

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

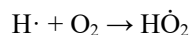
4.11. Detekce ·OH hydroxylací aromatických kyselin

V rámci této úlohy získají posluchači praktické zkušenosti s měřením luminiscence pro sledování vzniku luminoforů v důsledku ozáření roztoků. Tato úloha sestává z následujících dílčích částí:

- Ozáření vodného roztoku kyseliny benzoové nebo tereftalové rentgenovým zářením.
- Pozorování vzniku kyseliny salicylové nebo 2-hydroxytereftalové v roztoku pomocí její fotoluminiscence.

Úvod

Většina organických látek podléhá při radiolýze ve vodném prostředí poměrně komplikovaným reakcím, iniciovaným radikály $\text{H}\cdot$ a $\cdot\text{OH}$ vzniklými rozkladem vody, i mnoha dalšími radikály. Mnohdy má stěžejní význam i přítomnost kyslíku ve vodě, neboť ten je schopen vychytávat redukující vodíkové radikály a konvertovat je na spíše oxidující hydroperoxylový radikál:



Jako dostatečně selektivní senzory $\cdot\text{OH}$ radikálů lze použít např. benzenkarboxylové kyseliny resp. jejich konjugované soli. V případě ozařování roztoků kyseliny benzoové bez přítomnosti kyslíku byl pozorován vznik sraženiny bifenyldikarboxylových kyselin $\text{HOOC}-(\text{C}_6\text{H}_4)_2-\text{COOH}$, kromě nich vznikala i kyselina salicylová (*o*-hydroxybenzoová). V roztocích nasycených kyslíkem vznikají pouze hydroxybenzoové kyseliny, a to v řádově vyšším měřítku než v bezkyslíkatém prostředí. Primárním procesem se zdá být tvorba komplexu $\cdot\text{OH}$ radikálu s benzenovým jádrem kyseliny benzoové, v důsledku čehož vzniká karboxyhydroxycyklohexadienylový radikál $\text{HO}-\dot{\text{C}}_4\text{H}_5-\text{COOH}$. Konečným produktem radiolýzy v okysličeném prostředí jsou takřka výhradně hydroxylované kyseliny $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$. Měření zastoupení těchto hydroxylovaných aromatických kyselin lze tedy přímo stanovit množství $\cdot\text{OH}$ radikálů vzniklých v daném roztoku. Nevýhodou využití kyseliny benzoové pro tyto účely je vznik celkem tří rozdílných hydroxybenzoových kyselin (2-, 3- nebo 4-hydroxybenzoové) a nejednoznačnost jejich výtěžků. Tomuto problému lze zamezit s využitím kyseliny tereftalové neboli 1,4-benzendikarboxylové kyseliny $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$, v níž může docházet k hydroxylaci jen v pozici 2 (všechny H na benzenovém jádře jsou strukturně identické). Přítomnost jediného produktu, tj. 2-hydroxy-1,4-benzendikarboxylové kyseliny, tak umožňuje přímé stanovení množství $\cdot\text{OH}$. Při použití kyseliny tereftalové je však vhodné pracovat se zásaditými roztoky, jelikož je při nízkém pH nerozpustná.

Této reakce lze využít i pro stanovení toku UV fotonů v oblasti kolem 300 nm, pokud je ozařován vzduchem nasycený vodný roztok obsahující např. 10^{-2} mol dm^{-3} NaNO_3 , 10^{-3} mol dm^{-3} $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} NaHCO_3 . Záření je v tomto citlivém aktinometru absorbováno dusičnanovými ionty, jež jako jeden z produktů své fotolýzy generují $\cdot\text{OH}$ radikály, které zreagují s kyselinou benzoovou.

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

Ozařování rentgenovým zářením

Rentgenové záření vznikající při dopadu energetických nabitých částic na terč se skládá ze spojitého brzdného záření, jehož maximální energie odpovídá energii těchto částic, a čárového charakteristického záření terče, jehož intenzita, ale nikoliv poloha závisí na energii částic. Na rozdíl od takřka monoenergetického gama záření ^{60}Co jsou vlastnosti rentgenového záření a jeho pronikavost silně závislé na tomto spektru, jehož maximum intenzity se ve spektru dI/dE nachází při výrazně nižší energii než je maximální energie záření. V rentgence získají elektrony při vložení napětí např. 100 kV energii 100 keV a energie vzniklých rentgenových fotonů může být nejvýše 100 keV. Spektrum záření se navíc při průchodu látkou postupně mění, neboť některé části spektra jsou absorbovány méně než ostatní. Stanovení dávky záření je tak výrazně komplikovanější než u ^{60}Co .

Ozařování rentgenovým zářením je možné realizovat např. v kabinových RTG ozařovačích, kde je pracovní prostor obklopen stíněním, jež zaručuje bezpečné používání z hlediska radiační ochrany. Na míru vyrobený ozařovač SCIOX Beam k dispozici na FJFI obsahuje dva RTG zdroje – vzduchem chlazenou 50W rentgenku se širokým svazkem a olejem chlazenou bipolární 4200W wolframovou rentgenku se širokým svazkem (maximální napětí 350 kV). Obě rentgenky v olovem odstíněné kabině směřují směrem dolů a je jimi možné ozařovat relativně velkou plochu v různých výškových pozicích.

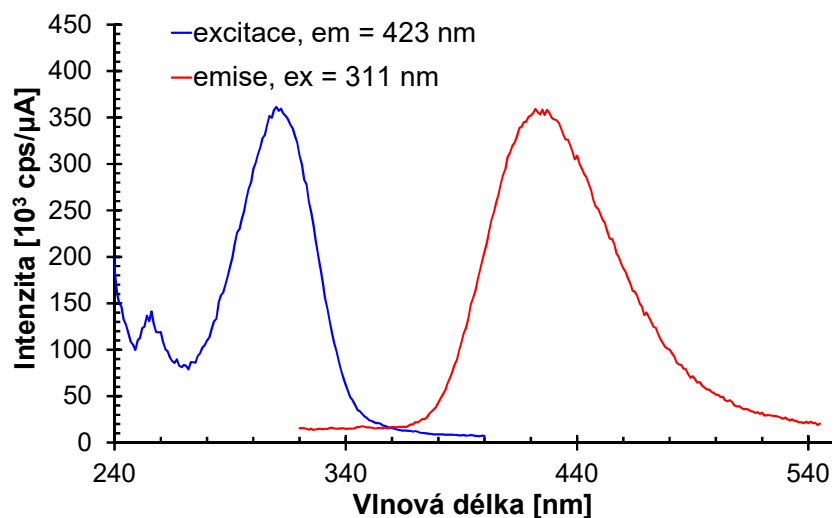
Měření luminiscence („fluorescence“)

Pojmem luminiscence se označuje široká škála procesů, jimiž ve vhodných látkách, objektech či organismech vzniká světlo (nad rámec klasického tepelného vyzařování). Pro pozorování vznikající kyseliny salicylové (2-hydroxybenzenkarboxylové), 2-hydroxybenzendikarboxylové či jejich aniontů je vhodné fotoluminiscenční měření, tedy měření luminiscence vybuzené (excitované) absorpcí světla o jiné vlnové délce. Na rozdíl od optických absorpčních spekter zde tedy vystupují dvě vlnové délky – excitační λ_{ex} (budící) a emisní λ_{em} (vyzářená). Ve většině případů bývá díky ztrátám energie excitační vlnová délka kratší než emisní vlnová délka, výjimkou jsou *up-konverzní materiály* (obvykle v laserové technice) či v omezené míře projevy tepelných kmitů. Podobně jako ve spektrofotometrii se vlnové délky vybírají pomocí monochromátoru; v přístroji na měření fotoluminiscence, tzv. spektrofluorimetru, jsou ale nezbytné dva monochromátory – jak pro excitační, tak pro emisní vlnovou délku. V souvislosti s fotoluminiscencí se tedy uvádí i dva druhy spekter – *emisní spektrum*, při němž se pro fixní excitační vlnovou délku měří intenzita světla v určitém rozsahu emisních vlnových délek, a *excitační spektrum*, při němž se emisní vlnová délka drží konstantní a mění se excitační vlnová délka. Obě spektra představují výřezy z trojrozměrného grafu $\{\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}, I\}$, s nímž se lze občas setkat a jehož změření lze docílit ve specializovaných aparaturách. Tento graf je obzvláště vhodný pro směsi více látek s odlišnými

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

excitačními a emisními spektry, příp. pro materiály s odlišnými emisními spektry buzenými při různých excitačních vlnových délkách.

Kyselina benzoová vykazuje velmi slabou emisi při ~ 320 nm, jejíž excitační spektrum má maximum kolem 230 nm, kyselina tereftalová je obdobně slabým luminoforem; hydroxylované kyseliny však vykazují intenzivní luminiscenci. Kyseliny *o*-, *m*- a *p*-hydroxybenzoové (2-, 3-, resp. 4-hydroxybenzoové) mají odlišná emisní a excitační spektra, jež ovlivňuje i pH roztoku. Mezi těmito produkty vyniká zejména kys. salicylová (2-hydroxybenzoová) s excitačním maximem při 295 nm a velmi intenzivním širokým emisním maximem při 400 nm. Armstrong a kol. měřili ostatní izomery pH 12 a přisoudili nárůst intenzity v píku kyseliny salicylové *m*-hydroxybenzoátu a emisní pás při 325 nm excitovaný při 285 nm *p*-hydroxybenzoátu. Aniont 2-hydroxy-benzendikarboxylový (neboli 2-hydroxytereftalát) s vysokou intenzitou luminiscence vykazuje excitační maximum při 311 nm a jeho emisní maximum je posunuté až k 422 nm (vizte obrázek níže). Při měření fluorescence je vždy problematický tzv. Ramanovský pík vody, posunutý do červené oblasti zhruba o 3500 cm^{-1} oproti excitačnímu záření, tj. nacházející se při 328 nm pro excitaci vlnovou délkou 295 nm, resp. 347 nm pro excitační vlnovou délku 311 nm.



Úkoly

1. Připravte 10^{-3} mol/l vodný roztok kyseliny benzoové buď o přirozeném pH, anebo s hydrogenuhličitanovým pufrům, případně 10^{-3} mol/l vodný roztok kyseliny tereftalové o pH 9 – 12 (např. v 10^{-2} mol/l NaOH).
2. Ozařujte tento roztok v rentgenovém svazku při zvolené hodnotě napětí a proudu rentgenky a průběžně odebírejte vzorky.
3. Změřte intenzitu fotoluminiscenčních emisních spekter naředěných vzorků.

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

Potřeby a pomůcky

Kyselina benzoová (C_6H_5COOH); kyselina tereftalová ($C_6H_4(COOH)_2$); kyselina 2-hydroxytereftalová ($C_6H_3OH(COOH)_2$); hydrogenuhličitan sodný ($NaHCO_3$); dusičnan sodný ($NaNO_3$); kyselina chlorovodíková HCl; hydroxid sodný NaOH; odměrné baňky o objemu 500, 250, 200 a 100 ml; 5ml, 15ml a 50ml centrifugační zkumavky; spektrofluorimetr; parafilm; plastové či křemenné kyvety se čtyřmi leštěnými stěnami; automatické pipety 200 a 5000 μ l; deionizovaná voda; analytické váhy; rentgenový ozařovač nebo střednětlaká rtuťová výbojka a stojan; pH-metr.

Pracovní postup**Příprava roztoků na ozařování**

Do 500ml odměrné baňky si připravte 2×10^{-3} mol dm^{-3} roztok kyseliny benzoové; budete-li roztok ozařovat UV zářením, přidejte dusičnan sodný tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2×10^{-2} mol dm^{-3} . Budete-li ozařovat pufrovaný roztok, pak si do 250ml odměrné baňky připravte 5×10^{-3} mol dm^{-3} roztok hydrogenuhličitanu sodného. Jsou-li oba roztoky již k dispozici, připravovat je nemusíte.

V případě použití kyseliny tereftalové si připravte cca 2 mol dm^{-3} zásobní roztok NaOH, načež si do 200ml odměrné baňky připravte 10^{-3} mol dm^{-3} roztok kyseliny tereftalové a 10^{-2} mol dm^{-3} NaOH (použijte připravený zásobní roztok), příp. jinou koncentraci NaOH pro dosažení požadovaného pH. Pro kvantifikaci 2-hydroxytereftalátu si do 200ml odměrné baňky připravte 10^{-3} mol dm^{-3} zásobní roztok odpovídající kyseliny v 10^{-2} mol dm^{-3} NaOH nebo jiné koncentraci dle potřeby. Z tohoto roztoku si následně do odměrných baněk či plastových ampulek připravte roztoky o koncentracích mezi 10^{-6} až 10^{-5} mol dm^{-3} 2-hydroxytereftalátu při požadovaném pH.

Do 15ml centrifugační zkumavky napipetujte 5 ml roztoku kyseliny benzoové a 5 ml deionizované vody nebo roztoku hydrogenuhličitanu sodného. V případě ozařování UV zářením si těchto zkumavek s 10 ml roztoku připravte ještě 5. Ve variantě využívající kyselinu tereftalovou si do centrifugační zkumavky přímo napipetujte 10 ml roztoku této kyseliny v roztoku NaOH. Víčka zkumavek důkladně uzavřete a utěsníte pomocí parafilmu.

Ozařování roztoků

UV záření: Umístěte střednětlakou rtuťovou výbojku do stojanu, do držáku v dobře definované vzdálenosti (alespoň 30 cm) od ní poté vložte centrifugační zkumavku s roztokem kyseliny benzoové. Celou aparaturu důkladně odstiňte pomocí kartonu. **Pozor!** Nikdy se nedívejte přímo do světla výkonných výbojek bez ochranných UV brýlí a také nevystavujte pokožku nefiltrovanému UV záření! Poté zapněte tuto výbojku na minimální výkon pomocí elektronického předřadníku a ozařujte po určenou

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

dobu. Jednotlivé ampule ozařujte po dobu 30, 60, 90, 120 a 150 s a po ozáření je uchovávejte mimo dosah UV záření.

Rentgenové záření: Před samotným ozařováním je potřeba rentgenový ozařovač zapnout a provést počáteční nažhavení (min. 1 hodina) podle předchozího využití přístroje. Tento proces stejně jako jakoukoliv manipulaci s ozařovačem je potřeba provádět pod dohledem pedagogického dozoru nebo jiného proškoleného pracovníka. Posluchači by neměli samostatně přístroj uvádět do chodu a smí jej ovládat jen v mezích určených pedagogickým dozorem. **Za žádných okolností není povoleno jakkoliv manipulovat s bezpečnostními prvky přístroje!** Přesuňte elektronicky polohovatelnou poličku (bez jakékoliv zátěže) do požadované polohy, umístěte na ni orbitální třepačku, připojte ji k přístroji a umístěte na ni v příslušném držáku 15ml ampulku s roztokem kyseliny benzoové či tereftalátu (vodorovně). Poté změřte, v jaké poloze je vrchní okraj třepačky vůči podlaze ozařovací kabiny a údaj si zaznamenejte.

Kabinu uzavřete a za třepání tuto ampulku ozařujte po dobu ~ 15 minut při zvoleném nastavení bipolární rentgenky (dle zadání pedagogického dozoru). Poté kabinu otevřete, z ampulky si do 5ml centrifugační zkumavky odpipetujte 200 μ l roztoku a doplňte 2,8 ml vody (ředění 15 \times), příp. roztokem NaOH u kyseliny tereftalové tak, aby se ředěním neměnilo pH resp. koncentrace NaOH. Ampulku opět důkladně uzavřete, utěsněte pomocí parafilmu, ozařujte při identickém nastavení a ve stejné poloze dalších 15 minut, načež opět odeberte vzorek do další 5ml zkumavky. Po celkové době ozařování 60 minut již 15ml ampulku dále neozařujte a ozařovač můžete vypnout. Takto získáte 4 naředěné ozářené vzorky roztoku kyseliny benzoové resp. tereftalátu.

Měření fotoluminiscence roztoků

Alespoň 30 minut před měřením zapněte spektrofluorimetr a ovládací počítač. Poté do čisté plastové nebo křemenné spektroskopické kyvety se 4 leštěnými stranami nalijte neozařený roztok kyseliny benzoové resp. tereftalátu (naředěný stejně jako ozářené vzorky). Zkontrolujte, zda v kyvetě nejsou bubliny a zda jsou všechny její strany bez šmouh, kapek či vláken, případně je očistěte suchým buničitým tampónkem. Poté proměřte její emisní spektrum pro excitační vlnovou délku 295 nm v rozsahu 300 – 580 nm (kyselina benzoová), či pro excitační vlnovou délku 311 nm v rozsahu 320 – 610 nm (tereftalát). Stejným způsobem změřte emisní spektra ozářených roztoků a pozorujte změny v roztoku.

V případě zájmu si změřte excitační a emisní spektrum kyseliny salicylové či 2-hydroxytereftalátu (v nejdéle ozařovaném roztoku) či změnu emisních spekter nejdéle ozářeného roztoku kyseliny benzoové s pH. V případě kyseliny tereftalové bylo pozorováno, že se emisní spektrum ani intenzita příliš neliší v rozsahu pH ~ 8.5 – 12. Změny pH lze nejnázat docílit přidávkem roztoku kyseliny chlorovodíkové či hydroxidu sodného. Nejdéle ozářený roztok kyseliny benzoové si 15 \times naředíte roztokem kyseliny

4.11. Detekce OH hydroxylací aromatických kyselin

chlorovodíkové a opět změřte emisní spektra při excitaci 295 nm, v rozsahu 300 – 580 nm. Do další ampule si nejdéle ozářený roztok kyseliny benzoové naředíte roztokem hydroxidu sodného a změřte emisní spektra při excitaci 295 nm a při excitaci 285 nm, obě v rozsahu 300 – 570 nm. Pozorované změny ve spektrech s růstem pH byly v literatuře přisouzeny *m*- a *p*- hydroxylované kyselině benzoové.

Zpracování výsledků

Naměřená emisní spektra roztoků si vyneste do jednoho grafu a popište pozorované změny. Z dat extrahujte intenzitu luminiscence v maximu a vyneste ji do grafu v závislosti na době ozařování. Pokud je závislost lineární, proložte ji přímkou. Bez znalosti či změření kalibrační křivky nelze z dat určit koncentraci kyseliny salicylové, avšak z roztoků 2-hydroxytereftalátu o různé koncentraci lze sestavit kalibrační křivku a určit tak koncentraci této luminiscenční složky v ozářených roztocích.

Pokud jste měřili excitační a emisní spektra kys. benzoové či tereftalátu, zobrazte je dohromady v jediném grafu; Pokud jste měřili emisní spektra při různých pH, zobrazte je opět v samostatném grafu.