

Dependencia de las absorptividades molares del azul de timol de la temperatura y salinidad:
Aplicación a la determinación espectrofotométrica del pH en aguas estuáricas

Temperature and salinity dependence of molar absorptivities of thymol blue:
Application to the spectrophotometric determination of pH in estuarine waters

M.D. Gabriel
J.M. Forja*
J.A. Rubio
A. Gómez-Parra

Departamento de Química Física
Facultad de Ciencias del Mar
Universidad de Cádiz
Campus Río San Pedro, s/n
11510 Puerto Real, Cádiz, España
* E-mail: jesus.forja@uca.es

Recibido en junio de 2003; aceptado en julio de 2004

Resumen

Se determinaron las absorptividades molares del azul de timol en soluciones sintéticas de fuerza iónica variable entre 0.1 y 0.7 M_w . Para ello, las disoluciones se tamponaron a pH 11.5 para caracterizar el espectro de absorción de la forma básica del indicador, y a pH 5.0 para la especie HI^- . Las absorptividades molares correspondientes a los máximos de absorción de estas formas del indicador, así como las absorptividades molares que describen las absorbancias residuales a estas mismas longitudes de onda, se calcularon por regresión lineal entre la concentración del indicador en las muestras y las absorbancias de los máximos, tras adiciones sucesivas de azul de timol 2 mM. Se encontró una dependencia lineal de las absorptividades molares con la temperatura entre 5°C y 30°C, y con la salinidad solamente para 596E (I^2^-). La aplicación de las expresiones de los coeficientes de extinción molar para el cálculo del pH espectrofotométrico proporciona resultados congruentes con medidas potenciométricas del pH en la escala de la concentración total del ión hidrógeno.

Palabras clave: pH espectrofotométrico, azul de timol, coeficientes de extinción molar, aguas estuáricas, agua de mar.

Abstract

Molar absorptivities of thymol blue have been determined in synthetic solutions of ionic strength ranging from 0.1 to 0.7 M_w . The solutions were buffered to pH 11.5 in order to characterize the absorption spectrum of the basic form of the indicator and to pH 5.0 to characterize the HI^- form. The extinction coefficients corresponding to the maximums of absorption of these forms of the indicator, as well as the molar absorptivities that describe the residual absorbances at the same wavelengths, were determined through linear regression between the indicator concentration in these samples and the absorbances of the maximums after successive additions of 2 mM thymol blue. A linear dependence of the molar absorptivities was found with temperature between 5°C and 30°C, and with salinity only for 596E (I^2^-). The application of the expressions of the molar absorptivities for the calculation of the spectrophotometric pH provided results in accordance with the potentiometric pH measurements in the total hydrogen ion concentration scale.

Key words: spectrophotometric pH, thymol blue, molar absorptivities, seawater, estuarine waters.

Introducción

La aparición de distintas escalas de pH basadas en una disminución del efecto del potencial de unión líquida en muestras salinas, así como la falta de consenso entre la comunidad científica, ha hecho del estudio de las reacciones ácido-base uno de los temas más confusos de la química marina (Dickson,

Introduction

The appearance of diverse pH scales based on a decrease in the effect of the liquid-junction potential in saline samples and the lack of consensus among the scientific community have made the study of acid-base reactions one of the most confusing in marine chemistry (Dickson, 1981). Consequently,

1981). Por esta razón, en los 15 últimos años se ha realizado un importante esfuerzo por establecer métodos de determinación del pH en el agua de mar mediante indicadores coloreados del grupo de las sulfonaftaleinas (Gabb y Latchem, 1968). Mediante esta técnica se evita tener que realizar una calibración previa a la determinación del pH, pero se requiere una caracterización de las propiedades espectrofotométricas y termodinámicas del indicador antes de su utilización (Clayton y Byrne, 1993; Zhang y Byrne, 1996; Balderas-Hernández *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 2000). El principal interés en la actualidad se centra en aumentar la precisión y la rapidez de este método aplicado fundamentalmente a aguas oceánicas y en continuo (Byrne y Breland, 1989; Bellerby *et al.*, 1995; DeIValls, 1999; Tapp *et al.*, 2000), o incluso aplicar sistemas de valoración que permitan la determinación de la alcalinidad total (Breland y Byrne, 1993; Clayton *et al.*, 1995; Roche y Millero, 1998; Yao y Byrne, 1998; Byrne *et al.*, 2002).

Aunque el método se encuentra bien establecido para el agua de mar, su aplicación a aguas estuáricas o agua intersticial de sedimentos litorales requiere una mejor caracterización de la influencia de la fuerza iónica o las interacciones específicas sobre las constantes de disociación de los indicadores y sus absorptividades molares.

En este trabajo se han cuantificado las absorptividades molares del azul de timol en disoluciones sintéticas de distinta fuerza iónica (entre 0.1 y 0.7 M_w) en el intervalo de 5°C a 30°C. El dispositivo experimental empleado permite una comparación directa de los valores obtenidos para el pH espectrofotométrico en muestras estuáricas con valores de pH potenciométrico en la escala de la concentración total del ión hidrógeno.

Material y métodos

Los espectros de absorción del azul de timol se registraron con un espectrofotómetro de doble haz (Lambda 16, Perkin Elmer) y celdas de flujo termostatizadas de 10 cm de paso óptico. Los barridos se realizaron cada nm dentro del intervalo de longitudes de onda comprendido entre 350 y 700 nm, y a una velocidad de 480 nm min⁻¹. La celda del espectrofotómetro estuvo conectada mediante una bomba peristáltica a un recipiente también termostatizado, en el que se midieron el pH potenciométrico y la temperatura mediante un potenciómetro (DMS 716 Tinitro, Metrohm), electrodos combinados de vidrio (Ref. 6.0210, Metrohm) y una sonda Pt 200 (Ref. 6.1110, Metrohm). Este sistema lleva acoplado una autobureta que permite una adición precisa ($\pm 1 \mu\text{L}$) del indicador. El pH se midió en la escala de la concentración total del ión hidrógeno (pH_T), calibrando con disoluciones de HCl Tris/Tris en agua de mar sintética (Dickson, 1993).

El control de la temperatura en el sistema se realizó con un baño criostático (Ecoline RE-306, Lauda) conectado en paralelo a la celda de medida y al recipiente de valoración del potenciómetro. Para cada una de las fuerzas iónicas estudiadas, se registraron los espectros de absorción a 5°C, 10°C, 15°C,

significant efforts have been made over the past 15 years to establish methods for the determination of seawater pH based on sulfonphthalein dyes as indicators (Gabb and Latchem, 1968). This technique eliminates the need for a calibration prior to pH determination, but requires a characterization of the spectrophotometric and thermodynamic properties of the indicator before being used (Clayton and Byrne, 1993; Zhang and Byrne, 1996; Balderas-Hernández *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 2000). At present, the research interests are mainly centered on increasing the precision and speed of this method, applied primarily to oceanic waters (Byrne and Breland, 1989; Bellerby *et al.*, 1995; DeIValls, 1999; Tapp *et al.*, 2000), or on applying procedures for the determination of total alkalinity (Breland and Byrne, 1993; Clayton *et al.*, 1995; Roche and Millero, 1998; Yao and Byrne, 1998; Byrne *et al.*, 2002).

This method is well established for seawater, but its application to estuarine waters or pore waters of coastal sediments requires a better characterization of the influence of the ionic strength or the specific interactions of the dissociation constants of the indicators and their molar absorptivities.

In this study we have quantified the molar absorptivities of thymol blue in synthetic solutions of different ionic strength (from 0.1 to 0.7 M_w) in the temperature range of 5°C to 30°C. The experimental device used allows a direct comparison between the values obtained for spectrophotometric pH in estuarine samples and the potentiometric pH values in the total hydrogen ion concentration scale.

Material and methods

The absorption spectra of thymol blue were recorded using a double-beam spectrophotometer (Lambda 16, Perkin Elmer) and temperature-regulated flow cells of 10 cm optical path-length. Scans were done every nanometer in the wavelength range between 350 and 700 nm, at a speed of 480 nm min⁻¹. The spectrophotometer's cell is connected by a peristaltic pump to a temperature-regulated container, where potentiometric pH and temperature measurements were taken, using a pH meter (DMS 716 Tinitro, Metrohm), combined glass electrodes (Ref. 6.0210, Metrohm) and a Pt 200 probe (Ref. 6.1110, Metrohm). The system is equipped with an autoburette for the accurate addition ($\pm 1 \mu\text{L}$) of the indicator. The pH was measured in the total hydrogen ion concentration scale (pH_T), calibrating with Tris/Tris HCl solutions in synthetic seawater (Dickson, 1993).

Temperature in the system was controlled by a cryostatic bath (Ecoline RE-306, Lauda) connected in parallel to the measuring cell and the container of the pH meter. Absorption spectra were recorded at 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C and 35°C for each of the ionic strengths studied. To prevent condensation on the cell walls, a continuous synthetic air current was introduced inside the measuring compartment.

Additions were made of 2-mM thymol blue (ACS Merck, 934YW167449), whose stability was periodically confirmed.

20°C, 25°C, 30°C y 35°C. Para evitar la condensación en las paredes de la celda, se introdujo una corriente continua de aire sintético en el interior del compartimento de medida.

Las adiciones de azul de timol se efectuaron con una disolución 2 mM (ACS Merck, 934YW167449) cuya estabilidad fue comprobada periódicamente. El azul de timol presenta tres máximos de absorción dependiendo del estado de protonación del indicador (fig. 1). De ellos, los máximos correspondientes a las especies I^{2-} (596 nm) y HI^- (435 nm) son los que son útiles para la medición espectrofotométrica del pH en aguas naturales.

Con objeto de poder calcular las absorptividades molares, es conveniente obtener los espectros independientes de estas formas del indicador. Para ello, se prepararon disoluciones de distinta fuerza iónica y tamponadas a pHs a los cuales prácticamente la totalidad del indicador se encuentra como I^{2-} o como HI^- . En el caso de I^{2-} , se emplearon disoluciones a pH_T de 11.5 tamponadas con fosfato, y para HI^- a pH_T 5.0 tamponadas con acetato. En la tabla 1 se muestra la composición de estas disoluciones y la fuerza iónica total resultante.

En el caso de la medida potenciométrica de muestras de aguas naturales, la salinidad se determinó con un salinómetro de inducción (RS-10, Rosemount).

En todos los casos, se recirculaban por el sistema 60 mL de disolución. Cuando la medida potenciométrica del pH era estable, se procedía a ajustar el cero de la señal espectrofotométrica; a continuación se añadían cantidades conocidas del indicador, y se registraban los espectros correspondientes una vez que el pH_T era constante. En la determinación de las absorptividades molares se emplearon adiciones sucesivas de 25 μ L, mientras que para la medida del pH espectrofotométrico

Tabla 1. Composición y fuerza iónica total de las disoluciones tamponadas a pH 11.5 y 5.0.

Table 1. Composition and total ionic strength of the solutions buffered to pH 11.5 and 5.0.

Especie	Concentración (mol \times kg sw^{-1})			
$pH_T = 11.5$				
Cl^-	7.484×10^{-3}	1.828×10^{-1}	2.888×10^{-1}	5.674×10^{-1}
Na^+	6.018×10^{-2}	2.387×10^{-1}	3.468×10^{-1}	6.286×10^{-1}
PO_4^{3-}	1.936×10^{-2}	1.973×10^{-2}	1.963×10^{-2}	1.950×10^{-2}
HPO_4^{2-}	5.481×10^{-4}	9.189×10^{-5}	4.399×10^{-5}	3.762×10^{-5}
$pH_T = 5.0$				
Cl^-	6.593×10^{-2}	2.409×10^{-1}	4.315×10^{-1}	5.965×10^{-1}
Na^+	1.374×10^{-1}	3.149×10^{-1}	5.096×10^{-1}	6.943×10^{-1}
Ac^-	6.413×10^{-2}	6.372×10^{-2}	6.328×10^{-2}	6.288×10^{-2}
HAc	3.561×10^{-2}	3.538×10^{-2}	3.513×10^{-2}	3.491×10^{-2}
I_{media}	0.1405	0.3208	0.5203	0.7113

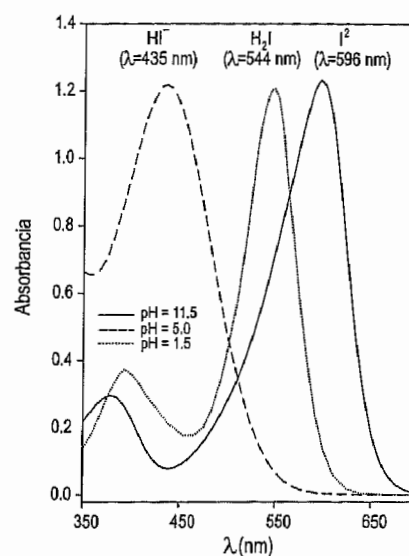


Figura 1. Máximo de absorción de las distintas especies protonadas del azul de timol.

Figure 1. Absorption maximum of the different protonated forms of thymol blue.

Thymol blue presents three absorption maxima depending on the indicator's state of protonation (fig. 1). Of these, the maxima corresponding to the I^{2-} (596 nm) and HI^- (435 nm) forms are useful in spectrophotometric measurements of pH in natural waters.

To be able to calculate molar absorptivities, it is convenient to obtain independent spectra of these forms of the indicator. For this, solutions of different ionic strength were prepared and buffered to pHs in which practically all the indicator occurs as I^{2-} or HI^- . Phosphate buffered solutions at pH_T 11.5 were used for I^{2-} and acetate buffered solutions at pH_T 5.0 were used for HI^- . Table 1 shows the composition of these solutions and the resulting total ionic strength.

For the potentiometric measurement of natural water samples, salinity was determined using an induction salinometer (RS-10, Rosemount).

In all cases, 60 mL of solution were recirculated in the system. When the potentiometric pH measurement was stable, the spectrophotometric signal was adjusted to zero. Known amounts of the indicator were then added and the corresponding spectra were recorded once pH_T was constant. Successive additions of 25 μ L were used in the determination of molar absorptivities, but for the spectrophotometric pH measurement in real samples, only three additions were made (100, 150 and 200 μ L).

Results and discussion

Like other sulfonphthalein indicators (e.g., bromocresol purple and phenol red), the second dissociation constant of thymol blue is used to measure pH in natural waters:

en muestras reales se efectuaron tres adiciones únicas (100, 150 y 200 µL).

Resultados y discusión

Al igual que otros indicadores sulfonaftaléinicos (e.g., púrpura de bromocresol, rojo de fenol), se emplea la segunda constante de disociación del azul de timol para la medida del pH en aguas naturales:

$$pH_E = pK_2 + \log \frac{[I^{2-}]}{[HI^-]}$$

donde pH_E es el pH espectrofotométrico. Se empleó la segunda constante de disociación del azul de timol propuesta por Zhang y Byrne (1996):

$$pK_2 = 4706 \frac{S}{T} + 26.3300 - 7.17218 \log T - 0.017316S$$

donde S es la salinidad y T la temperatura absoluta. Operando adecuadamente, se obtiene una expresión que permite el cálculo del pH a partir de las medidas experimentales de absorbancia a 596 y 435 nm, y de las absorptividades molares (Robert-Baldo *et al.*, 1985; Byrne, 1987; King y Kester, 1989; Clayton y Byrne, 1993; Zhang y Byrne, 1996):

$$pH_E = pK_2 + \log \frac{\frac{596A}{435A} + \frac{596\epsilon(HI^-)}{435\epsilon(HI^-)}}{\frac{596\epsilon(I^{2-})}{435\epsilon(HI^-)} + \frac{596A}{435A} \frac{435\epsilon(I^{2-})}{435\epsilon(HI^-)}}$$

Puesto que los valores de la constante de disociación del azul de timol se han calculado tomando como referencia disoluciones de HCl Tris/Tris en agua de mar sintética, los valores de pH_E son congruentes con los obtenidos potenciométricamente en la escala de la concentración total del ión hidrógeno. A diferencia de otros trabajos (e.g., Zhang y Byrne, 1996), las distintas absorptividades molares, $\lambda\epsilon$ ($H_nI^{(2-n)-}$), se han obtenido a partir de adiciones sucesivas de indicador. En la figura 2 se muestran los espectros de absorción obtenidos para distintas adiciones de azul de timol a pH_T de 11.5. Puede observarse la existencia de un máximo bien definido a 596 nm correspondiente a la especie I^{2-} del indicador. Asimismo, existe una elevada linealidad entre los datos de absorbancia a esta longitud de onda y la concentración del indicador en su forma I^{2-} , de cuya pendiente puede calcularse $596\epsilon(I^{2-})$. El espectro de absorción presenta una banda ancha, de forma que la absorbancia residual a la longitud de onda del máximo de absorbancia de la especie HI^- no es despreciable. Con objeto de corregir este efecto, es necesario calcular el coeficiente de extinción molar

$$pH_E = pK_2 + \log \frac{[I^{2-}]}{[HI^-]}$$

where pH_E is the spectrophotometric pH. The second dissociation constant of thymol blue proposed by Zhang and Byrne (1996) was used:

$$pK_2 = 4706 \frac{S}{T} + 26.3300 - 7.17218 \log T - 0.017316S$$

where S is salinity and T is absolute temperature. The correct operation gives an expression that allows the calculation of pH based on experimental absorbance measurements at 596 and 435 nm, and of molar absorptivities (Robert-Baldo *et al.*, 1985; Byrne, 1987; King and Kester, 1989; Clayton and Byrne, 1993; Zhang and Byrne, 1996):

$$pH_E = pK_2 + \log \frac{\frac{596A}{435A} + \frac{596\epsilon(HI^-)}{435\epsilon(HI^-)}}{\frac{596\epsilon(I^{2-})}{435\epsilon(HI^-)} + \frac{596A}{435A} \frac{435\epsilon(I^{2-})}{435\epsilon(HI^-)}}$$

Since the values of the dissociation constant of thymol blue were calculated taking as reference Tris/Tris HCl solutions in synthetic seawater, the pH_E values are consistent with those obtained potentiometrically in the total hydrogen ion concentration scale. Unlike other studies (e.g., Zhang and Byrne, 1996), the different molar absorptivities, $\lambda\epsilon$ ($H_nI^{(2-n)-}$), were obtained from successive additions of the indicator. The absorption spectra obtained for the different additions of thymol blue at pH_T 11.5 are shown in figure 2. A well-defined maximum can be observed at 596 nm corresponding to the I^{2-} form of the indicator. Likewise, high linearity exists between the absorbance data at this wavelength and the concentration of the indicator in its I^{2-} form, and $596\epsilon(I^{2-})$ can be calculated from the slope. The absorption spectrum presents a wide band, so the residual absorbance at the wavelength of maximum absorbance of the HI^- form is not insignificant. To correct this effect it is necessary to calculate the molar extinction coefficient of the I^{2-} form at 435 nm by linear regression of the absorbance at this wavelength and the concentration of I^{2-} .

Similarly, $435\epsilon(HI^-)$ can be obtained through additions of the indicator at pH_T 5.0 (fig. 3). In this case, a well-defined absorbance maximum is observed at 435 nm, which is linearly related to the concentration of the indicator, and a residual absorbance is observed at 596 nm, generally lower than 0.008 units. Hence, a greater degree of uncertainty is associated with the quantification of $596\epsilon(HI^-)$.

Molar absorptivities showed a clear dependence on temperature in the different ionic strengths studied. The molar

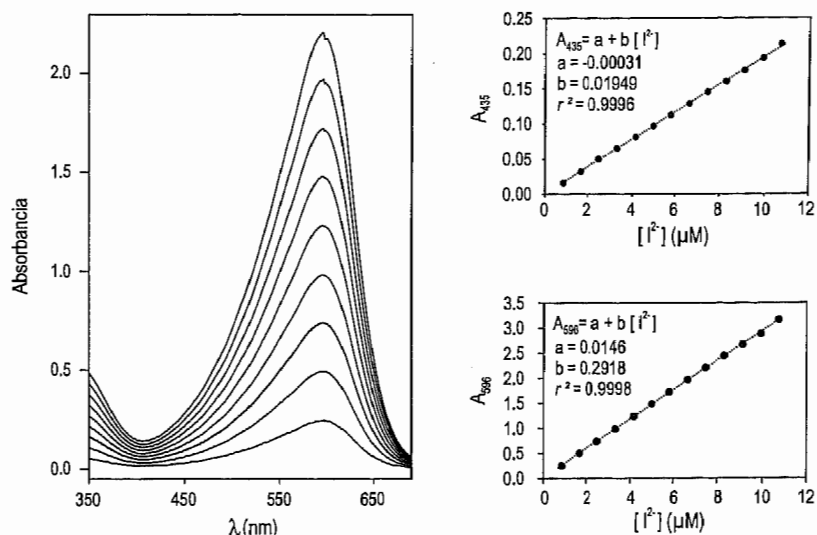


Figura 2. Espectros de absorción de la forma I^{2-} del indicador, obtenidos a pH 11.5 tras adiciones sucesivas de 25 μL de azul de timol 2 mM a 60 mL de disolución. Se muestran las regresiones lineales de la concentración del indicador con la absorbancia para la posición de su máximo (596 nm) y a la longitud de onda del máximo de la especie HI^- (435 nm).

Figure 2. Absorption spectra of the I^{2-} form of the indicator obtained at pH 11.5 after successive 25-mL additions of 2-mM thymol blue in a 60-mL solution. Linear regressions are shown of the indicator concentration with absorbance for the position of its maximum (596 nm) and at the wavelength of the maximum of the HI^- form (435 nm).

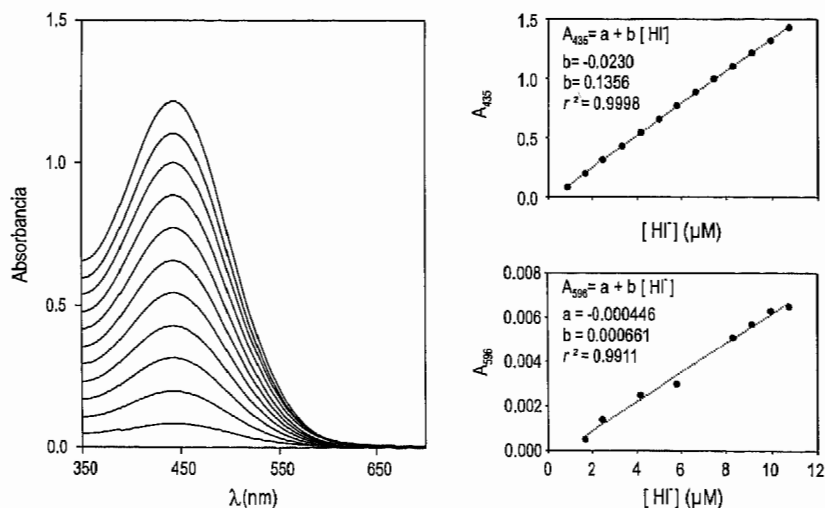


Figura 3. Espectros de absorción de la forma HI^- del indicador obtenidos a pH 5.0 tras adiciones sucesivas de 25 μL de azul de timol 2 mM a 60 mL de disolución. Se muestran las regresiones lineales de la concentración del indicador con la absorbancia para la posición de su máximo (435 nm) y a la longitud de onda del máximo de la especie I^{2-} (596 nm).

Figure 3. Absorption spectra of the HI^- form of the indicator obtained at pH 5.0 after successive 25-mL additions of 2-mM thymol blue in a 60-mL solution. Linear regressions are shown of the indicator concentration with absorbance for the position of its maximum (435 nm) and at the wavelength of the maximum of the I^{2-} form (596 nm).

de la especie I^{2-} a 435 nm por regresión lineal de la absorbancia a esta longitud de onda y la concentración de I^{2-} .

Análogamente, ${}_{435}\epsilon (HI^-)$ se puede obtener mediante adiciones de indicador a pH_7 de 5.0 (fig. 3). En este caso se observa un máximo de absorbancia bien definido a 435 nm que guarda una relación lineal con la concentración de indicador, así como

absorptivities that correspond to the absorption maxima, ${}_{596}\epsilon (I^{2-})$ and ${}_{435}\epsilon (HI^-)$, presented a linear decrease with temperature (fig. 4), whereas the residual molar absorptivities, ${}_{435}\epsilon (HI^-)$ and ${}_{596}\epsilon (HI^-)$, showed a linear increase with temperature. Descriptions are found in the literature of the dependence on temperature of certain relations between molar

una absorbancia residual a 596 nm, generalmente inferior a 0.008 unidades. Por esta razón, la cuantificación de $_{596}\epsilon$ (HI^-) lleva asociado un mayor grado de incertidumbre.

Se ha encontrado una clara dependencia de las absorptividades molares de la temperatura para las distintas fuerzas iónicas estudiadas. Para las absorptividades molares que corresponden a los máximos de absorción, $_{596}\epsilon$ (I^{2-}) y $_{435}\epsilon$ (HI^-), existe una disminución lineal con la temperatura (fig. 4). Por el contrario, las absorptividades molares residuales, $_{435}\epsilon$ (HI^-) y $_{596}\epsilon$ (HI^-), experimentan un aumento lineal con la temperatura. En la bibliografía se suele describir la dependencia de la temperatura de determinadas relaciones entre absorptividades molares (Zhang y Byrne, 1996), que generalmente presentan aumentos o disminuciones exponenciales. En este sentido, las variaciones con la temperatura de la relación entre las absorptividades molares que se han obtenido son muy similares a las propuestas por estos autores. En la tabla 2 se recogen los parámetros de ajuste para las regresiones lineales de las absorptividades molares con la temperatura a distintas fuerzas iónicas. En todos los casos, los coeficientes de regresión obtenidos son superiores a 0.9.

Para la base de datos completa, no se ha observado una tendencia bien marcada de las absorptividades molares con la fuerza iónica. Solamente se ha apreciado una variación con la salinidad en $_{596}\epsilon$ (I^{2-}). En este caso, los parámetros de ajuste con la temperatura muestran a su vez una dependencia lineal con la fuerza iónica (fig. 5).

En la tabla 3 se recogen las expresiones propuestas para las absorptividades molares del azul de timol en función de la temperatura y salinidad. Para aquellas absorptividades molares que no presentan tendencias definidas con la salinidad, se ha incluido el valor medio de las distintas fuerzas iónicas ensayadas.

La consistencia de los resultados obtenidos se ha comprobado mediante la comparación del pH_E y el pH_T para distintas muestras de aguas naturales. En la figura 6 se muestra el espectro de absorción del azul de timol para una muestra de agua estuárica. A partir de la relación entre los máximos después de cada adición ($_{596}A/_{435}A$) puede calcularse pH_E .

La adición del indicador produce una variación del pH inicial de la muestra. En la figura 6 se han representado para dos muestras estuáricas, la variación del pH_E con el volumen de indicador añadido. Ya que el pH de la disolución de azul de timol es próximo a 7.95, puede apreciarse como existe un aumento o disminución en función del pH inicial de la muestra. En las condiciones utilizadas, las variaciones del pH_E con el volumen de indicador son lineales, y el cálculo del pH_E inicial de la muestra puede obtenerse por interpolación lineal.

El método puede considerarse relativamente preciso (± 0.0005 unidades), pero se han obtenido diferencias apreciables con los valores de pH_T , sobre todo a bajas salinidades y pH inferiores a 8. En la figura 7 se observa como existe una cierta dispersión de los datos en torno a la recta de regresión entre las dos formas de medir experimentalmente el pH, en parte debida a la menor precisión de las medidas de pH_T . En este sentido,

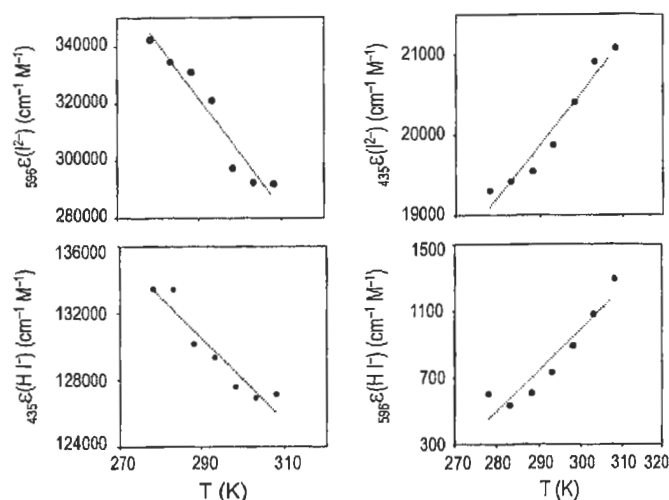


Figura 4. Dependencia de los coeficientes de extinción molar del azul de timol de la temperatura (fuerza iónica 0.5207 M_w).

Figure 4. Temperature dependence of the molar extinction coefficients of thymol blue (ionic strength 0.5207 M_w).

absorptivities (Zhang and Byrne, 1996), which generally present exponential increases or decreases. In this sense, the variations with temperature of the relation between the molar absorptivities that have been obtained are very similar to those proposed by these authors. The fit parameters for the linear regressions of molar absorptivities with temperature at different ionic strengths are given in table 2. In all cases, the regression coefficients obtained are greater than 0.9.

For the complete data base, a well-defined tendency was not found for molar absorptivities with ionic strength. Only for $_{596}\epsilon$ (I^{2-}) was a variation observed with salinity. In this case, the fit parameters with temperature show a linear dependence on ionic strength (fig. 5).

Table 3 shows the expressions proposed for the molar absorptivities of thymol blue in terms of temperature and salinity. For those molar absorptivities that do not present a defined tendency with salinity, the mean value of the different ionic strengths studied has been included.

The consistency of the results obtained was determined by comparing pH_E and pH_T for different natural water samples. Figure 6 shows the absorption spectrum of thymol blue for a sample of estuarine water. The relation between the maxima after each addition ($_{596}A/_{435}A$) can be used to calculate pH_E .

The addition of the indicator produces a variation of the sample's initial pH. The variation in pH_E with the volume of indicator added is shown in figure 6 for two estuarine samples. Since the thymol blue solution has a pH of about 7.95, an increase or decrease in terms of the initial pH can be appreciated. With the conditions used, the variations in pH_E with the indicator volume are linear and the sample's initial pH_E can be calculated by linear interpolation.

The method can be considered relatively accurate (± 0.0005 units), but significant differences were obtained with the pH_T values, especially at low salinities and pHs below 8. Figure 7

Tabla 2. Parámetros de ajuste para la regresión lineal de los coeficientes de absorción molar del azul de timol con la temperatura (a, ordenada en el origen; b, pendiente).

Table 2. Fit parameters for the linear regression of the molar absorption coefficients of thymol blue with temperature (a, ordinate at the origin; b, slope).

Coefficiente de extinción	a	b	r ²	Fuerza iónica
596ε (I ²⁻)	922846	-2026.46	0.946	0.1327
435ε (HI ⁻)	204877	-225.508	0.840	0.1483
596ε (HI ⁻)	-6747.41	26.0690	0.884	0.1483
435ε (I ²⁻)	2773.83	61.5729	0.997	0.1327
596ε (I ²⁻)	868918	-1854.02	0.918	0.3164
435ε (HI ⁻)	281113	-494.552	0.932	0.3252
596ε (HI ⁻)	-6207.48	23.9570	0.859	0.3252
435ε (I ²⁻)	1555.20	65.3383	0.810	0.3164
596ε (I ²⁻)	879747	-1923.75	0.934	0.5199
435ε (HI ⁻)	201900	-246.190	0.905	0.5207
596ε (HI ⁻)	-6406.30	24.6507	0.888	0.5207
435ε (I ²⁻)	843.022	65.6140	0.950	0.5199
596ε (I ²⁻)	768059	-1561.40	0.909	0.7226
435ε (HI ⁻)	246841	-381.509	0.809	0.7000
596ε (HI ⁻)	-4500.25	18.1400	0.963	0.7000
435ε (I ²⁻)	-28167.8	163.515	0.944	0.7226

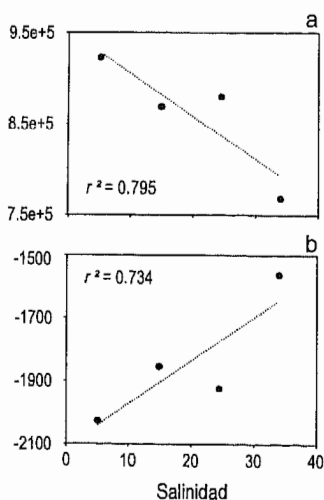


Figura 5. Dependencia de los parámetros de ajuste lineal del coeficiente de extinción molar de la especie I²⁻ a 596 nm de la salinidad: (a) ordenada en el origen; (b) pendiente.

Figure 5. Salinity dependence of the linear fit parameters of the molar extinction coefficient of the I²⁻ form at 596 nm: (a) ordinate at the origin; (b) slope.

shows some scattering of the data relative to the regression line of the two forms of experimentally measuring pH, in part because of the less precise pH_T measurements; however, it is necessary to consider that pH measurements in the total hydrogen ion concentration scale are made after calibrating the electrodes with an ionic strength solution very similar to seawater. On the other hand, the dependence of the second constant of thymol blue is only known in the salinity range of 30 to 40 (Zhang and Byrne, 1996). Even though it can be inferred, from the expression proposed by these authors, that the effect of temperature is around ten times more important than that of salinity for a similar range of variation, this tendency has not

Tabla 3. Expresiones propuestas para la dependencia de los coeficientes de extinción molar del azul de timol de la temperatura y la salinidad.

Table 3. Expressions proposed for temperature and salinity dependence of the molar extinction coefficients of thymol blue.

596ε (I ²⁻)	(951610.9 - 4687.547 S) + (-2109.370 + 13.695 S) T
435ε (HI ⁻)	233683.3 - 336.940 T
596ε (HI ⁻)	-6453.735 + 24.892 T
435ε (I ²⁻)	1724.017 + 64.175 T

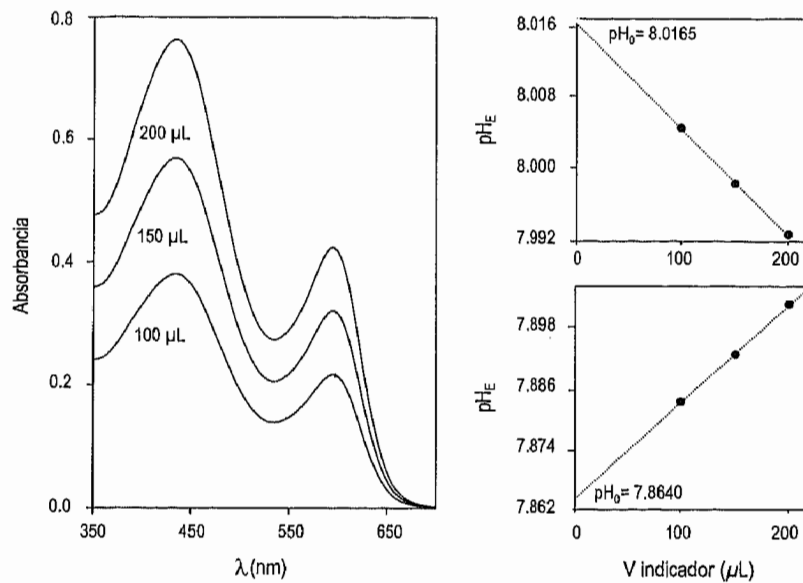


Figura 6. Espectro de absorción de una muestra de 60 mL de agua estuárica ($S = 25.023$, $T = 20^{\circ}\text{C}$) tras adiciones de 100, 150 y 200 μL de azul de timol 2 mM. A la derecha, se muestran dos ejemplos típicos de cálculo de pH_E inicial de las muestras a partir de las absorbancias a 596 y 435 nm obtenidas después de cada adición de indicador. **Figure 6.** Absorption spectrum of a 60-mL sample of estuarine water ($S = 25.023$, $T = 20^{\circ}\text{C}$) after additions of 100, 150 and 200 μL of 2-mM thymol blue. The right-hand plots correspond to two typical examples of the calculation of the initial pH_E of the samples based on absorbances at 596 and 435 nm obtained after each addition of the indicator.

debe considerarse que la medida del pH en la escala total del ión hidrógeno se realiza después de calibrar los electrodos con una disolución de fuerza iónica muy próxima al agua de mar. Por otra parte, sólo se conoce la dependencia de la segunda constante del azul de timol en el intervalo de 30 a 40 de salinidad (Zhang y Byrne, 1996). Aunque de la expresión propuesta por estos autores puede deducirse que el efecto de la temperatura es del orden de diez veces más importante que el de la salinidad para un intervalo de variación similar, esta tendencia no ha sido comprobada experimentalmente para salinidades bajas. En la figura 8 se muestra, para distintas condiciones de salinidad y temperatura, la variación del pH_E con la relación $_{596}A/_{435}A$, que constituye la variable experimental. Puede observarse cómo la utilización de indicador es especialmente recomendable para pHs relativamente elevados, próximos o superiores a 8. A pHs menores, existen cambios importantes del pH_E cuando varía la relación entre las absorbancias en los máximos.

Consideraciones finales

La medida del pH espectrofotométrico puede considerarse una técnica precisa y sujeta a un menor número de inconvenientes para la medida del pH en aguas oceánicas que las técnicas potenciométricas (Culberson, 1981; Dickson, 1993; Clayton *et al.*, 1995; Murphy, 1996; French *et al.*, 2002). No obstante, existen pocos estudios que hayan abordado la influencia de la salinidad sobre las absortividades molares y/o la constante de disociación del azul de timol en aguas estuáricas.

been experimentally proven for low salinities. The variation in pH_E relative to $_{596}A/_{435}A$, which constitutes the experimental variable, is shown in figure 8 for different salinity and temperature conditions. The use of the indicator is found to be particularly recommendable for relatively high pHs (around or above 8). At lower pHs, significant changes in pH_E occur when the relation between maximum absorbances varies.

Final considerations

The measurement of spectrophotometric pH can be considered an accurate technique and involves fewer inconveniences for the measurement of pH in oceanic waters than the potentiometric

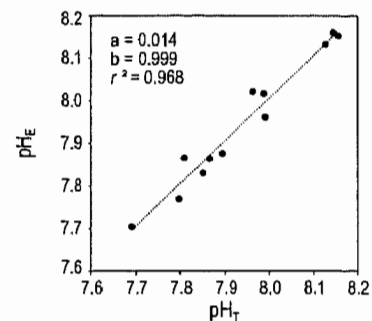


Figura 7. Correlación lineal entre los valores del pH espectrofotométrico (pH_E) y pH potenciométrico (pH_T) para un conjunto de muestras de aguas estuáricas. **Figure 7.** Linear correlation between the spectrophotometric pH (pH_E) and potentiometric pH (pH_T) values for a set of estuarine water samples.

Para la determinación de las absorptividades molares se empleó un diseño experimental basado en adiciones sucesivas en medios adecuadamente tamponados, a diferencia de otros autores que utilizan adiciones para el control del pH hasta conseguir una absorbancia no variable sobre una cantidad fija de indicador en la muestra (Zhang y Byrne, 1996). La linealidad encontrada entre las absorbancias en los máximos y la concentración del indicador ha sido, en todos los casos, muy elevada. Asimismo, se proponen expresiones de tipo lineal para la dependencia de las absorptividades molares de la temperatura, así como con de la salinidad para ${}_{596}\epsilon$ (I^{2-}).

Otra cuestión pendiente, que permitiría una mayor generalización de las medidas espectrofotométricas del pH, es la estandarización de los colorantes usados, con objeto de evitar tener que caracterizarlos de forma previa a su utilización.

Agradecimientos

Los autores agradecen la inestimable ayuda prestada por Teodora Ortega en la discusión de los resultados. Este trabajo ha sido financiado por la CICYT mediante el proyecto MAR97-0187.

Referencias

- Balderas-Hernández, P., Ramírez, M.T., Rojas-Hernández, A. and Gutiérrez, A. (1998). Determination of pKa's for thymol blue in aqueous medium: Evidence of dimer formation. *Talanta*, 46: 1439–1452.
- Bjellerby, R.G.J., Turner, D.R., Geoffrey, E.M. and Worsfold, P.J. (1995). Shipboard flow injection determination of sea water pH with spectrophotometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 309: 259–270.
- Breland, J.A. and Byrne, R.H. (1993). Spectrophotometric procedures for determination of sea water alkalinity using bromocresol green. *Deep-Sea Res.*, 40(3): 629–641.
- Byrne, R.H. (1987). Standardization of standard buffers by visible spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 59: 1479–1481.
- Byrne, R.H. and Breland, J.A. (1989). High precision multiwavelength pH determinations in seawater using cresol red. *Deep-Sea Res.*, 36 (5): 803–810.
- Byrne, R.H., Liu, X., Kaltenbacher, E.A. and Sell, K. (2002). Spectrophotometric measurement of total inorganic carbon in aqueous solutions using a liquid core waveguide. *Anal. Chim. Acta*, 451: 221–229.
- Clayton, T.D. and Byrne, R.H. (1993). Spectrophotometric seawater pH measurements: Total hydrogenion concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep-Sea Res.*, 40: 2115–2129.
- Clayton, T.D., Byrne, R.H., Breland, J.A., Feely, R.A., Millero, F.J., Campbell, D.M., Murphy, P.P. and Lamb, M.F. (1995). The role of pH measurements in modern oceanic CO₂-system characterizations: Precision and thermodynamic consistency. Pergamon, 0967-0645: 00028-3.
- Culberson, C.H. (1981). Direct potentiometry. In: M. Whitfield and J. Jäger (eds.), *Marine Electrochemistry*. John Wiley, Boca Raton, Florida, pp. 187–261.
- DelValls, T.A. (1999). Underway pH measurements in upwelling conditions: The California Current. *Mar. Chem.*, 25(3): 345–365.

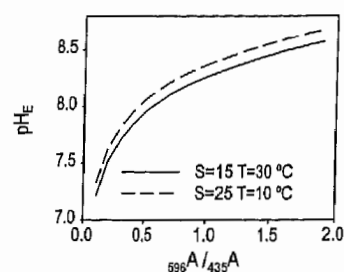


Figura 8. Variación del pH espectrofotométrico con el cociente de absorbancias a 596 y 435 nm, a dos salinidades y temperaturas diferentes. Se emplearon los coeficientes de extinción molar obtenidos en este trabajo y el valor de la segunda constante de disociación propuesto por Zhang y Byrne (1996).

Figure 8. Variation of spectrophotometric pH with the absorbance quotient at 596 and 435 nm at two different salinities and temperatures. The molar extinction coefficients obtained in this study and the value of the second dissociation constant proposed by Zhang and Byrne (1996) were used.

metric methods (Culberson, 1981; Dickson, 1993; Clayton *et al.*, 1995; Murphy, 1996; French *et al.*, 2002). Nevertheless, few studies have been conducted on the influence of salinity on molar absorptivities and/or the dissociation constant of thymol blue in estuarine waters.

An experimental design based on successive additions in appropriately buffered solutions has been used to determine molar absorptivities, as opposed to other authors who use additions to control pH until obtaining a non-variable absorbance on a fixed amount of indicator in the sample (Zhang and Byrne, 1996). The linearity found between absorbances at their maxima and the concentration of the indicator was, in all cases, very high. Linear expressions are proposed for the dependence of molar absorptivities on temperature, as well as on salinity for ${}_{596}\epsilon$ (I^{2-}).

A matter that must still be addressed, which will allow a greater generalization of the spectrophotometric pH measurements, is the standardization of dyes used, in order to eliminate the need of having to characterize them before being used.

Acknowledgements

The authors thank Teodora Ortega for her valuable help in the discussion of the results. This work was financed by CICYT through project MAR97-0187.

English translation by Christine Harris.

- Dickson, A.G. (1981). An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data. *Deep-Sea Res.*, 28: 609–623.
- Dickson, A.G. (1993). The measurement of sea water pH. *Mar. Chem.*, 44: 131–142.
- French, C.R., Carr, J.J., Eleanor, D.M., Eidson, L.A.K., Reynolds, J.C. and DeGrandpre, M.D. (2002). Spectrophotometric pH measurements of freshwater. *Anal. Chim. Acta*, 453: 13–20.

- Gabb, M.H. and Latchem, W.E. (1968). In: P. Kogan (ed.), *A Handbook of Laboratory Solutions*. Chemical Publ. Co., New York, pp. 28–35.
- Hopkins, A.E., Sell, K.S., Soli, A.L. and Byrne, R.H. (2000). *In situ* spectrophotometric pH measurements: The effect of pressure on thymol blue protonation and absorbance characteristics. *Mar. Chem.*, 71: 103–109.
- King, D.W. and Kester, D.R. (1989). Determination of sea water pH from 1.5 to 8.5 using colorimetric indicators. *Mar. Chem.*, 26: 5–20.
- Murphy, P.P. (1996). The carbonate system in seawater: Laboratory and field studies. Ph.D. thesis, University of Washington, 288 pp.
- Robert-Baldo, G., Morris, M.J. and Byrne, R.H. (1985). Spectrophotometric determination of seawater pH using phenol red. *Anal. Chem.*, 57: 2564–2567.
- Roche, M.P. and Millero, F.J. (1998). Measurement of total alkalinity of surface waters using a continuous flowing spectrophotometric technique. *Mar. Chem.*, 60: 85–94.
- Tapp, M., Hunter, K., Curric, K. and Mackaskill, B. (2000). Apparatus for continuous-flow underway spectrophotometric measurement of surface water pH. *Mar. Chem.*, 72: 193–202.
- Yao, W. and Byrne, R.H. (1998). Simplified seawater alkalinity analysis: Use of linear array spectrometers. *Deep-Sea Res. I*, 45: 1383–1392.
- Zhang, H. and Byrne, R.H. (1996). Spectrophotometric pH measurements of surface seawater at *in situ* conditions: Absorbance and protonation behavior of thymol blue. *Mar. Chem.*, 52: 17–25.