

# Lambert–Beer törvény gyakorlati alkalmazhatósági tartományának meghatározása

Elméleti alap: Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai, 2012.

Gyakorlat típusa: Egyéni.

Gyakorlat célja: A gyakorlat célja megmutatni, hogyan határozható meg egy adott spektrofotométeren az abszorbancia tartomány, amelyen belül a készülék kvantitatív mérésekre alkalmas. Az eljárás megfelelő változtatásokkal más molekulaszpektroszkópai készülék pontosságának megállapítására is használható.

## 1. Bevezetés

A spektrofotometriában a mért jel (vagy a fényintenzitás, vagy az abszorbancia) és a színes anyag koncentrációja közötti kapcsolatot a Lambert–Beer törvény írja le:

$$A^\lambda = \lg \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda} = \epsilon^\lambda \cdot c \cdot \ell, \quad (1)$$

ahol a  $\lambda$  index a használt hullámhosszat jelöli, valamint

$A^\lambda$  az abszorbancia,

$I_0^\lambda$  a beeső fény intenzitása,

$I^\lambda$  a mért mintán átjutott fény intenzitása,

$\epsilon^\lambda$  a színes anyag moláris abszorbanciája, amely az abszorbancia számértékével egyezik meg egységnyi moláris koncentráció és egységnyi küvetta hossz esetén, így szokásos mértékegysége  $M^{-1}cm^{-1}$ ,

$c$  a színes anyag koncentrációja és

$\ell$  a küvetta hossza a fényút irányában.

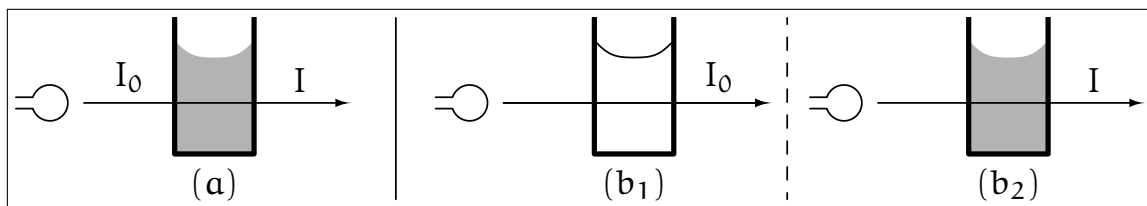
Ha nem egy, hanem több színes anyag van a mért mintában, akkor ezek abszorbanciái összegződnek és a Lambert–Beer törvény általános alakja lesz érvényes:

$$A^\lambda = \left( \sum_{i=1}^n \epsilon_i^\lambda \cdot c_i \right) \cdot \ell, \quad (2)$$

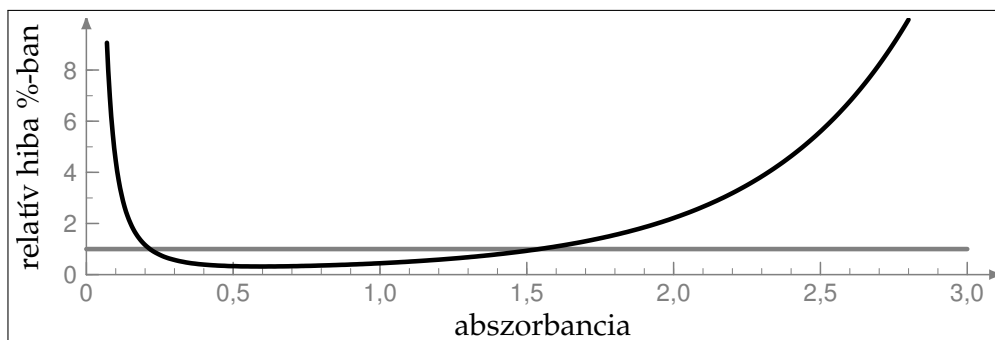
ahol  $n$  a színes részecskék száma.<sup>1</sup>

Az (1) egyenlet azt sugallja, hogy a mérés az 1a ábrának megfelelően történik. Ez a mérési módszer a küvetta, az oldószer és az oldott színes anyagok együttes fényelnyelését méri. A Lambert–Beer törvényben viszont az  $\epsilon_i$  és  $c_i$  csak az oldott anyago(ka)t jellemzik. Emiatt a gyakorlatban másképp mérünk. Ahogy az 1b ábra mutatja, a spektrofotométerekben a fénymérő csak a mintán már áthaladt fény intenzitását méri. Ha a fény útjában csak az oldószerrel megtöltött küvetta van ( $b_1$ ), akkor kapjuk meg  $I_0$  értékét, vagyis a háttér

<sup>1</sup>A továbbiakban a  $\lambda$ -t elhagyjuk az egyszerűség kedvéért, de mindig odaértjük.



1. ábra. Az abszorbancia mérésének lehetséges elrendezései. A magyarázatot lásd a szövegben.



2. ábra. Spektrofotometriás abszorbanciamérés relatív hibája az abszorbancia mért értékének függvényében, az intenzitás 0,1 %-os bizonytalansága esetén.

elnyelésének kiküszöbölésével mérhető a kezdeti fényintenzitás. Ha a kuvetta a mérendő oldatot tartalmazza ( $b_2$ ), akkor a fényintenzitás  $I_0$ -hoz viszonyított csökkenése már *csak* a csak az oldott anyag(ok) fényelnyelése miatt történhet, így az (1), illetve a (2) egyenlet alkalmazható. Egyfényutas készülékekben az  $I_0$  és  $I$  mérése egymás után történik, míg kétfényutas fotométerekben ez történhet egyszerre is.

### 1.1. Technikai megfontolások

A gyakorlatban az abszorbancia mérésének technikai korlátai vannak. A készülék optikai alkatrészeinek minősége mellett a pontosságot meghatározó alkatrész az intenzitást detektáló fénymérő. Például, ha a minta abszorbanciája 3 lenne, akkor az (1) egyenletéből következik az  $I_0/I = 1000$  egyenlőség, így a mintán átjutott fény intenzitása csak az ezredrésze a kezdeti intenzitásnak. Ahhoz, hogy az  $A = 3$  abszorbancia értéket ugyanolyan pontosan tudjuk mérni, mint pl. az  $A = 0,5$ -t, olyan fénymérőre lenne szükség, ami az  $I_0$  fényintenzitást ugyanakkora relatív hibával tudja mérni, mint az  $I_0$  ezredrészt. Ilyen minőségű fénymérők nem általánosan használtak a fotométerekben.

A fény mérés pontosságának figyelembevétele hasonlóan történhet, mint pl. a tömegmérésé. Az nyilvánvaló, hogy egy táramérleggel 20,00 g-ot és 0,02 g-ot nem lehet ugyanolyan pontossággal bemérni. Hasonló megfontolásokból kiindulva, de itt nem részletezendő matematikai levezetéssel bebizonyítható, hogy a mért intenzitásból számolt abszorbancia relatív pontossága a 2. ábrának megfelelően változik az abszorbancia számértékének függvényében, kb. 0,1 %-os pontosságú intenzitásmérés esetén. Pontosabb fénymérő esetén ez a görbe lefelé csúszik, pontatlanabb esetén felfelé.

Az ábrán 1 %-nál fel van tüntetve egy vízszintes vonal is, jelezvén a kvantitatív alkalmazhatóság határát. A mért abszorbancia abban a tartományban használható kvantitatív értékeléshez, ahol a görbe a vízszintes vonal alatt van. Mivel a spektrofotométerekbe épített fénymérők technikai adatai általában nem ismertek, ezért van szükség a pontos mérésekre használható abszorbancia tartomány kísérleti meghatározására.

A fénymérő relatív hibájának intenzitásfüggése mellett még két technikai korlát szűkíti a használható abszorbancia tartományt: (1) mind a fényforrás intenzitása, (2) mind a fénymérők relatív pontossága függ a használt fény hullámhosszától is. A gyakorlat keretén belül ezek figyelembevételétől eltekintünk, mert egyrészt ezek hatása kisebb hullámhossz tartományon belül elhanyagolható, másrészt az újabb spektrofotométerek jelentős része ezeket automatikusan korrigálja.

A gyakorlat során a feladat a kvantitatív célokra használható abszorbanciatartomány felső határának meghatározása az abszorbancia koncentrációfüggését mérve.

## 2. A mérés menete

A Lambert–Beer törvény gyakorlati alkalmazhatósági tartományának meghatározása úgy történik, hogy egy megfelelően választott színes anyagból növekvő koncentrációjú oldatsorozatot készítünk és ezeknek az oldatoknak megmérjük az abszorbanciáját. A mért abszorbanciákat a koncentráció függvényében ábrázolva egy

origóból induló egyenest kell kapni abban az abszorbancia tartományban, amelyben a Lambert Beer-törvény alkalmazható. Túl nagy abszorbancia értékeknél a mért pontok ettől az egyenestől elhajlanak. Egy átlagos spektrofotométernél általában a 0 – 2,5 közötti abszorbancia értékek elégítik ki a Lambert–Beer törvényt.

A színes anyag kiválasztásánál körültekintőnek kell lenni, mert az egyenestől való elhajlást nemcsak a nagy abszorbancia, hanem valamilyen kémiai folyamat ((de)protonálódás, disszociáció, bomlás, stb.) is okozhatja. Biztosnak kell lenni abban, hogy a Lambert–Beer törvény az (1) egyenletben megadott formában használható és nincs szükség a (2) egyenletben megadott általános alakra. A látható hullámhossz tartományban működő spektrofotométerek esetén jól alkalmazható a kálium-kromát lúgos, vagy a kálium-hexaciano-ferrát(III) semleges vizes oldata. Ezek az oldatok mind sárgák, így 500 nm-nél kisebb hullámhosszaknál használhatók. Ha nagyobb hullámhossznál akarunk mérni, akkor valamilyen indikátor híg vizes oldatát lehet használni. Az indikátorok azonban savban és / vagy lúgban bomlékonyak lehetnek, ráadásul változtatják a színüket a pH függvényében, ezért a megfelelő pH beállítására ügyelni kell. Néhány indikátor erősen adszorbeálódik műanyag felületekhez, ezeket csak üvegeküvetében szabad vizsgálni.

### 3. A gyakorlat kivitelezése

A gyakorlat során törzsoldatot kell készíteni a kijelölt anyagból. Ebből kell hígítással előállítani egy növekvő koncentrációjú oldatsorozatot, majd az oldatok abszorbanciáit kell megmérni két hullámhosszon. A mérésekből meg kell állapítani azt az abszorbancia tartományt, amelyben a Lambert–Beer törvénynek megfelelően a fotométer kvantitatív mérésekre alkalmas, illetve a két hullámhosszon ki kell számítani a moláris abszorbanciákat. Az első hullámhosszat ( $\lambda_1$ ) úgy kell megválasztani, hogy a töményebb oldatok abszorbanciái várhatóan kívül essenek a méréstartományon. A másik hullámhossz ( $\lambda_2$ ) megválasztásánál az a cél, hogy minden oldat abszorbanciája ezen a tartományon belül maradjon.

A gyakorlat kezdetekor a gyakorlatvezető megadja, hogy (1) melyik vegyülettel kell dolgozni ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , bróm-fenolkék, vagy metilnarancs) és (2) mennyi legyen a később készítendő törzsoldat várható abszorbanciája (5,5 – 6,5). Ha a gyakorlatvezető mást nem mond, akkor a vegyület a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (vörösvér-lúgsó) és a törzsoldat várható abszorbanciája 6,0.

A kiválasztott vegyület felhasználásával  $250\text{ cm}^3$  oldatot kell készíteni (ez nem a későbbi törzsoldat!), melynek koncentrációja a sók esetén  $10^{-3}\text{ M}$  és az oldat beméréssel készítendő, míg az indikátorok esetén  $5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$  és a kiadott alapoldatból hígítással készítendő. Az oldatok készítésekor a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , a bróm-fenolkék és a metilnarancs oldat tartalmaz még  $0,50\text{ g Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ -ot is a szükséges pH beállításához, míg a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  esetén az oldat a színes anyag egyszerű vizes oldata. A bemérendő tömegek vagy hígítandó térfogatok számolásához szükség van a relatív molekulatömegekre a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  és  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  esetén (relatív atomtömegek a Függelékben), illetve az indikátorok rendelkezésre álló alapadatainak koncentrációira, amelyek a következők:  $0,0015\text{ M}$  bróm-fenolkék és  $0,003\text{ M}$  metilnarancs esetén.<sup>2</sup>

Ezt követően fel kell venni a készített oldat spektrumát a látható fény hullámhossz tartományában (350 – 700 nm). Amennyiben az abszorbancia kb. 2 alatt marad a teljes tartományon, úgy meg kell keresni az elnyelési maximumhoz tartozó hullámhosszat ( $\lambda_1$ ). A spektrumot a fotométerről ki kell menteni, vagy fényképet kell készíteni róla, és csatolni kell a jegyzőkönyvhöz. Amennyiben az abszorbancia maximuma 2 feletti, hígabb törzsoldattal kell megismételni a műveletet. A készített oldat koncentrációja, a  $\lambda_1$ -on mért abszorbancia és a gyakorlatvezető által megadott várható abszorbancia ismeretében ki kell számítani a mérésekhez készítendő törzsoldat koncentrációját. Ezután  $250\text{ cm}^3$  törzsoldatot kell készíteni. A különböző színes anyagok törzsoldatának készítésekor a fentebb leírtak szerint  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  hozzáadása szükséges.

A második hullámhosszat ( $\lambda_2$ ) a hallgatónak kell kiválasztania a felvett spektrum segítségével úgy, hogy azon a korábbiak szerint készített törzsoldat várható abszorbanciája 2,5 legyen. Érdemes a második hullámhosszat minél közelebb választani az elsőhöz, de azt a tartományt érdemes kihagyni, ahol a spektrumok nagyon meredeken változnak.

<sup>2</sup>Ez utóbbi koncentrációkat érdemes ellenőrizni az alapoldatok üvegein a gyakorlat megkezdésekor.

Ezután a mérendő oldatsorozatot a törzsoldat megfelelő hígításával készítjük el.  $250\text{ cm}^3$  oldat áll rendelkezésünkre, amelyből a hígításokat készítjük. Nagyon ügyeljünk a hígítások során, hogy a bürettából kiengedett oldat elég legyen mind a 20 minta elkészítéséhez! Ne pazaroljuk el! A büretta törzsoldattal való atmoszája is csak néhány  $\text{cm}^3$  oldattal történjen, és minden jelre állításkor a *maradékot* ne a hulladékba tegyük, hanem egy külön, tiszta főzőpohárban gyűjtsük, melyből később visszatölthetjük a bürettába. Ha a gyakorlatvezető mást nem mond, akkor sorban 1, 2, ...,  $20\text{ cm}^3$ , bürettával pontosan kimért törzsoldat részleteket kell egy  $25\text{ cm}^3$ -es mérőlombikban jelre töltve hígítani és a hígított oldatok abszorbanciáját a két hullámhosszon megmérni. Az oldatokat ugyanabban a mérőlombikban készítjük el<sup>3</sup> és rögtön mérjük az abszorbanciákat. Legvégül a hígítatlan törzsoldat abszorbanciáit is megmérjük. *A méréseket mindig a leghígabb oldattal kezdjük és a koncentráció növekvő sorrendjében végezzük, mert az esetleges kísérleti hibák így a legkisebbek.*

Az abszorbancia mérése a következő módon történik. Először desztillált vízzel kb. a  $2/3$ -áig megtöltjük a küvetta, és az első hullámhosszon erre állítjuk be a  $0,000$  abszorbancia értéket (vagyis „nullázzuk” a készüléket).<sup>4</sup> Ezután az oldat  $1,0 - 1,5\text{ cm}^3$ -es részleteivel háromszor átmoszuk a küvetta, majd azt az oldattal kb. a  $2/3$ -áig feltöltve megmérjük az abszorbanciát. Ezután a spektrofotométert átállítjuk a második hullámhosszra, a küvetta kimossuk, megint megtöltjük desztillált vízzel, és nullázzuk a készüléket a második hullámhosszon. A küvetta a fentebb leírt módon a mérendő oldattal átmosva és feltöltve ezen a hullámhosszon is megmérjük az abszorbanciát. A következő oldat abszorbanciáinak mérését kezdhethetjük a második hullámhosszal, így ezen a hullámhosszon nem kell a nullázást újra végrehajtani. Csak akkor kell újra nullázni, amikor visszatérünk az első hullámhosszra. *Hullámhossz váltásakor azonban nem szabad elfelejteni a nullázást, mert a  $0,000$  abszorbancia érték erősen függ a hullámhossztól a küvetta és az oldószer elnyelése miatt!*

Ez a mérési módszer egyetlen küvetta használatával teszi lehetővé a gyakorlat végrehajtását, azonban sokszor és alaposan kell mosogatni a küvetta, így nagy a hibázás lehetősége. Két küvetta használata gyorsabbá teheti a mérést, amennyiben az egyik küvetta végig csak desztillált vizet tartalmaz és mindig arra nullázzuk a spektrofotométert a hullámhossz váltásakor, míg a mérendő oldatokat csak a másik küvettaiba töltjük és mérjük. Ennek a technikának a használata esetén azonban korrigálni kell a mért értékeket a két küvetta abszorbanciája közötti különbséggel, vagyis az oldatokat tartalmazó küvetta abszorbanciáját meg kell mérni úgy is, hogy desztillált vízzel van feltöltve, és az így mért értéket ( $A_{\text{küvetta}}^{\lambda_1}$ , illetve  $A_{\text{küvetta}}^{\lambda_2}$  a két használt hullámhosszon) le kell vonni a többi mért abszorbanciából. Ezt a küvetta-korrekciós mérést a gyakorlat elején kell elvégezni, és érdemes a gyakorlat végén is megismételni.

Ha a gyakorlatvezető mást nem mond és rendelkezésre áll két küvetta, akkor a kétküvetta mérési technikát kell alkalmazni. Amennyiben rendelkezésre áll mind műanyag, mind üvegeküvetta, az indikátorokat érdemes üvegeküvettaiban mérni.

Az indikátorok sokszor nehezen moshatók ki az eszközökből. Ha a gyakorlatot valamelyik indikátorral hajtottuk végre, akkor a mérések végén a mérőlombikokat, a bürettát, a küvetta, valamint a használt pipettákat és főzőpoharakat mossuk át alaposan 5–6-szor csapvízzel, egyszer öblítsünk desztillált vízzel, majd a rendelkezésre álló  $\sim 1\text{ M}$  mosólúggal is öblítsük át az eszközöket. A mosólúg többször is felhasználható, így visszaönthető a tárolóedényébe. Ezek után lehet az eszközöket desztillált vízzel a szokásos módon megtisztítani.

## 4. A mérési adatok értékelése

1. A mérés körülményeit, a mért abszorbanciákat, valamint a színes anyag koncentrációit foglaljuk össze az 1. táblázatnak megfelelően.

A korrigált abszorbanciákra, valamint a mérőküvetta abszorbanciájára a használt hullámhosszakon természetesen csak akkor van szükség, ha két küvettaival történt a mérés.

<sup>3</sup>Így a mérőlombikok térfogatainak esetleges eltéréséből adódó hibát kiküszöböljük.

<sup>4</sup>A spektrofotómetér kezelési útmutatója a felszerelés része, ebben van leírva, hogyan kell a beállításokat végrehajtani.

1. táblázat. A mért és számolt adatok összefoglalása

színes anyag=...,  $\lambda_1 = \dots, \lambda_2 = \dots, A_{\text{küvetta}}^{\lambda_1} = \dots, A_{\text{küvetta}}^{\lambda_2} = \dots$

$V_{\text{hígított}} \text{ (cm}^3\text{)}$	$c \text{ (M)}$	$A_{\text{mért}}^{\lambda_1}$	$A_{\text{mért}}^{\lambda_2}$	$A_{\text{korrigált}}^{\lambda_1}$	$A_{\text{korrigált}}^{\lambda_2}$

2. Az  $A_{\text{mért}}^{\lambda_1}$  (vagy kétküvetta mérés esetén a  $A_{\text{korrigált}}^{\lambda_1}$ ) értékeket ábrázoljuk  $c$  függvényében. A kapott görbe lineáris tartományára illesszünk egy origón átmenő egyenest, és határozzuk meg a színes anyag moláris abszorbanáciáját és annak szórását a  $\lambda_1$  hullámhosszon ( $\epsilon^{\lambda_1}$ ) az (1) egyenlet alapján (Excel LIN.ILL. függvénye, Origin, QtiPlot, stb.). A lineáris tartománytól a kísérleti pontok által meghatározott görbe a nagyobb abszorbanációknál tér el jobban, ha egyáltalán eltér. Emiatt, ha a kísérleti pontsor bármilyen kicsi, de szisztematikus elhajlást mutat, akkor a pontokat a legnagyobb abszorbanáciától kezdve sorban kihagyjuk az illesztésből, amíg a maradék pontok a szórástól eltekintve egy egyenesre nem esnek.
3. Az előző pontban leírt feladatot végrehajtjuk a második hullámhosszon mért adatokkal is.
4. A két ábra alapján megadjuk annak az abszorbanancia tartománynak a felső határát, amelyen belül a használt spektrofotométer kvantitatív mérésre alkalmas a Lambert–Beer törvénynek megfelelően.
5. Az általunk meghatározott moláris abszorbanációk értékeit vessük össze irodalmi értékekkel, és az esetlegesen jelentős (szórást meghaladó) eltéréseket próbáljuk megmagyarázni! Fel kell tüntetni az irodalmi adatok forrását.

## Ellenőrző kérdések

1. Adja meg az abszorbancia és a fényintenzitás közötti összefüggést!
2. Adja meg a Lambert–Beer törvényt egy, ill. több elnyelő részecske esetén!
3. Hogyan küszöböljük ki az oldószer és a kivetta abszorbanciáját?
4. Milyen technikai korlátok az okai annak, hogy egy spektrofotométer által mért abszorbancia csak egy adott tartományban követi a Lambert–Beer törvényt?
5. Rajzolja fel, hogyan változik az abszorbancia relatív hibája az abszorbancia függvényében!
6. Hogyan történhet a Lambert–Beer törvény gyakorlati alkalmazhatósági tartományának meghatározása?
7. Milyen feltételeknek kell megfelelni egy színes anyagnak ahhoz, hogy használható legyen a gyakorlat végrehajtásához?
8. Milyen megfontolások alapján választja ki a használandó hullámhosszakat a gyakorlata elején?
9. Milyen előnyei és hátrányai vannak az egy küvetta használó mérőmódszernek?
10. Miért és mivel kell kétküvetta mérés esetén korrigálni a mért abszorbanciákat?
11.  $250\text{ cm}^3$   $0,0025\text{ M}$  vörösvér-lúgsó ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) oldat készítéséhez mennyi szilárd anyagot kell bemérni?  $A_r(\text{C}) = 12,01$ ,  $A_r(\text{N}) = 14,00$ ,  $A_r(\text{K}) = 39,10$  és  $A_r(\text{Fe}) = 55,85$ .
12. A 11. kérdés szerint készített oldatból  $1$ ,  $5$ , illetve  $10\text{ cm}^3$ -t  $25\text{ cm}^3$ -re hígítunk. Adja meg az így készített oldatok koncentrációját!
13.  $420\text{ nm}$ -en  $607,7\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a kálium-kromát lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Milyen koncentrációjú törzsoldatot kell készítenünk ahhoz, hogy az oldat várható abszorbanciája  $3,0$  legyen? A mérést  $\ell = 1\text{ cm}$  fényutat biztosító küvettaiban tervezzük végezni.
14.  $500\text{ nm}$ -en  $16100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a metilnarancs lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Hány  $\text{cm}^3$   $0,003\text{ M}$  koncentrációjú alapoldatot kell  $250\text{ cm}^3$ -re hígítani ahhoz, hogy a hígított törzsoldat várható abszorbanciája  $3,0$  legyen? A mérést  $\ell = 0,5\text{ cm}$  fényutat biztosító küvettaiban tervezzük végezni.