

Spektrofotometria

(Dr. Fábrián István által összeállított silabusz
átdolgozott kiadása)

*A gyakorlaton bemutatott és alkalmazott Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotometriás
készülék a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 projekt keretében, az Európai Unió
támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával került
beszerzésre.*

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2019

Tartalomjegyzék

1	A fényelnyelésről	3
2	A spektrofotometriás módszere	5
3	A spektrofotométer	6
3.1	Egysugaras spektrofotométerek	8
3.2	Kétsugaras spektrofotométerek	8
3.3	Diódasoros spektrofotométerek	10
4	A spektrofotometria felhasználási területe	11
5	Derivatív spektrofotometria	12
5.1	A módszer elvi alapjai	12
5.2	A módszer alkalmazási területei	13
5.3	A jel a derivatív spektrofotometriában	15
6	Gyakorlatok	16
6.1	Cr(III) és Cr(VI) ionok egymás melletti meghatározása	16
6.2	Cr(VI) és Mn(VII) ionok egymás melletti meghatározása	16
6.3	Metilvörös indikátor koncentrációjának meghatározása	20
6.4	Brómkrezolöl indikátor koncentrációjának meghatározása	20
6.5	Szalicilsav koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével	25
6.6	A papaverin koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével	31
6.7	Kalmopyrin tableta szalicilsav tartalmának meghatározása derivatív spektrofotometriával	34
6.8	Ellenőrző kérdések, számolási feladatok	35
6.9	Felhasznált irodalom	36

1. A fényelnyelésről

A spektroszkópia és azon belül a spektrofotometria az egyik legelterjedtebb anyagvizsgálati módszer. Elterjedtségét elsősorban a viszonylag egyszerű és könnyen hozzáférhető műszerezettségének köszönheti, hiszen napjainkban már alig képzelhető el olyan laboratórium ahol ne lenne legalább egyszerűbb spektrofotométer.

Az elektromágneses sugárzás, legyen szó akár a nagy energiájú γ -sugarakról vagy a kis energiával rendelkező rádióhullámokról, kölcsönhatásba léphet az adott anyaggal. Ez a kölcsönhatás abszorpción (az elnyelt fény hozza létre a gerjesztett állapotot) vagy sugárzáson egyaránt alapulhat (emisszió - a gerjesztett atomok bocsátanak ki energiát). Az elektromágneses sugárzás és a különböző anyagi részecskék kölcsönhatásán alapuló spektroszkópai módszereket az alábbi táblázatban tüntettük fel:

Táblázat 1. Spektroszkópai módszerek.

Hullámhossz-tartomány		Sugárzás és anyag kölcsönhatása	Analitikai módszer
Gamma	0,5 - 10 pm	Magátmenetek	Mössbauer-spektroszkópia
Röntgen (X-ray)	0,01 - 10 nm	Belső elektronátmenetek (ionizáció)	Röntgenspektroszkópia
Távoli ultraibolya (FUV)	10 - 180 nm	Vegyértékelektronok gerjesztése	Spektrofotometria
Ultraibolya (UV)	180 - 350 nm		
Látható (VIS)	350 - 780 nm		
Közeli infravörös (NIR)	780 - 1000 nm	Rezgési és forgási átmenetek	IR-spektroszkópia
Infravörös (IR)	1 - 30 μ m		
Távoli infravörös (FIR)	30 - 300 μ m	Forgási átmenetek	
Mikrohullámok	0,3 mm - 1 m	Forgási átmenetek, elektronspin átmenetek	Mikrohullámú spektroszkópia
Rádióhullámok	1 - 300 m	Magspin átmenetek	NMR

A fényelnyelés a régebbi megfogalmazás szerint a két Bohr-féle posztulátummal értelmezhető. Az atom ill. molekula stacionáriusan csak meghatározott energiájú állapotokban lehet. Amíg a részecske ezen állapotok egyikében van, fényt nem bocsát ki és nem nyel el. Fénykibocsátás vagy elnyelés csak a két stacionárius állapot közti átmenetnél lehetséges. A kisugárzott vagy elnyelt foton rezgésszáma és a molekula

ill. atom két energiaállapota közötti összefüggés az Einstein-féle ekvivalencia elvben jut kifejezésre:

$$E_1 - E_2 = h\nu = hc/\lambda \quad (h - \text{Plank állandó, } \nu - \text{frekvencia, } \lambda - \text{hullámhossz})$$

A Bohr-féle elmélet az energia változásokat önkényesnek látszó posztulátumokkal magyarázta meg. A később kifejlődött kvantummechanikai tárgyalásmód jelentősége abban van, hogy az elektronpályák kvantálásának Bohr-féle posztulátumait matematikailag megalapozta.

Az atomok spektrumánál a molekulák spektruma lényegesen bonyolultabb, mivel ez utóbbiak elektronjai két vagy több mag erőterében mozognak. A molekula energiaállapotát az elektronok energiaállapota (E_{el}) az atomok rezgési (E_v) és forgási állapota (E_r) együtt szabja meg.

$$h = E_1 - E_2 = (E_{el,1} - E_{el,2}) + (E_{v,1} - E_{v,2}) + (E_{r,1} - E_{r,2})$$

A molekulák haladó mozgása nem kvantált így ez figyelmen kívül hagyható. A három fenti energiaérték közül az elektron energiaváltozása a legnagyobb, nagyságrendileg 1 - 10 eV, azaz 125 nm - 1250 nm hullámhosszúságú fotonnak felel meg. A rezgési és forgási energia változásának megfelelő frekvencia az infravörös (1 - 50 μm) ill. a távoli infravörös és mikrohullámú (> 50 μm) tartományba esik. Ezek az energiaértékek nem függetlenek egymástól, az elektron energiaváltozása megváltoztatja a rezgési és forgási energia értékét is.

Az abszorpciós színeképeket az esetek túlnyomó többségében híg oldatban vizsgáljuk. Ez közelíti meg legjobban a kölcsönhatásmentes és így ideálisnak tekinthető kisnyomású gáz állapotát. Ilyen körülmények között folytonos spektrum keletkezik, a különböző kölcsönhatások eredményeként egymáshoz képest igen sűrűn elhelyezkedő vonalak összemosódnak. A spektrumban jelentkező maximumok egy-egy sávrendszernek felelnek meg, kivételes esetekben egyes sávok külön maximumként is jelentkezhetnek.

A sávok és sávrendszerek helyéből a vegyület ill. kötéstípusokat lehet azonosítani, az abszorpciós sávok intenzitásából pedig a fényútba eső molekulák számára, illetve koncentrációjára lehet következtetni. Az abszorpció értékéből a koncentrációt a Lambert-Beer törvény alapján lehet kiszámítani.

Ha I_0 intenzitású monokromatikus fénynyaláb a közeg 1 cm vastagságú rétegén áthaladva I intenzitásra csökken, akkor a Lambert-féle törvény értelmében: $I/I_0 = 10^{-\beta l}$ vagy más alakban írva: $\beta = 1/l \cdot \log(I_0/I)$, ahol β a közeg Bunsen-féle abszorpciós (régébbi szóhasználat szerint extinkciós) koefficiense; ami annak a rétegvastagságnak a reciprokéval egyenlő, amelyen áthaladva a fényintenzitás eredeti értékének tizedrészére csökken. A kifejezésben l a rétegvastagságot jelöli. Beer törvénye szerint, ha az oldószer nem mutat szelektív abszorpciót, az abszorpciós koefficiens a következő összefüggésben van a koncentrációval: $\beta = \epsilon \cdot c$, ahol ϵ a moláris abszorbancia (extinkciós koefficiens), ha az l értékét cm-ben, a koncentrációt $\text{mól}/\text{dm}^3$ -ben adjuk meg. A moláris abszorbancia adott hullámhosszon független a koncentrációtól és az anyag minőségére jellemző állandó. A fenti összefüggések alapján a Lambert-Beer törvény a következő alakú:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

2. A spektrofotometriás módszerek

Az egyik legrégebbi fényelnyelésen alapuló analitikai módszer a kolorimetria. A módszer fényfelbontást nem igényel, a referenciát és a mintát polikromatikus fényvel világítjuk meg. Az ismeretlen koncentrációjú színes anyag adott rétegvastagságú oldatát ugyanazon anyag ismert koncentrációjú oldatával hasonlítjuk össze. Ez utóbbinak a rétegvastagságát vagy a koncentrációját addig változtatjuk, míg a két oldat „optikai sűrűsége” azonos lesz. Pl. ha a két oldat különböző koncentrációjú, akkor a rétegvastagságot addig kell változtatni, amíg azonos fény mennyiség abszorbeálódik a két rétegben. A Lambert-Beer törvény érvényessége esetén a rétegvastagságok a koncentrációval fordítva arányosak.

A legegyszerűbb fotometriás módszer esetében fény szűrővel szűrt, közelítőleg monokromatikus fény halad át a vizsgálandó oldaton, valamint a tiszta oldószeren. Az abszorbanciát a két intenzitás összevetéséből kapjuk. Ma már a legtöbb esetben a teljes spektrum felvételére alkalmas spektrofotométereket használnak.

A spektrofotometria módszerénél a fényt egy monokromátor – prizma vagy rács – segítségével bonthatjuk színeképre. A monokromatikus fénysugarat az oldaton illetve az oldószeren engedjük át, az áthaladt fény intenzitását valamilyen detektorral (fotoelektron-sokszorozó, diódasor stb.) mérjük. Az abszorpciós spektrumból az anyag szerkezetére, az atomok és molekulák sajátosságaira, komplexek szerkezetére stb. kapunk információt.

Az abszorpciós spektrum felvételét analitikai célból a következő szempontok indokolják:

1. Kvalitatív vizsgálatok:

- a) Azonosítást végezhetünk a spektrum alapján. Két anyagot akkor tekintünk azonosnak, ha abszorpciós színeképük teljes egészében megegyezik egymással.
- b) A abszorpciós színekép alapján igen egyszerűen eldönthető egy-egy anyag tisztasága ill. szennyezettsége. A szennyezettség meghatározásánál ügyelni kell arra, hogy nem minden szennyezőre egyforma a kimutathatóság határa. A szennyező szelektív abszorpciójának a mértéke a vizsgált hullámhossz tartományban meghatározza a kimutathatóság értékét.

2. Kvantitatív vizsgálat:

- a) Abszorpciós mennyiségi meghatározások kidolgozásánál igen fontos a mérés hullámhosszának helyes megválasztása. Az abszorpciós sávnak (maximumnak) nem az emelkedő vagy csökkenő szakaszán, hanem a maximumán kell mérnünk. Itt ugyanis a legkisebb a rendszeres hibának az a része, amely a hullámhossz pontatlan beállításából és a résszélesség változásából ered. Kis koncentrációjú anyagok, ún. nyomszennyezők vizsgálatánál nagy abszorbanciát mutató sávhelyet választunk ki, így nagyobb érzékenységet érhetünk el. A

differenciálspektrofotometria-módszer esetében viszont „széles, lapos” maximumot ill. elnyelési sávot választunk ki a főkomponens meghatározására.

- b) Ha több anyag keverékéből valamelyik komponens meghatározása a cél, a zavaró hatások kiküszöbölésénél nagy segítségünkre lehet az egyes komponensek abszorpciós spektrumának ismerete.
- c) Több komponensű rendszer mennyiségi meghatározását is elvégezhetjük az abszorpciós spektrumok intenzitásának mérése alapján. A klasszikus spektrofotometria módszerének relatív hibája 1 - 5%, így elsősorban a kis koncentrációban jelenlevő ún. nyomszennyezések meghatározására használják. Az utóbbi időben kidolgozták a differenciál spektrofotometria módszerét, amivel egy nagyságrenddel nagyobb pontosságot lehet elérni. Ez a módszer már főkomponensek meghatározására is alkalmas. A módszer relatív hibája 0,1 - 0,5%.

A spektrofotometria módszerének előnye nagy érzékenysége, nagy pontossága, rendkívüli egyszerűsége, gyorsasága, kis anyagigénye. A módszer általában még akkor is alkalmazható, ha az anyag egy adott spektrális területen nem mutat szelektív abszorpciót, mert redukálva, oxidálva, vagy komplexet képezve vele már szelektív abszorpciót mutathat.

A módszer hátránya, hogy hozzávetőlegesen tudnunk kell, mik a meghatározandó komponensek. Adott spektrofotometriás módszer alkalmazhatóságát más analitikai módszerekkel kell ellenőrizni. Így a spektrofotometria használata akkor előnyös, ha sorozatmérésekre alkalmazzuk.

3. A spektrofotométer

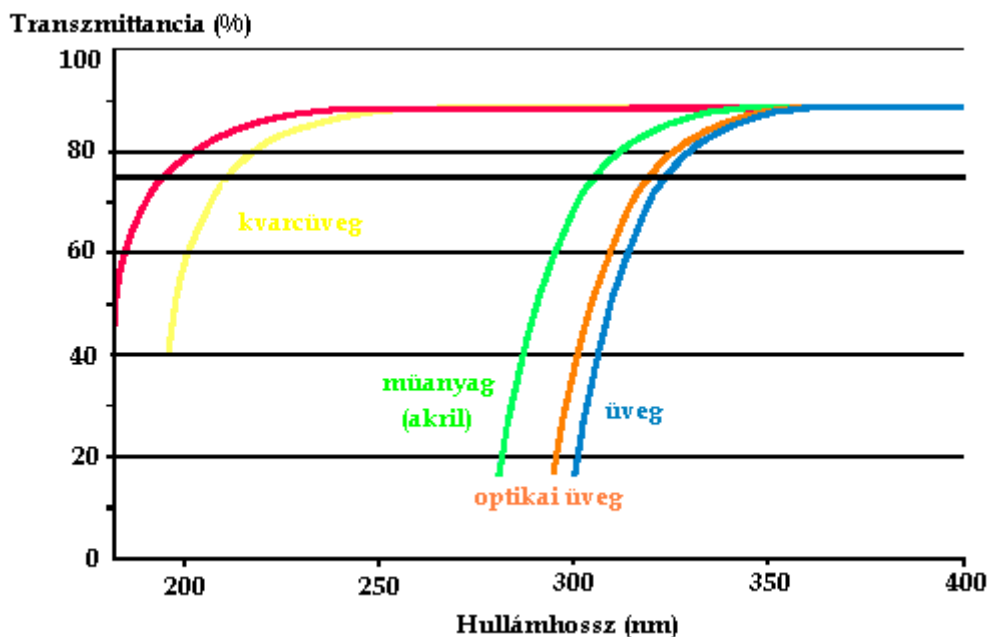
A spektrofotométer olyan optikai berendezés, amellyel a gyakorlatilag monokromatikus fény intenzitását illetve az intenzitás változását nagy pontossággal mérni lehet. A spektrofotométereket több szempontból osztályozhatjuk. Az egyik felosztás, a mérés hullámhossz tartománya szerint ismerünk ultraibolya, látható és infravörös tartományban mérő spektrofotométereket. A másik felosztás, a fényelbontás módja szerint prizmás és rácsos spektrofotométereket. További felosztás, a működési elv illetve a felépítés szerint megkülönböztetünk egysugaras, kétsugaras, valamint szakaszosan működő és folyamatosan működő automatikusan regisztráló spektrofotométereket. A mindennapi gyakorlatban a leggyakrabban kétsugaras és diódasoros fotométerekkel találkozhatunk.

A spektrofotométer fő részei:

- sugárforrás
- mintatér
- monokromátor
- detektor, erősítő
- kijelző rendszer (számítógép)

A sugárforrás a látható fény tartományában wolfram lámpa, az UV tartományban általában hidrogén (újabbán deutérium) lámpa, az infravörös tartományban globár izzó (SiC) vagy Nernst izzó (ritkaföldfémoxid keverék). Nagyon fontos a fűtőáram feszültségének stabilitása, különösen az egysugaras készülékeknél (lásd később).

Mintatérként különböző hosszúságú (0,1 – 10 cm) és kialakítású üveg, kvarc, ritkábban műanyag küvettákat használnak. Érdeemes megjegyezni, hogy némely műanyagból készült küvetta egész jó optikai tulajdonságokkal rendelkezik (pl. áteresztés) így alkalmas a közeli UV-tartományban spektrofotometriás mérések kivitelezésére (1. ábra) mindemellett az ilyen küvetták ára több nagyságrendekkel lehet olcsóbb (pl. egy jó minőségű kvarc küvetta ára 25.000 – 35.000 forint körül van, de 100 darab műanyag küvetta ára mindössze csak 1800 – 2500 forint). Lényeges, hogy a küvetták fény útjába kerülő oldalai egymással párhuzamosak, a fénynyalábra merőlegesek legyenek, egymástól mért távolságuk pontosan meghatározott legyen (a Lambert-Beer törvényben ez utóbbi az úthossz, l).



1. ábra. Különböző anyagból készült küvetták transzmittanciája a hullámhossz függvényében.

A monokromátor a fényforrás összetett fényének felbontására ill. a kívánt hullámhosszúságú (közel) monokromatikus fény kiválasztására szolgál. A prizmás készülékek a fénytörés hullámhosszfüggésén (a prizma a fehér fényt elemeire bontja, a prizma kismértékű forgatásával elérhetjük, hogy a kívánt hullámhosszúságú fény jusson ki a kilépő résen), míg a rácisos monokromátorok a diffrakció ill. interferencia jelenségén alapulnak. Az optikai rácsról visszaverődő fénysugarak interferenciájának következtében minden hullámhosszra más szögben lesz erősítés, így a prizmához hasonló színelbontást kapunk. A különbség annyi, hogy a ráccsal előállított spektrum egyenletes lépésközű, míg a prizmánál a felbontás a kék tartomány felé nagyobb, a vörös felé kisebb. A kiválasztott hullámhosszúságú fényt itt is a rács elfordításával juttathatjuk a kilépő részre (pl. egészen jó optikai rács a CD vagy DVD felülete). A prizmás készülékek általában fényerősek, de hátrányuk, hogy a különböző hullámhossztartományokban a felbontóképességük nem azonos, így a mai modern készülékekben már ritkán használják. Monokromatikus fény előállítására interferenciaszűrő is használható. Az ilyen szűrő lehet pl. üvegre párologtatott vékony dielektrikumréteg-rendszer, amelyen a rétegvastagságtól függő

interferencia következtében szűk hullámhossztartományra van átértesztés a többi visszaverődik.

Detektorként fotocellát, fotoelektronsokszorozót, diódasort használhatnak. A fotocellát napjainkban inkább hordozható vagy egyéb műszerekhez detektorként kapcsolt spektrofotométerekben használják. A fotomultiplierek általában széles hullámhossztartományban használhatók, és a zajszintjük is kedvezőbb. A diódasoros detektor előnye a gyorsaság és széles tartományban érvényes linearitás. Hátrány viszont a kisebb érzékenység.

3.1 Egysugaras spektrofotométerek

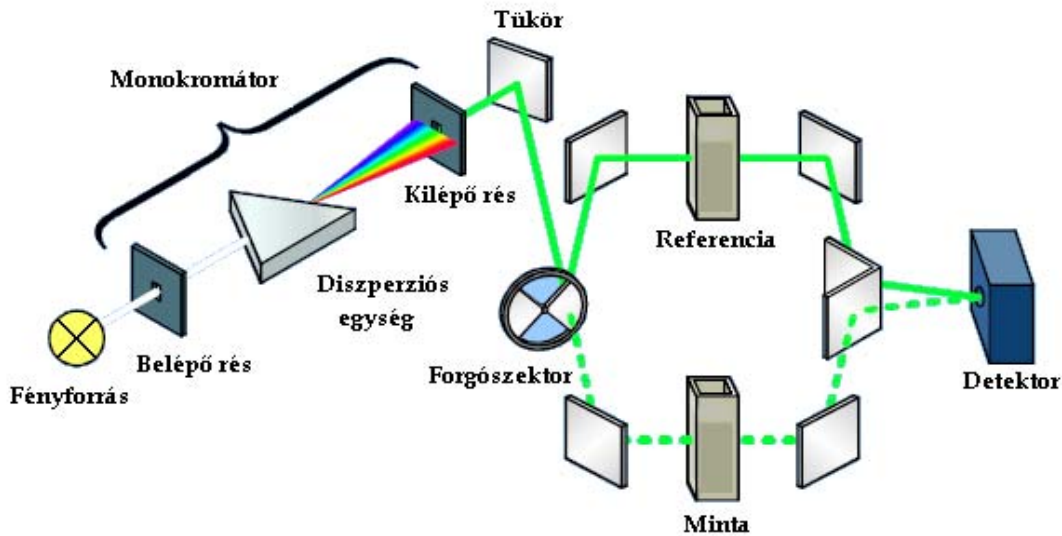
Ezek a készülékek is alapvetően két típusra oszthatók: közvetlen kitérésű és kompenzációs elven működő berendezésekre. A közvetlen kitérésű egysugaras készülékeknél (pl. Spekol) a fényintenzitással arányos elektromos jel elektronikus erősítés után közvetlenül kerül kijelzésre. A referencia-oldatot a fényútba helyezve kell nullázni a műszert ($T\% = 100$, $A = 0$), majd a mintát helyezve a fényútba ehhez képest mérjük a fényintenzitás csökkenését. E készüléktípus előnyei az olcsóság, egyszerű felépítés, legtöbb esetben kis méret, kevés hibaforrás. Sorozatelemzésekhez, gyári, gyártásközi elemzésekhez jól használható.

Hátrányai, hogy érzékenyek a tápfeszültség változására, a sugárforrás és a detektor időbeli változásaira stb.; ezek a hibák a nullpontstabilitásban, érzékenységben, reprodukálhatóságban, linearitásban jelentkeznek.

A kompenzációval működő egysugaras készülékek az előbbi készüléktípus hibáinak jó részét kiküszöbölik. A detektorból kikerülő elektromos jel egy kompenzációs áramkörre kerül, amelyben az egyensúlyi helyzetet egy nullműszer jelzi. Itt a mérés a következő lépésekből áll: a mintatárba a referenciaoldatot helyezük és a kompenzációs áramkört egyensúlyba hozzuk, ill. ezt egy automata elektronikus vezérlőrendszer végzi. E készüléktípusok igen pontos mérést tesznek lehetővé, ugyanakkor használatuk kissé nehézkes, különösen több hullámhosszon történő mérésnél (spektrum felvétel).

3.2 Kétsugaras spektrofotométerek

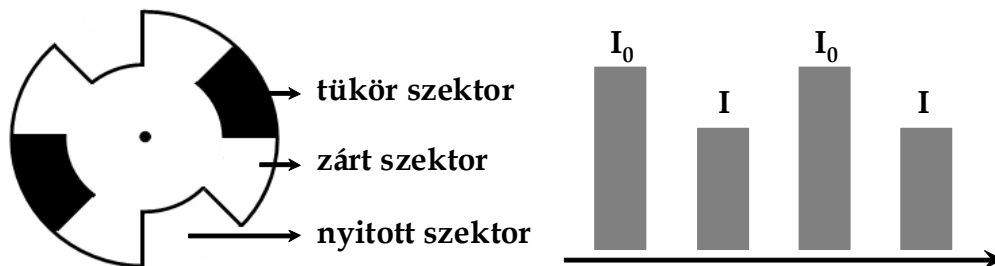
A kétsugaras készülékeknél a sugárforrásból kilépő fényt két fényútra bontják fel, amelyekből az egyik a referenciaoldaton, a másik a mintán halad keresztül (2. ábra). Így gyakorlatilag a két fényintenzitás (I_0 , I) azonos időben hasonlítható össze. Ezzel kiküszöbölődik a tápfeszültség, az elektronika, a sugárforrás esetleges ingadozásából származó hiba.



2. ábra Hagyományos UV-vis készülék vázlatos rajza (ilyen készülék például a Varian Cary 1E vagy a Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotométer is).

Ritkábban alkalmaznak a fényintenzitás mérésére két detektort, mivel nehéz két teljesen azonos jellemzőkkel rendelkező érzékelőt készíteni. Gyakrabban a mintátér után a két fényutat egyesítik, és a fényt egy detektorral alakítják elektromos jellé. Ezt úgy valósítják meg, hogy a két fényjel (I_0 és I) felváltva jelenik meg a detektoron, és a feldolgozó elektronika ezt a periodikus jelet demodulálva képi az abszorbancia jelet ($A = \lg I_0/I$).

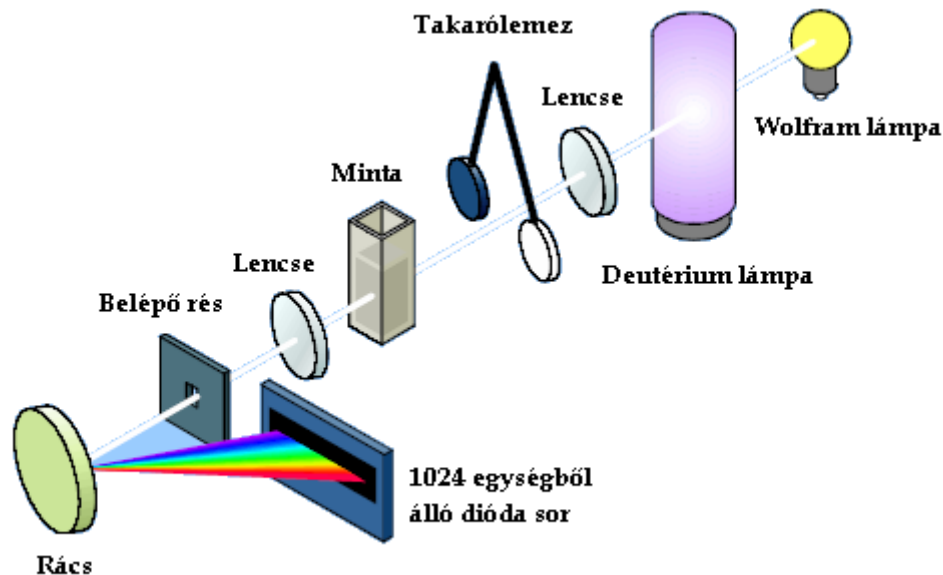
Ehhez a fényfelbontásra általában forgószelet („chopper”-t) alkalmaznak (3. ábra). Így elérhető, hogy megfelelő frekvenciával hol az egyik, hol a másik fényútba jut a lámpa fénye. E készülékek biztosítják a lehetőséget az automatizálásra, spektrumok széles hullámhossztartományban történő regisztrálására, mert kiküszöbölik az egysugaras készülékeknél jelentkező hibák zömét. Az újabb típusoknál szinte már természetes tartozék a számítógép, ami gyorsabbá és kényelmesebbé teszi a méréseket és az adatfeldolgozást.



3. ábra. A forgószelet („chopper”) vázlatos rajza, illetve a detektorba érkező fény intenzitása az idő függvényében.

3.3 Diódasoros detektorral rendelkező spektrofotométerek

A félvezető fotodetektorok olcsóbbá válása tette lehetővé egy új spektrofotométer típus kialakítását. Ebben egy (jellemzően 512 vagy 1024 elemből álló) sor érzékeli a kilépő fényt, amely az ún. polikromátorból érkezik (4. ábra). Azaz a rács / prizma felbontja a fényt, de nem kell kiválasztani egy hullámhosszt, hanem a diódasor, és a hozzá kapcsolt elektronika egyszerre elemezheti a teljes áteresztési spektrumot. Az ilyen elven működő spektrofotométerekben meglehetősen nagy energiájú fény halad át a mintán ezért könnyen előfordulhat, hogy a nagy energiájú fény fotokémia reakciókat indít be amit érdemes szem előtt tartani. A műszer nagy előnye viszont a gyorsasága, ugyanis egy teljes spektrum felvétele nem tart tovább 0,5 - 1 másodpercnél (a kétsugaras spektrofotométereknél ez az idő a hullámhossztartomány függvényében 60 - 90 másodperc) illetve a mintateret nem kell a külső fény hatástól elzárni.



4. ábra Diódasoros spektrofotométer vázlatos rajza (ilyen készülék például a Hewlett-Packard / Agilent 8453 spektrofotométer)

4. A spektrofotometria felhasználási területe

A spektrofotometriának, mint analitikai módszernek igen nagy jelentősége van mind a szerves, mind a szervetlen kémiai gyakorlatban.

Elvileg minden olyan anyag vizsgálható, amelynek elnyelése van a látható, UV (közel IR) tartományban. Általában érvényes, hogy teljesen ismeretlen összetételű vagy túlságosan sok komponensből álló mintáknál csak korlátozottan használható. Igen sok mintatípusra és komponensre dolgoztak ki analitikai eljárást, de számos esetben az előkészítő műveletek bonyolultak és a paraméterek igen pontos betartását igénylik. Így is számos esetben léphet fel valamilyen zavaróhatás, pl. komplexképződés, mellékreakció, nem szelektív színreakció stb. Ugyanakkor éppen

ezekre a paraméterekre való érzékenység teszi alkalmassá a módszert a különböző oldategyensúlyi, reakciókinetikai stb. vizsgálatokhoz.

Eltérés a Lambert-Beer törvénytől

A Lambert-Beer törvény híg oldatokra érvényes, a gyakorlatban 10^{-2} – 10^{-3} mol/cm³-nél nincs jelentős eltérés. Töményebb oldatok esetén a törésmutató változása miatt az abszorpciós koeficiens állandósága helyett az alábbi kifejezés konstans:

$$\frac{a \cdot n}{(n^2 + 2)^2}$$

ahol a : az abszorpciós koeficiens, n : a törésmutató

Emellett tömény oldatokban asszociációs és szolvatációs jelenségek is eltérést okozhatnak a törvénytől. Híg oldatok esetében is tapasztalhatunk eltérést a Lambert-Beer törvénytől, ezek fizikai és kémiai okokra vezethetők vissza.

A fizikai okok közül a legfontosabb az, hogy a mintába lépő fény nem teljesen monokromatikus. Ekkor a kalibrációs görbe a koncentráció tengely felé hajlik. A résszélesség csökkentésével ezt a hatást mérsékelhetjük, de ekkor csökken a detektorra jutó fény mennyiség is, amelyet az erősítés növelésével tudunk kompenzálni. Ez viszont együtt jár a zajszint növekedésével, így a mérés pontosságának romlásával.

Kémiai okokra vezethetjük vissza az eltérést, ha a vizsgálni kívánt komponens koncentrációváltozása nem egyenesen arányos a mérni kívánt forma koncentrációváltozásával. Azaz, ha az oldatban asszociáció, disszociáció, szolvatáció, komplexképződés stb. megy végbe. Ezenkívül hatása lehet az oldószer összetételének, a pH-nak, a hőmérsékletnek, egyéb mátrixanyag koncentrációváltozásának.

Jellegzetes példa a gyakorlatban vizsgált indikátor koncentráció meghatározása (lásd később). Különböző pH-nál a disszociált és a disszociálatlan forma aránya más-más, így természetesen változik a spektrum is. A két forma abszorpciós sávjának viszont van egy közös pontja, izobesztikus pont, ahol az abszorpciós koeficiensük azonos. Itt megvan a lehetőség a pH-tól (általánosan, mint körülménytől) független koncentráció meghatározásra.

Több komponens egymás melletti meghatározása

Az elegyek abszorpciós spektruma a komponensek spektrumából additíve tevődik össze.

$$A_{\text{össz.}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

Így elvileg lehetőség van legalább n különböző hullámhosszon mérve n komponens meghatározására, mivel

$$A_{\text{össz.}} = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l$$

felírható az összes hullámhosszon.

Mérve a tiszta komponensek abszorpciós spektrumát, a koncentráció ismeretében $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots$ abszorpciós koefficiensek minden hullámhosszon számolhatók. Így a keverék minta abszorpciójából egy n ismeretlenes egyenletrendszerrel a koncentrációk számolhatók. Két komponens esetén (A, B anyag és λ_1, λ_2 hullámhosszakon):

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_1) = \varepsilon_{A(\lambda_1)} c_A l + \varepsilon_{B(\lambda_1)} c_B l$$

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_2) = \varepsilon_{A(\lambda_2)} c_A l + \varepsilon_{B(\lambda_2)} c_B l$$

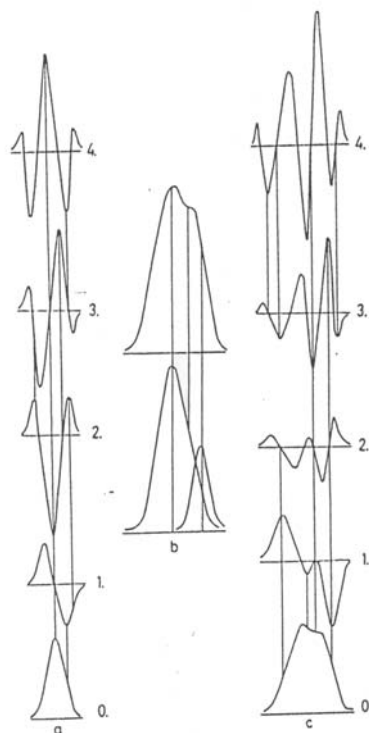
5. Derivatív spektrofotometria

5.1 A módszer elvi alapjai

Mind a háttérkorrekció, mind az átfedő sávok kvalitatív és kvantitatív elemzésre történő alkalmazhatósága szempontjából az utóbbi évtized legfontosabb fejleménye volt a derivatív spektrofotometria bevezetése. A módszer elve (az abszorbancia hullámhossz szerinti deriválása) korábban is ismert volt, azonban csak a legutóbbi években váltak hozzáférhetővé azok a spektrofotométerek, amelyek mikroszámítógép segítségével képesek a spektrum felvételével egyidőben a derivált spektrumokat is regisztrálni.

Az ábra a része az idealizált Gauss-görbe típusú abszorpciós sávot, és annak 1.-4. deriváltjait szemlélteti. A b ábrán az átfedő abszorpciós sáv kialakulását láthatjuk két különböző intenzitású Gauss-görbe alakú sávból. A c ábra pedig ezen összetett sáv 0.-4. deriváltjait mutatja be.

Mivel a deriválás során az eredeti függvény maximum- ill. minimumhelyei zéró értéket vesznek fel, az inflexiókból pedig maximum- ill. minimumhelyek lesznek, a derivált spektrumok sokkal strukturáltabbak, mint az eredetiek. Az első deriváltak és általában a páratlan számú deriváltaknak kisebb a jelentősége, a gyakorlatban inkább a második és negyedik derivált spektrumokat használják, de van példa magasabb rendű deriváltak alkalmazására is. A főcsúcs a második deriváltban negatív, a negyedikben pozitív irányú, és mindkettőt a rendűség növekedtével egyre bonyolultabbá váló mellékcsúcs-rendszer kíséri.



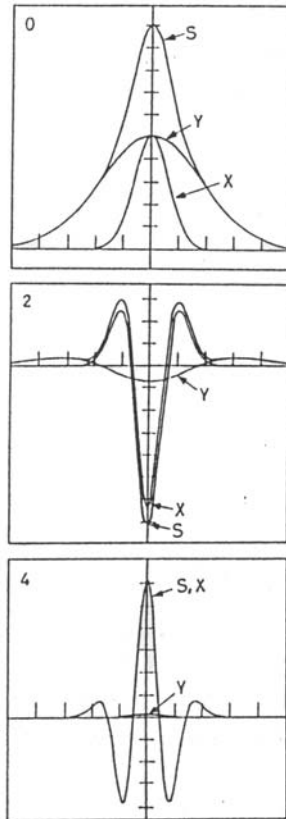
5. ábra Az abszorpciós spektrum deriválása.

5.2 A módszer elvi alapjai

A derivatív spektrofotometria a hagyományos spektrofotometriához viszonyítva négy területen jelent előrelépést:

1. *Kvalitatív analízis.* A derivatív spektrumok alkalmasak az alap spektrumban mutatkozó minimális különbségek kiemelésére. Különösen vonatkozik ez az izolált aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek finomszerkezetű sávjaira.
2. *Monoton háttér spektrum kiejtése a kvantitatív analízisben.* A deriválás szabályaiból következik, hogy a konstans háttér már az első derivált eliminálja: Amennyiben a háttér lineáris függvénye a hullámhossznak, a második derivált lesz zéró. A negyedik derivált esetében magasabb rendű függvénynek megfelelő monoton háttér spektrumok is kiejthetők.
3. Az egyszerűbb háttérproblémák megoldására gyakran az első derivált is elegendő, mert rövidebb hullámhossz tartományra vonatkoztatva a háttér közelítőleg állandónak vehető. A háttér eliminációnak ez a lehetősége nemcsak a fényabszorpcióból, hanem a fényszórásból eredő hátterekre is vonatkozik, vagyis a derivatív spektrofotometria opálos oldatok analízisére is alkalmas.
4. *Átfedő széles sáv eliminálása keskeny sávval rendelkező anyag mennyiségi analízise során.* A derivatív spektrofotometria egyik alapvető egyenlete összefüggést állapít meg az n -ed rendű derivatív spektrum sávintenzitása (A_n), a zéró-rendű spektrum (abszorpciós spektrum) sávintenzitása (A_0) és sáv szélessége (W), valamint a derivált rendűsége (n) között. Az egyenlet azt fejezi ki, hogy a sáv szélesség

növekedtével a derivált görbe sávjainak intenzitása rohamosan csökken. Ebből következik, hogy a deriválással a széles és éles sávok közötti különbség nő.



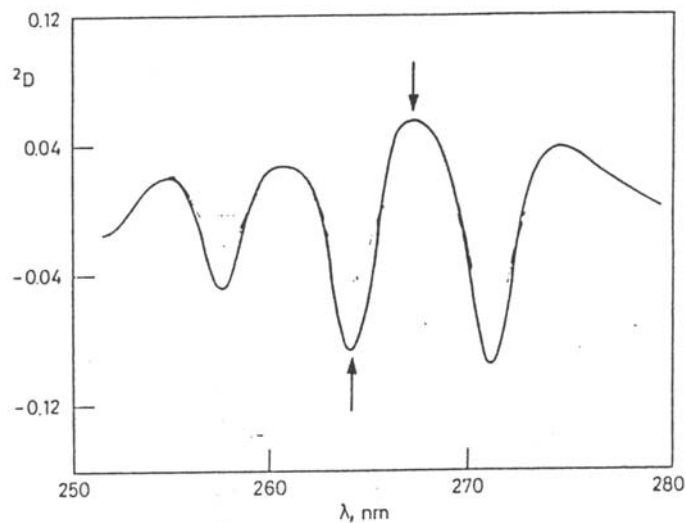
6. ábra Széles sáv eliminálása a vele egybeeső keskeny sáv (X) mérése során a 2. és 4. derivált spektrumok alkalmazásával ($S = X+Y$).

Az ábrán látható **S** abszorpciós spektrum két pontosan egybeeső, de sávszélességben jelentősen különböző **X** és **Y** komponensből áll ($W_Y = 3W_X$). **Y** intenzitása már a 2. derivált esetében az eredeti 1/7-ére csökken, a 4. derivált pedig csaknem beleolvad az alapvonalba. Ugyanakkor az **X** komponens és az eredő **S** görbe deriváltja 2. deriváláskor csaknem, 4. deriváláskor pedig teljesen egybeesik.

5. *Két- vagy többkomponensű rendszerek analízise derivatív spektrofotometria és algebrai módszerek kombinációjával.* A derivált spektrumok (különösen a magasabb rendűek) erősen strukturált voltukból következően számos pozitív és negatív maximumhellyel rendelkeznek. Így könnyen lehet találni olyan hullámhosszakat, ahol a meghatározni kívánt komponens derivált jele maximális, a másiké pedig minimális. Az algebrai módszerek ismertetése az anyag kereteit meghaladja, az érdeklődők számára jó összefoglalás található Görög Sándor: *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis* c. könyvében (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993.).

A magasabb rendű deriváltak felvétele és alkalmazása az előnyök mellett számos nehézséggel is jár. Egyrészt a deriválás rendűségének növelésével a jel/zaj arány csökken, másrészt az egyre bonyolultabbá váló mellékmaximum-rendszer zavarhatja a szomszédos csúcsok kiértékelését.

5.3 A jel a derivatív spektrofotometriában



7. ábra. A derivatív spektrofotometriás jel.

A kvantitatív analízis alapja a derivált spektrum amplitúdója, amely általában egyenesen arányos a koncentrációval, ezt azonban új mérési feladat beállításakor mindig ellenőrizni kell!

Az amplitúdót meghatározhatjuk:

- a derivált spektrum zéróvonalától számítva;
- a sáv két kiindulási pontjában meghúzott alapvonalától számítva;
- egy szomszédos maximum és minimum magasságának különbségeként.

6. Gyakorlatok

A gyakorlatok során elkészített oldatok abszorpciós spektrumait az alábbi képen látható Jasco V-770 típusú UV-Vis-NIR spektrofotometriás készülék segítségével vesszük fel.



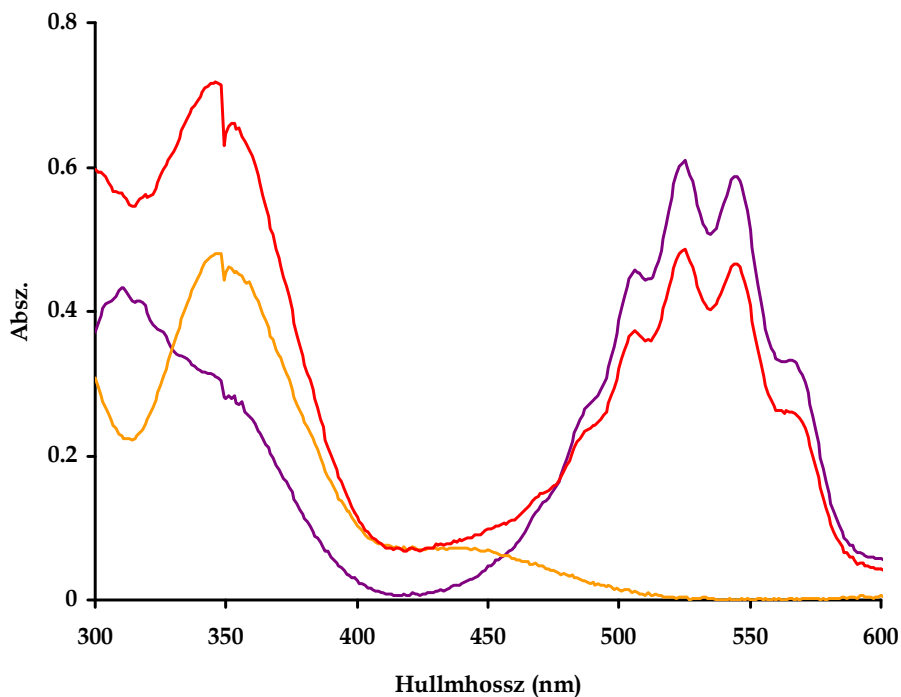
Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotométer

6.1. Cr(III) és Cr(VI) ionok illetve 6.2. Mn(VII) és Cr(VI) ionok egymás melletti meghatározása

Az a tény, hogy elegyek esetében a minta abszorpciós spektruma a komponensek spektrumából tevődik össze lehetőséget biztosít koncentráció meghatározásra többkomponensű rendszerben. Erre több gyakorlat is épülhet, és a leggyakoribbak közé tartozik a Cr(III) és Cr(VI) ionok illetve Mn(VII) és Cr(VI) ionok egymás melletti közvetlen meghatározása. A gyakorlaton elkészítendő oldatokat az alábbi képen láthatjuk (a képen balról jobbra haladva $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 0,1 M H₂SO₄ oldat (vak) és egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve)). Ezeket az oldatokat a gyakorlat során is el kell készíteni és felvenni a minták abszorpciós spektrumait 300 – 650 nm között.



8. ábra A gyakorlaton elkészítendő egyik oldatsorozat (balról jobbra haladva: $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 0,1 M H₂SO₄ oldat (vak) és egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve)).



9. ábra. A gyakorlaton elkészítendő egyik oldatsorozat abszorpciós spektrumai (lila – $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), narancssárga – 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), és piros – egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve)).

A spektrumokat elemezve elmondható, hogy az ismeretlen minta $K_2Cr_2O_7$ – koncentrációja gyakorlatilag megegyezik a standard kromát-oldat koncentrációjával oldat (a 420 nm körüli abszorbancia adatokból következtethetünk erre, mivel ezen a hullámhosszon gyakorlatilag csak a kromátion nyel el). Az előző esethez hasonlóan, az 550 nm körül csak a permanganátionnak van elnyelése, így az ezen a hullámhosszon mért abszorbancia adatok összehasonlításával elmondható, hogy az ismeretlen minta $KMnO_4$ koncentrációja kb. a 80%-a a standard oldat koncentrációjának. Az így leolvasott adatok, csak tájékozódásul szolgálhatnak, de az eredmény ellenőrzésére használható. A gyakorlaton ennél pontosabban kell a koncentrációkat megadni (négy értékes jeggyel).

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése, a Lambert–Beer törvény alkalmazása, az abszorbancia additivitásának alkalmazása kétkomponensű rendszer esetére.

Feladat:

- 6.1. Ismeretlen oldat Cr(III) és Cr(VI) tartalmának meghatározása
- 6.2. Ismeretlen oldat Cr(VI) és Mn(VII) tartalmának meghatározása

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Törzsoldatok ($0,1 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú $CrCl_3$ vagy $0,0382 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú $Cr_2(SO_4)_3$ króm(III) törzsoldatokat lehet használni, $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Mn(VII) törzsoldat és $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldat)
 $0,25 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ oldat

Folyadéküveges leosztó (diszpenzer) a savoldat adagolásához

A savoldat készítéséhez balesetvédelmi szempontból sokkal kisebb veszélytényezővel járó térfogatmérő eszközt, a diszpenzert, használunk. Az eszköz szabályos használata a következő.

1. *távolítsuk el a védőkupakot a diszpenzer kifolyó nyílásáról.*
2. *a diszpenzer csapját állítsuk „nyit” pozícióba*
3. *állítsuk be a megfelelő térfogatot a diszpenzer felső részének óvatos eltekerésével*
4. *óvatosan töltsük fel a diszpenzert a felső egység óvatos emelésével*
5. *helyezzük a diszpenzer kifolyó nyílása alá a lombikot és lassan engedjük bele a kívánt mennyiségű savat.*
6. *zárjuk el a diszpenzer fő csapját és helyezzük vissza a védőkupakot a kifolyónyílásra.*

Figyelem: a diszpenzer nem szakszerű használatából eredő károkért az anyagi felelősség a hallgatót terheli.

- 3 db 25 cm^3 -es mérőlombik
- 3 db 1 cm-es kvarc küvetta küvettatartóban
- 1db $1\text{-}5 \text{ cm}^3$ -es automata pipetta
- 200 cm^3 -es főzőpohár mosogatáshoz

Papírtörlő

Előkészítés:

6.1. A rendelkezésre álló $0,1 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(III) oldatból $25 \text{ cm}^3 \cdot 2 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ oldatot, az $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldatból pedig $25 \text{ cm}^3 \cdot 2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot készítünk, melyeknek kénsav koncentrációja $0,1 \text{ mol/dm}^3$ legyen. A spektrofotometriás méréshez összehasonlító oldatként $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kénsavat készítünk.

6.2. A rendelkezésre álló $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Mn(VII) oldatból $25 \text{ cm}^3 \cdot 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot, az $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldatból pedig $25 \text{ cm}^3 \cdot 2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot készítünk, melyeknek kénsav koncentrációja $0,1 \text{ mol/dm}^3$ legyen. A spektrofotometriás méréshez összehasonlító oldatként $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kénsavat készítünk.

Mérés:

Az előkészített Cr(III), Cr(VI) illetve a Mn(VII), Cr(VI) és az ismeretlen oldatok spektrumát $300\text{-}650 \text{ nm}$ között regisztráljuk kvarc küvetták segítségével.

Értékelés:

Válasszuk ki a spektrumból a két komponens méréséhez legmegfelelőbb hullámhosszakot és határozzuk meg a Cr(III) és Cr(VI) moláris abszorpciós koefficienseit ($\epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}})$, $\epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}})$, $\epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}})$ és $\epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}})$) illetve a Mn(VII) és Cr(VI) moláris abszorpciós koefficienseit ($\epsilon^{\lambda_1}(\text{Mn}^{\text{VII}})$, $\epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}})$, $\epsilon^{\lambda_2}(\text{Mn}^{\text{VII}})$ és $\epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}})$). A kapott értékek segítségével határozzuk meg az ismeretlen oldat Cr(III) és Cr(VI) illetve Mn(VII) és Cr(VI) koncentrációját az alábbi két ismeretlenes egyenletrendszer megoldásával (az egyik egyenletből fejezzük ki az egyik koncentrációt, majd helyettesítsük be azt a másik egyenletbe. Az így kapott egyenletet oldják meg, majd a kapott eredményt helyettesítsék vissza az elő egyenletbe).

$$\begin{aligned} A^{\lambda_1} &= \epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l + \epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) l \\ A^{\lambda_2} &= \epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l + \epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) l \end{aligned}$$

A feladat megoldása bizonyos esetekben egyszerűsíthető, ha létezik olyan hullámhossz ahol csak az egyik komponens nyel el (tehát a másik komponens moláris abszorbananciája nullával egyenlő). Tételezzük fel, hogy a Cr^{VI} esetére létezik ilyen tartomány (pl. $550\text{-}600 \text{ nm}$ között). Ebben az esetben az első egyenlet egyszerűsödik és a következő egyenletrendszert kapjuk:

$$\begin{aligned} A^{\lambda_1} &= \epsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l \\ A^{\lambda_2} &= \epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l + \epsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) l \end{aligned}$$

Az első egyenletből a Cr^{III}-koncentrációja közvetlenül számolható. Majd ezt a koncentrációt és a meghatározott moláris abszorbanacia adatokat a második egyenletbe helyettesítve a Cr^{VI} koncentrációja is könnyen számítható.

Beadandó eredmények:

- A Cr(III)-, a Cr(VI) és az ismeretlen oldat abszorpciós spektruma
- Az ismeretlen oldat Cr(III)-, és Cr(VI) koncentrációja

illetve

- A Cr(VI)-, a Mn(VII) és az ismeretlen oldat abszorpciós spektruma
- Az ismeretlen oldat Cr(VI)-, és Mn(VII) koncentrációja

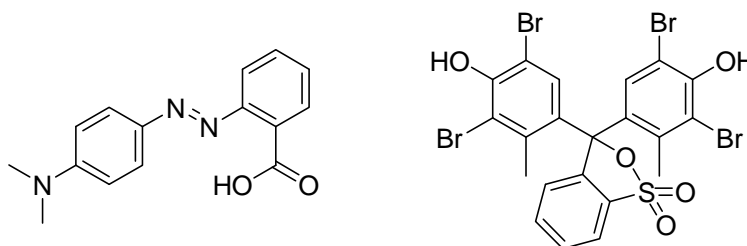
6.3. Metilvörös és 6.4. brómkrezolzöld indikátorok koncentrációjának meghatározása

A sav-bázis indikátorokat sokat használunk analitikai kémiai gyakorlatokon hiszen a sav-bázis titrálások végpontjelzésére alkalmas vegyületekről van szó. Az ilyen indikátorok olyan szerves molekulák amelyek képesek a közeg pH-jának a változását színreakcióval kíséni, azaz a protonleadásuk vagy protonfelvételük után bekövetkező molekulán belüli kötésátrendeződésük színváltozással jár. Így a molekula savi vagy bázikus formája a más-más komponensét nyeli el. A színváltozás egy adott pH-tartományban játszódik le amit az indikátor átcsapási tartományának nevezünk. A teljes pH skála lefedhető különböző indikátorokkal erre példát az alábbi táblázat tartalmaz:

Táblázat 2. Néhány indikátor átcsapási pH-tartománya, ill. a savi és bázis formáinak színe.

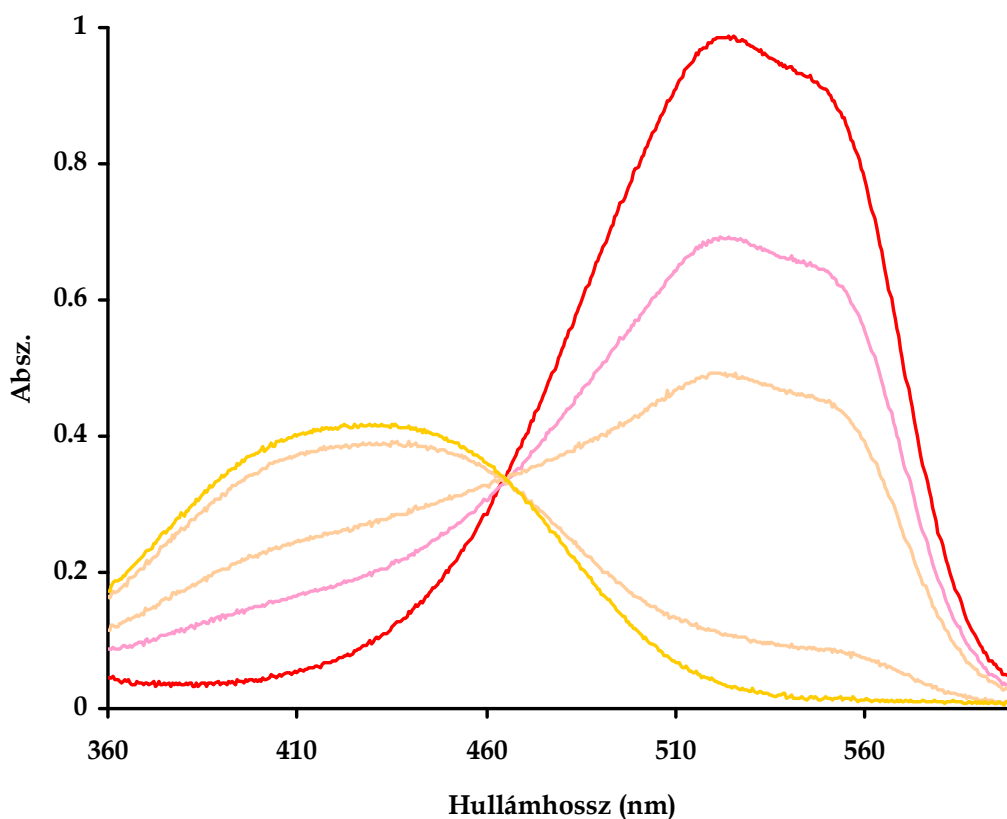
Indikátor	Átcsapási tartomány	Sav	Bázis
Malahit zöld	0,2-1,8	sárga	kékes-zöld
Timol kék	1,2-2,8	vörös	sárga
Metil sárga	2,9-4,0	vörös	sárga
Metil narancs	3,1-4,4	vörös	sárga
Brómfenol kék	3,0-4,6	sárga	ibolyás kék
Brómkrezol zöld	4,0-5,6	sárga	kék
Metil vörös	4,4-6,2	vörös	sárga
Brómkrezol bíbor	5,2-6,8	sárga	bíbor
Brómfenol kék	6,2-7,6	sárga	kék
Fenol vörös	6,4-8,0	sárga	vörös
Krezol vörös	7,2-8,8	sárga	vörös
Fenolftalein	8,0-10,0	színtelen	rózsaszín
Timolftalein	9,4-10,6	színtelen	kék
Alizarin sárga	10,0-12,0	sárga	lila
Trinitrobenzoesav	12,0-13,4	színtelen	vénarancs

A gyakorlaton vizsgált két indikátor szerkezeti képlete az alábbi ábrán látható:



10. ábra A metilvörös (bal) és bromkrezolzöld (jobb) indikátorok szerkezete.

A talán leggyakrabban használt sav-bázis indikátor a metil vörös savas közegben piros színű (az elnyelési maximuma $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$), bázis jelenlétében pedig sárga színű ($\lambda_{\max} = 419 \text{ nm}$). Savas környezetben az egyik nitrogénatom protonálódása miatt a konjugált rendszer megszakad, ami lúg hozzáadásával könnyen visszaalakítható. Ez a szerkezeti átalakulás okozza a színváltozást is. Az 11. ábra a metilvörös különböző pH-jú oldatait mutatja be. Az ábrán jól látható, hogy az abszorbancia nem csak a koncentráció, de pH függvénye is. Tehát különböző pH-jú oldatokra, ha az abszorbanciát a csúcsmaximumokon mérnénk nem lenne igaz a Lambert-Beer törvény, azaz a módszer nem lenne alkalmazható. A görbéknek van azonban egy közös metszéspontja, amely a pH-tól független abszorbanciát ad. Ez az úgy nevezett izobesztikus pont, ahol a két egymással egyensúlyban lévő részecskék (formák) moláris abszorpciós koefficiense megegyezik. Erre a pontra már alkalmazható a Lambert-Beer törvény, tehát ennek az ismeret lehetővé válik a színezék koncentrációjának a meghatározása.

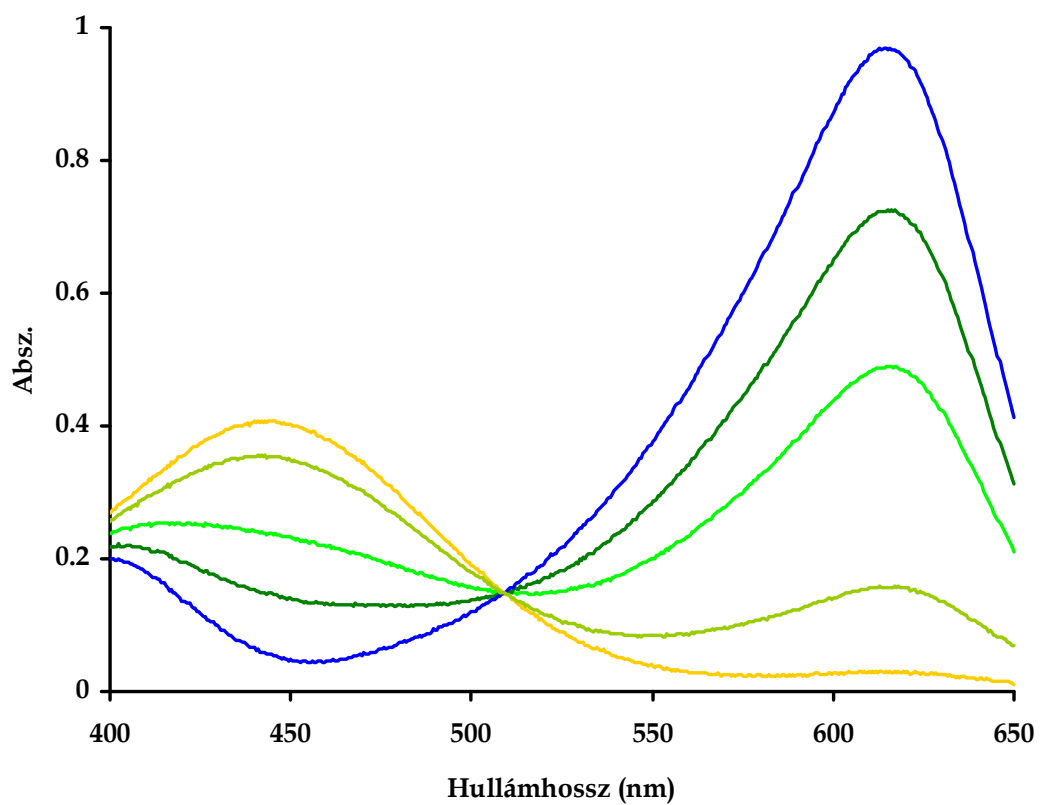


11. ábra. A metilvörös abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban.

A brómkrezolzöld indikátor esetében a savas közegben lévő, fenolos O-atomon protonált vegyület sárga színű ($\lambda_{\max} = 442 \text{ nm}$), ami lúg hatására kék színű ($\lambda_{\max} = 613 \text{ nm}$) deprotonált formába megy át amint azt az alábbi ábra is szemléltet.



12. ábra. A brómkrezolzöld indikátor különböző pH-jú oldatai



13. ábra. A brómkrezolzöld abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban.

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése, a Lambert-Beer törvény alkalmazása, koncentráció meghatározás moláris moláris abszorpciós koefficiensek ismeretében.

Feladat:

6.3. Metilvörös indikátor moláris abszorpciós koefficiensének és koncentrációjának a meghatározása

6.4. Brómkrezolzöld indikátor moláris abszorpciós koefficiensének és koncentrációjának a meghatározása

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Indikátor törzsoldatok ($5,0 \times 10^{-4}$ mol/dm³ koncentrációjú metilvörös és brómkrezolzöld törzsoldat)

0,2 mol/dm³ koncentrációjú ecetsav és nátrium-acetát oldatok puffer készítéshez

5 db 50 cm³-es mérőlombik

2 db 1 cm-es műanyag küvetta küvettatartóban

1db 1-5 cm³-es automata pipetta

1db 0,1-1 cm³-es automata pipetta

200 cm³-es főzőpohár mosogatáshoz

Papírtörölő

Feladat:

Az izobesztikus pont hullámhosszának, és ezen a hullámhosszon a metilvörös (illetve brómkrezolzöld) moláris abszorpciós koefficiensének meghatározása ismert koncentrációjú, de különböző pH-jú oldatsorozat segítségével.

Ismeretlen koncentrációjú metilvörös (illetve brómkrezolzöld) oldat koncentrációjának meghatározása.

Előkészítés:

50 cm³-es mérőlombikokba mérjük be rendre 2,5 - 2,0 - 1,5 - 0,5 - 0 cm³ 0,2 mol/dm³ koncentrációjú ecetsavat és 0 - 1 - 2 - 4 - 5 cm³ 0,2 mol/dm³ nátrium-acetát oldatot. A lombikok tartalmát töltjük fel desztillált vízzel kb. 40 cm³-ig, majd a rendelkezésre álló 5×10^{-4} mol/dm³-es metilvörös (a 6.4 gyakorlat esetében brómkrezolzöld) oldatból adjunk hozzá 2 - 2 cm³-t. A lombikok tartalmát töltjük jelleg desztillált vízzel és a lombik tartalmát homogenizáljuk.

Mérés:

Vegyük fel az elkészített oldatsorozat és az ismeretlen metilvörös illetve oldat spektrumát összehasonlítóként desztillált vizet használva 350-600 (metilvörös) illetve 400 - 650 (brómkrezolzöld) nm tartományban műanyag küvettában (a műanyag küvetták ebben a tartományban a üveg vagy speciális üveg küvettákhoz hasonlóan jól fényáteresztő képességgel rendelkeznek (lásd az 1. ábrát).

Értékelés:

Ha pontosan dolgoztunk, az azonos koncentrációjú metilvörös illetve brómkrezolzöld oldatok spektrumai egy pontban metszik egymást (u.n. izobesztikus pont). Határozzuk meg a metszésponthoz tartozó hullámhosszat és abszorbanca értéket. Az abszorbanca és a koncentráció segítségével (vigyázat mert itt már nem a törzsoldat koncentrációval kell számolni hiszen az 25×-ére hígult) számítsuk ki a színezék moláris abszorpciós koefficiensét a következő összefüggés alapján (az összefüggésben a λ jelzés az izobesztikus pont hullámhosszát jelöli):

$$A^\lambda = \varepsilon^\lambda \times c(\text{sz}) \times l$$

Az ismeretlen oldatra olvassuk le az abszorbanca adatot a spektrumból az izobesztikus pont hullámhosszán és az előző lépésben kiszámolt moláris abszorpciós koefficiens segítségével számoljuk ki az ismeretlen oldat koncentrációját ($c(\text{sz})$).

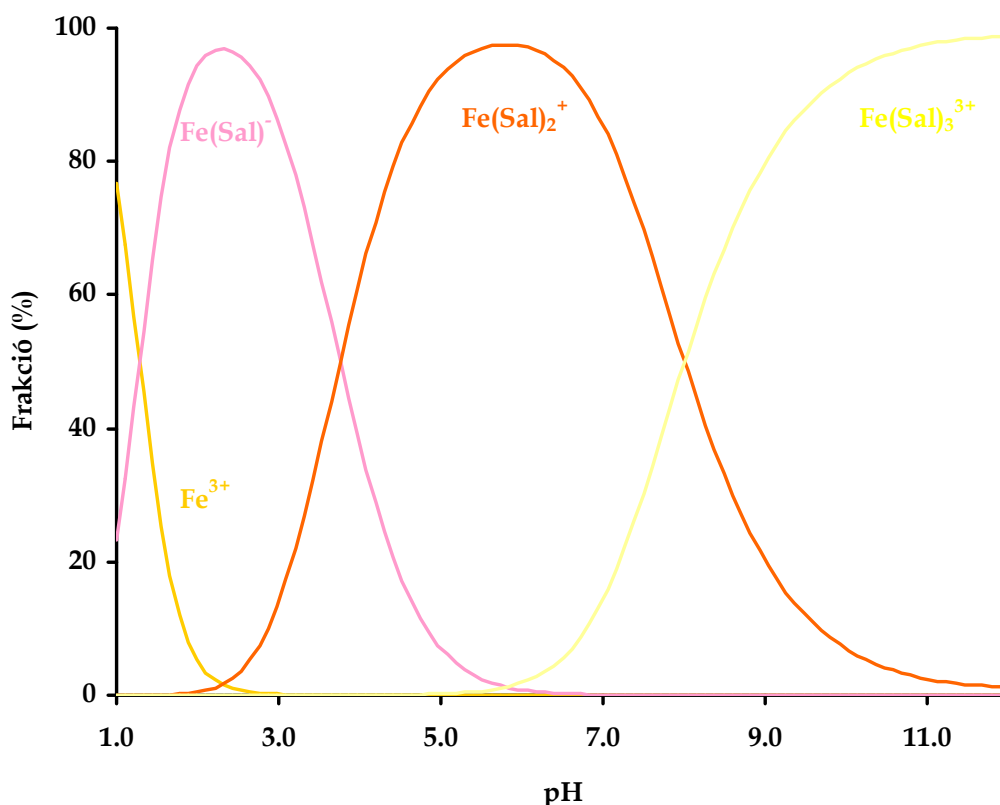
Beadandó eredmények:

- A színezékek abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban
- A színezék moláris abszorbanciája az izobesztikus pontban
- Az ismeretlen oldat koncentrációja

6.5. Szalicilsav koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével

A hidroxilcsoportot tartalmazó szerves vegyületek jól ismert és széles körben elterjedt komplexképzők. Nagy jelentősége van azoknak, amelyek egymáshoz közel lévő -OH csoportokat (pirokatechin) vagy egy -OH és egy -COOH csoportot tartalmaznak (szalicilsav, szulfoszalicilsav). Ezek számos fémmel nagy stabilitású belső komplex vegyületeket alkotnak, így azok mennyiségi meghatározására is alkalmasak. A vas(III)-ion híg fenol (C_6H_5-OH), hidrokinon ($C_6H_4(OH)_2$), pirogallol ($C_6H_3(OH)_3$), szalicilsav ($C_6H_4OH-COOH$ ($M_r=138,10$ g/mol)) illetve szulfoszalicilsav ($SO_3H_2-C_6H_3OH-COOH$) ligandumokkal intenzív színnel rendelkező komplexeket képez.

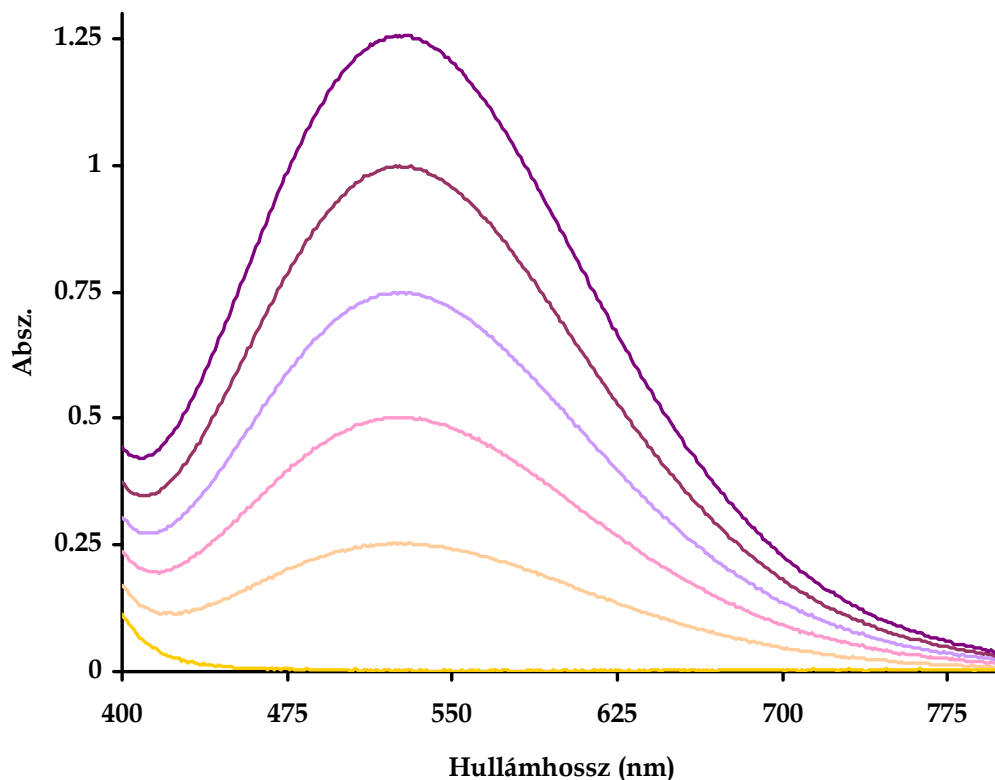
Érdeemes megjegyezni, hogy a Fe^{3+} -ion a felsorolt ligandumokkal többféle stöchiometria szerint reagálhat. A szulfoszalicilsavval például savas közegben $pH = 1,8 - 2,5$ között lila $[Fe(Sal)]^+$ komplex kation képez. A pH -t $4 - 8$ közé állítva vörösbarna $[Fe(Sal)_2]^-$ komplex, míg magasabb pH -n ($pH = 8 - 11,5$ között) sárga színű $[Fe(Sal)_3]^{3-}$ komplex anion keletkezik (ahol a Sal^{2-} a szulfoszalicilsav anionját jelenti), ami az alábbi koncentráció eloszlási görbén ez jól látható is (14. ábra). Fémion felesleg alkalmazásával viszont elérhető, hogy a $Fe(III)$ -ionok $[Fe(Sal)]^+$ -komplex formában legyenek jelen az oldatban ezáltal lehetőséget biztosítva a szulfoszalicilsav mennyiségi meghatározására (a példa szulfoszalicilsavra vonatkozik, de az egyensúly, a szerkezetileg analóg gyógyszerhatóanyag hidrolízis termékeként ismeretes szalicilsav esetére is nagyon hasonló).



14. ábra. Koncentráció eloszlás a Fe^{3+} – Sal^{2-} – H^+ rendszerben $c(\text{Fe}^{3+}) = 1.0 \text{ mM}$ és $c(\text{Sal}^{2-}) = 3.0 \text{ mM}$ koncentrációknál (az eloszlás számolásához használt protonálódási állandókat (ligandum) és Fe(III) -komplexek stabilitási állandóit a A. E. Martell, R. M. Smith, M. R. J. Motekaitis, szerzők által szerkesztett „Critically Selected Stability Constants” adatbázisból vettük (Texas A&M University, Ver 8., 2004)).

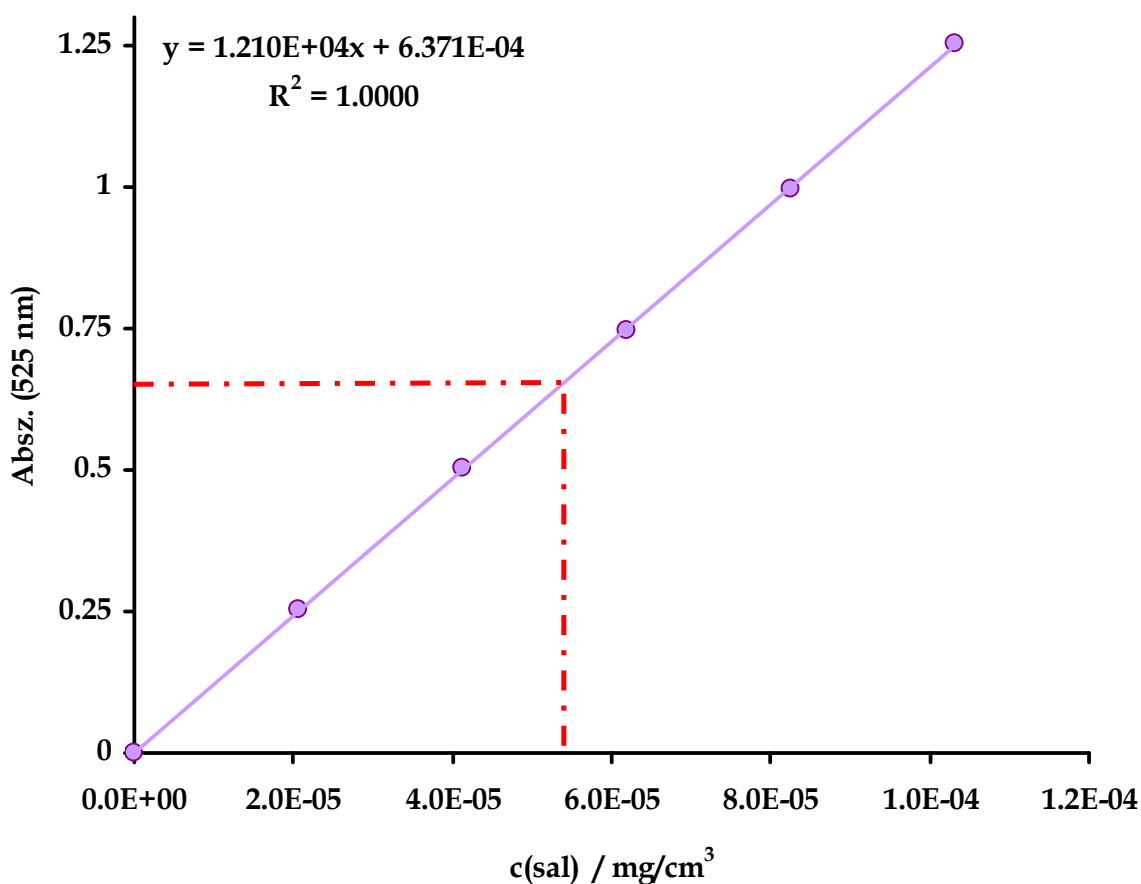


15. ábra. A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplexből készített különböző koncentrációjú oldatok. ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig jobbról balra haladva a következők voltak: $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$).



16. ábra. A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplex abszorpciós spektrumai a koncentráció függvényében ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig rendre, 0 g/cm^3 ; $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$).

A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplex elkészített oldatai ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig rendre, 0 g/cm^3 ; $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$) a 15. ábrán láthatók, az oldatsorozat spektrumait pedig a 16. ábra tartalmazza. A 16. ábrán látható spektrumokból, 525 nm-en kiolvassa az abszorbancia adatokat és azt a szalicilsav koncentrációjának a függvényében ábrázolva az alábbi kalibrációs egyenest kapjuk (17. ábra). Excel program segítségével a kalibrációs egyenes egyenlete $y = 12100 + 0,00064x$ melynek segítségével az ábrán piros szaggatott vonallal jelölt ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációja könnyen számolható (jelen esetben a tengelymetszet olyan kis érték, hogy annak elhagyása nem okoz semmiféle hibát, a jelenléte pedig az adott hullámhosszon FeCl_3 oldat elhanyagolhatóan kis elnyelésének tudható be). Az itt bemutatott ismeretlen oldat 525 nm-en mért abszorbanciáját felhasználva ($A = 0,683$) az ismeretlen oldat koncentrációja $5,64 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ -nek adódik, amely koncentráció egységet a szalicilsav moláris tömege felhasználásával átalakítható anyagmennyiség (mol/dm^3) koncentráció egységbe.



17. ábra. Kalibrációs görbe a szalicilsav koncentrációjának a meghatározásához.

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése és a Lambert-Beer törvény alkalmazása. Szalicilsav koncentrációjának meghatározás kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Feladat:

Szalicilsav koncentrációjának meghatározás kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Szalicilsav törzsoldat (1,0 mg/cm³ koncentrációjú standard szalicilsavoldat 1:10 metanol:víz FeCl₃ vagy Fe₂(SO₄)₃ törzsoldat (1,0 v/m %-os standard oldat 0,1 M savra nézve

Desztillált víz

8 db 50 cm³-es mérőlombik (a kalibrációs görbéhez illetve az ismeretlenhez)

2 db 1 cm-es műanyag küvetta küvetatartóban

1db 1-5 cm³-es automata pipetta (vagy 1 db 5,0 osztott pipetta a kalibráló oldatsorozat készítéséhez)

10 cm³-es mérőhenger (a Fe³⁺ sóoldat adagolásához)

3 db 50-100 cm³-es és 1 db 200 cm³-es főzőpohár a pipettázás elősegítésére illetve a küvetták öblítéséhez
Pumpett (pipettázó labda)
Papírtörölő

Feladat:

A kalibráló oldat sorozat elkészítése és azok illetve a három párhuzamos ismeretlen spektrumainak a felvétele 400 – 600 nm intervallumban. Ezt követően ki kell választani a megfelelő hullámhosszat és kigyűjteni a kalibrációs egyeneshez szükséges adatokat (igyekezni kell mindig az elnyelési sáv maximumán vagy lehetőség szerint annak közvetlen közelében dolgozni).

Előkészítés:

Először kapcsoljuk be a spektrofotométert, hiszen annak a munka végzés előtt legalább 30 perccel már üzemelnie kell a fényforrás üzemi hőmérsékletére való bemelegedéséhez. 50 cm³-es mérőlombikokba a szalicilsav törzsoldatból olyan térfogatokat mérjünk be, hogy szalicilsavra 0,00 – 0,07 mg/cm³ koncentráció tartományban egy öt pontból álló kalibráló oldatsorozatot kapjunk. A lombikokba kb. 25 cm³ desztillált vizet öntünk majd az oldatok mindegyikéhez mérőhengerrel 5,0 cm³ FeCl₃ vagy Fe₂(SO₄)₃ törzsoldatot (1,0 m/v%-os) adunk. Ezt követően a lombikokat desztillált vízzel jelre állítjuk majd alaposan homogenizáljuk. A kiadott ismeretlen szalicilsav tartalmú oldatot kvantitatíven egy 50 cm³-es mérőlombikba mossuk majd azt desztillált vízzel jelre állítjuk. Ebből a törzsoldatból kell 10 cm³-es részleteket újabb tiszta 50 cm³-es mérőlombikba mérni (3 párhuzamos) amit a kalibráló oldatsorozathoz leírtak szerint kezeljük (25 cm³ desztillált víz majd 5,0 cm³ Fe³⁺ törzsoldat hozzáadását követően jelre állítjuk a lombik tartalmát és homogenizáljuk.).

Mérés:

Vegyük fel az elkészített kalibráló oldatsorozatot és az ismeretlen minták spektrumát 400 – 600 hullámhossz tartományban műanyag küvettákat használva (a műanyag küvetták ebben a tartományban a speciális üveg vagy kvarc küvettákhoz hasonlóan jól fényáteresztő képességgel rendelkeznek (lásd pl. a 1. ábrát)). Vakoldatként elegendő, ha vizet használunk mivel a Fe³⁺ és a szalicilsav elnyelése a választott hullámhossztartományban elhanyagolható.

Értékelés:

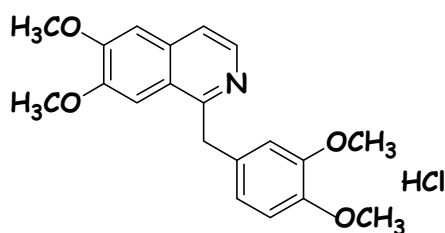
Ha pontosan dolgoztunk, a maximumokon mért abszorbancia a koncentráció függvényében ábrázolva egyenes ad, amelyre az ismeretlen három párhuzamos abszorbanciája az egyenes közepe táján közel egy pontban illeszkedik. A kalibrációs egyenes segítségével (milliméter papíron vagy számítógépes program (pl. excel) segítségével) az ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációját meg kell határozni (a számolás során vegyük figyelembe a hígításokat is, hiszen a szalicilsav koncentrációját a kapott ismeretlen oldatban kell meghatározni).

Beadandó eredmények:

- A Fe(III)-szalicilátó-komplex abszorpciós spektruma és moláris abszorbanciája az abszorpciós maximum helyén
- A kalibrációs egyenes milliméterpapíron vagy excel programból kinyomtatva
- Az ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációja (mol/dm^3 illetve mg/dm^3 koncentrációegységekben)
- A kapott eredmény szórása a három párhuzamos alapján

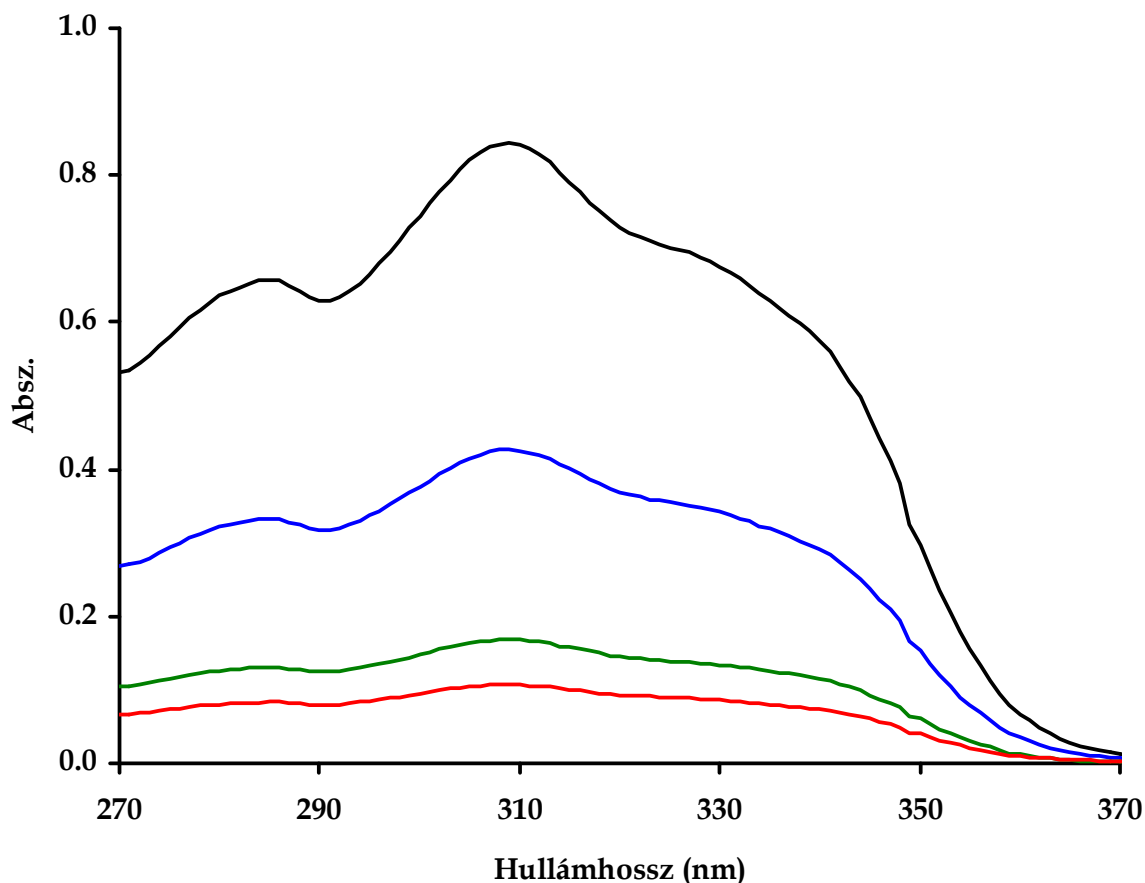
6.6. A papaverin koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével

A papaverin egy ópium-alkaloid, melyet főként érgörcsök és néha erektilis diszfunkció kezelésére használnak. A papaverin szerkezetében és hatásában is jelentősen eltér az ópiátoktól, hiszen elsősorban görcsoldó hatású, ami közvetlenül a simaizomsejtekre hatva a Ca^{2+} -csatornák gátlásával valósul meg reverzibilisen. Hatására csökken a vérnyomás és fokozódik az agyi keringés. Az emésztő- és a vizeletkiválasztó rendszerben jelentkező görcsös állapotokat egyaránt jól oldja.



18. ábra A papaverin-hidroklorid szerkezete

A papaverin koncentrációjának meghatározására lehetőség van spektrofotometriás módszer segítségével, a papaverin aromás rendszerének UV-elnyelése alapján.

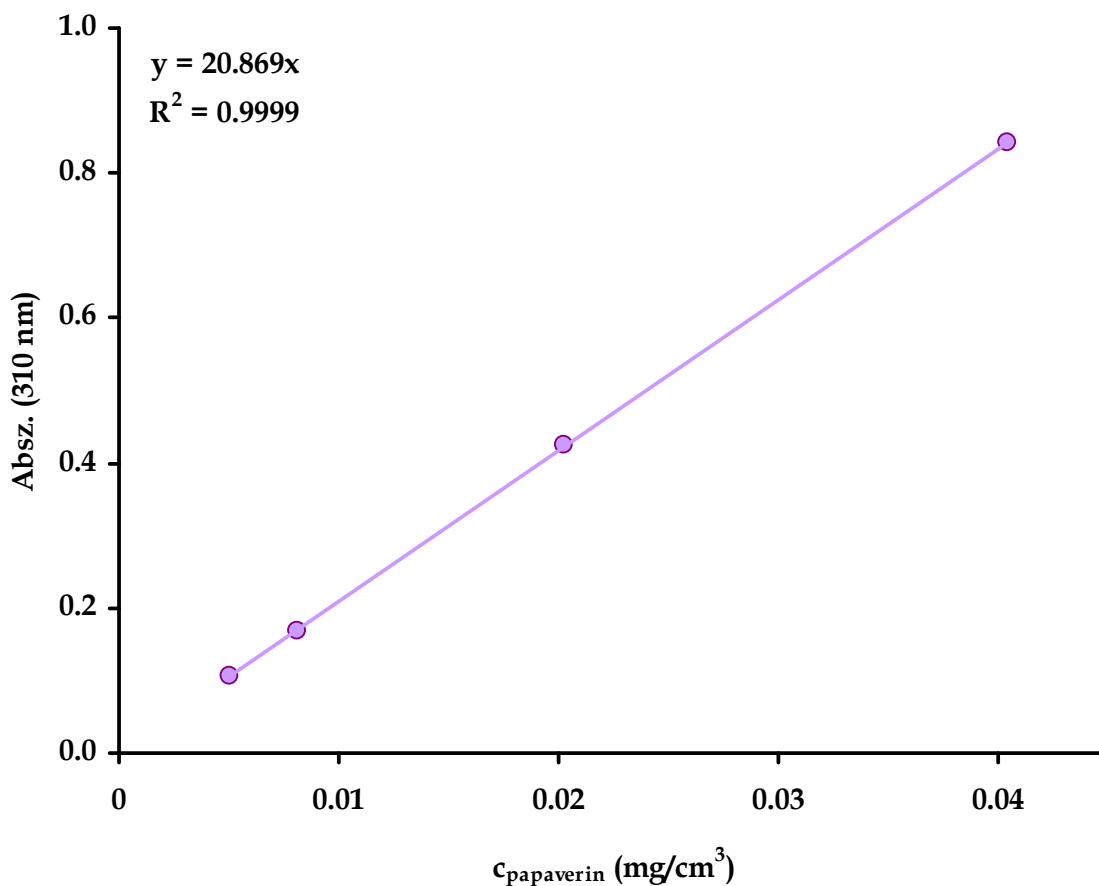


19. ábra. A gyakorlaton elkészítendő oldatsorozat abszorpciós spektrumai (fekete (papaverin törzsoldat) – $4,04 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, kék – kétszeres hígítás, $2,02 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, zöld – ötszörös hígítás, $8,08 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$, piros – nyolcszoros hígítás, $5,05 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$).

A gyakorlat célja: UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése és a Lambert-Beer törvény alkalmazása. Papaverin koncentráció meghatározása kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

- papaverin törzsoldat ($0,04 \text{ mg/cm}^3$, 0,01 M-os HCl-ban)
- HCl-oldat (0,01 M)
- desztillált víz
- 3 db 10 cm^3 -es mérőlombik (a kalibrációs görbéhez)
- 2 db kvarc küvetta
- 1db $1\text{-}5 \text{ cm}^3$ -es automata pipetta (vagy 1 db $5,0 \text{ cm}^3$ -es osztott pipetta a kalibráló oldatsorozat készítéséhez)
- 2 db $50\text{-}100 \text{ cm}^3$ -es és 1 db 200 cm^3 -es főzőpohár a pipettázás elősegítésére illetve a küvetta öblítéséhez
- pumpett (pipettázó labda)
- papírtörő



20. ábra. Kalibrációs egyenes a papaverin koncentrációjának meghatározásához

Feladat:

A kalibráló oldat sorozat elkészítése és azok illetve az ismeretlen oldat spektrumainak felvétele 270 – 370 nm intervallumban. Ezt követően olvassa le az abszorbancia maximumokhoz (310 nm) tartozó abszorbancia értékeket a kalibrációs egyenes elkészítéséhez (igyekedjen mindig az elnyelési sáv maximumán vagy lehetőség szerint annak közvetlen közelében dolgozni).

Előkészítés:

Először kapcsoljuk be a spektrofotométert, hiszen annak a munkavégzés előtt legalább 30 perccel már üzemelnie kell a fényforrás üzemi hőmérsékletére való bemelegedéséhez. 10 cm³-es mérőlombikokba a papaverin törzsoldatból olyan térfogatokat mérjünk be, hogy 2, 5 és 8-szoros hígításokat kapjunk. A lombikokat 0,01 M-os HCl oldat felhasználásával állítsuk jelre. A hígítások elkészítését követően vegyük föl mind az eredeti papaverin törzsoldat, mind pedig a hígított oldatok abszorpciós spektrumait (4 db. spektrum). Utolsó lépésként vegyük regisztráljuk az ismeretlen oldatunk spektrumát is.

Mérés:

Vegyük fel az elkészített kalibráló oldatsorozat és az ismeretlen minták spektrumát 270 – 370 hullámhossz tartományban kvarc küvettákat használva. Vakoldatként 0,01 M-os HCl-oldatot használunk.

Értékelés:

Ha pontosan dolgoztunk, a maximumon mért abszorbanciák a koncentráció függvényében ábrázolva egyenest adnak, amely egyenesről az ismeretlen oldat abszorbanciájának ismeretében meghatározható annak koncentrációja. A kalibrációs egyenest elkészíthetjük milliméterpapíron vagy számítógépes program (pl. excel) segítségével.

Beadandó eredmények:

- A papaverin abszorpciós spektrumai.
- A kalibrációs egyenes milliméterpapíron vagy programból kinyomtatva.
- Az ismeretlen oldat papaverin koncentrációja.

6.7. Kalmopyrin tabletta szalicilsav tartalmának meghatározása derivatív spektrofotometriával

Feladat:

A hatóanyag (acetil-szalicilsav) bomlástermékének (szalicilsav) meghatározása a spektrum 2. deriváltja alapján kalibrációs görbe segítségével.

Előkészítés:

Készítsünk 100 cm^3 $100 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú szalicilsav törzsoldatot 1% monoklór-ecetsav tartalmú etanollal. A törzsoldatból készítsünk száraz 10 cm^3 -es mérőlombikokba 1% monoklór-ecetsav tartalmú etanollal 10 - 15 - 20 - 25 - 30 μgcm^{-3} koncentrációjú szalicilsav kalibráló oldatokat. Egy Kalmopyrin tablettát dörzsmozsárban porítsunk el, majd közvetlenül a mérés előtt mérjünk be belőle pontosan kb. 0,1 g-ot, 1% monoklór-ecetsav tartalmú etanollal készítsünk belőle 25 cm^3 oldatot. Az oldatot szűrjük meg redős szűrőpapíron.

Mérés:

Az abszorpciós spektrum és a 2. derivált spektrum felvétele egy oldat esetében egymás után történik. Vegyük fel az első szalicilsav kalibráló oldat abszorpciós spektrumát 250-350 nm között, összehasonlító oldatként az oldószert használva. Majd kapcsoljuk be a 2nd DERIV kapcsolót és az ORD MIN és ORD MAX értékek megfelelő beállítása után a COMPUTE gomb segítségével állíthatjuk elő a spektrum 2. deriváltját. Az abszorpciós és derivált spektrum egyszerre jelenik meg a monitoron. Ezt követően az előzővel azonos módon regisztráljuk a többi kalibráló oldat és a Kalmopyrin oldat abszorpciós és derivált spektrumát, azonos méréstartományban.

Értékelés:

Mérjük meg a kalibráló oldatok derivált jeleit (a 311 nm-en jelentkező kis csúcs minimuma és a 329 nm-nél található maximum közötti távolság) és a Kalmopyrin oldat jelét (minimum és maximum közötti távolság). Ábrázoljuk a szalicilsav oldatokra kapott jeleket a koncentráció függvényében, majd a kalibrációs egyenes felhasználásával határozzuk meg a Kalmopyrin tabletta szabad szalicilsav tartalmát tömegszázalékban kifejezve.

ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK

1. A molekulaabszorpció elvi alapjai, spektrumtípusok.
2. A lehetséges molekulapályák relatív energiaszintjei, átmenettípusok.
3. Eltolódások az abszorpciós spektrumban.
4. UV/VIS spektrofotométerek alapegységei, fajtái.
5. Minőségi elemzés.
6. A mennyiségi elemzés alapösszefüggése, az ettől való eltéréseket befolyásoló tényezők.
7. Több komponens egymás melletti meghatározása.
8. Differenciál spektrofotometria.
9. A derivatív spektrofotometria elvi alapjai.

ZH KÉRDÉSEK

1. Adja meg az abszorbancia és a fényintenzitás közötti összefüggést!
2. Adja meg a Lambert-Beer törvényt egy elnyelő részecske esetén!
3. Adja meg a Lambert-Beer törvényt több elnyelő részecske esetén!
4. Mi a feltétele, hogy két anyag egy oldatból meghatározható legyen? Mi ennek a menete?
5. Hogyan küszöböljük ki az oldószer és a küvetta abszorbanciáját?
6. Mi az izobesztikus pont és mire utal a jelenléte a spektrumban?
7. Milyen technikai korlátok az okai annak, hogy a Lambert-Beer törvény csak egy adott tartományban érvényes?
8. Milyen feltételeknek kell megfelelni egy színes anyagnak ahhoz, hogy használható legyen a gyakorlat végrehajtásához?
9. Sorolja fel a diódasoros fotométer néhány várhatóan előnyös, illetve hátrányos tulajdonságát a hagyományos fotométerhez képest!
10. Milyen megfontolások alapján választja ki a használandó hullámhosszakat a gyakorlata elején?
11. Milyen előnyei és hátrányai vannak az egy küvetta használó mérési módszernek?
12. Miért és mivel kell kétküvetta mérés esetén korrigálni a mért abszorbanciákat?

SZÁMOLÁSI FELADATOK (MINTAPÉLDÁK)

1. 250 cm^3 $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgos ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) oldat készítéséhez mennyi szilárd anyagot kell bemérni? $\text{Ar}(\text{C})=12,01$, $\text{Ar}(\text{N})=14,00$, $\text{Ar}(\text{K})=39,10$ és $\text{Ar}(\text{Fe})=55,85$. (oldatkészítés)
2. A $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgos ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) oldatból 1 , 5 , illetve 10 cm^3 -t 25 cm^3 -re hígítunk. Adja meg az így készített oldatok koncentrációját! (hígítás)
3. 420 nm -en $610,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a kálium-kromát lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Milyen koncentrációjú törzsoldatot kell készítenünk ahhoz, hogy az oldat várható abszorbanciája $3,0$ legyen? (számolás moláris abszorbancia alapján)
4. 500 nm -en $16170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a metilnarancs lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Hány cm^3 $0,005 \text{ M}$ koncentrációjú alapoldatot kell 250 cm^3 -re hígítani ahhoz, hogy a hígított törzsoldat várható abszorbanciája $3,0$ legyen? (számolás moláris abszorbancia alapján, hígítási feladat)

IRODALOM

1. Pataki László, Zapp Erika: Analitikai kémiai praktikum, Tankönyvkiadó, Budapest, 1974.
2. Erdey László, Mázor László: Analitikai kézikönyv, Műszaki könyvkiadó, Budapest, 1974.
3. Pungor Ernő, Buzás Lajosné: Analitikai kémiai kislexikon, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1978.
4. Pungor Ernő: Analitikai kémia, Tankönyvkiadó, Budapest, 1979.
5. Pungor Ernő, Bányai Éva, Pólos László: Analitikusok kézikönyve. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1987.
6. Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai. Kémiai és műszeres elemzés, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1999.
7. Kristóf János, Kémiai Analízis II, Pannon Egyetemi Kiadó, Veszprém, 2000.