

Ćwiczenie 10

Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji. Ilościowe oznaczanie *p*-nitrofenolu. Zależność molowego współczynnika absorpcji od pH.

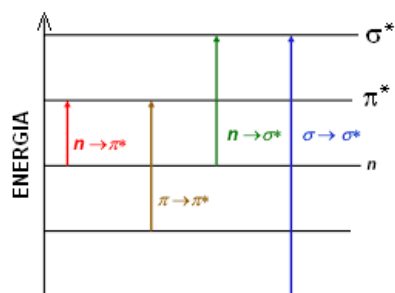
Część teoretyczna:

Spektroskopia obejmuje szereg metod badania materii przy użyciu promieniowania elektromagnetycznego (np. światła), które może być zarówno emitowane, jak i pochłaniane (absorbowane). Bardzo szerokie zastosowania znalazła zwłaszcza spektroskopia elektronowa w zakresie światła widzialnego (VIS; 400-800 nm) i nadfioletu (UV; 200-400 nm). W widmach absorpcyjnych UV-VIS w wyniku przejścia światła (promieniowania elektromagnetycznego) przez roztwór danego związku chemicznego obserwuje się przejścia elektronów walencyjnych ze stanu podstawowego do wzbudzonego. W wyniku takiego przejścia promieniowanie elektromagnetyczne o pewnych długościach fali jest pochłaniane (absorbowane). Absorpcja promieniowania (w przypadku światła mówimy często o absorpcji fotonu) związana jest z przejściami elektronów na wyższe poziomy energetyczne. Należy jednak pamiętać, że aby kwanty promieniowania elektromagnetycznego doprowadziły do takiego przejścia, to muszą posiadać odpowiednią energię, odpowiadającą różnicy energii pomiędzy poziomami energetycznymi ($\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$, gdzie ν - określa częstość promieniowania). Energie potrzebne do zmiany rozkładu elektronów w cząsteczce wynoszą kilka elektronowoltów ($1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$) i odpowiadają częstotliwości promieniowania w zakresie światła widzialnego i nadfioletu. Istotnie wiele barw otaczającego nas świata (zabarwienie kwiatów, roślin, materiałów, pigmentów itp.) wywołanych jest wzbudzeniami, w wyniku których elektrony przechodzą z jednego orbitalu na inny (kolejny). Przykładowo pod wpływem promieniowania słonecznego (zawierającego promieniowanie UV-VIS) cząsteczki chlorofilu absorbują czerwone i niebieskie długości fal, przez co następuje wzbudzenie elektronów. Widma elektronowe charakteryzujące stany elektronowo-oscylacyjno-rotacyjne nadają się szczególnie dobrze do badania substancji barwnych, przez co ułatwiają m.in.: identyfikację niektórych leków, czy sprawdzanie ich stopnia czystości.

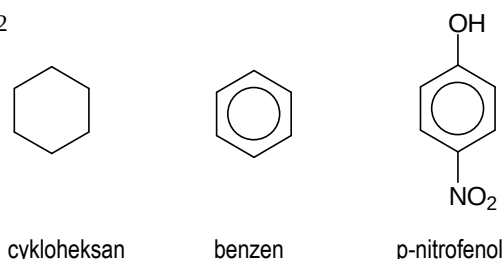
Związki wykazujące absorpcję w zakresie UV-VIS często posiadają w swej budowie grupy atomów zawierających elektrony o małych energiach wzbudzenia. Grupy takie, nazywane są **chromoforami** (grec. „*chroma phoros*” – „kolor niosący”). Zaliczamy do nich: pierścienie aromatyczne (aromatyczny sekstet elektronów), wiązania wielokrotne (wiązania typu π), czy też atomy zawierające wolne pary elektronowe (tzw. elektrony niewiążące n). Jak możemy zaobserwować na Ryc. 1 do wzbudzenia elektronów tworzących wiązania pojedyncze wymagana jest znacznie większa ilość energii, dlatego przejść tych nie obserwuje się podczas absorpcji światła. Związki zawierające elektrony niewiążące (n) i elektrony typu π najczęściej absorbują światło w obszarze nadfioletu. Obok chromoforów w cząsteczkach mogą znajdować się inne grupy atomów określane mianem **auksochromów** (same nie absorbują promieniowania, ale ich obecność powoduje wzrost intensywności

zabarwienia). Wzmacniają one działanie chromoforów, oraz mogą przesuwac maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych (tzw. batochromy, np.: $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$), bądź w kierunku fal krótszych (tzw. hipsochromy, np.: $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-$, $-\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$).

Ryc. 1

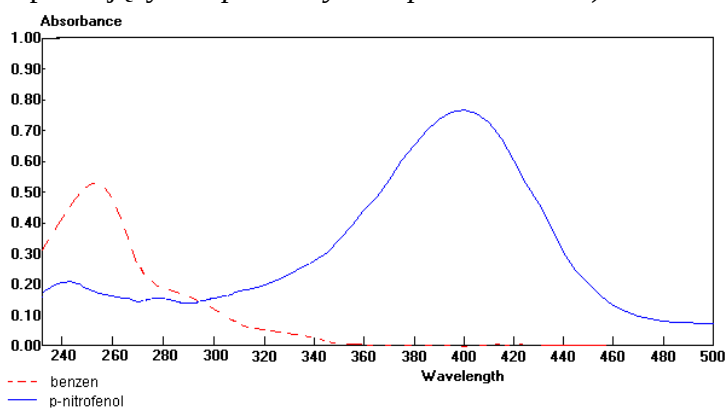


Ryc. 2

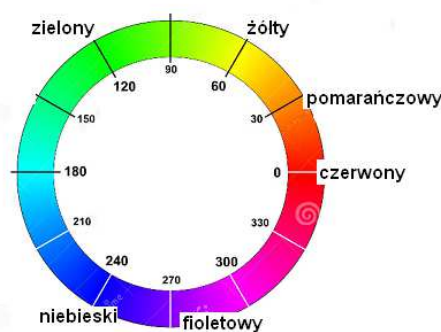


Efekt działania grup chromoforowych i auksochromowych na widma absorpcyjne możemy zademonstrować porównując widma 3 związków: cykloheksanu, benzenu oraz *p*-nitrofenolu. Jak widzimy (Ryc. 2) są to cykliczne związki zawierające 6 węgli. Jeżeli jednak popatrzymy na ich widma to zaobserwujemy, że cykloheksan wcale nie absorbuje światła (brak chromoforów), benzen silnie adsorbuje w nadfiolecie (200-300 nm), a *p*-nitrofenol zarówno w zakresie UV (poniżej 380 nm), jak i w zakresie światła widzialnego (powyżej 400 nm).

Obecność pierścienia aromatycznego (grupy chromoforowej) w benzenie powoduje, że związek ten absorbuje światło o długościach fal 190-300 nm (ultrafiolet), zaś obecność grupy nitrowej i fenolowej (auksochromów) powoduje przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych ($\lambda_{\text{max}}=405\text{-}415\text{ nm}$). Zatem *p*-nitrofenol (zawierający 2 grupy auksochromowe) absorbuje zarówno światło UV i światło widzialne (maksymalną absorpcję wykazuje dla długości fali ok. 405 nm, która odpowiada barwie niebieskiej). Należy podkreślić, że barwa substancji zależy od selektywnej absorpcji określonej długości światła widzialnego i jest ona barwą **dopełniającą (komplementarną)** do pochłoniętej. Ponieważ absorbowane jest światło o barwie niebieskiej to roztwór wykazuje żółte zabarwienie (barwa żółta jest barwą dopełniającą do niebieskiej, czerwona – zielona; biała-czarna, itp.). Poniżej na ryc. 3 przedstawiono widma absorpcyjne benzenu i *p*-nitrofenolu oraz zestawienie barw dopełniających – *położonych naprzeciw siebie*).



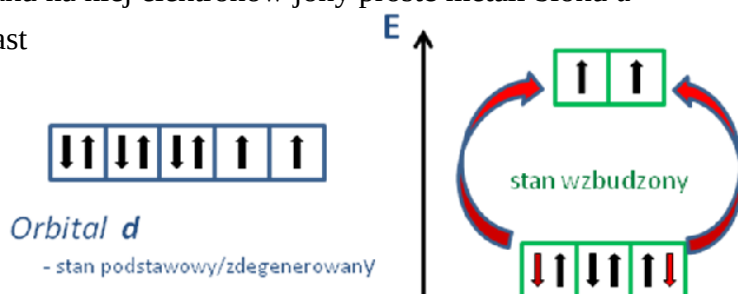
Ryc. 3a. Porównanie widma absorpcji benzenu i *p*-nitrofenolu.



Ryc. 3b. Zestawienie barw dopełniających.

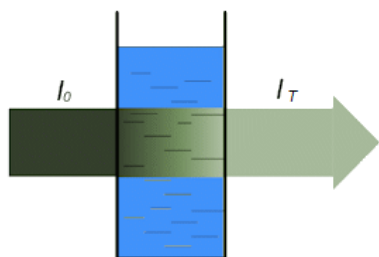
Należy podkreślić, że postrzeganie barw jest zjawiskiem złożonym. Na przykład jeśli postrzegamy jakiś niebieski przedmiot, to absorbuje on barwę żółtą, lub może to także wynikać z faktu, że absorbuje on wszystkie kolory poza kolorem niebieskim. Tak przykładowo jest z zielonym kolorem liści – chlorofil w nich zawarty absorbuje wiele długości fal, które odpowiadają różnym kolorom (np.: czerwone, niebieskie), poza zielonym (*wg niektórych teorii zielone jest odbijane – dlatego obserwujemy właśnie tę barwę u roślin*).

Przejścia elektronowe odpowiadające absorpcji światła widzialnego obserwuje się też w przypadku pierwiastków bloku *d*. Cechą tych pierwiastków jest niecałkowite zapełnienie podpowłoki *d*, w związku z czym elektron z łatwością może być przeniesiony w obręb poziomów energetycznych tej podpowłoki. Orbital *d* jest pięciokrotnie zdegenerowany w polu o symetrii kulistej. Jednak w innych polach dzieli się na dwa podpoziomy energetyczne: trzykrotnie i dwukrotnie zdegenerowane (ryc. 4). Przejścia elektronów pomiędzy tymi podpoziomami *d* odpowiadają energii promieniowania widzialnego (400-800 nm). Dlatego też większość roztworów związków zawierających pierwiastki bloku *d* wykazuje zabarwienie, co jest wykorzystywane do ich analizy (np. Cu^{2+} - niebieskie, CrO_4^{2-} - żółte, Cr^{3+} - zielone, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ - pomarańczowe, MnO_4^- - fioletowe, Fe^{2+} - jasnozielone, Fe^{3+} - żółte). Przy całkowite zapełnionej podpowłoczce *d* lub braku na niej elektronów jony proste metali bloku *d* są bezbarwne (np.: bezbarwny Cu^+ (natomiast Cu^{2+} niebieskie), czy bezbarwny Ti^{4+} , w odróżnieniu od fioletowego Ti^{3+}), bowiem nie ma możliwości przejścia elektronu na poziom wyższy energetycznie.



Prawa absorpcji

Widmo absorpcyjne związku chemicznego jest miarą ilości światła zaabsorbowanego przez ten związek w zależności od długości fali świetlnej (λ). Jeżeli na próbkę pada promieniowanie elektromagnetyczne (światło) o natężeniu I_0 to część tego promieniowania zostanie zaabsorbowana, a część przechodzi przez tą próbkę. Rejestrując natężenia promieniowania padającego (I_0) i przechodzącego (I_T) możemy wyznaczyć ilość światła która ulega pochłonięciu przez roztwór (absorbancja, A), lub która przez niego przeszła (transmitancja, T):



$$A = \log \frac{I_0}{I_T} = \log \frac{1}{T} \quad (1)$$

Absorbancja (dawniej określana też mianem gęstości optycznej) przy danej długości fali zależy od molowego współczynnika absorpcji (ϵ), grubości warstwy absorbującej (zwykle 1cm) i stężenia badanego roztworu. Zależność ta matematycznie jest wyrażona przez **prawo**

Lamberta-Beera (absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu i grubości warstwy absorbującej), co możemy zapisać:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2)$$

gdzie:

A – absorbancja

l – grubość warstwy absorpcyjnej

ε – molowy współczynnik absorpcji [cm^2/mol]

C – stężenie badanego roztworu [mol/dm^3]

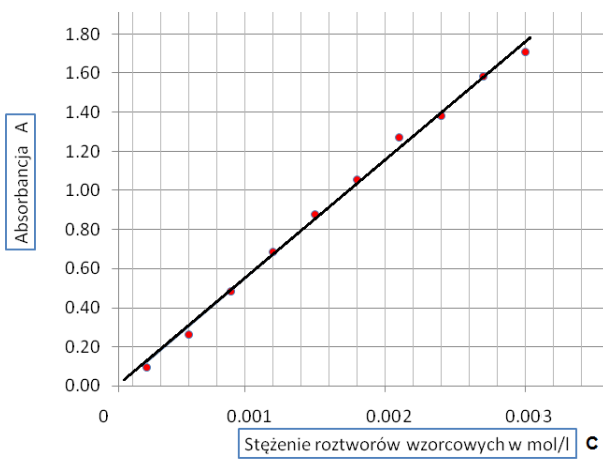
Molowy współczynnik absorpcji (ε) jest charakterystyczny dla danej substancji i ma stałą wartość przy określonej długości fali. Jego wielkość jest proporcjonalna do prawdopodobieństwa przejść pomiędzy poziomami energetycznymi cząsteczki i jest zależna od energii fotonów promieniowania ($h\nu$). Liczbowo przedstawia on absorbancję wykazywaną przez roztwór o stężeniu $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$, przy grubości warstwy 1 cm . Znajomość wartości molowego współczynnika absorpcji pozwala określić stężenie roztworu po oznaczeniu jego absorbancji (ekstynkcji^{*1}) bądź też wykorzystywać do obliczania przewidywanej absorbancji substancji o znanym stężeniu. W tabeli poniżej zestawiono wartości molowego współczynnika absorpcji (ε) dla kilku związków, wraz z podaniem długości fali świetlnej (λ_{max}) przy jakiej dokonano pomiaru.

Substancja	ε ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ($\times 10^3 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)	λ_{max} (nm)
Streptavidin	176	280
Cascade Blue®	28	400
Alexa Fluor® 488	71	495
Oregon Green®	77	488
Rhodamina B	80	570
Fluoresceina	85	498
Texas Red®	85	595
Alexa Fluor 750	240	749
PerCP	380	482
NADH	6 220	340
<i>p</i> -nitrofenol	18 400	405

Prawo Lamberta – Beera może też być zapisane jako: $I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}$, co uwidacznia że natężenie światła maleje wykładniczo wraz z zwiększeniem grubości warstwy (l) przez które światło przechodzi.

^{*1} <łac. *extinctio* - wygaśnięcie> osłabienie wiązki światła przechodzącej przez jakiś ośrodek, wynikające z pochłaniania i rozpraszania światła w tym ośrodku. Termin „ekstynkcja” często był używany zamiennie z terminem „absorpcja”, zwłaszcza w starszych podręcznikach pochodzących z lat 60-70-tych XX wieku. Obecnie wg. Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry), nie jest to termin zalecany i w odniesieniu do pochłaniania światła powinno się używać terminu: absorpcja / absorbancja (IUPAC. Compendium of Chemical Terminology: <http://goldbook.iupac.org/html/A/A00036.html>)

Z prawa Lamberta- Beera korzysta się do wyznaczania stężenia substancji o znanej wartości molowego współczynnika absorpcji. Jeśli go nie znamy możemy zapis $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ przedstawić w postaci graficznej jako zależność absorpcji od stężenia: $A = f(C)$. Będzie to linia prosta przechodząca przez początek układu współrzędnych (punkt (0,0); ryc. 6), a dla poszczególnych stężeń roztworów zaznaczono odpowiadającą im wartość absorpcji.



Ryc. 6. Zależność absorpcji od stężenia barwnej substancji – krzywa wzorcowa.

Korzystając z krzywej wzorcowej sporządzonej dla danej substancji i zmierzeniu absorpcji próbki badanej można na podstawie wykresu (sporządzonego na papierze milimetrowym) określić stężenie tej substancji w badanej próbce.

Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, iż **zmierzona wartość absorpcji jest sumą absorpcji próbki i absorpcji odnośnika**. Wynika to z prawa addytywności, które mówi, że absorbancja całkowita (A) jest sumą niezależnych absorpcji poszczególnych składników ($A_1, A_2, \dots, A_n$):

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i \quad (3)$$

Jako odnośniki stosuje się: powietrze; roztwory nie absorbujące przy żadnej długości fali (roztwory buforowe, woda); roztwory absorbujące, ale nie wchodzące w reakcje z badaną substancją lub roztwory o znanym stężeniu, które będzie się zmieniało w wyniku zachodzących reakcji.

Pomiar absorbancji

Przed wykonaniem pomiaru absorbancji należy wykalibrować spektrofotometr poprzez ustawienie absorbancji na wartość równą zero, gdy w kuwecie znajduje się odnośnik. Jeżeli wykonuje się widmo jakiegoś związku, również należy wykonać widmo odnośnika. Końcowe widmo związku jest zatem widmem zmierzonym danego związku, ale pomniejszonym o widmo odnośnika. Jeżeli roztwór (woda, bufor) będący odnośnikiem nie zawiera badanej substancji w żadnej z możliwych form, wówczas uzyskujemy widmo absolutne. Widmo różnicowe uzyskujemy, gdy roztwór odnośnika zawiera badaną substancję w takim samym stężeniu jak roztwór badany. Przeprowadza się wówczas reakcję w kuwecie z badaną substancją, w wyniku której stężenie jej zmienia się, natomiast w kuwecie

z odnośnikiem nie zachodzi żadna reakcja, a zatem stężenie badanej substancji nie zmienia się. W tego rodzaju badaniach widmo przedstawia zmiany absorbancji (ΔA) w próbce badanej w porównaniu do odnośnika. Oba sposoby pomiaru absorbancji są wykorzystywane w laboratoriach do wyznaczania stężeń czy też kinetyki reakcji chemicznych.

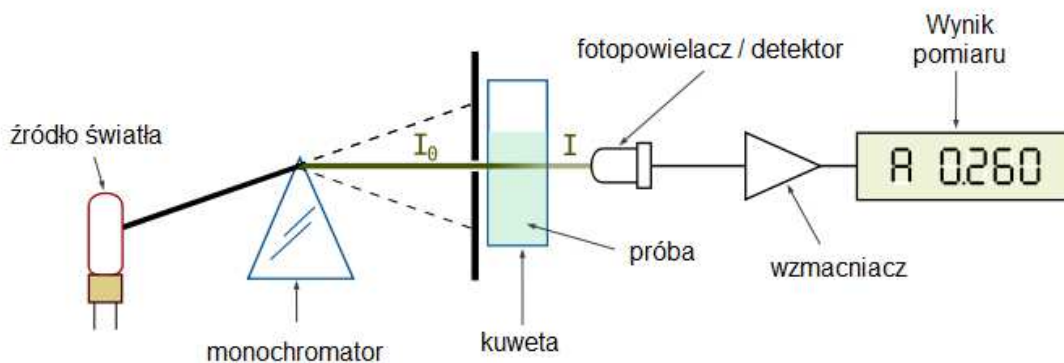
Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, iż na uzyskany wynik absorbancji wpływ ma również materiał, z którego wykonana jest kuweta pomiarowa. Przyczyną tego jest fakt, sama kuweta również może absorbować światło. Jeżeli wiązkę światła przepuścimy przez pustą kuwetę, to po dotarciu do detektora będzie ona miała mniejsze natężenie niż wiązka światła padającego. W związku z tym w zależności od zakresu długości fali, przy jakiej jest wykonywany pomiar należy stosować różnego rodzaju kuwety pomiarowe. Poniżej podano przepuszczalność światła dla materiałów, z których wykonuje się kuwety:

- Polistyren: 340 – 800 nm
- Szkło: 334 – 2500 nm
- Kwarc: 170 – 2600 nm
- Polimetakrylan: 280 – 800 nm

W wielu oznaczeniach, gdzie długość fali stosowanej w pomiarze jest większa od 340 nm stosuje się zwykle plastikowe kuwety, które są tańsze i mniej ulegają kontaminacji przy zastosowaniu takich odczynników jak np.: *coomasie blue*. Jednak do pomiarów absorbancji roztworów białek przy 280 nm, czy też DNA przy 260 nm stosuje się kuwety kwarcowe.

Należy pamiętać, iż przepuszczalność światła przez dwie kuwety (wykonane z tego samego materiału) może nawet znacznie się różnić. Dlatego należy dobierać kuwety o zbliżonej przepuszczalności światła lub dokonywać pomiaru absorbancji próbki i odnośnika w tej samej kuvecie. Tego typu problemy mogą również wystąpić przy stosowaniu kuwet do małych objętości (<1 ml) i może to być związane z tym, iż wiązka światła nie trafia precyzyjnie w środek przedniej ściany kuwety. W tym wypadku występujące zakłócenia można zniwelować poprzez zastosowanie kuwet, które są całe czarne poza szczeliną, którą dociera do próbki wiązka światła. Widzimy, zatem że kuweta pomiarowa ma ogromny wpływ na dokładność wykonywanych pomiarów. Ścianek kuwety, przez które przechodzi wiązka światła nie należy dotykać palcami, a w przypadku zabrudzenia należy je przemyć wodą i delikatnie wytrzeć miękką chusteczką. Przed dłuższym przechowywaniem kuwetę należy opłukać wodą dejonizowaną i etanolem, aby nie pozostały na niej zacieki.

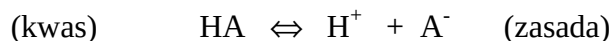
Do pomiarów absorpcji wykorzystuje się spektrofotometrię, którego schemat budowy przedstawiono na ryc. 7. Źródło światła wysyła promieniowanie, z którego za pomocą monochromatora możemy wyodrębnić monochromatyczną wiązkę promieniowania (o ściśle określonej długości). Promieniowanie to przechodzi przez szczelinę i pada na kuwetę z próbą. Część promieniowania jest absorbowana przez próbę, a pozostała część przechodzi i jest rejestrowana przez detektor (urządzenie zamieniające padające na nie promieniowanie na prąd elektryczny). W układzie detektora, następuje pomiar natężenia wiązki, która przeszła przez kuwetę (I) jak i padającej na kuwetę (I_0), a uzyskany wynik pomiaru prezentowany jest na wyświetlaczu spektrofotometru.



Ryc. 7. Schemat działania spektrofotometru [na podstawie ryc.: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometria>]

Wpływ pH na widmo absorpcyjne w zakresie światła widzialnego

Widmo formy niezjonizowanej związku o właściwościach zasadowych lub kwasowych różni się zasadniczo od widma formy zjonizowanej. Stąd powszechne jest zastosowanie spektrofotometrii do badania równowag kwasowo-zasadowych:



Reakcję tą opisuje stałą równowagi:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}, \quad \text{z czego wynika: } -\log K_a = pK_a = pH + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (4)$$

Aby wyznaczyć charakterystyczną wartość pK_a danego związku, oznacza się spektrofotometrycznie stosunek stężenia formy niezdysonizowanej do zdysocjowanej przy odpowiedniej wartości pH. Stosując jednakowe stężenia roztworów w kolejnych pomiarach, wzory na pK_a można wyrazić jako:

$$\text{dla kwasu: } pK_a = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_M} \quad (5) \quad \text{dla zasady: } pK_a = pH + \log \frac{A - A_M}{A_I - A} \quad (6)$$

gdzie (dla wybranej analitycznej długości fali):

A_I = absorbancja formy całkowicie zjonizowanej

A_M = absorbancja formy niezjonizowanej

A = absorbancja mieszaniny obu form przy danym pH

Celem precyzyjnego określenia pK_a wykonuje się kilka pomiarów przy różnych wartościach pH i oblicza się wartość średnią.

Krzywa absorpcji formy zjonizowanej przecina się z krzywą absorpcji niezjonizowanej w tzw. **punkcie izobestycznym**. W punkcie tym przecinają się wszystkie krzywe badanego układu bez względu na wartość stosunku $[\text{HA}]/[\text{A}^-]$, ponieważ suma $[\text{HA}] + [\text{A}^-]$ pozostaje stała.

Z równowagą kwasowo-zasadową związane są zmiany zabarwienia wskaźników pH, które różnią się budową w środowisku kwaśnym i zasadowym. Przykładowo fenoloftaleina w środowisku zasadowym tworzy anion, który charakteryzuje się silną absorpcją w zakresie światła widzialnego.

Część eksperymentalna:

Celem ćwiczenia jest określenie wartości molowego współczynnika absorpcji dla *p*-nitrofenolu, oraz określenie zmian w widmie absorpcyjnym tego związku w zależności od pH. Określany zostanie również wpływ alkoholu na pH i stopień dysocjacji *p*-nitrofenolu.

1. Wyznaczanie widma absorpcji

Widmo *p*-nitrofenolu, jak przedstawiono na ryc. 2a wykazuje absorpcję zarówno w zakresie światła widzialnego, jak i ultrafioletu. Ponieważ spektrofotometry znajdujące się na sali ćwiczeń nie są wyposażone w źródło światła emitujące promieniowanie z zakresu UV, pomiary widma absorpcji zostaną przeprowadzone dla fluoresceiny, związku który absorbuje w zakresie VIS.

Do kuwety wprowadzić roztwór fluoresceiny (0,5 mg/ml) i dokonać pomiaru absorpcji w zakresie 390–540 nm, co 10 nm. Odnośnikiem w pomiarach jest woda. Należy przestrzegać zasady, że do kuwety wprowadzamy taką ilość płynu aby stanowiła ona ok. $\frac{3}{4}$ objętości kuwety. Po każdej zmianie długości fali świetlnej spektrofotometr powinien być wyzerowany (kuweta z wodą; zgodnie z instrukcją danego aparatu, klawisze: „zero”; „blank”; „R”), a następnie po wstawieniu kuwety z fluoresceiną należy odczytać wynik absorpcji. Narysować na papierze milimetrycznym zależność absorpcji (A) od długości fali (λ) przy której dokonano pomiaru (widmo absorpcji) przy której prowadzono pomiar. Na podstawie wykresu określić analityczną długość fali dla fluoresceiny, przy której zarejestrowano najwyższą wartość absorpcji.

2. Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji (ϵ) dla *p*-nitrofenolu w środowisku zasadowym.

Przygotować 3 roztwory *p*-nitrofenolu (o stężeniach: 10, 20 i 40 μM) poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego *p*-nitrofenolu (0,1 mM = 100 μM) buforem fosforanowym o pH=10. Do wykonania pomiarów należy przygotować przynajmniej 3 ml każdego z roztworów (podpowiedź: skorzystać z zależności: $C_1V_1=C_2V_2$).

Mierzmy absorpcję dla każdego ze stężeń przy $\lambda = 415 \text{ nm}$ i obliczamy ϵ korzystając ze wzoru na prawo Lamberta – Beera. Jako odnośnik stosujemy wodę. W przypadku uzyskania wartości skrajnej (odstającej) pomiar dla danego stężenia należy powtórzyć, lub odrzucić (skonsultować z prowadzącym ćwiczenia). Obliczyć wartość średnią z uzyskanych wyników (wyliczonego ϵ) oraz odchylenie standardowe tej wartości (jako błąd pomiaru). Porównać otrzymaną wartość z wartością podaną w tabeli na stronie 4. Z czego mogą wynikać ewentualne różnice w zmierzonej wartości? Zwrócić uwagę na długość fali, przy której dokonano odczytu.

3. Wpływ alkoholu na pK_a *p*-nitrofenolu

W kolejnym etapie ćwiczenia pomiary spektroskopowe zostaną wykorzystane do wyznaczenia stałej dysocjacji *p*-nitrofenolu przy różnych wartościach pH. Dodatkowo należy określić jak alkohol wpływa na wartość pK_a *p*-nitrofenolu.

W czterech probówkach sporządzamy próby składające się z:

- a) 1 ml roztworu *p*-nitrofenolu (0,1 mM) + 3 ml wody destylowanej.
- b) 1 ml roztworu *p*-nitrofenolu (0,1 mM) + 3 ml buforu fosforanowego o pH=8;
- c) 1 ml roztworu *p*-nitrofenolu (0,1 mM) + 3 ml buforu fosforanowego o pH=8, zawierającego 10 % (v/v) alkohol (etanol lub izopropanol) (należy wcześniej przygotować roztwór – np.: 0,3 ml alkoholu + 2,7 buforu o pH=8)
- d) 1 ml roztworu *p*-nitrofenolu (0,1 mM) + 3 ml buforu fosforanowego o pH= 10

Roztwory w poszczególnych probówkach wymieszać, po czym zmierzyć absorbancję każdego z nich przy długości fali 415 nm. Zapisać wynik absorbancji dla każdego z roztworów. (UWAGA: najwyższa wartość absorpcji powinna być rejestrowana w próbce d, a najniższa w próbce a).

Należy zwracać uwagę, aby użyte kuwety były wykonane z tego samego materiału (różne tworzywa mogą wykazywać inną absorpcję światła o danej długości), to znaczy aby absorbancja kuwet nie zawierających żadnego roztworu była do siebie jak najbardziej zbliżona.

Na podstawie uzyskanych pomiarów wyliczamy pK_a *p*-nitrofenolu, przy pH=8 w roztworze bez alkoholu oraz w roztworze zawierającym alkohol. Wyciągnąć wnioski o wpływie alkoholu na pK_a i absorpcję światła przez *p*-nitrofenol.

Obliczenia pK_a :

- dla roztworu bez alkoholu:
$$pK_a = pH + \log \frac{A_{(d)} - A_{(b)}}{A_{(b)} - A_{(a)}}$$

- dla roztworu zawierającego alkohol:
$$pK_a = pH + \log \frac{A_{(d)} - A_{(c)}}{A_{(c)} - A_{(a)}}$$

gdzie: $A_{(d)}$ – absorbancja roztworu przygotowanego wg. punktu **d**

$A_{(a)}$ – absorbancja roztworu **a**,

$A_{(b)}$ – absorbancja roztworu **b**, $A_{(c)}$ – absorbancja roztworu **c**,

Jak stopień dysocjacji *p*-nitrofenolu wpływa na jego barwę (absorpcję światła)? Czy zwiększenie udziału formy zdysocjowanej przyczynia się do zmniejszenia czy do zwiększania intensywności barwy? Proszę sformułować odpowiednie wnioski.