



KAPITAŁ LUDZKI
CZŁOWIEK – NAJLEPSZA INWESTYCJA!



Inno-AgroChemOś



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

Laboratorium Chemii Fizycznej

skrypt dla studentów Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

pod redakcją
Karola J. Krzymińskiego



Projekt

„Kształcenie kadr dla innowacyjnej gospodarki opartej na wiedzy w zakresie agrochemii, chemii i ochrony środowiska (Inno-AgroChemOś)”

Przygotowanie materiału współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Gdańsk 2014

Zespół autorski:

Lidia Chomicz (ćw. 6, 15, 16)

Karol Krzymiński (ćw. 1, 2, 4, 6, 7, 9, 17, rozdział III)

Artur Sikorski (ćw. 3, 10, rozdział II)

Piotr Storoniak (ćw. 8)

Beata Zadykowicz (ćw. 13, 14, 18)

Agnieszka Żylicz-Stachula (ćw. 11, 12)

Projekt okładki, rysunki i fotografie: Piotr Storoniak

Rysunki: Damian Trzybiński

Spis treści

Słowo wstępne	5
Uwagi o wykonywaniu ćwiczeń	7
I. Opisy ćwiczeń	8
Właściwości cząsteczek	
Ćwiczenie 1. Pomiar momentu dipolowego substancji polarnej metodą optyczną.	8
Ćwiczenie 2. Wyznaczanie refrakcji molowej związku na podstawie pomiaru współczynnika załamania światła.	16
Termochemia	
Ćwiczenie 3. Pomiar ciepła spalania substancji organicznej.	25
Ćwiczenie 4. Pomiar ciepła rozcieńczania i zubożniania.	34
Kinetyka chemiczna	
Ćwiczenie 5. Wyznaczanie energii aktywacji reakcji zmydlania estru.	43
Ćwiczenie 6. Badanie wpływu kwasu na kinetykę inwersji sacharozy.	53
Ćwiczenie 7. Badanie szybkości hydrolizy bezwodnika octowego metodą pomiaru przewodnictwa elektrycznego roztworu.	61
Równowagi fazowe	
Ćwiczenie 8. Równowaga między fazą ciekłą i gazową w układach jedno- i dwuskładnikowych.	67
Ćwiczenie 9. Wyznaczanie masy molowej makromolekuł metodą osmometryczną.	78
Zjawiska powierzchniowe i koloidy	
Ćwiczenie 10. Wyznaczanie izotermy adsorpcji BET.	86
Ćwiczenie 11. Wykorzystanie przewodnictwa elektrycznego do rozdziału makromolekuł.	98
Elektrochemia	
Ćwiczenie 12. Część I: Badanie procesów elektrodowych: wyznaczenie charakterystyk elektrod: szklanej, antymonowej i chinhydronowej.	107
Ćwiczenie 12. Część II: Kalibracja pH-metru i pomiar pH roztworów. Wysalanie białek. Punkt izoelektryczny białka.	115
Ćwiczenie 13. Wyznaczanie średniego jonowego współczynnika aktywności elektrolitu drogą pomiaru siły elektromotorycznej ogniwa.	121

Ćwiczenie 14. Wyznaczanie liczb przenoszenia jonów metodą Hittorfa.	128
Ćwiczenie 15. Konduktometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji.	135
Spektrochemia	
Ćwiczenie 16. Spektrofotometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego.	142
Ćwiczenie 17. Spektrofotometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji <i>para</i> -nitrofenolu.	149
Ćwiczenie 18. Fluorymetryczne oznaczanie zawartości tryptofanu w białkach.	157
II. Rachunek błędów i elementy statystyki w opracowaniu danych	165
III. Bezpieczeństwo pracy w laboratorium fizykochemicznym	174
IV. Wykaz zalecanej literatury	181

Słowo wstępne

W niniejszym skrypcie opisano ćwiczenia do samodzielnego wykonania w ramach pracowni chemii fizycznej. Został on przygotowany z myślą o studentach wszystkich kierunków i specjalności Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, którzy z chemią fizyczną stykają się już na drugim roku studiów licencjackich, by w kolejnych latach zgłębiać problemy fizykochemiczne zarówno w obrębie kursów podstawowych, jak i bardziej zaawansowanych. Prezentowany materiał częściowo opracowano na podstawie wydawnictwa „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii fizycznej i fizyki chemicznej” pod redakcją Wandy Moski, który przez wiele lat służył jako podstawa ćwiczeń laboratoryjnych z chemii fizycznej w UG.

Celem niniejszego wydawnictwa jest – z jednej strony – pomoc w opanowaniu podstaw warsztatu pracy fizykochemika, które umożliwią podjęcie dalszych studiów wybranych przez Was specjalności, z drugiej zaś – zapoznanie z elementami wiedzy z zakresu chemii fizycznej w takim stopniu, na jaki pozwalają na to nabyte przez Was wcześniej wiadomości z chemii, fizyki i matematyki.

Chemia fizyczna uważana jest – niesłusznie – za przedmiot trudny. Spróbujemy razem przełamać tę barierę. Eksperymenty wykonywane samodzielnie posiadają bowiem walor angażowania uwagi i wzbudzania naturalnej ciekawości związanej z obcowaniem z prawami przyrody i odkrywaniem świata, co znacznie ułatwia zrozumienie studiowanych zagadnień. Badania fizykochemiczne stwarzają szansę na zrozumienie takich fundamentalnych zagadnień jak przyczyny, kierunek czy szybkość zachodzenia procesów chemicznych; pozwalają też wnikać w strukturę molekularną substancji chemicznych. Wszystkim przemianom, które zachodzą wokół nas, towarzyszą zmiany energetyczne, charakteryzujące się pewnym prawdopodobieństwem wystąpienia. Problemy te rozważa się na gruncie termodynamiki, stanowiącej fundament nie tylko chemii fizycznej, ale i wszystkich nauk przyrodniczych, umożliwiającej zrozumienie istoty i przyczyn procesów naturalnych zachodzących w otaczającym nas świecie.

Trudno jest dziś przecenić znaczenie pomiarów fizykochemicznych, które zwykle wymagają jedynie minimalnej ilości materiału badawczego i nie degradują go, dając jednocześnie godne zaufania rezultaty. Nowoczesne metody analizy – spektroskopowe, instrumentalne, elektrochemiczne, chromatograficzne i inne – szeroko wykorzystują procesy fizykochemiczne zachodzące na poziomie molekularnym, takie jak absorpcja czy emisja promieniowania elektromagnetycznego, przemiany związane z przepływem prądu elektrycznego, efekty cieplne przemian chemicznych czy zjawiska podziałowe.

Na koniec pozostaje mi miły obowiązek złożenia podziękowań Szanownym Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej – Współautorom oraz Współtwórcom tego przedsięwzięcia – za efektywną współpracę, inspirację, cenne uwagi i sugestie pomocne w jaśniejszym przedstawieniu wielu problemów. Kompetencje i doświadczenie grupy Autorów, którzy wielokrotnie proponowali oryginalne rozwiązania i potrafili je wdrożyć do praktyki laboratoryjnej, okazały się kluczowe w realizacji niniejszego projektu. Specjalne podziękowania pragnę też przekazać serdecznym Kolegom – dr hab. Piotrowi Storoniakowi, który wykonał zdjęcia i zaprojektował szatę graficzną niniejszego wydawnictwa oraz dr Damianowi Trzybińskiemu, który wykonał rysunki.

Żywię nadzieję, że nowy skrypt będzie dobrze służył pomocą w zgłębianiu tajników chemii fizycznej kolejnym rocznikom studentów Chemii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego.

Karol Krzymiński
Gdynia, kwiecień 2014

Uwagi o wykonywaniu ćwiczeń

Praca w nowoczesnym laboratorium – zarówno studenckim, jak i w przemysłowym, farmaceutycznym, biochemicznym czy technologicznym – gdzie powszechnie wykorzystuje się fizykochemiczne metody analizy – to przede wszystkim precyzja, czystość i przemyślane czynności pomagające wyeliminować pomyłki. Praca taka, jeśli ma prowadzić do rzetelnych rezultatów, oprócz odpowiedniego przygotowania merytorycznego wymaga także spokoju i skupienia – chemik eksperymentator musi być zorganizowany. Zaplanowane czynności należy wykonywać więc rozważnie, zwracając uwagę na jakość wykonywanej pracy, dostępny sprzęt i odczynniki, jak również zachowanie porządku i czystości.

Przygotowanie merytoryczne do ćwiczeń wymaga nie tylko przestudiowania materiału teoretycznego związanego z tematem ćwiczenia, ale również opanowania metodyki pomiarów, zasad działania przyrządów pomiarowych, poznania relacji ilościowych pomiędzy wielkościami mierzonymi, a także zorientowania się, jakiego typu obliczeń i wsparcia komputerowego będzie wymagało opracowanie wyników pomiarów. Podstawą do przygotowania teoretycznego są prezentowane tu instrukcje, z których każda posiada wstęp literaturowy zawierający podstawowe informacje z danego działu. Różne ćwiczenia z zakresu danej tematyki prezentują nieco odmienne spojrzenia na określone problemy fizykochemiczne, dlatego dla uzyskania szerszego obrazu warto zapoznać się również z zagadnieniami teoretycznymi dotyczącymi pokrewnych ćwiczeń. Należy też podkreślić konieczność posługiwania się literaturą uzupełniającą. Na końcu skryptu przygotowaliśmy spis zalecanej literatury, choć do nauki chemii fizycznej może posłużyć praktycznie każdy poważny podręcznik z tego obszaru wiedzy. Dostępnych jest także wiele publikacji poświęconych wybranym działom chemii fizycznej w Internecie; niektóre ważniejsze odniesienia również zostały tu przywołane. Aby ułatwić Wam poruszanie się wśród nowych terminów i wyłowić sprawy najważniejsze, pod każdym opisem przygotowaliśmy słowniczek, w którym zgromadziliśmy podstawowe pojęcia dotyczące danego tematu ćwiczeń.

Zespół Autorów

I. Opisy ćwiczeń

WŁAŚCIWOŚCI CZĄSTECZEK

Ćwiczenie 1

Pomiar momentu dipolowego substancji polarnej metodą optyczną

Trwały elektryczny moment dipolowy w cząsteczce jest wynikiem braku pokrywania się środków ciężkości ładunków dodatnich i ujemnych w molekułę, na którą nie działa zewnętrzne pole elektryczne. Można go traktować jako miarę asymetrii rozkładu ładunku elektrycznego w układzie molekularnym, będącej wynikiem nierównego rozdziału elektronów wiążących. Wynika to z różnej elektroujemności atomów wchodzących w ich skład – określającej zdolność przyciągania przez dany atom elektronów od innych atomów sąsiadujących. W rezultacie następuje przemieszczenie środka ciężkości ujemnego ładunku w pobliże atomów bardziej elektroujemnych. Trwałe momenty dipolowe przykładowych substancji polarnych przedstawiono w poniżej (Tab. 1).

Związek	Moment dipolowy (D)
Woda	1,84
Chlorowodór	1,03
Alkohole alifatyczne	1,70
Acetonitryl	3,44
Chlorobenzen	1,73
Bromobenzen	1,71
Anilina	1,56
Nitrobenzen	4,23

Tabela 1. Trwałe momenty dipolowe niektórych substancji polarnych.

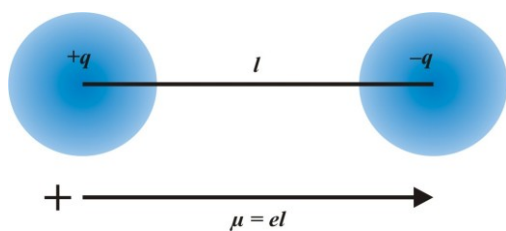
Oprócz trwałego momentu dipolowego, pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego, w obrębie każdej cząsteczki powstaje **indukowany moment dipolowy**. Zatem cząsteczka, znajdująca się pod działaniem zewnętrznego pola, posiada całkowity moment dipolowy (μ'), równy sumie momentów: trwałego (μ) oraz indukowanego ($\mu_E + \mu_A$):

$$\mu' = \mu + \mu_E + \mu_A = \mu + E \times (\alpha_A + \alpha_E) \quad (1)$$

gdzie: α_A – oznacza polaryzowalność atomową α_E – polaryzowalność elektronową; E – natężenie pola elektrycznego.

Polaryzowalność (elektronowa, atomowa) oznacza podatność chmur elektronowych (α_E) lub poszczególnych atomów (α_A) w cząsteczkach na odkształcenie w wyniku oddziaływania z drgającym zewnętrznym polem elektromagnetycznym.

Moment dipolowy przedstawia się za pomocą wektora o określonej długości, skierowanego od ładunku dodatniego do ujemnego – wzdłuż linii łączącej środki ciężkości tych ładunków (Rys. 1):



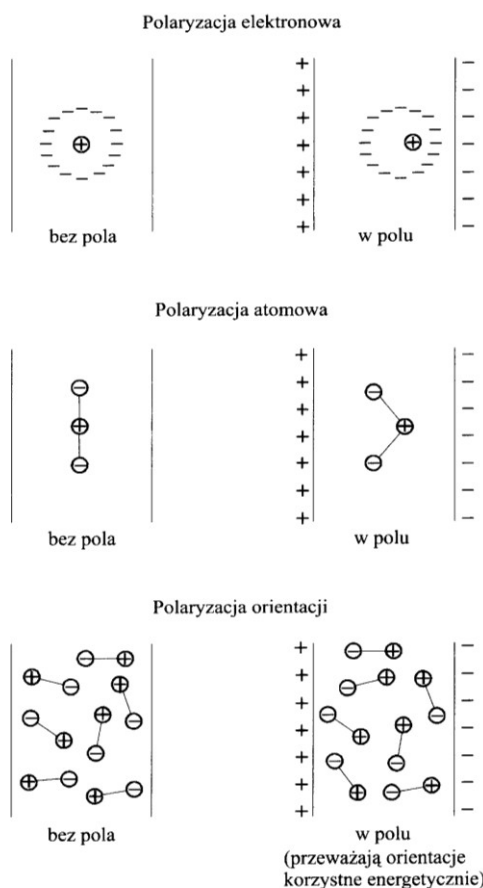
Rysunek 1. Graficzna reprezentacja pojęcia momentu dipolowego.

Wielkość momentu dipolowego jest równa iloczynowi ładunku q jednego z biegunów dipola oraz odległości l między rozsuniętymi środkami ciężkości ładunków. Ponieważ wielkość jest rzędu ładunku elementarnego ($e = 1,602 \times 10^{-19}$ C), a odległość l jest rzędu 10^{-10} m, więc wartość momentu dipolowego jest zwykle rzędu 10^{-29} C m. Dla 1 elektronu oddalonego od ładunku dodatniego o $1 \text{ \AA}$ (10^{-10} m) moment dipolowy wyniesie $\mu = 16,02 \times 10^{-30}$ C m, co w dawniej stosowanych jednostkach dla określenia tej wielkości oznacza wartość około 4,8 D (debaja; $1 \text{ D} = 3,338 \times 10^{-30}$ C m). Momentowi dipolowemu przypisuje się umownie znak wskazujący kierunek jego działania. Na przykład grupie nitrowej ($-\text{NO}_2$), naładowanej ujemnie w stosunku do pierścienia benzenowego, przypisuje się znak ujemny i przedstawia jako wektor skierowany od środka pierścienia do środka ciężkości ładunku ujemnego skupionego w centrum tego podstawnika.

Działanie pojedynczych dipoli w substancji sumuje się, w wyniku czego substancja wykazuje tak zwaną **polaryzację**, której miarą jest sumaryczny moment dipolowy. Całkowita polaryzacja właściwa substancji polarnej jest sumą polaryzacji elektronowej (p_E), atomowej (p_A) i orientacyjnej (p_{OR}):

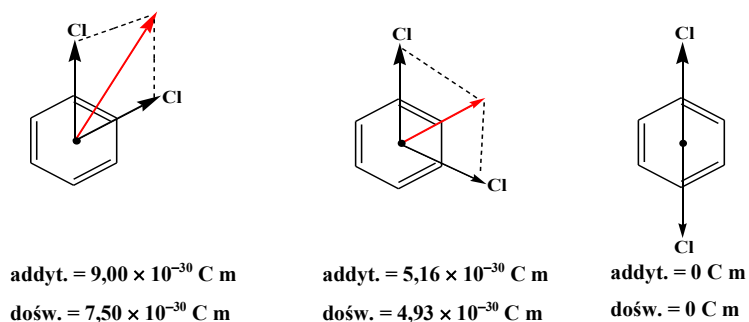
$$p = p_E + p_A + p_{OR} \quad (2)$$

Jedną z cech momentów dipolowych cząsteczek jest ich addytywność. Ponieważ moment dipolowy jest wielkością wektorową, oznacza to, że wektory momentów dipolowych poszczególnych wiązań sumują się, dając dla całej cząsteczki wektor wypadkowy. Przykładowo, dodanie czterech wektorów w wiązaniach C–H w tetraedrycznej molekułe metanu CH_4 daje wypadkowy $\mu = 0$. Jeżeli natomiast w miejsce atomu wodoru przyłączymy podstawnik bardziej elektroujemny, to w układzie molekularnym pojawi się nieskompensowany (niezerowy) moment dipolowy. Na przykład, niepodstawiony benzen wykazuje $\mu = 0$ C m, zaś chlorobenzen – $\mu = 5,16 \times 10^{-30}$ C m.



Rysunek 2. Porównanie zachowania molekuł bez pola elektrycznego i w obecności zewnętrznego pola elektrycznego.

W dichlorobenzenie momenty dipolowe wiązań C–Cl dodają się wektorowo, co zilustrowano na Rys. 3:



Rysunek 3. Powstawanie momentu dipolowego w cząsteczkach dichlorobenzenu i porównanie sposobów jego wyznaczania.

Addytywność jest w przybliżeniu spełniona, przy czym w *orto*-dichlorobenzenie pojawia się rozbieżność między wartością otrzymaną z sumowania udziałów i doświadczalną – oddziaływające ze sobą atomy chloru zniekształcają bowiem chmurę elektronową w cząsteczce.

Metoda optyczna wyznaczania momentu dipolowego

Wartość liczbowa całkowitej polaryzacji właściwej można wyznaczyć na podstawie znajomości przenikalności elektrycznej i gęstości substancji:

$$p = \frac{\varepsilon^* - 1}{\varepsilon^* + 2} \times \frac{1}{d_x} \quad (3)$$

gdzie: ε – względna przenikalność dielektryczna, d_x – gęstość roztworu [kg m^{-3}].

W tym punkcie wprowadzimy do rozważań wielkość zwaną **refrakcją molową**. Ogólnie, refrakcja charakteryzuje podatność na odkształcenie powłok elektronowych cząsteczek w wyniku oddziaływania z drgającym zewnętrznym polem elektromagnetycznym i jest określona równaniem:

$$R_D = \frac{n^2 - 2}{n^2 + 2} \times \frac{M}{d} \quad (4)$$

gdzie: n – współczynnik załamania światła.

Jak wynika z zależności (4), dla danej substancji wartość R_D zależy jedynie od długości fali świetlnej (dlatego umieszcza się symbol D , oznaczający długość fali światła, które zostało użyte do badania współczynnika załamania światła – żółta linia sodu D).

Z pewnym przybliżeniem można napisać:

$$R_D = M \times (p_E + p_A) \quad (5)$$

gdzie: R_D – refrakcja molowa [$\text{m}^3 \text{kmol}^{-1}$], M – masa molowa substancji [kg kmol^{-1}].

Ponieważ zgodnie z teorią Debye'a zachodzą następujące zależności:

$$p_{OR} \times M = P_{OR} = \frac{N_A \times \mu^2}{9\varepsilon_0 \times k \times T} \quad (6)$$

stąd:

$$p \times M = P = R_D + \frac{N_A \times \mu^2}{9\varepsilon_0 \times k \times T} \quad (7)$$

gdzie: μ – moment dipolowy [C m]; N_A – stała Avogadro [$N_A \approx 6,023 \times 10^{26} \text{ kmol}^{-1}$]; k – stała Boltzmanna [$k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J deg}^{-1}$]; T – temperatura pomiaru [K]; P – całkowita polaryzacja molowa [$\text{m}^3 \text{kmol}^{-1}$]; ε_0 – bezwzględna przenikalność elektryczna [$\varepsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$].

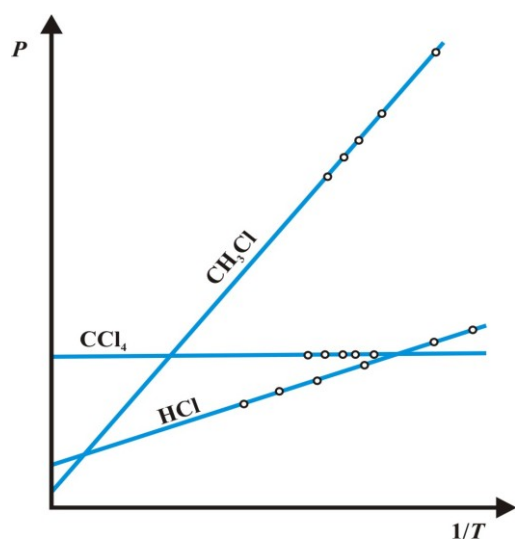
Ostatnie równanie oznacza, że polaryzacja molowa (P) jest równa refrakcji molowej (R_D), powiększonej o czynnik związany z występowaniem trwałego momentu dipolowego. Z tego po przekształceniach wynika ostateczne równanie (8):

$$\mu = \sqrt{\frac{9\varepsilon_0 \times k}{N_A}} \times \sqrt{T(P - R_D)} \approx 1,351 \times 10^{-30} \sqrt{T(P - R_D)} \quad [\text{C m}] \quad (8)$$

Zatem, wyznaczając doświadczalnie wartości P i R_D w określonej temperaturze T , możemy obliczyć wartość trwałego momentu dipolowego substancji. Jest to metoda pomiaru zwana "optyczną".

Metoda temperaturowa wyznaczania momentu dipolowego

Spośród składowych całkowitej polaryzacji molowej tylko polaryzacja orientacji (P_{OR}) zależy od temperatury (równanie (6)). Wynika stąd druga metoda doświadczalnego wyznaczania wartości momentu dipolowego, zwana **temperaturową** – oparta na pomiarach zależności całkowitej polaryzacji molowej od temperatury. Z równań (6) i (7) wynika, że zależność $P = f(T^{-1})$ powinna być liniowa, co zobrazowano na Rys. 4:



$$P = R_D + \frac{N \times \mu^2}{9\epsilon_0 \times k} \times \frac{1}{T}$$

$$Y = b + a \times X$$

Rysunek 4. Zależność całkowitej polaryzacji molowej od temperatury bezwzględnej dla różnych substancji.

Zatem, określając wartości P dla różnych temperatur (np. 293, 303 i 313 K) i wykreślając zależność $P = f(T^{-1})$, można wyznaczyć współczynnik kierunkowy (a) prostej i na tej podstawie oszacować wartość momentu dipolowego μ badanej substancji. Dodatkowo, z równania (7) wynika, że przecięcie wspomnianej prostej z osią rzędnych dla $T^{-1} = 0$ daje wartość refrakcji molowej dla danego związku.

Równanie Debye'a (6) i wynikające z niego zależności wyprowadzono przy założeniu braku wzajemnych oddziaływań między dipolami. Ponieważ cząsteczki polarne w czystych fazach skondensowanych silnie na siebie nawzajem oddziałują, można wyżej wymienione zależności stosować tylko do rozcieńczonych roztworów substancji polarnych w niepolarnych rozpuszczalnikach – gdyż tylko w takich układach założenie niezależnego zachowania się dipoli jest spełniane z wystarczającą dokładnością.

Metody pomiaru momentów dipolowych mają m.in. zastosowanie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych, prowadzących do powstawania w roztworach kompleksów molekularnych, zwanych kompleksami elektrono-donorowo-akceptorowymi

(EDA). Kompleksy EDA mają z reguły większe momenty dipolowe niż cząsteczki czystych składników; ponadto stwierdza się nieraz dość znaczne wartości momentów dipolowych kompleksów EDA, powstałych ze składników niepolarnych (np. kompleks jodu z benzenem). Tak więc doświadczalne stwierdzenie, że $\mu \neq 0$ w roztworze dwóch substancji niepolarnych stanowi przesłankę, że w roztworze zachodzą oddziaływania EDA, zaś liczbowa wartość momentu dipolowego może stanowić miarę tych oddziaływań. Z drugiej strony, niewłaściwy dobór niepolarnego rozpuszczalnika może w znacznym stopniu zafałszować wyniki pomiarów momentu dipolowego polarnej, jeżeli między substancją a rozpuszczalnikiem zachodzą oddziaływania typu EDA.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie momentu dipolowego jednej z substancji polarnych wskazanych przez prowadzącego (nitrobenzen, chlorobenzen, bromobenzen, chloroform, acetonitryl, kwas adypinowy i inne) metodą optyczną z wykorzystaniem kondensatora cieczowego zwanego dielektrometrem. W tego typu podejściu wyznacza się przenikalność elektryczną roztworów substancji polarnej w niepolarnej cieczy wzorcowej. Pomiar przenikalności elektrycznej (ϵ^*) polega na wyznaczeniu zmiany pojemności elektrycznej kondensatora powietrznego, wywołanej zamianą powietrza (stanowiącego dielektryk) na badaną cieć dielektryczną.

Kondensator, poza pojemnością czynną (C_c), posiada również niezdefiniowaną precyzyjnie pojemność własną (bierną, C_b), natomiast przyrząd mierzy sumę obu – tzw. pojemność całkowitą (C). Wielkości C_c i C_b , stałe dla danego kondensatora, wyznacza się przy zastosowaniu cieczy wzorcowych o znanych wartościach. Szczegółowy sposób wykonania pomiarów przy użyciu dielektrometru uniwersalnego znajduje się w instrukcji do przyrządu.

1. Zmierzyć pojemność pustego kondensatora cieczowego (C).
2. Zmierzyć pojemność elektryczną kondensatora napełnionego cieczą wzorcową (C') – obojętnym rozpuszczalnikiem o znanej względnej przenikalności elektrycznej.
3. Wyznaczyć wielkości stałe, charakterystyczne dla danego kondensatora: pojemność czynną (C_c) i pojemność bierną (C_b), według poniższych zależności (9), (10):

Pojemność czynna:

$$C_c = \frac{C' - C}{\epsilon^* - 1} \quad (9)$$

gdzie: ϵ^* – tablicowa przenikalność elektryczna cieczy wzorcowej (cykloheksan, $\epsilon^* = 2,020$).

Pojemność bierna:

$$C_b = C - C_c \quad (10)$$

4. Sporządzić metodą wagową 10–12 roztworów substancji polarnej w w/w rozpuszczalniku wzorcowym o ułamkach molowych w zakresie od 0,005–0,050 (nazwę substancji i szczegółowy zakres stężeń podać prowadzący ćwiczenia).
5. Po napełnieniu kondensatora cieczowego badanym roztworem zmierzyć pojemność elektryczną poszczególnych roztworów (C_x).
6. Zmierzyć współczynnik załamania światła badanej substancji polarnej, stosując refraktometr Abbego.

Wykonanie sprawozdania

1. Obliczyć dla wszystkich roztworów ich względną przenikalność elektryczną z równania:

$$\varepsilon_r^* = \frac{C_x - C_c}{C_c} + 1 \quad (11)$$

2. Obliczyć, stosując zasadę addytywności, gęstość poszczególnych roztworów po odczytaniu gęstości czystych składników z tablic fizykochemicznych ($d_r = d_1 \times X_1 + d_2 \times X_2$, gdzie d_r oznacza gęstość cieczy, zaś X_n – ułamki molowe związku polarnego i rozpuszczalnika, d_n – gęstość substancji czystych).
3. Obliczyć dla poszczególnych roztworów wartości polaryzacji właściwej, korzystając z zależności (3). Wyniki obliczeń przedstawić w postaci wykresu zależności: $p_r = f(X)$, gdzie X – ułamek molowy substancji polarnej w niepolarnym rozpuszczalniku. Posługując się metodą najmniejszych kwadratów znaleźć polaryzację właściwą badanej substancji na zasadzie ekstrapolacji zależności: $p_r = f(X)$ do wartości $X = 1$. Następnie obliczyć wartość całkowitej polaryzacji molowej ($P = p \times M$) badanego związku polarnego.
4. Obliczyć wartość refrakcji molowej związku polarnego, korzystając z zależności (4). Gęstość czystego związku polarnego (d) wyszukać w tablicach.
5. Znając wartości P i R_D , obliczyć na podstawie równania Debye'a (8) moment dipolowy substancji polarnej. Ostateczny wynik należy podać też w debajach (D).
6. Obliczoną wartość porównać z wartością tablicową i przedyskutować wyniki w kontekście budowy substancji.
7. Wyniki pomiarów zestawić w tabeli pomiarów (Tab. 1), przedstawiając też przykładowe obliczenia i sprawdzenie jednostek (SI).

Tabela 1. Wyniki pomiarów dielektrometrycznych.

Nr roztw.	Ilość zw. polarnego		Ilość rozpuszczalnika		Ułamek molowy zw. pol.	C_x (pF)	d_r (kg m ⁻³)	ϵ_r^*	p_r (m ³ kg ⁻¹)
	cm ³	kg × 10 ⁻³	cm ³	kg × 10 ⁻³					
1.									
...									
12.									

Zakres wymaganych wiadomości

Polaryzacja dielektryczna cząsteczek; rodzaje polaryzacji; teoria Debye'a; refrakcja molowa a struktura; moment dipolowy wiązania i sumaryczny; metody wyznaczania momentu dipolowego cząsteczek; pomiar współczynnika załamania światła; znaczenie i obliczanie refrakcji molowej; polaryzowalność.

Pozycje wykazu literatury: 1–8, 12, 15

Słowniczek

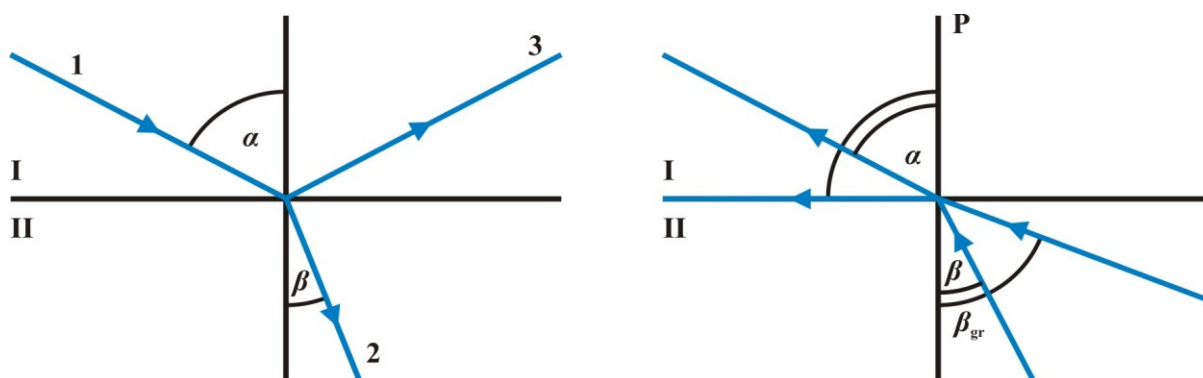
Moment dipolowy	Wielkość wektorowa, charakteryzująca dipol elektryczny, czyli układ dwóch ładunków o tych samych wartościach bezwzględnych, ale przeciwnych znakach. M.d. jest równy iloczynowi odległości między ładunkami i wartości ładunku. Moment dipolowy cząsteczek jest sumą wektorową momentów poszczególnych wiązań.
Polaryzacja dielektryczna	Zjawisko polegające na utworzeniu dipoli elektrycznych (lub orientacji już istniejących dipoli) w rezultacie oddziaływania z zewnętrznym. Wskutek tego w dielektryku powstaje wewnętrzne pole elektryczne (makroskopowy moment dipolowy) który częściowo równoważy przyłożone zewnętrzne pole. Kondensator wypełniony dielektrykiem zwiększa swoją pojemność elektryczną.
Polaryzowalność	Zdolność rozkładu ładunku cząsteczki (bądź atomu) do deformacji pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego i tworzenia dipoli elektrycznych.
Dielektrometria	Jedna z metoda elektroanalitycznych, w których bada się zmiany pojemności elektrycznej kondensatora cieczowego wypełnionego różnymi dielektrykami.
Kompleksy EDA	Addycyjne związki chemiczne, których cząsteczki powstają wskutek połączenia się dwóch trwałych, stabilnych termodynamicznie molekuł, z których jedna pełni rolę donora, a druga - rolę akceptora elektronów. Tworzenie tego typu adduktów przejawia się makroskopowo znaczącym zwiększeniem momentu dipolowego układu.

Ćwiczenie 2

Wyznaczanie refrakcji molowej związku na podstawie pomiaru współczynnika załamania światła

Refraktometria należy do optycznych metod analitycznych i opiera się na wyznaczeniu **współczynnika załamania światła** (n , zwanym też współczynnikiem refrakcji) – wielkości zależnej w danych warunkach pomiarowych od rodzaju substancji lub w przypadku mieszanin – od składu i stężenia roztworu.

Promień świetlny, padający na płaszczyznę rozgraniczającą dwa ośrodki o różnej gęstości optycznej, ulega częściowemu odbiciu i załamaniu. Światło, przechodząc z ośrodka optycznie rzadszego (ośrodek o niższym współczynniku załamania, I na Rys. 1) do optycznie gęstszego (ośrodek o wyższym współczynniku załamania, II na Rys. 1), ulega załamaniu i promień świetlny w ośrodku gęstszym odchyła się w kierunku płaszczyzny normalnej (P).



Rysunek 1. Załamanie promienia świetlnego (lewy rysunek) i zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła (prawy rysunek). Oznaczenia: 1– promień padający, 2– promień załamany, 3– promień odbity, I – ośrodek rzadszy optycznie, II – ośrodek gęstszy optycznie, β – kąt załamania światła, β_{gr} – kąt graniczny, P – płaszczyzna normalna.

Przyczyną załamania drogi promieni jest zmiana szybkości rozchodzenia się światła w ośrodkach o różnej gęstości optycznej. Wielkość tego załamania określa jedno z **praw Snelliusa**:

„W stałej temperaturze stosunek sinusów kąta padania α i załamania β jest dla danych dwóch ośrodków wielkością stałą, nazywaną współczynnikiem załamania światła lub współczynnikiem refrakcji n .”

Współczynnik załamania światła odpowiada stosunkowi szybkości światła v_1 w ośrodku

optycznie rzadszym do prędkości światła v_2 w ośrodku optycznie gęstszym:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{v_1}{v_2} \quad (1)$$

Teoretycznie współczynnik załamania odnosi się do próżni, a praktycznie do powietrza, co powoduje tylko bardzo nieznaczne obniżenie jego wartości (o około 0,03%). Próżnię jako ośrodek odniesienia stosuje się jedynie przy bardzo dokładanych pomiarach z udziałem gazów.

Gdy $n > 1$, czyli gdy kąt β jest mniejszy od kąta α , to światło przechodzi z ośrodka optycznie rzadszego do środowiska gęstszego. W takim przypadku wzrasta wielkość kąta załamania. Istnieje graniczna wielkość kąta załamania, osiągana, gdy kąt padania α równy jest 90° . W takich warunkach może wystąpić zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia. Kąt β , dla którego występuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia, nazwano **kątem granicznym** (β_{gr}) (Rys. 1). Wyznaczenie kąta granicznego umożliwia wyznaczenie współczynnika załamania światła (współczynnika refrakcji) z zależności (2):

$$n = \frac{\sin 90^\circ}{\sin \beta_{gr}}, \text{ zatem: } n = \frac{1}{\sin \beta_{gr}} \quad (2)$$

Stąd wniosek, że pomiar kąta granicznego pozwala wyznaczyć współczynnik n dla danego środowiska. Jeżeli znane są współczynniki refrakcji dwu ośrodków względem próżni lub powietrza, można wówczas obliczyć współczynnik załamania obu ośrodków względem siebie. Przejście promieni świetlnych przez takie ośrodki podlega zależności (3):

$$n_1 \times \sin \beta_1 = n_2 \times \sin \beta_2 \quad (3)$$

gdzie: β_1 – kąt załamania w ośrodku pierwszym, β_2 – kąt załamania w ośrodku drugim.

Dla przypadku, gdy $n_1 < n_2$ i promień światła pada z ośrodka rzadszego (o współczynniku n_1) pod kątem 90° , to kąt załamania w ośrodku gęstszym o współczynniku załamania n_2 osiągnie wartość kąta granicznego:

$$n_1 = n_2 \times \sin \beta_{gr} \quad (4)$$

Ostatnie równanie stosowane jest w **refraktometrii**, gdzie ośrodkiem rzadszym optycznie jest badana substancja, zaś gęstszym – specjalnie dobrany pryzmat szklany o znanym współczynniku załamania (n_2). Zjawisko załamania światła na granicy faz zależy od własności graniczących ośrodków oraz od warunków, w jakich wykonuje się pomiary (czynników zewnętrznych), wśród których należy wymienić:

- **Długość fali promieniowania.** Współczynnik załamania światła jest tym większy, im krótsze jest promieniowanie. Ponieważ światło białe na granicy dwóch ośrodków ulega rozszczepieniu, do pomiarów współczynnika refrakcji wykorzystuje się światło jednobarwne

– zwykle jest to światło sodowe, linia D o długości 589,3 nm.

- **Temperatura.** Zależność współczynnika refrakcji od temperatury jest istotna i np. dla wody w pobliżu temperatury pokojowej wynosi:

$$n_D^{15} = 1,3340 \qquad n_D^{20} = 1,3330 \qquad n_D^{25} = 1,3325$$

Dlatego pomiaru dokonuje się w warunkach termostatowanych, względnie wyznacza się współczynnik temperaturowy $\frac{\Delta n}{\Delta t}$ – podając zmianę współczynnika załamania przy zmianie temperatury o 1°C.

- **Ciśnienie.** Dla ciał stałych wpływ ciśnienia można pominąć. Zaznacza się on natomiast mierzalnie dla cieczy i gazów. Np. dla cieczy zwiększenie ciśnienia o 1 atm. zwiększa wartość n o około 3×10^{-5} .

Współczynnik zależy jednak przede wszystkim od budowy substancji, co charakteryzowane jest wielkością zwaną refrakcją. **Refrakcja właściwa (r_D)** i **refrakcja molowa (R_D)** – w odróżnieniu od n – są wielkościami niezależnymi od temperatury i ciśnienia oraz stanu skupienia danej substancji. Są one zdefiniowane poniższymi równaniami (5) i (6) (indeks D oznacza, że odnoszą się one do żółtej linii sodu):

$$r_D = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{1}{d} \qquad (5); \qquad R_D = r_D \times M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{M}{d} \qquad (6)$$

gdzie d oznacza gęstość cieczy, natomiast M – jej masę molową.

Refrakcja jest wielkością charakteryzującą do pewnego stopnia strukturę danej substancji. Refrakcja właściwa (wymiar SI: $\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$) lub molowa ($\text{m}^3 \text{kmol}^{-1}$) określają objętość, zbliżoną do rzeczywistej, zajmowanej przez 1 kilogram lub 1 mol substancji. Innymi słowy – jest to objętość, która w 1 kilogramie lub w 1 molu badanej substancji jest rzeczywiście zajęta przez materię. Jej wartość zależy przede wszystkim od liczby i rodzaju atomów, wchodzących w skład cząsteczki oraz rodzaju wiązań występujących między nimi, natomiast jedynie w minimalnym stopniu wpływa na nią stan skupienia substancji. Wartość refrakcji molowej jest równa w przybliżeniu sumie refrakcji atomowych atomów wchodzących w skład danej cząsteczki – mówimy, że wielkość ta posiada charakter addytywny:

$$R_{D(\text{molowa})} = \Sigma r_{D(\text{atomowa})} \qquad (7)$$

Addytywność refrakcji pozwala na obliczenie jej wartości jako sumy refrakcji atomów i wiązań. Addytywność tych funkcji pozwala też na obliczenie refrakcji roztworu – jeśli znane są refrakcje czystych składników. Na przykład, refrakcję właściwą roztworu

zawierającego składniki A i B (r_{AB}) można wyznaczyć z zależności (8):

$$r_{AB} = r_A \times w_A + r_B \times w_B \quad (8)$$

w której r_A i r_B są refrakcjami właściwymi czystych składników, natomiast w_A i w_B oznaczają ułamki wagowe składników w roztworze ($w_A + w_B = 1$).

Podobnie można obliczyć refrakcję molową mieszaniny cieczy A i B (R_{AB}), znając refrakcje molowe czystych składników (R_A i R_B) oraz ułamki molowe składników w roztworze (x_A i x_B):

$$R_{AB} = R_A \times x_A + R_B \times x_B \quad (9)$$

Refrakcję właściwą r_{AB} i molową R_{AB} roztworu można również wyznaczyć doświadczalnie, mierząc współczynnik załamania światła mieszaniny (n_{AB}) oraz gęstość roztworu (d_{AB}):

$$r_{AB} = \frac{n_{AB}^2 - 1}{n_{AB}^2 + 2} \times \frac{1}{d_{AB}} \quad (10)$$

$$R_{AB} = \frac{n_{AB}^2 - 1}{n_{AB}^2 + 2} \times \frac{x_A M_A + x_B M_B}{d_{AB}} \quad (11)$$

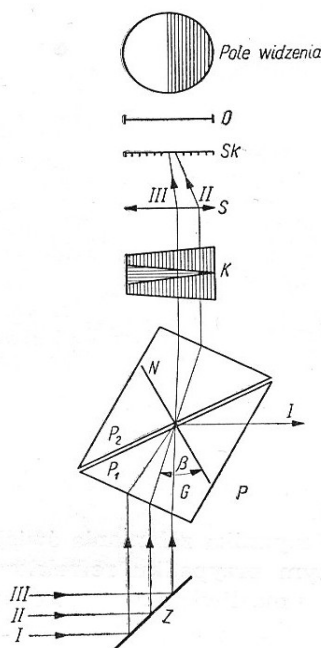
Zależności (10) i (11) wskazują, że refrakcja roztworu zmienia się liniowo z jego składem, co pozwala wykorzystać pomiar współczynnika załamania światła do wyznaczania składu mieszanin ciekłych. Z tego względu refraktometria znajduje zastosowanie w analizie ilościowej i jakościowej. Pomiar ilościowy można przeprowadzić, wykorzystując zależność współczynnika refrakcji od stężenia roztworów i składu mieszanin np. do pomiaru stężenia roztworów czystych odczynników organicznych i nieorganicznych, do kontroli czystości roztworów odczynników, których stężenie oznaczono inną metodą. Pomiar współczynnika refrakcji nie prowadzi jednak do celu, gdy w roztworze znajdują się zanieczyszczenia, mające zbliżony współczynnik refrakcji. Fakt małej specyficzności współczynnika załamania światła ogranicza w wielu przypadkach stosowanie opisywanej metody w celach analitycznych – obecność w roztworze każdej innej substancji poza badaną, wywiera bowiem wpływ na współczynnik załamania.

Pomiary refraktometryczne są przydatne w analityce w szczególności w przypadkach badań roztworów jednoskładnikowych oraz dwuskładnikowych, gdy drugi składnik występuje w ilości nieznannej ale stałej, roztworów dwuskładnikowych z równoczesnym pomiarem wielkości, która jest funkcją jej składu. Refraktometria dobrze też się sprawdza w badaniach przebiegu reakcji w roztworach, o ile przemiana powoduje wyraźną zmianę współczynnika załamania światła i jest jednocześnie jedyną przyczyną, która powoduje tą zmianę. Badania refrakcji molowych są też pomocne w określaniu struktury

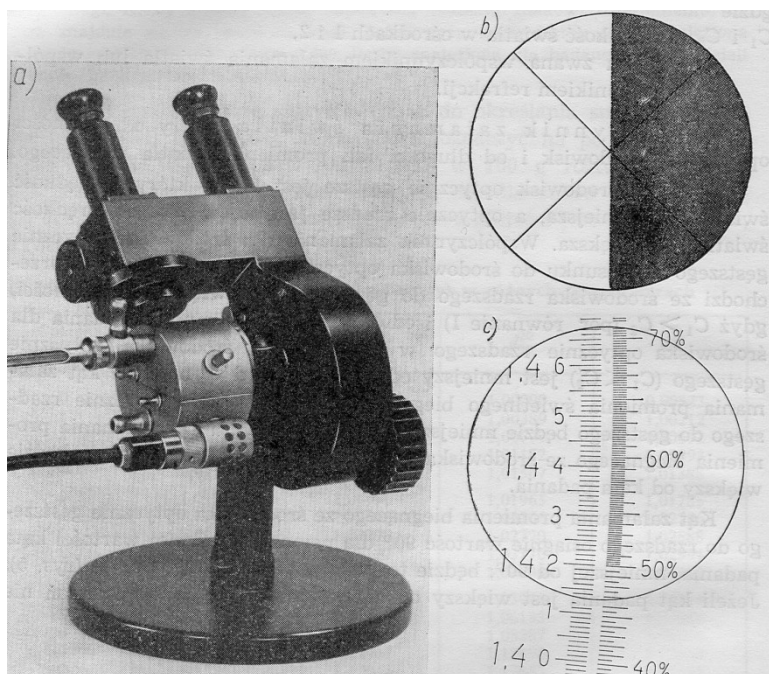
związków o nieznanej budowie i badaniu równowag w roztworach (np. tautomerycznych).

Zasada działania refraktometru

Refraktometr jest przyrządem służącym do wyznaczania współczynników załamania cieczy lub ciał stałych (Rys. 2 i 3).



Rysunek 2. Schemat biegu promieni świetlnych w refraktrometrze.



Rysunek 3. Refraktometr Abbego: a) aparat, b) pole ciemne i jasne, c) skala widziana w okularze.

Działanie przyrządu opiera się na wykorzystaniu zjawiska całkowitego wewnętrznego odbicia światła. Urządzenie składa się z następujących części (Rys. 2): zwierciadła – Z, pryzmatu – P, składającego się z dwóch połówek – P_1 i P_2 skierowanych do siebie równoległymi płaszczyznami przeciwprostokątnymi, kompensatora – K, soczewki zbierającej – S, okularu – O oraz skali – Sk. Okular ma wbudowane w pole widzenia dwa skrzyżowane włókienka. Na rys. 2 podany jest schemat biegu promieni świetlnych w refraktrometrze. Pomiedzy pryzmaty P_1 i P_2 wprowadza się kilka kropli badanego roztworu. Ciecz tworzy między pryzmatami cienką warstwę o równoległych płaszczyznach. Pryzmaty są otoczone płaszczem wodnym, pozwalającym na utrzymanie stałej temperatury. Wiązka światła (promienie I, II i III), skierowana na pryzmat P_1 , przechodzi do warstwy badanej cieczy (optycznie rzadszej) i tutaj promień I zostaje odbity całkowicie, gdyż pada on pod kątem większym od kąta granicznego – nie zdoła on zatem oświetlić pola widzenia obiektywu. Promień II, padający pod kątem granicznym, przechodzi przez warstwę cieczy, pryzmat P_2 oraz kompensator K dociera do skali Sk. Promień III, wpadając pod kątem mniejszym od kąta granicznego, przechodzi przez ciecz i pryzmat P_2 i również dociera do skali i oświetla ją. W pewnej pozycji zwierciadła i położenia pryzmatów, w polu widzenia obiektywu będzie widoczne pole oświetlone i pole ciemne (Rys. 3b). Promienie wpadające pod kątem granicznym będą stanowiły linię podziału tych pól; przy pomiarze powinna ona przebiegać przez skrzyżowanie dwóch włókien. Granica rozdzielająca pole ciemne i jasne musi być ostra, jeżeli jest niewyraźna i wielobarwna, należy skorygować ją pokrętelem kompensatora K. Skala Sk (Rys. 3c) jest skalibrowana we współczynnikach załamania światła.

Wykonanie pomiarów

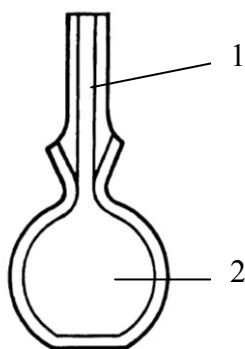
Celem ćwiczenia jest określenie składu mieszanin dwuskładnikowych różnych substancji chemicznych, korzystając z metody refraktometrycznej oraz piknometrycznych pomiarów gęstości.

Pomiar współczynnika załamania światła refraktometrem Abbego

1. Przygotować w kolbkach roztwory dwóch cieczy organicznych A i B w podanych proporcjach.
2. Zmierzyć współczynniki załamania światła czystych cieczy A i B oraz przygotowanych roztworów AB za pomocą refraktometru Abbego (Rys. 3).
3. Otworzyć pryzmat, za pomocą pipetki nalać kilka kropli badanej cieczy na dolną jego część i szybko zamknąć. Pryzmat musi być zwilżony badaną cieczą na całej powierzchni. W razie potrzeby przed pierwszym pomiarem pryzmat wyczyścić watą nasączoną acetonem.
4. Pokręcając pierścieniem na lunecie prawej ustawić ostrość pola widzenia w okularze dostosowując go do swego wzroku.
5. Za pomocą pokrętła kompensatora znajdującego się z lewej strony przyrządu ustawić pryzmat w takim położeniu, aby w okularze prawej lunetki na granicy skrzyżowania linii pojawiła się ostra granica pół jasnego i ciemnego. *Uwaga. Jeżeli uzyskanie wyraźnej granicy pół jasnego i ciemnego nie udaje się, oznacza to, że ciecz w pryzmacie odparowała lub spłynęła. Należy ją ponownie nanieść na pryzmat.*
6. Po ustawieniu ostrej granicy rozdziału obu pól na przecięciu dwóch linii należy w lunecie lewej odczytać na skali przyrządu współczynnik załamania światła z dokładnością do 0,0001. Ostrość widzenia skali można poprawić pokręcając pierścieniem na lewej lunecie.
7. Zmierzyć w powyższy sposób współczynniki załamania światła dla czystych składników (A i B) i ich mieszanin A/B, a następnie mieszanin o nieznanym składzie ($A/B = X$).

Wyznaczanie gęstości cieczy za pomocą piknometru

Piknometr składa się z małej kolbki zamykanej korkiem szklanym z rurką kapilarną. Na ścianie kolbki podana jest jej dokładna objętość (Rys. 4).



Rysunek 4. Schemat prostego piknometru: 1 – korek szklany z rurką kapilarną, 2 – kolbka.

1. Zważyć na wadze analitycznej suchy i pusty piknometr.
2. Wyjąć korek z kapilarą, napełnić kolbkę całkowicie badaną cieczą (roztworem).
3. Wstawić korek. Część cieczy musi wypłynąć przez kapilarę.
4. Piknometr osuszyć i ponownie zważyć. Różnicę mas piknometru napełnionego i pustego, równą masie cieczy, podzielić przez objętość piknometru.

- Objętość piknometru można precyzyjnie wykalibrować, stosując pomiar z udziałem wody destylowanej o precyzyjnie określonej gęstości w danej temperaturze (tablice).
- Zmierzyć w tych samych warunkach współczynnik załamania i gęstość mieszanin cieczy o nieznanym składzie.
- Wyniki pomiarów refraktometrycznych i piknometrycznych zebrać w Tab. 1.

Tabela 1. Wyniki pomiarów refraktometrycznych i piknometrycznych dla cieczy A i B.

L.p.	Roztwór	Gęstość d_i (g cm ⁻³)	Współczynnik załamania n_i	Ułamek wagowy składnika A (w_A)	Refrakcja właściwa r_i (cm ³ g ⁻¹)
1.	A				
2.	B				
3.	A/B = 1/9 ml				
...					
11.	A/B = 9/1 ml				
12.	A/B = X				

$T =$ A: B:

Oznaczanie stężenia białka metodą refraktometryczną

- Zmierz współczynnik załamania światła roztworu białka BSA w dostarczonym roztworze.
- Zmierz gęstość roztworu BSA w piknometrze.
- Oblicz refrakcję właściwą badanego roztworu na podstawie równania (5).
- Wyznacz zawartość białka w próbce, korzystając z wartości refrakcji podanych w Tab. 2.

refrakcja	Białko g%	Refrakcja	Białko g%	Refrakcja	Białko g%
1,3370	0,6	1,3430	3,9	1,3490	7,2
2	0,7	2	4,0	2	7,3
4	0,8	4	4,1	4	7,4
6	0,9	6	4,2	6	7,6
8	1,0	8	4,3	8	7,7
1,3380	1,1	1,3440	4,4	1,3500	7,8
2	1,2	2	4,6	2	7,9
4	1,3	4	4,7	4	8,0
6	1,4	6	4,8	6	8,1
8	1,5	8	4,9	8	8,2
1,3390	1,7	1,3450	5,0	1,3510	8,3
2	1,8	2	5,1	2	8,4
4	1,9	4	5,2	4	8,6
6	2,0	6	5,3	6	8,7
8	2,1	8	5,4	8	8,8
1,3400	2,2	1,3460	5,6	1,3520	8,9
2	2,3	2	5,7	2	9,0
4	2,4	4	5,8	4	9,1
6	2,6	6	5,9	6	9,2
8	2,7	8	6,0	8	9,3
1,3410	2,8	1,3470	6,1	1,3530	9,4
2	2,9	2	6,2	2	9,6
4	3,0	4	6,3	4	9,7
6	3,1	6	6,4	6	9,8
8	3,2	8	6,6	8	9,9
1,3420	3,3	1,3480	6,7	1,3540	10,0

Tabela 2. Zależność refrakcji właściwej od zawartości masowej białka w roztworze wodnym.

Wykonanie sprawozdania

- Zidentyfikuj substancje A i B na podstawie gęstości i wartości współczynników załamania światła podanych w Tab. 3.

Tabela 3. Gęstości (d) i współczynniki załamania światła (n_D) niektórych substancji ciekłych.

Substancja	Gęstość cieczy, d [g cm ⁻³]				Wsp. zał. n_D
T , K	283	293	303	313	293 K (20°C)
Aceton	0,8014	0,7905	0,7793	0,7682	1,3591
CCl ₄	1,6135	1,5939	1,5748	1,5557	1,4567
Metanol	0,8008	0,7915	0,7825	0,7740	1,3266
Octan etylu	0,9120	0,9005	0,8910	0,8762	1,3698
Toluen	0,8782	0,8670	0,8580	0,8483	1,4941
Woda	0,9997	0,9982	0,9956	0,9922	1,3330
n-Heksan		0,6549			1,3751
Gliceryna		1,2610			1,4744

2. Oblicz ułamki wagowe składnika A w kolejnych roztworach ($w_A = \frac{m_A}{m_A + m_B}$),

korzystając z zależności na gęstość roztworów ($m = V \times d$) oraz wyznaczonej wagowo gęstości (d) i znanej objętości poszczególnych składników (V), a następnie oblicz refrakcję właściwą czystych składników (r_A, r_B) według wzoru (5).

3. Wyznacz refrakcję właściwą poszczególnych mieszanin (r_{AB}), korzystając z addytywności refrakcji (równanie 8) i ułamków wagowych uzyskanych w pkt. 2.

4. Wyznacz, korzystając z równania (10), wartości r_{AB} dla roztworów wzorcowych AB oraz mieszaniny o nieznanej proporcji $A/B = X$, wykorzystując zmierzone refraktometrycznie wartości współczynnika załamania światła oraz gęstości wyznaczone z piknometru.

5. Sporządź wykresy liniowe zależności refrakcji właściwej roztworów wzorcowych od ułamka wagowego składnika A: $r_{AB} = f(w_A)$, podaj równanie prostej i współczynnik korelacji. Uwzględnij obie serie obliczonych wartości r_{AB} , tzn. te otrzymane z równania (8) oraz (10).

6. Na podstawie uzyskanych zależności liniowych (pkt. 5) wyznacz skład roztworu AB otrzymanego do badań. Po wyznaczeniu ułamków wagowych składników A i B, oblicz ich

ułamki molowe w mieszaninie ($x_A = \frac{n_A}{n_A + n_B}; n_A = \frac{m_A}{M_A}$).

7. Na podstawie uzyskanych wartości n i d dla roztworu białka, oblicz refrakcję właściwą badanego roztworu i oszacuj zawartość masową BSA (g%) w roztworze na podstawie danych zebranych w tabeli 2.

8. Przeprowadź dyskusję wyników i błędów pomiarowych.

Zakres wymaganych wiadomości:

Refrakcja molowa i jej wyznaczanie; sens i sposób wyznaczania współczynnika załamania światła; kąt graniczny refraktometr Abbego, gęstość substancji i jej wyznaczanie.

Pozycje literatury: 1–8

Słowniczek

Kąt graniczny	Maksymalny kąt, pod jakim promień światła monochromatycznego może padać na granicę dwóch ośrodków, ulegając przy tym załamaniu. Powyżej kąta granicznego promień ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu.
Refrakcja molowa	Wielkość addytywna, określająca objętość, zajmowaną przez 1 mol substancji chemicznej, inaczej objętość, która w 1 molu substancji jest wypełniona przez materię. Jednostką refrakcji w układzie SI jest $\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$.
Refrakcja właściwa	Wielkość addytywna, określająca objętość zajmowaną przez 1 kilogram substancji chemicznej, inaczej objętość, która w 1 kg substancji jest wypełniona przez materię. Jednostką refrakcji w układzie SI jest $\text{m}^3 \text{kmol}^{-1}$.
Refraktometria	Optyczna metoda analizy, opierająca się na pomiarze współczynnika załamania światła substancji i obliczeniach wielkości pochodnych (np. refrakcji).
Współczynnik załamania światła	Miara zmiany prędkości rozchodzenia się fali w danym ośrodku w stosunku do jej prędkości w ośrodku odniesienia, równa stosunkowi prędkości fazowej fali w ośrodku odniesienia do prędkości fali w danym ośrodku. Wyznacza się go na podstawie prawa Snelliusa: $n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$, gdzie: α – kąt padania promienia fali na granicę ośrodków (kąt między kierunkiem promienia a normalną do powierzchni granicznej ośrodków), β – kąt załamania, czyli kąt między kierunkiem promienia załamanego w danym ośrodku a normalną do powierzchni).

TERMOCHEMIA

Ćwiczenie 3

Pomiar ciepła spalania substancji organicznej

Każdy układ charakteryzuje się **energią wewnętrzną** (U), czyli łącznym zasobem energii w nim zgromadzonej. W układach zamkniętych izolowanych nie ma wymiany energii pomiędzy układem a otoczeniem, czyli nie następuje zmiana energii wewnętrznej takich układów ($\Delta U = 0$). Jeżeli w wyniku procesu zachodzącego w układzie zamkniętym nieizolowanym następuje wymiana energii z otoczeniem, to zmienia się energia wewnętrzna tego układu, a wymiana energii może przebiegać na sposób ciepła (Q) lub pracy (W), co opisuje pierwsza zasada termodynamiki:

$$\Delta U = Q + W \quad (1)$$

W układach chemicznych wymiana energii na sposób pracy jest związana z pracą zmiany objętości (inaczej: pracy objętościowej) wyrażonej zależnością:

$$W_{obj} = -p\Delta V \quad (2)$$

stąd wyrażenie na pierwszą zasadę termodynamiki przyjmuje postać:

$$\Delta U = Q - p\Delta V \quad (3)$$

Jeżeli proces chemiczny przebiega w stałej objętości (warunki izochoryczne: $V = const.$) oraz stałej temperaturze (warunki izotermiczne: $T = const.$), to układ nie wykonuje pracy objętościowej ($\Delta V = 0$, czyli $p\Delta V = 0$). Wówczas zmiana energii wewnętrznej jest równa ciepłu procesu zachodzącego w stałej objętości (Q_V):

$$\Delta U = Q_V \quad (4)$$

Dla procesów zachodzących pod stałym ciśnieniem (warunki izobaryczne: $p = const.$) efekty cieplne opisuje termodynamiczna funkcja stanu nazywana **entalpią** (H). Jest ona wyrażona zależnością:

$$H = U + pV \quad (5)$$

Zmianę entalpii opisuje zatem wzór:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV) \quad (6)$$

Zmiana wartości iloczynu $\Delta(pV)$ jest równa: $\Delta(pV) = p\Delta V + V\Delta p$, natomiast $\Delta U = Q_p - p\Delta V$, (Q_p oznacza ciepło procesu pod stałym ciśnieniem), dlatego podstawiając te wartości do powyższego wzoru otrzymujemy:

$$\Delta H = Q_p - p\Delta V + p\Delta V + V\Delta p \quad (7)$$

$$\Delta H = Q_p + V\Delta p \quad (8)$$

Proces chemiczny przebiega pod stałym ciśnieniem oraz w stałej temperaturze, więc nie ma przyrostu objętości ($\Delta p = 0$, czyli $V\Delta p = 0$). Zmiana entalpii jest wówczas równa ciepłu procesu zachodzącego w stałym ciśnieniu: $\Delta H = Q_p$, czyli efekty cieplne reakcji zachodzących w takich warunkach są opisywane zmianami entalpii.

Ciepło procesu chemicznego określają zatem: energia wewnętrzna układu oraz entalpia – termodynamiczne funkcje stanu, których zmiana nie zależy od drogi przemiany, ale od parametrów stanu początkowego i końcowego układu, pod warunkiem, że poszczególne etapy danego procesu zachodzą w stałej objętości lub pod stałym ciśnieniem. Powyższe zależności opisuje ilościowo **prawo Hessa** (inaczej: prawo stałości sum cieplnych). Prawo to bezpośrednio wynika z prawa zachowania energii w reakcjach chemicznych, które brzmi: w układzie izolowanym całkowita ilość energii jest niezmienna – może się zmieniać jedynie jej forma (na przykład: podczas spalania substancji energia chemiczna zamienia się w energię cieplną). W termochemii zmiany energii wewnętrznej oraz entalpii i odpowiadające im ciepła reakcji (Q_V oraz Q_p) określa się dla 1 mola substancji oraz – umownie – mają one dodatnie znaki, jeżeli powodują wzrost całkowitej energii układu (układ zyskuje energię), natomiast znaki ujemne, gdy powodują obniżenie energii układu (układ traci energię).

Powyższe zależności umożliwiają algebraiczne wyznaczenie ciepła reakcji chemicznej. W przypadku reakcji zachodzącej w warunkach standardowych (w stałej temperaturze $T = 298\text{ K}$ i pod stałym ciśnieniem $p = 1\text{ atm.}$) ciepło reakcji chemicznej (ΔH_r^0) można wyznaczyć na podstawie znajomości **standardowych molowych ciepł tworzenia** (H_{tw}^0) produktów oraz substratów, z uwzględnieniem odpowiednich współczynników stechiometrycznych (n_i):

$$\Delta H_r^0 = \sum_i (n_i H_{tw, produkty}^0) - \sum_i (n_i H_{tw, substraty}^0) \quad (9)$$

lub ich **standardowych molowych ciepł spalania** (H_{sp}^0):

$$\Delta H_r^0 = \sum_i (n_i H_{sp, substraty}^0) - \sum_i (n_i H_{sp, produkty}^0) \quad (10)$$

Należy pamiętać, że wartości ciepł tworzenia oraz spalania powinny uwzględniać warunki (ciśnienie, stan skupienia, temperatura,), w jakich przebiega reakcja. Wartości standardowych ciepł tworzenia oraz spalania substancji znajdują się w tablicach fizykochemicznych.

Zgodnie z **prawem Kirchhoffa**, ciepło zachodzącej reakcji zależy od temperatury, w której reakcja ta przebiega. Dla reakcji zachodzącej pod stałym ciśnieniem w pewnej temperaturze (T_2) ciepło reakcji, wyrażone zmianą entalpii standardowej ($\Delta H_{r, T_2}^0$) jest opisane

zależnością:

$$\Delta H_{r,T_2}^0 = \Delta H_{r,T_1}^0 + \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (11)$$

gdzie: $\Delta H_{r,T_1}^0$ i $\Delta H_{r,T_2}^0$ – zmiana standardowej entalpii reakcji w temperaturach T_1 i T_2 , ΔC_p – różnica pomiędzy ciepłami molowymi produktów i substratów z uwzględnieniem ich współczynników stechiometrycznych.

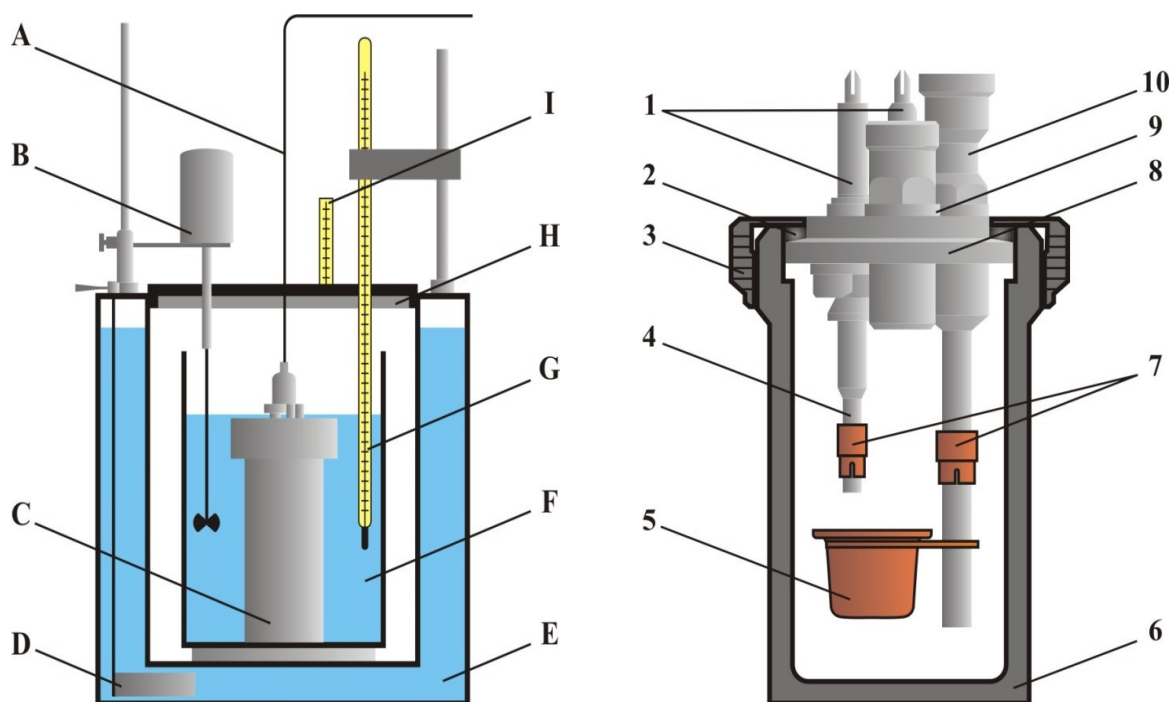
Oznacza to, że znając zmianę standardowej entalpii reakcji wyznaczoną w jednej temperaturze ($\Delta H_{r,T_1}^0$), jesteśmy w stanie wyliczyć zmianę standardowej entalpii reakcji w innej temperaturze ($\Delta H_{r,T_2}^0$).

W celu eksperymentalnego wyznaczenia ilości ciepła wydzielanego lub pochłanianego podczas procesów fizycznych bądź chemicznych przeprowadza się pomiary kalorymetryczne w urządzeniach nazywanych **kalorymetrami**. Istnieje wiele kryteriów podziału kalorymetrów (na przykład: w zależności od sposobu działania, rodzaju badanego procesu, etc.). Mając na uwadze sposób działania kalorymetrów wyróżnia się trzy najważniejsze rodzaje kalorymetrów: **izotermiczne**, **adiabatyczne** oraz **diatermiczne**. W kalorymetrach izotermicznych osłona kalorymetru, nazywana płaszczem ochronnym, jest utrzymywana w stałej temperaturze (z dużą dokładnością) podczas całego eksperymentu, by ciepło reakcji procesu zachodzącego w kalorymetrze nie powodowało zmiany temperatury kalorymetru. W kalorymetrach takich, znając ciepło przemiany oraz masę substancji, która ulega przemianie można wyliczyć całkowitą ilość ciepła oddaną lub pochłoniętą w badanym procesie. Ze względu na dużą wymianę ciepła między układem kalorymetrycznym a otoczeniem, konieczne jest uwzględnienie stosownej poprawki. Kalorymetry takie stosuje się do procesów zachodzących dość szybko (na przykład: podczas wyznaczania ciepła spalania, rozpuszczania). W kalorymetrach adiabatycznych osłonę kalorymetru utrzymuje się w tej samej temperaturze, jaka jest w naczyniu kalorymetrycznym, by nie dochodziło do przepływu ciepła między układem kalorymetrycznym a otoczeniem. W tego typu kalorymetrach całkowita ilość ciepła oddana lub pochłonięta w badanym procesie powoduje zmianę temperatury kalorymetru podczas trwania pomiaru kalorymetrycznego. Kalorymetry takie mogą służyć zarówno do badania procesów zachodzących szybko, jak i wolno.

Kalorymetry diatermiczne są nieizotermiczne oraz nieadiabatyczne, czyli nie jest w ich przypadku zachowany warunek utrzymywania stałej temperatury osłony oraz ma miejsce ograniczona (niewielka) wymiana ciepła pomiędzy układem kalorymetrycznym oraz otoczeniem.

Najprostszym przykładem kalorymetru jest kalorymetr wodny, stosowany w niniejszym

ćwiczeniu (Rys. 1).



Rysunek 1. (lewa strona). Schemat kalorymetru wodnego: A – przewód doprowadzający prąd do bomby kalorymetrycznej, B – mieszadło mechaniczne, C – bomba kalorymetryczna, D – mieszadło mechaniczne, E – płaszcz wodny, F – naczynie kalorymetryczne, G – termometr kalorymetryczny (np. Beckmanna), H – pokrywa kalorymetru, I – termometr w płaszczu kalorymetrycznym.

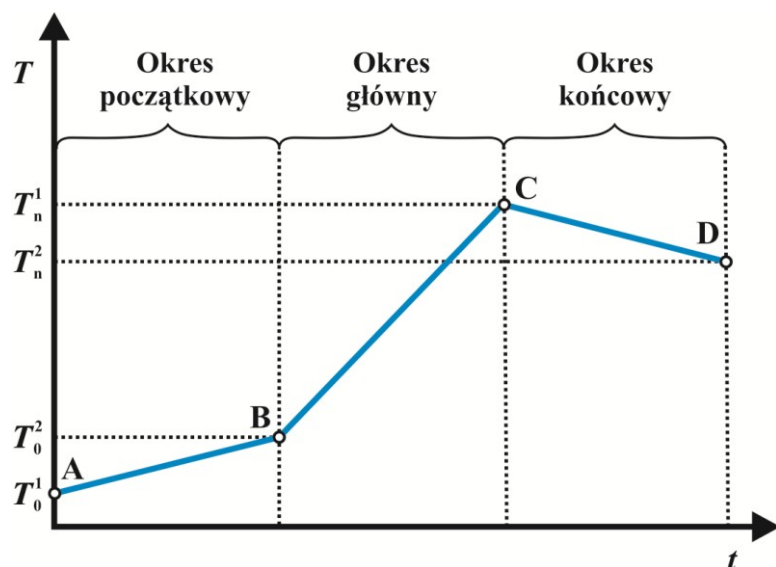
Rysunek 2. (prawa strona). Schemat bomby kalorymetrycznej: 1 – zatyczki elektrod, 2 – uszczelka, 3 – nakrętka bomby, 4 – elektroda, 5 – tygiel, 6 – korpus bomby, 7 – tuleje zaciskowe drucika, 8 – korpus bomby, 9 – zawór wylotowy, 10 – zawór wlotowy.

Kalorymetr wodny jest zbudowany w taki sposób, że płaszcz ochronny stanowi naczynie (naczynie Dewara) wypełnione cieczą kalorymetryczną, którą stanowi woda, wyposażone w bardzo czuły termometr, służący do pomiaru zmian temperatury zachodzących w trakcie badanego procesu oraz mieszadło – w celu równomiernego rozprowadzania ciepła wewnątrz naczynia. W zależności od badanej przemiany, proces przeprowadza się w odpowiednim dla danego procesu naczynku kalorymetrycznym i badając zmiany temperatury cieczy kalorymetrycznej – znając pojemność cieplną układu – możemy wyznaczyć efekt cieplny procesu spalania badanej substancji. Przykładami naczynek kalorymetrycznych stosowanych w kalorymetrach są naczynia szklane (ampułki, probówki i inne) umożliwiające odpowiednie dozowanie reagentów oraz bomba kalorymetryczna, która umożliwia badanie procesów spalania substancji organicznych.

Bomba kalorymetryczna to naczynie wykonane ze stali odpornej na działanie tlenu oraz działanie wysokiej temperatury oraz wysokiego ciśnienia (Rys. 2). Urządzenie to umożliwia

w prosty i dokładny sposób wyznaczyć ciepło spalania różnych substancji organicznych. Spalanie substancji organicznych w bombie kalorymetrycznej jest metodą często stosowaną w przemyśle, między innymi do pomiarów kalorymetrycznych stałych paliw energetycznych (na przykład: węgla kamiennego) w celu wyznaczania ich kaloryczności.

Pomiar kalorymetryczny (niezależnie od rodzaju kalorymetru) składa się z trzech okresów: początkowego, głównego i końcowego, a wykres przedstawiający zmianę temperatury w czasie nazywany jest **biegiem termometru** (Rys. 3).



Rysunek 3. Bieg termometru w pomiarach termochemicznych w bombie kalorymetrycznej .

Okres początkowy (odcinek AB na wykresie) odzwierciedla ustalanie się równowagi termicznej w naczyniu kalorymetrycznym. Niewielkie zmiany temperatury mające miejsce w tym okresie mogą one wynikać między innymi wskutek wyrównania się temperatury pomiędzy naczyniem kalorymetrycznym a wprowadzonym do niego reagentem, wymiany ciepła między kalorymetrem a otoczeniem, wydzielania się ciepła w wyniku tarcia mechanicznego mieszadła o ciecz kalorymetryczną. Zmiany temperatury są w tym okresie niewielkie i opisuje je prosta nachylona pod niewielkim kątem względem osi odciętych (czasu).

Okres główny (odcinek BC) rozpoczyna się w chwili rozpoczęcia badanego procesu (np. wprowadzenia do naczynia kalorymetrycznego drugiego z reagentów) i charakteryzuje się znacznymi zmianami temperatury w czasie.

Zakończenie okresu głównego następuje w momencie rozpoczęcia się stałego biegu termometru. Zmiany temperatury zachodzące w czasie stają się jednakowe; moment ten stanowi równocześnie początek **okresu końcowego** (odcinek CD), w którym zmiany

temperatury mają miejsce z podobnych przyczyn jak w okresie początkowym.

Z biegu termometru wyznacza się różnicę pomiędzy początkową i końcową temperaturą okresu głównego, która odpowiada ilości ciepła (wydzielonego lub pochłoniętego) w badanym procesie. Należy również uwzględnić zmian temperatury (niewielkie przyrosty lub straty ciepła) zachodzące w wyniku niepełnej izolacji układu kalorymetrycznego od otoczenia. Zmiany te uwzględnia się wyliczając tak zwaną empiryczną poprawkę na promieniowanie. Poprawkę tę oblicza się na podstawie znajomości biegu termometru w okresie początkowym i końcowym – w zależności od tego jak długo trwa okres główny. Jeżeli okres główny trwa krócej niż 5 minut, to poprawkę na promieniowanie wyznacza się z zależności:

$$\sum v = v_0 + (n - 1)v \quad (12)$$

Jeśli okres główny trwa dłużej niż 5 minut, stosuje się następującą zależność (wzór Regnaulta-Pfaundlera):

$$\sum v = nv_0 + \frac{v - v_0}{T'_n - T'_0} \left[\sum_1^{n-1} T + \frac{T_0^2 + T_n^1}{2} - nT_0^1 \right] \quad (13)$$

gdzie: $v_0 = \frac{T_0^1 - T_0^2}{n_0}$, $v = \frac{T_n^1 - T_n^2}{n_k}$

T_0^1 oraz T_0^2 – temperatura początkowa oraz końcowa okresu początkowego,

T_n^1 oraz T_n^2 – temperatura początkowa oraz końcowa okresu końcowego,

n_0 – liczba odczytów temperatury w okresie początkowym,

n – liczba odczytów temperatury w okresie głównym,

n_k – liczba odczytów temperatury w okresie końcowym,

T_n^1 oraz T_0^1 – średnia temperatura okresu początkowego oraz okresu końcowego,

$\sum_1^{n-1} T$ – suma temperatur okresu głównego minus temperatura końcowa okresu głównego,

$\frac{T_0^2 + T_n^1}{2}$ – średnia temperatura okresu głównego.

Znając **pojemność cieplną** układu kalorymetrycznego (K), zmianę temperatury podczas przemiany (ΔT) oraz poprawkę na promieniowanie ($\sum v$), można wyznaczyć ilość ciepła wydzielonego lub pochłoniętego podczas badanego procesu prowadzonego pod stałym ciśnieniem (Q_V) ze wzoru:

$$Q_V = K \times (\Delta T + \sum v) \quad (14)$$

Znając ilość pochłanianego lub wydzielonego ciepła (Q_V) w wyniku tego procesu można wyznaczyć molową entalpię spalania substancji organicznej (ΔH).

Jak wynika z pierwszej zasady termodynamiki:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV) \quad (15)$$

zaś z równania gazu doskonałego wiadomo, że $pV = nRT$

Stąd:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(RTn) \Rightarrow \Delta H = \Delta U + \Delta nRT \quad (16)$$

gdzie: Δn – różnica sum ilości moli gazowych produktów oraz substratów reakcji.

Pod stałym ciśnieniem układ nie wykonuje żadnej pracy, stąd: $\Delta U = Q_v$. Zatem mierząc ilość pochłanianego lub wydzielonego ciepła (Q_v) dla procesu przebiegającego w określonej temperaturze (T) jesteśmy w stanie wyznaczyć zmianę energii wewnętrznej układu (molową entalpię spalania) z zależności:

$$\Delta H = Q_p = Q_v + \Delta nRT \quad (17)$$

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczanie pojemności cieplnej układu kalorymetrycznego oraz ciepła spalania dla substancji organicznych, wskazanych przez prowadzącego.

Wyznaczanie pojemności cieplnej układu kalorymetrycznego

Wyznaczanie pojemności cieplnej układu kalorymetrycznego przeprowadza się, spalając w bombie kalorymetrycznej substancję wzorcową (tak zwany wzorzec termochemiczny), którą stanowi kwas benzoesowy. W celu wyznaczenia pojemności cieplnej układu kalorymetrycznego dla wzorca należy:

1. Odmierzyć 1g kwasu benzoesowego i za pomocą prasy uformować z niego tabletkę, z wprasowanym w nią drucikiem.
2. Gotową tabletkę zważyć, umieścić w znajdującym się w bombie kalorymetrycznej tyglu i nakręcając pierścień domykający zamknąć bombę.
3. Do bomby kalorymetrycznej wprowadzić tlen z butli, łącząc mosiężną rurką zawór redukcyjny butli z tlenem z pokrywą bomby.
4. Sprawdzić szczelność bomby zanurzając ją w naczyniu z wodą.
5. Wlać do naczynia 2,7 dm³ wody destylowanej (cieczy kalorymetrycznej) o temperaturze niższej o około 1–1,5°C od temperatury wody w płaszczu ochronnym kalorymetru.
6. Naczynie z wodą wstawić do płaszcza ochronnego, a w nim umieścić przygotowaną bombę kalorymetryczną w taki sposób, aby woda zakrywała około 2/3 wysokości zaworu wylotowego, obok zanurzamy termometr Beckmanna lub termometr kontaktowy i umieszczamy mieszaninę.
7. Po przygotowaniu zestawu połączyć elektrody z przewodem doprowadzającym prąd, założyć pokrywę na naczynie wewnętrzne i płaszcz ochronny oraz podłączyć układ do sieci prądu zmiennego.
8. Uruchomić mieszaninę i pozostawić układ na około 5-10 minut do momentu wyrównania się temperatury.
9. Po wyrównaniu się temperatury rozpocząć pomiary temperatury w odstępach 30 sekundowych dla 10 pomiarów – jest to okres początkowy biegu termometru (Tab. 1).
10. Podczas 11 pomiaru nacisnąć przycisk układu zapłonowego, co powoduje spalanie się substancji i

gwałtowny wzrost temperatury – jest to początek okresu głównego biegu termometru.

11. Jak uprzednio, przeprowadzać odczyty temperatury w odstępach 30 sekundowych.

12. W momencie ustalenia się stałej temperatury (niewielkich przyrostów temperatury) rozpoczyna się okres końcowy biegu termometru, dokonywać odczyty temperatury przez dalsze 5 minut.

13. Po zakończeniu eksperymentu wyjąć bombę z naczynia kalorymetrycznego, wypuścić z niej gazy, okręcając śrubę zamykającą otwór wlotowy i otwierając powoli zawór iglicowy. Sprawdzić (po zapachu), czy ulatniające się gazy nie zawierają lotnych produktów powstających w wyniku niecałkowitego spalania substancji organicznych. Po zdjęciu pokrywy spłukać wewnętrzne ścianki bomby wodą destylowaną.

Wyznaczanie ciepła spalania substancji organicznych

W taki sam sposób, jak w przypadku kwasu benzoowego, wyznacza się ciepła spalania dla dwóch, wskazanych przez prowadzącego ćwiczenia, substancji. Wyniki zestawiamy w Tab. 1.

Tabela 1. Zestawienie wyników badań termochemicznych dla spalania substancji organicznej w bombie kalorymetrycznej.

kwas benzoowy masa tabletki $m = \dots\dots\dots$		substancja I masa tabletki $m = \dots\dots\dots$		substancja II masa tabletki $m = \dots\dots\dots$	
t [s]	T [°C]	t [s]	T [°C]	t [s]	T [°C]
30		30		30	
60		60		60	
...		90		90	
300		120		120	
...		150		150	
600		180		180	
...		...		...	
900					

Wykonanie sprawozdania

1. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów wykreślić bieg termometru, czyli zależność temperatury w funkcji czasu ($T = f(t)$) dla wzorca termochemicznego oraz badanych substancji. Na każdym wykresie należy zaznaczyć okresy: początkowy, główny i końcowy.

2. Wyznaczyć pojemność cieplną układu kalorymetrycznego [J/K] dla wzorca termochemicznego z zależności:

$$K = \frac{Q_V m}{M(\Delta T + \sum v)} \quad (18)$$

gdzie: Q_V – molowe ciepło spalania kwasu benzoowego (wartość odczytana z tablic fizykochemicznych), m – masa tabletki kwasu benzoowego, M – masa molowa kwasu benzoowego, ΔT – przyrost temperatury w naczyniu kalorymetrycznym, v – poprawka na promieniowanie.

3. Obliczyć molowe ciepło spalania (Q_V) badanych substancji przekształcając wzór (18) :

$$Q_V = \frac{K M(\Delta T + \sum v)}{m} \quad (18')$$

4. Na podstawie obliczonych ciepł spalania badanych substancji wyznaczyć ich molowe entalpie spalania: $\Delta H_{sp} = Q_V + RT\Delta n$.

5. Obliczyć molowe entalpie tworzenia badanych związków z pierwiastków w warunkach doświadczenia stosując prawo Hessa: $\Delta H_r^0 = \sum_i (n_i H_{tw, produkty}^0) - \sum_i (n_i H_{tw, substraty}^0)$.

Za ciepło reakcji przyjąć obliczoną (p. 4) entalpię spalania.

6. Porównać otrzymane wyniki z danymi literaturowymi, przeprowadzić dyskusję wyników oraz analizę błędów.

Zakres wymaganych wiadomości:

Układ: otwarty, zamknięty, izolowany; wzorzec termochemiczny; pojemność cieplna kalorymetru; bieg termometru w kalorymetrze wodnym; I zasada termodynamiki; prawo Hessa; prawo Kirchhoffa; ciepło reakcji chemicznej w stałej objętości i pod stałym ciśnieniem a zmiana energii układu i zmiana entalpii; równania termochemiczne i obliczanie entalpii reakcji na podstawie ciepła tworzenia reagentów lub ciepła spalania reagentów.

Pozycje wykazu literatury: 1, 5, 6, 9

Słowniczek

Termochemia	Dział termodynamiki chemicznej zajmujący się badaniem efektów energetycznych (cieplnych), towarzyszących procesom fizycznym i chemicznym zachodzącym w różnych układach.
Kalorymetria	Dział termochemii, dotyczący metod pomiaru ilości ciepła wydzielanego lub pochłanianego podczas procesów fizycznych lub chemicznych.
Pojemność cieplna	Ilość ciepła, którą wymienia układ podczas zmiany temperatury układu o jednostkę.

Ćwiczenie 4

Pomiar ciepła rozcieńczania i zobojętniania

Entalpię, czyli ciepło przemiany chemicznej bądź procesu fizykochemicznego można obliczyć posługując się prawem Hessa oraz znając standardowe substancji biorących udział w przemianie. Entalpie obliczone na podstawie prawa Hessa z ogólnej zależności odnoszą się do warunków standardowych ($p = 101,3 \text{ kPa}$, $T = 298 \text{ K}$):

$$\Delta H_r^0 = \sum_i (n_i H_{\text{tw}, \text{produkty}}^0) - \sum_i (n_i H_{\text{tw}, \text{substraty}}^0) \quad (1)$$

Aby obliczyć wartość entalpii w innej temperaturze niż standardowa należy skorzystać z prawa Kirchhoffa:

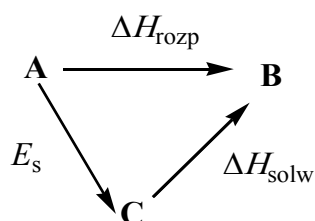
$$\Delta H_{r, T_2}^0 = \Delta H_{r, T_1}^0 + \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (2)$$

gdzie: $\Delta H_{r, T_1}^0$ i $\Delta H_{r, T_2}^0$ – zmiana standardowej entalpii reakcji w temperaturach T_1 i T_2 , ΔC_p – różnica pomiędzy ciepłami molowymi produktów i substratów z uwzględnieniem ich współczynników stechiometrycznych.

Warunkiem stosowalności prawa Kirchhoffa w tej postaci jest brak przemian fazowych wszystkich reagentów w rozpatrywanym zakresie temperatur ($298, T$), zapewniająca ciągłość funkcji $f(T) = C_{p(T)}$ w badanym obszarze. Ciepło molowe pod stałym ciśnieniem występujące w powyższej zależności to ilość ciepła potrzebna do ogrzania 1 mola substancji pod stałym ciśnieniem o 1 stopień. Ciepła molowe substancji zależą nieco od temperatury. Na ogół wyraża się je za pomocą zależności $C_p = a + bT + cT^2$, gdzie a , b i c to stałe empiryczne, określone dla wielu procesów warunkach standardowych. W uproszczeniu, dla niewielkich zmian temperatury, można uznać C_p za wartość stałą w rozpatrywanym przedziale temperatur.

Dział chemii fizycznej, zajmujący się badaniem ilościowym efektów cieplnych procesów chemicznych i fizycznych nazywany jest **termochemią**. Metody termochemiczne umożliwiają, między innymi, wyznaczanie ciepła procesów biegnących w fazie ciekłej – rozpuszczania, rozcieńczania czy zobojętniania. Jak wiadomo, podczas rozpuszczania większości substancji w rozpuszczalniku występują efekty cieplne. Niektóre substancje np. kwas siarkowy, wodorotlenek sodu czy etanol, tworząc roztwór z wodą, mniej lub bardziej ogrzewają układ. Z drugiej strony wiele soli nieorganicznych, np. chlorek lub bromek potasu czy azotan (V) srebra rozpuszczając się, pobierają ciepło z otoczenia – zatem tworzący się roztwór oziębia się. Źródłem wspomnianych efektów są procesy zachodzące podczas

destrukcji struktury substancji rozpuszczanej, a także procesy związane z tworzeniem się roztworu. Proces rozpuszczania krystalicznych substancji stałych można ująć za pomocą schematu przedstawionego na Rys. 1.



Rysunek 1. Schemat energetyczny procesu rozpuszczania. Oznaczenia: ΔH_{rop} – entalpia rozpuszczania, E_s – energia sieci krystalicznej, ΔH_{solw} – entalpia solwatacji.

Zgodnie ze nim proces rozpuszczania ($A \rightarrow B$) można rozdzielić na dwa etapy:

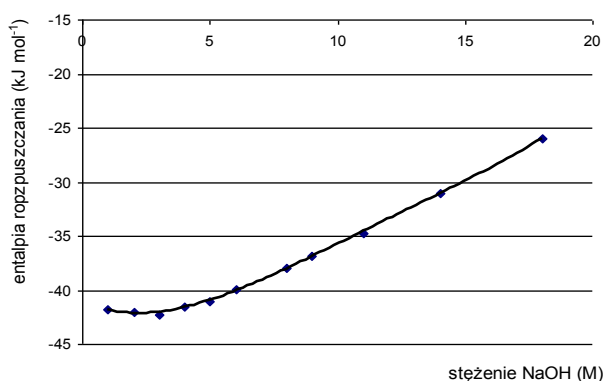
- (i) zniszczenie sieci krystalicznej przez przeniesienie cząsteczek lub jonów substancji krystalicznej do otoczenia ($A \rightarrow C$);
- (ii) przeniesienie tak powstałych cząstek do rozpuszczalnika i ich solwatacja z udziałem rozpuszczalnika ($C \rightarrow B$).

Na podstawie prawa Hessa entalpia rozpuszczania (ΔH_{rop}) równa jest sumie algebraicznej energii zniszczenia sieci krystalicznej (E_s) oraz entalpii solwatacji (ΔH_{solw}):

$$\Delta H_{\text{rop}} = E_s + \Delta H_{\text{solw}} \quad (3)$$

Efekt cieplny niszczenia sieci jest zawsze wielkością endoenergetyczną, natomiast proces solwatacji (hydratacji) przebiega z wydzielaniem energii (stabilizacja układu). Różnica tych wielkości decyduje, czy sumarycznie proces rozpuszczania jest egzo- czy endoenergetyczny.

Entalpia rozpuszczania danej substancji zależy również od jej stężenia w roztworze. Inny efekt cieplny towarzyszy rozpuszczaniu się substancji w czystym rozpuszczalniku, a inny w roztworze zawierającym różne stężenia tej substancji, jak pokazano poniżej dla przypadku rozpuszczania wodorotlenku sodu w wodzie (Rys. 2):



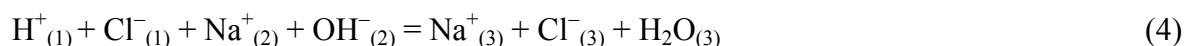
Rysunek 2. Zmiana całkowitej entalpii rozpuszczania wodorotlenku sodu w wodzie w zależności od stężenia powstającego roztworu.

Ciepło zobojętniania (entalpia neutralizacji, ΔH_N) to efekt cieplny procesu, w którym 1 mol jonów hydroniowych (zapisanych w uproszczeniu jako H^+) reaguje z 1 molem jonów

hydroksylowych OH^- w warunkach stałego stężenia indywiduów. Jeśli reakcja przebiega z udziałem mocnego kwasu i mocnej zasady, zarówno substraty, jak i powstająca sól są całkowicie zdysocjowane. Entalpia reakcji neutralizacji w takim przypadku jest w przybliżeniu równa (co do wartości bezwzględnej) entalpii dysocjacji wody np.:



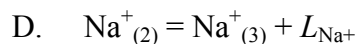
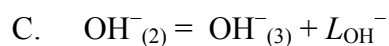
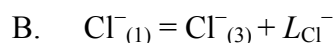
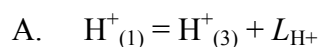
Założmy, że do roztworu HCl (indeksy 1) wprowadzamy roztwór NaOH (indeksy 2). W wyniku zobojętniania otrzymujemy wodny roztwór NaCl (indeksy 3). Reakcję sumaryczną można wówczas zapisać następująco:



Obserwowany efekt cieplny wynika z sumowania dwóch typów procesów: samej reakcji zobojętniania:

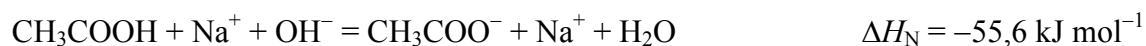


a także procesów rozcieńczania – to znaczy przeniesienia jonów z roztworów (1) i (2) do roztworu (3). Zatem, powyższą reakcję sumaryczną (5) można przedstawić formalnie jako sumę tych poszczególnych etapów:



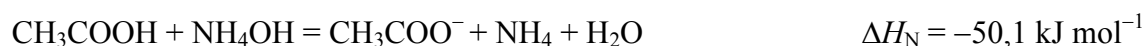
W powyższych równaniach symbole L_i oznaczają molowe ciepła rozcieńczania odpowiednich jonów. Sumaryczny Efekt cieplny procesów A+B i C+D nazywamy odpowiednio ciepłem rozcieńczania L_{HCl} i L_{NaOH} .

Z kolei, gdy w reakcji bierze udział słaby kwas, np. etanowy (octowy):



to w reakcji zobojętniania powstaje nieco mniej (55,6 kJ) energii w przeliczeniu na 1 mol wody w porównaniu do rozważanego wyżej przypadku. Wynika to z faktu, że podczas reakcji zobojętniania słabego kwasu część energii jest zużywana na proces dysocjacji słabego elektrolitu.

Jeszcze bardziej nasila się to zjawisko podczas neutralizacji słabego kwasu słabą zasadą:



Entalpie reakcji wyznacza się w urządzeniach zwanych **układami kalorymetrycznymi** lub po prostu kalorymetrami. Wszystkie układy kalorymetryczne zbudowane są z dwóch zasadniczych elementów: naczynia pomiarowego, w którym znajduje się układ stanowiący źródło ciepła – oraz ośrodka zewnętrznego (płaszcz wodny, osłona kalorymetru), pomiędzy którymi następuje wymiana ciepła. Efekty cieplne są mierzone w czasie rzeczywistym przez czułe termometry (np. termometr Beckmanna) a następnie – po uwzględnieniu odpowiednich poprawek – są wykorzystywane do obliczeń ciepła przemian chemicznych czy fizycznych. Parametrem, który jest charakterystyczny dla danego układu kalorymetrycznego jest współczynnik strat cieplnych G , który wyrażamy zależnością:

$$G = \frac{Q}{\Delta T} \quad (6)$$

gdzie Q jest ilością ciepła wymienionego pomiędzy naczyniem pomiarowym a ośrodkiem otaczającym, zaś ΔT – różnicą temperatur pomiędzy wspomnianymi wyżej częściami.

Ze względu na konstrukcję (sposób i wartość wymiany ciepła) układy kalorymetryczne ogólnie można podzielić na:

- **kalorymetry izotermiczne**, w których ciepło wydzielone w naczyniu pomiarowym jest natychmiast przekazane do osłony zewnętrznej układu. Tego typu układy charakteryzują się wysoką wartością współczynnika G , charakteryzującego efektywność wymiany ciepła między poszczególnymi częściami układu.
- **kalorymetry adiabatyczne**, w których nie zachodzi wymiana ciepła pomiędzy naczyniem pomiarowym a zewnętrzną osłoną kalorymetru ($\Delta T = 0$).
- **kalorymetry nieizotermiczne–nieadiabatyczne**, w których warunki prowadzenia pomiarów mogą się bardzo różnić, w zależności od wartości współczynnika strat cieplnych G .

Nieizotermiczno–nieadiabatyczne układy kalorymetryczne, zwane też **diatermicznymi** są najczęściej wykorzystywane w praktyce laboratoryjnej. W kalorymetrach tego typu ilość ciepła wydzielonego lub pochłoniętego określa się na podstawie obserwacji zmian temperatury w wewnętrznej części układu kalorymetrycznego. Właściwy pomiar efektów cieplnych rozpoczyna się po upływie pewnego czasu, pozwalającego na przejście od nieuporządkowanej wymiany ciepła do stanu uporządkowanego. Stan początkowy jest w dużym stopniu przypadkowy – szybkość zmian temperatury w poszczególnych punktach układu kalorymetrycznego jest zmienna. Po pewnym czasie wpływ tych przypadkowych nierówności pola temperatur stopniowo zanika i szybkość zmian temperatury w poszczególnych częściach układu kalorymetrycznego wyrównuje się, osiągając stan uporządkowany. Efekt cieplny w kalorymetrach diatermicznych określa się na podstawie

oznaczenia przyrostu temperatury w naczyniu kalorymetrycznym (ΔT) oraz obliczenia zmiany temperatury spowodowanej przez ciepło wymieniane w czasie pomiaru między naczyniem kalorymetrycznym a otoczeniem ($\Sigma \nu$). Druga składowa ma charakter **poprawki kalorymetrycznej** – pozwalającej przeliczyć obserwowany przyrost temperatury ΔT w warunkach wymiany ciepła z otoczeniem na taki, który nastąpiłby w warunkach adiabatycznych ($\Delta T + \Sigma \nu$). Wymiana ciepła pomiędzy poszczególnymi częściami układu kalorymetrycznego jest wynikiem złożenia kilku efektów: procesów przewodnictwa cieplnego, konwekcji oraz promieniowania. Dokładne określenie udziału każdego z tych rodzajów wymiany energii jest praktycznie niemożliwe, dlatego dla celów pomiarowych najczęściej określa się efekt sumaryczny. Wielkość obserwowanego efektu cieplnego (Q) obliczamy wówczas w podobny sposób, jak ma to miejsce w przypadku kalorymetru adiabatycznego:

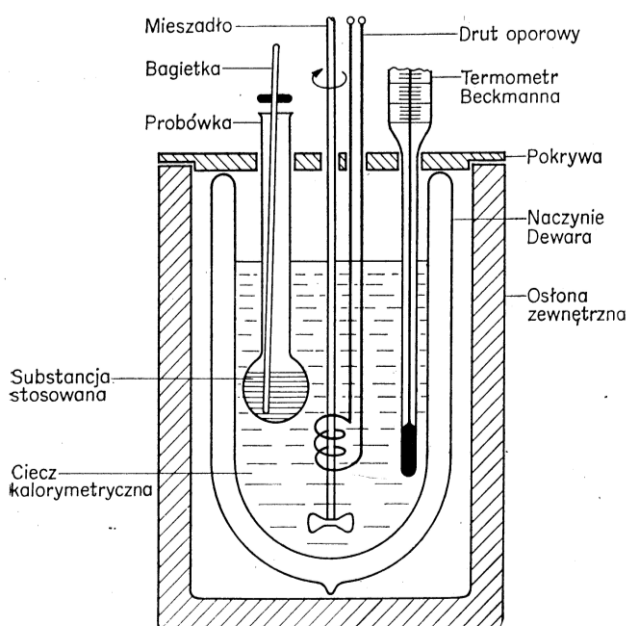
$$Q = K \times (\Delta T + \Sigma \nu) \quad (7)$$

gdzie K oznacza stałą kalorymetryczną [kJ K^{-1}].

Stała kalorymetryczna posiada sens pojemności cieplnej układu pomiarowego, wskazując ile ciepła jest potrzebne do podniesienia temperatury danego układu o 1 stopień. Wartość K wyznacza się przeprowadzając pomiar termochemiczny procesu o znanym efekcie cieplnym, w warunkach możliwie identycznych do tych dla procesu badanego. Można w tym celu wykorzystać tzw. **wzorce termochemiczne** – czyli substancje o precyzyjnie wyznaczonej entalpii spalania (dane dostępne są w tablicach). W celu określenia wartości liczbowej wyrażenia ($\Delta T + \Sigma \nu$) konieczne jest takie prowadzenie pomiaru kalorymetrycznego, które pozwala na sporządzenie obrazu graficznego lub tabelarycznego funkcji zmian temperatury od czasu. Poprawkę kalorymetryczną wyznacza się zwykle o wzory aproksymacyjne, możliwe jest też wyznaczenie jej w sposób numeryczny.

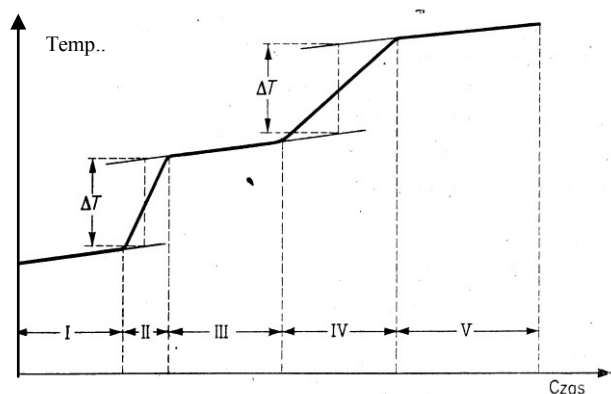
Przykładem diatermicznego układu kalorymetrycznego jest kalorymetr służący do oznaczania ciepła reakcji chemicznych zachodzących roztworach (nazywany też kalorymetrem zwykłym), stosowany w niniejszym ćwiczeniu i pokazany na Rys. 3.

Oslonę zewnętrzną kalorymetru stanowi naczynie Dewara (termos), który ma na celu zminimalizować wymianę ciepła między układem kalorymetrycznym a otoczeniem. Substraty badanej reakcji znajdują się początkowo w roztworze oraz w ampułce szklanej. Zapoczątkowanie reakcji następuje po zbiciu ampułki i wymieszaniu zawartości z cieczą kalorymetryczną. Utrzymanie równomiernego rozkładu temperatur w kalorymetrze oraz szybkie wymieszanie reagentów zapewnia mieszadło mechaniczne.



Rysunek 3. Schemat kalorymetru diatermicznego do wyznaczania ciepła reakcji biegnących w roztworach.

Zmiany temperatury obserwujemy za pomocą specjalnego, czułego termometru pracującego w wąskim zakresie temperatur (np. termometr Beckmanna). Przyrost temperatury (Δt) odczytuje się, sporządzając dla każdego eksperymentu wykres zwany **biegiem termometru** i wykreślając styczne jak to pokazano na Rys. 4.



Rysunek 4. Bieg termometru w czasie pomiarów kalorymetrycznych z elektryczną metodą wyznaczania pojemności cieplnej układu kalorymetrycznego.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest określenie ciepła (entalpii) rozcieńczania mocnego kwasu oraz entalpii zobojętnienia tego kwasu za pomocą mocnej zasady. Wszystkie pomiary wykonujemy w zestawie kalorymetrycznym, umożliwiającym śledzenie efektów cieplnych reakcji zachodzącymi w roztworach.

Aparatura: kalorymetr wyposażony w mieszadło magnetyczne i termometr z dokładnością odczytu $0,01^{\circ}\text{C}$), pipety, elektroniczna waga laboratoryjna (dokładność odczytu $0,0001\text{g}$), cylindry miarowe.

Wyznaczanie stałej kalorymetrycznej układu kalorymetrycznego napełnionego wodą.

Do naczynia Dewara wlewamy $0,6\text{ L}$ (600 mL) wody destylowanej, naczynie umieszczamy w płaszczu

zewnętrznym i zamykamy pokrywę. W jednym z otworów pokrywy umieszczamy sondę czułego termometru elektronicznego. Następnie do probówki wprowadzamy za pomocą pipety 7,5 mL stężonego kwasu (HCl lub H_2SO_4 – będzie on wykorzystywany w następnym punkcie), zamykamy ją korkiem i umieszczamy w pokrywie. Włączamy grzałkę elektryczną oraz mieszadło mechaniczne tak żeby nie dotykało naczynia Dewara. Pomiar rozpoczyna się po około 5 minutach od momentu włączenia mieszania, po osiągnięciu przez układ stabilizacji. Pomiar temperatury notujemy w odstępach 30-sekundowych. W czasie 11 pomiaru (zakończenie okresu wstępnego) włączamy prąd w obwodzie grzałki, notujemy wartość napięcia (U) oraz oporu grzałki (R), zapisując w dalszym ciągu przyrosty temperatury w odstępach 30-sekundowych. Po 5 minutach (zakończenie okresu głównego) wyłączamy grzałkę i zapisujemy wskazania temperatury przez dalsze 5 minut (okres końcowy). Wyniki zestawiamy w Tabeli 1 (poniżej).

Wyznaczanie ciepła rozcieńczania mocnego kwasu

Pracujemy w tym samym układzie pomiarowym, z tym że okres końcowy przyjmujemy teraz za początkowy. Po wykonaniu 10 pomiarów wstępnych, wprowadzamy do wody wybrany wcześniej kwas (HCl lub H_2SO_4), uderzając lekko w dno probówki z kwasem i powodując jej stłuczenie wewnątrz układu. Odczyty temperatury dokonujemy identycznie jak w punkcie 1 i odnotowujemy w tabeli pomiarów (Tab. 1).

Wyznaczanie stałej kalorymetrycznej układu kalorymetrycznego napełnionego zasadą

Naczynie Dewara napełniamy 600 cm^3 roztworu zasady sodowej lub potasowej o stężeniu 0,25 mol dm^{-3} . W probówce umieszczamy 7,5 cm^3 stężonego kwasu solnego lub siarkowego (VI). Postępując jak w punkcie 1 wyznaczamy pojemność cieplną układu kalorymetrycznego. Wyniki zestawiamy w Tab. 1.

Wyznaczanie ciepła zobojętniania mocnego kwasu

Naczynie Dewara napełniamy 600 mL roztworu wodorotlenku sodowego lub potasowego o stężeniu 0,25 M, po czym do probówki wprowadzamy 7,5 mL stężonego kwasu solnego lub siarkowego (VI). Temperaturę okresu końcowego z poprzednich pomiarów przyjmujemy za okres początkowy. Po zbitiu ampułki i wprowadzeniu kwasu do roztworu zasady rozpoczynamy pomiary temperatury w odstępach 30-sekundowych w okresie początkowym, głównym i końcowym (3×5 min.). Wyniki należy zebrać w Tabeli pomiarów (Tab. 1).

Tabela 1. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ciepła rozcieńczania i zobojętnienia mocnego kwasu zasadą.

L.p.	Stała kalorymetru (H_2O ; 0,25 M NaOH)		Ciepło rozcieńczania		Ciepło neutralizacji	
	$U =$	$I =$	HCl, H_2SO_4		NaOH + HCl, KOH + H_2SO_4	
	czas (min.)	temp. ($^{\circ}\text{C}$)	czas (min.)	temp. ($^{\circ}\text{C}$)	czas (min.)	temp. ($^{\circ}\text{C}$)
1.						
...						
10.						
...						
20.						
...						
30.						

Wykonanie sprawozdania

1. Dla wszystkich eksperymentów wykreślić krzywe zależności temperatury (T , K) w funkcji czasu (t): $T = f(t)$ (biegi termometru). Zaznaczyć graficznie (za pomocą stycznych

poprowadzonych w odpowiednich miejscach) okres początkowy, główny i końcowy. Szczególną uwagę należy zwrócić na punkty pomiędzy okresami głównym i końcowym – w wątpliwych przypadkach należy włączyć część pomiarów okresu końcowego do okresu głównego.

2. Obliczyć pojemność cieplną układu kalorymetrycznego napełnionego wodą destylowaną (K_{H_2O}) lub ługiem (K_{NaOH}), wykorzystując zależność (8):

$$K = \frac{U \times I \times t}{\Delta T + \sum \nu} \quad (8)$$

gdzie: U – napięcie w obwodzie grzałki (V); I – natężenie prądu w obwodzie grzałki (A); t – czas pracy grzałki (sek.); ΔT – przyrost temperatury w czasie pomiaru ($^{\circ}C$); $\sum \nu$ – poprawka na promieniowanie, obliczona na podstawie zależności:

$$\sum \nu = \nu_o + (n-1) \times \nu \quad (9)$$

gdzie: $\nu_o = \frac{T_o^1 - T_o^2}{n_o}$; $\nu = \frac{T_n^1 - T_n^2}{n_k}$; T_o^1 , T_o^2 – temperatury: początkowa i końcowa okresu początkowego;

T_n^1 , T_n^2 – temperatury: początkowa i końcowa okresu końcowego; n_o – liczba odczytów temperatury w okresie początkowym; n_k – liczba odczytów temperatury w okresie końcowym; n – liczba odczytów temperatury w okresie głównym.

3. Obliczyć za pomocą zależności (10) ciepło rozcieńczania mocnego kwasu ($Q_{roz.}$):

$$Q_{roz.} = \frac{-K_{H_2O} \times (\Delta T + \sum \nu)}{n_{kw}} \quad (10)$$

gdzie: K_{H_2O} – pojemność cieplna układu kalorymetrycznego napełnionego wodą ($kJ\ K^{-1}$); ΔT – przyrost temperatury w czasie pomiaru ($^{\circ}C$); $\sum \nu$ – poprawka na promieniowanie, obliczona na podstawie wzoru podanego powyżej; n_{kw} – liczba moli kwasu użyta w doświadczeniu.

4. W podobny sposób obliczyć ciepło reakcji mocnego kwasu z zasadą. W tym celu wykorzystać zależność (10), podstawiając odpowiednie przyrosty temperatury, ilości moli użytego kwasu w eksperymencie oraz pojemność cieplną układu napełnionego ługiem (K_{NaOH}).

5. Porównać otrzymane wartości ciepła rozcieńczania i zobojętniania badanego kwasu z danymi dostępnymi w literaturze i na tej podstawie obliczyć względny błąd procentowy wyznaczania poszczególnych ciepł.

6. Przeprowadzić dyskusję otrzymanych wyników, zwracając uwagę na źródła i wielkość błędów, założenia upraszczające metody oraz jej przydatność. Określić kierunek przepływu ciepła i znak entalpii.

Zakres wymaganych wiadomości:

Pierwsza zasada termodynamiki; podstawowe funkcje termodynamiczne; prawa termochemiczne: Hessa, prawo Kirchhoffa; typy układów termodynamicznych: otwarty, zamknięty, izolowany; ciepło reakcji chemicznej; ciepło zobojętniania, rozcieńczania, rozpuszczania, hydratacji; stała kalorymetryczna i jej wyznaczenie; ciepło molowe; pojemność cieplna; typy kalorymetrów.

Pozycje wykazu literatury: 1, 5, 6, 9

Słowniczek

Entalpia rozpuszczania	Suma algebraiczna energii zniszczenia sieci krystalicznej oraz entalpii solwatacji powstających indywiduów chemicznych (jonów).
Entalpia neutralizacji	Entalpia reakcji pomiędzy kwasem i zasadą w roztworze wodnym równa, co do wartości bezwzględnej, entalpii dysocjacji wody.
Kalorymetria	Dział termochemii, dotyczący metod pomiaru ilości ciepła wydzielanego lub pochłanianego podczas procesów fizycznych lub chemicznych.
Pojemność cieplna	Ilość ciepła, którą wymienia układ podczas zmiany temperatury układu o jednostkę.
Stała kalorymetryczna	Wartość charakteryzująca układ pomiarowy, podawana w kJ K^{-1} , mówiąca ile ciepła jest potrzebne do podniesienia temperatury danego układu kalorymetrycznego o 1 stopień Kelvina.
Termochemia	Dział termodynamiki chemicznej zajmujący się badaniem efektów cieplnych, towarzyszących procesom chemicznym i fizycznym.

KINETYKA CHEMICZA

Ćwiczenie 5

Wyznaczanie energii aktywacji reakcji zmydlania estru

Pomiar szybkości reakcji i określanie czynników na nią wpływających stanowią elementy badań mechanizmów reakcji oraz reaktywności chemicznej.

Szybkość reakcji. Jeżeli związek A przekształca się w związek B, i jeżeli przemiana ta jest dostatecznie powolna, to stężenia A i B mogą być mierzone w dowolnej chwili. Jeżeli stężenie A równe jest c_t w momencie t i zmniejsza się o Δc_t (stężenie związku B zwiększa się o Δc_t) w odstępie czasu Δt , to średnia szybkość reakcji w tym odstępie czasu równa jest ilorazowi $\Delta c_t / \Delta t$. Granica tego stosunku, gdy t dąży do 0, wyznacza rzeczywistą szybkość reakcji w momencie t . Jeśli stężenie c_t dla składnika A zmienia się jako funkcja czasu zgodnie z równaniem $c_t = f(t)$, to szybkość przemiany A w B (v) zmienia się tak, jak pochodna funkcji:

$$v = \frac{dc_t}{dt} = f'(t) \quad (1)$$

gdzie: c_t oznacza aktualne stężenie substratu (produktu) po czasie t .

Rząd reakcji. Jeżeli stwierdzi się doświadczalnie, że szybkość reakcji, której równanie stechiometryczne: $a A + b B + \dots = c C$, jest związana ze stężeniami substratów A, B wyrażeniem: $v = k \times [A]^m \times [B]^n \dots$, to sumę wykładników potęg $m + n + \dots$ itd nazywamy **całkowitym rzędem reakcji**. Wykładniki potęg m, n nie muszą być równe współczynnikom stechiometrycznym $a, b \dots$ itd., których suma jest określana, w przeciwieństwie do rzędu doświadczalnego, **teoretycznym rzędem reakcji**. Porównanie doświadczalnego rzędu reakcji z jej rzędem teoretycznym przynosi informacje dotyczące mechanizmu danej przemiany. Jeżeli reakcja biegnie wieloetapowo, a szybkości kolejnych etapów różnią się znacząco, to zwykle teoretyczny rząd reakcji różni się od rzeczywistego.

Cząstkowy rząd reakcji. Jeżeli szybkość reakcji jest proporcjonalna do potęgi m dla reagenta A i do potęgi n dla reagenta B, to mówi się, że reakcja jest rzędu cząstkowego m w stosunku do A i rzędu cząstkowego n w stosunku do B.

Określanie rzędu reakcji. Metody oznaczania rzędu reakcji po raz pierwszy opracował van't Hoff. Jeżeli szybkość jakiegokolwiek reakcji można wyrazić równaniem typu:

$$v = \frac{dc_t}{dt} = k(c_0 - c_t) \quad (2)$$

gdzie k jest stałą szybkości, charakterystyczną dla danej reakcji w danej temperaturze, c_0 – początkowym

stężeniem jednego z reagentów, a c_t – jego stężeniem w czasie t

to reakcja jest reakcją pierwszego rzędu, ponieważ wykładnik potęgowy dla wyrażenia na stężenie jest równy jedności. Całkując równanie (2) otrzymujemy zależności (3) i (3'):

$$\ln \frac{c_0}{c_0 - c_t} = kt \quad (3) \quad \text{lub:} \quad 2,303 \log \frac{c_0}{c_0 - c_t} = kt \quad (3')$$

W praktyce dokonuje się pomiarów stężeń reagenta w określonych odstępach czasu i uzyskane wartości ($c_0 - c_x$) dla różnych wartości t podstawia się do jednego z powyższych równań ((3) lub (3')). Jeżeli dla zależności $\log (c_0/c_0 - c_t)$ od t otrzymuje się zależność liniową, to można wnioskować, że reakcja jest **pierwszego rzędu kinetycznego**.

Podobnie, jeżeli szybkość reakcji jest wyrażona równaniem:

$$v = \frac{dc_x}{dt} = k(c_0 - c_t)^2 \quad (4)$$

to reakcja jest **drugiego rzędu kinetycznego**.

Na przykład dla przemiany typu $A + B = C$ równanie kinetyczne drugiego rzędu będzie wyglądać następująco:

$$v = \frac{dc_x}{dt} = k(c_{A0} - c_t) \times (c_{B0} - c_t) \quad (5)$$

gdzie c_{A0} i c_{B0} to początkowe stężenia substratów A i B, odpowiednio.

Po scałkowaniu otrzymuje się:

$$k = \frac{1}{(c_{A0} - c_{B0})t} \times \ln \frac{c_{B0}(c_{A0} - c_t)}{c_{A0}(c_{B0} - c_t)} \quad (6); \quad 2,303 \log \frac{c_{B0}(c_{A0} - c_t)}{c_{A0}(c_{B0} - c_t)} = k(c_{A0} - c_{B0}) \times t \quad (6')$$

Tak więc, jeżeli wykreśli się zależność $2,303 \log \frac{c_{B0}(c_{A0} - c_t)}{c_{A0}(c_{B0} - c_t)}$ od czasu t i otrzyma linię prostą, to oznacza, że reakcja przebiega według drugiego rzędu kinetycznego. Podobnie, jeśli szybkość reakcji jest wyrażona ogólnym równaniem: $v = \frac{dc_x}{dt} = k(c_0 - c_t)^3$, to reakcja jest trzeciego rzędu. Rzędów reakcji wyższych od 3 nie obserwuje się. Ogólnie, całkowity rząd reakcji odpowiada zatem maksymalnemu wykładnikowi potęgi dla c_t występującego w równaniu (inaczej: stopniowi równania kinetycznego).

Zależność między rzędem reakcji i jej mechanizmem nie zawsze jest oczywista – szczególnie w przypadku reakcji złożonych, których mechanizm zawiera wiele etapów. Jednym z powodów jest, fakt, że rząd reakcji może zmieniać się w zależności od warunków doświadczenia. Pamiętać też trzeba, że zapis przebiegu procesu chemicznego równaniem jest zwykle uproszczeniem i nie bierze pod uwagę wszystkich etapów pośrednich.

Dla reakcji prostych, zachodzących w jednym etapie, nazywanych elementarnymi, pomiar rzędu reakcji pozwala wyznaczyć **cząsteczkowość** reakcji elementarnej – to jest liczbę indywiduów, których równoczesne spotkanie jest niezbędne do tego, by proces mógł zajść. Istnieje oczywiście możliwość, że rząd reakcji jest tożsamy z cząsteczkowością reakcji.

Procesy elementarne są to w większości procesy jedno- i dwucząsteczkowe. Procesy trójcząsteczkowe typu $A + B + C = D$ spotyka się rzadko – prawdopodobieństwo równoczesnego spotkania trzech różnych cząstek chemicznych A, B i C jest bowiem niewielkie (porównaj: kinetyczna teoria gazów). W przypadku złożonych przemian, które można na ogół sprowadzić do następujących po sobie procesów jedno- bądź dwucząsteczkowych, określenie rzędu reakcji może dostarczyć informacji o etapie najwolniejszym. Na przykład dla reakcji typu $A + B = C$ przypuśćmy, że biegnie ona w dwóch etapach, z których pierwszy jest jednocząsteczkowy, a drugi dwucząsteczkowy:

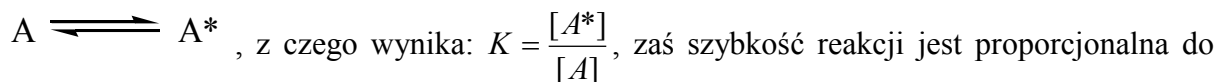


Rząd takiej reakcji będzie zależał od względnych szybkości każdego z etapów. Jeżeli etap 1 jest znacznie wolniejszy niż etap 2 ($k' \ll k''$), to wypadkowa szybkość reakcji będzie określana w przybliżeniu szybkością etapu 1 i w rezultacie reakcja będzie biegła według pierwszego rzędu kinetycznego zgodnie z zapisem: $v = k'[A]$. Szybkość, z jaką produkt przejściowy A' łączy się z B, jest tak duża w porównaniu z szybkością jego powstawania, że zmiany stężenia B w czasie reakcji wywierają na całkowitą szybkość reakcji pomijalny wpływ. Z drugiej strony, jeżeli etap 2 będzie najwolniejszy, to reakcja będzie w przybliżeniu drugiego rzędu kinetycznego (gdy nie ma dużego nadmiaru B). W tym przypadku szybkość tworzenia produktu końcowego będzie zależała zarówno od stężenia B jak i od stężenia produktu przejściowego A'. Stąd wynika równanie kinetyczne: $v = k''[A'] \times [B] \cong k[A] \times [B]$. Interpretacja równania kinetycznego pozwala często nie tylko określić, która z reakcji elementarnych stanowi etap najwolniejszy, lecz również stwierdzić, jaka jest kolejność następowania po sobie kolejnych etapów.

Aspekty energetyczne reakcji chemicznych. Równanie Arrheniusa.

Pierwszą interpretację faktu, że szybkość reakcji wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, podał w roku 1889 Svante Arrhenius, który na podstawie teorii kinetycznej gazów wywnioskował, że nie wszystkie zderzenia między cząsteczkami są skuteczne

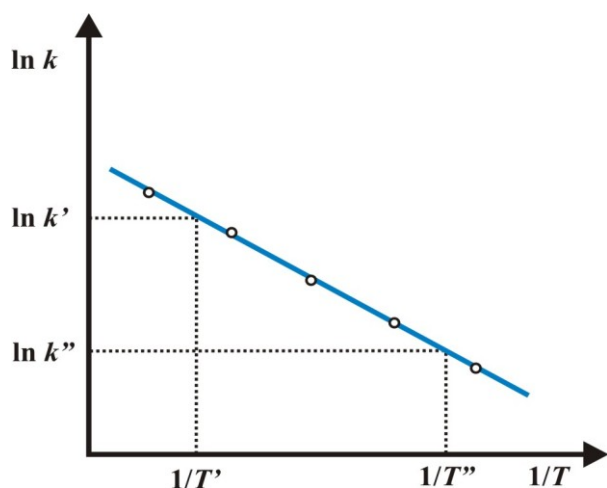
i powodują reakcję – w przeciwnym bowiem razie reakcje organiczne powinny być o wiele szybsze, niż to jest w rzeczywistości. Na podstawie tego faktu Arrhenius przyjął, że reagują jedynie cząsteczki, które zaabsorbowały pewną ilość energii (ciepła). Przyjął on, że cząsteczki aktywne A^* znajdują się w równowadze z cząsteczkami nieaktywnymi A :



liczby aktywnych cząsteczek: $v = C \times [A^*] = C \times K \times [A]$. Przyjmując dla stałej równowagi K klasyczne zależności termodynamiczne, Arrhenius wyprowadził znane równanie, wiążące stałą szybkości k z temperaturą:

$$k = A \times e^{-E_A / RT} \quad (7)$$

W powyższym równaniu E_A oznacza **energię aktywacji** – czyli energię, jaką cząsteczka powinna zaabsorbować, żeby stać się aktywną; wielkość tak przedstawiona jest charakterystyczna dla danej reakcji w danych warunkach; T , R i e oznaczają odpowiednio temperaturę absolutną (w Kelvinach), uniwersalną stałą dla gazów doskonałych i podstawę logarytmu naturalnego, zaś A jest stałą charakterystyczną dla danej reakcji (czynniki przedwykładniczy). Empiryczne prawo Arrheniusa pozwala z dobrym przybliżeniem określać energię aktywacji wielu typowych reakcji. Do tego celu wystarczy oznaczyć stałą k w kilku różnych temperaturach i wykreślić prostą jak przedstawiono na Rys. 1:



Rysunek 1. Graficzna postać równania Arrheniusa

Współczynnik nachylenia tej prostej ($\text{tg} \alpha$) równy jest $-E_A/R$, z czego można wyznaczyć wartość energii aktywacji procesu: $E_A = -R \times \text{tg} \alpha$.

Dwa zasadnicze punkty teorii zderzeń aktywnych, która w rozszerzonej formie jest uznawana do chwili obecnej można streścić następująco:

- Aktywacja cząsteczki jest wynikiem przemiany energii kinetycznej zderzeń między cząsteczkami w wewnętrzną energię potencjalną, która jest energią rotacji i oscylacji atomów;

- Aby reakcja mogła dojść do skutku, cząsteczki nie tylko muszą nabyć pewną ilość energii wskutek zderzeń; konieczne jest także, aby wchodząc w interakcję posiadały **określoną orientację**. Taki sposób rozpatrywania reakcji doprowadził do utożsamiania stałej A z równania Arrheniusa z czynnikiem, zwanym **częstotliwością**, który jest równy całkowitej liczbie zderzeń Z (na cm^3 i sekundę), pomnożonej przez parametr P , który zależy przede wszystkim od struktury geometrycznej cząsteczek i stąd jego nazwa – **współczynnik steryczny**:

$$A = P \times Z, \quad \text{skąd:} \quad k = P \times Z \times e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (8)$$

Przy czym liczba zderzeń Z jest proporcjonalna do $\sqrt{T}$.

W bardziej zaawansowanych badaniach teoria zderzeń ustąpiła miejsca kwantowym koncepcjom aktywacji i aktu reakcyjnego. Według nich wiązania, które powstają, albo które się rozrywają podczas reakcji, są częściowo tworzone lub rozrywane w **stanie przejściowym**, pojawiającym się pomiędzy stanem początkowym i końcowym. Stan przejściowy, nazywany również **kompleksem aktywnym** przemiany chemicznej, ma określoną budowę elektronową i geometryczną – taką, że przejście poprzez kompleks aktywny jest najkorzystniejszą energetycznie drogą przekształcenia stanu początkowego w końcowy. Energia niezbędna do takiego przegrupowania atomów i elektronów, aby utworzył się stan przejściowy (kompleks aktywny), jest rozumiana jako energia aktywacji reakcji. Koncepcje te stanowią podstawę **teorii stanu przejściowego**, nazywaną też **teorią szybkości absolutnych** – otwiera ona bowiem drogę do teoretycznych obliczeń stałych szybkości reakcji. Dzięki tej teorii, którą ugruntowali Eyring i Polanyi, stała szybkości może być powiązana z wielkościami termodynamicznymi, charakteryzującymi równowagę między stanem początkowym i stanem przejściowym:

$$k = C \times T \times e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (9)$$

gdzie $\Delta G^\ddagger$, jest zmianą energii swobodnej stanu przejściowego ($\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$), zaś stała C jest ilorazem stałej Boltzmanna (k_B) i stałej Plancka (h): $C = \frac{k_B}{h}$.

Podsumowując teorię stanu przejściowego, stała szybkości reakcji w danej temperaturze zależy od następujących czynników:

- Różnicy między całkowitymi entalpiami (energiami) stanu przejściowego i stanu początkowego (czynnik ten odpowiada energii aktywacji E_A z równania Arrheniusa);
- Różnicy między entropiami dwóch stanów, tzn. entropii aktywacji (czynnik ten występuje w parametrach A i P teorii zderzeń aktywnych. ΔH^* reakcji zależy przede wszystkim od

budowy elektronowej i od konfiguracji przestrzennej (czynniki steryczne), zaś entropia aktywacji ΔS^* – przede wszystkim od budowy przestrzennej reagujących cząsteczek. Im sztywniejsza jest struktura molekularna, tym mniejsza jest jej entropia i odwrotnie. W przypadku więc, gdy struktura stanu przejściowego jest sztywniejsza niż struktura substratów, entropia aktywacji jest ujemna ($\Delta S^* < 0$). Z drugiej strony – jeżeli struktura stanu przejściowego jest mniej sztywna niż struktura stanu początkowego, entropia aktywacji jest dodatnia ($\Delta S^* > 0$).

Teoria stanu przejściowego pozwala na interpretację oraz przewidywanie reaktywności chemicznej. Wyniki badań struktury stanu przejściowego i porównanie struktur stanu początkowego i stanu przejściowego pozwalają na zinterpretowanie i przewidywanie wpływu czynników elektronowych i sterycznych na szybkość reakcji.

Badana w niniejszym ćwiczeniu hydroliza zasadowa estru (zmydlanie) jest procesem wieloetapowym. W przypadku octanu etylu sumaryczny przebieg reakcji jest następujący:



Proces ten przebiega według drugiego rzędu kinetycznego. Stałe szybkości reakcji można wyznaczyć z poniższej zależności, stanowiącej zlienaryzowaną postać równania kinetycznego, zapisanego dla tego przypadku:

$$k = \frac{2,303}{(c_z^0 - c_{es}^0) \times t} \times \lg \frac{c_{es}^0 (c_z^0 - c_t)}{c_z^0 (c_{es}^0 - c_t)}$$

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodami pomiaru szybkości reakcji drugiego rzędu oraz wyznaczenie eksperymentalne stałych szybkości hydrolizy zasadowej (zmydlania) estru – octanu etylu. Przeprowadzając eksperyment w różnych temperaturach, możliwe jest, posługując się teorią Arrheniusa, oszacowanie wartości energii aktywacji tej reakcji.

Szybkość reakcji zmydlania zależy od aktualnych stężeń estru i zasady (drugi rząd kinetyczny). Przebieg reakcji można śledzić, wyznaczając stężenie jonów wodorotlenowych w wybranych odstępach czasu odpowiednio dobraną metodą pomiaru. W niniejszym ćwiczeniu aktualne stężenie jonów wodorotlenowych wyznaczamy w drodze pomiarów przewodnictwa mieszaniny reakcyjnej (konduktometrycznie). Wielkości występujące w równaniu (6) i (6') można zastąpić odpowiednimi wartościami przewodnictwa.

1. W trzech kolb miarowych o pojemności 50 cm³ przygotować 0,10 i 0,05 M roztwory NaOH oraz 0,1 M roztwór octanu etylu (CH₃CO₂C₂H₅, $d = 0,8947 \text{ g mol}^{-1}$, masa molowa = 88,10 g mol⁻¹). Kolbki z roztworami

umieszczamy w termostacie nastawionym na około 20°C (zrobić dokładny odczyt z sondy temperaturowej zanurzonej w naczynku konduktometrycznym).

2. Wprowadzić do naczynka konduktometrycznego 0,05 M roztwór NaOH, odczekać chwilę do ustalenia się temperatury w naczynku pomiarowym i zmierzyć przewodnictwo zasady. Odczytana wartość jest równa przewodnictwu roztworu reagującego dla czasu początkowego (S^0 , $t = 0$).

3. Po wykonaniu wstępnego pomiaru sporządzić mieszaninę reakcyjną, zlewając w zlewce termostatowane 0,1 M roztwory zasady i estru (50 ml/50 ml). W momencie zlania obu roztworów włączyć stoper i rozpocząć pomiar czasu trwania reakcji. Część tak otrzymanego roztworu wlać do czystego naczynka konduktometrycznego i zmierzyć przewodnictwo roztworu (G , w [mS] lub [μ S]) w krótkich odstępach czasu (po 2, 4, 6,... i 20 minutach – Tab. 1 poniżej). Pozostałą część roztworu wlać do kolbki okrągłodennej o poj. 100 ml i ogrzewać w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez około 1 godzinę. W temperaturze wrzenia roztworu reakcja przebiega praktycznie do końca. Po przerwaniu ogrzewania ochłodzić roztwór pod bieżącą wodą i odstawić na bok do czasu zakończenia pomiarów kinetycznych.

4. Po pierwszej serii pomiarów sporządzić nowe roztwory zasady i estru o identycznych stężeniach i powtórzyć pomiary, podwyższając temperaturę pomiarów do około 30°C (dokładny odczyt z termometru), wykonując taka samą jak poprzednio liczbę pomiarów.

5. Po zakończeniu obu serii pomiarów kinetycznych wprowadzić do naczynka roztwór ogrzewany pod chłodnicą, poczekać na ustabilizowanie się temperatury i dokonać pojedynczych odczytów przewodnictwa w 30°, następnie, po ochłodzeniu łaźni – w 20°C, uzyskując w ten sposób końcową wartość przewodnictwa badanych roztworów w obu temperaturach. Po zakończeniu pomiarów zanotować dokładną wartość stałej oporowej sondy konduktometrycznej – odczytać z opakowania danego egzemplarza ($k_s \approx 100 \text{ m}^{-1} = 1 \text{ cm}^{-1}$).

Wyniki pomiarów zestawień w tabeli wyników (wzór poniżej).

Tabela 1. Wyniki pomiarów przewodnictwa układów reakcyjnych, w których zachodzi zasadowa hydroliza estru.

Temp. pomiaru (°C)	t [min]	S_t [mS]	χ_t [S/cm]	c_t [M]	$\log \frac{c_{es}^0 (c_z^0 - c_x)}{c_z^0 (c_{es}^0 - c_x)}$	k [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]
20°C	0,5					
	2,0					
	4,0					
	...					
	20					
	$S^0 = \dots \text{mS}; S_\infty = \dots \text{mS}; c_z^0 = \dots \text{M}; c_{es}^0 = \dots \text{M}$					$k_{sr}(20) = \dots (\pm \dots)$
30°C	0,5					
	2,0					
	4,0					
	...					
	20					
	$S^0 = \dots \text{mS}; S_\infty = \dots \text{mS}; c_z^0 = \dots \text{M}; c_{es}^0 = \dots \text{M}$					$k_{sr}(30) = \dots (\pm \dots)$

Wykonanie sprawozdania

1. Wyznaczamy wartości przewodnictw właściwych (χ^0 – początkowe; χ_t – po czasie t ; χ_∞ – końcowe [$1 \text{ mS cm}^{-1} = 0,1 \text{ S m}^{-1}$] za pomocą równań:

$$\chi^0 = k_s \times S^0; \quad \chi_t = k_s \times S_t; \quad \chi_\infty = k_s \times S_\infty \quad (11)$$

biorąc pod uwagę zmierzone przewodnictwo roztworów – na początku reakcji ($t = 0$; 0,05 M NaOH), w kolejnych czasach t oraz przewodnictwo po ustaleniu się równowagi reakcji ($t = \infty$). Sporządzić dla badanych temperatur wykresy zmian przewodnictwa właściwego (χ_t) w czasie t .

2. Wartości stężeń występujących w równaniu kinetycznym obliczamy na podstawie wyników pomiarów przewodnictw roztworów. W momencie rozpoczęcia reakcji przewodnictwo roztworu jest związane jedynie z przewodnictwem zasady:

$$\chi^0 = c^0_z \times (\lambda_{Na^+} + \lambda_{OH^-}) = c^0_z \times \lambda_{NaOH} \quad (12)$$

Przewodnictwo molowe 0,05 M roztworu NaOH (λ_{NaOH}) wyraża wzór empiryczny wynikający z kalibracji układu pomiarowego:

$$\lambda_{NaOH} = 190 \times [1 + 0,019(t - 18)] \quad [\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}] \quad (13)$$

gdzie t jest temperaturą pomiaru wyrażoną w $^\circ\text{C}$.

Biorąc pod uwagę dwa powyższe równania uzyskujemy wzór na wyznaczenie stężenia początkowego NaOH metodą konduktometryczną:

$$c^0_z = \frac{\chi^0}{190 \times [1 + 0,019 \times (t - 18)]} \quad [\text{M}] \quad (14)$$

Należy wyznaczyć w ten sposób dokładne stężenie początkowe zasady w obu temperaturach (*sprawdzić jednostki!*)

3. Stężenie zasady (jonów OH^-) w danym momencie reakcji wyraża się zależnością:

$$c_t = \frac{(\chi^0 - \chi_t)}{\lambda_{OH^-} - \lambda_{Ac^-}} \quad [\text{M}] \quad (15)$$

gdzie χ_t – przewodnictwo właściwe w danym momencie reakcji, λ_{Ac^-} – przewodnictwo molowe jonów octanowych.

Wartość mianownika (różnicy $\lambda_{OH^-} - \lambda_{Ac^-}$) jest stała w toku reakcji i można ją wyznaczyć za pomocą równania empirycznego:

$$139 \times (1 + 0,0165 \times (t - 18)) \quad [\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}] \quad (16)$$

Biorąc pod uwagę dwie powyższe zależności, należy obliczyć stężenia c_x dla kolejnych czasów reakcji i zamieścić je w tabeli wyników.

4. Ponieważ początkowe stężenie estru wynosi tyle, ile stężenie jonów octanowych po

zakończeniu reakcji, to z p. 3 wynika, że stężenie początkowe estru wyznaczone konduktometrycznie wyniesie:

$$c_{es}^0 = \frac{\chi^0 - \chi_{\infty}}{139 \times [(1 + 0,0165 \times (t - 18))]} \text{ [M]} \quad (17)$$

Należy obliczyć te wartości dla obu temperatur i wyniki umieścić w tabeli.

5. Podstawiając do równania (10) wartości t , c^0 i c_{es} obliczyć II-rzędową stałą szybkości reakcji w każdej z temperatur. Należy wyznaczyć stałe szybkości dla poszczególnych pomiarów, a z nich znaleźć średnią wartość stałej w danej temperaturze i wpisać do tabeli pomiarów wraz z odchyleniem standardowym.

6. Sporządzić dla obu serii pomiarowych wykresy zależności:

$$\lg \frac{c_{es}^0 (c_z^0 - c_t)}{c_z^0 (c_{es}^0 - c_t)} = f(t) \quad (18)$$

Zastosować metodę najmniejszych kwadratów do wykreślenia prostych i obliczenia współczynnika kierunkowego; z wartości tego współczynnika wyznaczyć wartości $k(20)$ i $k(30)$ metodą graficzną (wskazówka: przekształć równanie (10) do postaci liniowej, gdzie

$$y = \lg \frac{c_{es}^0 (c_z^0 - c_t)}{c_z^0 (c_{es}^0 - c_t)}, \text{ zaś } x = t.$$

7. Obliczyć współczynnik temperaturowy reakcji, czyli stosunku stałej szybkości w temperaturze $T+10$ K do stałej szybkości w temperaturze T K, korzystając z równania:

$$\alpha = \frac{k_{T+10^\circ}}{k_T} \quad (19)$$

8. Stosując zlogarytmowane równanie Arrheniusa zapisane dla dwóch temperatur T_1 i T_2 , wyznaczyć energię aktywacji zmydlania estru z zależności (19):

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_A}{R} \times \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (20)$$

Gdzie k_1 i k_2 oznaczają stałe szybkości wyznaczone w dwóch temperaturach ($k_2 > k_1$), E_A – energię aktywacji [kJ mol^{-1}], R – stałą gazową, T_2 , T_1 – temperaturę w kelwinach ($T_2 > T_1$).

9. Sporządzić wykres zależności $\lg k = f(T^{-1})$ i na podstawie tego wykresu wyznaczyć wartość energii aktywacji. Porównać uzyskany wynik z wartością tablicową, która dla zmydlania octanu etylu wynosi $59,50 \text{ kJ mol}^{-1}$; skomentować uzyskany wynik i obliczyć średni błąd procentowy.

Zakres wymaganych wiadomości

Szybkość i stała szybkości reakcji; rząd i cząsteczkowość reakcji; podstawowe metody wyznaczania rzędu reakcji; przykłady reakcji różnych rzędów kinetycznych, teoria zderzeń aktywnych i teoria kompleksu aktywnego; równanie Arrheniusa; metody wyznaczania energii aktywacji; kataliza; pojęcie przewodnictwa roztworów i jego pomiar; hydroliza zasadowa estrów.

Pozycje wykazu literatury: 1–8

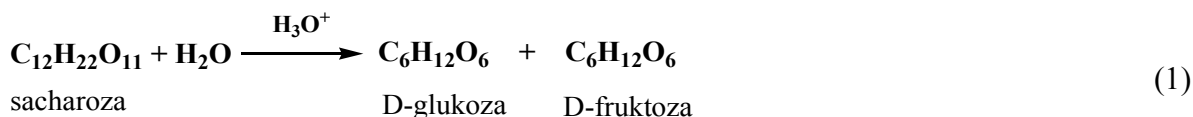
Słowniczek

Energia aktywacji	Minimalna energia, którą musi otrzymać zespół cząsteczek substratu, by wejść w reakcję chemiczną. Niższa wartość energii aktywacji oznacza szybszy przebieg reakcji.
Przybliżenie stanu stacjonarnego	Inaczej przybliżenie Bodensteina – założenie upraszczające rozwiązywanie równań kinetycznych. Zakłada, że stężenie produktów pośrednich w reakcjach następnych jest stałe i pomijalnie małe w porównaniu do stężeń substratów i produktów.
Całkowity rząd kinetyczny	Suma wykładników potęgowych, w jakich występują stężenia reagentów w równaniu kinetycznym. R. k. odzwierciedla liczbę indywiduów chemicznych, zmieniających stężenia w czasie przebiegu reakcji.
Stała szybkości	Stała proporcjonalności w równaniu kinetycznym przemiany chemicznej. Wielkość charakterystyczna dla danej reakcji chemicznej, zależna od temperatury.
Teoria kompleksu aktywnego	Teoria sformułowana w 1935 przez M. Polanyiego, C. Hinshelwooda i H. Eyringa, zakładająca istnienie stanu przejściowego reakcji, zwanego kompleksem aktywnym (AB^*) oraz równowagi termodynamicznej pomiędzy nim i reagentami.

Ćwiczenie 6

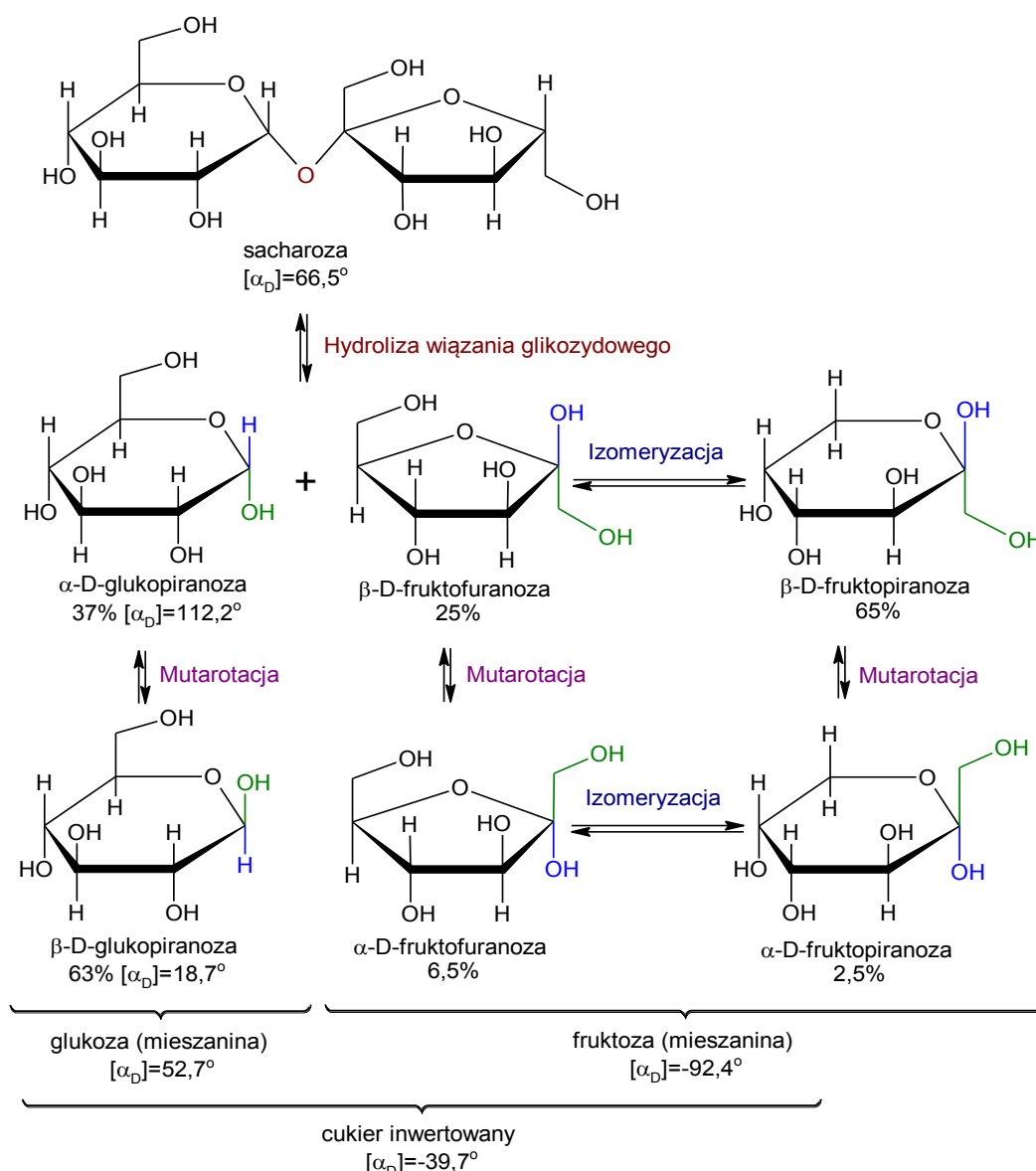
Badanie wpływu kwasu na kinetykę inwersji sacharozy

Sacharoza jest disacharydem zbudowanym z D-glukozy i D-fruktozy. Bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie i powoli rozpada się w niej w procesach nazywanych ogólnie **inwersją**. W ich wyniku których powstaje tzw. cukier inwertowany – mieszanina glukozy i fruktozy, główny składnik miodu:



Wszystkie reagenty biorące udział w reakcji są związkami **optycznie czynnymi**. W miarę postępu reakcji ubywa sacharozy – która skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo, zaś przybywa mieszaniny glukozy i fruktozy – które skręcają tę płaszczyznę w lewo. W efekcie następuje zmiana (inwersja właśnie) znaku kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego α . Zmiana kierunku skręcania płaszczyzny polaryzacji cukru wynika z faktu, że fruktoza skręca płaszczyznę w lewo o kąt większy niż prawoskrętna glukoza.

W istocie inwersja sacharozy nie jest procesem prostym, jak to sugeruje powyższy zapis stechiometryczny procesu. Stanowi ona przykład wieloetapowej przemiany chemicznej z utworzeniem szeregu produktów pośrednich, z których najważniejsze przedstawiono poniżej (Rys. 1). W pierwszym etapie zachodzi katalizowana jonami hydroniowymi (H_3O^+) hydroliza wiązania glikozydowego. W wyniku tego procesu z sacharozy powstaje mieszanina zawierająca cukry proste sześć- i pięciocząłowe: α -D-glukopiranozę oraz β -D-fruktofuranozę, zaś skręcalność sumaryczna układu zmniejsza się od wartości $66,5^\circ$ (roztwór czystej sacharozy) do około $56,7^\circ$ – głównie za sprawą niskiej skręcalności właściwej ostatniego produktu. Pięciocząłowy pierścień β -D-fruktofuranozy pozostaje w równowadze (izomeryzuje) z formą sześciocząłową – β -D-fruktopiranozą, co jest związane ze znacznym obniżeniem skręcalności optycznej i zmianą znaku wypadkowej skręcalności całej mieszaniny. Lewostronna skręcalność mieszaniny ulega dalszemu obniżeniu w wyniku zjawiska **mutarotacji** – czyli odwrócenia podstawników przy anomerycznym atomie węgla C1 powstałych cukrów prostych. W wyniku tego procesu następuje wzajemna przemiana form typu „ α ” i „ β ” (anomeryzacja). W końcu przemian (w stanie równowagi), tak zwany **cukier inwertowany** charakteryzuje się skręcalnością wypadkową roztworu na poziomie -40° .



Rysunek 1. Schemat procesów prowadzących do inwersji sacharozy. Poniżej reagentów – wartości kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego α .

Inwersja sacharozy bez obecności **katalizatora** zachodzi bardzo wolno. Katalizuje ją efektywnie obecność kwasu mineralnego w roztworze, a w warunkach naturalnych – enzymy, zwane inwertazami, wytwarzane przez pszczoły i drożdże.

Z punktu widzenia kinetyki proces ten jest reakcją dwucząsteczkową (w **reakcji elementarnej** biorą udział dwie cząsteczki: sacharoza i woda). W rozcieńczonym roztworze wodnym nadmiar ilości wody w stosunku do ilości sacharozy powoduje, że zmiany stężenia wody są znikome i praktycznie pomijalne. Szybkość reakcji zależy więc jedynie od zmian stężenia sacharozy. Reakcję inwersji sacharozy można potraktować jako reakcję pseudo-jednocząsteczkową i zastosować kinetykę pierwszego rzędu.

W pomiarach kinetycznych nie jest konieczna bezpośrednia znajomość stężenia reagenta, uwzględnionego w równaniu kinetycznym danej reakcji. W zastępstwie stężenia, można mierzyć dowolną wielkość do niego proporcjonalną. W przypadku rozpatrywanej reakcji inwersji sacharozy będzie to wartość kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego (α) przez roztwór sacharozy. Wartość α w stałych warunkach pomiaru jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji optycznie czynnej.

Oznaczając kąt skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego na początku pomiaru (w stałej temperaturze) jako α_0 , a kąt skręcania po zakończeniu reakcji inwersji jako α_∞ , początkowe stężenie sacharozy c_0 można zapisać jako:

$$c_0 = a \times (\alpha_0 - \alpha_\infty) \quad (2)$$

Gdzie współczynnik a jest współczynnikiem proporcjonalności. Podobną zależność możemy zapisać dla stężenia sacharozy c_t w dowolnej chwili pomiaru t :

$$c_t = a \times (\alpha_t - \alpha_\infty) \quad (3)$$

Równanie kinetyczne reakcji pierwszego rzędu, przebiegającej ze stałą szybkości k ma postać:

$$\frac{dc}{dt} = -k \times c \quad (4)$$

Po scałkowaniu w przedziale od 0 do t otrzymujemy postać logarytmiczną równania:

$$\ln c_t = -k \times t + \ln c_0 \quad (5)$$

Wyznaczając z niej stałą szybkości otrzymujemy:

$$k = \frac{1}{t} \times \ln \frac{c_0}{c_t} \quad (6)$$

Po podstawieniu do wzoru (5) wyrażeń (1) i (2), otrzymamy:

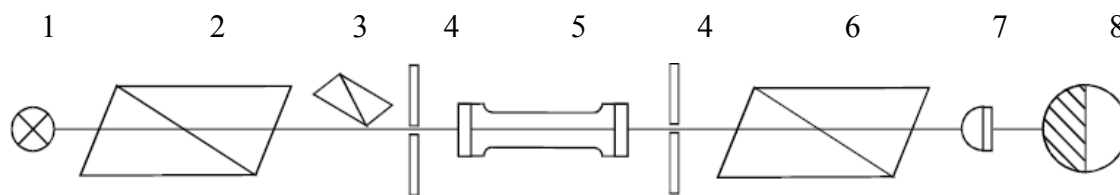
$$k = \frac{1}{t} \times \ln \frac{\alpha_0 - \alpha_\infty}{\alpha_t - \alpha_\infty} \quad (7)$$

Równanie to można przedstawić w postaci funkcji liniowej:

$$f(t) = \ln \frac{\alpha_0 - \alpha_\infty}{\alpha_t - \alpha_\infty} = k \times t \quad (7')$$

Aparatura pomiarowa

Pomiar kąta skręcalności światła spolaryzowanego przez badane roztwory optycznie czynne odbywa się przy pomocy polarymetru półcieniowego z wbudowanym źródłem światła – lampą sodową (Rys. 1, Fot. 1).



1 – lampa sodowa, 2 – polaryzator, 3 – pryzmaty półcieniowe Lippicha, 4 – przesłona, 5 – rurka polarymetryczna, 6 – analizator, 7 – okular — luneta, 8 – obraz w okularze.

Rysunek 1. Schemat blokowy polarymetru półcieniowego.



Fotografia 1. Widok ogólny trójpoleowego polarymetru półcieniowego ze źródłem światła – lampą sodową.

Polarymetryczny pomiar kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła przez substancję optycznie czynną polega na odczycie wartości kąta na noniuszu i skali sprzężonej z analizatorem, przy ustawieniu jednakowej jasności trzech sąsiadujących ze sobą pól, na które jest podzielone pole widzenia w okularze aparatu. Roztwór badany (np. mieszanina cukrów) umieszcza się w rurce polarymetrycznej pomiędzy polaryzatorem a analizatorem. Pomiar polarymetryczny wykonuje się, wykorzystując jako źródła światła monochromatycznej lampy sodowej. Trójdzielność pola widzenia, a co za tym idzie zwiększenie dokładności odczytów kąta skręcenia uzyskuje się umieszczając za polaryzatorem dwa półpryzmaty.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stałej szybkości reakcji inwersji sacharozy z wykorzystaniem różnic we właściwościach optycznych reagentów oraz zbadanie wpływu stężenia katalizatora (kwasu solnego) na kinetykę tej reakcji.

Aparatura: Do przygotowania i przeprowadzenia pomiarów konieczne będą, oprócz polarymetru Lippicha, 4 podpisane rurki polarymetryczne, 3 stopery i szkło laboratoryjne (kolby stożkowe, pipety).

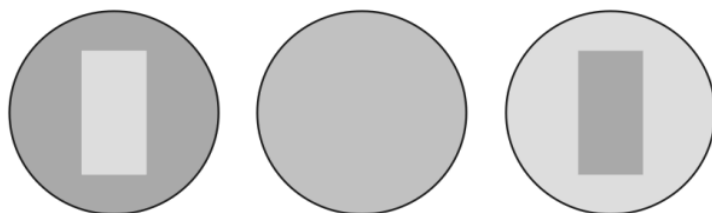
W kolbach stożkowych przygotować roztwory, zgodnie z Tabelą 1, mieszając w odpowiednich proporcjach: 20% roztwór sacharozy (świeżo przygotowany), 6 M roztwór kwasu solnego i wodę destylowaną.

Kwas należy dodawać bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiaru! Ze względu na bezpośredni kontakt z dosyć stężonym kwasem, zaleca się wykonywanie całego ćwiczenia w rękawiczkach.

Tabela 1. Przygotowanie roztworów sacharozy w wodzie i wodnych roztworach kwasu solnego.

L.p.	Opis	20% r-r sacharozy	woda destylowana	6 M HCl
1	10% roztwór sacharozy	25 ml	25 ml	0,0 ml
2	10% r. sacharozy w 0,75 M HCl	25 ml	18,75 ml	6,25 ml
3	10% r. sacharozy w 1,5 M HCl	25 ml	12,50 ml	12,50 ml
4	10% r. sacharozy w 3,0 M HCl	25 ml	0,0 ml	25 ml

W pierwszej kolejności należy zmierzyć wartość kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego w 10% roztworze sacharozy bez dodatku katalizatora (α_0). W tym celu roztwór nr 1 należy wlać do czystej rurki polarymetrycznej (powoli i ostrożnie, aby nie dostały się do niej pęcherzyki powietrza) – aż do zaobserwowania menisku wypukłego. Wówczas należy zamknąć rurkę szkiełkiem przykrywkowym, wsuwając je delikatnie w roztwór tworzący menisk nad rurką. Na szkiełko nałożyć gumową nakładkę, tulejkę i nakrętkę, i przy pomocy tej ostatniej zakręcić rurkę polarymetru. Sprawdzić szczelność układu (obracając góra-dół), ewentualnie ponownie skrócić rurkę, przetrzeć ją z zewnątrz ręcznikiem papierowym i umieścić w polarymetrze. Przy pomocy pokrętki wyregulować jednolity obraz (Rys. 3) i odczytać wartość kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego ze skali. Wyjąć rurkę z roztworem nr 1 z polarymetru.



Rysunek 2. Schematyczny obraz w okularze polarymetru. Wartość kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego α odczytuje się po uzyskaniu jednolitego zaciemnienia.

Przygotować do pomiaru roztwór 2: do rozcieńczonego roztworu sacharozy dołączyć kwas solny, jednocześnie uruchamiając stoper. Sprawnie wlać roztwór nr 2 do rurki polarymetrycznej nr 2, zamknąć ją jak w pierwszym przypadku (unikając pęcherzy powietrza), umieścić rurkę w polarymetrze i odczytać wartość α_t (notując jednocześnie czas t ze stopera). Kolejny pomiar wykonać w 5 i 10 minucie, następnie co około 10 minut aż do ustabilizowania się zmian wartości kąta α_n (przez ok. 1,5 h), równoległe z pozostałymi roztworami 3 i 4. Wyniki zapisać w Tabeli 1. Roztwór pozostaje w zamkniętej podpisanej rurce do końca pomiarów. Po zanotowaniu pomiaru α_t po 10 min dla roztworu 2, należy przygotować roztwór 3: wlać odpowiednią ilość

kwasy do kolby z rozcieńczonym roztworem sacharozy, włączyć drugi stoper, wypełnić rurkę nr 3, zmierzyć wartość α_t i wpisać ją do tabeli (razem z czasem ze stopera). Po upływie kolejnych ok. 10–15 minut rozpocząć przygotowywanie roztworu nr 4 w rurce nr 4. Należy zwrócić uwagę, by zaplanowane pomiary dla trzech rurek 2–4 nie pokrywały się w czasie. Docelowo, rurki polarymetryczne z kolejnymi roztworami będą zmieniane co ok. 3 min.

Tabela 2. Wartości kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego α_t roztworów sacharozy z dodatkiem kwasu solnego, po czasie t . Tabela robocza do pracy w laboratorium.

n	Roztwór 2		Roztwór 3		Roztwór 4	
	t_n [min]	α_n	t_n [min]	α_n	t_n [min]	α_n
1	<i>np. 2</i>					
2	5		5		5	
3	10		10		10	
4	20		20		20	
...	...	...	...	...	...	...

Opracowanie wyników

1. Obliczyć wartość α_∞ . Ponieważ nawet w obecności katalizatora, jakim jest kwas solny, reakcja inwersji sacharozy biegnie w temperaturze pokojowej na tyle wolno, że nie udałoby się zmierzyć końcowej wartości kąta skręcania α_∞ podczas trwania zajęć, wartość tę należy wyznaczyć ze wzoru (8), w którym t oznacza temperaturę pomiaru wyrażoną w °C.

$$\alpha_\infty = -\alpha_0 \times (0,440 - 0,005 \times t) \quad (8)$$

2. Wyznaczyć szybkość reakcji v w kolejnych odstępach czasu, z zależności:

$$v = \frac{\Delta\alpha}{\Delta t} = \frac{\alpha_n - \alpha_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} \quad (9)$$

Dane i wyniki obliczeń zebrać w postaci tabeli (Tabela 3).

Tabela 3. Wyznaczanie stałej szybkości reakcji inwersji sacharozy. Dane do wykresów nr 1 i 2.

n	t_n [min]	α_n	$v = \frac{\Delta\alpha}{\Delta t}$	$\ln \frac{\alpha_0 - \alpha_\infty}{\alpha_n - \alpha_\infty}$
Roztwór 2				
1	2			
...	...			

↑

zbiór argumentów dla
wykresów 1 i 2

↑

zbiór wartości
dla wykresu 1

↑

zbiór wartości
dla wykresu 2

3. Wykreślić zależność $v = f(t)$ dla roztworów 2–4 (wykres 1).

4. Wykreślić zależność (7) dla roztworów 2–4 (wykres 2). Współczynniki kierunkowe

otrzymanych prostych (a_2 , a_3 , a_4) są poszukiwanymi stałymi szybkości k_2 , k_3 i k_4 dla roztworów 2–4.

5. Obliczyć stężenie molowe katalizatora (kwasu solnego) c_2 – c_4 w roztworach 2–4, a następnie sprawdzić, czy zachodzi równość:

$$k = \frac{k_2}{c_2} = \frac{k_3}{c_3} = \frac{k_4}{c_4} \quad (10)$$

6. Skomentować wpływ katalizatora na szybkość reakcji chemicznej oraz przyczyny otrzymania ewentualnych odstępstw w równaniu (10).

Zakres wymaganych wiadomości

Inwersja sacharozy, cukier inwertowany; zależność szybkości reakcji chemicznej od temperatury (reguła van't Hoffa, równanie Arrheniusa + proste obliczenia); rzędowość a cząsteczkowość reakcji; reakcje elementarne i złożone; kinetyka reakcji pierwszego i drugiego rzędu (równanie kinetyczne, przebieg krzywej kinetycznej, czas połowicznej przemiany); energia aktywacji; budowa, zasada działania i zastosowanie polarymetru.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 4, 12, 13

Słowniczek

Cząsteczkowość reakcji elementarnej	Liczba cząsteczek (albo atomów, jonów, rodników), biorących w niej udział w charakterze substratów. Najpospolitsze są reakcje dwucząsteczkowe (w zderzeniu biorą udział dwie cząsteczki) i jednocząsteczkowe (np. niektóre reakcje analizy). Bardzo rzadkie są reakcje trózcąsteczkowe, a reakcje o wyższej cząsteczkowości nie zostały dotąd zaobserwowane. Wiąże się to ze zbyt małym prawdopodobieństwem jednoczesnego zderzenia się ze sobą np. czterech cząsteczek.
Katalizator	Substancja chemiczna, która dodana do układu reagentów powoduje obniżenie energii aktywacji reakcji, zwiększając tym samym jej szybkość. K. tworzy tymczasowy kompleks z substratami i zmienia przez to ścieżkę kinetyczną reakcji na bardziej korzystną, o mniejszej barierze.
Reakcja elementarna	Reakcja chemiczna, która zachodzi w jednym etapie, bez produktów pośrednich, z jednym tylko stanem przejściowym. Większość reakcji to reakcje złożone z kilku takich elementarnych procesów.
Rząd reakcji	Suma wykładników w równaniu kinetycznym reakcji, nie zawsze zgodna z jej cząsteczkowością. Jeśli równanie kinetyczne ma postać: $v = k \times c_A^\alpha \times c_B^\beta \times \dots \times c_L^\lambda$ to rząd reakcji wynosi $\alpha + \beta + \dots + \lambda$.

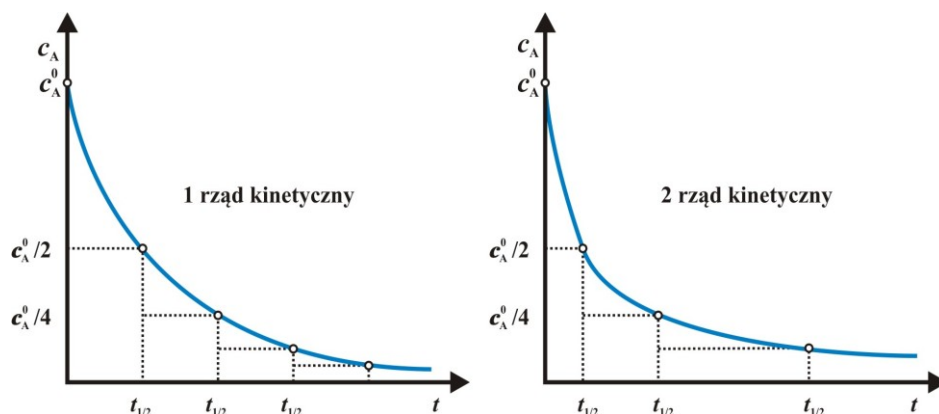
Związki optycznie czynne	Związki chemiczne zdolne do skręcania płaszczyzny polaryzacji światła spolaryzowanego. Warunkiem występowania aktywności optycznej jest chiralność związku (rodzaj izomerii, obecność dwóch nienakładalnych izomerów optycznych – enancjomerów, będących dla siebie odbiciami lustrzanymi). Nie wszystkie związki chiralne są optycznie czynne.
---------------------------------	---

Ćwiczenie 7

Badanie szybkości reakcji hydrolizy bezwodnika octowego metodą pomiaru przewodnictwa elektrycznego roztworu

Kinetyka chemiczna, czyli nauka o szybkości procesów chemicznych ma – obok termodynamiki – podstawowe znaczenie w chemii. O ile prawa termodynamiki umożliwiają ocenę realności dowolnego procesu, jednak nie dostarczają informacji o czasie, w którym zostaje osiągnięty stan końcowy procesu chemicznego (czyli stan równowagi termodynamicznej). Pełniejsze ich poznanie umożliwia znajomość szybkości reakcji chemicznych, co dla wielu przemian, również takich o znaczeniu przemysłowym, ma kluczowe znaczenie.

Średnią szybkość reakcji chemicznej mierzy się zmianą stężeń substancji reagujących w jednostce czasu. W czasie przebiegu reakcji jej szybkość (v) ulega nieustannym zmianom – na początku jest najwyższa, potem, w miarę wyczerpywania się substratów, zmniejsza się asymptotycznie (Rys. 1).



Rysunek 1. Zmiany stężenia substratu (A) w czasie dla hipotetycznej reakcji 1 rzędu (lewy rysunek) i 2 rzędu kinetycznego (prawy rysunek).

Rzeczywistą szybkość reakcji w każdej chwili określa się jako stosunek nieskończenie małej zmiany stężenia substratów (dc) lub produktów (dx) do nieskończenie małego okresu (dt), w którym nastąpiła zmiana stężenia:

$$v = -\frac{dc}{dt} \text{ lub } v = \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

Czynnikami, które wpływają na szybkość reakcji chemicznej jest stężenie substratów, temperatura reakcji oraz obecność katalizatorów. Dla każdej reakcji można zapisać tzw.

równiami kinetyczne, w którym współczynnikiem proporcjonalności jest **stała szybkości reakcji** – wielkość informująca o tempie procesu, niezależna od stężeń reagentów. Na przykład dla hipotetycznej reakcji: $a A + b B = c C$ równanie kinetyczne będzie wyglądać następująco:

$$v = k \times [A]^a \times [B]^b \text{ lub w innym zapisie: } v = k \times (c_A)^a \times (c_B)^b \quad (2)$$

$$\text{ogólnie: } v = k \times c^n \quad (3)$$

gdzie: v – szybkość reakcji, c – stężenie reagentów, k – stała szybkości reakcji.

W powyższym równaniu kinetycznym pojawia się jeszcze symbol n , który oznacza **teoretyczny rząd reakcji chemicznej** – czyli sumę wykładników potęgowych, w jakich występują stężenia reagentów w równaniu kinetycznym. Dla powyższej reakcji **rząd sumaryczny** ze względu na substraty będzie wynosił: $n = a + b$, przy czym a i b to **rzędy cząstkowe** – odniesione do poszczególnych składników. Z powyższych zapisów wynika, że rząd reakcji wyraża liczbę składników substratów zmieniających stężenia w czasie przebiegu reakcji i uwidocznionych równaniu kinetycznym. Gdy wartość rzędu okazuje się wartością ułamkową, sugeruje to że szybkość reakcji zależy od stężeń produktów pośrednich, których nie znamy i – co za tym idzie – bardziej złożony przebieg reakcji, niż sugeruje to sumaryczny zapis równania.

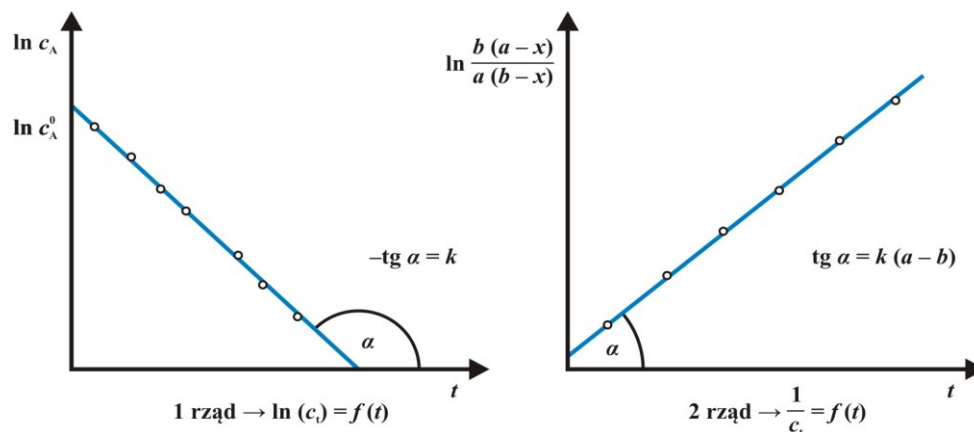
Badając reakcje chemiczne należy też wyznaczyć rząd reakcji w sposób eksperymentalny i porównać go z teoretycznym. Wykorzystuje się w tym celu różne metody – wśród nich podstawowe to **metoda podstawienia do wzoru** oraz **metoda graficzna**. Wyznaczanie rzędu reakcji metodą podstawienia do wzoru polega na podstawianiu kolejnych wartości stężeń, wyznaczonych dowolną metodą do scałkowanej formy równania kinetycznego, na przykład:

$$1 \text{ rząd: } k' = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c_t} \text{ [s}^{-1}\text{]}; \quad (5); \quad 2 \text{ rząd: } k'' = \frac{1}{t} \times \left(\frac{1}{c_t} - \frac{1}{c_0} \right) \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]} \quad (5')$$

gdzie t – oznacza czas po którym badane stężenie osiągnęło wartość c_t , c_0 – stężenie początkowe badanego reagenta, c_t – stężenie reagenta w czasie t pobierania prób do badań, zaś k' i k'' – to stałe szybkości odpowiednio 1 i 2-go rzędu kinetycznego.

Następnie sprawdza się, czy dla kolejnych próbek o stężeniu c_t , pobranych po czasach t otrzymujemy ciąg stałych wartości (k' lub k'') dla jednego z powyższych równań. Jeśli tak, reakcja jest odpowiedniego rzędu kinetycznego.

Z kolei metoda graficzna polega na sprawdzeniu liniowości zależności wynikających wprost z powyższych zapisów (rysunek 2).



Rysunek 2. Graficzne wyznaczanie rzędu reakcji w przypadku procesów 1-rzędowych (lewy rysunek) oraz 2-rzędowych (prawy rysunek).

Wpływ temperatury na szybkość reakcji

Wartość stałej szybkości znacznie wzrasta ze wzrostem temperatury, dlatego równanie kinetyczne i stałą szybkości reakcji wyznacza się na podstawie danych kinetycznych w określonej temperaturze. W sposób przybliżony można opisać wpływ temperatury przez podanie tzw. współczynnika temperaturowego reakcji, czyli stosunku stałej szybkości w temperaturze $T+10$ K do stałej szybkości w temperaturze T K (8):

$$\alpha = \frac{k_{T+10^\circ}}{k_T} \quad (8)$$

Tak zwana **reguła van't Hoffa** mówi, że podwyższenie (obniżenie) temperatury układu reakcyjnego o 10 K powoduje od 2–4 krotny wzrost (obniżenie) stałej szybkości reakcji (w pobliżu temperatury pokojowej). Wytlumaczenie przyczyn, dla których szybkość reakcji tak znacznie zależy od temperatury daje m. in. **teoria zderzeń aktywnych**. Według niej efektywne są tylko te zderzenia, w których biorą udział cząsteczki posiadające energię większą lub równą pewnej granicznej wartości, zwanej **energią aktywacji (E_A)**. Energia aktywacji to ilość energii, potrzebna do wytworzenia cząstek kompleksu aktywnego zdolnego do przemiany w produkty – ilość energii potrzebna do zajścia reakcji. Dokładnie ujmując to zagadnienie równanie Arrheniusa, które w użytecznej, zlogarytmowanej formie wygląda następująco:

$$\ln k = \frac{-E_A}{RT} + C \quad (9)$$

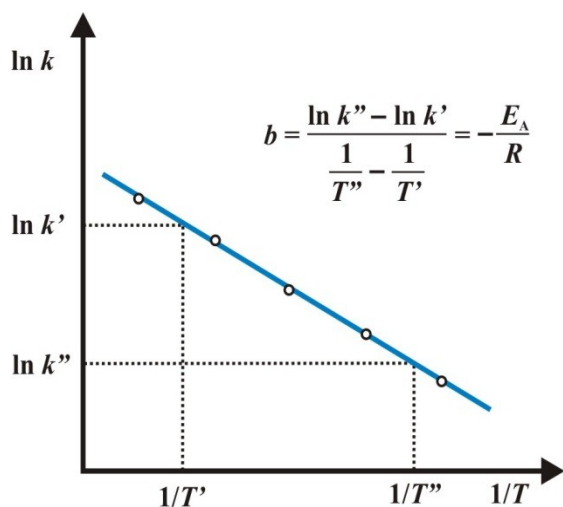
gdzie k – oznacza stałą szybkości reakcji w temperaturze T , R – uniwersalną stałą gazową, E_a – energię aktywacji, zaś C – stałą, charakteryzującą tzw. czynnik częstości zderzeń A ($C = \ln A$).

Duża wartość E_A oznacza, że wpływ temperatury na szybkość reakcji jest znaczny, zaś

mała – że wpływ temperatury na szybkość procesu jest niewielki. Wartość energii aktywacji można znaleźć ze znanych wartości stałych szybkości k' i k'' , wyznaczonych w temperaturach T' i T'' według zależności (10) wynikającej wprost z równania Arrheniusa:

$$\ln \frac{k''}{k'} = -\frac{E_A}{R} \times \left(\frac{1}{T''} - \frac{1}{T'} \right) + C \quad (10)$$

Średnią wartość energii aktywacji najczęściej znajduje się graficznie dla danego przedziału temperatur z zależności liniowej typu $\ln k = f(T^{-1})$. Z nachylenia tej zależności liniowej znajduje się energię aktywacji ($b = \operatorname{tg} \alpha = -E_A/R$; Rys. 3).



Rysunek 3. Graficzna postać zależności Arrheniusa i wyznaczanie energii aktywacji z wykresu.

W niniejszym ćwiczeniu bada się kinetykę hydrolizy bezwodnika octowego, przebiegającej według sumarycznej reakcji:



W celu mierzy się zmiany przewodnictwa elektrycznego układu w funkcji czasu. W rozpuszczalnikach organicznych (acetonie lub kwas octowy) reakcja jest procesem przebiegającym zgodnie z drugim rzędem kinetycznym. Jednak w rozcieńczonych roztworach wodnych proces zachodzi według schematu reakcji pierwszego rzędu, praktycznie do końca. W takich warunkach mierzone zmiany przewodnictwa elektrycznego są w dobrym przybliżeniu proporcjonalne do zmian stężenia powstającego kwasu octowego. Wzrost ilości kwasu (elektrolitu) w mieszaninie reakcyjnej z czasem wiąże się ze zwiększaniem przewodnictwa elektrycznego badanego układu.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stałej szybkości reakcji hydrolizy bezwodnika octowego w dwóch temperaturach i na tej podstawie obliczenie energii aktywacji procesu

oraz wartości wyrazu wolnego w równaniu Arrheniusa.

Wyposażenie: konduktometr, kolba miarowa o pojemności 25 cm³, pipeta wielomiarowa na 10 cm³, zlewka 200 cm³, stoper, termostat. Odczynniki: bezwodnik octowy, woda podwójnie destylowana.

1. Do kolby miarowej o pojemności 25 cm³ wprowadzić z pipety odmierzoną objętość bezwodnika octowego, taką aby po uzupełnieniu wodą do kreski jego stężenie wynosiło 2,16 M. Kolbę z odmierzoną ilością bezwodnika oraz wodę, którą używać się będzie do sporządzania roztworu wstawić na 15 minut do termostatu utrzymującego zadaną temperaturę (w pobliżu temperatury pokojowej). Następnie uzupełnić kolbę wodą do kreski (pojawi się widoczne rozdzielenie faz). W tym momencie włączamy stoper i energicznie wstrząsając doprowadzamy układ do momentu, w którym nastąpi całkowite rozpuszczenie bezwodnika – aż otrzymamy jednorodny roztwór. Jako czas początku pomiarów przyjąć średnią z czasów początku i końca rozpuszczania.
2. Pomiaru przewodnictwa wykonywać w konduktometrze ustawionym na odpowiednim zakresie pomiarowym. Przewodnictwo należy rejestrować 2–3 razy na minutę w czasie pierwszych 3 minut, następnie 2–3 razy w ciągu kolejnych 5 minut, potem zaś raz na 10 minut, aż do ustabilizowania się wartości przewodnictwa (L_{∞}), co powinno nastąpić w ciągu około dwóch godzin.
3. Analogiczną serię pomiarów wykonać w drugiej, ustalonej przez prowadzącego temperaturze. Wyniki pomiarów zestawzić w Tabeli 1.

Tabela 1. Tabela wyników pomiarów przewodnictwa roztworów bezwodnika octowego w wodzie.

Temperatura I				
Nr pomiaru	Czas (t , s)	L_t (Ω^{-1})	$\log(L_{\infty} - L_t)$	k_{ex} (temp. I)
1				
2				
...				
Temperatura II				
Nr pomiaru	Czas (t , s)	L_t (Ω^{-1})	$\log(L_{\infty} - L_t)$	k_{ex} (temp. II)
1.				
2.				
...				

Wykonanie sprawozdania

1. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów wyznaczyć metodą najmniejszych kwadratów wartości stałej szybkości reakcji hydrolizy bezwodnika octowego w dwóch badanych temperaturach. Uzyskane wyniki pomiarów powinny spełniać zależność liniową:

$$\log(L_{\infty} - L_t) = \frac{-k_{\text{ex}}}{2,303} \times t + \log(L_{\infty} - L_0) \quad (12)$$

Wartość k_{ex} dla dwóch temperatur wyznaczmy z nachylenia obu uzyskanych prostych. Ekstrapolując zależność $\log(L_{\infty} - L_t)$ do czasu t_0 wyznaczyć wartość L_0 .

2. Przekształcić zależność (12) tak, aby otrzymać wyrażenie do obliczania wartości k_{ex} . Na tej podstawie wyliczyć stałą szybkości reakcji k_{ex} dla każdego punktu pomiarowego, następnie obliczyć średnią i porównać ją z wartością wyznaczoną metodą najmniejszych kwadratów. Obliczenia przeprowadzić dla obydwu serii pomiarowych.
3. Posługując się wyznaczonymi w dwóch temperaturach stałymi szybkości obliczyć energię aktywacji reakcji na podstawie równania Arrheniusa (10) i oszacować wartość czynnika przedwykładniczego A ($A = e^C$).
4. Przedyskutować uzyskane wyniki pomiarowe w świetle teorii szybkości reakcji i teorii Arrheniusa.

Pozycje spisu literatury: 1–13, 15

Słowniczek

Cząsteczkowość reakcji	Liczba cząstek chemicznych, których jednoczesne spotkanie jest niezbędne do tego, aby reakcja mogła zajść.
Energia aktywacji	Minimalna energia, którą musi otrzymać zespół cząsteczek substratu, by wejść w reakcję chemiczną. Niższa wartość energii aktywacji oznacza szybszą reakcję.
Rząd kinetyczny	Suma wykładników potęgowych, w jakich występują stężenia reagentów w równaniu kinetycznym. R. k. wyraża liczbę składników zmieniających stężenia w czasie przebiegu reakcji.
Stała szybkości	Stała proporcjonalności w równaniu kinetycznym przemiany chemicznej. Wielkość charakterystyczna dla danej reakcji chemicznej, zależna od temperatury.
Teoria kompleksu aktywnego	Teoria sformułowana w 1935 przez M. Polanyiego, C. Hinshelwooda i H. Eyringa, zakładająca istnienie stanu przejściowego reakcji (o maksymalnej energii potencjalnej), zwanego kompleksem aktywnym (AB^*), oraz równowagi termodynamicznej pomiędzy nim i reagentami (substratami i produktami). Model ten umożliwia wyliczenie stałych szybkości reakcji.

RÓWNOWAGI FAZOWE

Ćwiczenie 8

Równowaga między fazą ciekłą i gazową w układach jedno- i dwuskładnikowych

Definicja równowagi fazowej wynika z drugiej zasady termodynamiki mówiącej, że **potencjał chemiczny** μ czystej substancji w równowadze (dla czystej substancji potencjał chemiczny jest tożsamy z **entalpią swobodną**, G) jest taki sam w obrębie całej próbki, niezależnie od ilości faz, które w niej występują. Tak więc, gdy przykładowo ustala się równowaga pomiędzy fazą ciekłą i fazą stałą czystej substancji A, potencjały chemiczne substancji w obydwu fazach zrównują się. Jeśli potencjał chemiczny substancji A w fazie ciekłej oznaczmy jest jako $\mu_{A(c)}$, a w fazie stałej jako $\mu_{A(s)}$, to dla stanu równowagi termodynamicznej można zapisać: $\mu_{A(c)} = \mu_{A(s)}$. Potencjał chemiczny wieloskładnikowego układ jest zależny od jego składu. W przypadku roztworu utworzonego z lotnych substancji ciekłych A i B, stan równowagi oznacza, że potencjał chemiczny substancji A w fazie gazowej (w parze) jest taki sam jak w roztworze: $\mu_{A(g)} = \mu_{A(c)}$. Podobnie potencjał chemiczny drugiego składnika w fazie gazowej i roztworze jest taki sam: $\mu_{B(g)} = \mu_{B(c)}$. Stąd, w równowadze całkowita entalpia swobodna ciekłej mieszaniny, $G_{(c)} = \mu_{A(c)} + \mu_{B(c)}$, jest taka sama jak fazy gazowej nad nią, $G_{(g)} = \mu_{A(g)} + \mu_{B(g)}$.

Jednym z podstawowych pojęć związanych z problematyką równowag w układach jedno-/wieloskładnikowych i jedno-/wielofazowych są **stopnie swobody**. Stopnie swobody definiuje się jako parametry opisujące układ (takie jak ciśnienie panujące w układzie, temperatura i skład), które można zmieniać bez zaburzenia istniejącego w danym momencie stanu równowagi fazowej. Liczbę stopni swobody, n , określonego układu wyznacza się za pomocą równania, zwanego **regułą faz Gibbsa**: $n = \alpha - \beta + 2$, gdzie α to liczba składników znajdujących się w układzie, natomiast β jest ilością faz. Gdy ustalone jest ciśnienie zewnętrzne lub temperatura, reguła faz Gibbsa przyjmuje postać: $n = \alpha - \beta + 1$. Układ jednoskładnikowy składający się z fazy ciekłej w równowadze z parą opisany jest pojedynczym stopniem swobody ($n = 1 - 2 + 2 = 1$). Oznacza to, że jeśli czysta substancja znajdzie się w określonej temperaturze, nad fazą ciekłą ustali się ściśle określona prężność pary. Z kolei wartość ciśnienia pod jakim znajdzie się substancja determinuje temperaturę w jakiej ustali się równowaga pomiędzy jej fazą ciekłą i gazową. Punkty **przemian fazowych** są szczególnymi punktami, w których fazy znajdują się w równowadze. Temperatura zamarzania

czy wrzenia czystej substancji zmienia się wraz ze zmianą panującego w układzie ciśnienia. Dla znajdującego się w stałej temperaturze układu dwuskładnikowego, takiego jak np. roztwór dwóch mieszających się całkowicie cieczy, liczba stopni swobody wynosi $n = 3 - \beta$, przyjmując najwyższą wartość równą 2, gdy istnieje tylko jedna faza. Pierwszym z tych dwóch stopni swobody może być ciśnienie, drugim skład (wyrażony jako ułamek molowy jednego ze składników). Tak więc stan układu można określić przez podanie wartości tych dwóch parametrów oraz przedstawić go jako punkt na wykresie we współrzędnych ciśnienia i składu. Takie wykresy przedstawiające warunki w jakich mogą istnieć fazy w układach jedno- lub wieloskładnikowych nazywane są **diagramami fazowymi**. Diagramy fazowe niosą również informacje o warunkach, które muszą być spełnione dla zachowania równowag fazowych oraz o tym jak zmiana różnych parametrów wpływa na przemiany fazowe. Dla powyższej mieszaniny oprócz diagramu fazowego we współrzędnych ciśnienia i składu w warunkach $T = \text{const.}$, alternatywnie można wykreślić diagram fazowy we współrzędnych temperatury i składu przyjmując $p = \text{const.}$

Zakłada się, że faza gazowa nad roztworem dwóch lotnych cieczy A i B o nieograniczonej wzajemnej rozpuszczalności w przypadku doskonałego zachowania się tych substancji podlega prawom gazu doskonałego – prawu Clapeyrona i Daltona. Sumaryczna prężność pary nasyconej, P , nad tak zwanym roztworem doskonałym (idealnym) zgodnie z prawem Daltona równa się sumie cząstkowych prężności par składników:

$$P = p_A + p_B \quad (1)$$

$$p_A = PY_A \quad (2) \quad p_B = PY_B \quad (2')$$

gdzie P – ciśnienie całkowite, p_A i p_B – cząstkowe prężności par składnika A i B, Y_A i Y_B – ułamki molowe składnika A i B w fazie gazowej.

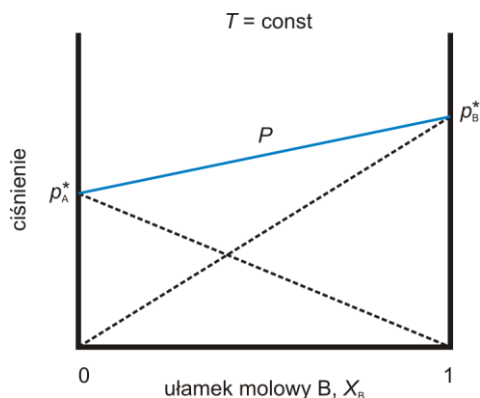
Roztwory są roztworami idealnymi gdy spełniają prawo Raoult'a. Cząstkowe prężności par składników nad roztworem według prawa Raoult'a są funkcją liniową ich ułamka molowego w roztworze:

$$p_A = p_A^* X_A \quad (3) \quad p_B = p_B^* X_B \quad (3')$$

gdzie p_A^* i p_B^* oznaczają prężności par nad czystym składnikiem w danej temperaturze, X_A i X_B – ułamki molowe składników w roztworze.

Sytuację tą przedstawiono na rysunku 1, gdzie na osi odciętych znajduje się skład, a na osi rzędnych prężność pary. Roztwory idealne spełniają prawo Raoult'a dzięki temu, że siły oddziaływań międzycząsteczkowych różnych substancji, A–B, są równe siłom oddziaływań międzycząsteczkowych A–A oraz B–B. Przykładami roztworów zbliżonych do idealnych są mieszaniny substancji o podobnej budowie chemicznej, np. benzenu i toluenu, heksanu

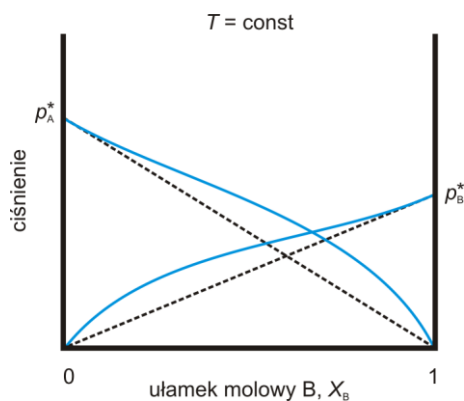
i pentanu czy wody i tlenku deuteru. Większość roztworów rzeczywistych wykazuje większe lub mniejsze odchylenia od prawa Raoult'a.



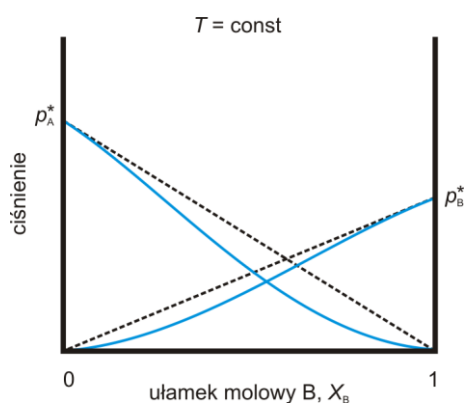
Rysunek 1. Zależność prężności cząstkowych (p_A , p_B) i ciśnienia sumarycznego (P) od składu roztworu idealnego.

Jeśli oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy cząsteczkami tego samego rodzaju, czyli A–A i B–B, są silniejsze niż oddziaływania A–B, wówczas zależność prężności par od zawartości danego składnika przebiega powyżej prostej wynikającej z prawa Raoult'a (Rys. 2). Mówi się wówczas o dodatnim odchyleniu od prawa Raoult'a. Podwyższenie prężności pary nad roztworem wynika z tego, że pojawiające się w mieszaninie oddziaływania A–B przyczyniają się do rozpadu asocjatów typu A–A i B–B, co osłabia siłę oddziaływań w fazie skondensowanej i prowadzi do wzrostu populacji cząsteczek w fazie gazowej. Osiągnięcie punktu wrzenia takiej mieszaniny wymaga dostarczenia mniejszej ilości energii niż konieczne by było aby doprowadzić do wrzenia pojedyncze czyste składniki. Wzrost lotności składników mieszaniny w porównaniu z czystymi substancjami oznacza zmniejszenie ciepła parowania zarówno substancji A jak i substancji B będących w mieszaninie.

Jeżeli natomiast oddziaływania typu A–B są silniejsze niż A–A i B–B to zależność prężności par od zawartości danego składnika przebiega poniżej prostej wynikającej z prawa Raoult'a (Rys. 3). Odchylenie tego rodzaju nosi nazwę odchylenia ujemnego. Pojawienie się dużych sił przyciągających pomiędzy cząsteczkami różnych typów po zmieszaniu czystych składników utrudnia parowanie tych składników, co skutkuje obniżeniem prężności pary nad roztworem. Aby doprowadzić taką mieszaninę do wrzenia, czyli spowodować zrównanie prężności par nad mieszaniną z ciśnieniem zewnętrznym, konieczne jest ogrzanie jej do wyższej temperatury niż wynoszą poszczególne temperatury wrzenia czystych A i B. Oznacza to, że ciepło parowania danego składnika znajdującego się w roztworze jest wyższe niż ciepło parowania składnika w postaci czystej.



Rysunek 2. Przebieg zależności prężności par składników nad roztworem w przypadku występowania dodatniego odchylenia od prawa Raoult'a.

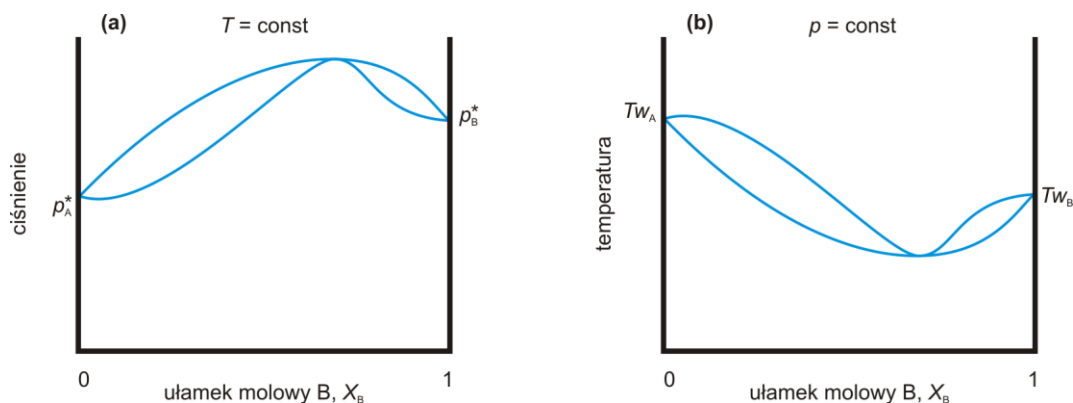


Rysunek 3. Przebieg zależności prężności par składników nad roztworem w przypadku występowania ujemnego odchylenia od prawa Raoult'a.

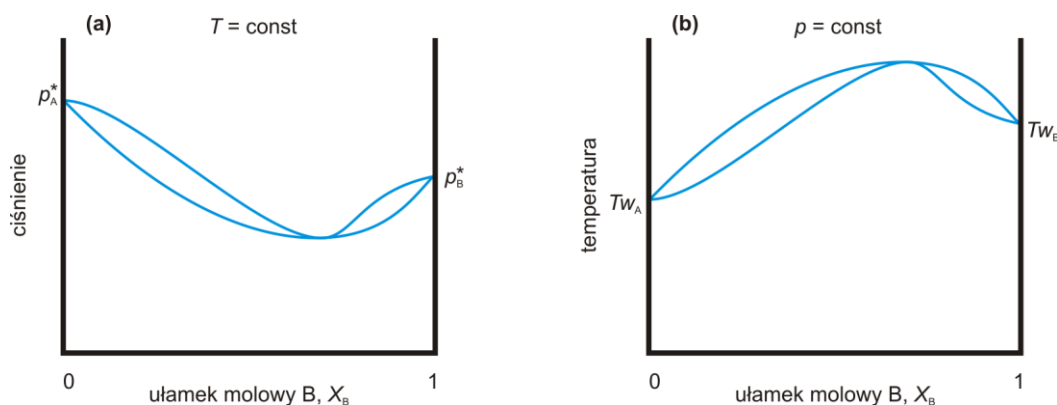
Jeśli w mieszaninie przeważają oddziaływania pomiędzy cząsteczkami tego samego rodzaju A–A i B–B, czyli występuje odchylenie dodatnie od prawa Raoult'a, diagram fazowy charakteryzuje się występowaniem maksimum na krzywej sumarycznej prężności pary nasyconej (Rys. 4(a)). Przykładem mogą tu być mieszaniny: butanol-toluen, tetrachlorek węgla-metanol, etanol-benzen. Natomiast, jeśli w roztworze przeważają oddziaływania A–B, to diagram fazowy wykazuje minimum na krzywej sumarycznej prężności pary nasyconej (Rys. 5(a)). Do układów o takich właściwościach należą chloroform-aceton, woda-kwas bromowodorowy, woda–chlorowodór, fenol–alkohol benzyłowy. Układy, dla których występują ekstrema na krzywej sumarycznej prężności pary nasyconej, nazywane są układami azeotropowymi. Gdy na krzywej sumarycznej prężności pary nasyconej występuje maksimum (odchylenie dodatnie od prawa Raoult'a) jest to układ azeotropowy dodatni. Gdy na krzywej sumarycznej prężności pary nasyconej występuje minimum (ujemne odchylenie od prawa Raoult'a) jest to układ azeotropowy ujemny. W punktach minimum i maksimum, zwanych punktami azeotropowymi, krzywa cieczy styka się z krzywą pary. Właściwości mieszanin azeotropowych podsumowuje **II prawo Konowalowa**:

„Mieszanina o składzie azeotropowym (czyli odpowiadającym ekstremum na krzywej sumarycznej prężności pary, a zarazem ekstremum na krzywej temperatury wrzenia) ma skład pary nasyconej równy składowi cieczy”.

Z racji tego, że w punkcie azeotropowym, skład cieczy i pary jest jednakowy mieszanina azeotropowa wrze jak czysta substancja i jej rozdzielanie na drodze destylacji nie jest możliwe. Podczas rozdzielania mieszanin azeotropowych można otrzymać jeden składnik i mieszaninę azeotropową.



Rysunek 4. Diagram fazowy ciecz-para układów w których występują duże dodatnie odchylenia od prawa Raoult'a.

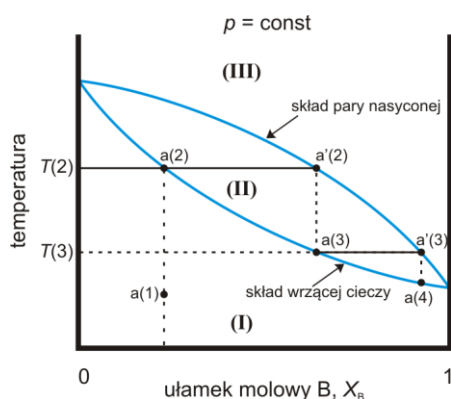


Rysunek 5. Diagram fazowy ciecz-para układów w których występują duże ujemne odchylenia od prawa Raoult'a.

Rysunki 4(a) i 5(a) są diagramami fazowymi ciecz-para w warunkach izotermicznych. Z punktu widzenia rozdziału mieszanin na czyste składniki większe znaczenie mają diagramy fazowe dla warunków izobarycznych (tak zwane izobary), gdyż destylacje najczęściej prowadzi się ogrzewając mieszaninę pod stałym ciśnieniem. Rysunki 4(b) i 5(b) są diagramami fazowymi tego typu, i przedstawiają zależność temperatury wrzenia cieczy od jej składu i składu pary nad nią. Skład pary nad roztworem jest zwykle inny niż skład roztworu będącego w równowadze z tą parą. W fazie gazowej dominuje składnik bardziej lotny zgodnie z I prawem Konowalłowa, które brzmi: „Para wzbogaca się w ten składnik, którego dodatek do cieczy zwiększa prężność pary nad nią (lub obniża jej temperaturę wrzenia)”. Ten fakt wykorzystuje się praktycznie podczas rozdzielania składników metodą destylacji.

Jeśli różnica pomiędzy oddziaływaniami A–B, A–A i B–B nie są duże, składniki układu wykazują niewielkie odchylenia od prawa Raoult'a, czyli roztwór rzeczywisty ma właściwości zbliżone do właściwości roztworu idealnego. Takie mieszaniny, zwane **zeotropowymi**, można rozdzielić na drodze destylacji frakcyjnej. Diagram fazowy w warunkach izobarycznych dla mieszanin tego typu przedstawia Rys. 6. Na liniach umiejscowione są punkty odpowiadające składowi faz we wzajemnej równowadze dla różnych temperatur (czyli w punktach wrzenia) pod danym ciśnieniem $p = \text{const}$. Przykładowo, w temperaturze wrzenia $T(2)$ roztwór o składzie $a(2)$ istnieje w równowadze termodynamicznej z parą nasyconą o składzie $a'(2)$, natomiast w temperaturze wrzenia $T(3)$, równowagowe ilości cieczy i pary to odpowiednio $a(3)$ i $a'(3)$. W obszarze zawartym pomiędzy krzywymi w układzie istnieją dwie fazy, a liczba stopni swobody układu wynosi 1 (obszar (II)). Stąd w danej temperaturze (przy $p = \text{const}$.) skład obu faz w równowadze musi być ściśle określony. Obszary (I) i (III) na zewnątrz krzywych odpowiadają czystym fazom i charakteryzują się dwoma stopniami swobody, co oznacza, że zarówno temperatura jak i skład mogą ulegać zmianie bez zaburzania równowagi danej czystej fazy.

Na podstawie wyznaczonego diagramu ciecz-para, takiego jak na Rys. 6, można przewidywać przebieg rozdziału mieszaniny na drodze destylacji. Jeśli czysta ciecz (bez śladu fazy gazowej) o składzie $a(1)$ będzie ogrzewana, po osiągnięciu temperatury $T(2)$ dojdzie do punktu wrzenia. W temperaturze $T(2)$ roztwór ma skład $a(2)$, który jest taki sam jak $a(1)$, ale równocześnie pojawi się znikoma ilość pary o składzie $a'(2)$. Para $a'(2)$ jest bogatsza w bardziej lotny składnik B (składnik B ma niższą temperaturę wrzenia od składnika A) aniżeli ciecz $a(2)$. Prosta destylacja polega na tym, że para jest usuwana z układu i skraplana, dając ciecz o składzie $a(3)$. Ponowne ogrzewanie cieczy o składzie $a(3)$ spowodowałoby jej wrzenie w temperaturze $T(3)$ – która jest niższa od $T(2)$ z powodu większej zawartości bardziej lotnego składnika B. W temperaturze $T(3)$ w parze nasyconej o składzie $a'(3)$ przeważa składnik B. Powtarzając procedurę ponownego ogrzewania kondensatu o składzie $a'(3)$ otrzymuje się prawie czysty B.

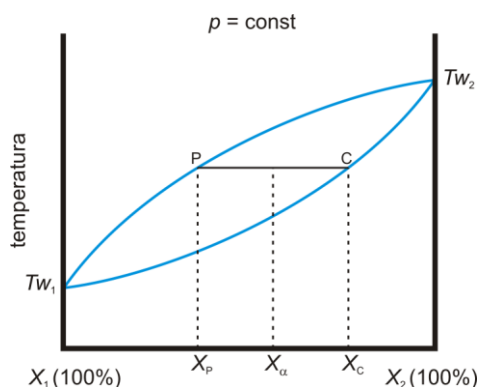


Rysunek 6. Technika separacyjna zwana destylacją frakcyjną przedstawiona na diagramie fazowym ciecz-para mieszaniny dwóch cieczy o nieograniczonej rozpuszczalności, tworzących roztwór zbliżony do idealnego (substancja B jest składnikiem bardziej lotnym). Obszar (I) obrazuje układ jednofazowy cieczy; obszar (II) odpowiada układowi dwufazowemu, gdzie ciecz i jej para nasycona są w równowadze w danej temperaturze; obszar (III) obrazuje układ jednofazowy pary.

Punkt w obszarze dwufazowym diagramu fazowego, oprócz jakościowej informacji o istnieniu dwóch faz w układzie, niesie również informację o ich względnych ilościach. Stosunek masy fazy gazowej do masy fazy ciekłej wynosi zgodnie z regułą dźwigni (Rys. 7):

$$\frac{m_p}{m_c} = \frac{X_c - X_a}{X_a - X_p} \quad (4)$$

gdzie: m_p , m_c – masy fazy gazowej i ciekłej.



Rysunek 7. Ilustracja reguły dźwigni. X_c i X_p – ułamki molowe cieczy i pary w równowadze; X_1 i X_2 – ułamki molowe składników mieszaniny; T_{W1} , T_{W2} – temperatury wrzenia czystych składników 1 i 2.

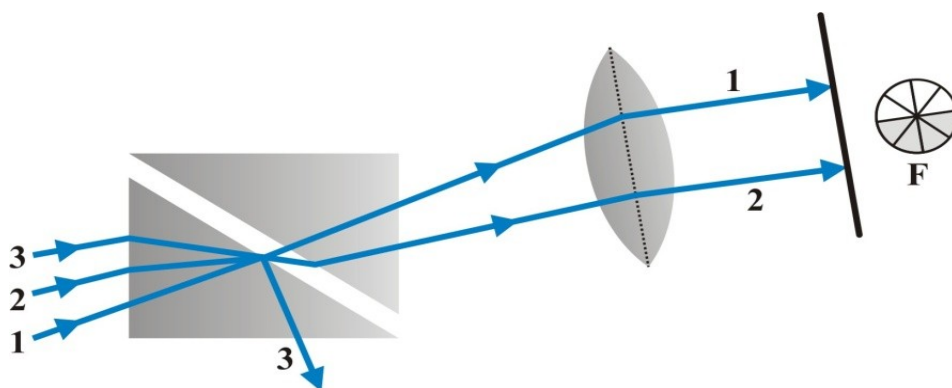
Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie diagramu fazowego ciecz-para w układzie dwu cieczy o nieograniczonej rozpuszczalności w warunkach izobarycznych. Metoda dynamiczna, którą stosujemy w tym ćwiczeniu, polega na ustaleniu składu cieczy i pary będącej z nią w równowadze w temperaturze wrzenia. Mieszaninę dwu cieczy o nieograniczonej rozpuszczalności doprowadzamy do wrzenia w aparaturze, która umożliwia pobieranie roztworu i kondensatu w trakcie wrzenia. Skład roztworu i kondensatu określany jest w oparciu o krzywą wzorcową wyznaczoną w pierwszej części ćwiczenia na podstawie pomiarów refraktometrycznych. W ćwiczeniu bada się jeden układ wskazany przez prowadzącego (może to być jedna z następujących mieszanin: aceton/chloroform, octan

etylu/chloroform, aceton/czterochlorek węgla, metanol/czterochlorek węgla, etanol/czterochlorek węgla, etanol/octan etylu).

Wyznaczanie krzywej wzorcowej

Przygotować dziewięć mieszanin substancji I i II o składach podanych w tabeli. Ciecze odmierzyć za pomocą pipet o pojemności 5 cm^3 . Jako ciecz I obrać substancję bardziej lotną (o niższej temperaturze wrzenia). Dla każdego roztworu wyznaczyć refraktrycznie współczynniki załamania światła, n_D^{20} , zgodnie z instrukcją obsługi refraktometru opisaną w ćwiczeniu 2 niniejszego skryptu. Schemat ideowy biegu promieni w refraktrometrze Abbego przedstawiono na Rys. 8. Promienie świetlne 1–3 ulegają na rozszczepieniu pryzmacie Nikola (wykonanym z kalcytu lub szkła ołowiowego o wysokim współczynniku załamania światła) na dwie składowe – promień zwyczajny (3), który ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu i dalej usunięciu z pryzmatu oraz promienie nadzwyczajne (1, 2), które wychodzą na zewnątrz pryzmatu i trafiają do okularu drgając w jednej płaszczyźnie (są spolaryzowane liniowo). Tak więc w rezultacie załamania i polaryzacji wiązki światła wchodzącej do aparatu pole obserwowane w okularze lunety podzielone jest na dwie części – jasną i ciemną.



Rysunek 8. Schemat biegu promieni w refraktrometrze Abbego. 1,2,3 – monochromatyczna wiązka promieni wchodzących; 1,2 – promienie nadzwyczajne (pomiarowe); 3 – promień zwyczajny (pochłonięty przez obudowę); F – okular lunety.

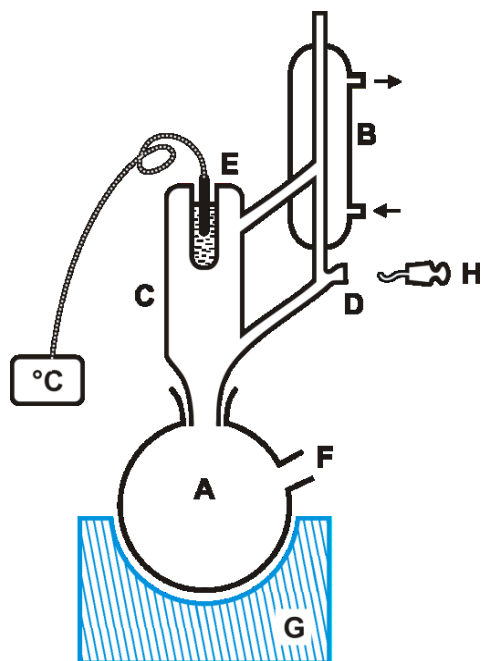
W oparciu o tablicową gęstość substancji I obliczyć jej ułamek molowy, X_I w każdym z roztworów. Uzyskane wyniki zestawzić w Tabeli 1.

Tabela 1. Tabela wyników do sporządzenia wykresu kalibracyjnego $n_D^{20} = f(X_I)$.

Nr roztworu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Składnik I (ml)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	czysty skł. I
Składnik II (ml)	czysty skł. II	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0
n_D^{20}											
X_I											

Wyznaczanie diagramu fazowego

Aparat do wyznaczania składu fazy ciekłej i gazowej mieszaniny w temperaturze wrzenia (patrz Rys. 9) składa się z kolby dwuszyjnej (A) o pojemności 250 ml i kolumny C połączonej z chłodnicą zwrotną B. W gnieździe E jest umieszczony termometr. Kolba jest ogrzewana płaszczem grzejnym G włączonym do sieci przez autotransformator, który pozwala regulować intensywność wrzenia cieczy.



Rysunek 9. Aparat do wyznaczania składu fazy ciekłej i gazowej mieszaniny w temperaturze wrzenia. A – kolba dwuszyjna; B – chłodnica zwrotna; C – kolumna; D – otwór do pobierania kondensatu; E – gniazdo termometryczne; F – otwór do pobierania roztworu; G – płaszcz grzejny; H – łódeczka.

Przygotować kolejne roztwory zgodnie z Tabelą 2, odmierzając poszczególne objętości składników I i II cylindrami miarowymi o pojemności 25 ml. Do kolby dwuszyjnej (A) wprowadzić pierwszą z mieszanin. Do kolby z roztworem wrzucić kaolin. Otwór do pobierania roztworu (otwór F) zatkać korkiem, natomiast otwór do pobierania kondensatu (otwór D) zatkać korkiem z łódeczką H, w taki sposób aby łódeczka była zorientowana dnem do góry. Kolbę podłączyć do pozostałej części aparatury i umieścić w płaszczu grzejnym. Włączyć przepływ wody w chłodnicy. Para przedostaje się do chłodnicy, gdzie ulega skropleniu, a kondensat spływa w dół przez kroplomierz. Kolbę należy ogrzewać aż do uzyskania w kroplomierzu od 50 do 100 kropeł na minutę. Z chwilą gdy ustali się temperatura wrzenia zanotować ją w Tabeli 2. Obrócić w otworze D łódeczkę H tak aby możliwe było nabranie kilku kropeł kondensatu. Zebrany kondensat przelać do próbowki. Po wyjęciu łódeczki w jej miejsce szybko włożyć drugą. Tym sposobem w próbowce zebrać 1–2 ml kondensatu. Następnie wyłączyć ogrzewanie i odstawić płaszcz grzejny. Gdy roztwór przestanie wrzeć pobrać z niego 1–2 ml roztworu do próbowki. Zmierzyć współczynniki załamania światła pobranego kondensatu oraz roztworu i wprowadzić te dane do Tabeli 2. W analogiczny sposób dla pozostałych mieszanin określić skład fazy gazowej i ciekłej w punkcie wrzenia. Zmierzyć również n_D^{20} czystych składników I i II, a ich temperatury wrzenia odczytać z tablic fizykochemicznych.

Roztwory po wykonaniu ćwiczenia wylewamy do butelki przeznaczonej na zlewki rozpuszczalnikowe.

Tabela 2. Wyniki pomiarów współczynnika załamania światła badanych roztworów.

Nr roztworu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Składnik I (ml)	0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0	22,5	czysty skł. I
Składnik II (ml)	czysty skł. II	22,5	20,0	17,5	15,0	12,5	10,0	7,5	5,0	2,5	0
n_D^{20} kondensat											
Y_I											
n_D^{20} roztwór											
X_I											
T_w (°C)											

Wykonanie sprawozdania

1. Wyniki zebrane w Tabeli 1 przedstawić graficznie – na osi odciętych odłożyć ułamki molowe, X_I , na osi rzędnych wartości n_D^{20} poszczególnych roztworów wzorcowych. Przeprowadzić regresję liniową uzyskując parametry a i b prostej $n_D^{20} = f(X_I)$.

2. Wykorzystać parametry a i b krzywej wzorcowej do określenia składu roztworu i kondensatu mieszanin z Tabeli 2. W tym celu należy skorzystać z równań prostych $n_D^{20}\text{kondensat} = f(Y_I)$ i $n_D^{20}\text{roztwór} = f(X_I)$:

$$Y_I = \frac{n_D^{20}\text{kondensat} - b}{a} \quad (5) \quad X_I = \frac{n_D^{20}\text{roztwór} - b}{a} \quad (5')$$

gdzie Y_I , X_I oznaczają odpowiednio ułamek molowy składnika I w kondensacie i w roztworze.

3. Sporządzić diagram fazowy wykreślając na jednym wykresie zależność temperatury wrzenia roztworu od ilości składnika lotniejszego w kondensacie (Y_I) i roztworze (X_I).

4. Na podstawie diagramu fazowego określić jakim rodzajem mieszaniny jest badany układ dwóch cieczy, tzn. czy jest to układ zeotropowy czy azeotropowy. Jeśli diagram przyjmuje kształt charakterystyczny dla azeotropu, z diagramu fazowego odczytać temperaturę wrzenia azeotropu, a z wykresu $Y_I = f(X_I)$ odczytać skład azeotropu w punkcie przecięcia z prostą o równaniu $y = x$.

5. W przypadku zidentyfikowania układu jako azeotrop porównać jego skład azeotropowy i temperaturę wrzenia z danymi literaturowymi.

Zakres wymaganych wiadomości:

Zeotropia, azeotropia dodatnia i ujemna – warunki występowania i przykłady; prawa Konowallowa; diagramy równowagi ciecż–para dla układów dwuskładnikowych

o nieograniczonej rozpuszczalności (izotermy i izobary); reguła dźwigni; destylacja frakcyjna układów zeotropowych i azeotropowych; Prawo Raoult'a; równanie Clausiusa–Clapeyrona; entalpia mieszania dla mieszanin azeotropowych; współczynnik załamania światła.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 5, 7, 8, 10

Słowniczek

Mieszanina zeotropowa (zeotrop)	Układ ciecz–para, w którym podczas destylacji roztworu dwóch lub więcej związków chemicznych skład cieczy jest zawsze inny niż skład pary nasyconej pozostającej z nią w równowadze. Na wykresach fazowych ilustrujących warunki równowagi termodynamicznej (izotermy i izobary) nie występują w tym przypadku punkty ekstremalne. Jest to konsekwencją niewielkich odchyłeń od prawa Raoult'a, wynikających z podobieństwa chemicznego poszczególnych składników mieszaniny (np. benzen–toluen, metanol–etanol).
Mieszanina azeotropowa (azeotrop)	Mieszania dwóch całkowicie mieszających się cieczy, która przy określonym ciśnieniu zewnętrznym wrze w określonej temperaturze, przy czym skład destylującej cieczy jest taki sam jak skład pary nasyconej pozostającej z nią w równowadze. Jest to konsekwencją znacznych odchyłeń od prawa Raoult'a, wynikających różnej budowy i chemicznej oddziaływań poszczególnych składników mieszaniny.
Azeotropy dodatnie	Mieszaniny azeotropowe wykazujące podczas destylacji ekstrema na wykresach fazowych: maksimum na izotermie (zależność ciśnienie–skład) oraz minimum na izobarze (zależność temperatura–skład). Przykładem a.d. są mieszaniny benzen–etanol, etanol–woda i inne.
Azeotropy ujemne	Mieszaniny azeotropowe wykazujące podczas destylacji ekstrema na wykresach fazowych: minimum na izotermie oraz maksimum na izobarze. Przykładem a.u. są roztwory kwasów beztlenowych w wodzie (np. HCl aq).
Destylacja prosta	Proces fizykochemiczny wykorzystujący różną temperaturę wrzenia składników wieloskładnikowej mieszaniny, polegający na jej rozdzielaniu poprzez jednorazowe odparowanie, a następnie skroplenie składników. Stosuje się w celu wyizolowania lub oczyszczenia jednego lub więcej związków składowych.
Destylacja frakcyjna	Proces wielostopniowy (kaskadowy) w aparaturze, która umożliwia jednoczesne wielokrotne odparowywanie i skraplanie cieczy. Istotą jest przeciwprądowy ruch fazy ciekłej i gazowej; destylat może być odbierany w formie frakcji różniących się składem.
Prawo Raoult'a	Równanie określające skład pary nasyconej nad cieczą o znanym składzie. Zgodnie z nim faza gazowa (para cieczy) będzie zawsze bogatsza od fazy ciekłej w składniki bardziej lotne, mające wyższe ciśnienie pary nasyconej i niższą temperaturę wrzenia.

Ćwiczenie 9

Wyznaczanie masy molowej makromolekul metodą osmometryczną

Własnościami koligatywnymi nazywamy właściwości roztworów rozcieńczonych, zależne wyłącznie od **liczby cząsteczek** i **masy cząsteczkowej** rozpuszczonych indywiduów chemicznych, nie zaś od ich natury (struktury) chemicznej.

Należą do nich:

- ciśnienie osmotyczne;
- podwyższenie temperatury wrzenia i obniżenie prężności par nad roztworem;
- obniżenie temperatury krzepnięcia.

Ciśnienie osmotyczne występuje w układzie, w którym roztwór oddzielony jest od czystego rozpuszczalnika błoną przepuszczalną dla cząsteczek rozpuszczalnika, zaś nieprzepuszczalną dla cząsteczek substancji rozpuszczonej. W układzie takim, na skutek różnic prężności par nad czystym rozpuszczalnikiem i nad roztworem, rozpuszczalnik wykazuje tendencję do przenikania przez błonę w kierunku od rozpuszczalnika do roztworu. W miarę postępu osmozy rośnie ciśnienie hydrostatyczne słupa roztworu. W stanie równowagi osmotycznej wartość ciśnienia hydrostatycznego równa jest wartości przeciwnie skierowanego ciśnienia osmotycznego. Dla roztworów doskonałych wielkość ciśnienia osmotycznego zależna jest od stężenia roztworu, nie zależy ona natomiast od rodzaju substancji rozpuszczonej.

Podwyższenie temperatury wrzenia roztworu w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem (ΔT_{wrz}) nazywamy **efektem ebulioskopowym**. Wyraża on się zależnością:

$$\Delta T_{\text{wrz}} = K_e \times m \quad (1)$$

gdzie: K_e – stała ebulioskopowa [K mol^{-1}]; m – molalność roztworu [mol kg^{-1}].

Obniżenie temperatury krzepnięcia roztworu w porównaniu z czystym (ΔT_{krz}) rozpuszczalnikiem nazywamy **efektem krioskopowym**:

$$\Delta T_{\text{krz}} = K_k \times m \quad (2)$$

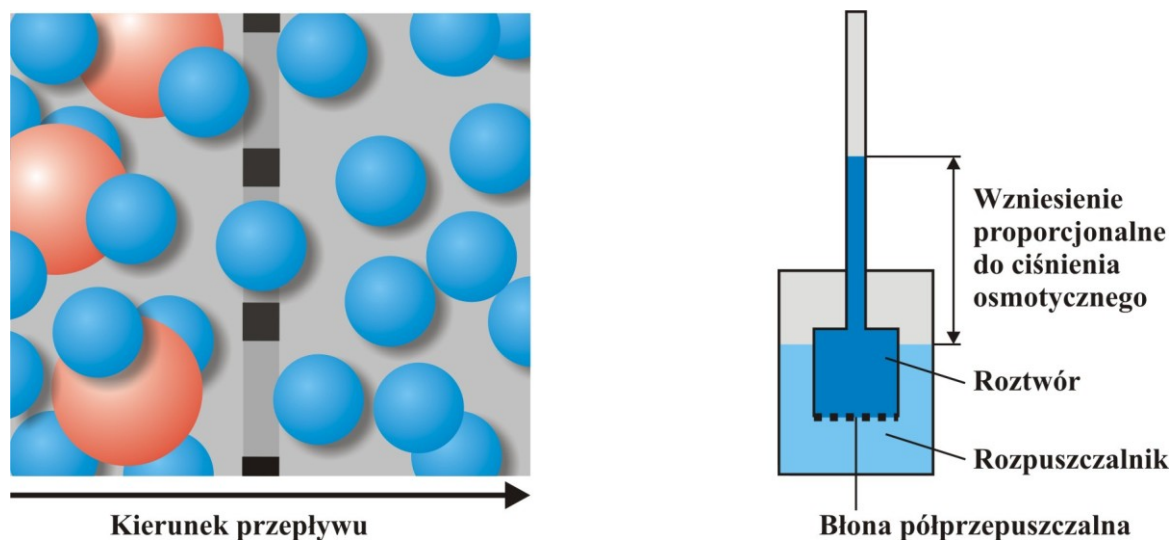
gdzie: K_k – stała krioskopowa (K/mol); m – molalność roztworu [mol kg^{-1}].

Zmiany temperatur są dużo większe dla temperatury krzepnięcia/topnienia niż dla temp. wrzenia, co wynika z różnic w zmianach entropii dla poszczególnych stanów.

Zjawiska tego typu związane są z równowagą w układach dwu- lub więcej składnikowych i dotyczą roztworów substancji nielotnych polimerów (na przykład białek lub

polisacharydów), soli nieorganicznych i innych. Powodem takiego zachowania roztworów są zjawiska asocjacji oraz solwatacji, wynikające z oddziaływań pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika z substancją rozpuszczoną. Pomiary osmometryczne oraz ebulliometryczne i kriometryczne pozwalają na wyznaczanie średniej masy cząsteczkowej makromolekuł.

Osmometria opiera się o wspomniane zjawisko osmozy, które zachodzi pomiędzy roztworem a czystym rozpuszczalnikiem przy założeniu, że są one oddzielone membraną półprzepuszczalną (rysunek 1):



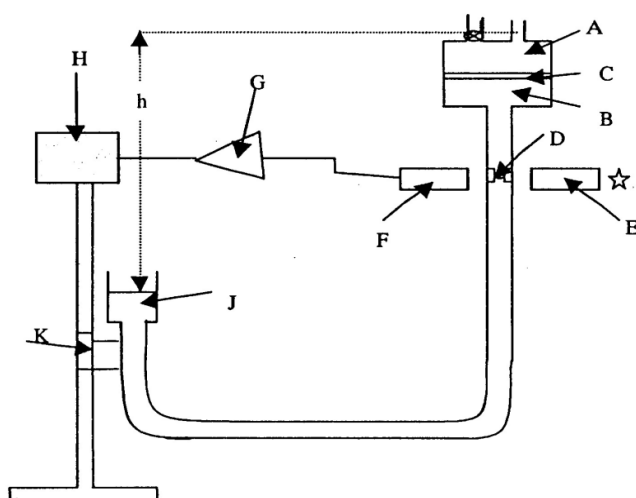
Rysunek 1. Działanie błony półprzepuszczalnej (lewy rysunek). Powstawanie ciśnienia osmotycznego (prawy rysunek).

Z powodu obecności błony dochodzi do „przeciwego” w stosunku do klasycznej dyfuzji zachowania cząsteczek. Zamiast naturalnego dążenia układu do wyrównania stężenia substancji rozpuszczonej następuje wędrówka cząsteczek rozpuszczalnika w kierunku roztworu. Układ dąży do stanu równowagi poprzez rozcieńczenie substancji rozpuszczonej. Przepływ rozpuszczalnika zachodzi do momentu wyrównania potencjałów chemicznych, zarówno rozpuszczalnika jak i substancji rozpuszczonej, po obu stronach przegrody. Objawem zjawiska jest wzrost objętości roztworu, powodujący zmniejszenie stężenia substancji nierozpuszczonej. Proces osmozy w układzie jest samorzutny; można go zahamować, a nawet odwrócić działając zewnętrznym ciśnieniem, większym od ciśnienia jakie panuje po stronie rozpuszczalnika (tak zwana odwrócona osmoza).

Zjawisko osmozy z jednej strony definiuje się w oparciu o ilość rozpuszczalnika, która przemieszcza się przez membranę do roztworu, powodując jego rozcieńczenie. Stan równowagi osiągany jest w momencie, w którym w roztworze jest tak dużo rozpuszczalnika, że stężenie substancji rozpuszczonej jest „pomijalnie” niskie. Z drugiej strony rozpuszczenie

makromolekuły czy soli powoduje obniżenie prężności pary nad roztworem. W tym przypadku na przepływ rozpuszczalnika przez membranę można popatrzeć jako na dążenie układu do przywrócenia prężności par charakterystycznej dla czystego rozpuszczalnika. Te dwa aspekty znajdują odzwierciedlenie w technikach pomiarowych i budowie urządzeń.

Obecnie na rynku dostępne są dwa typy osmometrów: membranowe i parowe. Zasadniczą częścią osmometru membranowego, wykorzystywanego w niniejszym ćwiczeniu są dwie komory przedzielone membraną przenikliwą tylko dla cząsteczek o określonej masie molowej (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat ideowy osmometru membranowego.

Główną częścią osmometru jest komora z roztworem A, komora z rozpuszczalnikiem B, oddzielone od siebie błoną półprzepuszczalną C. Komora B jest połączona ze zbiorniczkiem J zawierającym nadmiar rozpuszczalnika rurką, w której znajduje się pęcherzyk powietrza D. Zbiorniczek J jest umieszczony na uchwycie K, który jest przesuwany w górę lub w dół przez motor H. Gdy w komorze B wzrośnie ciśnienie, pęcherzyk D przesunie się w dół i natychmiast przez urządzenie, złożone ze źródła światła i detektora optycznego F oraz przetwornika elektronicznego G zostaje przekazany impuls prądowy do silnika, tak że zbiorniczek J zostaje podniesiony. Gdy wysokość zbiorniczka będzie dostatecznie duża, to pęcherzyk zacznie się poruszać w dół i impuls prądowy zmieni kierunek obrotów silnika. Zbiorniczek osiąga stan równowagi w czasie kilku minut. Wysokość równowagową h odczytuje się bezpośrednio na mierniku przyrządu. Po dokonaniu pomiaru dla jednego stężenia, strzykawką wprowadza się roztwór o innym stężeniu do komory A i dokonuje kolejnego pomiaru. Zaletą krótkiego czasu ustalania się równowagi w osmometrach automatycznych jest to, iż nie zdąży w tym czasie zajść dyfuzja małych makrocząsteczek i zakres stosowalności metody jest szerszy niż w klasycznej osmometrii. W każdego typu osmometrach zasadnicza część aparatu powinna być termostatowana (układ służący do tego celu pominięto w powyższym opisie).

Osmometrami membranowymi można mierzyć ciśnienia do około $0,1 \text{ mmH}_2\text{O}$, co w praktyce pozwala badać masy cząsteczkowe polimerów na poziomie 10^4 – 10^6 g/mol . Dolny zakres pomiarowy zależy od porowatości membrany. Przepuszczalność membrany uzależniona jest od jej budowy: czy ma ona system porów (materiały nieorganiczne), czy też

jest sitem molekularnym (substancje organiczne) i jest wyrażona najwyższą masą cząsteczkową substancji, jaką membrana jeszcze przepuszcza (ang.: *molecular weight cut off* – *MWCO*). Prawidłowość wyników uzyskiwanych metodą osmometryczną w decydującej mierze uzależniona jest od jakości membrany. Teoretycznie membrana półprzepuszczalna przepuszcza tylko cząsteczki rozpuszczalnika. W praktyce jednak wszystkie membrany, w mniejszym lub większym stopniu, przepuszczają także cząsteczki polimerów o niskich masach cząsteczkowych. Dyfuzja przez membranę niskocząsteczkowych frakcji polimeru powoduje stopniowy spadek stężenia polimeru w roztworze, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia ciśnienia osmotycznego i zawyżenia obliczanej wartości masy cząsteczkowej. Istnieje szereg metod, które ilościowo pozwalają oznaczyć stężenie polimeru, który przedyfundował przez błonę półprzepuszczalną, jak również wnieść odpowiednie poprawki. Wyniki obarczone najmniejszymi błędami uzyskuje się jednakże tylko w przypadku oznaczeń mas cząsteczkowych polimerów pozbawionych frakcji niskocząsteczkowych (względnie monodispersyjnych). Przed przystąpieniem do oznaczania ciśnienia osmotycznego wskazane jest przeprowadzenie wstępnych pomiarów przepuszczalności membrany względem rozpuszczalnika – ich przepuszczalność względem różnych rozpuszczalników nie jest bowiem jednakowa. Pozwala to dobrać najbardziej odpowiednie środowisko, a także określić szybkość osiągnięcia przez układ stanu równowagi.

Na innej zasadzie pracuje osmometr parowy, gdzie mierzony jest efekt cieplny kondensacji par rozpuszczalnika na kropli czystego rozpuszczalnika i badanego roztworu. Jeżeli układ znajduje się w stanie równowagi (w określonej temperaturze), to szybkość parowania rozpuszczalnika równa jest szybkości kondensacji. Jeżeli w komorze wypełnionej oparami rozpuszczalnika umieszczona będzie kropla roztworu, to w wyniku różnicy prężności par dojdzie do wytworzenia różnicy temperatur. Na powierzchni kropli roztworu następować będzie intensywna kondensacja par rozpuszczalnika, co spowoduje wzrost temperatury. Wspomniana różnica temperatur jest podstawą pomiaru w osmometrze parowym. Przyrządami tymi można dokonywać pomiarów mas cząsteczkowych w zakresie około 10^2 – 10^4 g mol⁻¹.

Wyniki doświadczeń uzyskanych na drodze pomiaru ciśnienia osmotycznego (π) analizuje się w oparciu o tzw. równanie wirialu, które kojarzone jest ze stanem gazu rzeczywistego. Zasadność takiego podejścia związana jest z istotą oddziaływań pomiędzy cząsteczkami, które poruszając się ruchem chaotycznym zderzają się ze sobą. Zjawiska te ujmuje poniższe równanie:

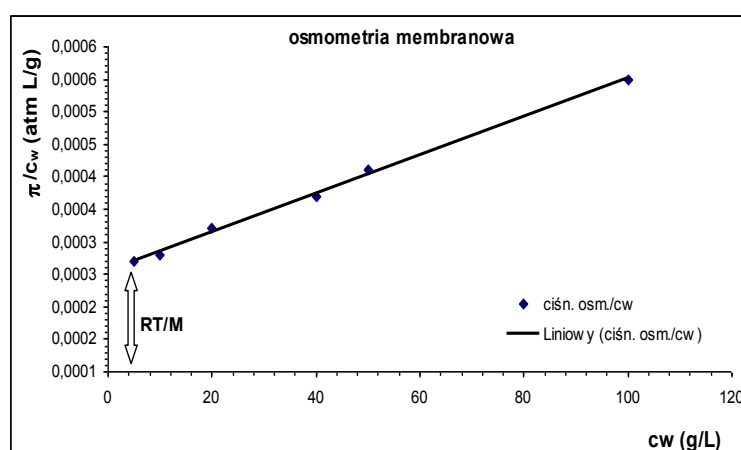
$$p = \frac{RT}{V} [1 + B_2(T) \times p + B_3(T) \times p^2 + \dots] \quad (3)$$

Wielkości $B_2(T)$, $B_3(T)$ noszą nazwę odpowiednio drugiego i trzeciego współczynnika wirialnego i są miarą oddziaływań pomiędzy dwiema i trzema molekułami. Równanie to można potraktować jako równanie stanu gazu doskonałego korygowane o składniki sumy, które uwzględniają oddziaływania międzycząsteczkowe.

W przypadku roztworów ciekłych można dokonać podobnej interpretacji: molekuly polimeru są nieporównywalnie większe od cząsteczek rozpuszczalnika. W ten sposób rozpuszczalnik staje się „tłem” dla substancji rozpuszczonej, co stanowi analogię do gazu rzeczywistego. W przypadku ciśnienia osmotycznego można zapisać:

$$\pi = c_w \frac{RT}{M} [1 + A_2(T) \times c_w + A_3(T) \times c_w^2 + \dots] \quad (4)$$

Współczynniki $A_2(T)$, $A_3(T)$ to drugi i trzeci współczynnik wirialu, c_w to stężenie masowe substancji rozpuszczonej, natomiast M to masa cząsteczkowa rozpuszczonej makromolekuly. Współczynniki wirialne są funkcją temperatury i tak jak poprzednio opisują oddziaływania międzycząsteczkowe. Dodatnie wartości współczynnika $A_2(T)$ świadczą o powinowactwie makrocząsteczki do rozpuszczalnika, czyli jej lepszej lub gorszej rozpuszczalności, natomiast jego ujemne wartości o tendencji do agregacji cząsteczek w danym środowisku. W przypadku roztworów rozcieńczonych uzyskane wyniki analizuje się z uwzględnieniem drugiego współczynnika wirialnego. Dane doświadczalne (π/c_w) powinny układać się wzdłuż prostej, która po ekstrapolacji do zerowego stężenia biopolimeru przecina oś odciętych w punkcie RT/M (Rys. 3):



$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{c_w} = \frac{RT}{M}$$

Rysunek 3. Graficzne wyznaczanie masy cząsteczkowej polimeru.

Współczynnik kierunkowy otrzymanej prostej posiada sens drugiego współczynnika wirialnego, $A_2(T)$. Wyniki pomiarów masy cząsteczkowej metodą osmotyczną są niezależne od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika, podczas gdy nachylenie tych prostych

(wartość $A_2(T)$) jest zależne od rodzaju użytego rozpuszczalnika. Dla „dobrych” rozpuszczalników nachylenie prostych jest większe niż dla rozpuszczalników „złych”.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest pomiar ciśnienia osmotycznego roztworów wybranych biomolekuł (surowiczej albuminy wołowej (BSA) lub albuminy białka jaja kurzego (CA)). Otrzymane wyniki posłużą do wyznaczenia liczbowo uśrednionej masy cząsteczkowej oraz wartości drugiego współczynnika wirialu dla badanych układów. Pomiary wykonuje się za pomocą osmometru membranowego (Fot. 1).



Fotografia 1. Osmometr membranowy *Osmomat 050* firmy *Gonotec* wykorzystywany do wyznaczania masy cząsteczkowej polimerów.

1. Przygotować 6–8 roztworów wybranego polimeru (BSA lub CA) w we fiolkach typu „penicylinówki”. W tym celu rozcieńczać roztwór wyjściowy („stock solution”) o stężeniu około 50 g L^{-1} roztworem Ringera tak, żeby uzyskać każdorazowo 2 ml roztworu polimeru o stężeniach z przedziału $5\text{--}50 \text{ g L}^{-1}$.
2. Określić rzeczywiste stężenie białka metodą spektrofotometryczną. W tym celu dokonać pomiarów absorbancji (A) promieniowania przy długości fali 277 nm w spektrofotometrze UV-Vis (*Lambda 40* firmy *Perkin Elmer*) dla roztworu o stężeniu $c_w = 5 \text{ g L}^{-1}$ (BSA) oraz $c_w = 2,5 \text{ g L}^{-1}$ (CA), stosując jako układ odniesienia roztwór Ringera.
3. Wykonać pomiary ciśnienia osmotycznego wg instrukcji dołączonej do przyrządu oraz wskazówek prowadzącego.

Wykonanie sprawozdania

1. Sporządzić notatkę informacyjną o badanym białku.
2. Dla kolejnych stężeń białka obliczyć średnie wartości ciśnienia osmotycznego (w mmHg oraz kPa).
3. Na podstawie zmierzonej wartości absorbancji oraz wartości współczynnika ekstynkcji (przekroju czynnego cząsteczek) wynoszącego $\varepsilon = 6,04 \text{ dm}^2 \text{ g}^{-1}$ dla BSA oraz $\varepsilon = 7,50 \text{ dm}^2$

g^{-1} dla CA wyznaczyć rzeczywiste stężenie roztworów białka (zakładamy proporcjonalną (liniową) zmianę A w stosunku do c_w w badanym zakresie stężeń).

4. Obliczyć, na podstawie kolejnych punktów pomiarowych, średnie wartości masy cząsteczkowej (M , g/mol) badanego biopolimeru korzystając z zależności (6):

(pamiętaj o uzgodnieniu jednostek!)

$$\pi = \frac{c_w}{M} \times RT \quad (6)$$

Otrzymane wyniki uśrednić, podać średnią masę cząsteczkową (M_{sr}), odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe (wskaźnik rozbieżności, % RSD).

5. Obliczyć wyrazy π/c_w i wykonać wykres $\pi/c_w = f(c_w)$. Zlinearyzować go, podać równanie prostej oraz współczynnik korelacji punktów (R^2).

6. Obliczyć masę cząsteczkową polimeru na podstawie uzyskanego wykresu, przyrównując wyraz wolny równania prostej do wyrażenia RT/M .

7. Dla otrzymanych wartości masy cząsteczkowej z obu metod przeprowadzić rachunek błęd. Obliczyć średni błąd procentowy, biorąc literaturowe średnie wartości mas cząsteczkowych badanych białek ($M_{\text{BSA}} = 66500 \text{ Da}$, $M_{\text{CA}} = 45000 \text{ Da}$).

8. Określić na podstawie wartości współczynnika kierunkowego otrzymanej prostej wartość drugiego współczynnika wirialnego ($A_2(T)$), podać jego wymiar.

9. Przeprowadzić dyskusję merytoryczną uzyskanych wyników. Omówić błędy pomiarowe i ich przyczyny).

Zakres wymaganych wiadomości

Ciśnienie osmotyczne i jego pomiar; efekt ebulioskopowy; efekt krioskopowy; odmiany mas cząsteczkowych polimerów; osmometr membranowy.

Pozycje wykazu literatury: 1–6, 10, 11, 13, 15

Słowniczek

Ciśnienie osmotyczne	Różnica ciśnień wywieranych na półprzepuszczalną membranę przez dwie ciecz, które ta membrana rozdziela. Przyczyną pojawienia się ciśnienia osmotycznego jest różnica stężeń związków chemicznych lub jonów w roztworach po obu stronach membrany i dążenie układu do ich wyrównania.
-----------------------------	---

Właściwości koligatywne roztworów	Niektóre właściwości fizykochemiczne roztworów, które zależą tylko od ilości substancji nierotnej (jej stężenia w układzie), a nie są zależne od rodzaju substancji rozpuszczonej. Należą do nich: ciśnienie osmotyczne, obniżenie prężności pary nad roztworem oraz efekt ebulioskopowy i krioskopowy.
Masa cząsteczkowa polimerów	Stosuje się w tym przypadku pojęcie średniej masy cząsteczkowej (molowej). Może być ona obliczana jako średnia arytmetyczna lub średnia geometryczna masy poszczególnych cząsteczek w populacji. Rodzaje mas cząsteczkowych polimerów: M. cz. średnia liczbowa: $M_n = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n N_i M_i$ gdzie N_i to liczba cząsteczek o masie M_i, zaś N to całkowita liczba wszystkich cząsteczek w próbce. M. cz. średnia masowo (wagowo): $M_w = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^n m_i M_i$ gdzie m_i to łączna masa cząsteczek o masie cząsteczkowej M_i, zaś m to masa całej próbki.

ZJAWISKA POWIERZCHNIOWE I KOLOIDY

Ćwiczenie 10

Adsorpcja gazów na ciałach stałych – wyznaczanie izotermy BET

We wnętrzu każdej z faz: stałej, ciekłej oraz gazowej, pomiędzy cząsteczkami działają siły spójności, które się równoważą. Na granicy faz, na cząsteczki (atomy lub jony) działają nie zrównoważone siły powierzchniowe, dzięki czemu na powierzchni granicznej ma miejsce zmiana ilości cząsteczek (atomów lub jonów) substancji – czyli zmiana stężenia – w stosunku do wnętrza sąsiadujących faz. Następuje zatem gromadzenie się substancji na powierzchni jednej z faz. Zjawisko to nazywamy **adsorpcją**, substancję adsorbującą – **adsorbentem** – natomiast substancję ulegającą adsorpcji – **adsorbatem**. Nie należy mylić procesu adsorpcji z procesem **absorpcji**, w którym następuje przenikanie substancji z jednej fazy do wnętrza drugiej.

Procesy adsorpcyjne możemy podzielić uwzględniając wielkość powierzchni adsorbentu oraz rozmiar jego cząstek, sposób oddziaływania adsorbentu z powierzchnią adsorbentu oraz rodzaj graniczących faz w układzie adsorbent – adsorbat. Mając na uwadze rodzaj sił działających pomiędzy adsorbentem a adsorbatem możemy wyróżnić adsorpcję fizyczną oraz adsorpcję chemiczną.

Adsorpcja fizyczna (inaczej: fizysorpcja) ma miejsce wówczas, gdy między powierzchnią adsorbentu a cząsteczkami adsorbentu występują oddziaływania międzycząsteczkowe (oddziaływania van der Waalsa, wiązania wodorowe). Poprzez te siły mogą również oddziaływać między sobą cząsteczki adsorbentu, dzięki czemu na powierzchni pierwszej warstwy adsorpcyjnej mogą się gromadzić kolejne warstwy adsorbentu – z tego powodu mówimy, iż adsorpcja fizyczna ma charakter wielowarstwowy.

Adsorpcja chemiczna (inaczej: chemisorpcja) zachodzi w wyniku tworzenia się silnych wiązań chemicznych (lub oddziaływań elektrostatycznych w przypadku jonów) pomiędzy powierzchnią adsorbentu i cząsteczkami adsorbentu. W wyniku chemisorpcji na powierzchni adsorbentu może się zaadsorbować jedynie jedna warstwa adsorbentu, a cząsteczki z kolejnych warstw adsorbentu oddziałują ze sobą tak jak ma to miejsce w adsorpcji fizycznej.

Najważniejsze różnice między adsorpcją fizyczną a chemiczną są następujące:

a) adsorpcja fizyczna jest procesem związanym z niewielkim efektem energetycznym (do około 50 kJ mol^{-1} adsorbentu), natomiast w przypadku adsorpcji chemicznej wydzielą się ciepło porównywalne z ciepłem przeciętnej reakcji chemicznej (do około 500 kJ/mol

adsorbentu),

b) adsorpcja fizyczna jest całkowicie odwracalna (poprzez zmniejszenie ciśnienia lub stężenia adsorbentu oraz podwyższenie temperatury) natomiast chemisorpcja na ogół jest procesem nieodwracalnym (w wyniku desorpcji często stwierdza się produkty reakcji chemicznej pomiędzy adsorbentem i adsorbentem),

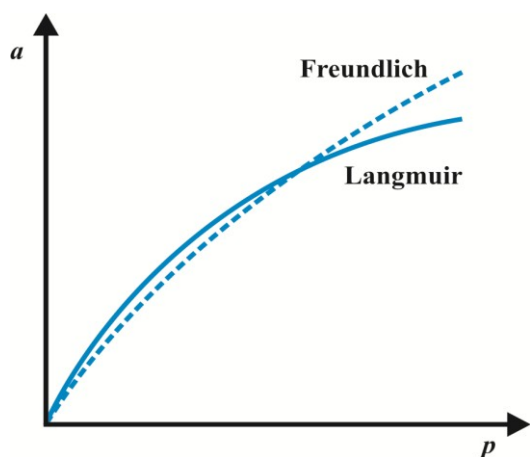
c) adsorpcja chemiczna zachodzi w ze ściśle określoną energią aktywacji, istnieje zatem pewien zakres temperatur, w których obserwuje się ten proces, co nie dotyczy adsorpcji fizycznej,

d) w przypadku adsorpcji chemicznej na powierzchni adsorbentu powstaje jednocząsteczkowa warstwa adsorbentu, adsorpcja fizyczna zaś ma charakter wielowarstwowy,

e) adsorpcja fizyczna jest procesem niespecyficznym (może przebiegać w dowolnych układach adsorbent – adsorbat), natomiast adsorpcja chemiczna jest procesem wysoko specyficznym (na przykład: kataliza).

Mając na uwadze podział procesów adsorpcyjnych ze względu na rodzaj graniczących faz należy mieć na uwadze, że mogą one zachodzić w układach typu adsorbent – adsorbat na granicach faz w układach: ciało stałe – gaz, ciało stałe – ciecz, ciecz – gaz oraz ciecz – ciecz. Ze względów praktycznych najważniejsze znaczenie ma adsorpcja substancji z roztworów na stałym adsorbencie oraz adsorpcja par i gazów na powierzchni ciał stałych, które mają miejsce podczas takich procesów jak chromatografia czy kataliza.

W celu ilościowego opisu zjawiska adsorpcji zazwyczaj stosuje się metody, które umożliwiają wyznaczenie zależności ilości substancji zaadsorbowanej (a) przez jednostkową masę (najczęściej 1g) adsorbentu od stężenia lub ciśnienia adsorbentu, dla procesu przebiegającego w stałej temperaturze. Funkcja opisująca zależność tą jest nazywana równaniem izoterm adsorpcji, a wykres – izotermą adsorpcji (Rysunek 1).



Rysunek 1. Przebieg izoterm Freundlicha oraz Langmuira.

Oprócz izoterm, w celu charakterystyki procesów adsorpcyjnych stosuje się inne zależności,

głównie równania izoster (stała ilość zaadsorbowanej substancji) oraz równania izobar (stałe ciśnienie adsorbentu).

Adsorpcja na granicy faz ciało stałe (adsorbent) – ciecz (adsorbat) jest procesem złożonym. W procesie tym należy uwzględnić oddziaływania pomiędzy poszczególnymi składnikami roztworu (rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej), jak również pomiędzy adsorbentem, a każdym ze składników roztworu. Należy mieć również na uwadze, iż podczas zmiany stężenia roztworu, zmienia się ilość poszczególnych składników roztworu na powierzchni adsorbentu.

Do opisu zjawiska adsorpcji substancji z roztworów na stałym adsorbencie najczęściej stosuje się empiryczne równanie izotermy Freundlicha:

$$a = k \times c^{\frac{1}{n}} \quad (1)$$

gdzie:

a – ilość substancji zaadsorbowanej z roztworu przypadająca na jednostkę masy (1 g) adsorbentu,

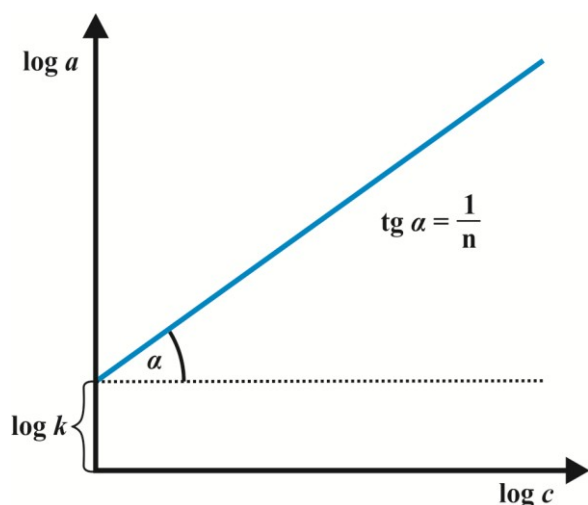
c – stężenie molowe substancji ulegającej adsorpcji

k oraz n – stałe charakterystyczne dla danego adsorbentu i adsorbentu,

Wykreślając zależność $a = f(c)$ otrzymuje się krzywą (Rys. 1). Powyższe równanie często jest wyrażane w postaci logarytmicznej:

$$\log a = \log k + \frac{1}{n} \log c \quad (2)$$

Jeżeli dane eksperymentalne spełniają równanie izotermy Freundlicha, to wykreślając zależność: $\log a = f(\log c)$, którą opisuje prosta (Rys. 2), jesteśmy w stanie wyznaczyć wartości stałych k oraz n .



Rysunek 2. Wykres izotermy Freundlicha w postaci liniowej.

Zjawisko adsorpcji na granicy faz ciało stałe (adsorbent) – gaz (adsorbat) jest zależne od takich czynników jak: rodzaj adsorbentu, rodzaj adsorbentu, wielkość powierzchni właściwej adsorbentu, temperatura oraz ciśnienie. Adsorpcja jest tym większa, im większa jest powierzchnia właściwa adsorbentu. Do opisu zjawiska adsorpcji par i gazów na powierzchni ciał stałych stosuje się kilka rodzajów izoterm adsorpcji. Najczęściej do opisu tego zjawiska stosuje się równania izoterm adsorpcji Langmuira oraz BET.

Wyznaczając równanie izoterm Langmuira zakłada się, że na powierzchni adsorbentu znajduje się określona liczba centrów adsorpcyjnych, a na każdym z tych centrów może się zaadsorbować tylko jedna cząsteczka adsorbentu, tworząc jednocząsteczkową warstwę adsorpcyjną, ciepło adsorpcji przypadające na jedną cząsteczkę jest niezależne od stopnia obsadzenia powierzchni, a pomiędzy cząsteczkami zaadsorbowanymi oraz niezaadsorbowanymi ustala się równowaga o charakterze dynamicznym. Analizując kinetykę procesów adsorpcji i desorpcji, podczas wyznaczania izoterm adsorpcji Langmuira (Rys. 1) zakłada się, że szybkość adsorpcji (v_{ads}) jest proporcjonalna do ciśnienia gazu oraz ułamka powierzchni obsadzonej przez adsorbat:

$$v_{ads} = k_1 \times p(1 - W) \quad (3)$$

a szybkość desorpcji (v_{des}) jest proporcjonalna do ułamka powierzchni obsadzonej:

$$v_{des} = k_2 \times W \quad (4)$$

gdzie:

k_1 – stała szybkości adsorpcji, k_2 – stała szybkości desorpcji, W – ułamek powierzchni obsadzonej przez adsorbat, p – ciśnienie w układzie.

W stanie równowagi szybkość adsorpcji równa jest szybkości desorpcji:

$$v_{ads} = v_{des} \quad (5)$$

czyli:

$$k_1 \times p(1 - W) = k_2 \times W \quad (6)$$

Ułamek powierzchni zajętej przez adsorbat wynosi:

$$W = \frac{a}{a_m} \quad (7)$$

gdzie:

a – ilość substancji zaadsorbowanej przez jednostkową masę adsorbentu, a_m – ilość substancji adsorbowanej przez jednostkową masę adsorbentu, niezbędną do pokrycia całkowitej powierzchni adsorbentu warstwą jednocząsteczkową,

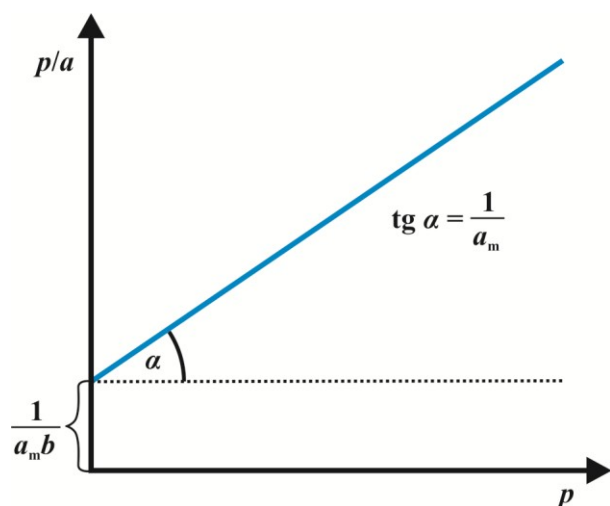
$$\text{stąd: } \frac{p}{a} = \frac{1}{a_m} \times p + \frac{1}{a_m \cdot b} \quad (8)$$

Wielkość $b = \frac{k_1}{k_2}$ jest nazywana **współczynnikiem adsorpcji**, który zależy od standardowego molowego ciepła adsorpcji (ΔH_{ads}^0):

$$b = B \times e^{\frac{-\Delta H_{ads}^0}{RT}} \quad (9)$$

gdzie: B – stała charakterystyczna dla danego procesu, R – stała gazowa, T – temperatura w Kelwinach.

Jeżeli dane eksperymentalne spełniają równanie izotermy Langmuira, to wykreślając zależność $\frac{p}{a} = f(p)$ uzyskuje się prostą (Rys. 3), pozwalającą na wyznaczenie a_m oraz współczynnika adsorpcji b , dzięki czemu możemy wyznaczyć ilość centrów aktywnych przypadających na jednostkę wagową adsorbentu.



Rysunek 3. Wykres izotermy Langmuira w postaci liniowej

Izoterma Langmuira dość dobrze opisuje proces adsorpcji chemicznej, natomiast słabo oddaje przebieg adsorpcji fizycznej, dlatego też do opisu adsorpcji fizycznej par i gazów na powierzchni ciał stałych zwykle stosuje się równanie izotermy BET.

Izoterma BET (skrót BET wywodzi się od pierwszych liter nazwisk uczonych: Brunauera, Emmetta oraz Tellera, którzy wyprowadzili równanie tej izotermy) stanowi prosty model służący do opisu adsorpcji par i gazów na stałym adsorbencie. Wyznaczając równanie izotermy BET zakłada się, że powierzchnia adsorbentu jest jednorodna, cząsteczki pierwszej warstwy adsorbentu oddziałują z adsorbentem nie przemieszczając się po jego powierzchni i stanowią centra aktywne dla kolejnych warstw adsorbentu a ciepło adsorpcji pierwszej warstwy adsorpcyjnej jest różne od ciepła adsorpcji kolejnych warstw, dla których przyjmuje się, że ciepło adsorpcji jest równe ciepłu kondensacji (skraplania). Uwzględniając powyższe

założenia wyprowadzono równanie izotermy adsorpcji wielowarstwowej BET:

$$\frac{p}{a(p_0 - p)} = \frac{1}{C \times a_m} \times [1 + (C - 1) \cdot \frac{p}{p_0}] \quad (10)$$

które można przedstawić w postaci:

$$a = \frac{C \times a_m \times \frac{p}{p_0}}{(1 - \frac{p}{p_0}) \times [1 + (C - 1) \times \frac{p}{p_0}]} \quad (11)$$

gdzie:

a – ilość substancji zaadsorbowanej przez jednostkową masę (1 g) adsorbentu pod ciśnieniem p , a_m – ilość substancji zaadsorbowanej przez jednostkową masę (1 g) adsorbentu odpowiadająca jednej warstwie monomolekularnej, p – ciśnienie w układzie, p_0 – ciśnienie (prężność) nasyconej pary adsorbentu w temperaturze pomiaru, C – stała związana wykładniczo z różnicą między ciepłem adsorpcji w pierwszej monowarstwie, a ciepłem kondensacji (skraplania) adsorbentu:

$$C = e^{\frac{(H_0 - H_k)}{RT}} \quad (12)$$

gdzie: H_0 – ciepło adsorpcji w pierwszej warstwie, H_k – ciepło skraplania adsorbentu, R – stała gazowa, T – temperatura w Kelwinach.

Adsorpcji na powierzchni ciała stałego ulega gaz, zatem równanie izotermy BET można przekształcić do postaci:

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{V(1 - \frac{p}{p_0})} = \frac{(C - 1)}{V_m \cdot C} \times \frac{p}{p_0} + \frac{1}{V_m \cdot C} \quad (13)$$

gdzie:

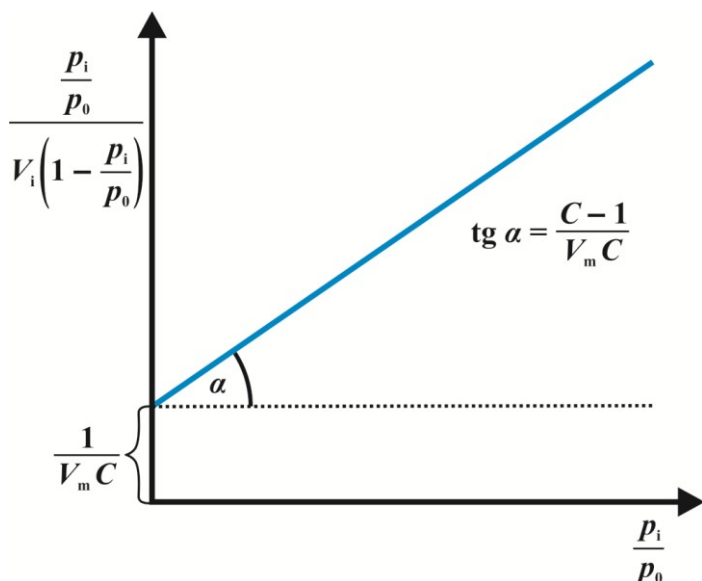
V – objętość zaadsorbowanego gazu, V_m – objętość gazu potrzebna do całkowitego pokrycia powierzchni adsorbentu warstwą jednocząsteczkową.

Sporządzając wykres zależności:

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{V(1 - \frac{p}{p_0})} = f(\frac{p}{p_0}) \quad (14)$$

uzyskuje się prostą, pozwalającą na wyznaczenie wartości C i V_m . (Rys. 4). Należy mieć jednak na uwadze, iż liniowość wykresu izotermy BET jest zwykle zachowana w zakresie niewielkich ciśnień: $0,05 < p/p_0 < 0,3$ – w pozostałym zakresie przebieg ten jest zazwyczaj nieliniowy, co wynika z założeń przyjętych podczas wyprowadzania równania izotermy BET

(Rys. 5). Jeśli więc wykres nie jest liniowy, wówczas metodą najmniejszych kwadratów wyznaczamy równanie prostej jedynie dla prostoliniowego odcinka izotermy BET.



Rysunek 4. Wykres izotermy BET.

Wyznaczając z równania izotermy BET wartości C i V_m można – uwzględniając powierzchnię przekroju czynnego cząsteczek adsorbentu (s^0), nazywaną powierzchnią osadzania (Tab. 1) – wyznaczyć **powierzchnię właściwą adsorbentu**, czyli jeden z głównych parametrów charakteryzujących właściwości adsorpcyjne substancji.

Tabela 1. Wielkość powierzchni osadzania (s^0) oraz prężności pary nasyconej (p_0) wybranych adsorbatów w temperaturze 20°C.

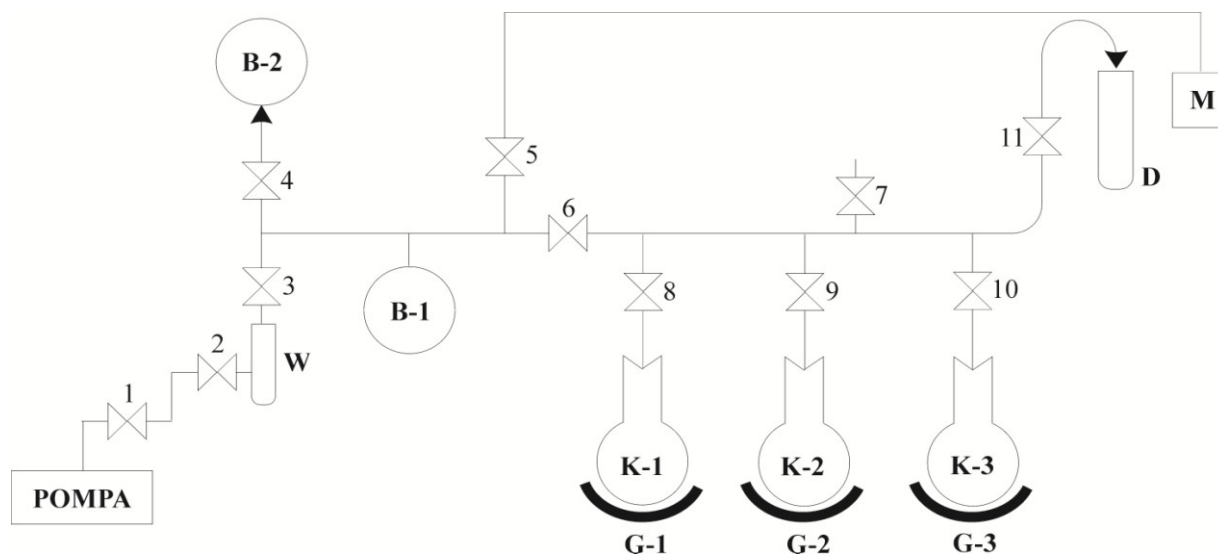
Adsorbat	s^0 [m ²]	p_0 [mmHg]
<i>n</i> -pentan	$5,23 \cdot 10^{-19}$	489
<i>n</i> -heksan	$5,82 \cdot 10^{-19}$	147
eter dietylowy	$4,99 \cdot 10^{-19}$	442

Wykonanie pomiarów

Przygotowanie aparatury

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia należy odpowiednio przygotować aparaturę służącą do badania procesu adsorpcji metodą BET (Rys. 5). W tym celu należy:

1. Wyrzekać adsorbenty w temperaturze ok. 500°C oraz pod zmniejszonym ciśnieniem przez około 1–2 godziny.
2. Wyrzane kolby z adsorbentami pozostawić pod zmniejszonym ciśnieniem (zamknięte krany 8, 9 i 10) celem ostygnięcia do temperatury otoczenia, w której wykonuje się pomiary.
3. Podczas wygrzewania postępować jak opisano poniżej.



Rysunek 5. Schemat aparatury do badania procesu adsorpcji metodą BET: B-1, B-2 – naczynia buforowe, K-1, K-2, K-3 – kolby z adsorbentami, G-1, G-2, G-3 – płaszcze grzejne, POMPA – rotacyjna pompa próżniowa, W – wymrażarka, M – manometr, D – dozownik adsorbentu (biureta), 1–11 – krany.

Uruchomienie aparatury

1. Przed włączeniem pompy rotacyjnej P kran 1 zostawić otwarty a kran 3 zamknięty; krany 7, 8, 9, 10 i 11 pozostawić zamknięte, natomiast pozostałe krany – otwarte.
2. Po włączeniu pompy zamknąć kran 1, otworzyć kran 3 i obniżyć ciśnienie wewnątrz aparatury do stałej wartości (0,0 – 3,0 mmHg) odczytanej z manometru M.
3. Sprawdzić szczelność aparatury poprzez zamknięcie kranu 3 i obserwację wskazań manometru – ciśnienie nie powinno rosnać w sposób zauważalny.
4. Po ustaleniu się ciśnienia otworzyć na chwilę krany 8, 9 i 10 (przy zamkniętym kranie 3) w celu sprawdzenia aparatury – manometr nie powinien wskazywać wzrostu ciśnienia.

Pomiar izotermy $p_i^0 = f(V_a)$ bez adsorbentu (V_a oznacza objętość adsorbentu wprowadzona do aparatury [cm^3]).

1. Do odpowiednio przygotowanej aparatury wraz z dołączonym buforem B-2 (otwarty kran 4), podłączyć – znajdującą się za kranem 11 – biuretę D napełnioną adsorbentem, *n*-pentanem (lub innym adsorbentem wskazanym przez prowadzącego).
2. Ostrożnie otwierając kran 11, łagodnie odparować 0,5 – 1,0 cm^3 substancji (w ten sposób następuje pozbycie się powietrza znajdującego się wewnątrz biurety).
3. Po zamknięciu kranu 11 ponownie odpompować wnętrze aparatury, a następnie zamknąć kran 3, otworzyć kran 1 oraz wyłączyć pompę.
4. Manipulując kranem 11 wprowadzać do aparatury po 0,4–0,5 cm^3 adsorbentu (łącznie od 4–5 cm^3) i każdorazowo dokonywać pomiaru ciśnienia.
5. Po zakończeniu pomiarów ponownie uruchomić pompę, odpompować wnętrze aparatury i zamknąć kran 4, co spowoduje odłączenie od aparatury buforu B-2.

Uwaga: Wykonanie powyższego pomiaru zależy od decyzji prowadzącego ćwiczenia – przebieg izotermi może

być również wyznaczony pośrednio jak w punkcie 4.

Pomiar izotermy $p_i = f(V_a)$ dla wybranego adsorbentu.

1. Do przygotowanej aparatury należy dołączyć biuretę z wybranym adsorbentem (np. eter naftowy, eter etylowy), usunąć z niej powietrze, ponownie odpompować aparaturę, włączyć pompę (jak w punkcie 2), a następnie otworzyć kran od kolby z wybranym adsorbentem (np. węgiel aktywowany, sita molekularne).
2. Wprowadzać kolejne porcje adsorbentu według następującego schematu: zamknąć kran 6, ostrożnie otworzyć kran 11 i wprowadzić ok. 0,4 – 0,5 cm³ adsorbentu, zamknąć kran 11, odczekać 2 minuty, otworzyć kran 6, odczekać 2 – 3 minuty, odczytać ciśnienie.

Uwaga: Wprowadzanie adsorbentu początkowo nie powoduje wzrostu ciśnienia; w miarę zajmowania powierzchni adsorbentu przez adsorbat ciśnienie zaczyna rosnąć i od momentu zablokowania powierzchni rozpoczyna się liniowy przebieg izotermy $p_i = f(V_a)$.

3. Po dokładnym wyznaczeniu odcinka, dla którego wykres izotermy BET ma charakter liniowy, pomiary można zakończyć i przystąpić do wyznaczania izotermy dla innego układu adsorbent – adsorbat, bądź do regeneracji powierzchni użytego poprzednio adsorbentu przez wygrzewanie (patrz punkt 1).

Wykonanie sprawozdania

Podstawę do sporządzenia wykresu izotermy BET stanowią wyniki pomiarów przeprowadzonych według punktu 3 oraz 4 (ewentualnie tylko 4) (Tabela 2 oraz 3).

Tabela 2. Zestawienie wyników pomiarów podczas wyznaczania izotermy $p_i^0 = f(V_a)$ bez adsorbentu.

Lp.	V_a [cm ³]	p_i^0 [mmHg]
1		
2		
...		

Tabela 3. Zestawienie wyników pomiarów podczas wyznaczania izotermy $p_i = f(V_a)$ dla wybranego adsorbentu.

Lp.	V_a [cm ³]	p_i [mmHg]
1		
2		
...		

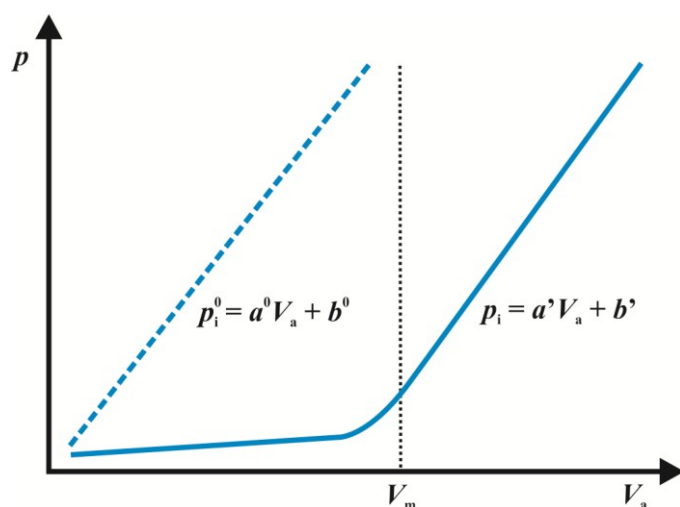
Pomiar izotermy $p_i^0 = f(V_a)$ bez adsorbentu.

1. Sporządzić wykres zależności: $p_i^0 = f(V_a)$. Wyniki pomiarów odłożone na wykresie powinny wyznaczać linię prostą (Rys. 6).
2. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczyć parametry prostej (a^0 oraz b^0) opisanej

równaniem: $p_i^0 = a^0 \times V_a + b^0$

Pomiar izotermy $p_i = f(V_a)$ dla wybranego adsorbentu.

1. Sporządzić wykres zależności: $p_i = f(V_a)$.
2. Na podstawie wykresu wybrać punkty pomiarowe, dla których przebieg izotermy jest liniowy i metodą najmniejszych kwadratów wyznaczyć parametry prostej (a' oraz b') opisanej równaniem: $p_i = a' \times V_a + b'$. Współczynnik kierunkowy (a') tej prostej powinien być – w granicach błędów pomiarowych – tak jak w powyżej wyznaczonym równaniu izotermy $p_i^0 = f(V_a)$ bez adsorbentu ($a' \approx a^0$).



Rysunek 6. Sposób wyznaczania liniowego przebiegu izotermy BET.

Oznacza to, że do wyznaczania spowodowanej adsorpcją zmiany ciśnienia par adsorbentu w układzie: $\Delta p_i = p_i^0 - p_i$ wystarczy przesunąć prostą $p_i = a' \cdot V_a + b'$ do początku układu współrzędnych (przyjmując, że $b' = 0$), dzięki czemu dla poszczególnych wartości V_a można obliczyć odpowiadające im wartości $p_i^0 = a' \times V_a$ oraz Δp . Umożliwia to wyliczenie zaadsorbowanych objętości adsorbentu (V_i) występujących w równaniu izotermy BET:

$$V_i = \frac{\Delta p_i}{a'}$$

3. Znając prężność pary nasyconej n -pentanu (p_0 – patrz: Tabela 1), wyliczyć wartość $\frac{p_i}{p_0}$,

oraz sporządzić wykres izotermy BET z zależności: $\frac{\frac{p_i}{p_0}}{V_i(1 - \frac{p_i}{p_0})} = f(\frac{p_i}{p_0})$ (Tab. 4)

Tabela 4. Obliczenia umożliwiające wyznaczenie izotermy BET.

L.p.	V_a [cm ³]	p_i [mmHg]	$p_i^0 = a' \times V_a$ [mmHg]	$\Delta p_i = p_i^0 - p_i$ [mmHg]	$V_i = \frac{\Delta p_i}{a'}$ [cm ³]	$\frac{p_i}{p_0}$	$\frac{\frac{p_i}{p_0}}{V_i(1 - \frac{p_i}{p_0})}$ [1/cm ³]
1							
2							
...							

4. Dla prostoliniowego odcinka izotermy BET metodą najmniejszych kwadratów wyznaczyć wartości a oraz b dla równania prostej: $y = ax + b$.

5. Wyznaczyć wartości stałych V_m oraz C . Z równania izotermy BET:

$$\frac{\frac{p_i}{p_0}}{V_i \times (1 - \frac{p_i}{p_0})} = \frac{(C-1)}{V_m \times C} \times \frac{p_i}{p_0} + \frac{1}{V_m \times C} \quad (15)$$

wynika, że: $a = \frac{C-1}{V_m \times C}$ [1/cm³] oraz $b = \frac{1}{V_m \times C}$ [1/cm³]. Wyliczając wartości parametrów

a oraz b z równania liniowego $y = ax + b$, można wyznaczyć V_m oraz C : $V_m = \frac{1}{a+b}$ [cm³] oraz

$$C = \frac{a}{b} + 1.$$

Uwaga: Wyliczoną wartość V_m należy zaznaczyć na wykresie $p_i = f(V_a)$ – jest to punkt, od którego rozpoczyna się liniowy przebieg izotermy BET.

6. Znając V_m , czyli ilość n -pentanu (adsorbentu) potrzebną do pokrycia powierzchni adsorbentu warstwą jednocząsteczkową w temperaturze, w której przeprowadzany był pomiar, wyznaczyć powierzchnię zajęta przez adsorbat (S). Ze wzoru na gęstość (ρ) wiadomo, że:

$$\rho_{n-pentan\ u} = \frac{m_{n-pentan\ u}}{V_m}, \text{ stąd: } m_{n-pentan\ u} = V_m \times \rho_{n-pentan\ u}. \text{ Wyznaczając liczbę moli } n\text{-pentanu:}$$

$$n_{n-pentan\ u} = \frac{m_{n-pentan\ u}}{M_{n-pentan\ u}} \text{ należy wyliczyć powierzchnię zajęta przez adsorbat (S):}$$

$$S_{n-pentan\ u} = s_{n-pentan\ u}^0 \times N_A \times n_{n-pentan\ u} \quad (16)$$

gdzie: s^0 – powierzchnia osadzania n -pentanu (patrz: Tabela 1), N_A – liczba Avogadro.

7. Wyznaczyć powierzchnię właściwą adsorbentu ($S_{wł}$):

$$S_{wł} = \frac{S_{n-pentan\ u}}{m} \quad (17)$$

gdzie: m – masa adsorbentu [g] (sprawdzić w czasie wykonywania ćwiczenia).

Jednostka, w której najczęściej wyraża się powierzchnię właściwą adsorbentu to $[m^2/g]$.

8. Porównać wyliczoną powierzchnię właściwą adsorbentu z wartością tablicową, przeprowadzić dyskusję wyników oraz analizę błędów.

Zakres wymaganych wiadomości:

Adsorbent; adsorbat; adsorpcja fizyczna; adsorpcja chemiczna; izoterma adsorpcji; izoterma adsorpcji Freundlicha; izoterma adsorpcji Langmuira; izoterma adsorpcji BET; metody wyznaczania izoterm adsorpcji.

Pozycje wykazu literatury: 1, 5, 6, 10, 15

Słowniczek

Adsorpcja	Zjawisko fizykochemiczne, polegające na wiązaniu cząsteczek, atomów lub jonów na powierzchni lub granicy faz fizycznych, powodujący lokalne zmiany stężenia. Proces odwrotny do adsorpcji nazywamy desorpcją.
Adsorbent	Substancja, na której zachodzi adsorpcja (adsorbująca).
Adsorbat	Substancja ulegająca adsorpcji na adsorbencie.
Adsorpcja fizyczna (fizysorpcja)	Odwracalne oddziaływanie adsorbentu i adsorbatu za pomocą słabych oddziaływań fizycznych (wiązania Van der Waalsa, wiązania wodorowe, itp.).
Adsorpcja chemiczna (chemisorpcja)	Stosunkowo trwałe oddziaływanie adsorbentu i adsorbatu za pomocą wiązań chemicznych (kataliza kontaktowa).
Izoterma BET (Brunauera, Emmetta, Tellera)	Prosty model adsorpcji fizycznej, służący głównie do opisu adsorpcji par i gazów na adsorbencie stałym.

Ćwiczenie 11

Wykorzystanie przewodnictwa elektrycznego do rozdzielania makromolekul

Elektroforezę cząsteczek np. DNA, RNA lub białek zachodzącą w porowatym nośniku, którym może być żel, można traktować jako rozdział polijonów pod wpływem pola elektrycznego. Naładowane cząsteczki poruszają się w polu elektrycznym w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku. Różnorodność ich ładunków i mas, zdolność do dysocjacji lub tworzenia kompleksów z obdarzonymi ładunkiem składnikami środowiska sprawia, iż w rezultacie różne cząstki mieszaniny poruszają się z różną prędkością. Jeżeli w trakcie doświadczenia zachowane zostaną stałe parametry: różnica potencjałów, natężenie prądu, pH środowiska, temperatura roztworu, przewodność roztworu oraz lepkość roztworu – to dana cząstka będzie poruszać się ze stałą prędkością.

Na cząsteczkę posiadającą wypadkowy ładunek elektryczny, która znajduje się w polu elektrycznym działa siła (F), proporcjonalna do jej ładunku oraz natężenia pola elektrycznego.

$$F = E \times Q \quad (1)$$

gdzie: E – natężenie pola elektrycznego [$V\ cm^{-1}$], Q – ładunek cząsteczki [C]

Natężenie pola elektrycznego (E), definiowane jest jako iloraz napięcia elektrycznego U (różnicy potencjałów) oraz odległości pomiędzy potencjałami (l).

$$E = \frac{U}{l} \quad \text{czyli} \quad F = Q \times \frac{U}{l} \quad (2)$$

Im większe napięcie (U) - tym większa siła działa na cząsteczkę i szybsza jej migracja. Im większa odległość (l) pomiędzy potencjałami (elektrodami), tym mniejsze natężenie pola (E) i wolniejsza migracja cząsteczek. Dlatego aby zapewnić optymalne natężenie pola elektrycznego (E) w aparatach większych, o większej odległości pomiędzy elektrodami zwykle prowadzi się elektroforezę przy wyższym napięciu niż w aparatach małych – o małej odległości pomiędzy elektrodami.

Ważnym parametrem naładowanych cząstek jest **ruchliwość elektroforetyczna**, która zależy od wartości pK naładowanych grup oraz od wielkości cząstek. Do czynników wpływających na ruchliwość elektroforetyczną należą: rodzaj buforu, stężenie buforu, pH buforu, temperatura, natężenie pola elektrycznego oraz właściwości i rodzaj rozdzielanego materiału. Zazwyczaj określa się **względna ruchliwość elektroforetyczną** R_f , czyli stosunek odległości migracyjnej badanej substancji od odległości migracyjnej odnośnika. Podczas elektroforezy prąd wykonuje w żelu pracę, która powoduje wzrost temperatury żelu. Jest to tzw. **ciepła Joule’a**. Efekt ten zwiększa dyfuzję polijonów podczas elektroforezy i dlatego

limituje użycie bardzo wysokich napięć podczas elektroforezy. **Ciepło Joule’a (W)** definiuje się jako moc P wydzielaną w objętości V w procesie elektroforezy [$W\ m^{-3}$].

$$W = \frac{P}{V} \quad (5)$$

gdzie: P – moc prądu [W], V – objętość w której wydzielana jest moc [m^3].

Zastosowanie elektroforezy:

- preparatywne i ilościowe wydzielenie z badanych mieszanin czystych frakcji;
- określenie czystości i jednorodności badanych substancji;
- oznaczanie punktu izoelektrycznego badanych substancji;
- oznaczenie masy cząsteczkowej badanych substancji;
- zastosowanie do celów diagnostycznych i badawczych.

Zakres zastosowań rozciąga się od całych komórek i cząstek przez kwasy nukleinowe, białka, peptydy, aminokwasy, organiczne kwasy i zasady do narkotyków, pestycydów, nieorganicznych kationów i anionów (czyli wszystkich indywiduów chemicznych, które mogą nosić ładunek elektryczny).

Elektroforeza poliakryloamidowa białek w warunkach denaturujących (ang. SDS-PAGE)

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym jest użyteczną i powszechnie stosowaną metodą rozdziału i charakterystyki białek. Żel poliakryloamidowy powstaje w wyniku polimeryzacji monomerów akryloamidowych w długie łańcuchy, które następnie łączone są kowalencyjnie przez N,N'-metyleno-bis-akryloamid (Rys. 1). Gęstość żelu zależy od całkowitego stężenia obu składników, natomiast stopień usieciowania zależy od stężenia bis-akryloamidu. Reakcja polimeryzacji jest inicjowana przez wolne rodniki dostarczone przez N,N,N',N'-czterometylo-etylenodwuaminę (TEMED) i stabilizowane przez nadsiarczan amonu (Rys. 1). Polimeryzacja zachodzi bez dostępu tlenu, który jest inhibitorem tej reakcji. Możliwa jest także fotopolimeryzacja, czynnikiem inicjującym reakcję polimeryzacji jest wówczas UV. Utworzony żel służy jako nośnik do rozdziału elektroforetycznego, funkcjonując jednocześnie jak sito molekularne, co wpływa na skuteczny rozdział makrocząsteczek.

Parametry charakteryzujące mieszaninę akryloamidów

- stężenie akryloamidu, oznaczane jako T – wyrażona w % (w/v) ilość akryloamidu i bisakryloamidu w objętości roztworu;
- stężenie (C) tzw. cross-linkerów (związków sieciujących) – wyrażony w % (w/w) stosunek ilości bisakryloamidu do ilości akryloamidu i biskaryloamidu. Np. oznaczenie 20% T , 5 % C oznacza że roztwór zawiera 20% (w/v) akryloamidów w stosunku akryloamidu do

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_2=\text{CH} \\
 | \\
 \text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{NH}_2 \\
 \text{Acrylamide}
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2=\text{CH} \\
 | \\
 \text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{NH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{NH} \\
 | \\
 \text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{CH}_2=\text{CH} \\
 \text{BIS}
 \end{array}
 \xrightarrow[\text{TEMED}]{\text{Persulfate}}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}- \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{C}=\text{O} \quad \quad \text{C}=\text{O} \quad \quad \text{C}=\text{O} \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{NH}_2 \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{NH}_2 \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{NH}_2 \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{NH}_2 \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{C}=\text{O} \quad \quad \text{C}=\text{O} \quad \quad \text{C}=\text{O} \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}- \\
 | \quad \quad | \quad \quad | \\
 \text{H} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{H} \\
 \text{Polyacrylamide}
 \end{array}$$

Wielkość porów sita uwarunkowana jest zarówno przez stężenie akryloamidu (ze wzrostem stężenia wielkość porów maleje), jak i poprzez stopień usieciowania. Wielkość ta musi być właściwie dobrana do wielkości rozdzielanych cząsteczek. Najczęściej używa się żeli o stężeniu akryloamidu 7,5% – 10%, lecz przy rozdziale cząsteczek bardzo dużych (m.cz. rzędu 100 kDa) stosuje się żele o bardzo niskim stężeniu akryloamidu, nawet 2,5%. Do rozdziału bardzo małych białek (m.cz. rzędu 2000 Da) używa się żeli zawierających 20%, a nawet 30% akryloamidu. Ze wzrostem czynnika sieciującego wielkość porów również maleje. Stężenie akryloamidu decyduje także o własnościach mechanicznych żelu, jego elastyczności i przejrzystości.

Użycie anionowego detergentu soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego (SDS – *ang. Sodium Dodecyl Sulphate*) pozwala na rozdział elektroforetyczny białek zgodnie z ich masą cząsteczkową. Podczas przygotowania próbek i w trakcie elektroforezy białka ulegają dysocjacji i denaturacji w obecności SDS, który łączy się z białkami specyficznie w stosunku masowym 4.1:1. Zapewnia to przyjęcie przez białko ujemnego ładunku elektrycznego netto o stałej gęstości bez względu na jego długość. Dla całkowitego rozwinięcia polipeptydu,

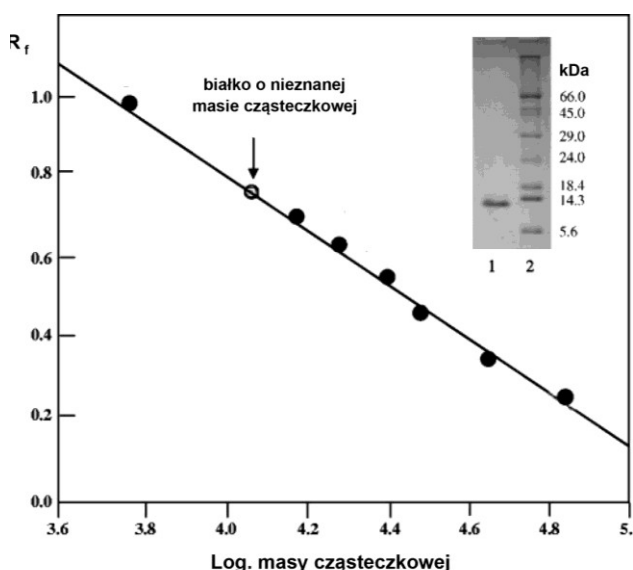
zapewnienia mu pierwszorzędowej struktury, niezbędne jest dodatkowo zniszczenie mostków dwusiarczkowych (β -merkaptetoetanol lub DTT). Otoczenie białka przez cząsteczki SDS oraz redukcja mostków dwusiarczkowych pozwalają na separację białek w żelu poliakryloamidowym ze względu na ich wielkość, a zatem pośrednio masę cząsteczkową. Szybkość migracji w SDS-PAGE nie jest determinowana przez ładunek elektryczny białka zależny od pH i jego konformacji, ale przez masę białka.

Próbki białka nanosi się na żel po 5 min. ogrzaniu w 100°C (we wrzącej łaźni wodnej lub w bloku grzejnym) w buforze denaturującym. Wchodząca w skład buforu denaturującego sacharoza obciąża próbki, ułatwiając ich umieszczenie w studziencie. W obecności SDS i czynnika redukującego wiązania dwusiarczkowe (β -merkaptetoetanolu) białka ulegają denaturacji (rozdzielają się na podjednostki), a ich wiązania niekowalencyjne ulegają rozkładowi. Rozdział prowadzi się w buforze glicynowym. Odpowiednie napięcie wraz z użyciem żelu o mniejszym stężeniu akryloamidów w stosunku do żelu dolnego pozwala na zagęszczenie próbek. Efekt taki uzyskujemy dzięki glicynie i jonom chlorkowym zawartym w buforze elektrodowym. Glicyna w roztworze o pH = 6,8 górnego żelu (wyższym od jej punktu izoelektrycznego (pI), który wynosi 6,3) przyjmuje ładunek lekko ujemny. W porównaniu z silnym ładunkiem ujemnym jonów chlorkowych i białka (dzięki obecności SDS) jest to ładunek znikomy. Glicyna jako cząsteczka o najmniejszym ładunku wypadkowym ujemnym wędruje więc najwolniej ku anodzie. Przed nią przemieszczają się białka poprzedzone przez jony chlorkowe, charakteryzujące się dużą ruchliwością elektroforetyczną. Takie rozmieszczenie migrujących cząsteczek w żelu powoduje zagęszczenie próbki. Dzięki temu naniesione białka wchodzą równocześnie w żel dolny. Przejście białek z żelu górnego do dolnego rozpoczyna proces ich właściwego rozdziału. Żel dolny, poza stężeniem akryloamidów, a co się z tym wiąże wielkością porów, różni się od żelu górnego również pH, które wynosi 8,8. Takie pH jest znacznie wyższe od pI glicyny, co powoduje, że wypadkowy ładunek aminokwasu staje się bardziej ujemny (wraz ze zmniejszeniem liczby jonów H^+ zwiększa się ilość cząsteczek glicyny ze zjonizowanymi grupami karboksylowymi). Zmiana ładunku glicyny jest przyczyną zmiany opisanej wcześniej kolejności migracji. Białka wędrują za jonami chlorkowymi i glicyną, ulegając rozdziałowi pod względem masy cząsteczkowej. Małe białka poruszają się w żelu szybko, natomiast duże zatrzymują się na górze, blisko miejsca nałożenia mieszaniny na żel.

Białka w żelu można wybarwić następującymi metodami:

- Barwienie w roztworze barwnika *Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250*.
- Barwienie srebrem (np. według metody opisanej w pracy Nesterenko i wsp., 1994 [35]).

- Barwienie roztworem czerni amidowej.



Rysunek 2. Wyznaczanie masy cząsteczkowej białka metodą elektroforezy denaturującej w żelu poliakryloamidowym.

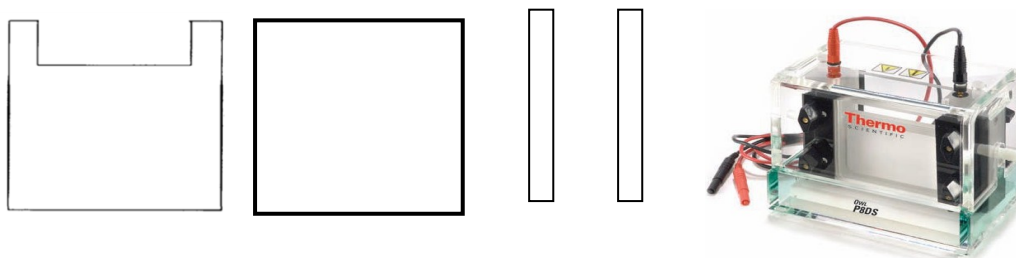
Po wybarwieniu błękitem *CBB R-250* już 0,1 μg białka daje wyraźny prążek, a jeszcze mniejszą ilość (około 0,01 μg) można uwidocznic wybarwiając srebrem. Dzięki możliwości rozdzielu białek na podstawie ich wielkości możemy oznaczyć masę cząsteczkową nieznanego białka, porównując jego położenie w żelu w stosunku do innych białek (tzw. białek wzorcowych) po zakończonej migracji i wybarwieniu (Rys. 2).

W zastosowanych warunkach ruchliwość większości łańcuchów polipeptydowych jest liniowo proporcjonalna do logarytmu ich masy cząsteczkowej. Jednak należy pamiętać, że do tej empirycznej zależności stosują się nie wszystkie białka: np. niektóre białka bogate w reszty węglowodanowe i białka błonowe migrują nietypowo. Tą metodą można na ogół rozdzielić białka różniące się masą cząsteczkową o około 2% (np. 40 i 41 kDa, co odpowiada różnicy około 10 reszt aminokwasowych).

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie masy cząsteczkowej badanych białek metodą elektroforezy poliakryloamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

Aparatura i materiały: 2 Płytki szklane „bez uszu”, 2 płytki szklane z „uszami”, 2 przekładki teflonowe, 1 grzebień teflonowy, podstawka do wylewania żelu, worki do wylewania żeli, aparat do elektroforezy, zasilacz prądu stałego, pipety automatyczne, naczynie do wybarwiania żeli, mikrowirówka, mieszadło magnetyczne, probówki typu *Eppendorf*, końcówki do pipet automatycznych, statyw do probówek typu *Eppendorf*, cylinder miarowy oraz butelki szklane, naczynia do przygotowania żelu dolnego i górnego.



Szybka z „uszami”. Szybka bez „uszu” Przeladki teflon Aparat do elektroforezy

Rysunek. 3 Elementy aparatury do rozdzielania elektroforetycznego białek.

Roztwory: białka do elektroforezy (udostępnia prowadzący), roztwór akryloamidów: 30%: 29% akryloamid, 1% N, N-metyleno-bisakryloamid, woda podwójnie destylowana, roztwór 10% SDS, roztwór nadsiarczanu amonu (APS) 10%, roztwór 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), roztwór 1 M Tris-HCl (pH 6,8), TEMED - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina, Barwnik do żeli poliakryloamidowych: 0,2% roztwór *Coomassie Brilliant Blue R-250* w odbarwiaczu do żeli poliakryloamidowych, odbarwiacz do żeli poliakryloamidowych (1100 ml), 800 ml wody dejonizowanej, 200 ml metanolu, 100 ml bezwodnego kwasu octowego, bufor denaturujący do nanoszenia próbek na żel o składzie (5x stężony): 50 mM tris-HCl (pH 6,8 w 25°C) + 5 mM EDTA (pH 8,0 w 25°C) + 12,5% SDS; 50% sacharoza + 25% 2-merkaptotanol (β Me) + 0,05% błękit bromofenolowy.

Przygotowanie i nanoszenie próbek. Rozdział elektroforetyczny

Studenci otrzymują przygotowany wcześniej żel poliakryloamidowy.

1. Przygotować bufor glicynowy do rozdzielania elektroforetycznego (według podanego poniżej przepisu), używając wody podwójnie destylowanej. Bufor glicynowy do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony; pH około 8,3 w 25°C): 25 mM Tris, 250 mM glicyna, 0.1% SDS.

2. Przygotować próbki białek do elektroforezy SDS-PAGE.

W tym celu należy przygotować odpowiednią liczbę probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Do każdej probówki należy dodać za pomocą pipety po 15 μ l buforu glicynowego. Następnie do przygotowanych probówek należy dodać po 4 μ l buforu denaturującego (5x stężonego) oraz po 1,5 μ l roztworów białek o różnej masie cząsteczkowej (roztwory udostępni prowadzący). Tak przygotowane próbki należy inkubować we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Gorące próbki należy nanieść w całości do kolejnych studzienek w żelu przy pomocy pipety automatycznej. Do pierwszej studzienki należy nanieść odpowiednią ilość **wzorca masowego** (wzorzec udostępni prowadzący).

3. Wyjąć ostrożnie płytki z żelem z worka i umieścić w aparacie do elektroforezy (szybka z „uszami” musi być skierowana do środka aparatu), delikatnie dokręcając śruby. Ostrożnie wyjąć grzebień.

4. Dolne i górne naczynie elektrodowe napełnić przygotowanym wcześniej buforem glicynowym (około 350 ml). Studzienki w żelu muszą być wypełnione buforem.

5. Za pomocą dużej pipety automatycznej ostrożnie przepłukać studzienki buforem i usunąć pęcherzyki powietrza z dolnej części płytki.

6. Przeprowadzić elektroforezę przy stałym natężeniu 20 mA. Po wnikięciu próbek w żel zwiększyć natężenie do 30 mA i kontynuować rozdział dopóki barwnik nie znajdzie się 0,5 cm od końca żelu.

7. Po skończonym rozdziale wyłączyć prąd, wylać bufor i wyjąć żel z aparatu. Następnie ostrożnie oddzielić

szyby, wyjąć żel i umieścić w pudełku do barwienia z przygotowanym barwnikiem do żeli poliakryloamidowych. Zagrzać żel w kuchence mikrofalowej przez 1 min. (z uchyloną pokrywką) i pozostawić na 1h.

8. Otrzymane od prowadzącego zdjęcie żelu wraz z opisem należy umieścić w sprawozdaniu.

Kolejne czynności (9–10) wykonuje prowadzący ćwiczenie.

9. Następnie zlać barwnik do butelki i umieścić żel w odbarwiaczu do żeli poliakryloamidowych. Ponownie zagrzeć i poczekać aż ostygnie. Odbarwiacz zmieniać dwukrotnie, aż do uzyskania wyraźnych prążków.

10. Żel zeskanować.

Przygotowanie żelu poliakryloamidowego.

W czasie trwania elektroforezy studenci przygotowują samodzielnie nowy żel poliakryloamidowy.

1. Starannie umyć szyby detergentem (patrz Aparatura i materiały), osuszyć czystym ręcznikiem papierowym i przetrzeć wewnętrzne powierzchnie szyb etanolem.

2. Suche teflonowe przekładki umieścić pomiędzy szybami (jak najbliżej prawej i lewej krawędzi) w taki sposób, aby krawędzie jednej szyby nie wystawały poza pole drugiej szyby. Nie dotykać wewnętrznych powierzchni szyb palcami! Złożone szybki ostrożnie wsunąć do worka, całość umieścić w aparacie do wylewania żeli i docisnąć specjalną płytką. Szybka z „uszami” powinna znaleźć się po zewnętrznej stronie (od strony płytki pleksi), do góry „uszami”. Ostrożnie docisnąć poprzez odpowiednie dokręcenie śruby. Wypoziomować aparat ustawiając bańkę powietrza w zaznaczonym zakresie.

3. Sporządzić roztwór 10% żelu dolnego według opisu w Tab. 1 (poniżej).

Tabela 1. Skład żelu dolnego

Składniki (na 10 ml żelu)	Objętość
Procentowość żelu	10%
H ₂ O	4,0 ml
30% akryloamidu (z lodówki)	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS (z lodówki)	100 µl
TEMED (z lodówki)	4 µl

UWAGA! APS powoduje rozpoczęcie polimeryzacji, dlatego APS i TEMED dodaje się na samym końcu, przed waniem roztworu żelu między szyby!

4. Wymieszać ostrożnie wszystkie składniki i wlać za pomocą pipety około 6 ml roztworu pomiędzy płytki szklane do takiej wysokości, żeby pozostawić miejsce na około 1 cm żelu górnego i grzebień.

Na żel nawarstwić ostrożnie za pomocą pipety 1 ml wody destylowanej. Pozostawić do polimeryzacji (około 15 min.). Nadmiar roztworu można pozostawić w probówce, co ułatwi wychwycenie momentu, w którym żel spolimeryzuje.

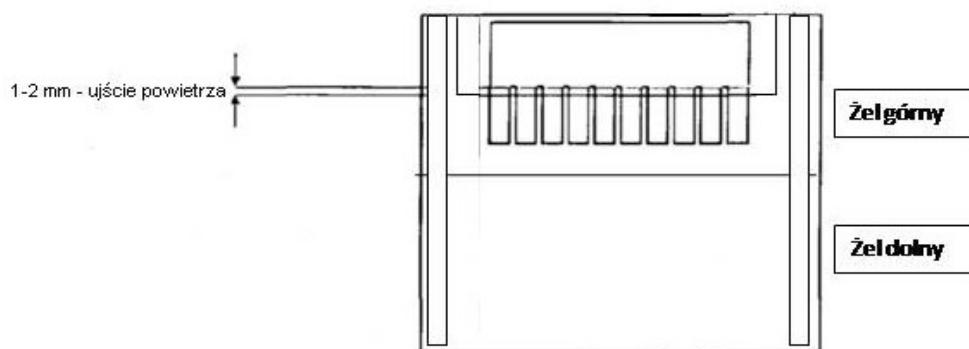
5. Przygotować żel górny zagęszczający (Tab. 2).

Tabela 2. Skład żelu górnego.

Składniki (na 4 ml)	Objętość [ml]
H ₂ O	2,7 ml
30 % akryloamidy	0,67 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl

UWAGA ! APS powoduje rozpoczęcie polimeryzacji, dlatego APS i TEMED dodaje się na samym końcu, przed waniem roztworu żelu między szyby!

6. Przechylając aparat zlać wodę z nad żelu dolnego i delikatnie osuszyć papierowym ręcznikiem.
7. Wlać roztwór żelu górnego między szyby i umieścić prawidłowo grzebień. Grzebień powinien być włożony symetrycznie, w taki sposób, aby między zębami było ujście dla powietrza, wychodzącego spomiędzy szyb po wylaniu żelu (Rys. 1). Uważać aby przy zębach grzebienia nie utworzyły się pęcherzyki powietrza. Zostawić żel do polimeryzacji.



Rysunek 4. Prawidłowy sposób umieszczenia „grzebienia”.

8. Po spolimeryzowaniu żelu górnego (około 15 min.), żel zalać buforem glicynowym i zabezpieczyć taśmą klejącą. Żel przechowywać w lodówce.

UWAGA! Akryloamidy są neurotoksyczne. Unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi. Używać rękawiczek. Roztwór APS może być przechowywany w lodówce przez 1 tydzień.

Opracowanie wyników

W sprawozdaniu z wykonanego ćwiczenia należy:

1. Umieścić wstęp teoretyczny, zawierający informację o technice elektroforezy, roli SDS i glicyny, oraz o metodzie wyznaczania masy cząsteczkowej za pomocą elektroforezy SDS-PAGE.
2. Podać cel ćwiczenia i omówić krótko poszczególne jego etapy.
3. Przeprowadzić analizę wykonanej elektroforezy (umieścić zdjęcie żelu wraz z opisem

ścieżek; podać masy cząsteczkowe białek zastosowanego wzorca).

4. Obliczyć wartości R_f dla wszystkich rozdzielonych białek wzorca i białek badanych (R_f = odległość migracyjna białka/odległość migracyjna markera np. błękitu bromofenolowego [mm]). W tym celu należy zmierzyć za pomocą linijki drogę migracji markera (błękitu bromofenolowego) oraz poszczególnych białek (pomiar odległości od krawędzi żelu do środka prążka).

5. Wykreślić zależność względnej ruchliwości elektroforetycznej (R_f) od logarytmu masy cząsteczkowej [kDa] białek wzorcowych (Rys. 2). Przebieg prostej wyznaczyć metodą najmniejszych kwadratów.

6. Z otrzymanej krzywej wzorcowej odczytać masę cząsteczkową badanych białek.

7. Przeprowadzić dyskusję wyników i podać wnioski. Porównać wyznaczoną masę cząsteczkową badanych białek z danymi literaturowymi.

Zakres wymaganych wiadomości

Podstawy teoretyczne elektroforezy (definicja, rodzaje elektroforezy, zastosowanie, polimeryzacja żeli poliakryloamidowych; parametry rozdziału elektroforetycznego: ruchliwość elektroforetyczna, ciepło Joule'a; rodzaje elektroforezy; ogólne informacje o białkach, wyznaczanie masy cząsteczkowej białek metodą elektroforezy denaturującej w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE).

Pozycje wykazu literatury: 16–20, 35

Słowniczek

Ciepło Joule'a (W)	Moc P [W m^{-3}] wydzielana w objętości elektrolitu V [m^3] podczas procesu elektroforezy: $W = \frac{P}{V}$
Elektroforeza	Procesy elektrokinetyczne zachodzące w całej objętości elektrolitu, polegające na przemieszczaniu się jonów i makrojonów w zewnętrznym polu elektrycznym.
Sila jonowa (I)	Funkcja stężenia jonów tworzących elektrolit (bufor), definiowana jako wartość połowy sumy iloczynów stężeń molowych i kwadratu wartościowości wszystkich jonów znajdujących się w roztworze.
Względna ruchliwość elektroforetyczna (R_f)	Stosunek odległości migracyjnej badanej substancji od odległości migracyjnej odnośnika.
Wzorzec masowy	Zestaw odpowiednio dobranych białek o znanych masach cząsteczkowych.

ELEKTROCHEMIA

Ćwiczenie 12. Część I

Wyznaczanie charakterystyk elektrod: szklanej, antymonowej i chinhydronowej

Potencjometryczne pomiary pH wykonuje się za pomocą ogniwa zawierającego elektrodę o potencjale stałym oraz elektrodę, której potencjał jest zależny od aktywności jonów wodorowych. Elektrodę o potencjale stałym nazywamy **elektrodą odniesienia**, zaś elektrodę reagującą na zmiany pH – **elektrodą wskaźnikową**. Elektrodą odniesienia jest zazwyczaj elektroda kalomelowa. Elektrodami wskaźnikowymi mogą być elektrody: wodorowa, chinhydronowa, antymonowa lub szklana. **Silę elektromotoryczną (SEM)** ogniwa z wartościami pH łączy zależność:

$$E = E^0 - k \times pH \quad (1)$$

gdzie: E^0 – potencjał elektrody przy $pH = 0$, k – współczynnik proporcjonalności, określający o ile miliwoltów zmienia się potencjał elektrody, kiedy pH zmienia się o 1 jednostkę (nachylenie charakterystyki).

Wykres zależności między potencjałem elektrody a pH roztworu nazywa się **charakterystyką elektrody**. W układzie współrzędnych SEM – pH charakterystyka elektrody jest linią prostą. E^0 w powyższym równaniu oznacza potencjał elektrody wskaźnikowej, względem danej elektrody odniesienia, odpowiadający $pH = 0$. Dany układ elektrod może być scharakteryzowany poprzez: (1) wielkość E^0 , która podaje punkt przecięcia się linii prostej, przedstawiającej omawianą zależność, z osią E [mV] oraz (2) wartość pH, dla której SEM ogniwa pomiarowego jest równa zero. Współczynnik proporcjonalności k podaje o ile mV zmienia się potencjał elektrody, gdy pH roztworu zmienia się o 1 jednostkę. W układzie współrzędnych SEM – pH wartość k określa nachylenie charakterystyki elektrody. Współczynnik ten jest proporcjonalny do temperatury bezwzględnej.

$$k = \left[\frac{R}{F} \ln 10 \right] \times 1000 = 0,1984T \quad (2)$$

gdzie: R – stała gazowa, F – stała Faradaya, T – temperatura bezwzględna.

W danej temperaturze charakterystyka elektrody jest nazywana izotermą elektrody. Izotermy różnych elektrod, których potencjały są wyznaczone wartością pH, tworzą rodzinę prostych równoległych.

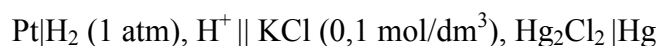
Sens fizyczny i definicja pH

Wartość współczynnika pH roztworu stanowi ilościową miarę jego kwasowości.

Wielkość ta została wprowadzona w 1909 roku i oznaczała pierwotnie ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych. Była to tzw. stężeniowa skala pH zdefiniowana przez Sörensena. Gdy okazało się, że potencjał elektrody odwracalnej względem jonów wodorowych jest jednoznacznie określony nie przez stężenie lecz przez aktywność tych jonów, definicja pH została zmodyfikowana. Obecnie pH roztworu definiuje się jako ujemny logarytm z aktywności jonów wodorowych w danym roztworze. Jest to tzw. skala aktywnościowa. Poniższe równanie (3) wyjaśnia fizyczny sens tej wielkości:

$$pH = -\lg a_{H^+} \quad (3)$$

Definicja ta nie jest jednak jednoznaczna. Wynika to z faktu, że aktywności indywidualnych jonów są niemierzalne, a nawet nie mają jasnego sensu termodynamicznego, (oprócz roztworów bardzo rozcieńczonych). Konieczna jest zatem bardziej praktyczna definicja pH, która stwarzałaby możliwości pomiaru tej wielkości, pozostając w zgodzie z termodynamicznymi zależnościami w które wchodzi aktywność jonów wodorowych. W tym celu należy oprzeć się na sile elektromotorycznej np. ogniwa złożonego z elektrody wodorowej i 0,1 normalnej elektrody kalomelowej:



W ogniwie tym roztwór, którego pH definiujemy, jest roztworem elektrody wodorowej. Siłę tego ogniwa określa się wzorem:

$$E = E_{odn} - \frac{2,303 \times RT}{F} \times \lg a_{H^+} \quad (4)$$

Wyrażając SEM tego ogniwa w woltach oraz biorąc pod uwagę równanie (4) otrzymujemy:

$$E = E_{odn} + 0,0001984T \times pH \quad (5)$$

a stąd

$$pH = \frac{E - E_{odn}}{0,0001984T} \quad (6)$$

E_{odn} obejmuje potencjał dyfuzyjny, który występuje w tym ogniwie.

Równanie (6) jest równaniem definiującym pH, podczas gdy równanie (3) wyjaśnia sens fizyczny tej wielkości. Pomiar pH z wykorzystaniem zależności (6) nie jest zawsze łatwy i możliwy. Wynika to z faktu, że trudno jest sporządzić dobrą elektrodę wodorową. Ponadto nie w każdym środowisku pracuje ona odwracalnie. W związku z tym pomiary pH mają praktycznie zawsze charakter pomiarów porównawczych. Polegają one na zastosowaniu wzorcowych roztworów buforowych, dla których wartości pH zostały ustalone na podstawie równania (6) oraz innych elektrod odwracalnych względem jonów wodorowych. Wieloletnie badania pozwoliły na określenie E różnego typu ogniw z elektrodą wodorową, a następnie

wyznaczenie pH szeregu roztworów buforowych, uznanych jako wzorce w konwencjonalnej skali pH. Zbiór wzorcowych roztworów buforowych określa praktyczną skalę pH. Ustalono również precyzyjnie potencjały różnych elektrod odniesienia względem standardowej elektrody wodorowej.

Pisząc równanie dla przypadków, gdy elektroda odwracalna względem jonów wodorowych znajduje się raz w roztworze badanym (indeks x), a drugi raz w roztworze wzorcowym (indeks wz), mamy:

$$0,0001984T \times pH = E_x - E_{odn}$$

oraz

$$0,0001984T \times pH_{wz} = E_{wz} - E_{odn}$$

Dzieląc powyższe równania stronami, otrzymamy równanie pozwalające wyznaczyć wartość pH nieznanego roztworu (pH_x):

$$pH_x = pH_{wz} + \frac{E_x - E_{wz}}{0,0001984T} \quad (7)$$

Elektrody wskaźnikowe

Elektrody pierwszego rodzaju

Elektrody pierwszego rodzaju zbudowane są albo z metalu zanurzonego do roztworu zawierającego jego własne kationy, albo z gazu zanurzonego do roztworu zawierającego jego aniony. Pierwszy typ nazywa się elektrodami metalowymi, a drugi gazowymi. Elektrody metalowe są odwracalne względem kationu. Są to elektrody na których zachodzi reakcja typu:



Elektrody gazowe są odwracalne względem anionu. Szczególnym przypadkiem elektrody gazowej jest elektroda wodorowa (gazowa), odwracalna względem kationu.



Do elektrod pierwszego rodzaju należą np. elektroda srebrowa: $Ag|Ag^+$, wodorowa: $Pt|H_{2(g)}|H^+$ lub chlorowa: $Pt|Cl_{2(g)}|Cl^-$, a także elektrody: miedziowa $Cu|Cu^{2+}$, cynkowa: $Zn|Zn^{2+}$ oraz rtęciowa $Hg|Hg^{2+}$.

Elektrody drugiego rodzaju

Elektrody drugiego rodzaju są odwracalne względem wspólnego anionu. Elektrode stanowi metal pokryty jego trudno rozpuszczalną solą, zanurzony do roztworu zawierającego aniony wspólne z tą solą. Do elektrod drugiego rodzaju należą np. elektroda chlorosrebrowa

Ag|AgCl_(s)|KCl, kalomelowa Hg|Hg₂Cl_{2(s)}|KCl, siarczano(VI)-rtęciowa Hg|Hg₂SO₄|H₂SO₄.

Elektrody trzeciego rodzaju

Elektrody trzeciego rodzaju są odwracalne względem wspólnego kationu. Elektrode taką tworzy metal, jego trudno rozpuszczalna sól i druga trudno rozpuszczalna sól o wspólnym anionie z pierwszą. Do elektrod trzeciego rodzaju należą np. układy: Pb|PbCO_{3(s)}|CaCO_{3(s)}|Ca²⁺ oraz Hg|Hg₂C₂O_{4(s)}|CaC₂O_{4(s)}|Ca²⁺.

Elektrody redoks

Elektrody utleniająco-redukujące (redoks) zbudowane są z metalu biernego chemicznie (platyna lub metale z grupy platynowców), zanurzonego do roztworu zawierającego postać utlenioną i zredukowaną pierwiastka lub związku. Elektroda metaliczna nie bierze bezpośredniego udziału w reakcji, lecz odgrywa rolę przenośnika ładunków elektrycznych.

Potencjał takiego półogniwa spełnia równanie Nernsta:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (9)$$

gdzie: a_{ox} – jest iloczynem aktywności form utlenionych, a_{red} – jest iloczynem aktywności form zredukowanych, z – ilość elektronów wymienianych w reakcji red-ox.

Przykładami elektrod typu redoks są: elektroda chinhydronowa, manganianowa II)/(VII): Pt|MnO₄⁻, Mn²⁺, H⁺, żelazowa (II)/(III): Pt|Fe³⁺, Fe²⁺ i inne.

Wykorzystywana w trakcie ćwiczenia elektroda chinhydronowa składa się z elektrody wyprowadzającej (najczęściej gładkiej elektrody platynowej wykonanej z drutu lub blaszki o dość dużej powierzchni), zanurzonej do roztworu badanego, zawierającego niewielką ilość chinhydronu. Chinhydron jest kompleksowym połączeniem cząsteczkowym o charakterze elektrono-donorowo-akceptorowym chinonu i hydrochinonu w stosunku 1:1. W roztworze wodnym z jonami H⁺ tworzy on układ typu redoks, na którym opiera się działanie elektrody. Przy oznaczaniu wartości pH za pomocą elektrody chinhydronowej stosujemy jako elektrodę odniesienia nasyconą elektrodę kalomelową (kalomel to tradycyjna nazwa dimeru chlorku rtęci (I), Hg₂Cl₂). Zapis formalny **ogniwa chinhydronowo-kalomelowego** jest następujący:



Na elektrodzie lewej zachodzi proces utleniania (11), natomiast na prawej – redukcji (12):



Zatem reakcja sumaryczna biegnąca w takim ogniwie będzie wyglądać następująco:



Równanie Nernsta zapisane dla tego przypadku przybierze następującą postać:

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \times \ln a_{H^+} \quad (14)$$

Wykorzystując odpowiednie wartości tablicowe **potencjałów standardowych półogniwi**:

$E^0_{\text{chinhydronowa}} = 0,700 \text{ V}$, $E^0_{\text{kalomelowa nas.}} = 0,244 \text{ V}$ otrzymamy wartość **potencjału standardowego** tego ogniwa $E^0 = E_{\text{prawa}} - E_{\text{lewa}}$. W temperaturze standardowej można zapisać wzór przybliżony:

$$E = E^0 - 0,059 \text{ pH}$$

i wykonując prosty rachunek, podać ostateczną zależność, z której można wyznaczyć pH za pomocą ogniwa chinhydronowo-kalomelowego:

$$\text{pH} = \frac{0,456 - E}{0,059} \quad (15)$$

gdzie E oznacza mierzoną wartość potencjału tego ogniwa w roztworze o badanym odczynie.

Elektrodę chinhydronową, pełniącą rolę elektrody wskaźnikowej w omawianym ogniwie można traktować jak elektrodę wodorową, pracującą pod niewielkim ciśnieniem wodoru. Dlatego jest ona wygodna w użyciu, posiada jednakże pewne wady, do których zaliczamy:

- zakres pomiarowy do $\text{pH} = 7$; powyżej tej wartości następuje dysocjacja chinhydronu – słabego kwasu organicznego;
- duże odchylenia lub brak stosowności w środowisku zawierającym silne utleniacze lub reduktory i/lub substancje kompleksujące chinhydron.

Inne elektrody

W skład tej grupy wchodzi elektrody, które nie mieszczą się w stosowanym podziale np. antymonowa $\text{Sb}|\text{Sb}_2\text{O}_3|\text{H}^+$ i inne elektrody metaliczne o podobnej zasadzie działania – pozostające w równowadze z nasyconym roztworem tlenku: na przykład bizmutowa, żelazowa, molibdenowa, chromowa i ołowiowa i inne.

Wykorzystywaną w ćwiczeniu elektrodą antymonowa jest czuła na zmianę stężenia jonów wodorowych. Stanowi ją pręcik z metalicznego antymonu, zanurzony w badanym roztworze wodnym. Ponieważ antymon w zetknięciu z powietrzem utlenia się powierzchniowo i pokrywa warstwą tlenku, właściwą elektrodę stanowi antymon pokryty warstwą tlenku antymonu (III), Sb_2O_3 . Antymon jest metalem amfoterycznym, dlatego elektrodę antymonową można stosować zarówno do roztworów kwaśnych, jak też do obojętnych i zasadowych:



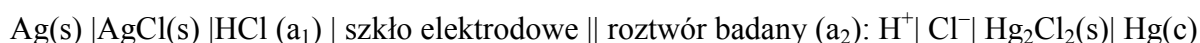
Elektrodę antymonową stosuje się w zakresie pH od 2 do 10, przy czym jest ona wrażliwa na

obecność w układzie badanym czynników utleniających, siarkowodoru, substancji kompleksotwórczych (np. szczawiany, winiany, cytryniany), jak również jonów metali bardziej szlachetnych od antymonu (np. Cu^{2+}). Reakcję elektrochemiczną zachodzącą na elektrodzie antymonowej można zapisać sumarycznie (17):



Elektroda szklana kombinowana jest podstawową elektrodą używaną przy wyznaczaniu pH roztworów. Elektroda składa się ze szklanej membrany, znajdującej się pomiędzy dwiema elektrodami odniesienia (np. elektrodą chlorosrebrową oraz nasyconą elektrodą kalomelową lub dwiema elektrodami chlorosrebrowymi), umieszczonymi we wspólnej oprawce. Elektrody te zachowują stały potencjał. Napięcie ogniwa zmienia się tylko w wyniku zmian napięcia na szklanej membranie. Tak zbudowane ogniwo stanowi pojedynczą sondę, której zanurzenie do badanego roztworu powoduje zamknięcie obwodu elektrycznego.

Elektrochemiczny zapis przykładowej elektrody szklanej kombinowanej jest następujący:



Potencjał elektrody szklanej spełnia równanie:

$$E = E^0 + \frac{2,303RT}{F} \times pH \quad (18)$$

W cienkich warstwach powierzchniowych po obu stronach membrany szklanej zachodzi zmiana rozkładu kationów (wymiana jonów Na^+ na H^+). W wyniku wymiany jonowej na dwóch granicach faz membrana-roztwór powstają różnice potencjałów obu roztworów, proporcjonalnie do wartości pH badanego roztworu. Elektroda szklana pracuje najlepiej w przedziale pH 2–10, w którym potencjał tej elektrody jest liniową funkcją odczynu pH roztworu.

Aparatura pomiarowa



Fotografia 1. pH-Metr HI221 firmy Hanna.

W ćwiczeniu wykorzystujemy pH-metr cyfrowy z zestawem elektrod pH-metrycznych. Urządzenie takie to w istocie czuły miliwoltomierz, dający możliwość bezpośredniego odczytu potencjału lub po wykalibrowaniu – jednostek pH ze skali ciekłokrystalicznej.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie charakterystyki elektrody szklanej, chinhydronowej i antymonowej oraz pomiar pH roztworów. Aby sporządzić charakterystyki elektrod wykonujemy trzy serie pomiarów zmian SEM ogniów w zależności od pH:

- a) ogniwa złożonego z elektrody szklanej zespolonej;
- b) ogniwa złożonego z elektrody chinhydronowej i kalomelowej;
- c) ogniwa złożonego z elektrody antymonowej i kalomelowej.

W każdej serii pomiarów mierzymy SEM ogniwa zawierającego kolejno roztwory buforowe wskazane przez prowadzącego ćwiczenia. Stosując te same układy elektrod wyznaczamy SEM ogniów zawierających kolejno roztwory badane o nieznanymi wartościami pH. Wyniki zebrać w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki pomiarów pH-metrycznych roztworów wzorcowych i badanych.

Lp.	pH roztworu		SEM [mV] ogniwa z elektrodą		
	buforowego	badanego	szklaną	chinhydronową	antymonową
1					
...					
15					

Opracowanie wyników:

1. Wykreślić zależności $E[\text{mV}] = f(\text{pH})$ dla wszystkich elektrod na wspólnym dużym wykresie.
2. Metodą najmniejszych kwadratów (regresja liniowa) wyznaczyć odchylenia standardowe oraz równanie prostej dla każdej zależności.
3. Z otrzymanych wykresów odczytać wartości E^0 dla poszczególnych ogniw oraz wyznaczyć nachylenie charakterystyk elektrod (k).
4. Wyznaczyć pH badanych roztworów graficznie (na podstawie otrzymanych wykresów) oraz obliczyć stosując zależności (1) i (2).

Zakres wymaganych wiadomości:

Wartość pH jako miara kwasowości; podstawy potencjometrycznych pomiarów pH; ogniwa galwaniczne jako źródła energii elektrycznej; procesy zachodzące na elektrodach podczas elektrolizy roztworów elektrolitów; rodzaje i typy elektrod; zapis ogniw chemicznych.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 18, 21, 22

Słowniczek

Charakterystyka elektrody	Wykres zależności między potencjałem elektrody a pH roztworu.
Elektroda odniesienia	Elektroda o stałym potencjale, zależnym od aktywności jonów wodorowych.
Elektroda wskaźnikowa	Elektroda reagująca na zmiany pH.
pH roztworu	Ujemny logarytm z aktywności jonów wodorowych w danym roztworze.
Potencjał elektrodowy	Siła elektromotoryczna ogniwa złożonego z danej elektrody oraz standardowej elektrody wodorowej.
Siła elektromotoryczna (SEM)	Różnica potencjałów dwóch półogniw otwartego ogniwa elektrochemicznego (przez ogniwo nie płynie prąd, znajduje się ono w stanie równowagi).
Standardowy potencjał elektrody (E^0)	Wartość potencjału odpowiadająca aktywnościom substancji reagujących równym jedności.

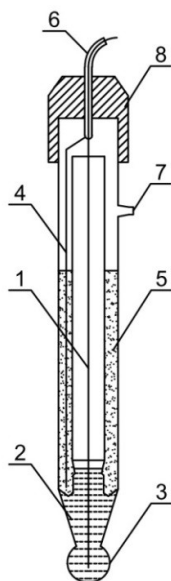
Ćwiczenie 12. Część II

Kalibracja pH-metru i pomiary pH roztworów. Wysalanie białek.

Punkt izoelektryczny białka

Wyznaczanie pH roztworów

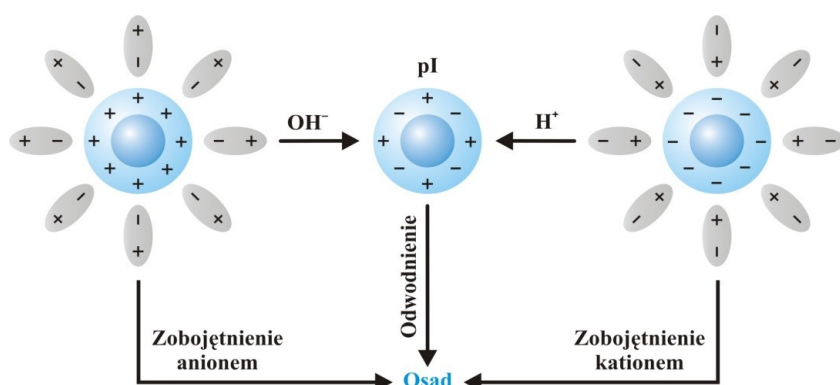
Pomiar pH roztworu przeprowadza się za pomocą pH-metru kompensacyjno-wychyleniowego, mierząc uprzednio pH roztworów wzorcowych celem wycechowania pH-metru i elektrody szklanej. Wzorcowanie na bufor o znanym pH polega na dokonaniu w obwodzie pomiarowym takich zmian, zależnych od E^0 elektrody szklanej, aby wskazówka przyrządu pokazywała rzeczywistą wartość pH buforu; elektrody pomiarowe muszą być przy tym zanurzone w roztworze buforowym o znanym pH. Ogniwo służące do wyznaczania pH roztworów zbudowane jest z elektrody szklanej jako elektrody wskaźnikowej oraz elektrody chlorosrebrowej lub kalomelowej w nasyconym roztworze KCl jako elektrody odniesienia (Rys. 1). Konstrukcyjnie obie elektrody stanowią całość i są nazywane „elektrodą zespoloną”. W celu przeprowadzenia pomiaru pH, zanurza się elektrodę zespoloną w buforowym roztworze wzorcowym (zanurzony musi być łącznik elektrolityczny znajdujący się około 1,5 cm nad bańką elektrody szklanej), po czym skaluje się miernik na znaną wartość pH roztworu wzorcowego. Następnie elektrodę zespoloną przenosi się do roztworu badanego i odczytuje wskazania pH-metru.



Rysunek 1. Schemat budowy przykładowej elektrody szklanej kombinowanej. 1 – elektroda chlorosrebrowa, 2 – roztwór wewnętrzny (0,1 M HCl), 3 – membrana szklana, 4 – elektroda porównawcza chlorosrebrowa, 5 – roztwór wewnętrzny elektrody porównawczej (nasycony KCl), 6 – kabel koncentryczny, 7 – wlew roztworu wewnętrznego, 8 – korek.

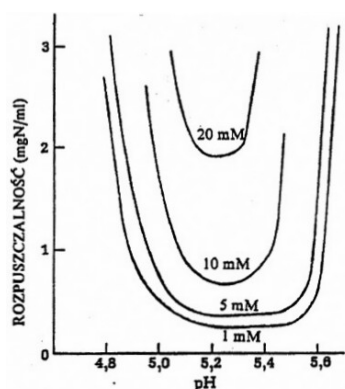
Punkt izoelektryczny białka

Cząsteczki białek są drobinami amfoterycznymi – czyli wykazują zarówno właściwości kwasowe, jak i zasadowe. W roztworach wodnych tworzą koloidy. Większość białek wykazuje duże powinowactwo do wody. Takie koloidy nazywamy hydrofilowymi. Białka, podobnie jak aminokwasy, posiadają ładunek, lecz w pH równym **punktwi izoelektrycznemu** (pI) są elektrycznie obojętne (Rys. 2). Różne białka mogą mieć różne wartości pI. W pH powyżej i poniżej pI białka uzyskują ładunek odpowiednio ujemny i dodatni. Na skutek zależnej od pH zmiany ładunku powierzchniowego białka zostają otoczone dipolami wody (hydratacja). Zjawisko to warunkuje rozpuszczalność białek w wodzie. Pozbawienie białek ładunku powoduje dezintegrację otoczki wodnej i utratę rozpuszczalności. Białka różniące się wartościami punktu izoelektrycznego (w tym samym pH środowiska) będą różniły się ładunkiem i powinowactwem do wody. Różnica ta umożliwia ich rozdział (frakcjonowanie).



Rysunek 2. Udział ładunku elektrycznego w procesach wytrącania białka z roztworu.

Wytrącanie białka zachodzi najłatwiej w jego punkcie izoelektrycznym (Rys. 2). Jeżeli proces ten przebiega w niskiej temperaturze (0–5°C), to wytrącone w osadzie białko po ponownym rozpuszczeniu odzyska swoją prawidłową strukturę oraz funkcję biologiczną.



Rysunek 3. Wpływ pH i niewielkich stężeń NaCl na rozpuszczalność α -laktoglobuliny w 25°C (Lehninger, 1979).

Na Rys. 3 zilustrowano zależność rozpuszczalności przykładowego białka od pH w warunkach zróżnicowanego stężenia chlorku sodu (NaCl). Rozpuszczalność białka wyraźnie maleje w pH zbliżonym do pI. Największy spadek rozpuszczalności obserwuje się w warunkach niskiego stężenia elektrolitu (1 mM NaCl).

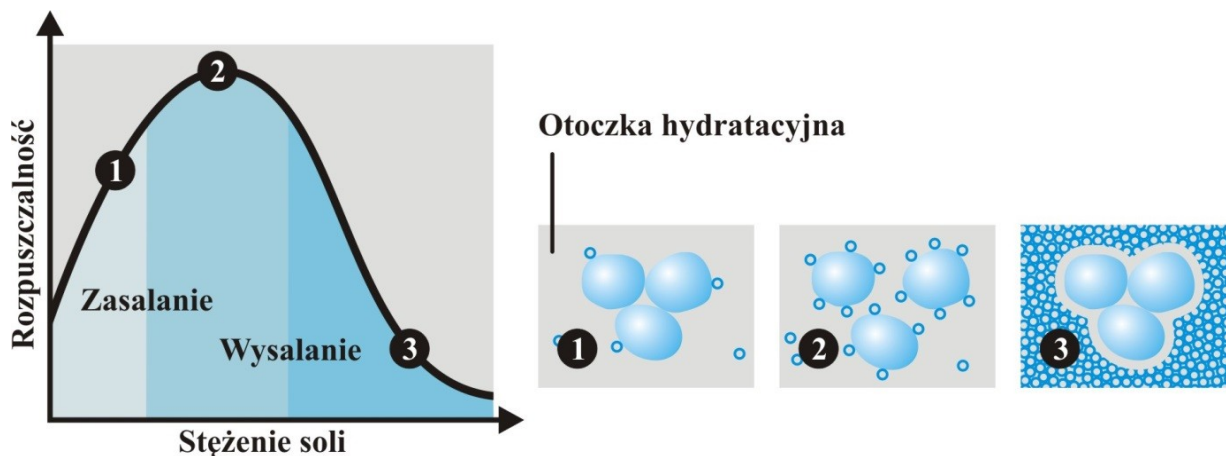
Wpływ stężenia soli na rozpuszczalność białek. Wysalanie białek.

Rozpuszczalność jest funkcją zarówno stężenia soli obojętnej, jak też ilości ładunków wszystkich rodzajów jonów znajdujących się w roztworze. Wartości te określają siłę jonową roztworu:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i \times z_i^2 \quad (10)$$

gdzie: c – stężenie jonów, z – ładunek jonów

Rozpuszczalność białka w wodzie destylowanej jest niewielka. Początkowo wraz ze wzrostem siły jonowej rośnie liczba jonów nieorganicznych na powierzchni białka, zapobiegając jego agregacji. Wiąże się to ze wzrostem rozpuszczalności białka. Zjawisko to określane jest wsalaniem lub zasalaniem (Rys. 4). Przy dużej sile jonowej, sól odciąga cząsteczki wody od powierzchni białek, doprowadzając do ich agregacji (**wysalanie białka**) (Rys. 4). Wysolone białka rozpuszczają się ponownie po usunięciu soli lub po rozcieńczeniu roztworu.



Rysunek 4. Zasalanie (wsalanie) i wytrącanie białek (wysalanie) w warunkach rosnącej siły jonowej roztworu.

Wykonanie pomiarów

Celem tej części ćwiczenia jest zapoznanie się z kalibracją, obsługą oraz przykładowym wykorzystaniem pH-metru do przeprowadzenia precypitacji białka w punkcie izoelektrycznym. W ramach ćwiczenia studenci zapoznają się również z różnymi rodzajami pH-metrów. Do wykonania tej części ćwiczenia wykorzystany zostanie pH-metr przenośny do pomiarów terenowych oraz mikrowirówka (Fot. 1 i 2).



Fotografia 1. Przenośny pH-Metr CP-105 (Elmetron) do pomiarów terenowych.



Fotografia 2. Mikrowirówka Denville.

Zasady prowadzenia pomiarów pH

1. Przy przenoszeniu elektrod z jednego roztworu do drugiego należy je starannie opłukać wodą destylowaną w celu uniknięcia przeniesienia zanieczyszczeń.
2. Podczas pomiarów elektrody nie powinny stykać się z dnem oraz ściankami naczynia.
3. Prowadzenie dokładnych pomiarów pH wymaga wstępnego ustalenia jednakowej temperatury roztworów wzorcowych i badanych oraz cechowania przyrządu za pomocą dwóch roztworów wzorcowych.
4. Buforowe roztwory wzorcowe powinny być tak dobrane, aby różnica pomiędzy ich wartościami pH obejmowała przedział wartości mierzonych.
5. Po użyciu elektrodę zespoloną należy opłukać wodą destylowaną.

Przeprowadzenie dwupunktowej kalibracji pH-metru

1. Zdjąć gumową osłonkę elektrody. Włączyć pH-metr.
2. Opłukać elektrodę wodą destylowaną, a następnie osuszyć delikatnie ręcznikiem papierowym.
3. Zanurzyć elektrodę w roztworze wzorca pH 7,0 na głębokość 3–4 cm.
4. Odczekać do ustabilizowania się wyniku na wyświetlaczu.
5. Nacisnąć przycisk *CAL* i chwilę przytrzymać do momentu pojawienia się *CAL* na wyświetlaczu. Po krótkim okresie czasu zniknie napis *CAL* i pojawi się skorygowana wartość pomiaru, równa wartości roztworu wzorcowego.
6. Opłukać elektrodę wodą destylowaną, a następnie osuszyć delikatnie ręcznikiem papierowym.
7. Umieścić elektrodę w roztworze wzorca pH 4,0 lub 9,0, powtarzając czynności opisane w pkt. 4–6.
8. Opłukać elektrodę wodą destylowaną, a następnie osuszyć delikatnie ręcznikiem papierowym.
9. Założyć gumową osłonkę na elektrodę.

Wysalanie i precipitacja owoalbuminy w punkcie izoelektrycznym.

1. Pobrać do zlewki 10 ml roztworu buforowego pH 7,6. Odważyć 0,2 g liofilizowanego białka jaja kurzego.
2. Intensywnie mieszać uzyskaną zawiesinę na mieszadle magnetycznym przez 5 min.
3. Ciągłe mieszając dodawać powoli 10 ml nasyconego roztworu siarczanu amonowego. Wytrącające się białka spowodują widoczne zmętnienie preparatu.
4. Mieszać na mieszadle przez 5 min.

5. Przygotować odpowiednią liczbę probówek typu Eppendorf o objętości 2 ml.
6. Wlać uzyskaną zawiesinę do przygotowanych probówek.
7. Odwirować zawiesinę w mikrowirówce (5 min., obroty 14 000 rpm).
8. Ostrożnie zlać supernatant znad osadu do przygotowanej umytej zlewki.
9. Zmierzyć i zapisać pH początkowe uzyskanego supernatantu.
10. Ciągłe mieszając doprowadzić pH zawiesiny do 4,6 (pI owoalbuminy) dodając ostrożnie po jednej kropli 2M kwasu octowego. Wytrącająca się owoalbumina spowoduje widoczne zmętnienie preparatu.
11. Przygotować 2 probówki typu Eppendorf o objętości 2 ml.
12. Wlać część zawiesiny do przygotowanych probówek.
13. Odwirować zawiesiny w mikrowirówce (5 min., 14 000 rpm).
14. Ponownie zlać supernatant. W uzyskanym osadzie znajduje się wytrącona owoalbumina.

Aby sprawdzić jakość wykonanego doświadczenia można przeprowadzić denaturującą elektroforezę poliakrylamidową białka w 10% żelu poliakrylamidowym. W tym celu należy pobrać po 200 μ l z każdej uzyskanej podczas ćwiczenia frakcji. Pobrane próbki należy zachować do dalszej analizy. Próbki powinny być przechowywane w -20°C .

Opracowanie wyników

1. Opisać przebieg wykonywanego ćwiczenia.
2. Wymienić i scharakteryzować wykorzystywane w ćwiczeniu zjawiska fizyczne.
3. Wyjaśnić w jaki sposób właściwości fizyczne białek mogą być wykorzystywane do ich izolacji.

Zakres wymaganych wiadomości

Podstawowe informacje o budowie białek; kalibracja pHmetru; roztwory wzorcowe pH; zasady pomiaru pH; wysalanie białek; punkt izoelektryczny białka.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 18, 21, 22

Słowniczek

Charakterystyka elektrody	Wykres zależności między potencjałem elektrody a pH roztworu
Elektroda odniesienia	Elektroda o stałym potencjale, zależnym od aktywności jonów wodorowych
Elektroda wskaźnikowa	elektroda reagująca na zmiany pH
pH roztworu	ujemny logarytm z aktywności jonów wodorowych w danym roztworze
Potencjał elektrodowy	siła elektromotoryczna ogniwa złożonego z danej elektrody oraz standardowej elektrody wodorowej

Punkt izoelektryczny	wartość pH, przy której populacja cząsteczek posiadających grupy funkcyjne mogące przyjmować jednocześnie dodatni i ujemny ładunek elektryczny (np. aminokwasy) zawiera średnio tyle samo ładunków dodatnich co ujemnych, na skutek czego ładunek całkowity całej populacji wynosi zero
Sila elektromotoryczna (SEM)	różnica potencjałów dwóch półogniw otwartego ogniwa elektrochemicznego (przez ogniwo nie płynie prąd, znajduje się ono w stanie równowagi)
Standardowy potencjał elektrody (E^0)	Wartość potencjału odpowiadająca aktywnościom substancji reagujących równym jedności
Wysalanie białek	Selektywne strącanie białek z roztworów poprzez dodanie stężonego roztworu soli (zwiększenie siły jonowej). Proces jest wynikiem zaburzenia otoczki solwatacyjnej i agregacji cząsteczek białek w wyniku łatwiejszego kontaktu pomiędzy polarnymi grupami sąsiadujących cząsteczek.

Ćwiczenie 13

Wyznaczanie średniego jonowego współczynnika aktywności elektrolitu drogą pomiaru siły elektromotorycznej ogniwa

Ogniwo galwaniczne zamienia bezpośrednio energię chemiczną na energię elektryczną prądu stałego. Proces ten następuje w wyniku reakcji elektrochemicznych, czyli reakcji chemicznych z oddawaniem lub przyłączaniem elektronów. Ogniwo zasadniczo składa się z dwóch elektrod, czyli metalicznych przewodników (przewodnik I rodzaju), które pozostają w kontakcie z roztworem elektrolitu, czyli przewodnikiem jonowym (przewodnik II rodzaju). Powstawanie różnicy potencjałów między metalem a roztworem elektrolitu można wytłumaczyć zdolnością metali do wysyłania swoich jonów do roztworu lub przyjmowania jonów z roztworu na swoją powierzchnię. Jony powstałe w wyniku dysocjacji elektrolitu warunkują powstawanie na powierzchniach elektrod pewnego potencjału względem roztworu (napięcie kontaktowe). Połączenie zewnętrznym przewodnikiem elektrod o różnym potencjale względem roztworu, zanurzonych w roztworze elektrolitycznym, powoduje przepływ prądu przez przewodnik. W zależności od rodzaju elektrolitu i materiału elektrod zachodzące w źródłach elektrochemicznych podczas przepływu prądu przemiany chemiczne mogą być nieodwracalne lub odwracalne.

Siła elektromotoryczna ogniwa (napięcie ogniwa) jest miarą zdolności reakcji ogniwa do spowodowania przepływu elektronów przez obwód. Siła elektromotoryczna ogniwa jest więc wielkością różnicy potencjałów występujących na biegunach ogniwa elektrochemicznego. Jednak aby różnica potencjałów na biegunach ogniwa elektrochemicznego mogła wystąpić konieczne jest spełnienie jednego z poniższych warunków:

- ogniwo elektrochemiczne zbudowane z różnych metali elektrodowych i różnych elektrolitów;
- elektrody mogą być zanurzone w tym samym elektrolicie, ale muszą być zbudowane z dwóch różnych metali;
- elektrody wykonane z tego samego metalu, ale zanurzone w różnych elektrolitach;
- elektrody wykonane z tego samego metalu i zanurzone w tym samym elektrolicie, ale o dwóch różnych stężeniach (ogniwo stężeniowe).

W skład ogniwa elektrochemicznego, jak wspomniano wcześniej, wchodzi przewodnik II rodzaju. W roztworach elektrolitów występują obdarzone ładunkiem elektrycznym jony, jak

i obojętne cząsteczki rozpuszczalnika. W związku z tym należy uwzględnić różne rodzaje oddziaływań wzajemnych pozostających w stanie równowagi: silne elektrostatyczne oddziaływania między jonami oraz oddziaływania jonów z elektrycznie obojętnymi cząsteczkami rozpuszczalnika. Silne oddziaływania kulombowskie (elektrostatyczne) pomiędzy jonami sprawiają, że nawet rozcieńczonych roztworów elektrolitów nie można traktować jako doskonałe. Do badania procesów równowagowych w roztworach elektrolitów stosuje się najczęściej cząstkowe molowe entalpie swobodne składników, zwane potencjałami chemicznymi, wyrażone zależnością:

$$\mu = \mu^o + RT \ln a_{\pm} \quad (1)$$

gdzie: μ – potencjał chemiczny elektrolitu; μ^o – potencjał standardowy elektrolitu; R – stała gazowa; T – temperatura; $a_{\pm}$ – średnia aktywność jonowa elektrolitu.

Aktywność elektrolitu definiowana jest jako iloczyn stężenia roztworu i współczynnika aktywności:

$$a_{\pm} = c_{\pm} f_{\pm} \quad (2)$$

gdzie: $a_{\pm}$ – średnia aktywność jonowa elektrolitu; $c_{\pm}$ – stężenie elektrolitu; $f_{\pm}$ – średni jonowy współczynnik aktywności elektrolitu.

Za średnią jonową aktywność elektrolitu uważa się średnią geometryczną aktywności poszczególnych jonów powstałych w wyniku dysocjacji elektrolitycznej:

$$a_{\pm} = (a_+^{n^+} a_-^{n^-})^{1/n} \quad (3)$$

gdzie: n^+ , n^- – liczba odpowiednio kationów i anionów tworzonych w wyniku dysocjacji; n – liczba jonów tworzonych w wyniku dysocjacji ($n^+ + n^- = n$).

Analogicznie średnie jonowe stężenie elektrolitu i średnie jonowe współczynniki aktywności elektrolitu wyrażane są jako:

$$c_{\pm} = (c_+^{n^+} c_-^{n^-})^{1/n} \quad (4)$$

$$f_{\pm} = (f_+^{n^+} f_-^{n^-})^{1/n} \quad (5)$$

Współczynnik aktywności jest wielkością zależną od temperatury oraz od siły jonowej roztworu. Siła jonowa roztworu zależy natomiast od stężeń i ładunków wszystkich jonów obecnych w roztworze i wyrażana jest wzorem:

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i \quad (6)$$

gdzie: I – siła jonowa elektrolitu; z_i – wartościowość jonu i ; c_i – stężenie jonu i .

Zgodnie z teorią Debye'a-Hückela, w roztworach silnie rozcieńczonych średnie

współczynniki aktywności można obliczyć korzystając z równania:

$$\log f_{\pm} = -A|z_+z_-|\sqrt{I} \quad (7)$$

gdzie: A – stała charakterystyczna dla rozpuszczalnika i temperatury (dla roztworów wodnych w temperaturze 298 K wynosząca $0,509 \text{ mol}^{-1/2}\text{dm}^{3/2}$); z_+, z_- – wartościowości jonów; I – siła jonowa.

Znając wartość siły jonowej można obliczyć współczynnik aktywności posługując się następującym równaniem:

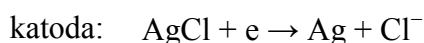
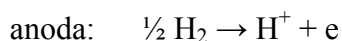
$$\log f_{\pm} = -\frac{A|z_+z_-|\sqrt{I}}{1 + Bd\sqrt{I}} \quad (8)$$

gdzie: B – stała charakterystyczna dla rozpuszczalnika i temperatury (dla roztworów wodnych w temperaturze 298 K wynosi $3,3 \times 10^7$); d – efektywna średnica jonów, czyli najmniejsza odległość, na jaką mogą się zbliżyć jony różnoimienne (parametr empiryczny, zależny od rodzaju elektrolitu).

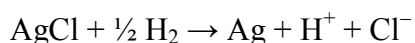
Pomiar siły elektromotorycznej ogniwa umożliwia wyznaczenie szeregu wielkości fizykochemicznych, na przykład zmian termodynamicznych funkcji stanu dla reakcji sumarycznej zachodzącej w ogniwie, współczynników aktywności elektrolitu w roztworze, czy iloczynów rozpuszczalności. Jedną z najbardziej dokładnych metod wyznaczania średnich współczynników aktywności jonów elektrolitu jest pomiar siły elektromotorycznej ogniw zbudowanych z elektrod, z których jedna jest odwracalna względem kationu a druga względem anionu tego elektrolitu. Wyznaczenie średniego jonowego współczynnika aktywności jonów w roztworze HCl jest możliwe przy użyciu ogniwa złożonego z elektrody wodorowej (odwracalna względem jonów wodorowych) i chlorosrebrowej (odwracalna względem jonów chlorkowych):



w której na elektrodach zachodzą następujące reakcje:



Źródłem energii elektrycznej w tym ogniwie jest następujący proces chemiczny:



Siła elektromotoryczna omawianego ogniwa opisuje równanie:

$$E = E_o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{Ag}} a_{\text{H}^+} a_{\text{Cl}^-}}{a_{\text{AgCl}} a_{\text{H}_2}^{0,5}} \quad (9)$$

gdzie: E_o - standardowa siła elektromotoryczna ogniwa [V], F – stała Faradaya [C mol^{-1}], n – liczba elektronów wymienianych w danej reakcji, a – aktywności substancji reagujących, R – stała gazowa, T – temperatura.

Przyjmując, że aktywność fazy czystej oraz aktywność ciśnieniowa wodoru równe są jedności ($a_{\text{Ag}}, a_{\text{AgCl}}, a_{\text{H}_2} = 1$), otrzymujemy:

$$E = E_o - \frac{RT}{nF} \ln a_{H^+} a_{Cl^-} \quad (10)$$

$$E = E_o - \frac{2RT}{nF} \ln a_{\pm} \quad (11)$$

Pamiętając, że aktywność elektrolitu definiowana jest jako iloczyn stężenia roztworu i współczynnika aktywności, zgodnie z zależnością (2) oraz $n = 1$ w przypadku omawianej reakcji, po dokonaniu przekształceń uzyskamy:

$$E + \frac{2RT}{F} \ln c_{\pm} = E_o - \frac{2RT}{F} \ln f_{\pm} \quad (12)$$

Gdy $c_{\pm} \rightarrow 0$, wówczas $f_{\pm} \rightarrow 1$. Zgodnie z tym otrzymujemy zależność:

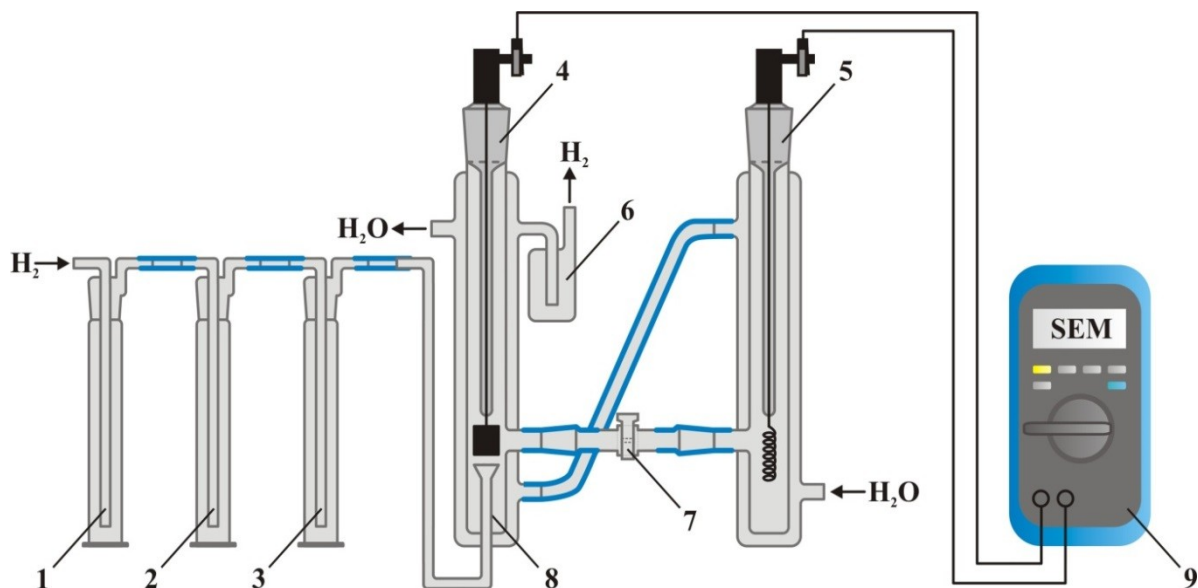
$$\lim_{c \rightarrow 0} (E + \frac{2RT}{F} \ln c_{\pm}) = E_o \quad (13)$$

Uwzględniając zależność, zgodnie z granicznym prawem Debye'a-Hückela, spełnionym dla roztworów rozcieńczonych ($c < 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$), zależność $E + \frac{2RT}{F} \ln c_{\pm} = f(\sqrt{c_{\pm}})$ powinna mieć przebieg prostoliniowy w zakresie niskich stężeń. Przeprowadzenie graficznie ekstrapolacji do $c_{\pm} = 0$ (zgodnie z równaniem (13)) pozwala na wyznaczenie wartości E_o , a następnie obliczenie wartości współczynników aktywności dla poszczególnych stężeń przekształcając zależność (12).

Aparatura pomiarowa

Ogniwo służące do pomiarów siły elektromotorycznej w celu wyznaczenia średniego jonowego współczynnika aktywności jonów w roztworach kwasu solnego przedstawiono na rysunku 1. Przed rozpoczęciem pomiaru roztworem elektrolitu napełnia się naczynia elektrodowe, w których następnie umieszcza się odpowiednie elektrody (4 – elektroda platynowa, 5 – elektroda chlorosrebrowa). Naczynia elektrodowe połączone są kluczem elektrolitycznym (7). Oba naczynia elektrodowe posiadają płaszcze termostatu, do których tłoczona jest woda z termostatu o odpowiedniej temperaturze. Po zmontowaniu układu pomiarowego, można rozpocząć pomiar ostrożnie uruchamiając przepływ wodoru z butli gazowej. Wodór przepuszczany jest przez układ trzech płuczek napełnionych odpowiednimi roztworami (1 – płuczka z 3% roztworem KMnO_4 , 2 – płuczka z alkalicznym roztworem pirogallolu, 3 – płuczka z nasyconym roztworem HgCl_2) i doprowadzany do bełkotki (8), która rozdziela strumień gazu na drobne pęcherzyki. Strumień wodoru opłukuje elektrodę platynową i opuszcza naczynie przez zawór (6). Po nasyceniu elektrody wodorem,

mierzymy siłę elektromotoryczną ogniwa przy pomocy pH-metru.



Rysunek 1. Schemat ogniwa użytego w ćwiczeniu, służący do pomiarów siły elektromotorycznej w celu wyznaczenia średniego jonowego współczynnika aktywności jonów w roztworach kwasu solnego.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie średnich współczynników aktywności jonów w wodnych roztworach kwasu solnego na podstawie pomiarów siły elektromotorycznej ogniwa zbudowanego z dwóch elektrod odwracalnych względem jonów badanego elektrolitu.

1. Przygotować 8–10 roztworów kwasu solnego (100 cm^3) z zakresu stężeń od 0,1 do $0,001\text{ mol dm}^{-3}$ (stężenia roztworów wyznaczane są przez prowadzącego ćwiczenia).
2. Roztworem o najmniejszym stężeniu napęlnić naczynia elektrodowe połączone kluczem elektrolitycznym, uważając aby w rurkach nie wytworzyły się pęcherzyki powietrza. Do naczynek elektrodowych włożyć elektrody: chlorosrebrową oraz platynową. Sprawdzić, czy elektrody są zanurzone w roztworze HCl. Ostrożnie odkręcamy zawór butli gazowej, tak aby elektroda platynowa była delikatnie opłukiwana gazowym wodorem. Odczekać do momentu ustalenia się wskazań SEM ogniwa, a następnie zapisać odczyt siły elektromotorycznej ogniwa.
3. Zakręcić zawór butli, ostrożnie wyjąć elektrody, a następnie zlać badany roztwór rozmontowując klucz elektrolityczny. Przepłukać naczynia elektrodowe badanym w następnej kolejności roztworem elektrolitu.
4. Postępując w opisany w punktach 1–3 sposób przeprowadzić pomiary siły elektromotorycznej dla pozostałych roztworów kwasu solnego.

Tabela 1. Dane elektrochemiczne do wyznaczania średniego jonowego współczynnika aktywności elektrolitu drogą pomiaru siły elektromotorycznej ogniwa.

$T = \dots\dots\dots K$							
Lp.	c [mol dm ⁻³]	E [mV]	$E + \frac{2RT}{F} \ln c$ [mV]	$c^{1/2}$ [mol ^{1/2} dm ^{-3/2}]	$\ln f_{\pm}$	$f_{\pm}^{\text{eksperyment}}$	$f_{\pm}^{\text{literatura}}$
1.							
2.							
...							
10.							

Wykonanie sprawozdania

Z granicznego prawa Debye'a-Hückela obliczyć teoretyczne wartości współczynników aktywności dla badanych stężeń kwasu solnego, w tym celu:

1. Obliczyć wartości $E + \frac{2RT}{F} \ln c_{\pm}$ dla poszczególnych roztworów, a następnie wykreślić zależność $E + \frac{2RT}{F} \ln c_{\pm} = f(\sqrt{c_{\pm}})$. W zakresie niskich stężeń wykres powinien być linią prostą. Ekstrapolując wykreśloną prostą do $\sqrt{c_{\pm}} = 0$ wyznaczyć wartość E_o i porównać ją z danymi tablicowymi.
2. Korzystając z równania (12) wyliczyć średnie współczynniki aktywności dla każdego stężenia HCl. Wyniki zestawień w tabeli.
3. Porównać wartości średnich współczynników aktywności wyznaczonymi w ćwiczeniu z wartościami literaturowymi.
4. Wyjaśnić przyczyny rozbieżności wyników.

Zakres wymaganych wiadomości

Ogniwa chemiczne; reakcje elektrodowe w ogniwach; potencjały normalne elektrod; praktyczne wykorzystanie ogniw chemicznych; pojęcie SEM; zależność SEM od aktywności jonów; metody pomiaru SEM; definicja i sens fizyczny współczynnika aktywności; wyznaczanie współczynnika aktywności drogą pomiaru SEM ogniwa; podział elektrolitów ze względu na wielkość i rodzaj sił międzycząsteczkowych; teoria Debye'a-Hückla elektrolitów mocnych; pojęcie aktywności i siły jonowej roztworu.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 5, 11, 12, 13

Słowniczek

Ogniwo elektrochemiczne	Urządzenie zamieniające bezpośrednio energię chemiczną na energię elektryczną prądu stałego. Proces zmiany następuje w wyniku reakcji elektrochemicznych, czyli reakcji chemicznych z oddawaniem lub przyłączaniem elektronów. Ogniwo zbudowane jest z dwóch elektrod, czyli metalicznych przewodników (przewodnik I rodzaju), które pozostają w kontakcie z roztworem elektrolitu, czyli przewodnikiem jonowym (przewodnik II rodzaju).
Siła elektromotoryczna (SEM)	Różnica potencjałów elektrod ogniwa w warunkach <i>quasi</i>-statycznego przepływu ładunku. Siła elektromotoryczna źródła jest zdefiniowana jako iloraz pracy wykonanej przez źródło do wartości przenoszonego ładunku: $SEM = \frac{W}{q}$ gdzie: SEM – siła elektromotoryczna [V], W – praca [J], q – przepływający ładunek [C].
Współczynnik aktywności	Bezwymiarowy współczynnik pozwalający przeliczyć wielkości fizyczne o charakterze stężenia lub ciśnienie na wielkości o charakterze termodynamicznym nazywane aktywnością. Dla układów idealnych (gaz doskonały, roztwór doskonały) w których nie występują (lub mogą być pominięte) oddziaływania pomiędzy parami cząsteczek, a także w przypadku układów bardzo rozcieńczonych (niskie stężenie lub ciśnienie) współczynniki aktywności są równe jedności. $a_{\pm} = c_{\pm} f_{\pm}$ gdzie: $a_{\pm}$ – średnia aktywność jonowa elektrolitu; $c_{\pm}$ – stężenie elektrolitu; $f_{\pm}$ – średni jonowy współczynnik aktywności elektrolitu.
Siła jonowa elektrolitu	Miara występujących w roztworze oddziaływań międzyjonowych, określająca wpływ wszystkich obecnych w roztworze jonów na ich zachowanie oraz oddziaływanie z polem elektrycznym. Siła jonowa obliczana jest ze wzoru: $I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i$ gdzie: I – siła jonowa elektrolitu; z_i – wartościowość jonu i; c_i – stężenie jonu i.

Ćwiczenie 14

Wyznaczanie liczb przenoszenia jonów metodą Hittorfa

Przewodnictwo elektryczne jest to zdolność przenoszenia ładunków elektrycznych przez dodatnie lub ujemne nośniki zachodzące w ośrodku materialnym pod wpływem przyłożonego zewnętrznego pola elektrycznego. Zdolność do przewodzenia prądu elektrycznego posiadają przewodniki, wśród których wyróżniamy przewodniki I i II rodzaju. Pierwszą grupę stanowią przewodniki metaliczne (metale oraz ich stopy), w których udział w przewodzeniu prądu elektrycznego biorą elektrony. Przewodnikami II rodzaju są przewodniki elektrolityczne (jonowe), które przewodzą prądu na skutek ruchu jonów. Wielkością charakteryzującą przewodnictwo elektryczne materiałów jest przewodność elektryczna, wyrażona wzorem:

$$\kappa = \frac{1}{R} \times \frac{l}{S} \quad (1)$$

gdzie: κ – przewodność elektryczna właściwa [S m^{-1} lub $\Omega^{-1} \text{m}^{-1}$]; R – opór elektryczny [Ω]; l – grubość warstwy roztworu [m]; S – powierzchnia przekroju warstwy roztworu prostopadła do kierunku przepływu prądu [m^2].

Wielkość przewodnictwa roztworów zależy od jego stężenia, temperatury, a także od charakteru chemicznego substancji rozpuszczonej (zdolności do dysocjacji na jony) i rodzaju rozpuszczalnika (zdolności do tworzenia solwatów z powstałymi w wyniku dysocjacji jonami oraz wartości przenikalności elektrycznej).

Przepływ prądu elektrycznego przez roztwór elektrolitu polega na równoczesnym i przeciwnie ukierunkowanym ruchu kationów i anionów. Szybkość poruszania się jonów w polu elektrycznym zależy od rozmiaru, ładunku, stopnia solwatacji oraz stężenia jonów w roztworze, lepkości ośrodka oraz temperatury i jest wprost proporcjonalna do natężenia pola elektrycznego. Szybkości poruszania się jonu w polu elektrycznym nazywana jest ruchliwością jonu i wyrażana jako prędkość migracji jonu w polu elektrycznym o jednostkowym natężeniu, zgodnie ze wzorem:

$$u = \frac{v}{E} \quad (2)$$

gdzie: u – ruchliwość jonu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{S}^{-1}$]; v – średnia prędkość poruszania się jonu [m s^{-1}]; E – natężenie pola elektrycznego [V m^{-1}].

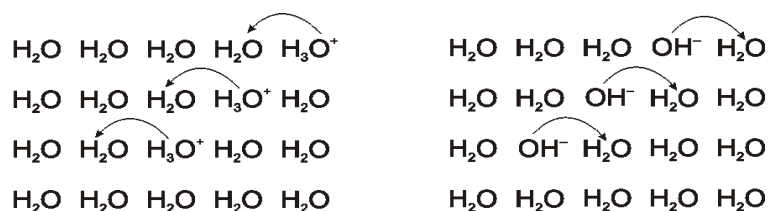
W przypadku roztworów o rozcieńczeniu nieskończenie wielkim w określonej temperaturze oraz rodzaju rozpuszczalnika ruchliwość jonów osiąga maksymalną wartość

i jest nazywana ruchliwością graniczną jonu (u_∞). W tabeli 1 zestawiono ruchliwości graniczne niektórych jonów w wodzie w temperaturze 298 K.

Tabela 1. Ruchliwość graniczna (u_∞) wybranych jonów w wodzie w temperaturze 298 K.

Rodzaj kationu	Ruchliwość jonu $u_\infty \times 10^{-8} [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$	Rodzaj anionu	Ruchliwość jonu $u_\infty \times 10^{-8} [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
H_3O^+	36,26	OH^-	20,46
Na^+	5,24	Cl^-	7,93
K^+	7,62	Br^-	8,12
NH_4^+	7,61	HSO_4^-	5,18
Ag^+	6,45	NO_3^-	7,41
Mg^{2+}	5,49	SO_4^{2-}	8,30
Cu^{2+}	5,75	HCO_3^-	4,61
Al^{3+}	6,32	BrO_3^-	5,80

Z danych zestawionych w tabeli 1 wynika, że ruchliwości graniczne różnych jonów mają zbliżone wartości, niezależnie od budowy jonu czy jego ładunku. Jedynie jony oksoniowe i wodorotlenowe wykazują znacznie większe wartości ruchliwości granicznej. Anomalnie wysoka ruchliwość jonu oksoniowego (H_3O^+) oraz wodorotlenowego (OH^-) w roztworach wodnych związana jest ze specyficznym mechanizmem wędrówki tych jonów, przedstawionym na rys. 1, polegającym na przeskokach protonu między sąsiednimi cząsteczkami wody (mechanizm „łańcuchowy”). W przypadku jonów oksoniowych kierunek pozornej wędrówki jonów w polu elektrycznym jest zgodny z kierunkiem przeskoku protonu, natomiast w przypadku jonów wodorotlenowych – kierunek pozornej wędrówki jonów w polu elektrycznym jest przeciwny do kierunku przeskoku protonu.



Rysunek 1. Mechanizm wędrówki jonów H_3O^+ (lewa strona) i OH^- (prawa strona) w polu elektrycznym.

Ruchliwość kationów i anionów na ogół różnią się wartością. W związku z tym udział odpowiednich jonów w przenoszeniu ładunku elektrycznego również nie jest jednakowy. Porównanie udziału poszczególnych jonów w przenoszeniu ładunku elektrycznego jest możliwe poprzez wyznaczenie liczby przenoszenia jonów (liczby Hittorfa). Jest ona wyrażana jako stosunek ładunku elektrycznego przenieszonego przez dany rodzaj jonu do całkowitego ładunku elektrycznego przepływającego przez roztwór, wyrażanego wzorem:

$$t_i = \frac{q_i}{Q} = \frac{u_i c_i z_i}{\sum u_i c_i z_i} \quad (3)$$

gdzie: t_i – liczba przenoszenia jonu i ; q_i – ładunek przeniesiony przez jon i ; Q – całkowity ładunek elektryczny przeniesiony przez roztwór; u_i – ruchliwość jonu i ; c_i – stężenie jonu i ; z_i – wartościowość jonu i .

W przypadku gdy roztwór elektrolitu zbudowany jest z kationu i anionu o tym samym ładunku bezwzględnym (elektrolit symetryczny), liczby przeniesienia odpowiednio kationu i anionu przedstawia się za pomocą równań:

$$t_K = \frac{u_K}{u_K + u_A} \quad (4)$$

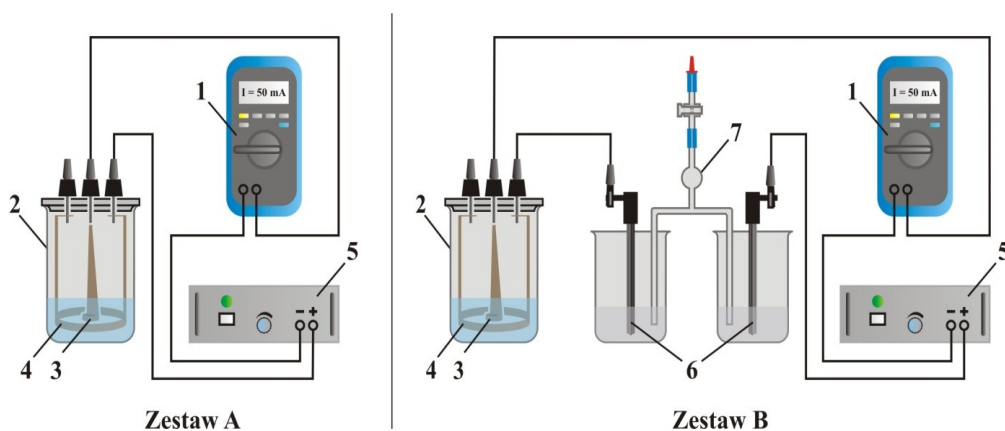
$$t_A = \frac{u_A}{u_K + u_A} \quad (5)$$

gdzie: t_K, t_A – liczba przenoszenia odpowiednio kationu i anionu; u_K, u_A – ruchliwość odpowiednio kationu i anionu.

Suma liczb przenoszenia kationów i anionów w określonym elektrolicie jest równa jedności ($t_K + t_A = 1$). Liczby przenoszenia wskazują, jaka część ogólnej ilości ładunku elektrycznego została przeniesiona przez kationy, a jaka przez aniony.

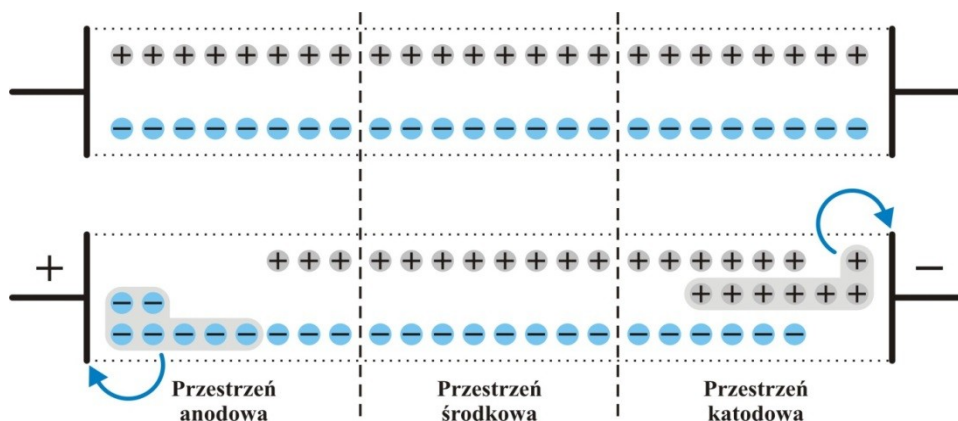
Aparatura pomiarowa

Jedną z metod wyznaczenia liczb przenoszenia jonów jest metoda zaproponowana przez niemieckiego chemika Johanna Hittorfa. Wykazał on, że przepływowi ładunku elektrycznego przez roztwór elektrolitu towarzyszą zmiany ilości elektrolitu w przestrzeniach elektrodowych związane z wartościami liczb przenoszenia kationów i anionów. W celu wyznaczenia liczb przenoszenia jonów aparat Hittorfa (rys. 2, zestaw B) napełnia się elektrolitem o znanym stężeniu, a następnie przepuszcza przez roztwór określony ładunek.



Rysunek 2. Schemat aparatu Hittorfa używanego w ćwiczeniu do celu wyznaczenia liczb przenoszenia: 1 – miliamperomierz, 2 – kulometr miedziowy, 3 – katoda, 4 – anoda, 5 – zasilacz, 6 – elektrody węglowe, 7 – klucz elektrolityczny.

Po przepłynięciu ładunku oznacza się ilościowo zawartość elektrolitu w przestrzeni katodowej i anodowej. Na podstawie bilansu mas w obu przestrzeniach można w prosty sposób wyznaczyć liczby przenoszenia. Na rysunku 3 przedstawiono schemat wędrówki jonów w aparacie Hittorfa: na górze stan roztworu elektrolitu przed elektrolizą, na dole stan roztworu elektrolitu po przepłynięciu ładunku q . Przed rozpoczęciem elektrolizy stężenie roztworu w obu przestrzeniach przyelektrodowych oraz w przestrzeni środkowej jest jednakowe. W trakcie elektrolizy zgodnie z warunkiem zachowania elektroobojętności roztworu z otoczenia każdej z elektrod ubywają równoważne pod względem ładunku ilości kationów i anionów (zaznaczone na rys. 3. kolorem szarym). Zmiany ilości elektrolitu w przestrzeniach przykatodowej i przyanodowej po procesie elektrolizy są jednak różne.



Rysunek 3. Schemat wędrówki jonów w aparacie Hittorfa; na górze stan roztworu przed elektrolizą, na dole stan roztworu po przepłynięciu ładunku q .

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczanie liczb przenoszenia jonów jednego z elektrolitów wskazanych przez prowadzącego (H^+ i Cl^- w 0,1 M roztworze HCl , H^+ i SO_4^{2-} w 0,1 M roztworze H_2SO_4 , Na^+ i OH^- w 0,1 M roztworze NaOH) metodą Hittorfa.

1. Pomiar ładunku przepływającego przez roztwór wykonujemy kulometrem miedziowym, który zestawiamy zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 2 (zestaw A).

Kulometr składa się z naczynia przykrytego pokrywą, z umocowanymi w niej elektrodami miedzowymi: pierścieniową anodą i katodą, którą można wyjmować. Naczynie napełnione jest elektrolitem o składzie: 15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 cm^3 stężonego H_2SO_4 , 5 cm^3 alkoholu etylowego w 100 cm^3 wody.

Wstępnego pokrycia katody miedzią dokonać przepuszczając przez kulometr prąd o natężeniu około 50 mA przez czas 15 minut. Wskazania miliamperomierza korygować co 2 minuty. Po wyłączeniu prądu ostrożnie wyjąć katodę, opłukać wodą destylowaną i alkoholem etylowym, wysuszyć i zważyć. Opisane czynności należy wykonać szybko i ostrożnie, aby świeżo osadzona warstwa miedzi nie uległa uszkodzeniu lub utlenieniu. Zważoną katodę umieścić w kulometrze i przystąpić do właściwych pomiarów.

2. Zestawić układ pomiarowy zgodnie z rysunkiem 2 (zestaw B), w celu przeprowadzenia elektrolizy jednego z trzech elektrolitów (HCl, NaOH, H₂SO₄), wskazanego przez prowadzącego ćwiczenia. W dwóch zlewkach umieścić po 80 cm³ badanego roztworu o stężeniu 0,1 mol dm⁻³, połączyć je kluczem elektrolitycznym i zanurzyć w nich elektrody węglowe. Po zmontowaniu obwodu elektrycznego i podłączeniu do źródła prądu ustalić w obwodzie natężenie prądu na poziomie 50 mA. Elektrolizę badanego roztworu prowadzić przez 40 minut, korygując wskazania miliamperomierza co 5 minut.
3. W czasie trwania elektrolizy oznaczyć dokładnie stężenie badanego roztworu elektrolitu. W tym celu pobrać 20 cm³ roztworu wyjściowego do kolby stożkowej i zmiareczkować 0,1 mol dm⁻³ roztworem NaOH (w przypadku elektrolizy roztworu kwasu) lub 0,1 mol dm⁻³ roztworem HCl (w przypadku elektrolizy roztworu zasady), stosując jako wskaźnik fenoloftaleinę. Każde miareczkowanie powtórzyć co najmniej trzykrotnie.
4. Po przeprowadzeniu elektrolizy ponownie wyjąć ostrożnie katodę, opłukać wodą destylowaną i alkoholem etylowym, osuszyć i zważyć.
5. Po przeprowadzonej elektrolizie z każdej przestrzeni (katodowej i anodowej) pobrać pipetą po 20 cm³ badanego roztworu i miareczkować 0,1 mol dm⁻³ roztworem NaOH lub 0,1 mol dm⁻³ roztworem HCl wobec fenoloftaleiny. Każde miareczkowanie powtórzyć co najmniej trzykrotnie.

Tabela 1. Tabela wyników wyznaczania liczb przenoszenia jonów metodą Hittorfa.

Dane pomiarowe	Badany roztwór: 0,1 mol dm ⁻³			
Masa katody przed elektrolizą m_1 [g]				
Masa katody po elektrolizie m_2 [g]				
Miareczkowanie	Numer pomiaru			
	1	2	3	Średnia
Objętość roztworu miareczkującego przed elektrolizą V_1 [cm ³]				
Objętość roztworu miareczkującego po elektrolizie w przestrzeni katodowej V_K [cm ³]				
Objętość roztworu miareczkującego po elektrolizie w przestrzeni anodowej V_A [cm ³]				

Wykonanie sprawozdania

1. Znając przyrost masy katody podczas elektrolizy badanego roztworu, obliczyć ilość ładunku, który przepłynął przez roztwór, korzystając z zależności:

$$Q = \Delta n_{Cu^{2+}} z_{Cu^{2+}} F = \frac{(m_2 - m_1)}{M_{Cu^{2+}}} z_{Cu^{2+}} F \quad (6)$$

gdzie: Q – ładunek, który przepłynął przez roztwór [C]; m_1, m_2 – masa katody odpowiednio przed i po elektrolizie [g]; $M_{Cu^{2+}}$ – masa molowa kationu miedzi [g mol⁻¹]; $z_{Cu^{2+}}$ – wartościowość kationu miedzi; F – stała Faradaya [C mol⁻¹].

2. Na podstawie średnich wyników miareczkowania badanego roztworu przed i po elektrolizie obliczyć zmianę ilości jonów odpowiednio H^+ , Cl^- lub OH^- w przestrzeni katodowej i anodowej.

3. Wyznaczyć liczby przenoszenia dla kationu i anionu (t_K, t_A), korzystając z zależności:

$$t_K = \Delta n_{and} \frac{F}{Q} \quad (7)$$

$$t_A = \Delta n_{kat} \frac{F}{Q} \quad (8)$$

gdzie: $\Delta n_{and}, \Delta n_{kat}$ – zmiana ilości jonów przed i po elektrolizie odpowiednio w przestrzeni anodowej i katodowej.

4. Porównać otrzymane wyniki liczb przenoszenia jonów z danymi literaturowymi (podać źródło).

5. Oszacować błąd otrzymanych wyników. Przedyskutować możliwe błędy pomiarowe i podać przyczyny powstawania błędów w metodzie Hittorfa.

Zakres wymaganych wiadomości:

Pojęcia przewodnictwa roztworów elektrolitów i ruchliwości jonów; zależność przewodnictwa od stężenia, temperatury; prawa elektrolizy Faradaya; kulometria; metody wyznaczania liczby przenoszenia jonów; proces elektrolizy; elektroliza kwasów, zasad i soli; analiza Hittorfa dla przestrzeni przyelektrodowych dla kwasów i zasad.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 5, 12, 13

Słowniczek

Przewodność elektryczna	Wielkość charakteryzująca przewodnictwo elektryczne materiałów, wyrażana wzorem: $\kappa = \frac{1}{R} \times \frac{l}{S}$, gdzie: κ – przewodność elektryczna [$S \cdot m^{-1}$ lub $\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$]; R – opór elektryczny [Ω]; l – grubość warstwy roztworu [m]; S – powierzchnia przekroju warstwy roztworu prostopadła do kierunku przepływu prądu [m^2]. Wielkość przewodnictwa zależy od jego stężenia, temperatury, a także w przypadku roztworów od charakteru chemicznego substancji rozpuszczonej (zdolności do dysocjacji na jony) i rodzaju rozpuszczalnika (zdolności do tworzenia solwatów z powstałymi w wyniku dysocjacji jonami oraz wartości przenikalności elektrycznej).
Ruchliwość jonów	Szybkości poruszania się jonu w polu elektrycznym. Wyrażana jest jako stosunek prędkości migracji jonu w polu elektrycznym o jednostkowym natężeniu: $u = \frac{v}{E}$, gdzie: u – ruchliwość

	jonu [$\text{m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$]; v – średnia prędkość poruszania się jonu [m s^{-1}]; E – natężenie pola elektrycznego [V m^{-1}].
Liczby przenoszenia jonów	Jest to stosunek ładunku elektrycznego przenieszonego przez dany rodzaj jonu do całkowitego ładunku elektrycznego przepływającego przez roztwór, wyrażanego wzorem: $t_i = \frac{q_i}{Q} = \frac{u_i c_i z_i}{\sum u_i c_i z_i}$ gdzie: t_i – liczba przenoszenia jonu i; q_i – ładunek przeniesiony przez jon i; Q – całkowity ładunek elektryczny przeniesiony przez roztwór; u_i – ruchliwość jonu i; c_i – stężenie jonu i; z_i – wartościowość jonu i.

Ćwiczenie 15

Konduktometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji

Czysta woda nie przewodzi prądu elektrycznego, dopiero roztwory **elektrolitów** mają taką właściwość. Przewodnictwo roztworów zależy od ich stężenia i temperatury, ale przede wszystkim – od rodzaju substancji rozpuszczonej (od jej zdolności dysocjacji na jony, zależnej od stopnia spolaryzowania cząsteczek) oraz od rodzaju użytego rozpuszczalnika i jego zdolności solwatacyjnych, czyli otaczania jonów cząsteczkami rozpuszczalnika na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych.

Przewodnictwo roztworów elektrolitów można opisać przy pomocy kilku wielkości fizycznych. Podstawową jest **przewodność** (L), wielkość odwrotnie proporcjonalna do oporu roztworu (R). Jednostką przewodności (przewodnictwa) w układzie SI jest siemens (S).

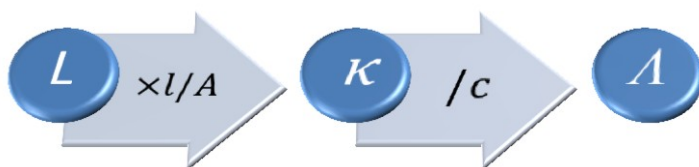
$$L = \frac{1}{R} \quad [\text{S} = \Omega^{-1}] \quad (1)$$

Zarówno opór, jak i przewodność próbki roztworu zależy od wymiarów naczynka, jego długości l i pola przekroju A :

$$L = \frac{\kappa \times A}{l} \quad (2)$$

Stosunek A/l jest stały dla danego naczynka pomiarowego, a κ oznacza **przewodność właściwą**, o wymiarze $[\text{S/m}]$ w jednostkach SI. Uwzględniając zależność przewodności od stężenia molowego elektrolitu (c), możemy zdefiniować **przewodność molową** Λ jako:

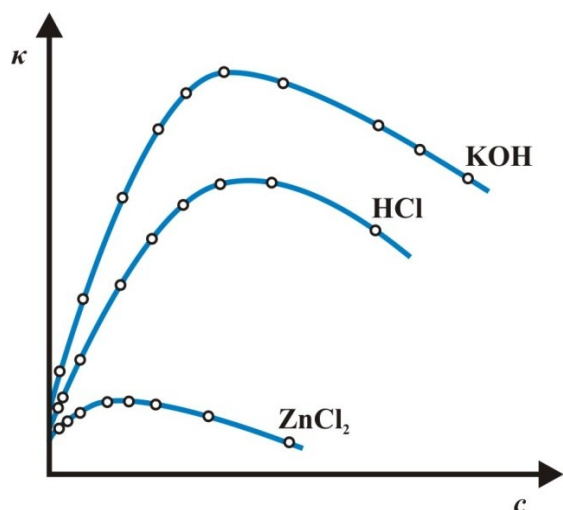
$$\Lambda = \frac{\kappa}{c} \quad [\text{S m}^2 \text{mol}^{-1}] \quad (3)$$



Rysunek 1. Zależności pomiędzy przewodnością L , przewodnością właściwą κ i przewodnością molową Λ .

Przewodność właściwa roztworów elektrolitów nie zmienia się w zależności od stężenia roztworu liniowo w całym zakresie stężeń (Rys. 2). Początkowy liniowy wzrost przewodności ze wzrostem stężenia roztworu w roztworach rozcieńczonych związany jest

po prostu ze zwiększeniem się liczby jonów w roztworze. Osłabienie wzrostu, a następnie spadek przewodności roztworów bardziej stężonych może wynikać z nieliniowego przyrostu liczby jonów (np. ze względu na zmniejszenie stopnia dysocjacji lub efekty solwatacyjne) lub ze zmniejszaniem się ruchliwości jonów w coraz bardziej stężonym roztworze.

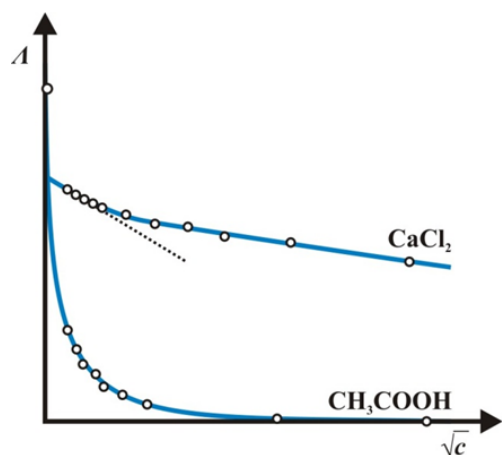


Rysunek 2. Zmiany przewodności właściwej κ roztworów elektrolitów w zależności od stężenia.

Z tego powodu, chcąc posłużyć się pomiarem przewodnictwa roztworu w celu zbadania jego stężenia, lepiej brać pod uwagę roztwory rozcieńczone. I tak, dla rozcieńczonych roztworów mocnych elektrolitów, Friedrich Kohlrausch zaobserwował regułę empiryczną, nazwaną **regułą** (lub **prawem**) **Kohlrauscha**:

$$\Lambda = \Lambda_{\infty} - a\sqrt{c} \quad (4)$$

Wielkość Λ_{∞} oznacza **graniczną przewodność molową**, natomiast empiryczna stała a zależy m.in. od rodzaju elektrolitu, temperatury czy względnej przenikalności elektrycznej roztworu. Reguła Kohlrauscha umożliwia wyznaczenie Λ_{∞} dla mocnych elektrolitów, przez ekstrapolację wykresu funkcji $\Lambda(\sqrt{c})$ (Rys. 3).



Rysunek 3. Zależność przewodności molowej od pierwiastka ze stężenia dla roztworu elektrolitu mocnego (CaCl_2) i słabego (CH_3COOH). Dla roztworu elektrolitu mocnego zaznaczono ekstrapolację do granicznej przewodności molowej Λ_{∞} .

Kohlrausch dowiódł ponadto, że graniczna przewodność molowa roztworu jest sumą

przewodności molowych poszczególnych jonów w roztworze. Tę intuicyjną zależność opisuje **prawo niezależnej wędrówki jonów Kohlrauscha**.

Nieco inaczej przedstawia się sytuacja elektrolitów słabych, nie w pełni ulegających dysocjacji elektrolitycznej. W ich przypadku, przewodność zależy nie tylko od stężenia, ale też od **stopnia dysocjacji elektrolitu (α)**. Zgodnie z teorią Arrheniusa dla roztworów słabych elektrolitów dostajemy prosty związek, pozwalający wyznaczyć Λ_∞ , jeśli znany jest stopień dysocjacji danego elektrolitu w roztworze (5):

$$\Lambda = \alpha \times \Lambda_\infty \quad (5)$$

Do obliczenia przewodności granicznej elektrolitów słabych można wykorzystać również prawo niezależnej wędrówki jonów Kohlrauscha, ale nie bezpośrednio. Weźmy przykład słabego elektrolitu – kwasu mrówkowego. Aby wyznaczyć $\Lambda_{\infty}(\text{HCOOH})$, wykorzystuje się wyniki pomiarów dla roztworów mocnych elektrolitów: soli tego kwasu (HCOONa), mocnego kwasu (HCl) i soli mocnego kwasu (NaCl). Przewodności graniczne mocnych elektrolitów, zgodnie z prawem Kohlrauscha, można zapisać:

$$\Lambda_{\infty}(\text{HCl}) = \Lambda_{\infty}(\text{H}^+) + \Lambda_{\infty}(\text{Cl}^-)$$

$$\Lambda_{\infty}(\text{HCOONa}) = \Lambda_{\infty}(\text{HCOO}^-) + \Lambda_{\infty}(\text{Na}^+)$$

$$\Lambda_{\infty}(\text{NaCl}) = \Lambda_{\infty}(\text{Na}^+) + \Lambda_{\infty}(\text{Cl}^-)$$

W wyniku kombinacji liniowej powyższych równań można uzyskać sumaryczne wyrażenie:

$$\Lambda_{\infty}(\text{HCl}) + \Lambda_{\infty}(\text{HCOONa}) - \Lambda_{\infty}(\text{NaCl}) = \Lambda_{\infty}(\text{H}^+) + \Lambda_{\infty}(\text{Cl}^-) + \Lambda_{\infty}(\text{HCOO}^-) + \Lambda_{\infty}(\text{Na}^+) - \Lambda_{\infty}(\text{Na}^+) - \Lambda_{\infty}(\text{Cl}^-)$$

Skąd po uproszczeniu:

$$\Lambda_{\infty}(\text{HCOOH}) = \Lambda_{\infty}(\text{H}^+) + \Lambda_{\infty}(\text{HCOO}^-) = \Lambda_{\infty}(\text{HCl}) + \Lambda_{\infty}(\text{HCOONa}) - \Lambda_{\infty}(\text{NaCl}) \quad (6)$$

Znajomość granicznej przewodności molowej dla roztworu słabego elektrolitu umożliwia wyznaczenie stałej dysocjacji (K_{dys}) tego elektrolitu. W tym celu należy skorzystać z przybliżonej zależności pomiędzy stężeniem analitycznym roztworu (c) a jego stałą i stopniem dysocjacji, znanej jako **prawo rozcieńczeń Ostwalda**:

$$K_{\text{dys}} = \frac{\alpha^2 \times c}{1 - \alpha} \quad (7)$$

Podstawienie wyrażenia (5) do wzoru (7), po przekształceniach da następującą zależność:

$$K_{\text{dys}} = \frac{\Lambda^2 \times c}{\Lambda_\infty \times (\Lambda_\infty - \Lambda)} \quad (8)$$

Tę natomiast, ze względów praktycznych, można przekształcić do postaci liniowej typu $y = ax + b$, uzyskując zależność (9):

$$\frac{1}{\Lambda} = \frac{1}{K_{dys} \times \Lambda_{\infty}} \times c_0 \Lambda + \frac{1}{\Lambda_{\infty}} \quad (9)$$

Stałą dysocjacji wyznacza się wówczas ze współczynnika kierunkowego a tej prostej:

$$a = \frac{1}{K_{dys} \times \Lambda_{\infty}^2} \Rightarrow K_{dys} = \frac{1}{a \times \Lambda_{\infty}^2} \quad (10)$$

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stałej dysocjacji słabego elektrolitu (HA, np. kwasu octowego, mrówkowego, chlorooctowego, benzoowego lub cytrynowego – wskazanego przez prowadzącego ćwiczenia), przy pomocy pomiarów przewodnictwa jego rozcieńczonych roztworów, rozcieńczonych roztworów mocnego kwasu (HCl) oraz rozcieńczonych roztworów soli sodowych obu tych kwasów (NaA i NaCl).

Aparatura pomiarowa

Pomiary przewodności G roztworów elektrolitów wykonuje się z użyciem konduktometru w termostatowanym naczyniu w pobliżu temperatury standardowej odczytywanej z termometru.

Wyznaczenie stałej naczynka konduktometrycznego

Ustawić na termostacie pożądaną temperaturę (temperatura bliska temperaturze pokojowej pozwoli skrócić czas termostatowania badanych roztworów), włączyć termostat wraz z pompką wodną. Do naczynka konduktometrycznego wlać ok. 20 cm³ 0,01M roztworu KCl. Po ustabilizowaniu się temperatury na termostacie (ok. 10 min), zmierzyć przewodność roztworu, zanotować też temperaturę. Naczynko konduktometryczne opróżnić (bez odłączania od termostatu), opłukać wodą destylowaną i osuszyć przed kolejnymi pomiarami.

Pomiar przewodnictwa roztworów elektrolitów mocnych i słabych

Do suchego termostatowanego naczynka konduktometrycznego wlać 20 cm³ roztworu badanego kwasu HA o stężeniu 1/16 M, włożyć sondę konduktometryczną. Po ustabilizowaniu się temperatury (ok. 5 min) zapisać wartość przewodności G w Tabeli 1. Ostrożnie wyjąć sondę, opłukać wodą destylowaną, osuszyć. Bezpośrednio z naczynka konduktometrycznego pobrać 10 cm³ roztworu i dolać 10 cm³ wody destylowanej, wymieszać bagietką. Po odczekaniu ok. 5 min na termostatowanie, zmierzyć wartość przewodności tak rozcieńzonego (do 1/32 M) roztworu. W ten sposób rozcieńczać roztwór badanego kwasu aż do stężenia 1/1024 M, przy każdym rozcieńczeniu mierząc przewodność roztworu za pomocą opłukanej i osuszonej sondy.

W analogiczny sposób (po uprzednim umyciu i osuszeniu naczynka konduktometrycznego) zmierzyć przewodności roztworów soli NaA i NaCl oraz kwasu HCl, zapisując wyniki w Tabeli 1. Zmierzone wartości przewodności G oraz obliczone przewodności molowe Λ dla kolejnych rozcieńczeń badanych elektrolitów.

Tabela 1. Pomiary przewodnictwa elektrolitów mocnych i słabych.

c	HA		NaA		NaCl		HCl	
	L	A	L	A	L	A	L	A
1/16			–	–	–	–	–	–
1/32								
...								
1/1024								

Uwaga! Wykonując obliczenia z udziałem powyższych wielkości, należy zwrócić uwagę na jednostki: stężenie molowe zwykle podaje się w $[\text{mol dm}^{-3}]$ (a nie $[\text{mol m}^{-3}]$), stała naczynka konduktometrycznego zwykle jest podawana w $[\text{cm}]$ a nie w $[\text{m}]$, zaś odczytana z konduktometru przewodność w $[\text{mS}]$, a nie w $[\text{S}]$.

Opracowanie wyników

1. Korzystając z wartości tablicowej przewodnictwa molowego dla 0,01 M roztworu KCl w temperaturze pomiaru, wyznaczyć stałą naczynka konduktometrycznego (k), charakteryzującego jego parametry geometryczne $k = \frac{l}{A}$, gdzie l = odległość między elektrodami pomiarowymi (cm), A – powierzchnia elektrod (cm^2). Stosujemy w tym celu metodę porównania z przewodnictwem roztworu wzorcowego, według równania (11):

$$k = \frac{\kappa}{L} \quad (11)$$

gdzie κ – przewodność właściwa 0,01 M roztworu KCl odczytana z tablic $[\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}]$, L – zmierzona przewodność identycznego roztworu w warunkach eksperymentu $[\Omega^{-1}]$.

2. Korzystając z przekształconego wzoru (11) oraz obliczonej stałej k , wyznaczyć wartości przewodnictwa właściwego κ , a następnie molowego Λ (równanie 3) dla wszystkich badanych roztworów. Wyniki zamieścić w Tabeli 1.

3. Wykreślić zależności Λ od $\sqrt{c}$ (jak na Rys. 3) dla czterech badanych roztworów elektrolitów.

4. Dla roztworów mocnych elektrolitów (NaA, NaCl, HCl), ekstrapolując graficznie lub metodą regresji liniowej (dla odcinków o przebiegu liniowym), wyznaczyć wartości granicznych przewodności Λ_∞ w punkcie przecięcia wykresów z osią Y.

5. Obliczyć przewodność graniczną Λ_∞ dla słabego elektrolitu HA, korzystając ze wzoru (6).

6. Wyznaczyć stałą dysocjacji kwasu HA **sposobem podstawienia do wzoru**. Z zależności (8). obliczyć dla wszystkich stężeń HA wartość średnią stałej dysocjacji oraz średni błąd kwadratowy.

7. Wyznaczyć stałą dysocjacji kwasu HA **metodą graficzną**. Narysować wykres liniowy zależności (9) i metodą regresji liniowej obliczyć współczynnik kierunkowy a uzyskanej prostej. Następnie, korzystając ze wzoru (10), obliczyć wartość K_{dys} .
8. Porównać wartości K_{dys} wyznaczonej obydwoma sposobami (z punktu 6 i 7) z wartością literaturową stałej dysocjacji badanego kwasu.

Zakres wymaganych wiadomości

Wyznaczanie granicznej przewodności molowej dla elektrolitów mocnych i słabych; stosowalność prawa niezależnej wędrówki jonów Kohlrauscha dla roztworów słabych elektrolitów; prawo rozcieńczeń Ostwalda; obliczenia związane z przewodnością, stałą i stopniem dysocjacji; zależność przewodności właściwej elektrolitu od stężenia.

Pozycje wykazu literatury: 1–6, 12, 13

Słowniczek

Elektrolit	Roztwór zdysocjowanych substancji jonowych (lub stopiona substancja jonowa), zdolny przewodzić prąd elektryczny ze względu na obecność swobodnych jonów. Elektrolity mocne (kwasy, zasady, rozpuszczalne sole) ulegają całkowitej dysocjacji, natomiast elektrolity słabe (np. roztwory słabych kwasów) ulegają dysocjacji jedynie częściowo.
Graniczna przewodność molowa (Λ_{∞})	Inaczej: graniczne przewodnictwo molowe, wyrażane w jednostkach SI [$\text{S m}^2 \text{mol}^{-1}$]. Jest to przewodność molowa przy stężeniu roztworu dążącym do zera, w którym jony znajdują się daleko od siebie, nie oddziałując ze sobą.
Prawo niezależnej wędrówki jonów Kohlrauscha	W roztworach mocnych elektrolitów, graniczne przewodnictwo molowe elektrolitu jest wielkością addytywną: $\Lambda_{\infty} = \Lambda_{\infty(\text{kation})} + \Lambda_{\infty(\text{anion})}$ Prawo to można zastosować pośrednio do wyznaczenia przewodnictwa granicznego roztworów elektrolitów słabych.
Prawo rozcieńczeń Ostwalda	Opisuje przybliżoną zależność pomiędzy stałą dysocjacji (K_{dys}), stopniem dysocjacji (α) i stężeniem analitycznym roztworu słabego elektrolitu: $K_{\text{dys}} = \frac{\alpha^2 \times c}{1 - \alpha}$
Przewodność (G)	Przewodność roztworu jest odwrotnością jego oporu (R), wyraża się w simensach [$1 \text{ S} = 1 \Omega^{-1}$]
Przewodność molowa (Λ)	Miara zdolności przenoszenia ładunku przez 1 mol elektrolitu (podawana w $\text{S m}^2 \text{mol}^{-1}$): $\Lambda = \frac{\kappa}{c}$; κ – przewodność właściwa, c – stężenie molowe roztworu.
Przewodność właściwa (κ)	Wielkość fizyczna podawana w S m^{-1} , opisująca przewodnictwo elektryczne materiału (roztworu elektrolitu), uwzględniająca wymiary naczynka

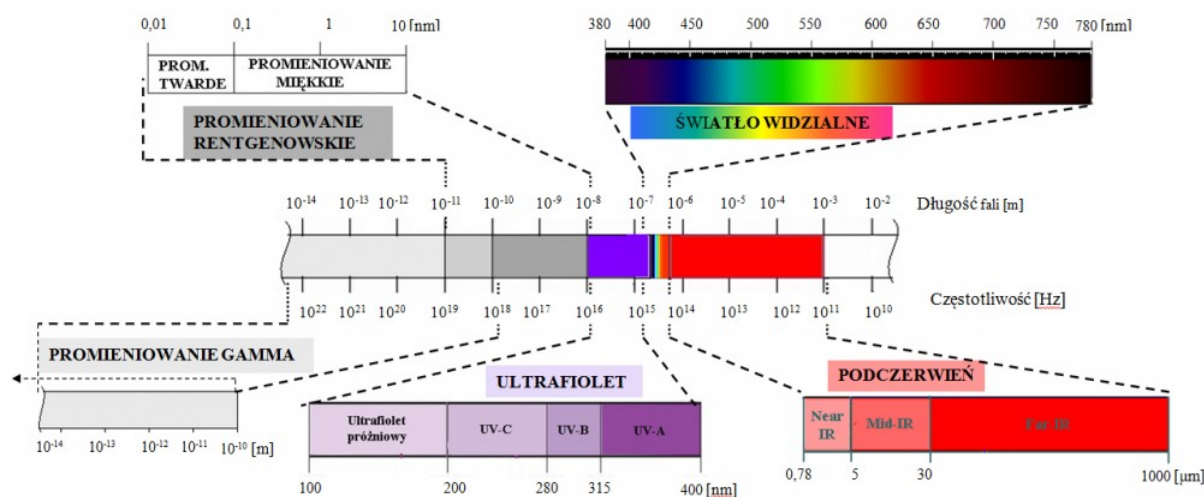
	konduktometrycznego (długość l i pole przekroju A): $\kappa = \frac{L \times l}{A}$ gdzie: L – przewodność roztworu elektrolitu.
Reguła Kohlrauscha	Przewodność molowa (Λ) rozcieńczonych roztworów mocnych elektrolitów zależy od pierwiastka ze stężenia (c) tego elektrolitu: $\Lambda = \Lambda_{\infty} - a\sqrt{c}$ Λ_{∞} – graniczna przewodność molowa, a – stała, charakterystyczna dla danego roztworu, zależna od rodzaju i stechiometrii elektrolitu, temperatury, lepkości oraz przenikalności elektrycznej roztworu.
Stopień dysocjacji (α)	Stosunek liczby zdysocjowanych cząsteczek elektrolitu do całkowitej liczby cząsteczek elektrolitu obecnych w roztworze ulegającym dysocjacji jonowej.

SPEKTROCHEMIA

Ćwiczenie 16

Spektrofotometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego.

Widzenie barw przez człowieka związane jest z wrażliwością na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego (ok. 400–700 nm, Rys. 1) specjalnych fotoreceptorów – 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 częstotliwości łącznie postrzeganych jako kolor pomarańczowy właśnie. W rezultacie oko ludzkie rejestruje tzw. barwę dopełniającą obiektu czy substancji.



Rysunek 3. Zakresy falowe promieniowania elektromagnetycznego.

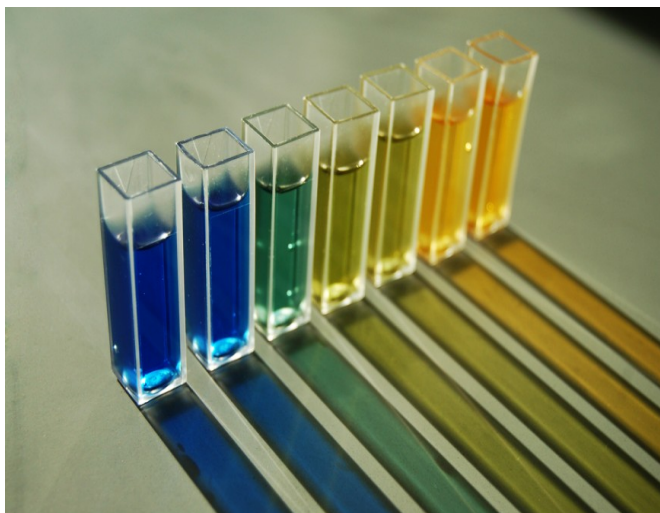
Mechanizm zmiany barwy błękitu bromotymolowego – popularnego wskaźnika pH, jest związany z dysocjacją elektrolityczną tego słabego kwasu, w uproszczeniu:



Stałą dysocjacji tej reakcji wyraża równanie (2):

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] \times [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (2)$$

W roztworach o kwaśnym odczynie równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku formy niezdisocjowanej HA (o barwie żółtej, Rys. 2), 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.



Fotografia 1. Barwa błękitu bromotymolowego w roztworach o odczynie zasadowym, obojętnym i kwaśnym (odpowiednio od strony lewej do prawej).

Miarą absorpcji promieniowania (z łac. *absorptio* – pochłanianie) jest **absorbancja** – wielkość wyrażająca stosunek natężenia światła padającego I_0 do natężenia światła przepuszczonego I , definiowana zależnością (3):

$$A = \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

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

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (4)$$

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

- 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;
- cząsteczki absorbujące nie oddziałują między sobą, nawet przy wzroście stężenia roztworu.

W rzeczywistości, niezależnie od rodzaju roztworu, przy wyższych stężeniach można spodziewać się odchylenia 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: żółte HA i błękitne A^-), absorpcja całkowita jest sumą absorpcji poszczególnych składników (Rys. 1B). Dla roztworu błękitu bromotymolowego **prawo addytywności absorpcji** można zapisać następująco:

$$\varepsilon \times l \times c = (\varepsilon_{HA} \times c_{HA} + \varepsilon_{A^-} \times c_{A^-}) \times l \quad (5)$$

W stanie równowagi $c_{HA} = [HA]$, $c_{A^-} = [A^-]$, a stężenie całkowite c :

$$c = [HA] + [A^-] \quad (6)$$

Po wyznaczeniu c z równania (5) i wstawieniu go do równania (6), otrzymamy zależność:

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_{HA}}{\varepsilon_{A^-} - \varepsilon} \quad (7)$$

Po podstawieniu (7) do wyrażenia na stałą dysocjacji (2) otrzymamy:

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \times (\varepsilon - \varepsilon_{HA})}{\varepsilon_{A^-} - \varepsilon} \quad (8)$$

A w wersji zlogarytmowanej:

$$\log K_a = -\text{pH} + \log \frac{\varepsilon - \varepsilon_{HA}}{\varepsilon_{A^-} - \varepsilon} \quad (9)$$

Gdy pH roztworu jest bardzo niskie, możemy założyć, że absorbuje wyłącznie forma niezdisocjowana HA, wobec czego $\varepsilon \approx \varepsilon_{\text{HA}}$. Analogicznie, dla roztworu silnie zasadowego: $\varepsilon \approx \varepsilon_{\text{A}^-}$. 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^-} .

Aparatura pomiarowa

Rejestracji widm absorpcji w zakresie widzialnym i ultrafioletowym dokonuje się przy pomocy spektrofotometru absorpcji elektronowej (UV–Vis) przedstawionym na Fot. 2.



Fotografia 2. Spektrofotometr UV–Vis Lambda 40 firmy Perkin-Elmer wykorzystywany w ćwiczeniu.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest spektrofotometryczne (UV-Vis) wyznaczenie stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego w oparciu o różnicę barw formy zdysocjowanej i niezdisocjowanej tego słabego kwasu organicznego.

1. Przygotować 7 roztworów buforowych (bufor fosforanowy Brittona–Robinsona). W tym celu pipetą miarową wlać do kolb po 10 cm³ roztworu podstawowego (mieszaniny słabych kwasów: 0,04 M kwasu octowego, 0,04 M fosforowego i 0,04 M borowego), a następnie dodać do nich odpowiednią objętość roztworu 0,2 M NaOH, zgodnie z Tab. 1.

Tabela 4. Przygotowanie buforów Brittona i Robinsona. Objętości 0,2 M roztworu NaOH, jakie należy dodać do 10 cm³ roztworu podstawowego, aby uzyskać roztwór buforowy o określonym pH.

Nr buforu	V _{NaOH} [cm ³]	pH buforu
1	0,00	1,81
2	2,00	3,29
3	3,75	5,33
4	4,00	5,72
5	4,50	6,67
6	6,00	7,96
7	8,00	10,4

2. W kolejnych 7 kolbach/fiolkach przygotować roztwory błękitu bromotymolowego. W tym celu pobrać pipetą miarową po 10 cm³ odpowiedniego buforu i dolać po 0,5 cm³ wyjściowego roztworu błękitu bromotymolowego (o stężeniu $6,41 \times 10^{-4}$ M). Niewielki dodatek słabego kwasu nie wpływa na wartość pH roztworów buforowych.

3. Przygotowane roztwory błękitu bromotymolowego i odpowiadające im roztwory buforowe przelać do czystych szklanych kuwet pomiarowych ($l = 1$ cm), do ok. $\frac{3}{4}$ wysokości. Roztworem buforowym nr 1 jest sam roztwór podstawowy – można go pobrać do kuwety bezpośrednio z butelki. Ewentualne zabrudzenia bocznych ścianek kuwet (np. odciski palców) przetrzeć ręcznikiem papierowym nasączonym alkoholem. Nie stawiać kuwet na spektrofotometrze.

4. Zmierzyć przy pomocy spektrofotometru *Lambda 40* absorbancję roztworów błękitu bromotymolowego w zakresie długości fali 700–400 nm względem odpowiednich roztworów buforowych jako układów odniesienia.

5. Po włączeniu spektrofotometru i komputera, uruchomić program *Lambda 40*, w zakładce *Methods* uruchomić metodę *blekit.msc*, sprawdzić ustawienia (Tab. 2).

Tabela 5. Ustawienia programu *Lambda 40* przy rejestracji widm roztworów błękitu bromotymolowego.

Zakładka	Parametr	Ustawienia
Scan	<i>Start wavelength</i>	700 nm
	<i>End wavelength</i>	400 nm
	<i>Autosave</i>	On
	<i>Autoprint</i>	Off
	<i>Display</i>	Overlay
Inst.	<i>Ordinate Mode</i>	A
	<i>Lamp UV</i>	On
	<i>Lamp VIS</i>	On
	<i>Scan speed</i>	120 nm/min
	<i>Smooth</i>	On
Sample	<i>Result Filename</i>	Twoja_nazwa_pliku
	<i>Number of samples</i>	7
	<i>Sample identity</i>	Twoja_nazwa_probki

6. Do obu uchwytów w komorze pomiarowej wprowadzić puste kuwety tak, aby droga optyczna wiązki przebiegała przez przezroczyste ścianki kuwet. Zamknąć pokrywę i kliknąć *Autozero*. W oknie z komunikatem *Please insert next sample: „Blank”* kliknąć *OK*. Po zarejestrowaniu linii zerowej wyjąć puste kuwety.
7. Rozpocząć właściwe pomiary klikając *Start*. Pojawi się okno *Please insert next sample: „Twoja_nazwa_probki1”* Włożyć kuwetę z pierwszym roztworem błękitu bromotymolowego do przedniego uchwytu, a kuwetę z odpowiednim bezbarwnym roztworem odniesienia – do tylnego uchwytu. Wówczas kliknąć *OK* w oknie *Sample Change*.
8. Po zarejestrowaniu widma pojawi się okno *Sample Change Insert Sample 2*. Wymienić kuwety na drugą parę błękit–bufor, kliknąć *OK*. W ten sposób zarejestrować widma pozostałych roztworów.
9. Po zakończeniu pomiarów zapisać pliki z wynikami. Pliki o rozszerzeniu .sp można otworzyć zarówno przy pomocy programu typu Excel (w oknie *Otwórz* należy wybrać *Wszystkie pliki* zamiast domyślnego *Wszystkie pliki programu Excel*), jak i w dowolnym edytorze tekstu. Wyłączyć program Lambda 40, komputer i spektrofotometr. Wyplukać kuwety pomiarowe wodą, a następnie alkoholem, osuszyć.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć stężenie błękitu bromotymolowego w badanych roztworach. Następnie, korzystając ze wzoru (4), na podstawie zmierzonych wartości absorpcji A , obliczyć molowe współczynniki absorpcji ε dla kolejnych długości fal λ : 400, 420, 440 ... 700 nm. Rezultaty zestawień w tabeli wyników (Tab. 3).

Tabela 6. Wartości absorpcji (A) i molowe współczynniki absorpcji (ε), wyznaczone dla roztworów błękitu bromotymolowego (1–7) o różnym odczynie, przy odpowiednich długościach fali z zakresu 400–700 nm.

Nr roztworu		1	2	3	4	5	6	7
Długość fali [nm]	pH	1,8	3,3	5,3	5,7	6,7	8,0	10,4
400	A							
	ε							
420	A							
	ε							
440	A							
	ε							
...	A							
	ε							
700	A							
	ε							

2. Zilustrować na jednym wykresie zależność $\varepsilon = f(\lambda)$ dla wszystkich roztworów.
3. Na podstawie wykresu wybrać długość fali – nie w maksimum absorpcji i nie w punkcie izobestycznym (punkcie przecięcia uzyskanych krzywych), np. 540 nm.

4. Przy wybranej długości fali obliczyć stałe dysocjacji K_a dla roztworów 2–6, korzystając ze wzoru (9) (przyjąć $\varepsilon_{HA} = \varepsilon_1$ oraz $\varepsilon_{A^-} = \varepsilon_7$). Na podstawie uzyskanych wartości stałej K_a obliczyć średnią wartość stałej dysocjacji błękitu bromotymolowego oraz średnie odchylenie standardowe wartości średniej.

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

Zakres wymaganych wiadomości:

Natura promieniowania elektromagnetycznego; prawo Lamberta–Beera i odchylenia od niego; prawo addytywności absorpcji; obliczenia oparte o prawo Lamberta–Beera; stała i stopień dysocjacji; warunek częstości Bohra; zastosowania pomiarów spektroskopowych.

Pozycje wykazu literatury: 1, 23–26, 30

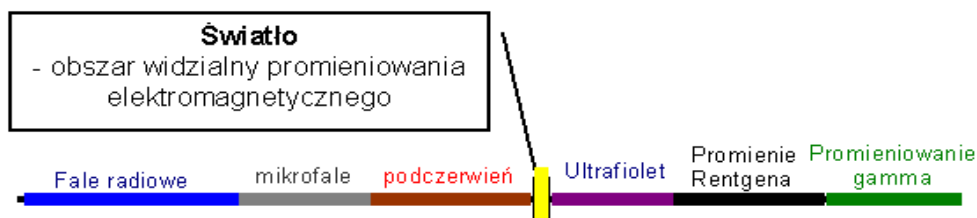
Słowniczek

Absorbancja	Miara absorpcji promieniowania; dziesiętny logarytm ze stosunku natężenia promieniowania padającego (I_0) do natężenia promieniowania przepuszczonego (I) przez ośrodek absorbujący: $A = \frac{I_0}{I}$.
Absorpcja promieniowania	Zjawisko pochłaniania energii fali elektromagnetycznej przez substancję absorbującą; absorpcja promieniowania powoduje wzrost energii wewnętrznej układu.
Bufor Brittona i Robinsona	Uniwersalny roztwór buforowy o zakresie stosowności ok. 2–12 w skali pH, zaproponowany przez Huberta Brittona i Roberta Robinsona w 1931r. Roztwory buforowe o określonym pH przygotowuje się przez dodatek odpowiedniej objętości 0,2M roztworu NaOH do mieszaniny trzech słabych kwasów: octowego, borowego (V) i fosforowego (V) o stężeniach 0,04M.
Liczba falowa	W spektroskopii liczbą falową ν' określa się odwrotność długości fali promieniowania λ : $\nu' = \frac{1}{\lambda}$. Zwyczajową jednostką ν' jest $[\text{cm}^{-1}]$.
Monochromator	Przyrząd optyczny, używany m.in. w spektrofotometrze jako element rozszczepiający światło, pozwalający uzyskać promieniowanie monochromatyczne – o określonej długości fali (ewentualnie o wąskim zakresie długości fali).
Warunek częstości Bohra	Częstość ν promieniowania absorbowanego jest proporcjonalna do zmiany energii cząsteczki absorbującej: $h\nu' = E_2 - E_1$ $h = 6,626 \times 10^{-34} [\text{J s}]$ – stała Plancka, E_1 – energia cząsteczki przed absorpcją, E_2 – energia cząsteczki po absorpcji promieniowania.
Punkt izozbestyczny	Punkt przecięcia krzywych absorpcji, wskazujący na równowagę dwu lub więcej form tej samej substancji w roztworze.

Ćwiczenie 17

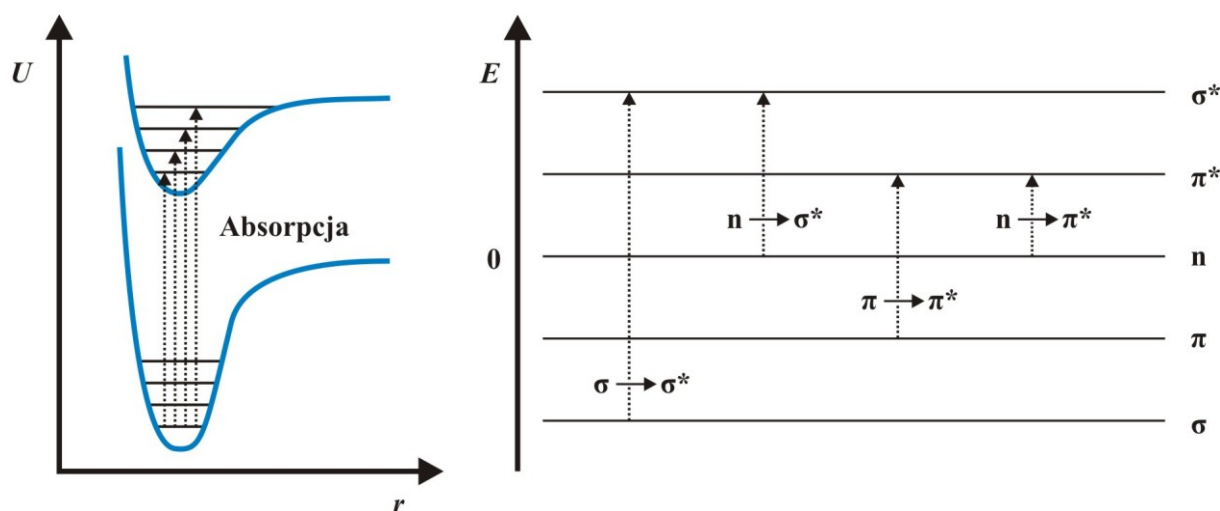
Spektrofotometryczne wyznaczanie stałej dysocjacji para-nitrofenolu

Światło uważa się za pulsujące pole elektromagnetyczne, złożone z dwóch prostszych, sprzężonych pól ze sobą – pola elektrycznego, które rozpędza swobodne ładunki elektryczne lub zakrzywia ich tor – oraz pola magnetycznego, które może zakrzywiać tor ładunku, ale może też działać siłą na przewodnik z prądem (pole tego typu jest wytwarzane przez przewodniki z prądem, poruszające się ładunki, a także magnesy trwałe). Zakres udziału różnych długości fal elektromagnetycznych promieniowania zawartego w wiązce promieniowania określa się jako **widmo promieniowania elektromagnetycznego**. Wszystkie rodzaje fal elektromagnetycznych rozchodzą się w próżni tą samą prędkością, oznaczaną przez c i wynosząca około $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$.



Rysunek 1. Widmo promieniowania elektromagnetycznego.

Promieniowanie elektromagnetyczne, padając na homogeniczny ośrodek, może zostać odbite, pochłonięte lub przepuszczone. Odbita część promieniowania stanowi zwykle niewielką część promieniowania padającego, szczególnie gdy strumień światła skierowany jest prostopadle na badany ośrodek. Jeśli niektóre z poziomów energetycznych w cząsteczce badanego związku są dopasowane do energii kwantów promieniowania, spełniony zostaje podstawowy warunek oddziaływania promieniowania z materią i nastąpić może **absorpcja**, czyli pochłonięcie części (lub całości) światła przechodzącego przez próbkę. W wyniku tego procesu fotofizycznego wzbudzeniu ulegają elektrony ze stanu podstawowego do jednego z wyższych poziomów elektronowych. Hipotetyczne krzywe energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego przedstawiono na Rys. 2. Wzbudzenie elektronowe może być związane z różnymi typami przejść elektronowych w cząsteczkach, w zależności od struktury danego związku chemicznego (rodzaje grup funkcyjnych, geometria). Najczęściej wśród związków organicznych obserwuje się w zakresie widzialnym przejścia typu $\pi-\pi^*$ oraz $n-\pi^*$, charakteryzujące się stosunkowo niewielką energią przejścia (Rys. 2).



Rysunek 2. Zjawisko absorpcji elektronowej na diagramie energii potencjalnej cząsteczki (lewa strona). Typy absorpcyjnych przejść elektronowych w cząsteczkach (prawa strona).

Natężenie wiązki światła po przejściu przez dany ośrodek który absorbuje promieniowanie ulega zatem zmniejszeniu. Zgodnie z prawem Lamberta, spadek natężenia światła po przejściu przez próbkę o grubości l jest proporcjonalny do natężenia światła padającego I , co można zapisać w postaci równania:

$$\frac{dI}{dl} = -k \times I \quad (1)$$

gdzie k jest współczynnikiem absorpcji, charakteryzującym właściwości danego ośrodka.

Po scałkowaniu otrzymujemy równanie:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \times l \quad (2)$$

gdzie I_0 jest natężeniem światła padającego, I – natężeniem światła przechodzącego, zaś l – grubością próbki. Przechodząc do logarytmu dziesiętnego i odnosząc te zależności do roztworów otrzymuje się podstawowe w ilościowych badaniach spektroskopowych **prawo Lamberta-Beera**:

$$\lg \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times l \times c \quad (3)$$

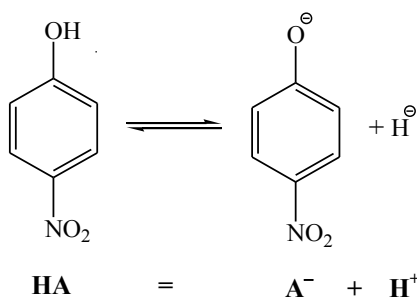
gdzie A oznacza absorbancję (określaną też jako ekstynkja, E), ε – molowy dziesiętny współczynnik absorpcji, wyrażony w $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$], zaś c – stężenie w [mol dm^{-3}] ($[M]$).

Współczynnik ε charakteryzuje efektywność procesu absorpcji i zależy przede wszystkim od długości fali promieniowania oraz od temperatury. Powyższe prawo jest ściśle tylko wówczas, gdy substancja rozpuszczona odpowiedzialna za absorpcję nie ulega zmianom chemicznym w roztworze – które to procesy mogłyby wpłynąć na uzyskane widma. Gdy w roztworze znajduje się więcej niż jedna substancja absorbująca, to ekstynkja całkowita równa jest sumie absorpcji poszczególnych składników – określa to w sposób ilościowy **prawo**

addytywności adsorpcji.

W praktyce spotykamy się nierzadko z odstępstwami od prawa absorpcji promieniowania. Odchylenia te mogą mieć charakter instrumentalny – niedoskonałość przyrządów, wynikająca z obecności w przyrządzie promieniowania rozproszonego, zbyt dużej szerokości spektralnej wiązki przechodzącej przez próbkę, odstępstwa od proporcjonalności pomiędzy natężeniem promieniowania padającego na detektor i wielkością sygnału powstałego w detektorze (tzw. nieliniowa odpowiedź detektora), bądź mogą być związane z próbką – reakcjami wtórnymi zachodzącymi w roztworze (kondensacja, polimeryzacja, hydroliza, dysocjacja, obecność lub powstawanie zawiesin koloidalnych, etc). Duże znaczenie ma też zależne od stężenia nakładanie się tzw. przekrojów czynnych cząsteczek (powodujące ujemne odchylenia od prawa Lamberta-Beera), które to przekroje są charakteryzowane przez pewną funkcję zależną od długości fali, przypisywaną każdemu rodzajowi molekuł, odzwierciedlającą powierzchnię wzajemnego oddziaływania materii z fotonami. Wspomniany wyżej molowy współczynnik absorpcji ε jest związany z molowym przekrojem czynnym cząsteczek, dlatego można go też wyrazić w jednostkach typowych dla tej wielkości [$\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$].

W niniejszym ćwiczeniu wykorzystujemy możliwości spektrofotometrycznego oznaczania stałej dysocjacji związku chemicznego (słabego kwasu) w przypadku, gdy jego jedna postać absorbuje promieniowanie elektromagnetyczne w innym zakresie spektralnym aniżeli jego inna forma. Jednym z tego typu układów jest *para*-nitrofenol – prosty związek aromatyczny, będący słabym kwasem organicznym i dysocjujący wg schematu (Rys. 3):



Rysunek 3. Dysocjacja *para*-nitrofenolu, związku organicznego o charakterze kwasowym.

Grupa nitrowa (wykazująca wpływ elektronoakceptorowy) powoduje polaryzację wiązania O–H i w tym związku łatwość odszczepienia protonu od grupy wodorotlenkowej, co skutkuje właściwościami kwasowymi tego związku.

Z ogólnych zależności znanych w chemii analitycznej do opisu słabych elektrolitów mamy:

$$K = \frac{c_{A^-} \times c_{H^+}}{c_{HA}} \quad (4)$$

Jeśli za c_0 oznaczymy stężenie analityczne słabego kwasu, można napisać:

$$\alpha = \frac{c_{A^-}}{c_0} \quad (5)$$

$$c_0 = c_{A^-} + c_{HA} \quad (6)$$

Na podstawie powyższych wzorów można wyprowadzić znaną zależność ogólną:

$$K = \frac{c_{H^+} \times \alpha}{1 - \alpha} \quad (7)$$

Wynika z niego, że do wyznaczenia stałej dysocjacji tą metodą konieczna jest znajomość stężenia jonów wodorowych (c_{H^+}) oraz stopnia dysocjacji (α). Stężenie jonów wodorowych można obliczyć znając wartość pH roztworu buforowego, użytego jako rozpuszczalnik, natomiast stopień dysocjacji *para*-nitrofenolu może być wyznaczony z wartości absorbancji. Jeśli spełnione jest prawo Lamberta-Beera i widzialnym zakresie, w którym niezdysocjowany kwas nie absorbuje promieniowania, odczytana wartość absorbancji (A) będzie proporcjonalna do stężenia anionów fenolanowych (c_{A^-}):

$$A = \varepsilon_{A^-} \times c_{A^-} \times l \quad (8)$$

Z drugiej strony, *para*-nitrofenol w roztworze zasady sodowej ulega całkowitej dysocjacji (występuje jedynie w formie anionu) – co można zapisać w postaci zależności (9):

$$A_{\infty} = \varepsilon_{A^-} \times c_0 \times l \quad (9)$$

Na podstawie powyższych równań (5), (8), (9) można napisać:

$$\alpha = \frac{A}{A_{\infty}} \quad (10)$$

Zależność ta umożliwia praktyczne wyznaczenie stopnia dysocjacji *p*-nitrofenolu i dalej jego stałej kwasowości.

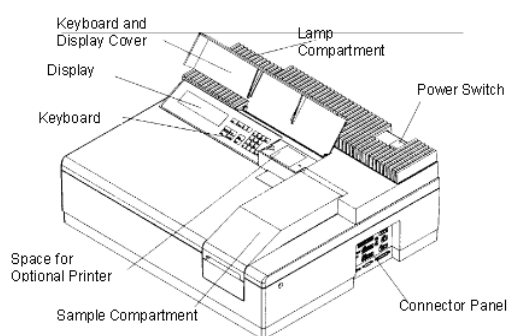
Aparatura pomiarowa

Aparaty do pomiaru widm absorpcji promieniowania elektromagnetycznego nazywamy spektrofotometrami. W większości tego typu urządzeń pomiar absorpcji światła oparty jest na metodzie różnicowej. Polega ona na porównaniu natężeń światła wiązki pomiarowej tj. przechodzącej przez roztwór badanej substancji oraz wiązki odniesienia – przechodzącej przez kuwetę z czystym rozpuszczalnikiem. Źródłem promieniowania w zakresie widzialnym jest najczęściej żarówka wolframowa (widmo ciągłe do 350 nm), zaś

w zakresie UV – lampy rtęciowe, deuterowe lub ksenonowe. Pomiary prowadzi się w kwarcowych lub szklanych celkach (kuwetach), do których wprowadza się rozcieńczony roztwór substancji (stężenia typowo na poziomie milimolowym ([Mm] lub niższe) oraz czysty rozpuszczalnik. Rozpuszczalnik do badań spektrofotometrycznych powinien spełniać następujące wymagania:

- powinien dobrze rozpuszczać badany związek;
- nie absorbować w zakresie roboczym;
- być obojętnym chemicznie dla substancji badanej;
- w miarę możliwości – powinien być nietoksyczny, nietłoty, stabilny chemicznie, niehygroskopijny oraz dostępny.

Przykładem urządzenia do pomiarów w zakresie widzialnym i nadfiolecie (UV-Vis) jest spektrofotometr *Lambda 40* firmy *Perkin-Elmer*, wykorzystywany w niniejszym ćwiczeniu (Rys. 4).



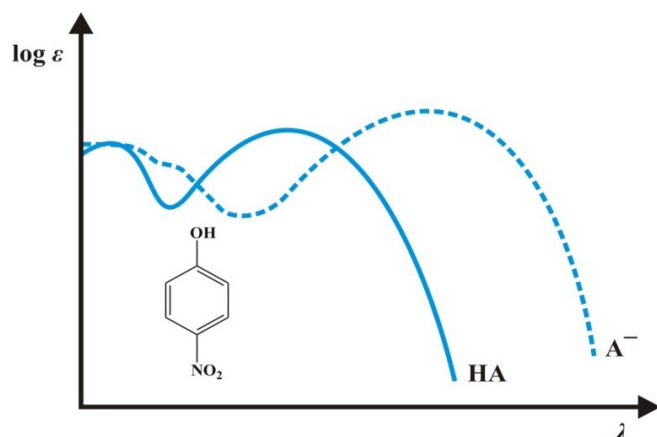
Najważniejsze parametry
spektrofotometru *Lambda 40*:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| • zakres pomiarowy: | 190–1100 nm |
| • dokładność pomiaru długości fali: | $\pm 0,1$ nm |
| • powtarzalność: | 0,05 nm |
| • minimalna rozdzielczość: | 0,5 nm |
| • dostępne szczeliny: | 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 |
| • emisja promieniowania: | lampa halogenowa i deuterowa |

Rysunek 4. Schemat spektrofotometru *Lambda 40* firmy *Perkin-Elmer* wraz z najważniejszymi parametrami technicznymi.

Wykonanie pomiarów

Cząsteczki niezdysocjowanego *para*-nitrofenolu są bezbarwne, natomiast jego anion jest żółty. Oznacza to, że widma absorpcji elektronowej obu form różnią się, co umożliwia oznaczanie stałej dysocjacji tego związku metodą spektroskopii UV-Vis i jest celem niniejszego ćwiczenia. Orientacyjne różnice w wyglądzie widma elektronowego *para*-nitrofenolu w formie obojętnej (HA) oraz zjonizowanej (A^-) przedstawiono na Rys. 5.



Rysunek 5. Przebieg absorpcyjnego widma elektronowego para-nitrofenolu w formie obojętnej (HA) oraz zjonizowanej (A^-).

Sporządzanie wykresu wzorcowego (kalibracyjnego)

Przygotować roztwór *para*-nitrofenolu w 0,01 M NaOH o stężeniu 5×10^{-4} M. Przy pomocy pipety zmieszać ze sobą roztwory (wg tabeli 1 poniżej) tak, aby otrzymać szereg roztworów zawierających różne stężenia jonów fenolanowych. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali **455 nm**. Jako roztwór porównawczy stosować 0,01 M NaOH. Wyniki zestawić w Tabeli 1.

Tabela 1. Tabela wyników do wykresu kalibracyjnego typu $A = f(c_{A^-})$.

5×10^{-4} M <i>p</i>-nitrofenol w 0,01 M NaOH	5 cm ³	4,5 cm ³	4,0 cm ³		0,5 cm ³
0,01 M NaOH	0 cm ³	0,5 cm ³	1,0 cm ³		4,5 cm ³
$c_{A^-} \times 10^{-5}$ M	50	45	40		5
<i>A</i>					

Badanie równowagi forma obojętna – anion słabego kwasu organicznego.

Sporządzić serię roztworów buforowych. Do każdego z tych roztworów, oraz do 5 cm³ roztworu 0,01 M NaOH dodać po 0,25 cm³ wodnego roztworu *para*-nitrofenolu o stężeniu 0,01 M. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów stosując jako roztwór porównawczy 0,01 M NaOH. Wyniki zestawić w Tab. 2.

Tabela 2. Właściwości spektralne i stała dysocjacji *para*-nitrofenolu w roztworach o różnej kwasowości.

0,2 M NaOH [cm³]	1,49	1,61	1,72	1,83	1,88	5,00 ($c = 0,01$ M)
roztwór podst. [cm³]	3,51	3,39	3,28	3,17	3,12	–
pH końcowe	6,1	6,6	7,0	7,5	8,0	12,0
<i>A</i>						A_∞
α						
<i>K</i>						
p<i>K</i>						

Opracowanie wyników

1. Stosując metodę najmniejszych kwadratów sporządzić wykres kalibracyjny typu $A = f(c_A)$ według danych z Tabeli 1. Służy on do sprawdzenia liniowości prawa Lamberta–Beera w badanym zakresie pomiarowym.
2. Na podstawie danych zebranych w Tabeli 2 obliczyć stopnie dysocjacji *para*-nitrofenolu (α) w kolejnych roztworach z zależności (10).
3. Obliczyć wartości stałych dysocjacji K na podstawie zależności (7), następnie wyznaczyć wartość średnią K oraz pK , podać odchylenie standardowe.
4. Porównać otrzymaną wartość średnią K oraz pK z wartością literaturową dla *para*-nitrofenolu.
5. Przeprowadzić dyskusję wyników i błędów pomiarowych. Uwzględnić wpływ budowy związku (efekt indukcyjny i mezomeryczny grupy nitrowej) na stałą dysocjacji badanego związku.

Zakres wymaganych wiadomości

Elektronowe widma absorpcyjne; Wyznaczanie stałej dysocjacji w oparciu o pomiary spektroskopowe; pojęcia: absorpcji, ekstynkcji, transmisji; prawo Lamberta–Beera i jego ograniczenia; obliczenia oparte o prawo Lamberta–Beera; teoria barwy; grupy chromoforowe i auksochromowe; przesunięcie bato- i hipsochromowe; pojęcie stopnia i stałej dysocjacji; zastosowania pomiarów spektroskopowych; spektrofotometri UV-Vis.

Pozycje wykazu literatury: 1–6, 8, 10, 12, 15, 23, 30

Słowniczek

Absorpcja	Pochłanianie kwantów promieniowania elektromagnetycznego w całej masie substancji.
Transmisja (T) (przepuszczalność)	Oslabienie natężenia promieniowania po przejściu przez ośrodek (próbkę) $T = \frac{I}{I_0}$ T jest wyrażana też w procentach – oznacza wtedy jaki % wiązki świetlnej w stosunku do padającej zostaje przepuszczony przez ośrodek.
Absorbancja (A), (ekstynkcja, E)	Ujemny logarytm z transmisji; może zmieniać się od wartości bliskich 0 do ∞ . $A = E = -\lg T = \log \frac{I_0}{I}$
Chromofor	Grupy atomów zawierające zdelokalizowane elektrony typu π , powodujące zwiększoną absorpcję promieniowania i pojawienie się pasm absorpcyjnych (>200 nm) w widmie

	związku chemicznego, w którym się znajdują Przykładem grup chromoforowych jest ugrupowanie alkenowe C=C, grupa karbonylowa C=O, nitrowa NO ₂ , azowa N=N i inne.
Auksochrom	Grupy atomów, zawierające niewiążące elektrony typu <i>n</i> , nie wykazujące absorpcji własnej (>200 nm), ale powodujące zwiększoną intensywność absorpcji chromoforów w cząsteczce oraz przesunięcie związanych z nimi pasm absorpcyjnych. Przykładem takich grup jest grupa hydroksylowa OH, aminowa NH ₂ , chlorowce (F, Cl, Br), etc.
Prawo Lamberta-Beera	Absorpcja światła przepuszczonego przez roztwór (mierzona jako absorbancja, <i>A</i>) jest proporcjonalna do grubości warstwy (<i>l</i>) i stężenia substancji absorbującej (<i>c</i>): $A = \varepsilon \times l \times c$ Współczynnik proporcjonalności w równaniu Lamberta-Beera to molowy dziesiętny współczynnik absorpcji, mówiący o efektywności absorpcji promieniowania przy danej długości fali.
Punkt izobestyczny	Punkt przecięcia krzywych absorpcji, wskazujący na równowagę dwu lub więcej form tej samej substancji w roztworze.

SPEKTROCHEMIA

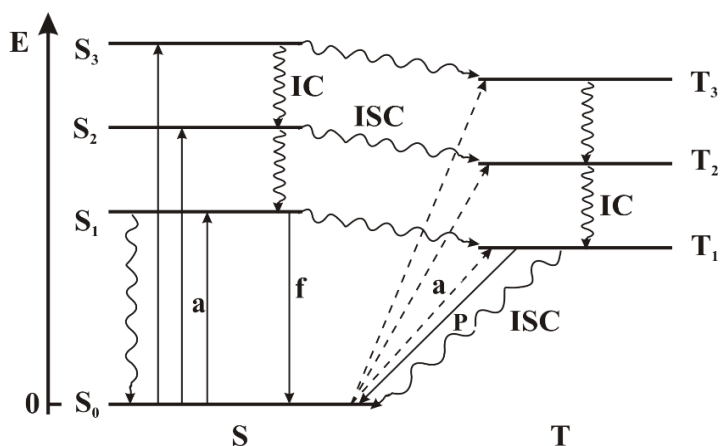
Ćwiczenie 18

Fluorymetryczne oznaczanie zawartości tryptofanu w białkach

Zjawiskiem **luminescencji** nazywamy rodzaj emisji promieniowania elektromagnetycznego, który następuje po zaabsorbowaniu energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji. U podstaw luminescencji leży zjawisko relaksacji – przejścia układu z energetycznego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. W stanie podstawowym wszystkie elektrony zajmują w atomach możliwie najniższe stany energetyczne, a zewnętrzna powłoka na której znajdują się elektrony tworzy tak zwane pasmo walencyjne. **Stan wzbudzony** to taki, w którym elektrony w atomach materiału są przeniesione z pasma walencyjnego do wyższych stanów energetycznych, czyli do tak zwanego pasma przewodnictwa. Przeniesienie elektronu do pasma przewodnictwa następuje w wyniku działania zewnętrznego czynnika wzbudzającego. Tym czynnikiem może być promieniowanie, temperatura, reakcja chemiczna, oddziaływanie mechaniczne, strumień elektronów, fala ultradźwiękowa lub zewnętrzne pole elektryczne. Wszystko w naturze dąży do obniżenia swojego stanu energetycznego, więc również i wzbudzone elektrony dążą do pozbycia się nadmiaru energii. Warunkiem, by elektron mógł oddać energię jest istnienie pustego stanu dozwolonego na niższym poziomie energetycznym oraz prawdopodobieństwo przejścia większe od zera. Innymi słowy w paśmie walencyjnym musi znajdować się puste miejsce, tak zwana dziura, które elektron może obsadzić. Przejście elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, w którym elektron zajmuje miejsce (dziurę) nazywa się rekombinacją (lub anihilacją) pary elektron-dziura. Różnicę energii sprzed rekombinacji i po rekombinacji elektron może wypromieniować w postaci fali elektromagnetycznej i wówczas mówimy o rekombinacji promienistej. Światło generowane jest wówczas, gdy różnica energii pomiędzy pasmem przewodnictwa a pasmem walencyjnym odpowiada energii promieniowania z zakresu widzialnego.

Fotoluminescencja to emisja światła przez molekuly w stanie wzbudzonym, które tworzą się w wyniku zaabsorbowania promieniowania elektromagnetycznego (nadfioletowego, widzialnego lub podczerwonego). Na gruncie mechaniki kwantowej jest to zjawisko pobudzania do wyższego stanu energetycznego, a następnie powrotu do stanu niższego, któremu towarzyszy emisja fotonów. Opis zachowania cząsteczek wieloatomowych uczestniczących w procesie fotoluminescencji dobrze oddaje diagram Jabłońskiego (Rys. 1).

W temperaturze pokojowej cząsteczki znajdują się na najniższym poziomie oscylacyjnym podstawowego stanu elektronowego (S_0). Podczas absorpcji promieniowania ma miejsce przeniesienie elektronu ze stanu podstawowego (S_0) do stanów wzbudzonych (S_n). Wzbudzone cząsteczki szybko tracą nadmiar energii, powracając do niższych stanów energetycznych. Może się to odbywać w sposób promienisty lub bezpromienisty.



Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego obrazujący przejścia pomiędzy stanami elektronowymi cząsteczki wieloatomowej; IC – konwersja wewnętrzna, ISC – przejście międzysystemowe (interkombinacyjne), a – absorpcja promieniowania, f – fluorescencja, p – fosforescencja.

Gdy powrót cząsteczki do stanu podstawowego towarzyszy emisja światła mówimy o drodze promienistej, do której należą:

- fluorescencja – jeśli cząsteczka wzbudzona przechodzi z wyższego do niższego poziomu energetycznego wraz z emisją fotonu, bez zmiany multipletowości (przejście typu $S_1 \rightarrow S_0$ – dozwolone regułami kwantowymi wyboru);
- fosforescencja – jeśli cząsteczka wzbudzona przechodzi z wyższego do niższego poziomu energetycznego wraz z emisją fotonu, ze zmianą multipletowości (przejście typu $T_1 \rightarrow S_0$ – wzbronione regułami kwantowymi wyboru).

Powrót cząsteczki do stanu podstawowego nie musi wiązać się z emisją fotonu, ale może zajść bezpromieniscie na drodze:

- konwersji wewnętrznej (IC – *ang. Internal Conversion*) – procesu bezpromienistego przejścia (dozwolonego) cząsteczki ze wzbudzonych stanów energetycznych do stanów niższych zachodzącego bez zmiany multipletowości (typu $S_2 \rightarrow S_1$ lub $T_2 \rightarrow T_1$);
- przejścia interkombinacyjnego (ISC – *ang. Intersystem Crossing*) – przejścia bezpromienistego pomiędzy stanami singletowymi i tripletowymi (wzbronionego) zachodzącego ze zmianą multipletowości (typu $S_1 \rightarrow T_1$, $T_1 \rightarrow S_0$).

W zjawisku fotoluminescencji wyróżnia się dwa procesy – w zależności od długości

okresu między pochłonięciem a wyemitowaniem energii – fluorescencję i fosforescencję. Z pierwszym procesem mamy do czynienia jeśli od pochłonięcia przez cząsteczkę promieniowania do emisji nie upłynęło więcej niż 10^{-8} sekundy. W przypadku gdy czas pomiędzy pochłonięciem energii a jej wyemitowaniem jest znacznie dłuższy niż 10^{-8} sekundy, zjawisko nosi nazwę **fosforescencji**. Obsadzenie poziomu tripletowego (o innej multipletowości) bezpośrednio ze stanu podstawowego jest wzbronione. Najczęściej więc cząsteczka zostaje wzbudzona do pierwszego stanu singletowego (S_1) i z niego, w określonych warunkach, przechodzi do stanu tripletowego (T_1). Ponieważ przejście między stanami T_1 i S_0 jest wzbronione (różna multipletowość), cząsteczka stosunkowo długo przebywa w elektronowym stanie wzbudzonym, zanim wyemituje foton i powróci do elektronowego stanu podstawowego. Prawdopodobieństwo przejść zabronionych typu S–T się może zwiększać w niskich temperaturach, w środowiskach sztywnych (matryce stałe) oraz w obecności ciężkich atomów (np. I, Xe) – czy to w substancji będącej emitorem, czy w środowisku (rozpuszczalnik, matryca). Emisja fosforescencji jest przesunięta długofalowo w stosunku do widma emisji fluorescencji i charakteryzuje się zwykle mniejszą intensywnością.

Wiele związków chemicznych wykazuje zdolność do fluorescencji. Należą do tej grupy liczne połączenia aromatyczne i heterocykliczne (na przykład amid dansylu, pochodne 9-akrydanonu, czy flawonole), niektóre barwniki (na przykład fluoresceina, rodamina, eozyna), związki występujące w środowisku (aromatyczne aminokwasy takie jak tryptofan czy fenyloalanina), zasady nukleinowe (tymina, uracyl, cytozyna) oraz barwniki roślinne (chlorofil, karotenoidy, niektóre witaminy i hormony)).

Fluoryzujące związki organiczne znajdują szereg zastosowań w analityce – w charakterze sond lub znaczników fluorescencyjnych. Mogą być one wykorzystywane również jako indykatory fluorescencyjne do badania właściwości faz skondensowanych. Dział wiedzy dotyczący wykorzystania substancji fluoryzujących w analityce określa się mianem fluorymetrii. Znajduje ona zastosowania w badaniach klinicznych. Niezwykła czułość tej metody pozwala między innymi na określenie z dużą dokładnością stężeń substancji białkowych we krwi i innych płynach fizjologicznych. Rutynowo oznacza się fluorymetrycznie substancje o znaczeniu biologicznym, takie jak ryboflawina, tiamina, czy kwas foliowy. W nowoczesnych laboratoriach szeroko stosuje się mikroskopy fluorescencyjne, między innymi do wizualizacji obiektów biologicznych. Przykładem może być stosowanie barwników do sprawdzania żywotności komórek (metoda pozwala na procentowe określenie ilości komórek żywych i martwych). Pośród związków

nieorganicznych fluoryzują między innymi sole uranu, ceru i samaru. Połączenia te mogą być bezpośrednio oznaczane fluorymetrycznie. Do fluorescencyjnego oznaczania jonów innych metali wykorzystuje się ich fluoryzujące kompleksy. Aktualnie wszechstronnie rozwija się diagnostyka fotodynamiczna oraz diagnostyka fluorescencyjna, która umożliwia lokalizację i obserwację obszarów patologicznych – najczęściej zmian nowotworowych. Metody te, podobnie jak terapia fotodynamiczna, polegają na podaniu fotouczulacza (najczęściej jest nim syntetyczny kwas delta-aminolewulinowy, będący prekursorem porfiryn), który selektywnie trafia do obszarów chorych i tam się kumuluje. Fluorescencja pozwala na zidentyfikowanie obszarów zmienionych chorobowo – zarówno dużych obszarów patologicznych, jak i mikrorozsiewów – niewidocznych przy świetle dziennym.

Fluorescencyjne właściwości reszt tryptofanu (Trp) są uzależnione od lokalizacji w łańcuchu polipeptydowym oraz ładunku sąsiednich reszt aminokwasowych. Analiza widm emisji tryptofanu, zarejestrowanych dla białek natywnych o różnorodnej strukturze, wykazała istnienie istotnych różnic w położeniu maksimum wzbudzenia, szerokości pasm oraz kwantowej wydajności fluorescencji. Zjawisko to, stanowiące poważne utrudnienie w praktycznym zastosowaniu metod fluorymetrycznych do ilościowego oznaczania tryptofanu w białkach, można wyeliminować poddając badane białko uprzedniej denaturacji w roztworze chlorowodoru guanidyny o stężeniu 6 mol dm^{-3} z dodatkiem β -merkaptoetanolu.

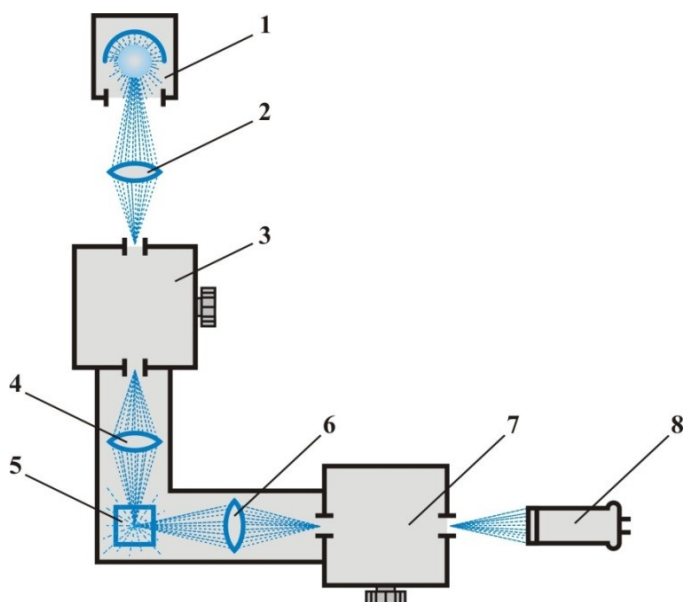
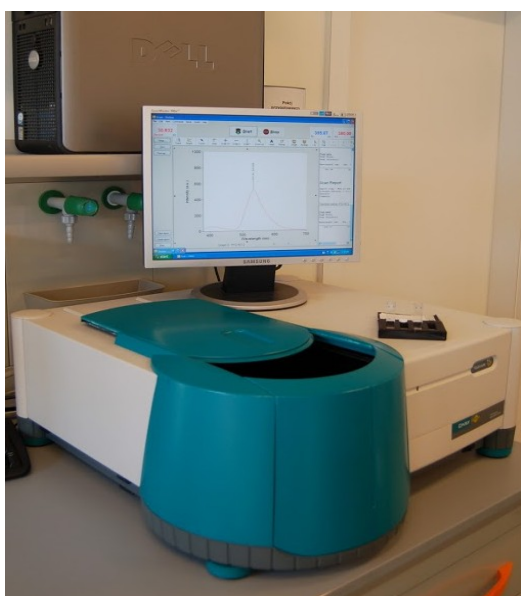
Jedną z metod analizy ilościowej jest metoda wzorca wewnętrznego, która polega na wprowadzeniu do analizowanej mieszaniny znanej ilości substancji wzorcowej. Znając relacje pomiędzy współczynnikami odpowiedzi wzorca i substancji analizowanej można w łatwy sposób określić skład ilościowy mieszaniny. Pewną odmianą tej metody, stosowaną w wykonywanym ćwiczeniu, jest dodatek znanej ilości substancji występującej w mieszaninie. Wówczas ze wzrostu intensywności pików lub wielkości przyrostu pola powierzchni sygnału i znanych względnych współczynników odpowiedzi można wyznaczyć stężenie (lub ilość) analizowanych substancji w mieszaninie. Zastosowanie wzorca wewnętrznego pozwala na ilościowe oznaczanie tryptofanu w białkach, zawierających ugrupowania, takie jak nukleotyd flawinowy, hem czy fosforan pirydoksalu, ulegające wzbudzeniu w zakresie 290–370 nm.

Aparatura pomiarowa

Aparaty do pomiaru natężenia emitowanego przez substancję promieniowania fluoroscencyjnego nazywamy spektrofluorymetrami (fluorymetrami). Układ aparatu (rys. 3) jest podobny jak w spektrofotometrze, z dwoma istotnymi wyjątkami. Pierwszą różnicą jest obecność dwóch monochromatorów – jednego koniecznego dla wyboru fali wzbudzenia

i drugiego, dla analizy długości fali światła emitowanego. Drugą różnicą jest umiejscowienie detektora w stosunku do promieniowania wzbudającego (zwykle kąt między detektorem a światłem padającym na próbkę wynosi 90°). Dzięki takiemu układowi eliminuje się wpływ światła przechodzącego przez próbkę.

Przy użyciu spektrofluorymetru można otrzymać dwa rodzaje charakterystyk: widmo wzbudzenia fluorescencji oraz widmo emisji fluorescencji. Pierwszy rodzaj widma można zarejestrować w przypadku, gdy monochromator analizujący ustawiony jest na określoną długość fali w zakresie fluorescencji, natomiast monochromator toru wzbudzenia przemiata długości fali światła wzbudającego. Widma wzbudzenia fluorescencji są zazwyczaj podobne do odpowiednich widm absorpcji badanej substancji w roztworach rozcieńczonych. Z kolei drugi rodzaj widm otrzymujemy, gdy monochromator toru wzbudzenia ustawiony jest na określoną długość fali absorbowaną przez próbę, natomiast monochromator toru emisji przemiata i analizuje emitowane światło.



Rysunek 2. Spektrofluorymetr *Cary Eclipse* firmy *Varian* (fotografia po lewej stronie) wraz ze schematem blokowym spektrofluorymetru (rysunek po prawej stronie); 1 – źródło promieniowania, 2, 4, 6 – układ soczewek, 3 – monochromator wzbudzący, 5 – kuweta pomiarowa, 7 – monochromator emisyjny, 8 – detektor.

Wykonanie pomiarów

Celem ćwiczenia jest fluorymetryczne oznaczenie zawartości tryptofanu w białkach (wybranych przez prowadzącego ćwiczenia spośród zestawu: albumina surowicy bydlęcej (BSA), owoalbumina, żelatyna, inwertaza, hydrolizat laktoalbuminy, RNAza A, lizozym) metodą wzorca wewnętrznego.

Rejestracja widma absorpcji L-tryptofanu

Wykonać widmo absorpcji roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ [Mm] w buforze fosforanowym o pH 7. Pomiar wykonać przy użyciu spektrofotometru UV-Vis w zakresie długości fali 220–330 nm w sposób przedstawiony w instrukcji do urządzenia.

Pomiary emisji fluorescencji

1. Wykonać widmo wzbudzenia roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ w buforze fosforanowym o pH 7,0. Pomiar wykonać przy użyciu spektrofluorymetru, stosując wzbudzenie w zakresie 230–340 nm oraz emisję przy długości fali 354 nm (szczelina wzbudzenia 2,5 nm; szczelina emisji 5 nm).
2. Wykonać widmo emisji roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ w buforze fosforanowym o pH 7. Pomiar wykonać przy użyciu spektrofluorymetru, stosując wzbudzenie o długości fali 295 nm oraz emisję w zakresie 320–420 nm (szczelina wzbudzenia 5; szczelina emisji 10).

Wyznaczenie krzywej wzorcowej emisji fluorescencji tryptofanu

1. Do kuwety fluorescencyjnej pobrać 3 cm^3 roztworu buforu fosforanowego o pH 7,0, a następnie dodać 15 μl roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ w buforze fosforanowym o pH 7,0. Wymieszać zawartość kuwety.
2. Wykonać widmo fluorescencji roztworu tryptofanu stosując wzbudzenie przy długości fali 295 nm oraz emisję w zakresie 320–420 nm. Odczytać i zanotować intensywność emisji roztworu przy długości fali 354 nm.
3. Do zawartości kuwety dodać jeszcze 5 razy po 15 μl roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ w buforze fosforanowym o pH 7,0. Po każdym dodaniu roztworu tryptofanu zawartość kuwety dobrze wymieszać, a następnie wykonać widmo fluorescencji stosując parametry z poprzedniego punktu. Po każdym pomiarze odczytać intensywność emisji roztworu przy długości fali 354 nm. Wyniki zestawić w tabeli 1.

Tabela 1. Tabela wyników do krzywej wzorcowej oznaczania zawartości tryptofanu w białkach.

Objętość 0,5 mM roztworu Trp [μl]	Intensywność fluorescencji I_F [a.u.]	Stężenie końcowe Trp bez korekcji [mM]	Stężenie końcowe Trp z korekcją [mM]
15			
30			
45			
60			
75			
90			

Badanie zawartości tryptofanu w roztworach białek

1. Do kuwety fluorescencyjnej pobrać 3 cm^3 otrzymanego od prowadzącego ćwiczenia roztworu białka o stężeniu $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ w wodnym roztworze chlorowodoru guanidyny o stężeniu 6 mol dm^{-3} z dodatkiem β -merkaptetanolu.
2. Wykonać widmo fluorescencji roztworu białka stosując wzbudzenie przy długości fali 295 nm oraz emisję w zakresie 320–420 nm. Odczytać i zanotować intensywność emisji roztworu przy długości fali 354 nm.

3. Do zawartości kuwety dodać 10 μl roztworu tryptofanu o stężeniu $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ (mM) w buforze fosforanowym o pH 7. Zawartość kuwety dobrze wymieszać. Wykonać widmo fluorescencji roztworu białka z dodatkiem wzorca wewnętrznego, stosując wzbudzenie przy długości fali 295 nm oraz emisję w zakresie 320–420 nm. Odczytać i zanotować intensywność emisji roztworu przy długości fali 354 nm.
4. Do zawartości kuwety dodać jeszcze 5 razy po 10 μl roztworu tryptofanu o stężeniu 0,5 mM w buforze fosforanowym o pH 7. Po każdym dodaniu roztworu tryptofanu zawartość kuwety dobrze wymieszać, a następnie wykonać widmo fluorescencji stosując parametry z poprzedniego punktu. Po każdym pomiarze odczytać intensywność emisji roztworu przy długości fali 354 nm. Wyniki zestawić w tabeli 2.
5. Powtórzyć pomiary dla roztworu drugiego białka.

Tabela 2. Tabela wyników badań fluorymetrycznych dotyczących oznaczania zawartości tryptofanu w białkach.

Objętość roztworu tryptofanu o stężeniu 0,5 mM [μl]	Intensywność fluorescencji [a.u.]	Stężenie końcowe tryptofanu bez korekcji [mM]	Stężenie końcowe tryptofanu z korekcją [mM]
10			
20			
...			
60			

Wykonanie sprawozdania

1. Stosując metodę najmniejszych kwadratów sporządzić wykres kalibracyjny – zależności intensywności fluorescencji od skorygowanego stężenia tryptofanu – według danych z Tabeli 1. Podać współczynnik kierunkowy prostej (a_w).
2. Wykreślić zależność intensywności fluorescencji (I_{fl}) od stężenia tryptofanu dodanego do roztworu białka (C_{tr}), według danych z Tabeli 2. Metodą najmniejszych kwadratów obliczyć liniową regresję i podać współczynnik kierunkowy prostej (a_{oz}).
3. Ekstrapolować prostą $I_{fl} = f(C_{tr})$ do $C_{tr} = 0$. Określić wartość intensywności fluorescencji pochodzącej od reszt tryptofanu zawartych w badanym białku.
4. Skorygować odczytaną wartość, mnożąc ją przez empiryczny współczynnik proporcjonalności wynoszący a_w/a_{oz} .
5. Wyznaczyć liczbę reszt tryptofanu (R_{tr}) przypadających na jedną cząsteczkę białka, korzystając z zależności $R_{tr} = C_{tr}/C_b$, gdzie C_b – stężenie molowe białka w próbce. Masę molową białka poda prowadzący ćwiczenia.
6. Porównać wyznaczone zawartości reszt tryptofanu w badanych białkach z wartościami literaturowymi (np. P. Pajot, *Eur. J. Biochem.* 63 (1976) 263–269). Przeprowadzić dyskusję wyników i błędów pomiarowych.

Zakres wymaganych wiadomości

Spektrofotometria absorpcyjna; prawa absorpcji promieniowania elektromagnetycznego i odstępstwa od nich; aparatura spektrofotometryczna; zastosowanie pomiarów spektroskopowych; fluorescencja; gaszenie fluorescencji; diagram Jabłońskiego; procesy promieniste i bezpromieniste; zależności między strukturą a fluorescencją cząsteczek; zastosowanie fluorescencji; pomiar widm emisyjnych; przykłady substancji fluoryzujących.

Pozycje wykazu literatury: 1, 3, 13, 16, 23, 26

Słowniczek

Luminescencja	Rodzaj emisji promieniowania elektromagnetycznego, który następuje po zaabsorbowaniu energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji, w wyniku działania zewnętrznego czynnika wzbudzającego (promieniowanie, temperatura, reakcja chemiczna, oddziaływanie mechaniczne, strumień elektronów, fala ultradźwiękowa lub zewnętrzne pole elektryczne).
Fluorescencja	Emisja światła przez molekuly w stanie wzbudzonym, które tworzą się w wyniku zaabsorbowania promieniowania nadfioletowego, widzialnego lub podczerwonego. O fluorescencji mówimy gdy od pochłonięcia przez cząsteczkę promieniowania do emisji nie upłynęło więcej niż 10^{-8} sekundy.
Fluorofor	Fragment cząsteczki, odpowiedzialny za jej fluorescencję. Najczęściej jest to grupa funkcyjna, zdolna do absorpcji energii o określonej długości fali, a później do wyemitowania innej długości fali (ściśle określonej). Ilość energii, jak i długość fali emitowanej zależy od budowy fluorofora, ale też od środowiska chemicznego w jakim on działa (na przykład pH czy siły jonowej).

II. Rachunek błędów i elementy statystyki w opracowaniu danych

Błędy pomiarowe

Każdy pomiar wielkości fizykochemicznej jest obarczony błędami pomiarowymi, w wyniku czego otrzymane wartości mierzone są mniej lub bardziej zbliżone do wartości rzeczywistej. Błędy te można ogólnie podzielić na dwie grupy: **systematyczne** i **przypadkowe**. Każdą wartość liczbową pewnego pomiaru (x_i) należy rozważać jako sumę wartości rzeczywistej mierzonej wielkości (μ_x), błędu systematycznego (x_{syst}) oraz błędu przypadkowego (e_i):

$$x_i = \mu_x + x_{syst} + e_i \quad (1)$$

Błędy systematyczne – błędy spowodowane niedokładnością przyrządów pomiarowych oraz przybliżeniami stosowanymi podczas określania zależności funkcyjnych pomiędzy wielkościami mierzonymi a wyliczonymi. Błędy systematyczne określają dokładność (precyzję) danej metody, którą charakteryzuje zgodność wartości wyników pomiarów przeprowadzonych określoną metodą z rzeczywistą wartością mierzonej wielkości. Dokładność danej metody charakteryzuje rozrzut pomiarów przeprowadzonych w identycznych warunkach. Metoda jest tym bardziej precyzyjna, im mniejszy jest rozrzut wartości liczbowych pomiarów wokół wartości rzeczywistej.

Błędy przypadkowe – błędy spowodowane są przez czynniki o charakterze losowym, na przykład wahania temperatury i ciśnienia atmosferycznego; występują one niezależnie od błędów systematycznych.

Statystyczne metody wyznaczania błędów pomiarów fizykochemicznych

Przeprowadzając co najmniej trzy pomiary wielkości mierzonej, do analizy błędów przypadkowych można i należy stosować **metody statystyczne**.

Jeżeli pewien pomiar (doświadczenie) powtórzono n razy, a badane zdarzenie losowe (X) wystąpiło k razy, to stosunek k/n nazywamy częstością zdarzenia X , a jego wartość mieści się w przedziale: $0 \leq k/n \leq 1$. Dla coraz większej ilości przeprowadzonych pomiarów stosunek k/n będzie zbliżał się do pewnej stałej wartości p , którą nazywamy prawdopodobieństwem (P) zaistnienia zdarzenia losowego X : $P(X) = p$. Dla zdarzenia, które nastąpi na pewno $p = 1$, a dla niemożliwego $p = 0$. Jeżeli prawdopodobieństwo błędu w badanym procesie wynosi 0,07, to oznacza, że błąd nastąpi przeciętnie 7 razy na każde 100 prób. Zdarzenie losowe charakteryzuje się wielkością nazwaną **zmienną losową**. Wartości, które przyjmuje zmienna losowa są związane z prawdopodobieństwem, które określa, jak często mogą wystąpić pewne

wartości zmiennej losowej. Jeżeli dla każdego przedziału $\langle a; b \rangle$ określone jest prawdopodobieństwo tego, że zmienna losowa (x) znajduje się w przedziale: $P(a \leq x \leq b)$, to mówimy, że określony jest rozkład prawdopodobieństwa zmiennej losowej x .

Konsekwencją wpływu czynników losowych na wyniki pomiarów jest rozrzut wielkości mierzonych. Powtarzając kolejno pomiar wielkości fizykochemicznej uzyskujemy pewien zbiór wartości zmiennej losowej, dzięki czemu jesteśmy w stanie określić kształt rozkładu wartości zmiennej losowej oraz parametry tego rozkładu, takie jak miara położenia oraz miara rozproszenia.

Miarę położenia określa zależność częstości (prawdopodobieństwa) występowania wartości pomiarów zmiennej losowej od wartości tych pomiarów. Oznacza to, że wszystkie wyniki pomiarów są skupione wokół pewnej wartości, która na wykresie powyższej zależności znajduje w maksimum, którego położenie jesteśmy w stanie wyznaczyć. Do najczęściej stosowanych miar położenia należą: średnia arytmetyczna oraz mediana.

Średnia arytmetyczna – jest najczęściej używaną miarą położenia; wartość średniej arytmetycznej ($\bar{x}$) oblicza się z zależności:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

gdzie: $\sum_{i=1}^n x_i$ – suma zaobserwowanych wartości liczbowych badanej zmiennej, n – liczba dokonanych pomiarów.

Zaletą stosowania wartości średniej arytmetycznej jako miary położenia jest fakt, iż suma kwadratów odchyłeń poszczególnych pomiarów od średniej arytmetycznej jest najmniejsza z możliwych:

$$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \text{minimum} \quad (3)$$

Mediana (Me) – wielkość, pozwalająca usystematyzować ogół obserwacji w szeregu od wartości najmniejszej do największej. Jeżeli liczba obserwacji jest nieparzysta, to mediana znajduje się w środku uporządkowanego szeregu:

$$Me = x_{\frac{n+1}{2}} \quad (4)$$

Na przykład w szeregu: 1,4,7,10,13 ilość pomiarów (n) wynosi 5, czyli medianę stanowi wartość trzeciego pomiar (x_3) – czyli jej wartość wynosi 7. Jeżeli liczba obserwacji jest parzysta, to mediana jest w tym przypadku średnią arytmetyczną dwu środkowych wartości szeregu:

$$Me = \frac{1}{2}(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1})$$

Miary rozproszenia określają rozproszenie (rozrzut) zdarzeń losowych wokół wartości rzeczywistej mierzonej wielkości (μ_x). Dwa zbiory, dla których wyznaczono taką samą wartość miary położenia (na przykład średnią arytmetyczną), mogą mieć różne miary rozproszenia, czyli różnić się rozrzutem wartości pomiarowych, a więc precyzją pomiarów. Rozproszenie mierzonych wartości wokół wartości rzeczywistej, najczęściej scharakteryzuje się za pomocą takich miar rozproszenia, jak: rozstęp, wariancja oraz odchylenie standardowe.

Rozstęp – jest najprostszą miarą rozproszenia; rozstęp (R) definiuje się jako różnicę pomiędzy największą i najmniejszą zaobserwowaną wartością pomiaru:

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (5)$$

Rozstęp przedstawia bezwzględną wartość rozproszenia danych eksperymentalnych. Dla niewielkiej próby (małej liczby pomiarów), rozstęp stanowi kryterium odrzucania wyników wątpliwych. W celu odrzucenia wyników wątpliwych wyznacza się parametr w ze wzoru:

$$w = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (6)$$

gdzie: x_2 – wątpliwy wynik pomiaru; x_1 – najbliższy (sąsiedni) wynik dla wyniku wątpliwego.

Jeżeli wyliczona wartość w jest zbyt duża, względem konkretnej liczby pomiarów dla określonej wartości prawdopodobieństwa, wynik ten można odrzucić.

Wariancja – jest określana jako średnia kwadratów odchyłeń zdarzeń losowych (pomiarów) od wartości rzeczywistej; wariancja zbiorowości generalnej (σ_x^2) jest zdefiniowana jest zależnością:

$$\sigma_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n} \quad (7)$$

Najczęściej wariancję zbiorowości generalnej szacujemy za pomocą wariancji dla niewielkiej próby, w której nie posługujemy się wartością rzeczywistą, lecz wartością średnią (średnią arytmetyczną); wariancja ta (s_x^2) jest wyrażona zależnością:

$$s_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (8)$$

Odchylenie standardowe – jest podstawową wielkością określaną w podczas statystycznej analizy błędów i zdefiniowane jako pierwiastek kwadratowy wariancji dla zbiorowości generalnej:

$$\delta_x = \sqrt{\delta_x^2} \quad (9)$$

Podobnie jak dla wariancji, najczęściej posługujemy się odchyleniem standardowym dla niewielkiej próby, nazywanym **średnim odchyleniem standardowym**, które wyznacza się z zależności (10):

$$s_x = \sqrt{s_x^2} \quad (10)$$

W przypadku, gdy niemożliwy jest bezpośredni pomiar poszukiwanej wielkości (Z), a można ją wyznaczyć z empirycznego równania na podstawie innych zmiennych: $Z = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$. Precyzja wyznaczania wielkości Z zależy od dokładności pomiarów $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$.

Wariancja funkcji Z jest definiowana wyrażeniem: $\delta^2_{(z)} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial Z}{\partial x_i}\right)^2 \delta^2_{(x_i)}$, a odchylenie standardowe wynosi: $\delta_{(z)} = \sqrt{\delta^2_{(z)}}$, stąd możemy wyznaczyć wartości tych parametrów dla różnych funkcji, przykłady podano w Tab. 1:

Tabela 1. Podstawowe funkcje i ich wariancje.

Funkcja	Wariancja
$Z = ax$	$\delta^2_{(z)} = a^2 \delta^2_{(x)}$
$Z = ax_1 \pm x_2$	$\delta^2_{(z)} = a^2 \delta^2_{(x_1)} + \delta^2_{(x_2)}$
$Z = ax_1 x_2$	$\delta^2_{(z)} = (a \bar{x}_2)^2 \delta^2_{(x_1)} + (a \bar{x}_1)^2 \delta^2_{(x_2)}$
$Z = \frac{ax_1}{x_2}$	$\delta^2_{(z)} = \left(\frac{a}{\bar{x}_2}\right)^2 \delta^2_{(x_1)} + \left(\frac{a \bar{x}_1}{\bar{x}_2^2}\right)^2 \delta^2_{(x_2)}$

Przykład 1:

Należy obliczyć stężenie substancji A w roztworze oraz wariancję i odchylenie standardowe stężenia, jeżeli wartość średnia wyznaczonej przepuszczalności dla grubości warstwy $d = 1$ cm wynosi $T = 52,5\%$, odchylenie standardowe transmisji $\delta_T = 1,5 \times 10^{-2}$, średnia wartość molowego współczynnika absorpcji $\bar{\varepsilon} = 10^4$, natomiast $\delta_\varepsilon = 25$.

$$\log \frac{1}{T} = d \times c \times \varepsilon$$

$$c = -\frac{\log T}{d \times \varepsilon} = -\frac{\log 0,525}{10^4} = 2,798 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$\delta_c^2 = \left(\frac{\partial c}{\partial T}\right)^2 \delta_T^2 + \left(\frac{\partial c}{\partial \varepsilon}\right)^2 \delta_\varepsilon^2$$

$$\delta_c^2 = \left(\frac{1}{2,303T\bar{\varepsilon}}\right)^2 \delta_T^2 + \left(\frac{\log \bar{T}}{\bar{\varepsilon}}\right)^2 \delta_{\varepsilon}^2 = \left(\frac{1}{2,303 \times 0,525 \times 10^4}\right)^2 \times 2,25 \times 10^{-4} + \left(\frac{\log 0,525}{(10^4)^2}\right)^2 \times 625$$

$$\delta_c^2 = 1,545 \times 10^{-12}$$

$$\delta_c = \sqrt{1,545 \times 10^{-12}} = 1,24 \times 10^{-6}$$

Przykład 2:

Obliczmy odchylenie standardowe (*SD*) i względne odchylenie standardowe (*RSD*) wyznaczenia ładunku, który przepłynął przez kulometr w metodzie Hittorfa:

$$Q = \frac{m_2 - m_1}{31,77} \times F$$

wiedząc że: $m_2 = 12,166$ g; $m_1 = 11,973$ g, zaś pomiaru masy katody przed i po doświadczeniu dokonano za pomocą wagi analitycznej z dokładnością do 3-go miejsca po przecinku.

Problemem do rozwiązania jest określenie błędu względnego wielkości bezpośrednio niemierzalnej – w tym przypadku ładunku przepływającego przez elektrolit. Dla dowolnej funkcji możemy wyznaczyć wariancję, czyli kwadrat odchylenia standardowego za pomocą tzw. różniczki zupełnej. Wariancje dla niektórych funkcji podano w Tabeli 1.

W niniejszym przypadku funkcja ma ogólną postać: $Z = ax_1 + ax_2$,

gdzie: $Y = Q$; $a = \text{const.} = F/31,8$; $x_1 = m_1$; $x_2 = m_2$,

czyli zmienne równania to masa katody – wyznaczana wagowo przed i po doświadczeniu. Zgodnie z wzorami podanymi w powyższej tabeli wariancja powyższej funkcji będzie miała postać: $\delta^2_{(Z)} = a^2 \delta^2_{(x_1)} + a^2 \delta^2_{(x_2)}$.

Ponieważ ważenie wykonujemy na tej samej wadze, błąd jest identyczny w obu przypadkach i można zapisać: $\delta_Y^2 = 2a^2(\delta X_1)^2$. Zatem:

$$a = 96500 \text{ C mol}^{-1} / 31,77 \text{ g mol}^{-1} = 3034,8 \text{ C g}^{-1}$$

$$\Delta m = 12,166 \text{ g} - 11,973 \text{ g} = 0,193 \text{ g}$$

$$Q = 3034,8 \times 0,193 \approx 585,72 \text{ C}$$

$$\delta^2_{(Z)} = 2 \times (3034,8)^2 \times (0,001)^2 \approx 18,42 \text{ C}^2$$

Odchylenie standardowe dla obliczonej wartości Q wynosi: $\delta_Z = \sqrt{18,42 \text{ C}^2} \approx 4,29 \text{ C}$.

$$\text{Stąd: } SD \approx 4,3 \text{ C; } RSD = \frac{100\% \times 4,3}{1183,5} \approx 0,36\%$$

Odpowiedź: $Q \approx 1183,5 (\pm 4,3) \text{ C}$ oraz $Q \approx 1183,5 \text{ C} (\pm 0,36\%)$.

Błąd bezwzględny i względny

Błąd pojedynczego pomiaru można scharakteryzować wprowadzając pojęcie błędu bezwzględnego oraz błędu względnego.

Błąd bezwzględny – błąd pomiaru o wartości liczbowej a ; błąd bezwzględny ($\Delta(a)$) jest opisany zależnością:

$$\Delta(a) = |a - \mu| \quad (11)$$

gdzie: μ – wartość rzeczywista mierzonej wielkości.

Jeżeli dokładna wartość a nie jest znana, to pojęcie błędu bezwzględnego zastępuje się pojęciem kresu górnego błędu bezwzględnego:

$$\Delta(a) \leq \Delta a \quad (12)$$

gdzie: Δa – kres górny błędu bezwzględnego (inaczej: maksymalny błąd bezwzględny) ustalony na podstawie znajomości charakterystyki przyrządu pomiarowego.

Błąd względny – jest zdefiniowany jako stosunek błędu bezwzględnego oraz wartości rzeczywistej mierzonej wielkości:

$$\left| \frac{\Delta(a)}{\mu} \right| = \delta(a) \quad (13)$$

Wartość kresu górnego błędu względnego δ_a (inaczej: maksymalnego błędu względnego) wynosi: $\delta(a) \leq \delta a$

Oprócz dokładności pomiarów, błąd wyników uzyskanych z obliczeń opierających się bezpośrednio na pomiarach zależy od błędów popełnionych przy zaokrąglaniu wartości liczbowych wielkości niemierzonych bezpośrednio. Wartość liczbową przeprowadzonego pomiaru powinna zawierać taką liczbę cyfr znaczących, aby tylko ostatnia z nich była niepewna. Przy zaokrąglaniu liczb należy kierować się następującymi zasadami: jeżeli pierwsza z odrzuconych cyfr jest mniejsza od 5, to pozostałych cyfr nie zmienia się, jeśli jest większa od 5, to do ostatniej cyfry dodaje się 1, natomiast jeżeli jest równa 5 – do ostatniej dodaje się 1, jeżeli przynajmniej jedna cyfra z odrzuconych była większa od 0, a gdy pozostałe wynosiły 0, to do ostatniej dodaje się 1 tylko wtedy, jeśli jest ona cyfrą nieparzystą. Błąd bezwzględny wielkości Z , która opisuje funkcja kilku zmiennych: $Z = Z(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ jest definiowany wyrażeniem:

$$\Delta Z = \sum_{i=1}^n \frac{\partial Z}{\partial x_i} \Delta x_i \quad (14)$$

gdzie: ΔZ – błąd bezwzględny wartości x_i .

Wartość jej błędu względnego opisana jest równaniem (15):

$$\frac{\Delta Z}{Z} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial}{\partial x_i} \ln Z \right) \Delta x_i \quad (15)$$

stąd możemy wyznaczyć wartości tych parametrów dla różnych funkcji, przykłady podano w Tab. 2.

Tabela 2. Obliczanie błędu bezwzględnego i względnego dla często spotykanych funkcji.

Funkcja	Błąd bezwzględny	Błąd względny
$Z = x \pm y$	$\Delta Z = \Delta x + \Delta y $	$\frac{\Delta Z}{Z} = \left \frac{\Delta x}{x \pm y} \right + \left \frac{\Delta y}{x \pm y} \right $
$Z = x^y$	$\Delta Z = yx^{(y-1)}\Delta x + x^y \ln y \Delta y $	$\frac{\Delta Z}{Z} = \left \frac{y}{x} \Delta x \right + \ln x \Delta y $
$Z = \ln(x - y)$	$\Delta Z = \left(\frac{\Delta x}{x - y} \right) + \left(\frac{\Delta y}{x - y} \right)$	$\frac{\Delta Z}{Z} = \left \frac{\Delta x}{(x - y) \ln(x - y)} \right + \left \frac{\Delta y}{(x - y) \ln(x - y)} \right $

Przedstawienie danych doświadczalnych za pomocą równań

Przedstawienie danych eksperymentalnych w postaci równań matematycznych ułatwia określenie zależności funkcyjnej pomiędzy mierzonymi wielkościami oraz umożliwia wyznaczenie wartości zmiennej poprzez interpolację (wyznaczenie wartości zmiennej pomiędzy punktami wyznaczonymi w drodze pomiaru) oraz ekstrapolację (przewidywanie wartości zmiennej poza zakresem pomiaru). Równania zależności funkcyjnych są wyrażane różnymi wzorami empirycznymi, w których występują pewne stałe. Stałe te najprościej można wyznaczyć, gdy pomiędzy zmiennymi istnieje zależność liniowa. Z tego powodu często równania krzywych, poprzez zmianę współrzędnych przekształca się do postaci liniowej w układzie nowych współrzędnych; przykłady podano w Tab. 3 poniżej.

Tabela 3. Linearyzacja kilku często spotykanych funkcji w analizie fizykochemicznej.

Wzór funkcji	Zmiana współrzędnych	Równanie liniowe w układzie nowych współrzędnych
$y = ax^b$	$x' = \log x$ $y' = \log y$	$y' = \log a + bx'$
$y = b + \log x$	$x' = \log x$	$y' = b + x'$
$y = a + e^{bx}$	$y' = \log y$	$y' = \log a + 0,343bx$
$y = a + b/x$	$x' = 1/x$ $y' = \log y$	$y' = a + x'$
$y = \frac{1}{a + bx}$	$y' = 1/y$	$y' = a + bx$

Podczas wyznaczania wartości stałych w równaniach najczęściej stosuje się tak zwaną **metodę najmniejszych kwadratów**. Dla równań – tak jak w przypadku średniej arytmetycznej – istnieje jedna krzywa, dla której suma kwadratów odchyleń jednej ze zmiennych od tej krzywej jest najmniejsza z możliwych. Stąd dla równania liniowego pewnej funkcji S:

$$S = \sum_{i=1}^n Z_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - ax_i - b)^2 = \text{minimum} \quad (15)$$

gdzie: n – liczba pomiarów, y_i – wartość funkcji wyliczona na podstawie zmierzonej wartości x_i .

W powyższym wzorze (15) x_i oraz y_i są danymi eksperymentalnymi, natomiast a oraz b to zmienne. Funkcja S osiąga minimum wtedy, gdy jej pochodne cząstkowe względem zmiennych a i b są równe zero: $\frac{\partial S(a,b)}{\partial a} = 0$ oraz $\frac{\partial S(a,b)}{\partial b} = 0$.

$$\frac{\partial S(a,b)}{\partial a} = 2na - 2 \sum_{i=1}^n y_i + 2b \sum_{i=1}^n x_i = 0 \quad (16)$$

$$\frac{\partial S(a,b)}{\partial b} = 2a \sum_{i=1}^n x_i^2 - 2 \sum_{i=1}^n x_i y_i + 2b \sum_{i=1}^n x_i = 0 \quad (16')$$

Z powyższych zależności można wyliczyć wartości zmiennych a i b , które wynoszą:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n}} \quad (17)$$

oraz:
$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - a \sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (18)$$

Przykładowo, poniżej zestawiono wartości ciśnienia panującego w układzie (p^0) w zależności od objętości wprowadzonego adsorbentu (V_a) (Tab. 4):

Tabela 4. Przykładowe dane uzyskane podczas badania adsorpcji fizycznej.

L.p.	V_a (ml)	p^0 (Tr)
1	0,5	7,968
2	1,0	20,056
3	1,5	37,016
4	2,0	54,816
5	2,5	74,266
6	3,0	96,536
7	3,5	119,776
8	4,0	142,576
9	4,5	162,076
10	5,0	185,076
11	5,5	210,676

Wiedząc, że zależność $p^0 = f(V_a)$ opisuje równanie prostej $p^0 = a^0 \cdot V_a + b^0$ metodą najmniejszych kwadratów można wyznaczyć parametry prostej: a^0 oraz b^0 (Tab. 5).

Tabela 5. Przykład analizy danych podczas badania izotermy adsorpcji fizycznej.

L.p.	$V_a = x_i$	$p^0 = y_i$	y_i^2	x_i^2	$x_i y_i$
1	0,5	7,968	63,489	0,25	3,984
2	1,0	20,056	402,243	1,00	20,056
3	1,5	37,016	1370,184	2,25	55,524
4	2,0	54,816	3004,794	4,00	109,632
5	2,5	74,266	5515,439	6,25	185,665
6	3,0	96,536	9319,199	9,00	289,608
7	3,5	119,776	14346,290	12,25	419,216
8	4,0	142,576	20327,920	16,00	570,304
9	4,5	162,076	26268,630	20,25	729,342
10	5,0	185,076	34253,130	25,00	925,308
11	5,5	210,676	44384,380	30,25	1158,718
Σ	33	1110,838	159255,700	126,5	4467,429

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}} = 40,400$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - a \sum_{i=1}^n x_i}{n} = -21,086$$

Zatem zależność: $p^0 = f(V_a)$ wyrazić wzorem: $p^0 = 40,4 \cdot V_a - 21,086$

W przypadku, gdy wartości jednej zmiennej (x) odpowiada pewien zbiór wartości drugiej zmiennej (y), czyli występuje pomiędzy nimi zależność funkcyjna określająca stopień powiązania między zmiennymi x i y , to między tymi zmiennymi istnieje zależność nazywana **korelacją**. Wskaźnik określający stopień zależności liniowej pomiędzy zmiennymi x i y nosi nazwę **współczynnika korelacji liniowej** (r). Współczynnik korelacji liniowej definiuje zależność:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n} \right] \times \left[\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_i\right)^2}{n} \right]}} \quad (19)$$

gdzie: x_i oraz y_i – wartości liczbowe kolejnych pomiarów.

Gdy wartość współczynnika korelacji liniowej wynosi 0, to zależność liniowa pomiędzy zmiennymi x i y nie istnieje, natomiast gdy jego wartość wynosi 1, to zmienne x i y są powiązane liniową zależnością funkcyjną.

Pozycje wykazu literatury: 31, 32

III. Bezpieczeństwo pracy w laboratorium fizykochemicznym

Praca z substancjami palnymi, żrącymi, trującymi oraz wykorzystywanie różnego typu aparatury – elektrycznej czy próżniowej – wymaga zachowania szczególnych środków ostrożności. Nieumiejętnie lub niedbale wykonana czynność może pociągnąć za sobą przykre następstwa nie tylko dla samego eksperymentatora, ale również dla jego koleżanek i kolegów oraz całego otoczenia. W związku z tym należy się zapoznać nie tylko z zasadami postępowania w celu uniknięcia wypadku, ale również z zasadami udzielania pierwszej pomocy poszkodowanemu.



Fotografia 1. Praca w laboratorium fizykochemicznym.

Zasady pracy w laboratorium chemicznym

- Student na pracowni zobowiązany jest stale przebywać w fartuchu, a podczas pracy z substancjami niebezpiecznymi – w okularach ochronnych.
- Należy zapoznać się z rozmieszczeniem sprzętu gaśniczego i instrukcjami jego użycia, apteczki laboratoryjnej oraz wyjść ewakuacyjnych.
- Wszystkie niebezpieczne doświadczenia należy przeprowadzać pod sprawnie działającym wyciągiem.
- W przypadku powstania pożaru należy natychmiast zaalarmować prowadzących ćwiczenia oraz zgodnie z ich wskazówkami, opuścić salę ćwiczeń.
- Zaistniałe poparzenia lub skaleczenia należy natychmiast zgłaszać prowadzącym ćwiczenia.
- W przypadku wystąpienia objawów zatrucia należy zgłosić się do osoby prowadzącej ćwiczenia. Jeśli takie objawy zostaną zauważone po godzinach ćwiczeń, należy natychmiast zgłosić się do lekarza.

- Zabrania się spożywania posiłków oraz picia napoi podczas pobytu na pracowni.
- Na stole laboratoryjnym mogą znajdować się tylko przedmioty i rzeczy związane z bezpośrednim wykonywaniem ćwiczenia.
- Ewentualne wyjścia z pracowni podczas zajęć należy zgłaszać prowadzącemu zajęcia.
- Należy zachowywać porządek w miejscu pracy, zwracając uwagę na rodzaje powstających odpadków i związanych z nimi zagrożeń.
- Po zakończeniu ćwiczenia i przed opuszczeniem laboratorium należy umyć, wysuszyć i schować wszystkie używane naczynia oraz zabezpieczyć używane substancje chemiczne. Sprawdzić, czy wszystkie instalacje zostały wyłączone.
- Warunkiem otrzymania zaliczenia jest wykonanie ćwiczeń przewidzianych programem oraz rozliczenie się ze sprzętu.

Szczegółowe zasady pracy w laboratorium

Praca z chemikaliami

Przeważająca większość substancji chemicznych stwarza zagrożenie dla zdrowia ludzkiego oraz otaczającego nas środowiska. Substancje, z którymi mamy do czynienia mogą mieć własności toksyczne lub alergiczne, łatwość zapłonu lub wybuchu, niszczące lub żrące działanie na organizm ludzki. Do organizmu trucizny mogą dostawać się zarówno przez drogi oddechowe, jak i przez skórę i błony śluzowe, czy też przez przewód pokarmowy. Dla uniknięcia zatrucia poprzez przewód pokarmowy, skórę i błonę śluzową należy przyjąć następujące zasady postępowania:

- Nie należy pobierać pipetą roztworów lub rozpuszczalników trujących bezpośrednio ustami.
- Prace z substancjami żrącymi i szczególnie agresywnymi czy trującymi należy wykonywać w rękawicach ochronnych, okularach ochronnych i fartuchu ochronnym.
- Nie należy wykorzystywać naczyń laboratoryjnych do celów spożywczych.
- Po zakończeniu pracy w laboratorium należy dokładnie umyć ręce.
- Wszystkie prace związane z operowaniem substancjami palnymi, toksycznymi lub żrącymi należy bezwzględnie wykonywać pod wyciągiem!

Przy pracy z rozpuszczalnikami organicznymi należy zachować szczególne środki ostrożności, ze względu na możliwość powstania pożaru lub wybuchu. Podczas pracy z rozpuszczalnikami łatwopalnymi i lotnymi w pomieszczeniu nie wolno zapalać ognia. Pracując z toksycznymi rozpuszczalnikami należy zakładać maskę lub półmaskę i zwrócić uwagę staranną wentylację

pomieszczenia. Ze względu na możliwość wybuchu podczas pracy z niektórymi substancjami należy nosić okulary ochronne.

Praca z gazami sprężonymi

Gazy sprężone przechowywane są zwykle w butlach stalowych pod ciśnieniem do 250 atm. Magazyn butli znajduje się zgodnie z ogólnie obowiązującymi przepisami na zewnątrz budynku. Butle zainstalowane w laboratorium muszą być umieszczone w odpowiednich stojakach. Nie wolno przechowywać w tym samym pomieszczeniu butli z różnymi gazami, mogącymi tworzyć mieszaniny wybuchowe. Temperatura w pobliżu butli z gazem nie powinna przekraczać 35°C. Poza okresem korzystania wszystkie zawory główne butli powinny być zamknięte. Odkręcanie i zamykanie zaworów należy wykonywać z wyczuciem, tak aby nie zerwać gwintu.

Praca ze szklaną aparaturą próżniową

Aparatura pracująca pod zmniejszonym ciśnieniem powinna być osłonięta płytą z plexi lub szkła przeciwybuchowego. Manipulacje kranami próżniowymi powinny być wykonywane bardzo ostrożnie. Ze względu na możliwość implozji aparatury i rozprysku odłamków szkła wszelkie prace pod zmniejszonym ciśnieniem należy wykonywać w masce ochronnej na twarz.

Praca z promieniowaniem ultrafioletowym

Należy chronić wzrok przed bezpośrednim, nawet krótkim działaniem promieniowania ultrafioletowego. Skóra reaguje również na dłuższe działanie promieni ultrafioletowych najpierw zaczerwienieniem, a później oparzeniami. Szkodliwe działanie promieniowania nie manifestuje się natychmiastowymi efektami – co czyni je tym bardziej niebezpiecznym. Aparatura wytwarzająca promieniowanie ultrafioletowe (lampy UV-Vis) powinna być umieszczona w wentylowanym pomieszczeniu, promieniowanie to wytwarza bowiem w atmosferze reaktywne produkty drażniące drogi oddechowe.

Postępowanie w razie wypadku. Zasady udzielania pierwszej pomocy

Żadnego wypadku w laboratorium nie wolno bagatelizować. O zdarzeniu należy zawsze powiadomić prowadzącego zajęcia lub obsługę laboratorium. W przypadku utraty przytomności bezwzględnie sprawdzić drożność dróg oddechowych u poszkodowanego, stwierdzić czy oddycha, zbadać tętno, położyć na boku z nisko ułożoną głową.

Pożary, wybuchy, oparzenia termiczne

W razie pożaru nie wolno dopuścić do paniki. W miarę możliwości należy jak najszybciej usunąć z sąsiedztwa butle ze sprężonymi gazami oraz substancje łatwopalne. W celu

uniknięcia sytuacji pożarowych należy dokładnie sprawdzać szczelność aparatury, reakcje niebezpieczne przeprowadzać pod wyciągiem, nie dopuszczać do przegrzania cieczy łatwopalnych podczas ich ogrzewania i wyeliminować lub ograniczyć używanie otwartego ognia w laboratorium. Substancje palne (rozpuszczalniki organiczne) należy ogrzewać ostrożnie za pomocą czasz grzejnych. Należy także pamiętać o groźbie wystąpienia pożaru w sąsiedztwie substancji łatwopalnych o dużej prężności par.

Gdy płonie ubranie poszkodowanego nie należy dopuścić do rozprzestrzenienia się ognia. Ogień należy ugasić poprzez szczelne owinięcie laboratoryjnym kocem gaśniczym. Należy pamiętać o możliwości wystąpienia implozji podczas użytkowania eksyktorów próżniowych, wyparek i przeprowadzania destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem.

Przy oparzeniach istotne jest stwierdzenie, czy nie doszło do uszkodzenia dróg oddechowych, co może prowadzić do niemożności oddychania. Należy wówczas podawać tlen. Przy oparzeniach I i II stopnia zaczerwienioną skórę należy przemywać zimną wodą (do około 30 min.) lub solą fizjologiczną, pokryć jałową gazą. Na miejsce oparzenia można nałożyć substancję przeciwoparzeniową dostępną w apteczce laboratoryjnej (np. Pantenol w aerozolu). Nie smarować oparzeń tłustymi maściami, oliwą czy spirytusem i nie przekłuwać powstałych pęcherzy. Oparzenia III stopnia przykrywa się jałowym opatrunkiem; w tym przypadku konieczny jest jak najszybszy kontakt z lekarzem.

Oparzenia chemiczne i zatrucia

Należy pamiętać, że każda substancja jest potencjalną trucizną. Efekt toksyczny związany jest z dawką oraz trwałością (okresem toksyczności) toksyny. Oprócz toksyczności danej substancji należy uwzględniać także wpływ na organizm produktów jej rozpadu i przekształceń metabolicznych.

Najczęściej zatrucie w laboratorium dokonuje się poprzez układ oddechowy. Po przedostaniu się do płuc trucizna rozchodzi się w krótkim okresie po całym ciele za pomocą układu krwionośnego. W przypadku kontaktu z gazami, pyłami lub parami należy stosować maski z odpowiednimi pochłaniaczami i pracować tylko pod sprawnie działającym wyciągiem.

Należy zwracać uwagę nawet na najmniejsze skaleczenia, gdyż ułatwiają one przedostanie się trucizn do krwioobiegu. Zawsze powinno się unikać bezpośredniego kontaktu z odczynnikami, gdyż nawet substancje nie reagujące z pozoru ze skórą przy dłuższej ekspozycji powodują uczulenia, mogące prowadzić do miejscowej martwicy skóry. Najbardziej podatne na poparzenia są błony śluzowe i oczy. Dla tego niedopuszczalne jest wciąganie cieczy do pipety bezpośrednio ustami, badanie substancji „na smak” czy tarcie

oczach brudnymi rękami.

Stosunkowo rzadkim jest w laboratorium zatrucie poprzez układ pokarmowy, spowodowane na przykład przez wprowadzenie trucizny wraz z jedzeniem bez uprzedniego mycia rąk. Postępowanie w wypadku zatrucia związane jest z rodzajem toksyny. Pierwszą czynnością powinno być odcięcie chorego od źródła trucizny i zabezpieczenie jej przed innymi użytkownikami laboratorium. W wypadku zatrucia gazami należy wyprowadzić poszkodowanego na świeże powietrze (w tym przypadku nie stosować bezpośrednio sztucznego oddychania). Gdy trucizna nie jest znana stosuje się odtrutkę uniwersalną (wodna zawiesina węgla aktywnego, tlenku magnezu i taniny – dostępne w apteczce). Przy zatruciach substancjami żrącymi podaje się białko, mleko lub olej parafinowy. Środków wymiotnych nie stosuje się przy zatruciach kwasami lub zasadami.

Najczęściej zatrucia w laboratorium spowodowane są przez:

Aceton – należy spowodować wymioty, podać odtrutkę uniwersalną, nie pozwolić zasnąć;

Aldehydy – podawać białko, mleko, środki pobudzające;

Alkohol metylowy – stosować płukanie żołądka wodą, podawać alkohol etylowy, wskazane wyprowadzenie chorego na świeże powietrze, w razie potrzeby stosować sztuczne oddychanie;

Benzen i jego homologi – w razie kontaktu wynieść chorego na świeże powietrze, podać środki pobudzające i witaminę C;

Brom – spowodować wymioty, podać roztwór skrobi, mleko, środki pobudzające;

Chloroform – w razie potrzeby stosować sztuczne oddychanie, wynieść chorego na świeże powietrze;

Fenol – spowodować wymioty, podać natychmiast alkohol etylowy, białko jajka lub olej mineralny;

Gazy trujące (CO_2 , CS_2 , H_2S , acetylen, etylen, tlenki azotu) – chorego wynieść na świeże powietrze, w razie potrzeby podać tlen;

Gazy żrące (NH_3 , Cl_2 , Br_2 , HCl , HF , SO_2) – wynieść poszkodowanego na świeże powietrze, przy zatruciu amoniakiem podawać do wdychania kwas octowy, zaś przy zatruciach Cl_2 , Br_2 , HCl – roztwór rozcieńczonego amoniaku;

Kwasy mineralne – podać natychmiast wodę wapienną lub tlenek magnezowy dużą ilość wody, nie powodować wymiotów;

Nadmanganiany – spowodować wymioty, podawać mleko, białko jajka;

Nitrobenzen – podać 100 ml 3% kwasu octowego, dużo wody, spowodować wymioty;

Pirydyna – spowodować wymioty;

Rtęć i jej związki – podać roztwór tiosiarczanu sodowego (ok. 2g na 250 ml wody);

Zasady – zastosować 5% roztwór kwasu octowego, sok z cytryny, mleko.

Porażenie prądem elektrycznym

Przed użyciem urządzeń elektrycznych należy sprawdzić ich stan, stan izolacji przewodów elektrycznych, kontaktów i gniazdek. Wszystkie aparaty elektryczne powinny być uziemione.

Przyjmuje się najczęściej, że oporność ciała wynosi około 1000 Ω . Skutki przepływu prądu elektrycznego przez organizm ludzki zależą od jego natężenia i częstotliwości. Prąd o częstotliwości 50 Hz o natężeniu do 0,8 mA (miliamperów) jest praktycznie niewyczuwalny. Wzrost natężenia od 2 do 12 mA wywołuje już skurcze w dłoniach, ramionach, nawet dochodzące do pleców. Przy natężeniach rzędu kilkunastu mA ręce trudno jest oderwać od przewodów. Powyżej 15 mA skurcz jest zwykle tak silny, że bez pomocy z zewnątrz nie można samodzielnie oderwać się od przewodów. Powyżej 20 mA zachodzi już możliwość porażenia śmiertelnego. Zakres natężeń prądów śmiertelnych przesuwają się w kierunku większych prądów i wynosi np. 1 A przy częstotliwości 5000 Hz. Przy prądzie stałym graniczna wartość bezpiecznego natężenia wynosi 1 A.

Podstawową sprawą przy ratowaniu porażonego jest odizolowanie go od źródła prądu. Oparzenia skóry traktować podobnie jak oparzenia termiczne. Gdy poszkodowany jest w szoku, należy okryć go kocem, podawać ciepłe płyny (zapobieganie utracie ciepła, ale bez aktywnego ogrzewania ciała) i zapewnić spokój.

Skaleczenia

Przy zwykłych skaleczeniach ranę należy delikatnie oczyścić, zdezynfekować i założyć opatrunek. W przypadkach, gdy uszkodzona została tętnica, krwotok należy tamować opatrunkiem uciskowym zakładanym w miejscu krwawienia. Pierwsza pomoc w skaleczeniach oczu polega na usunięciu szkła poprzez długotrwałe przemywanie oczu wodą lub roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Nie należy wyjmować odłamków wbitych w tkankę ani pocierać oka. Nałożyć na oko jałowy opatrunek i natychmiast udać się do lekarza. Większość skaleczeń w laboratorium spowodowanych jest przez sprzęt szklany. W związku z tym należy przed pracą skontrolować stan szlifów, występowanie rys czy wad (niejednorodności) szkła. Czynności te należy przeprowadzać szczególnie dokładnie przed rozpoczęciem pracy pod zmniejszonym lub zwiększonym ciśnieniem.

Krótkotrwała utrata przytomności

Może wystąpić po urazie głowy, często towarzyszy jej niepamięć wsteczna i dezorientacja. Przez okres około doby chory powinien zostać pod opieką osoby trzeciej, a nawet lekarza, gdyż nie można wykluczyć powstania krwiaka mózgu i innych poważnych następstw urazu.

W razie zaniku akcji serca należy przeprowadzić sztuczne oddychanie (około 10 razy na minutę poprzez umiarkowanie głębokie wdechy), połączone z masażem serca (częstość około 60 razy na minutę). Należy podawać środki pobudzające, sprawdzić drożność dróg oddechowych przez odgięcie głowy do tyłu i uniesienie żuchwy. Usunąć ewentualne ciała obce z jamy ustnej i ułożyć poszkodowanego w bezpiecznej pozycji. Ważne jest, by przywrócić przepływ mózgowy przed upływem ok. 4 minut, aby nie doszło do nieodwracalnego uszkodzenia kory mózgowej.

Pozycje wykazu literatury: 33, 34

IV. Wykaz zalecanej literatury

1. Atkins P.W. „Chemia fizyczna”, PWN Warszawa 2006 i wcześniejsze.
9. Atkins P.W. „Podstawy chemii fizycznej”, PWN, Warszawa, 1996.
2. Whittaker A.G., Mount A.R., Heal M.R. „Chemia fizyczna. Krótkie wykłady”, PWN Warszawa 2012 i wcześniejsze.
5. Praca zbiorowa „Chemia fizyczna”, PWN Warszawa 1980.
6. Barrow G.M. „Chemia fizyczna”, PWN Warszawa 1973.
7. Brdička R., Podstawy chemii fizycznej, PWN Warszawa 1970.
3. Komorowski L., Olszowski A. (red.) „Chemia fizyczna. T.4. Laboratorium fizykochemiczne”, PWN Warszawa 2013.
4. Praca zbiorowa „Fizyczne podstawy chemii”, WSiP Warszawa 1982.
8. Sobczyk L., Kiswa A., Gatner K., Koll A. „Eksperymentalna chemia fizyczna”, PWN, Warszawa 1982.
10. Pigoń K., Ruziewicz Z. „Chemia fizyczna”, PWN Warszawa 1980.
11. Sobczyk L., Kiswa A. „Chemia fizyczna dla przyrodników”, PWN Warszawa 1981.
12. Drapała T. „Chemia fizyczna z zadaniami”, PWN Warszawa-Poznań 1982.
13. Pigoń K., Ruziewicz Z. „Chemia fizyczna. Podstawy fenomenologiczne. Cz. 1”, PWN Warszawa 2005.
14. Morrison R.T., Boyd R.N. „Chemia organiczna”, PWN Warszawa 1996.
17. Bursa S. „Chemia fizyczna”, PWN Warszawa 1976.
18. Praca zbiorowa (red. Jóźwiak Z., Bartosza G.) „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”, PWN Warszawa 2007.
19. Kur J. „Podstawy inżynierii genetycznej”, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 1994.
20. Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L. „Biochemia”, PWN Warszawa 2011 i wcześniejsze.
21. www.kucharczyk.com.pl/ (zakładka „WSPARCIE: Parametry, Polimeryzacja”)
22. „Elektroforeza SDS-PAGE”: http://www.youtube.com/watch?v=IWZN_G_pC8U;
<http://www.youtube.com/watch?v=toPpdoBYPWo>
23. Praca zbiorowa (red. Strzelecki, H.) „Eksperymentalna chemia fizyczna dla inżynierów”, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 1996.
24. Praca zbiorowa (red. Kocjan R.) „Chemia analityczna”, PZWL Warszawa 2002.
26. Paszyc S. „Podstawy fotochemii”, PWN Warszawa 1992.
27. “Spectrophotometry Introduction”: http://www.youtube.com/watch?v=qbCZbP6_j48
“How does a spectrophotometer work?”: <http://www.youtube.com/watch?v=pxC6F7bK8CU>

“UV/vis spectroscopy”: http://www.youtube.com/watch?v=0n-dbLzj_HM

28. Struktura 2D i 3D błękitu bromotymolowego:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6450>

29. Suppan P. „Chemia i światło”, PWN Warszawa 1997.

30. Zieliński W., Rajca A. (red.) „Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych”, PWN Warszawa 2007.

31. Demichowicz-Pigoniowa J. „Obliczenia fizykochemiczne”, PWN Warszawa 1984.

32. Ufnalski W. „Obliczenia fizykochemiczne”, OWPW Warszawa 1995.

33. Wojciechowska-Piskorska H. „Bezpieczeństwo i higiena pracy w laboratoriach chemicznych”, e-book eBHP0030, 2012, ISBN: 978-83-7804-429-1.

34. Czapnik E. , Wojciechowska-Piskorska H., „BHP w laboratoriach chemicznych”, ODDK Gdańsk 2001, ISBN: 83-71874-56-1.

35. Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28 (1994) 239–242.