東海大學
Exp. 4 實驗報告
Tunghai University

系級　　姓名
組別　　學號
日期

• Spectrophotometer 分光光度計

一原理：

分光光度計之原理，乃是利用可見光及紫外光之灯管 (Lamp) 做為光源，通过濾光鏡調整色調後，經聚焦後通过單色光分光稜鏡，再經过狹縫选擇波長，使成單一也特定波長之光線，而後射入样品管中之水样中，最後射入光电管中將光能転換為电器訊號，再藉由样本及空白水样間所吸收之光能的能量差，及標準液之能量吸收值相比較，便可定样本中之待測物濃度。

一种類：

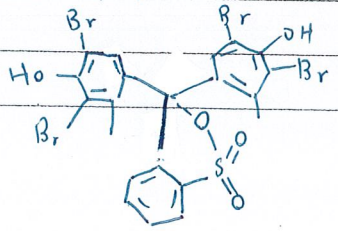
1. 可見光分光光度計　：　400 ~ 760 nm　(偵測的波長範圍)
2. 紫外分光光度計　：　200 ~ 400 nm
3. 紅外光分光光度計　：　760 nm
4. 螢光光度計
5. 原子吸收分光光度計

一应用：

1. 核酸定量
2. 蛋白質定量 (UV法)
3. 比色法
4. 細菌細胞密度 (OD 600)

• Bromocresol green 溴甲酚綠

一 簡稱BCG，是一种三苯甲烷衍生類的染料，常作為指示劑。



東海大學
Exp. 實驗報告
Tunghai University

系級　　姓名
組別　　學號
日期

- CAS No.: 76-60-8　　化學式: $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$
pubchem: 6451　　莫耳質量: 698.01 $g \cdot mol^{-1}$

- 物理性質: 溶於乙醇乙醚苯、乙酸、乙醚、乙醛，微溶溶於水

本實驗之目的:

利用分光光度計測量pH值和酸鹼平衡，並計算出指示劑的解離常數。學習如何使用UV-vis及處理實驗數據。

注意事項: 1. 測pH值前，要先校正pH meter，且每測过一次电极就要清洗一次。
2. 樣品要先測UV-vis，得到 isoshestic point 後，才測pH值。
3. 石英會粘粘細面。

儀器設定:

λ: 400nm ~ 680nm

blank : 蒸餾水

結果:

(1)完成下表

樣品溶液	1	2 25.5°C	3 25.6°C	4 26.1°C	5
pH		4.98	4.69	4.48	
$[H^+](M)$		1.05×10^{-5}	2.04×10^{-5}	3.31×10^{-5}	
λ max(in acidic) : 445.00 nm (A)	0.039	0.149	0.185	0.204	0.290
λ max(in basic) : 615.00 nm (A)	0.717	0.402	0.290	0.221	0.001

(2)利用實驗原理中所敘述的兩種方法，分別求出 Ka。

(a) 理論計算:

Let λ_1 be the wavelength of maximum absorbance of the acid form of the indicator

P be the absorbance at λ_1 for the acidic form of the indicator

R be the absorbance at λ_1 for the basic form of the indicator

Q be the absorbance at λ_1 for the buffer

In the buffer the concentrations of base and acid forms of the indicator

are in the ratio of (P - Q) to (Q - R). The ionization constant of the indicator is therefore:

$Ka = [H+]\,[In-] / [HIn] = [H^+]\,(P - Q) / (Q - R)$

(b) 作圖法:

$Am = Aa + \{(Ab - Am)/[H^+]\}Ka$

where Aa and Ab are absorbance of indicator in a pure acidic form and in a pure basic form at λ_1, respectively.

A plot of Am versus $(Ab - Am)/[H^+]$ will yield a straight line with the slope of Ka and the intercept of Aa.

東海大學 Exp. 實驗報告 Tunghai University

系級 姓名

組別 學號

日期

結果計算：

1. $[H^+]$ pH meter

① $[OH^-] = 0.1\,M \times \frac{2.5}{25} = 0.01M \Rightarrow [H^+] = 10^{-12}\,M$

② $[H^+] = 10^{-4.98} = 1.05\times10^{-5}\,M$

③ $[H^+] = 10^{-4.69} = 2.04\times10^{-5}\,M$

④ $[H^+] = 10^{-4.48} = 3.31\times10^{-5}\,M$

⑤ $[H^+]: 0.1M \times \frac{2.5}{25} = 0.01\,M$

$\lambda_{max}^{basic} = 615.00\,nm$ R = 0.717 A P = 0.001

$K_a = [H^+](P-Q)/(Q-R)$

② $K_a = (1.05\times10^{-5}) \times (0.001-0.402)/(0.402-0.717) = 1.33\times10^{-5}$

③ $K_a = (2.04\times10^{-5}) \times (0.001-0.290)/(0.290-0.717) = 1.38\times10^{-5}$

④ $K_a = (3.31\times10^{-5}) \times (0.001-0.221)/(0.221-0.717) = 1.47\times10^{-5}$

平均 $K_a = 1.39\times10^{-5}$

$\lambda_{max}^{acid} = 445.00\,nm$ R = 0.039 P = 0.290

② $K_a = (1.05\times10^{-5}) \times (0.290-0.149)/(0.149-0.039) = 1.34\times10^{-5}$

③ $K_a = (2.04\times10^{-5}) \times (0.290-0.185)/(0.185-0.039) = 1.47\times10^{-5}$

④ $K_a = (3.31\times10^{-5}) \times (0.290-0.204)/(0.204-0.039) = 1.73\times10^{-5}$

平均 $K_a = 1.51\times10^{-5}$

2. $A_m = A_a + \left(\frac{A_b - A_m}{[H^+]}\right) K_a$ ｜ A_a：截距 ｜ K_a：斜率

$\lambda_{max}^{basic} = 615.00\,nm$ $A_b = 0.717$

② A_m: 0.402 $(0.717-0.402)/(1.05\times10^{-5}) = 3.01\times10^{4}$

③ A_m: 0.290 $(0.717-0.290)/(2.04\times10^{-5}) = 2.09\times10^{4}$

④ A_m: 0.221 $(0.717-0.221)/(3.31\times10^{-5}) = 1.50\times10^{4}$

$y = 1.20\times10^{-5}x + 0.0403$ $r^2 = 0.9998$

$\lambda_{max}^{acid} = 445.00\,nm$ $A_b = 0.039$

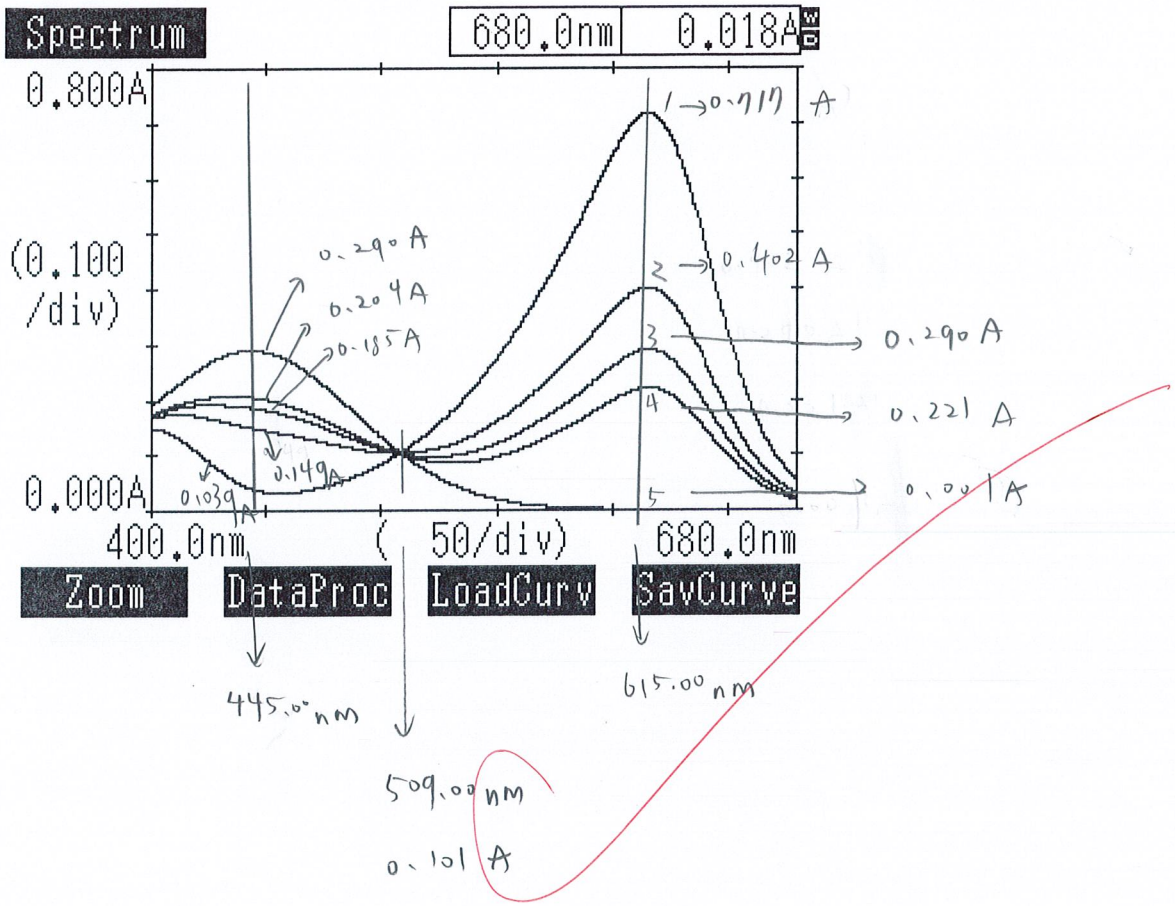
② A_m: 0.149 $(0.039-0.149)/(1.05\times10^{-5}) = -1.05\times10^{4}$

③ A_m: 0.185 $(0.039-0.185)/(2.04\times10^{-5}) = -7.15\times10^{3}$

④ A_m: 0.204 $(0.039-0.204)/(3.31\times10^{-5}) = -4.98\times10^{3}$

$y = 1.00\times10^{-5}x + 0.255$ $r^2 = 0.9972$

2018/04/12 11:09:38



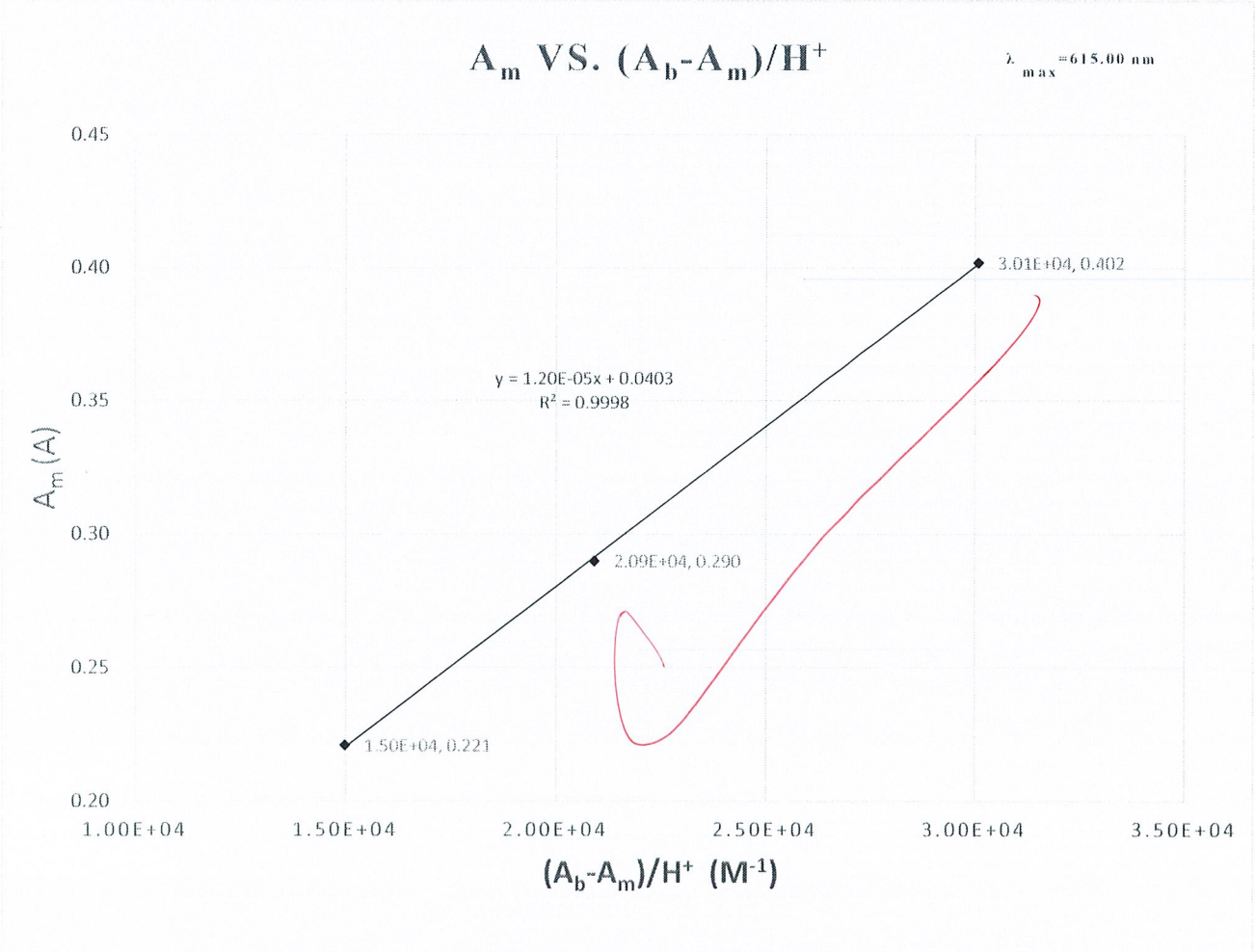
樣品溶液		1	2	3	4	5
pH			4.98	4.69	4.48	
$[H^+]$ (M)			1.05E-05	2.04E-05	3.31E-05	
λ max (in acidic) 445.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.039	0.149	0.185	0.204	0.290
λ max (in basic) 615.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.717	0.402	0.290	0.221	0.001

445.00 nm	2	3	4
P (A) in acid	0.290		
R (A) in base	0.039		
Q (A)	0.149	0.185	0.204
$[H^+]$ (M)	1.05E-05	2.04E-05	3.31E-05
Ka	1.34E-05	1.47E-05	1.73E-05
Ka (average)	1.51E-05		

615.00 nm	2	3	4
P (A)	0.001		
R (A)	0.717		
Q (A)	0.402	0.290	0.221
$[H^+]$ (M)	1.05E-05	2.04E-05	3.31E-05
Ka	1.33E-05	1.38E-05	1.47E-05
Ka (average)	1.39E-05		

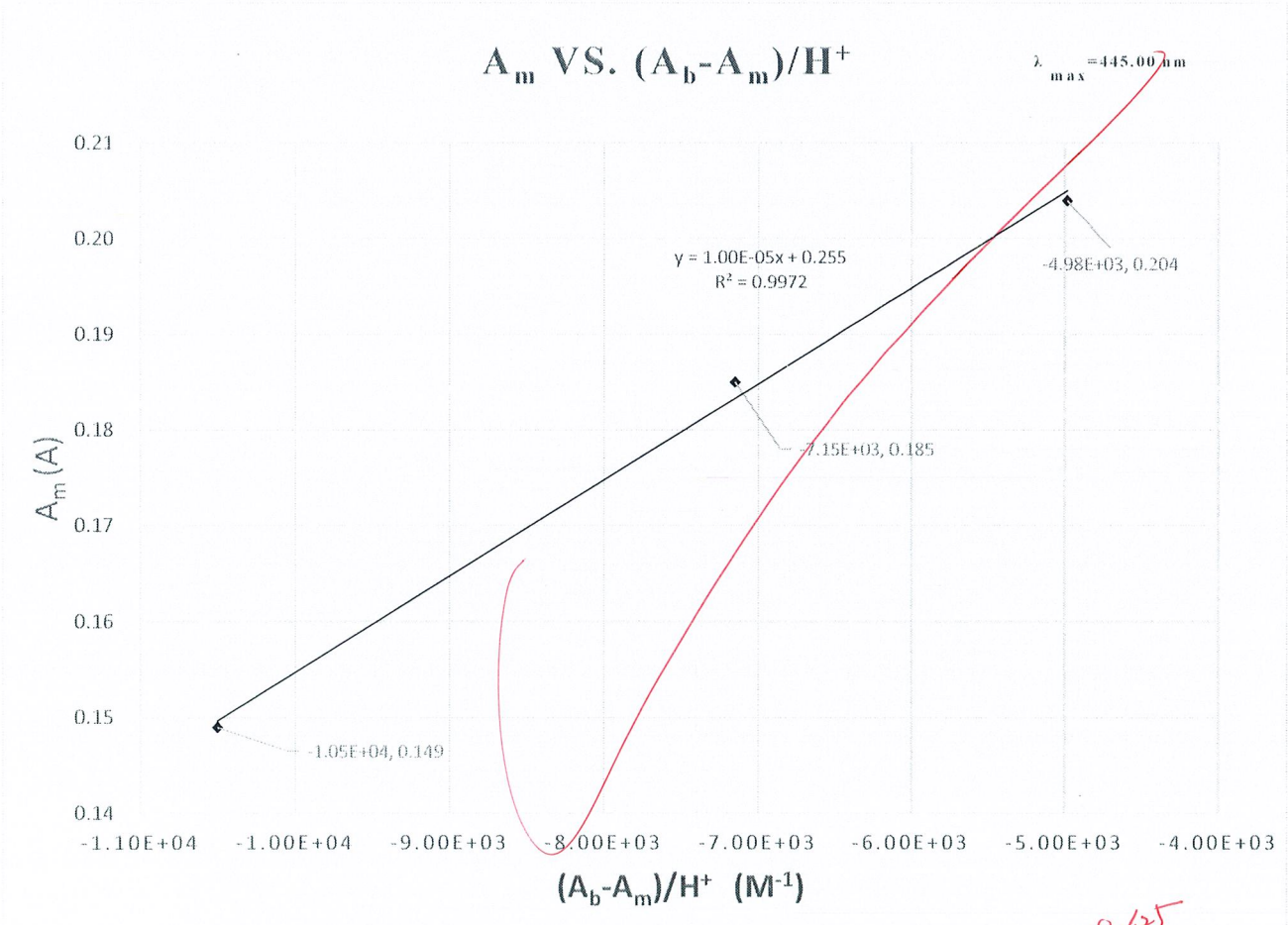
樣品溶液		1	2	3	4	5
pH			4.98	4.69	4.48	
$[H^+]$ (M)			1.05E-05	2.04E-05	3.31E-05	
λ max (in acidic) 445.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.039	0.149	0.185	0.204	0.290
λ max (in basic) 615.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.717	0.402	0.290	0.221	0.001

λ max (in basic)=615.00 nm			
$(A_b-A_m)/H^+$ (M^{-1})	3.01E+04	2.09E+04	1.50E+04
A_m (A)	0.402	0.290	0.221
slope	1.20E-05		
intercept	4.03E-02		
相關係數 r	0.9999		



樣品溶液		1	2	3	4	5
pH			4.98	4.69	4.48	
$[H^+]$ (M)			1.05E-05	2.04E-05	3.31E-05	
λ max (in acidic) 445.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.039	0.149	0.185	0.204	0.290
λ max (in basic) 615.00 nm	吸收度 (absorbance) (A)	0.717	0.402	0.290	0.221	0.001

λ max (in acidic)=445.00 nm			
$(A_b-A_m)/H^+$ (M^{-1})	-1.05E+04	-7.15E+03	-4.98E+03
A_m (A)	0.149	0.185	0.204
slope	1.00E-05		
intercept	2.55E-01		
相關係數 r	0.9986		



88 + 125