

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 λ index a használt hullámhosszat jelöli, valamint

A^λ az abszorbancia,

I_0^λ a beeső fény intenzitása,

I^λ a mért mintán átjutott fény intenzitása,

ϵ^λ 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

ℓ a küvetta hossza a fényút irányában.

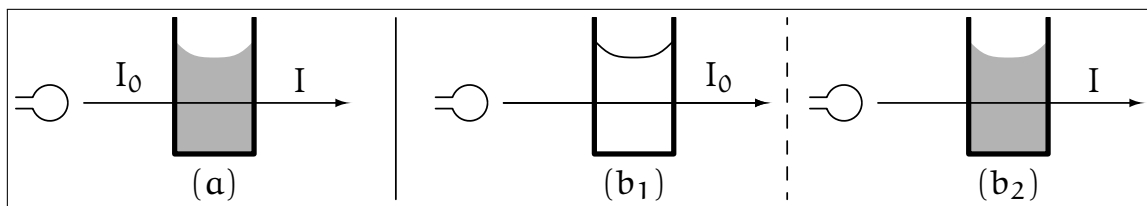
Ha nem egy, hanem több színes anyag van a mért mintában, akkor ezek abszorbanciái összegződnek és a Lambert–Beer törvény általános alakja lesz érvényes:

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

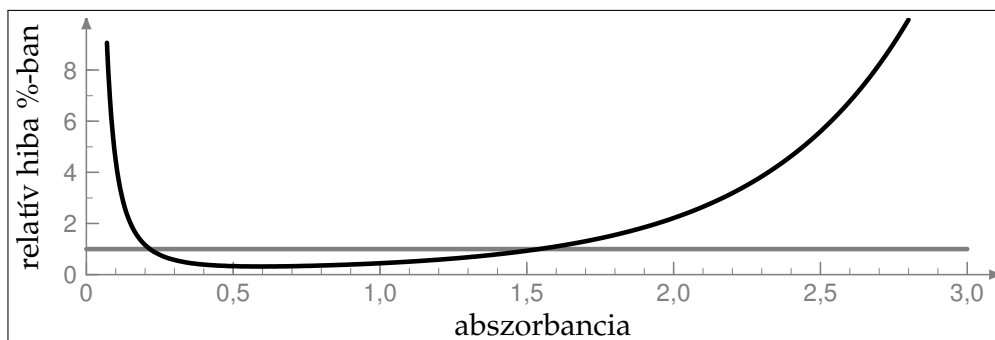
ahol n a színes részecskék száma.¹

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 ϵ_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

¹A továbbiakban a λ -t elhagyjuk az egyszerűség kedvéért, de mindig odaértjük.



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



2. ábra. Spektrofotometriás abszorbanciámérés 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 ezredrészét. 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 abszorbanciataromány 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 oldatsorozat készitünk 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 (λ_1) úgy kell megválasztani, hogy a töményebb oldatok abszorbanciái várhatóan kívül essenek a méréstartományon. A másik hullámhossz (λ_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 (K_2CrO_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 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (vörösvérplúgsó) és a törzsoldat várható abszorbanciája 6,0.

A kiválasztott vegyület felhasználásával 250 cm^3 oldatot kell készíteni (ez nem a későbbi törzsoldat!), melynek koncentrációja a sók esetén 10^{-3} 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 K_2CrO_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 K_2CrO_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.²

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 (λ_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 λ_1 -on mért abszorbancia és a gyakorlatvezető által megadott várható abszorbancia ismeretében ki kell számítani a mérésekhez készítendő törzsoldat koncentrációját. Ezután 250 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 (λ_2) a hallgatónak kell kiválasztania a felvett spektrum segítségével úgy, hogy azon a korábbiak szerint készítendő törzsoldat várható abszorbanciája 2,5 legyen. Érdeemes a második hullámhosszat minél közelebb választani az elsőhöz, de azt a tartományt érdemes kihagyni, ahol a spektrumok nagyon meredeken változnak.

²Ez utóbbi koncentrációkat érdemes ellenőrizni az alapoldatok üvegein a gyakorlat megkezdésekor.

Ezután a mérendő oldatsorozatot a törzsoldat megfelelő hígításával készítjük el. 250 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 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 cm^3 , bürettával pontosan kimért törzsoldat részleteket kell egy 25 cm^3 -es mérőlombikban jelre töltve hígítani és a hígított oldatok abszorbanciáját a két hullámhosszon megmérni. Az oldatokat ugyanabban a mérőlombikban készítjük el³ 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 küvetát, és az első hullámhosszon erre állítjuk be a 0,000 abszorbancia értéket (vagyis „nullázzuk” a készüléket).⁴ Ezután az oldat $1,0 - 1,5\text{ cm}^3$ -es részleteivel háromszor átmoszuk a küvetát, majd azt az oldattal kb. a $2/3$ -áig feltöltve megmérjük az abszorbanciát. Ezután a spektrofotométert átállítjuk a második hullámhosszra, a küvetát kimossuk, megint megtöltjük desztillált vízzel, és nullázzuk a készüléket a második hullámhosszon. A küvetát 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 küvetát, 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 küvetát, 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.

³Így a mérőlombikok térfogatainak esetleges eltéréséből adódó hibát kiküszöböljük.

⁴A 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 kétküvettes mérés esetén a $A_{\text{korrigált}}^{\lambda_1}$) értékeket ábrázoljuk c függvényében. A kapott görbe lineáris tartományára illesztünk egy origón átmenő egyenest, és határozzuk meg a színes anyag moláris abszorbanciáját és annak szórását a λ_1 hullámhosszon (ϵ^{λ_1}) az (1) egyenlet alapján (Excel LIN.ILL. függvénye, Origin, QtiPlot, stb.). A lineáris tartománytól a kísérleti pontok által meghatározott görbe a nagyobb abszorbanciáknál tér el jobban, ha egyáltalán eltér. Emiatt, ha a kísérleti pontsor bármilyen kicsi, de szisztematikus elhajlást mutat, akkor a pontokat a legnagyobb abszorbanciától 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 abszorbancia tartománynak a felső határát, amelyen belül a használt spektrofotó mérésre alkalmas a Lambert–Beer törvénynek megfelelően.
5. Az általunk meghatározott moláris abszorbanciák 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 kivetttát használó mérőmódszernek?
10. Miért és mivel kell kétküvettes mérés esetén korrigálni a mért abszorbanciákat?
11. 250 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 cm^3 -t 25 cm^3 -re hígítunk. Adja meg az így készített oldatok koncentrációját!
13. 420 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 küvetében tervezzük végezni.
14. 500 nm -en $16100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a metilnarancs lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Hány cm^3 $0,003\text{ M}$ koncentrációjú alapoldatot kell 250 cm^3 -re hígítani ahhoz, hogy a hígított törzsoldat várható abszorbanciája $3,0$ legyen? A mérést $\ell = 0,5\text{ cm}$ fényutat biztosító küvetében tervezzük végezni.