

10 a) SPEKTROFOTOMETRIE – STANOVENÍ MOLÁRNÍHO ABSORPČNÍHO KOEFICIENTU

Spektrofotometrie je jednou z nejrozšířenějších analytických metod, při níž se měří množství světla pohlcené roztokem stanovované látky. Metoda je poměrně citlivá, umožňuje pracovat i s roztoky látek o koncentraci menší než $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Množství světla pohlceného roztokem, jehož tloušťka vrstvy je d a koncentrace c , určuje Lambertův-Beerův zákon

$$I = I_0 \cdot \exp(-\alpha \cdot c \cdot d) \quad (\text{X-1})$$

ve kterém I_0 je intenzita dopadajícího světla, I je prošlé množství světla roztokem a α je absorpční koeficient. Rovnici (X-1) je možno psát také ve tvaru

$$\log \frac{I}{I_0} = -\varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{X-2})$$

Konstanta ε se nazývá molární dekadický absorpční koeficient. Poměr I/I_0 , který může nabývat hodnot od 1 do 0, se nazývá propustnost (transparence) T . Záporný dekadický logaritmus propustnosti se nazývá absorbance A :

$$-\log \frac{I}{I_0} = A = \varepsilon \cdot c \cdot d = -\log T \quad (\text{X-3})$$

Hodnoty absorbance se pohybují v intervalu od 0 do ∞ , ovšem při požadavku dosažení vysoké přesnosti měření je optimální pracovat s roztoky, jejichž absorbance nepřekračuje hodnotu 1. Jestliže existuje v roztoku n absorbujících složek, pak je absorbance aditivní:

$$A = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d \quad (\text{X-4})$$

Molární dekadický absorpční koeficient ε je při dané vlnové délce charakteristickou konstantou a nezávisí na koncentraci látky. Jeho hodnota vykazuje pro danou látku charakteristický tvar závislosti na vlnové délce.

V některých případech nemusí být Lambertův-Beerův zákon splněn a absorbance není lineární funkcí koncentrace. Proto před každým měřením, v němž se vychází z Lambertova-Beerova zákona, je nutné ověřit jeho platnost a sestavit kalibrační křivku závislosti absorbance na koncentraci.

Úkol: Ověřte platnost Lambertova-Beerova zákona a stanovte molární absorpční koeficienty pro dané indikátory

1. Bromthymolová modř (BTM), pH=9, $\lambda_{\max} = 615 \text{ nm}$,
2. Methyloranž (MO), $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$,
3. Krystalová violet' (KV), $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$.

Experimentální vybavení:

- $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok krystalové violeti
- $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok methyloranže
- $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok BTM v pufru o pH = 9
- pufr pH = 9
- pipety a pipetovací balonek
- 4 kádinky o objemu 25, 50 cm³
- 10 odměrných baněk o objemu 25 cm³
- spektrofotometr s kyvetami 1 cm

Pracovní postup: Do odměrných baněk napipetujeme postupně 0,5 až 5 cm³ (po 0,5 ml) základního roztoku jednotlivých indikátorů, doplníme po značku destilovanou vodou (v případě BTM pufr o pH = 9), zazátkujeme a promícháme. Naplníme si spektrofotometrické kyvety ($\approx 1 \text{ cm}$ pod okraj kyvety), očistíme kyvetu hadříkem a opatrně vložíme do spektrofotometru. Nejprve musíme změřit srovnávací roztok a potom roztoky indikátoru. Srovnávacím roztokem je destilovaná voda (u BTM opět pufr o pH=9). Absorbanci roztoku měříme v 1 cm spektrofotometrických kyvetách při vlnové délce λ_{\max} .

Vyhodnocení:

- Naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé koncentrace studovaných látek zapíšeme společně s příslušnou hodnotou koncentrace do tabulky (Tabulka X-1)

Tabulka X-1: Ověření Lambert-Beerova zákona – krystalová violet³ (KV)

Objem KV [cm ³]	Koncentrace KV [mol · dm ⁻³]	A	ε [mol ⁻¹ · dm ³ · cm]
0,5			
1,0			
1,5			
2,0			
2,5			
3,0			
3,5			
4,0			
4,5			
5,0			

- Hodnotu koncentrace vypočítáme dle vztahu

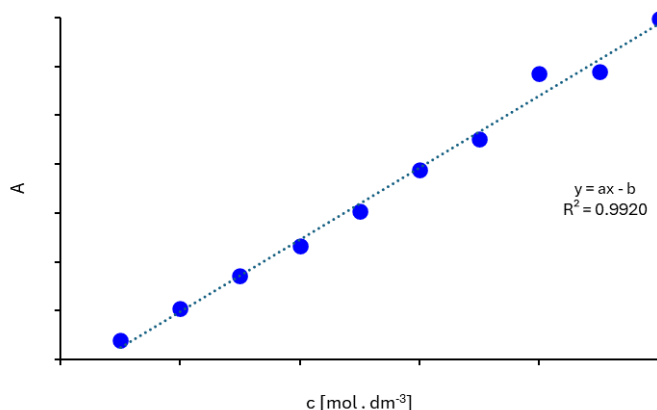
$$c = \frac{n}{V_{celk.}} = \frac{c_{ind.} \cdot V_{ind.}}{V_{celk.}} \quad (X-5)$$

- Např. pro roztok obsahující 2 ml KV

$$c = \frac{5 \cdot 10^{-5} \cdot 0,002}{0,025} = 4 \cdot 10^{-6} (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}) \quad (X-5a)$$

- Pomocí rovnice (X-3) vypočítáme hodnotu molárního absorpčního koeficientu ε

- Sestrojíme graf závislosti $A = f(c)$



- **A** (závisle proměnná) → osa y
- **c [mol·dm⁻³]** (nezávisle proměnná) → osa x
- velikost grafu alespoň 10 x 10 cm
- body izolované, nespojovat !!!
- lineární závislost → proložíme přímkou, uvést rovnici přímky a koeficient R^2
- rozsah os vhodně zvolíme dle naměřených hodnot, abychom využili celou plochu grafu pro naše naměřené hodnoty

Graf X-1: Závislost $A = f(c)$ pro indikátor

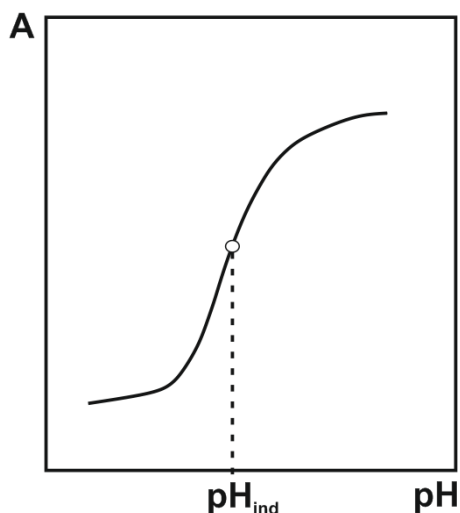
- Do **závěru** protokolu nezapomeňte uvést:
 - co bylo cílem úlohy, co jste stanovovali, jak jste to provedli
 - kde jsou uvedena data (např. v tabulce 1, 2 atd.) a grafické závislosti (např. Graf 1 atd.)
 - pro každý indikátor uveďte průměrnou hodnotu molárního absorpčního koeficientu se směrodatnou odchylkou ($\varepsilon = \varepsilon_{\text{prům.}} \pm \text{směr. odch.}$)
 - ještě uveďte hodnotu molárního absorpčního koeficientu z grafu (směrnice přímkové závislosti)
 - porovnejte vámi stanovené hodnoty molárních absorpčních koeficientů s tabelovanými hodnotami (tyto uveďte i do závěru) a vyjádřete relativní chybu v %
 - pokud se něco nepovedlo, nezapomeňte to uvést a napsat pravděpodobnou příčinu nepřesnosti

10 b) SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ pK INDIKÁTORU

Acidobazické indikátory jsou vesměs organická barviva, která reagují změnou zbarvení na změnu koncentrace hydroxoniových iontů v roztoku.

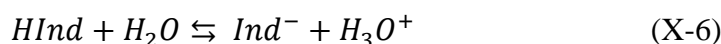
Definici acidobazických indikátorů podal Kolthoff. Acidobazické indikátory jsou slabé kyseliny nebo zásady, jejichž disociovaná forma má jiné zbarvení a strukturu než forma nedisociovaná.

Titrační křivka indikátoru je totožná s titrační křivkou ostatních kyselin a to znamená, že barevný přechod není dán bodem, ale celou oblastí pH. U "dobrých" indikátorů je tato oblast asi 1,5 jednotky pH.



Obr. X-1: Závislost absorbance roztoku indikátoru H_{Ind} na pH

Pro indikátor H_{Ind} , který ve vodě disociuje podle zjednodušené rovnice



můžeme napsat termodynamickou disociační konstantu $K_{H_{Ind}}$

$$K_{H_{Ind}} = \frac{a_{Ind^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{H_{Ind}}} \quad (X-7)$$

Protože $a = \gamma \cdot c$, platí:

$$K_{H_{Ind}} = \frac{\gamma_{Ind^-} \cdot \gamma_{H_3O^+} \cdot c_{Ind^-} \cdot c_{H_3O^+}}{\gamma_{H_{Ind}} \cdot c_{H_{Ind}}} \quad (X-8)$$

Pro velmi zředěné roztoky je možno s velmi malou chybou pokládat aktivitní koeficienty γ za jednotkové a termodynamickou disociační konstantu $K_{H_{Ind}}$ lze ztotožnit s hodnotou zdánlivé (koncentrační) disociační konstanty $K'_{H_{Ind}}$. Rovnici (X-8) lze potom psát ve tvaru:

$$pK_{H_{Ind}} = pH - \log \frac{c_{Ind^-}}{c_{H_{Ind}}} \quad (X-9)$$

Protože platí, že součet koncentrací obou forem je konstantní

$$c_{Ind^-} + c_{H_{Ind}} = c_T \quad (X-10)$$

z Lambertova-Beerova zákona a z rovnic (X-7), (X-9) vyplývá:

$$pK_{H_{Ind}} = pH - \log \frac{A - A_{H_{Ind}}}{A_{Ind^-} - A} \quad (X-11)$$

Závislost absorbance na pH je znázorněna na Obr. X-1.

Úkol: Spektrofotometrie - stanovte pK bromthymolové modře (BTM)

Experimentální vybavení:

- $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok BTM v pufru o pH = 9
- sada Britton – Robinsonových pufrů
- pipety a pipetovací balonek
- 4 kádinky o objemu 25, 50 cm³
- 10 odměrných baněk o objemu 25 cm³
- spektrofotometr s kyvetami 1 cm
- pH-metr s ISE elektrodou

Pracovní postup: Sadu po 100 cm³ Britton-Robinsonových pufrů o pH ≈ 3 až 10 máme již připravenou.

pH	pH
2,56	7,24
3,29	7,54
6,09	7,96
6,37	8,69
6,80	9,91

Platnost Lambert-Beerova zákona jsme ověřili v předchozí úloze 10 a).

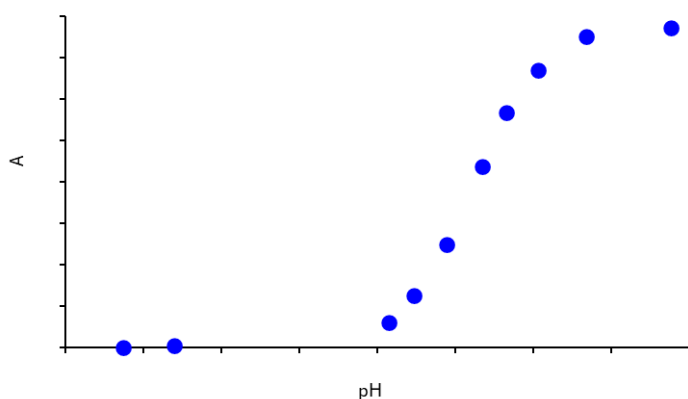
Do odměrných baněk 25 cm³ napipetujeme po 5 cm³ zásobního roztoku BTM a doplníme po značku jednotlivými pufrů, zazátkujeme a promícháme. Srovnávací roztoky připravíme stejně, pouze místo roztoku BTM dáme destilovanou vodu. Spektrofotometrické kyvety naplníme jednotlivými roztoky a kyvety očistíme suchým hadříkem. Na spektrofotometru změříme absorbance při 615 nm. Zbytek roztoků použijeme ke změření pH roztoku a to tak, že srovnávacími roztoky opláchneme elektrody a u roztoků, které obsahují BTM, změříme pH. Vše si pečlivě zapisujeme do tabulky (Tabulka X-2).

Tabulka X-2: Spektrofotometrie – stanovení pK bromthymolové modře

pH (na lahvi)	A ($\lambda_{\max}=615$ nm)	pH (změřené)	pK
2,56			
3,29			
6,09			
6,37			
6,80			
7,24			
7,54			
7,96			
8,69			
9,91			

Vyhodnocení:

- Vypočítáme disociační konstanty roztoků (kromě prvního a posledního) - rovnice X-11, kde za A_{Hind} dosadíme hodnotu absorbance roztoku s nejnižším pH a za A_{Ind} hodnotu absorbance roztoku s nejvyšším pH
- Graficky znázorníme závislost $A = f(\text{pH})$



- **A** (závisle proměnná) → osa y
- **pH** (nezávisle proměnná) → osa x
- velikost grafu alespoň 10 x 10 cm
- body izolované, nespojovat !!!
- rozsah os vhodně zvolíme dle naměřených hodnot, abychom využili celou plochu grafu pro naše naměřené hodnoty

Graf X-2: Závislost $A = f(\text{pH})$ pro bromthymolovou modř

- Do **závěru** protokolu nezapomeňte uvést:
 - co bylo cílem úlohy, co jste stanovovali, jak jste to provedli
 - kde jsou uvedena data (např. v tabulce 1, 2 atd.)
 - uveďte průměrnou hodnotu pK se směrodatnou odchylkou ($pK = pK_{\text{prům.}} \pm \text{směr. odch.}$)
 - okomentovat přesnost stanovení (jak velké jsou relativní chyby v % od tabelovaných hodnot – též uveďte)
 - pokud se něco nepovedlo, nezapomeňte to uvést a napsat pravděpodobnou příčinu nepřesnosti