

Spektroszkópiai mérési gyakorlat fizikusoknak

1. A mérés célja

A mérés célja az ismerkedés az ultraibolya/látható és a fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel. A mérés során szörpök és üdítő italok abszorpciós és emissziós spektrumát tanulmányozzuk valamint azok élelmiszerszínezék koncentrációját és kinin tartalmát határozzuk meg spektroszkópiai kísérletekkel.

2. A mérés elméleti háttere

Ultraibolya-látható spektroszkópia

A kvantummechanika törvényei szerint a molekulákat felépítő elektronok energiája (az elektronok mozgási valamint az elektron-elektron taszításból és az elektron-atommag vonzásból származó potenciális energiák összege) nem tetszőleges, csak bizonyos meghatározott értékeket vehet fel. Normál körülmények között a molekula elektronjai a legalacsonyabb energiaszinten tartózkodnak, azt mondjuk, hogy a molekula alapállapotban van. A magasabb energiaszinteket gerjesztett állapotoknak nevezzük.

Ha a molekulát fényvel sugározzuk be, és a fény energiája megegyezik valamelyik gerjesztett állapot és az alapállapot energiájának a különbségével, a molekula elnyelheti a fényt és gerjesztett állapotba kerülhet. Ilyenkor abszorpcióról beszélünk. Az abszorpció bekövetkezésének valószínűsége azonban nem 100%, és függ attól, hogy melyik gerjesztett állapotba kerül a molekula, azaz mekkora a gerjesztő fény energiája (hullámhossza).

A fenti jelenségen alapul a ultraibolya (UV)-látható abszorpciós spektroszkópia. Egy UV-látható spektroszkópiai mérés során a mintánkat folytonosan változó hullámhosszúságú UV illetve látható fényvel sugározzuk be és a fény hullámhosszának függvényében vizsgáljuk, hogy a fény mekkora hányadát nyeli el a minta. Ez utóbbi mennyiség jellemzésére leggyakrabban a abszorbanciát (A) használjuk, ami nem más, mint a mintára eső fény intenzitása (I_0) és a mintán átértesztett fény intenzitása (I) hányadosának a logaritmus: $A = \lg(I_0/I)$. Az abszorbanciát a hullámhossz függvényében ábrázolva az adott vegyület UV-látható, más néven elektrongerjesztési színképét (spektrumát) kapjuk. Az UV-látható spektroszkópiát mind szerkezetvizsgálati, mind analitikai célokra alkalmazzuk. A vegyület UV-látható spektruma alapján következtetéseket vonhatunk le az anyag szerkezetére vonatkozólag, az abszorbancia koncentrációfüggését kihasználva pedig oldatok koncentrációját határozhatjuk meg. Ez utóbbi alapja a Lambert-Beer törvény, mely szerint az abszorbancia egyenesen arányos a koncentrációval, $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$, ahol ε egy konstans (moláris abszorpciós koefficiens), c a koncentráció és l az úthossz, azaz a vizsgált minta vastagsága.

Az UV-látható spektrumok mérésére szolgáló készülékek (spektrométerek) közül az ún. egyutas spektrométerek a legegyszerűbbek. Ilyet fogunk alkalmazni a mérés során is (a készülékrajzot lásd 1.b. ábra). A szokásos spektrométerek a 200-1000 nm intervallumban működnek. A gerjesztő fényt előállító fényforrás általában deutérium és/vagy volfrám lámpa. A fényforrás által kibocsátott fényt átvezetjük a mintatartón. A gyakorlatban ez egy üvegből vagy kvarcból készült küvetta (egy kis hasábalakú tartály), amibe a mérendő anyagot tartalmazó oldatot töltjük. A mintatartón át bocsátott fény a monokromátorra kerül. A monokromátor, leggyakrabban

egy optikai rács, felbontja a rács fényt hullámhosszak szerint. A felbontott fény a detektorra kerül, amely a fény intenzitásával arányos elektromos jelet ad a hullámhossz függvényben.

A mérés két lépésben történik. Először megmérjük a mérendő anyagot tartalmazó oldat spektrumát. A második lépésben csak tiszta oldószert töltünk a küvettába és ennek is megmérjük a spektrumát. Ezt nevezzük referenciának. Mivel az oldószert és a készülék optikai elemei is elnyelhetnek valamennyi fényt, ahhoz, hogy a mérendő anyag spektrumát megkapjuk, az előbbi spektrumból kivonjuk a referenciát.

A 200 nm feletti ultraibolya és a látható tartományban felvett színek segítségével több szerves és szervetlen vegyületcsoport is vizsgálható. A szerves anyagok közül elsősorban a π -kötéssel és kötetlen elektrópárral egyaránt rendelkező (-CO, -CN, -NO₂ funkciós csoportok) molekulák, a „laza” nemkötő elektront tartalmazó molekulák (Cl, Br, I, S, Se tartalmú vegyületek) és a konjugált kettős kötések tartalmazó molekulák tanulmányozhatók. A szervetlen vegyületek között az átmeneti fém-komplexek vizsgálatában játszik fontos szerepet az ultraibolya-látható spektroszkópia. Azok az anyagok viszont, amelyek nem nyelnek el számottevően 200 nm felett, jó oldószerek a spektrum méréséhez. Ilyenek például a telített szénhidrogének (pl. hexán), továbbá a víz és az etanol.

Fluoreszcencia spektroszkópia

A gerjesztett állapotba került molekula rövid időn belül leadja energiáját és visszakerül alapállapotba. Az energialeadás történhet fénykibocsátással (emisszió) vagy fénykibocsátás nélkül. Az utóbbi esetben a molekula a környezetének adja le az energiát, pl. a többi molekulával való ütközések révén. Az esetek túlnyomó többségében az emisszió a legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapotból történik. Ha a molekula magasabb gerjesztett állapotban volt akkor először fénykibocsátás nélkül a legalacsonyabb gerjesztett állapotba kerül és innen emisszióval tér vissza az alapállapotba. Ezt az emissziót, amely a gerjesztést követően általában néhány nanoszekundumon (10^{-9} s) belül lejátszódik, fluoreszcenciának nevezzük. A fluoreszcencián alapuló spektroszkópai módszerek mind a kémiai szerkezetkutatásban, mind a kémiai analízisben alkalmazhatók.

A fluoreszcenciaspektrum mérése során a mintát adott hullámhosszúságú (monokromatikus) fényel besugározzuk és a kibocsátott fény intenzitását mérjük a hullámhossz függvényében. A fluoreszcenciaspektrum felvételére használt készülékben, a spektrofluoriméterben (ábrát lásd alább) többnyire xenonlámpa a fényforrás. Fényét optikai ráccsal bontják fel, amelyet elfordítva a gerjesztő fény hullámhossza beállítható. A minta minden irányban bocsát ki fényt (emittál). A gerjesztő sugárra merőleges irányban a kibocsátott fluoreszcencia-sugárzást lencsével összegyűjtik és újabb optikai ráccsal felbontják hullámhossz szerint. A fluoreszcenciaspektrum mérése során a gerjesztő fény hullámhosszát rögzítik, az emittált fény útjában elhelyezett rácsot lépésekben elfordítják és az egyes helyzetekben megméri az emittált fény intenzitását.

A fluoreszcenciaspektrum vízszintes tengelyén a hullámhossz olvasható le, a függőleges tengelyen a fluoreszcencia-intenzitást adják meg „önkéntes egység”-ben. Az „önkéntes egység” használatának oka, hogy a jel nagysága készülékfüggő, mert az optikai elemek pontos elrendezésétől függ, hogy a fluoreszcencia sugárzás mekkora része jut a detektorra. Ha koncentrációt akarunk mérni, kalibrációs görbét kell készíteni, és csak az ugyanazon készüléken mért intenzitások tekinthetők összehasonlíthatónak.

A fluoreszcencia mérésnek több előnye is van az abszorpciós méréssel szemben. Egyik előny a kétszeres szelektivitás. Ha abszorpciós méréssel akarjuk meghatározni többkomponensű minták összetételét, sokszor előfordul, hogy ugyanabban a hullámhossz-tartományban több anyag is elnyel, abszorpciójukat nem tudjuk szétválasztani. A fluoreszcencia-mérés szelektívebb. Egyrészt azért, mert az elnyelést követően a vegyületeknek csak egy töredéke ad mérhető fluoreszcenciát.

Másrészt azért, mert a fluoreszkáló komponensek azonos hullámhosszon történt gerjesztést követően más emissziós spektrumot adnak.

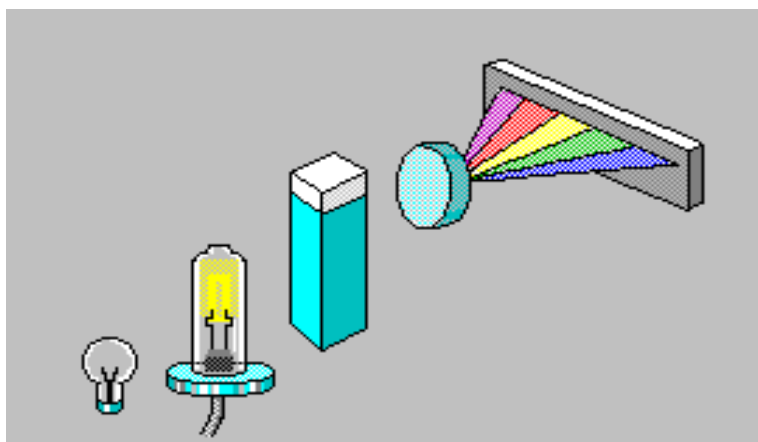
A fluoreszcencia másik előnye a nagy érzékenység. Az abszorpciós mérésnél a referencia a minta távollétében mért fényintenzitás, azt mérjük, hogy ezt a jelet a minta mennyire gyengíti. A fluoreszcencia mérésénél a referencia a nulla jel, hiszen, ha nincs fluoreszkáló anyag, a detektorra egyetlen foton sem érkezik. Érzékeny detektorral akár minden foton meg lehet számolni. Ezért a fluoreszkáló anyagok kimutathatósági koncentrációja 2-3 nagyságrenddel kisebb, mint a csak abszorbeálóké.

3. A mérés során használt készülékek

Agilent 8453 fotodiódásoros spektrofotométer¹



1.a. ábra
A készülék látképe
(a gyártó honlapjáról)



1.b. ábra
A készülék elvi rajza

A készülék két fényforrást tartalmaz. A jobb oldali fényforrás egy deutérium lámpa, ami 190 és kb. 800 nm hullámhossz közötti fényt emittál. A bal oldali lámpa ún. alacsony zajú volfrám lámpa, 370 és 1100 nm közötti működési tartománnyal.

A folyadékot tartalmazó mintatartó (küvetta) a középén látható hasáb, ez általában 1 cm-es fényúttal rendelkezik és üvegből vagy kvarcból készül. Az üvegből készült küvetták az ultraibolya (UV) tartományban nem használhatóak.

Az ábrán fekvő hengerként ábrázolt rész az optikai rács. Feladata, hogy a lámpákból jövő és a mintatartón áthaladó fényt felbontsa hullámhossz szerint. Az így felbontott fényt szimbolizálja a kiszélesedő szivárvány színegyüttes. Ez a fény kerül az ábra jobb oldalán található fotodiódásorra.

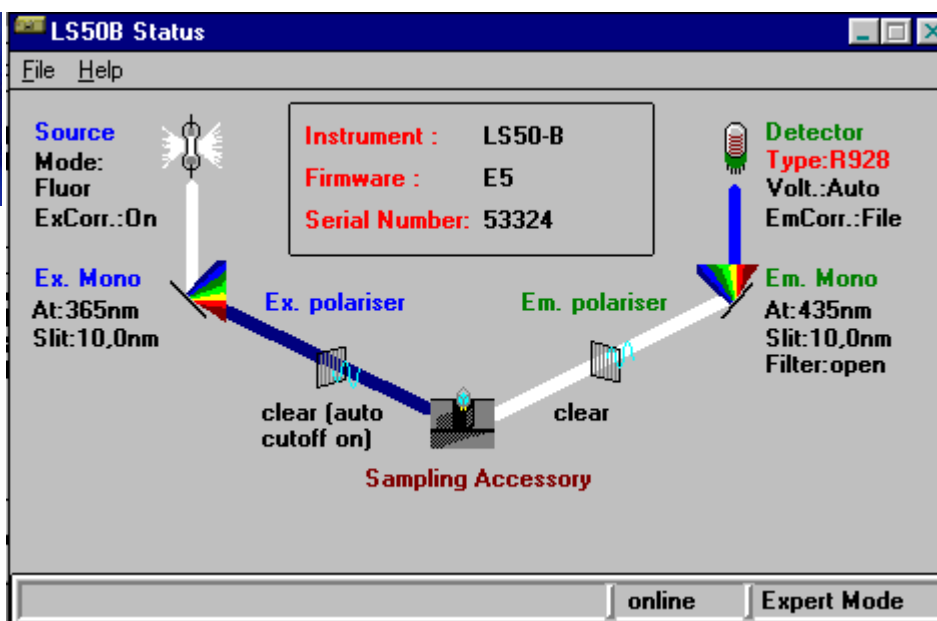
A fotodiódásor 1024 db félvezető chipet tartalmaz, ami átlagosan 0,9 nm-es mintavételezési intervallumokkal fedi le a készülék 190-től 1100 nm-ig terjedő működési tartományát. (Megjegyzés: a készülék alapbeállítása szerint 1 nm-es felbontással működik!)

A készülékhez UTP kábelen keresztül egy számítógép csatlakozik. A készüléket az Agilent ChemStation programmal vezérelhetjük. Mivel a készülék alkalmas arra, hogy kinetikai méréseket is végezzünk rajta (időfelbontásos spektrumok felvétele), fontos, hogy alapüzemmódban használjuk a mérés során. Az adatokat a mérés után CSV formátumba célszerű exportálni. (Comma Separated

¹ A gyártó adatlapja: <http://www.chem.agilent.com/scripts/PDS.asp?IPage=310>

Value; elérhető File → Export Selected Data as → CSV)

Perkin Elmer LS 50B fluoriméter²



2.a. ábra

A készülék látképe
(a gyártó honlapjáról)

2.b. ábra

A készülék elvi rajza

A készülék fényforrása (ábrán: Source) egy xenon kisülési lámpa, 50 Hz-es frekvencián 7,3 W-os átlagos energiával működik. (A fényforrás teljesítménye a kisülés során 8 μ s alatt ekvivalens 20 kW-os teljesítménnyel.) A kisülés impulzusának félértékessége kisebb 10 μ s-nál. Ez a fényforrás biztosítja a gerjesztéshez szükséges „fehér” fényt.

A kibocsátott fény a gerjesztési monokromátoron (ábrán: Ex. Mono) keresztül halad át. A monokromátor 200-800 nm között működik. A monokromátoron áthaladó fény egy gerjesztési oldali polarizátoron (ábrán: Ex. polariser) haladhat át. (A mérés során nem használjuk).

Ezután a fény eljut a mintatartóhoz (ábrán: Sampling Accessory), ami egy 1 cm-es fényúthosszal rendelkező kétutas folyadék mintatartó (küvetta).

A kisugárzott fényt a gerjesztő fényre merőlegesen vizsgáljuk. A mintatartóból kilépő merőleges fényt először egy emissziós oldali polarizátoron (ábrán: Em. polariser) haladhat át. (A mérés során nem használjuk). A kibocsátott fény hullámhosszát a emissziós monokromátorral (ábrán: Em. Mono) határozhatjuk meg. A monokromátor 200-900 nm között működik. A monokromátorról érkező fényt egy fotoelektronsokszorozó (R928 Red-Sensitive Photomultiplier) fogadja. (ábrán: Detector)

A fluorimétert RS232 porton (soros kapu) keresztül vezéreljük a számítógépre telepített FL Winlab szoftver segítségével.

A készülék maximális felbontása 1 nm, spektrumfelvételi sebessége 10-1500 nm/perc között változhat. Természetesen a gyorsabb felvétel rosszabb minőségű spektrumot eredményez.

² A gyártó adatlapja: <http://las.perkinelmer.com/Catalog/default.htm?CategoryID=LS+50B+Luminescence+Spectrometer>

4. A mérés menete

A mérés során a mérőcsoport két alcsoportra oszlik, és az egyik alcsoport az első, a másik alcsoport pedig a második méréssel kezdi a mérést. A laboridő felénél az alcsoportok váltanak. Mindenkitől egyéni munkát várunk el, ezért az ismeretlenek kiválasztásánál ügyeljenek arra, hogy mindenki más ismeretlent határozzon meg!

1. mérés: Szörpök élelmiszerszínezék tartalmának meghatározása ultraibolya-látható spektrofotométerrel

A mérés alapvetően két részből áll. Első lépésben azt kell meghatároznia, hogy a kiválasztott szörp melyik élelmiszerszínezéket tartalmazza, második lépésben pedig az adott élelmiszerszínezék koncentrációját a szörpben.

A mérés során a következő élelmiszerszínezékeket használjuk:

- MaxColor Kék (színező anyag: E131)
- MaxColor Zöld (színező anyag: E102 és E131)
- MaxColor Málnapiros (színező anyag: E 122)

A méréskor a következő szörpök élelmiszerszínezék koncentrációja határozandó meg:

- Fizzi Málna ízű szörp
- Fizzi Narancs ízű szörp
- Fizzi Fekete áfonya ízű szörp
- Fizzi Erdei szamóca ízű szörp

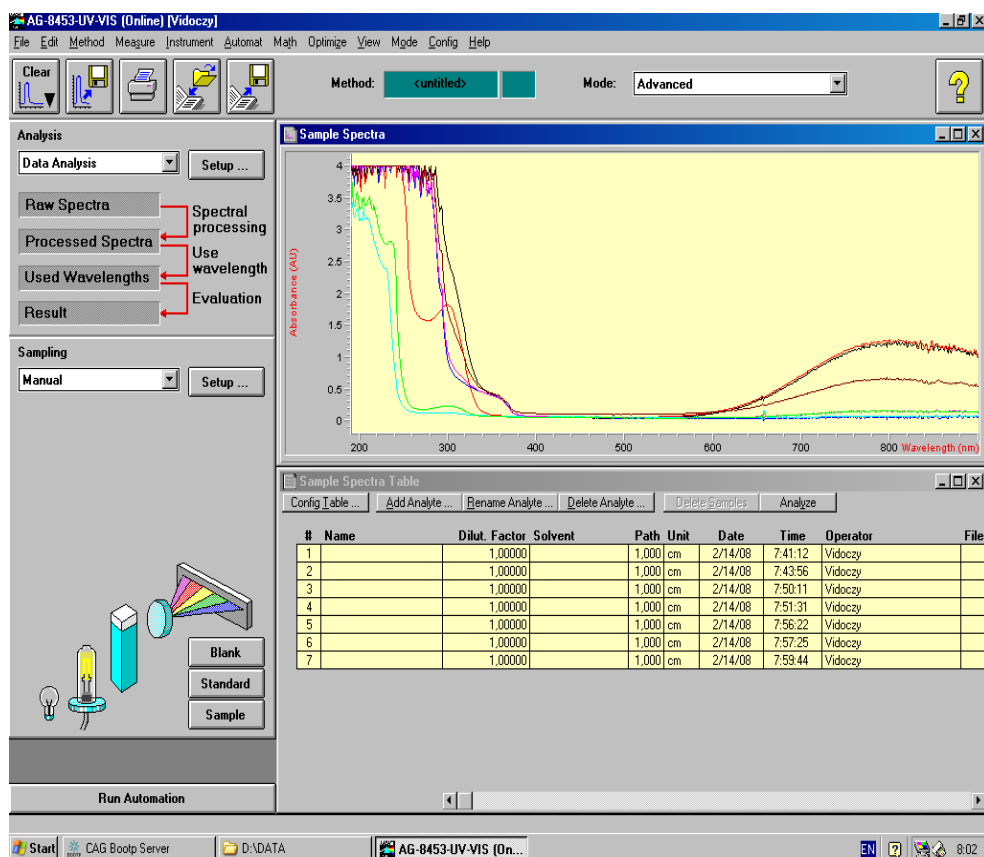
a) Válasszon ki egy szörpöt! Készítsen belőle 10-50x-es hígítást, mert ez esik a fotométerrel mérhető tartományba. A rendelkezésre álló lombikokat és pipettákat használja minden hígítási feladathoz!

b) Mérőtársaival egyeztetett módon mindhárom étel színezékből készítsenek 1000-2500x-os hígítást, mert ez esik a fotométerrel mérhető tartományba.

c) Mérjék le a hígított étel színezékek és a szörpök spektrumait a fotométerrel (részletek az f) pontban)! Ezután határozzák meg, hogy melyik ételszínezéket találja meg a szörpben, és utána azzal dolgozzon!

d) Tervezzon meg és készítsen kalibrációs oldatsort. Az oldatsor elkészítésének a célja, hogy lefedje a hígított szörp (ismeretlen) mérési tartományát a lehető legjobb eloszlással.

e) Mérje le a kalibrációs oldatsor és az ismeretlen spektrumait a fotométerrel! Az elkészített oldatokat egymás után öntse be a küvettába, tegye bele a mintatartóba és mérje le a spektrumokat a készülékkel. A mérés során a hígabb oldatok irányából haladjanak.



3. ábra.
A szoftver képernyőképe

f) A követta behelyezése után a Sampling ablak Sample feliratú gombjával tud mérni. A mért spektrum képét a Sample Spectra ablakban láthatja, míg a hozzá tartozó adatokat a Sample Spectra Table ablakban. Ha végzett, az adatsorokat egyesével jelölje ki (egérrel álljon a táblázat # oszlopában szereplő számok elé és a jobbra mutató fekete nyílal klikkeljen), és egyesével mentse el az adatait CSV formátumban. (File → Export Selected Data as → CSV). A kapott adatsor három oszlopot tartalmaz: hullámhossz (Wavelength, nm), abszorbancia (Absorbance) és standard eltérés (Stand. Dev.).

g) Otthoni feladat: kalibrációs egyenes készítése. Válassza ki a **színezékre jellemző** csúcs maximumához tartozó hullámhosszat. Olvassa le a kiválasztott hullámhosszhoz tartozó abszorbanciaértékeket a kalibrációs oldatokról felvett spektrumokról. Ábrázolja egy grafikonon az abszorbanciaértékeket az oldatok koncentrációjának a függvényében. Illesszen egyenest a pontokra (az illesztést célszerű valamilyen szoftverrel végezni, pl. Open Office Calc, Gnuplot, Origin, Excel³). Az ismeretlenről felvett spektrum esetében is határozza meg a kiválasztott hullámhosszhoz tartozó abszorbanciát és a kalibrációs egyenes egyenlete alapján számítsa ki az oldat koncentrációját.

Beadandók: a mérés menete, benne leírva az ételszínezék kiválasztásának a menetét, az ételszínezék adataival (E szám, IUPAC név és szerkezeti képlet⁴, molekulatömeg), a kalibrációs oldatsor készítésének (hígítás) pontos leírását, egy kiválasztott kalibrációs oldat és az ismeretlen (szörp) spektruma a látható tartományban egy grafikonon (!), a kalibrációs oldatok koncentrációja és a mért

³ Természetesen használható bármilyen segédprogram az egyenesillesztéshez. Nem a részeredményekre, hanem a végeredményre vagyunk kíváncsiak.

⁴ A szerkezeti képletet nem kell megrajzolni, hanem megkereshető és letölthető az Internetről is!

abszorbancia adatok az adott hullámhosszon táblázatba foglalva, a grafikon a kalibrációs egyenessel, a kalibrációs egyenes egyenlete, a mért ismeretlen koncentrációja.

2. mérés: Tonik kinintartalmának meghatározása spektrofлуорiméterrel

A mérés során vizsgálható tonikok a következők:

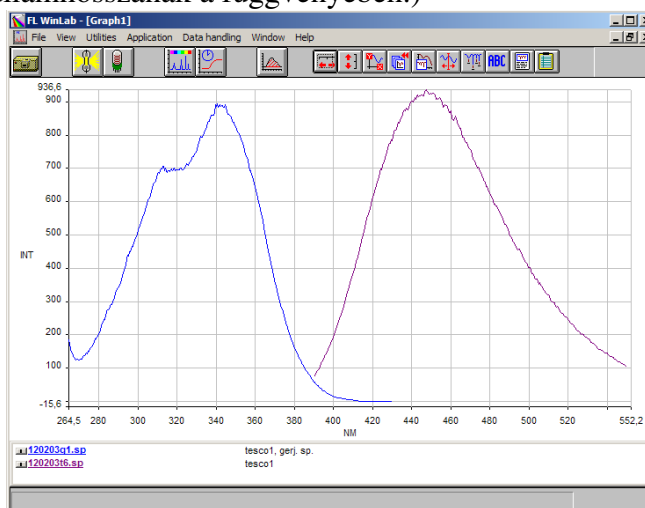
- Schweppes [SW]
- Kinley [KIN]
- Tesco 1 [T1]
- Tesco 2 [T2]

Az üdítőkben található kinin **abszorpciós maximuma vízben 347 nm**.

Az al csoport tagjai más-más üdítőt vizsgáljanak. A kinin törzsoldat koncentrációja $0,2 \text{ mol/dm}^3$, ami az üdítők kinin-koncentrációjával nagyságrendileg megegyező érték.⁵

a) Tervezzen meg és készítsen **kalibrációs oldatsort**. A kinin erős emissziója miatt a törzsoldatot minimum 20-szorosára kell hígítani, hogy mérhetővé váljon. Célszerűen 20 és 100-szoros hígítás között kell több ismert koncentrációjú mérési pontot kialakítani a kinin törzsoldatból, majd az üdítőt úgy kell hígítani, hogy intenzitása a kalibrációs skála két végpontja közé essen. A rendelkezésre álló lombikokat és pipettákat használja a feladathoz!

b) Mérje le a kalibrációs oldatsorból a **legtöményebb oldat gerjesztési és emissziós spektrumát!** (A gerjesztési spektrum esetében a gerjesztő fény hullámhosszát változtatjuk és ennek a függvényében mérjük az emittált fény intenzitását. Ezzel a módszerrel tulajdonképpen az abszorpciós spektrumhoz hasonló spektrumot mérünk. A gerjesztési spektrum felvételének célja a gerjesztő fény hullámhosszának a kiválasztása. Emissziós spektrum – azaz az igazi fluoreszcencia spektrum – mérésekor a gerjesztő fény hullámhossza rögzített és az emittált fény intenzitását mérjük az emittált fény hullámhosszának a függvényében.)



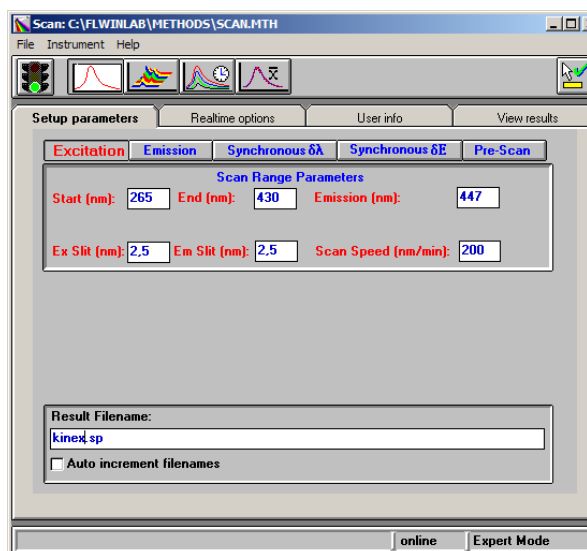
4. ábra

A kinin gerjesztési (kék) és emissziós (lila) spektruma

⁵ Az egyik Tesco termék (sárga címkés) egy nagyságrenddel kisebb kinin-tartalmú, mint a törzsoldat!

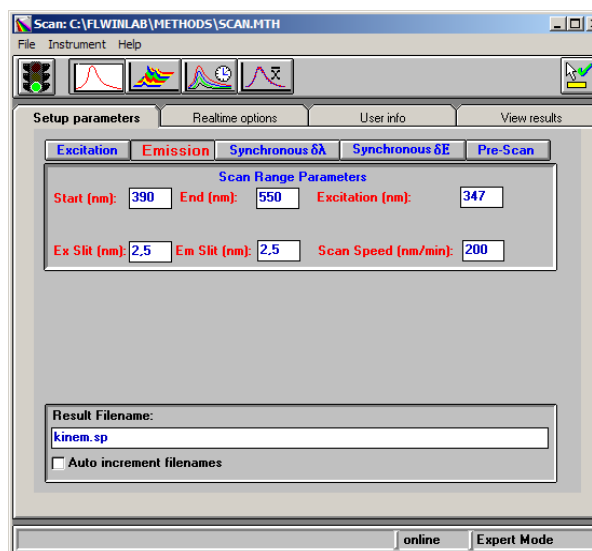
Először az emissziós spektrumot vegye fel, a gerjesztés hullámhosszának állítsa be a fent megadott abszorpciós maximum értékét. A kapott spektrum alapján **állapítsa meg a kinin emissziós maximumát**, majd ezen az értéken detektálva vegye fel a gerjesztési spektrumot, és **állapítsa meg a gerjesztési spektrum maximumának értékét**. Hasonlítsa össze, hogy ez mennyire egyezik az abszorpciós maximum értékével!

Spektrum felvételét az Application → Scan választásával kezdeményezhet. Ne keverje össze a gerjesztési és az emissziós beállítási ablakokat! A maximum pontos meghatározásához használja a felső ikonsor jobbról 5. ikonját, ami megmutatja a spektrum hullámhosszát és a hozzá tartozó intenzitását egy adott pontban.



5.a. ábra

Gerjesztési spektrumfelvétel beállítása



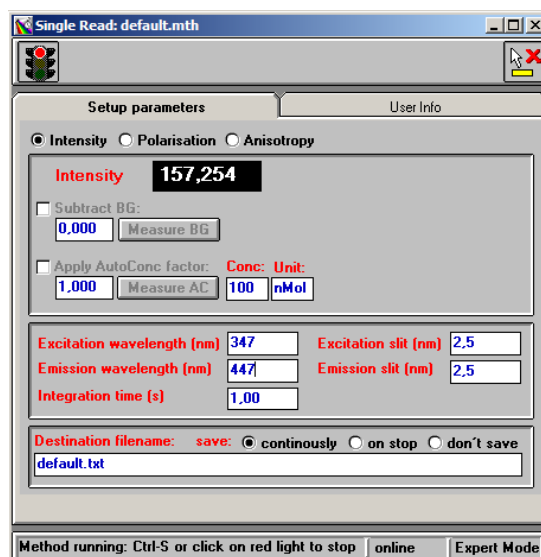
5.b. ábra

Emissziós spektrumfelvétel beállítása

Figyelje meg, hogy a két ablak bár nagyon hasonlít egymáshoz, teljesen mást mér vele! A gerjesztési spektrumnál arra vagyunk kíváncsiak, hogy egy adott emissziós hullámhosszon figyelve milyen spektrumot kapunk. Az emissziós spektrumnál viszont arra, hogy egy adott hullámhosszon gerjesztve hogyan bocsát ki fényt a kinin! Ennek megfelelően a gerjesztési spektrum felvételénél az Excitation gombnak kell benyomva lennie, míg az emissziósnál az Emission-nak! A Start és End mezőkbe a mérés során használni kívánt mérési tartományt állítjuk be. Az, hogy melyik monokromátorról van szó, abból derül ki, hogy mit mérünk. A gerjesztési ablakban az Emission mezőbe, az emissziós ablakban pedig az Excitation mezőbe írjuk bele a fixen hagyott monokromátor hullámhosszértékét.

Kiindulásnál a monokromátorok résszélessége (Slit) 2,5-2,5 nm legyen, míg a felvétel sebessége 200 nm. Ha a javasolt alapbeállítások nem várt eredményt hoznának, változtasson a résszélességeken. A fájlnev (Result Filename) mezőbe olyan fájlnevet írjon, ami maximum 8 karakter, egyedi, nem tartalmaz különleges karaktereket (így ékezetet sem). Javasolt a két felvett spektrumot hasonlóan elnevezni, a fájlnevbe egy kis utalással a felvétel típusára (ex – em; ger – em). Ha beállította a paramétereket, a bal felső sarokban található közlekedési lámpa ikonnal tudja elindítani a mérést. Az így kapott .sp kiterjesztésű adatsorok ASCII formátumban vannak, amik tartalmaznak egy fejléct, amiben a felvétel paraméterei találhatóak, majd maga az adatsor (hullámhossz [nm], intenzitás) egységekben.

- c) Határozza meg a **kalibrációs oldatokhoz és az üdítőhöz tartozó intenzitásokat** a fentiek alapján meghatározott maximumnál! Az ehhez szükséges ablakot a detektor ikon megnyomásával kapja meg.



6. ábra
Intenzitás adott paramétereknél

Beállítási paramétereknél használja a b) pontban meghatározott értéket (tehát a gerjesztési spektrum maximumánál gerjesszen, az emissziós spektrum maximumánál detektáljon), és azokat a résszélességeket (slit), amiknél mért. Az integrálás ideje legyen 1 másodperc és az adatokat ne mentse el! (Viszont írja fel, hogy egy adott oldatnál milyen intenzitást mért.)

Ne felejtse el minden oldatát lemérni, és feljegyezni!

d) Otthon: kalibrációs egyenes illesztése az 1. méréshez hasonlóan, a meghatározott koncentráció–intenzitás párok alapján

Beadandók: a mérés pontos menete, a kinin paramétereivel (IUPAC elnevezés, szerkezeti képlet⁶, molekulatömeg), leírva benne a kalibrációs oldatsor elkészítésének pontos módját (kapott koncentrációk), a mért gerjesztési és emissziós spektrumok a maximumok jelölésével, a mért koncentráció–intenzitás párok táblázatosan, a kalibrációs egyenes (grafikon, egyenes egyenlete), az üdítő kininkoncentrációja.

⁶ A szerkezeti képletet nem kell megrajzolni, hanem megkereshető és letölthető az Internetről is!