

SPEKTROFOTOMETRIA

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.

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:

1. táblázat Spektroszkópai módszerek.

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

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

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 (régebbi szóhasználat szerint extinkciós) koefficiense; ami annak a rétegvastagságnak a reciproka értékével 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: $\beta = \varepsilon \cdot c$, ahol ε a moláris abszorbancia (extinkciós koefficiens), ha az l értékét cm-ben, a koncentrációt mól/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 fényszűrővel 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. nyomszennyezők 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

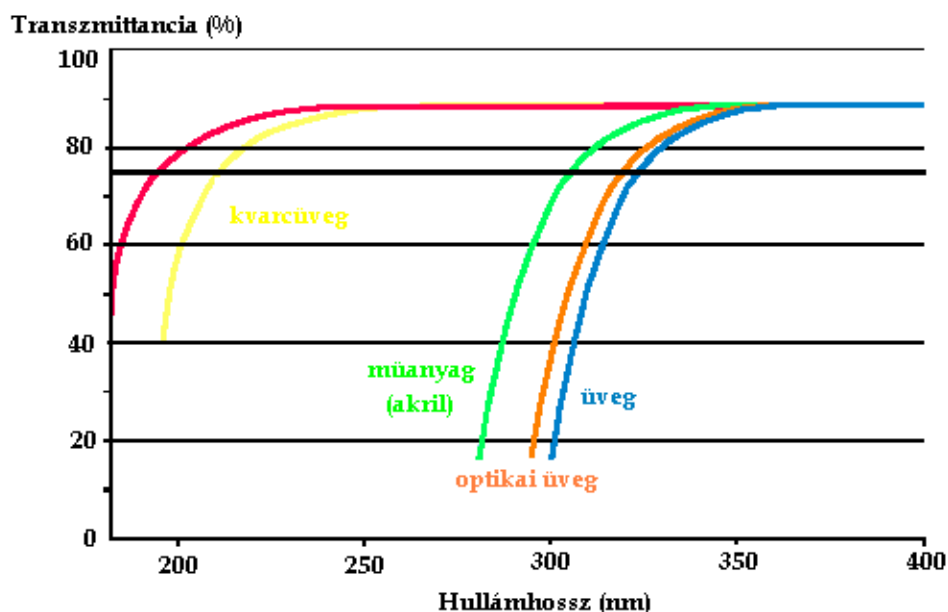
A spektrofotométer olyan optikai berendezés, amellyel a gyakorlatilag monokromatikus fény intenzitását illetve az intenzitás változását nagy pontossággal mérni lehet. A spektrofotométereket több szempontból osztályozhatjuk. Az egyik felosztás, a mérés hullámhossz tartománya szerint ismerünk ultraibolya, látható és infravörös tartományban mérő spektrofotométereket. A másik felosztás, a fényelbontás módja szerint prizmás és rácisos 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. Érdemes 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 taransmittanciája 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 rácsos monokromátorok a diffrakció ill. interferencia jelenségén alapulnak. Az optikai rácsról visszaverődő fénysugarak interferenciájának következtében minden hullámhosszra más szögben lesz erősítés, így a prizmához hasonló színfelbontást 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 áteresztés 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

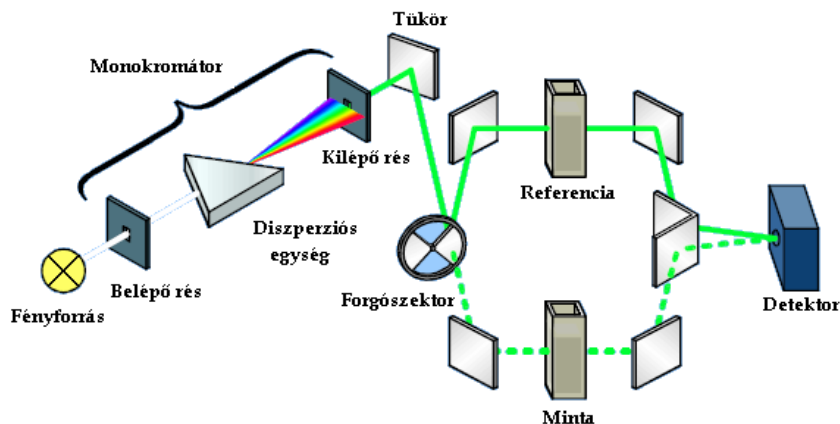
olcsóság, egyszerű felépítés, legtöbb esetben kis méret, kevés hibaforrás. Sorozatelemzésekhez, gyári, gyártásközi elemzésekhez jól használható.

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.

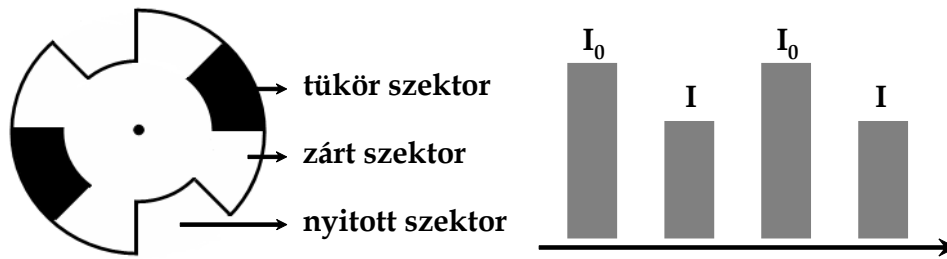


2. ábra Hagyományos UV-vis készülék vázlatos rajza (ilyen készülék például a Varian Cary 1E vagy a Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotométer is).

Ritkábban alkalmaznak a fényintenzitás mérésére két detektort, mivel nehéz két teljesen azonos jellemzőkkel rendelkező érzékelőt készíteni. Gyakrabban a mintatér 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 forgószektort („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

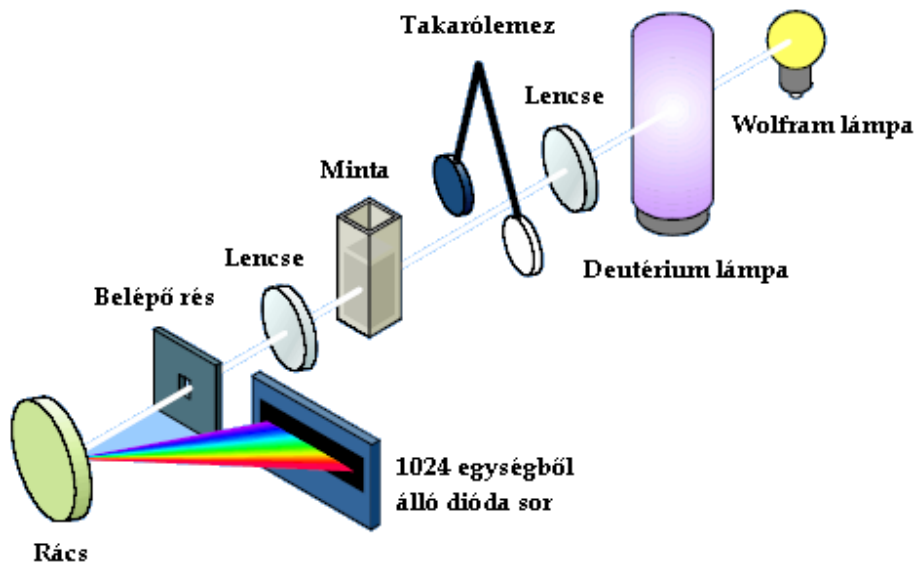
típusoknál szinte már természetes tartozék a számítógép, ami gyorsabbá és kényelmesebbé teszi a méréseket és az adatfeldolgozást.



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

3.3 Diódásoros 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 un. 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 átérésztési 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 Diódásoros 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 (közeli 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 koefficiens állandósága helyett az alábbi kifejezés konstans:

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

ahol a: az abszorpciós koefficiens, 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 koefficiensük 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):

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_1) = \varepsilon_A(\lambda_1) c_A l + \varepsilon_B(\lambda_1) c_B l$$

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_2) = \varepsilon_A(\lambda_2) c_A l + \varepsilon_B(\lambda_2) c_B l$$

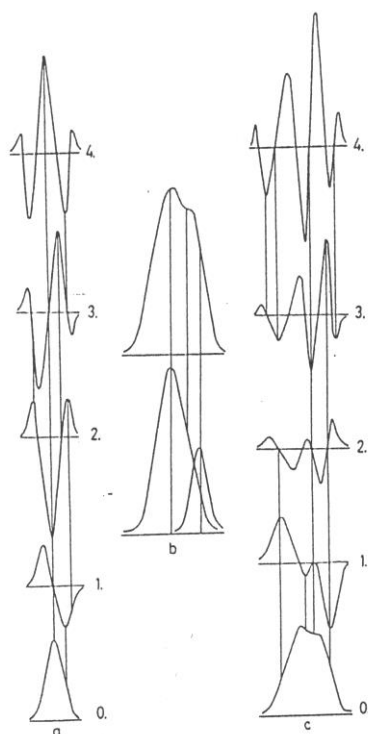
5. DERIVATÍV SPEKTROFOTOMETRIA

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

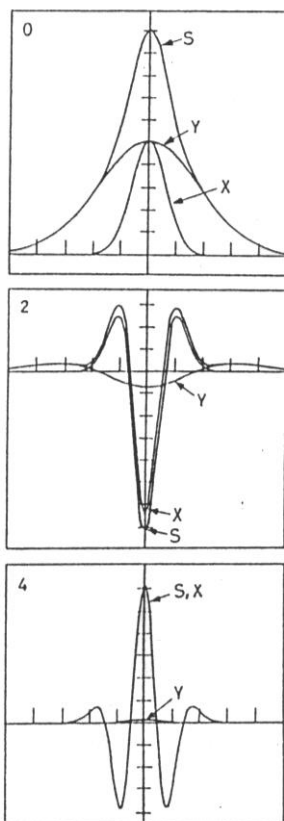
A derivatív spektrofotometria a hagyományos spektrofotometriához viszonyítva négy területen jelent előrelépést:

Kvalitatív analízis. A derivatív spektrumok alkalmasak az alap spektrumban mutatkozó minimális különbségek kiemelésére. Különösen vonatkozik ez az izolált aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek finomszerkezetű sávjaira.

Monoton háttérpektrum 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.

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.

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



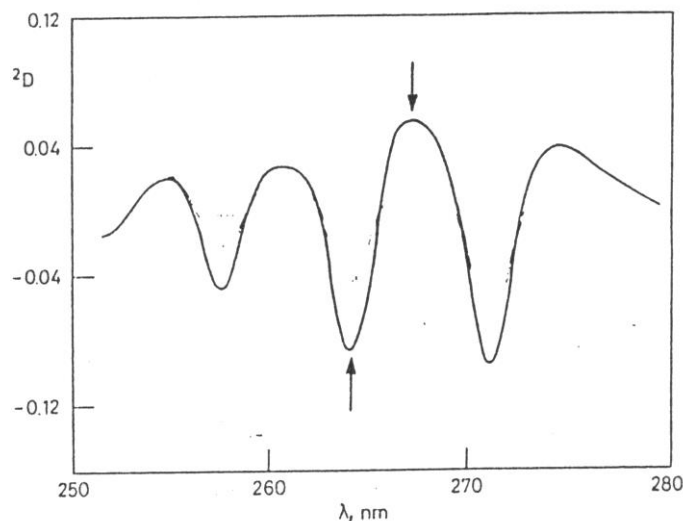
6. ábra Széles sáv eliminálása a vele egybeeső keskeny sáv (X) mérése során a 2. és 4. derivált spektrumok alkalmazásával ($S = X+Y$).

Az ábrán látható **S** abszorpciós spektrum két pontosan egybeeső, de sáv szélességben 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.

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!

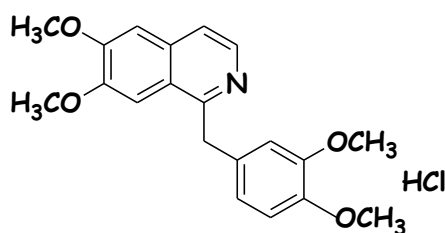
Az amplitúdót meghatározhatjuk:

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

6. GYAKORLAT

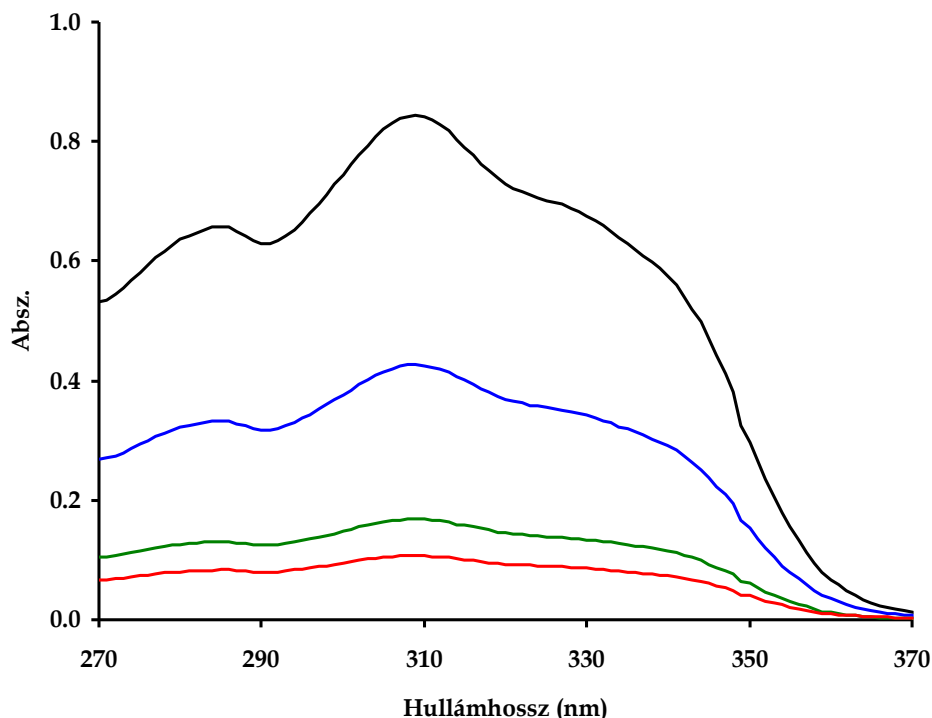
A papaverin koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével

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.



8. ábra A papaverin-hidroklorid szerkezete

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

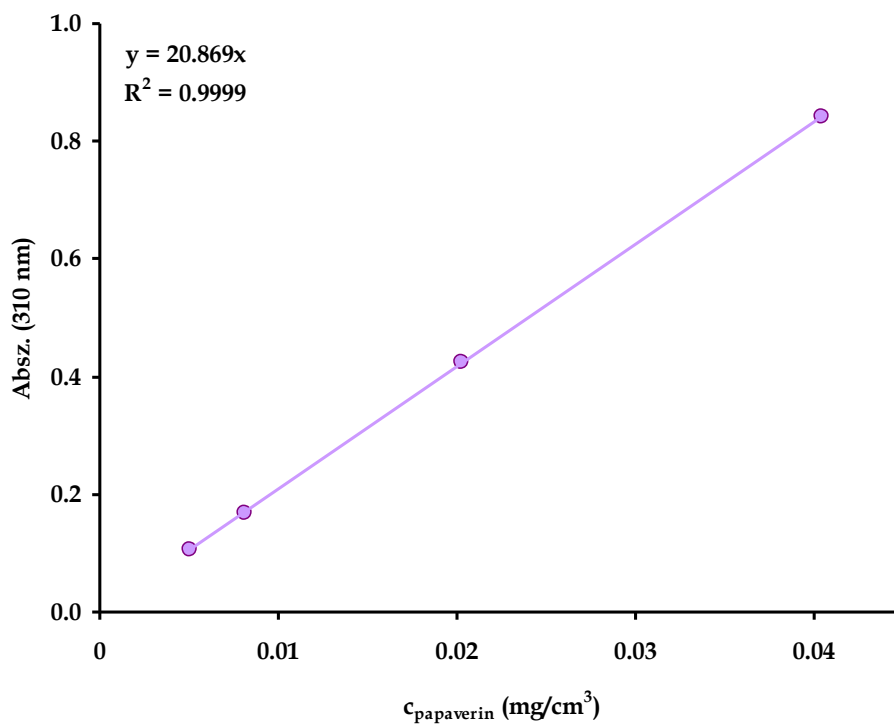


9. ábra A gyakorlaton elkészítendő oldatsorozat abszorpciós spektrumai (**fekete** (papaverin törzsoldat) – $4,04 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, **kék** – kétszeres hígítás, $2,02 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, **zöld** – ötszörös hígítás, $8,08 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$, **piros** – nyolcszoros 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 küvetták öblítéséhez
- pumpett (pipettázó labda)
- papírtörő



10. 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 (igyekezzen 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 mérjük 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.

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 hullámhosszokat 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 $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgsó ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 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 $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgsó ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 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.
- Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai. Kémiai és műszeres elemzés, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1999.
- Kristóf János, Kémiai Analízis II, Pannon Egyetemi Kiadó, Veszprém, 2000.