

UV-LÁTHATÓ ABSZORPCIÓS SPEKTROFOTOMETRIA

A GYAKORLAT CÉLJA: AZ UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése és a Lambert-Beer törvény alkalmazása. Szalicilsav meghatározása egy vizes oldatban kalibrációs egyenes alapján.

A MÉRÉSI MÓDSZER ALAPELVEI

Az ultraibolya (UV, $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$) ill. látható (VIS, $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$) fény elnyelésekor (abszorpciójakor) a molekulák elektroneloszlása megváltozik: kötő, lazító vagy nemkötő elektronjaik kisebb energiájú pályákról nagyobb energiájúakra ugranak át, azaz gerjesztődnek. Az ilyen elektronátmenetek tanulmányozásával foglalkozó spektroszkópiai módszert elektrongerjesztési (vagy elektron-) spektroszkópiának is nevezik. Egy molekula azon részleteit, amelyekben az elektronátmenetek létrejönnek (azaz elnyelik a fényt), *kromoforoknak* nevezzük. Azt az energiatartományt, amelynél egy adott kromofor elnyel, elnyelési sávnak nevezzük, ennek helye a spektrumban (vagyis a hozzá tartozó elektronátmenet energiája) elsősorban a kromofor anyagi minőségétől függ, de azt a kromoforral kölcsönhatásban levő egyéb csoportok is befolyásolják.

Amikor egy anyag vizes oldatának fényelnyelését ábrázoljuk a besugárzó fény energiájának (hullámhosszának) függvényében, az ún. *abszorpciós spektrumot* kapjuk. Az abszorpciós spektrum mind minőségi, mind mennyiségi információkat hordoz, emiatt az analitikai kémia egyik leggyakrabban használt módszere. Ha besugárzunk egy oldatot egy I_0 intenzitású, adott hullámhosszágú (monokromatikus) fénysugárral, annak intenzitása a fény abszorpciója miatt lecsökken I -re. A fényelnyelést egy mértékegység nélküli mennyiség, az *abszorbancia* jellemzi, ami definíció szerint

$$A = \lg \frac{I_0}{I}$$

Szokás még a fényelnyelést a *transzmittanciával* (más szóval transzmisszióval, T) is jellemezni, amely a minta fényáteresztő képességére jellemző, és az átengedett valamint a beeső fény intenzitásának hányadosaként szokás kifejezni (egyres esetekben százalékban):

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Tekintsünk egy olyan oldatot, amelyben csak *egyfajta* fényt abszorbeáló anyag van jelen. Az anyag koncentrációja (c) és az adott λ hullámhosszúságú sugárzásra mért abszorbancia (A_λ) közötti összefüggést a *Lambert-Beer törvény* írja le, amely szerint

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

ahol l a *rétegvastagság* (ez a mérések többségében 1 cm), és ε_λ az adott kromoforra jellemző, az alkalmazott hullámhossztól függő mennyiség, az ún. *moláris abszorbancia*, az egységnyi (1 mol/L) koncentrációjú oldat egységnyi (1 cm) rétegvastagságnál mért abszorbanciája. A Lambert-Beer törvény érvényességi határain belül az abszorbancia *additív tulajdonság*, amely a vizsgált hullámhossznál az egymás mellett előforduló komponensek abszorbanciáinak összegeként adódik. Tehát egy n darab fényelnyelő komponenst tartalmazó oldatra

$$A_\lambda = l \cdot \sum_{i=1}^n \varepsilon_{\lambda_i} \cdot c_i$$

ahol ε_{λ_i} az i -edik, c_i koncentrációjú komponens moláris abszorbanciája az adott hullámhossznál. Abszorbanciamérés alapján, a moláris abszorbancia és a rétegvastagság ismeretében a Lambert-Beer törvény alkalmazásával a kromofor koncentrációja közvetlenül is meghatározható. Fontos megemlíteni, hogy a törvény kizárólag híg oldatokra ($c < 10^{-3}$ mol/L) érvényes, töményebb oldatokra csak módosításokkal alkalmazható (pl. a törésmutató változását figyelembe kell venni). Eltéréseket okozhatnak még a törvénytől a kromofor különböző kémiai reakciói (pl. önasszociáció, protonálódási vagy komplexképződési egyensúlyok), valamint az oldószercsere is.

Az abszorpciós spektrofotometria gyakorlata. Az abszorpciós spektrofotométerek legfontosabb alkotóeleme egy olyan fényforrás, amely a teljes mérési (UV vagy VIS) hullámhossztartományt lefedő folytonos („fehér” fényt) sugároz ki. Ezt a fényt alkalmas optikai eszközzel (pl. prizma vagy rács segítségével) összetevőire bontjuk, majd egy kiválasztott hullámhosszúságú nyalábját a mintatartóban elhelyezett mintára irányítjuk. A mintaoldatot üvegből, műanyagból vagy kvarcból készült edényben (*küvetában*) helyezzük el. Az UV tartományba eső spektrumok felvételéhez szükséges a kvarcküvetta alkalmazása, mert a más anyagból készült küveták maguk is elnyelik az UV-fényt. A küvetán keresztülhaladó fénysugarat egy detektorra (fotocella, fotoelektron-sokszorozó) irányítjuk, amely megméri annak intenzitását.

Az abszorpciós spektrofotometriás mérés során a beeső fény intenzitását az oldatban való abszorpció mellett a szóródás és visszaverődés is csökkenti. Utóbbiaknak a mért jelhez való hozzájárulását a mérés pontossága érdekében állandó értéken kell tartani vagy elhanyagolhatóvá kell tenni. Ezért pl. a mérés során ügyelni kell arra, hogy a küvetta azon oldalai, amelyen a méréshez használt fénysugár keresztülhalad, a lehető legtisztábbak legyenek. További hibaforrás, ha az optikai felületnek a beeső fénysugárral bezárt szöge mintáról mintára változik (nem áll függőlegesen a küvetta), ami változó mértékű visszaverődést és ezzel a beeső fénysugár intenzitásában ingadozásokat okoz. Általában elkerülendő még az is, hogy a mérendő oldat csapadékos legyen vagy kolloid részecskék legyenek benne, ez ugyanis úgynevezett *alapvonaeltolódást* (az abszorpciós spektrum konstans értékkel való pozitív irányú eltolódását) eredményezi. Bármely hullámhosszon is hajtjuk végre a mérést, nem várható, hogy ott kizárólag a célmolekula kromoforjának fényelnyelése okozzon csökkenést a beeső fény intenzitásában: az oldószernak és magának a küvetának is van valamennyi „saját” elnyelése. Az ezek által okozott fényvesztéséget mindig korrekcióba kell venni. Ezt egy úgynevezett *vakoldat* segítségével tesszük meg, amelyben a kromoforon kívül minden, a mérendő mintában is jelenlevő komponens megtalálható. Ha a vakoldat fényelnyelését regisztráljuk és a mintaoldat fényelnyeléséből azt levonjuk, akkor az így kapott (különbségi) spektrum már tisztán csak a kromoforra lesz jellemző, és a kapott (ún. háttérkorrigált) abszorbancia pedig csak a kromofor koncentrációjától fog függeni.

Az abszorpciós spektrofotometriás mérések során a mintába belépő és abból kilépő fény intenzitásának arányát mérjük. Kis abszorbanciáknál a belépő és az áteresztett fény intenzitása közötti kis különbség miatt ($I_0 \approx I$), míg nagy abszorbanciáknál az áteresztett fény intenzitásának kicsiny volta miatt ($I_0 \approx 0$) jelentős lehet a mért abszorbancia értékek pontatlansága. Korábban, a mechanikus felépítésű spektrofotométerek korában ezért elfogadott szabály volt, hogy a spektrofotometria legmegbízhatóbban (kb. 1 relatív % pontossággal) akkor használható, ha a mért abszorbanciák 0,3 és 0,6 érték közé esnek. A modernebb (elektromos/digitális) spektrofotométereknél ugyanez a $0,05 \leq A \leq 2$ tartományban is elérhető. Mindezek miatt tanácsos méréseinket a koncentrációtartomány, a méréshez használt hullámhossz vagy a rétegvastagság alkalmas megválasztásával úgy megtervezni, hogy a mért abszorbanciaadatok az optimális tartományba essenek.

Mennyiségi elemzés. UV-látható spektrofotometria alkalmazásával csak olyan anyagok mérhetők, amelyek a $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ tartományban fényt nyelnek el. Ha a meghatározandó anyag nem is nyel el fényt, az valamilyen szelektív reakcióval általában fényelnyelővé tehető. A $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ aquoionok csak nagyon gyenge fényelnyelést mutatnak a látható hullámhossztartományban, de megfelelően megválasztott komplexképzővel, pl. szalicilát ionnal, színessé tehetőek. Az ismeretlen oldat koncentrációjának pontos meghatározásához először mindig ki kell választani egy olyan hullámhosszat, amelyen a mintának értékelhető fényelnyelése van. Ezt a hullámhosszat általában úgy választjuk meg, hogy az a célmolekula spektrumának valamelyik *abszorpciós maximumában* legyen. Ezt követően egy kalibráló oldatsorozat (ennek egyes tagjai pontosan ismert koncentrációban tartalmazzák a mérendő vegyületet) segítségével meghatározzuk az abszorbancia

koncentrációfüggését. Ennek eredményeként előáll a kalibrációs görbe, amely alakja egyenes, ameddig a rendszer követi a Lambert-Beer törvényt. Ezt követően az analizálandó oldat mérését teljesen azonos módon elvégezzük, majd a kalibrációs görbéről (egyenesről) egyszerűen leolvasható az ismeretlen oldat koncentrációja. Az eljárás pontossága numerikus módszerek számítógépes alkalmazásával (lineáris regresszió) nagymértékben növelhető. A meghatározás pontosságát csökkenti, ha a kalibráló- és mintaoldatok háttérabszorbanciája jelentősen eltér, vagy mátrixhatás lép fel. Ilyen esetekben a standard addíciós módszert alkalmazhatjuk.

A szalicilsav ($C_6H_4OHCOOH$, $M_r=138,1$) a Fe^{3+} ionokkal a pH-tól és a komponensek arányától függően különböző összetételű komplexeket képez. Fe(III) ionok feleslegében például kizárólag egy ibolyaszínű FeL^+ részecske lesz jelen az oldatban, aminek a 400 – 600 nm tartományban van egy elnyelési maximuma. Ebben a hullámhossztartományban sem a $Fe(H_2O)_6^{3+}$ aquoionnak, sem a szalicilsavnak nincs jelentős fényelnyelése. Az általunk használt körülmények között az abszorpciós spektrum maximumán mért fényelnyelés 5-80 mg/dm³ szalicilsav koncentrációtartományban követi a Lambert-Beer törvényt. A Fe(III) és a szalicilsav közötti reakció nem pillanatszerű, emiatt a reagensek elegyítését követően legalább 15 percig várni kell, hogy az oldat színe állandósuljon (ezt követően az mintegy 4 órán át nem változik). A szalicilsav vízben kevéssé oldódik, ezért a szalicilsav törzsoldatot 1:10 arányú etanol – víz elegyben készítjük el. A tapasztalat szerint az ilyen mértékű oldószercsere a képződő komplex abszorpciós spektrumát nem befolyásolja.

SZÜKSÉGES ANYAGOK, ESZKÖZÖK ÉS MŰSZEREK

1,00 mg/cm³ koncentrációjú standard szalicilsav oldat 1:10 MeOH-H₂O elegyben
kb. 1 m/v%-os FeCl₃ oldat (sósavra nézve 0,1 M oldat)
desztillált víz

11 db 100,00 cm³-es mérőlombik (a kalibráló oldatsorozathoz és az ismeretlenhez)
1 db 10 cm³-es osztott pipetta (a kalibráló oldatsorozat készítéséhez)
1 db 20,00 cm³-es hasas pipetta (az ismeretlen oldat kiméréséhez)
1 db 5 cm³-es hasas pipetta (a FeCl₃ reagens kiméréséhez)
10 db összemért, 1 cm-es műanyag küvetta küvettatartóban elhelyezve
3 db 50 cm³-es főzőpohár (a pipettázás segítésére)
1 db üvegedény (a követték öblítéséhez)
1 db pipettázó labda
1 db üvegtölcsér
papírtörölő

JENWAY 6105 vagy Spektromom 195D típusú UV-Vis spektrofotométer

AZ ELVÉGZENDŐ FELADATOK ÉS A FELHASZNÁLANDÓ MŰSZEREK LEÍRÁSA

Előkészítés. Először kapcsoljuk be a spektrofotométert a műszer hátulján található főkapcsolóval, mert a spektrofotométerek fényforrásának bemelegedéséhez általában 30 percre van szükség. A pontosan 1 mg/cm^3 koncentrációjú standard szalicilsav oldatból $100,00 \text{ cm}^3$ -es mérőlombikokba osztott pipettával olyan térfogatokat mérünk be, hogy szalicilsavra $0,00$ – $0,07 \text{ mg/cm}^3$ koncentrációtartományban egy hat tagból álló kalibráló oldatsorozatot kapjunk. A lombikokba kb. 50 cm^3 desztillált vizet töltünk, majd az oldatok mindegyikéhez mérőhengerrel kb. 5 cm^3 1 m/v\% -os FeCl_3 oldatot adunk. Ezután a lombikokat desztillált vízzel jelre töltjük, alaposan összerázzuk. A kiadott ismeretlen szalicilsavtartalmú oldatot kvantitatíven bemossuk egy $100,00 \text{ cm}^3$ -es mérőlombikba, majd desztillált vízzel jelre töltjük, alaposan homogenizáljuk. Ebből a törzsoldatból mérjük be 20 cm^3 -es részleteket hasas pipettával három $100,00 \text{ cm}^3$ -es mérőlombikba, és kezeljük azokat a kalibráló oldatsorozatnál leírtak szerint.

A komplex abszorpciós spektrumának felvétele (csak a Jenway berendezéssel). A mérési üzemmód kiválasztására szolgáló „MODE” kapcsolóval állítsuk a berendezést „ABS” üzemmódra. Ekkor a kijelzőn a fényútban levő oldat abszorbanciája fog megjelenni. Töltsünk meg egy küvettát desztillált vízzel (vakoldat), egy másikat pedig egy közepes koncentrációjú szalicilát kalibráló oldattal, és helyezzük a küvettákat a küvettatartóba. Zárjuk a küvettatartó fedelét. A recés élű tárcsa kattánástól kattanásig való forgatásával mindig a kívánt küvetta helyezhető a fényútba. Fordítsuk a desztillált vizes küvettát a fényútba, és állítsuk a hullámhosszat 400 nm -re. Nyomjuk meg a „CALIBRATE” gombot. A kijelzőn $0,000$ abszorbancia fog megjelenni, és ezzel egyrészt meghatároztuk az adott hullámhosszhoz tartozó I_0 értéket, másrészt (technikailag) a háttér abszorbanciát nullára állítottuk be az adott hullámhosszon. Fordítsuk a szalicilát tartalmú küvettát a fényútba, és jegyezzük fel a kijelzett abszorbancia értéket, ez természetesen már a szalicilátoldat háttérkorrigált abszorbanciája. Állítsuk a mérési hullámhosszat 410 nm -re, a vakoldatot tartalmazó küvettával a fényútban ismét korrigáljunk a háttérre (a „CALIBRATE” gomb megnyomásával) majd ismét mérjük meg a szalicilátoldat abszorbanciáját. Folytassuk a méréseket, a hullámhosszat 10 nm -enként változtatva 600 nm -ig. Ábrázoljuk a háttérkorrigált abszorbanciát a hullámhossz függvényében, és válasszuk ki az abszorpciós maximum helyét. Ha az időbe belefér, a gyakorlatvezető segítségével vegyük fel a komplex spektrumát a teljes látható hullámhossztartományban a laboratóriumban található UNICAM regisztráló spektrofotométerrel is.

Ismeretlen szalicilátkoncentráció meghatározása a Jenway berendezéssel. A hullámhosszbeállítóval állítsuk be a mérési hullámhosszat a korábban meghatározott abszorpciós maximumra és a továbbiakban ne változtassunk a hullámhosszon. Helyezzük el a kalibráló ill. ismeretlen oldatokat tartalmazó küvettákat a küvettatartóban. Először a vak oldattal a fényútban a „CALIBRATE” gomb megnyomásával végezzük el a háttérkorrekciót. Ezt követően mérjük meg rendre a kalibráló oldatokat, majd végül a három ismeretlen oldat abszorbanciáját. Ezt a komplett mérési sorozatot még kétszer ismételjük meg, minden sorozat

kezdetén elvégezve a háttérkorrekciót. Az egyes kalibráló sorozatokra kapott abszorbanciaértékeket ábrázoljuk a szalicilátkoncentráció függvényében méréssorozatonként külön-külön, majd olvassuk le a kalibráló egyenesről az ismeretlen koncentrációját. Ez összesen 3×3 adatot fog eredményezni, amelyet átlagolunk.

A Spektromom 195D típusú műszer kezelése. A készülék küvettaterének fedelét nyissuk fel (ennek a fedélnek a nyitott állásában a fényérzékelőt sötételő védőburkolat záródik), ezt a fedelet a mérések szünetében célszerű nyitva tartani. A lámpakiválasztó kar (a készülék küvettatér felőli oldalán található „LAMPS” felirattal) betolt helyzetében a látható, kihúzott helyzetében az ultrabolya tartományban működő lámpa működik. A lámpák működését az előlapon a „VIS” vagy „UV” jelzőizzók igazolják vissza (az utóbbi kb. 1 perc késleltetéssel). A gyakorlat során a látható fénytartományban fog mérni. A „WAVELENGTH” feliratú hullámhossz állító gomb forgatásával állítjuk be a mérés 530 nm hullámhosszát. A mérésmód választó gombot a „T%” állásba forgatjuk. A beállított hullámhossznak megfelelő fotocellát is ki kell választanunk: a látható tartományban érzékeny fotocellát a „DETECTORS” feliratú kar betolásával választhatjuk ki. Ezután a küvettafedél nyitott állása mellett a „DARK CURRENT” gomb szabályozásával a kijelzőt nulla értékre állítjuk, amivel kikompenzáljuk a sötétáramot.

A küvettatartót a mérendő oldatokat tartalmazó küvettákkal a küvettatérbe helyezzük. Megfigyeljük, hogy melyik (küvetta váltó tárcsa) állásnál lesz a fényútban az ún. összehasonlító („vak”) oldatot tartalmazó küvetta. Az összehasonlító oldatot fényútba állítjuk és lecsukjuk a küvettaház fedelét. Ekkor a küvettán átjutó fény a fotocellára kerül. A fénynyaláb szélességét az átengedő rés állításával szabályozhatjuk, azaz a „SLIT” jelű gombot óvatosan elforgatjuk. Igyekszünk olyan résszélességet beállítani, amelynél a kijelző 100,0-as transzmittanciát mutat. A „100T% fine” gombbal finomszabályzás is lehetséges. A „100T% fine” gombot célszerű középső állásban vagy annak közelében tartani. Miután beállítottuk a 100%-os transzmittanciát, a küvettafedelelet továbbra is zárva tartva, a mérendő küvettát juttatjuk a fényútba és leolvassuk a kijelzőn megjelenő transzmittancia értéket, amelyből az abszorbancia kiszámítható. Az egyes mérések között célszerű a sötétáram és a 100%-os transzmittancia értéket ellenőrizni, szükség esetén újból beállítani, hogy a készülék elektromos állapotának, melegedésének változása minél kisebb hibát okozzon. Az elvégzendő mérési feladatok megegyeznek a másik műszerrel kapcsolatban leírtakkal, kivéve, hogy a Spektromom készülék felépítéséből adódóan a spektrum felvételére nem alkalmas.

BENYÚJTANDÓ ADATOK, EREDMÉNYEK

- A Fe(III)-szalicilátó komplex kísérletileg meghatározott abszorpciós spektruma
- A kalibrációs függvények milliméterpapíron ábrázolva
- Az ismeretlen szalicilsav törzsoldat koncentrációja mg/dm^3 és mol/dm^3 egységekben és a mért eredmény szórása
- A komplex moláris abszorbanciája az abszorpciós maximum helyén

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK ÖNÁLLÓ FELKÉSZÜLÉSHEZ

1. Mi az abszorbancia és a transzmittancia definíciója, és mi a kettő közötti összefüggés?
2. Ismertesse a Lambert-Beer törvényt és nevezze meg a benne szereplő mennyiségeket és dimenziójukat!
3. Melyek a Lambert-Beer törvény érvényességének határai, soroljon fel eseteket, amikor a törvénytől eltérések lehetnek!
4. Definiálja az abszorpciós spektrum, az abszorpciós sáv és az abszorpciós maximum fogalmát!
5. Melyek az abszorpciós spektrofotométerek legfontosabb részei és a műszeres abszorbancia meghatározás legfontosabb lépései?
6. Mi a háttérkorrekció, miért van rá szükség, hogyan történik?
7. Milyen abszorbancia tartományban mér optimálisan egy spektrofotométer?
8. Ismertesse a szalicilsav spektrofotometriás meghatározásának alapelveit!
1. Kálium-dikromát oldat moláris abszorbanciája 410 nm-en $1100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Oldatunk $1,00 \text{ dm}^3$ -ben 0,0230 gramm kálium-dikromátot tartalmaz. A beérkező fény hány százalékát nyeli el az oldat 1,7 cm vastag rétege?
(a $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ móltömege 294,2 gramm/mol; a helyes megoldás: 28,5%)
10. Adott egy gyenge sav 0,01 M oldata. Az oldat fényelnyelése a sav protonált formájára jellemző hullámhosszon 0,015. Becsüljük meg, hogy mekkora a K_d és a pH!
($\epsilon = 1,7 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $l = 1 \text{ cm}$; a helyes megoldás: $K_d \approx 1,57 \cdot 10^{-4}$; $\text{pH} \approx 2,93$)