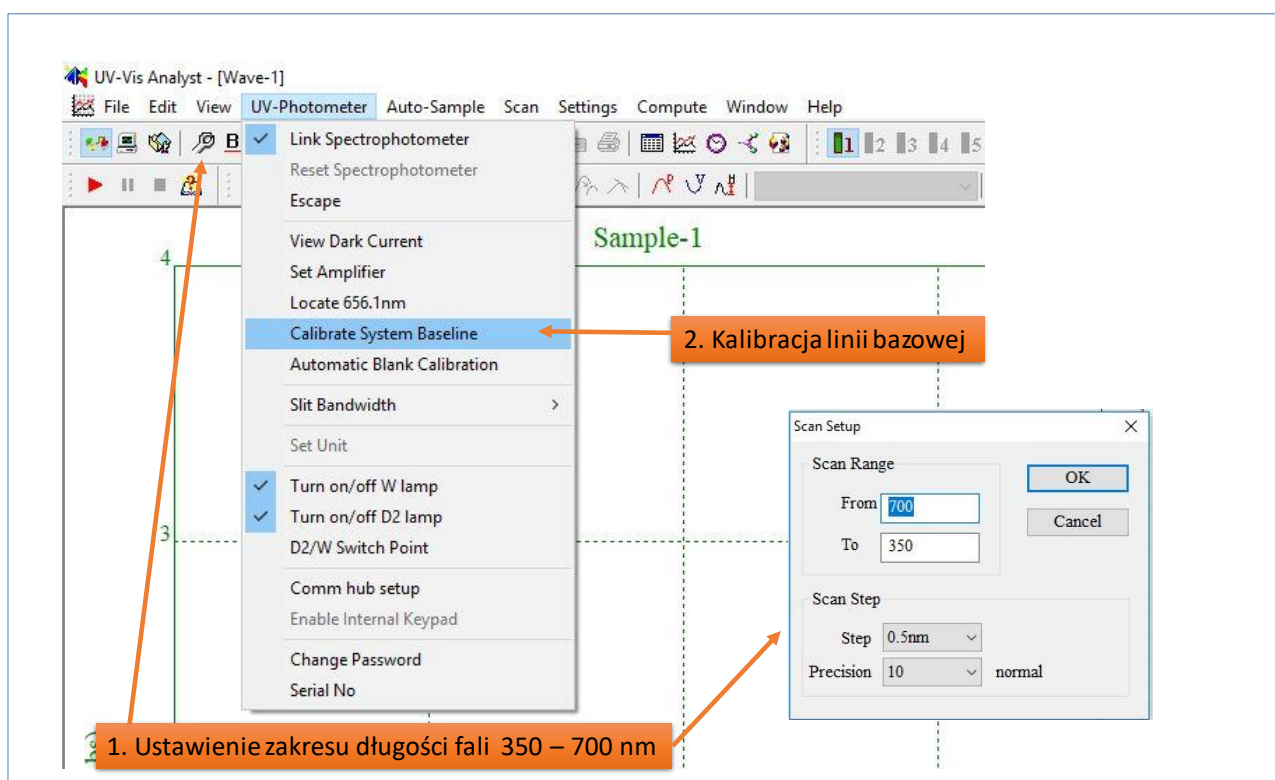
4. Na podstawie wykresu  $\varepsilon = f(\lambda)$  wybrać długość fali – nie w maksimum absorpcji i nie w punkcie izobestycznym\*, np. 540 nm.

(\*Punkt izobestyczny (izobastyczny) – 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 niezdisocjowana) 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 izobestycznych. Dla jednoprotowego kwasu dysocjującego zgodnie z równaniem:  $\text{HA} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$  w układzie absorbancja-długość fali obserwować będziemy jeden punkt izobestyczny. Dla  $n$ -protonowego kwasu obserwować będziemy  $n$  punktów izobestycznych. Na podstawie punktu izobestycznego, znając molowy współczynnik absorpcji (ekstynkcji) oznaczonego składnika, możemy stosując prawo Lamberta-Beera wyznaczyć jego stężenie.)

5. Dla wybranej długości fali obliczyć stałą 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.

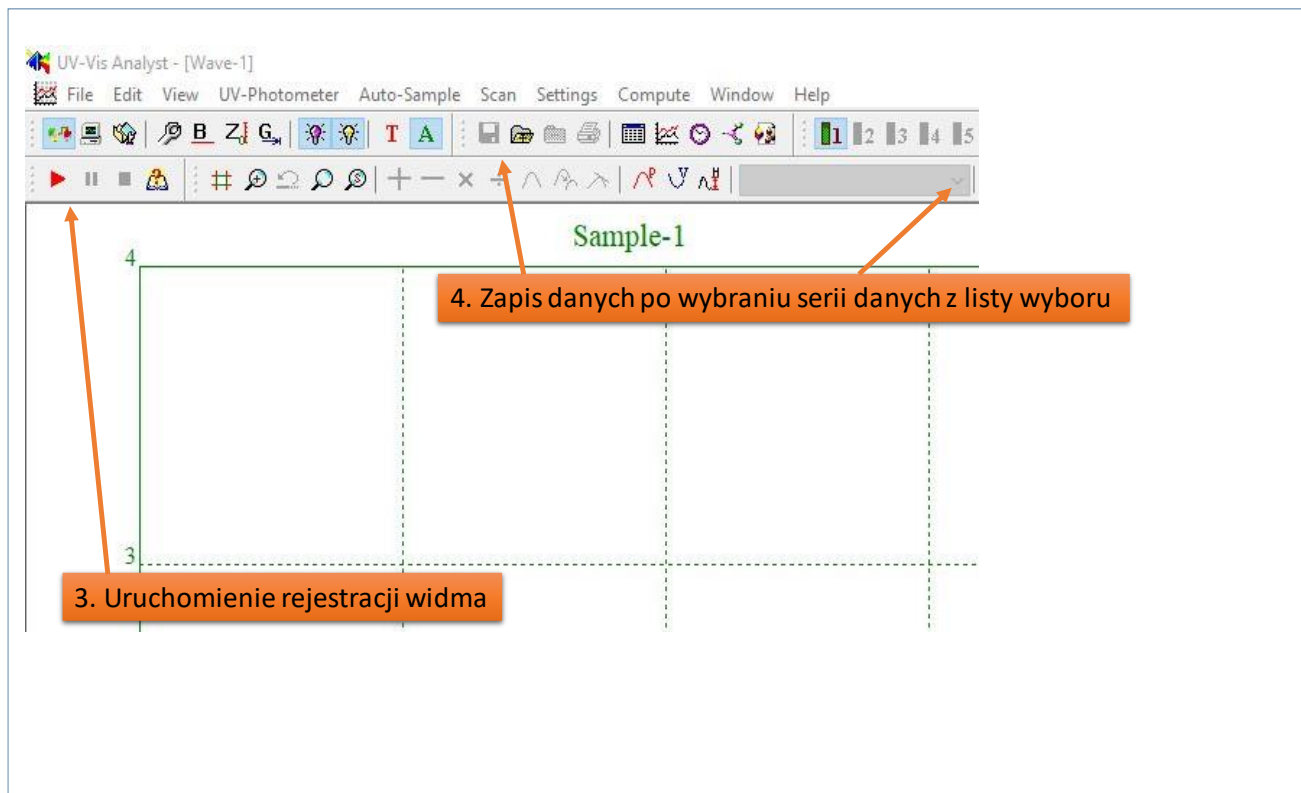
## Instrukcja obsługi spektrofotometru

- Uruchomić komputer i spektrofotometr (spektrofotometr powinien być włączony co najmniej 15 min przed pomiarami w celu wygrzania/stabilizacji pracy lampy)
- Uruchomić aplikację UV-Analyst - skrót znajduje się na pulpicie.
- 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 ▶)
- W komorze spektrofotometru umieścić kuetę z buforem podstawowym, wybrać zakres pomiarowy od 350 do 700 nm i dokonać kalibracji linii zerowej na ten roztwór (patrz rysunek 5)



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

- Po kalibracji linii bazowej, umieszczać w uchwycie spektrofotometru kuetę z kolejnymi roztworami barwnika w buforze o odpowiednim pH. Zarejestrować widma 6 roztworów (zgodnie ze wskazówkami z rysunek 6).
- Po zakończeniu pomiarów zapisać pliki z wynikami. Wyplukać kuetę 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.

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

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