

Podstawowym prawem wykorzystywanym w analizie opartej na metodach optycznych (spektrometrii) jest prawo Lamberta (zwane też prawem Lamberta-Beera-Waltera). Chodzi tu o zależność absorbancji A od stężenia c i grubości warstwy pochłaniającej l :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

jeśli c wyrazimy w molach/dm³ a l w cm (w praktyce stosujemy najczęściej kuwety o grubości warstwy roztworu absorbującego światło wynoszącej 1 cm) to ϵ nosi nazwę **molowego współczynnika absorpcji**. Stosując molowy współczynnik absorpcji, szukane stężenie wyliczamy w molach/dm³. Wynik w takich jednostkach jest najczęściej pożądanym w badaniach typu poznawczego. Sens fizyczny wartości molowego współczynnika – jest to wartość (oczywiście tylko hipotetyczna, bo takiej wartości żaden przyrząd nie zmierzy) absorbancji roztworu o grubości warstwy 1 cm i stężeniu 1 mol/dm³.

Dla określania stężenia w jednostkach masowych (np. procentach czy ppm) wygodniej jest stosować tzw. **właściwy współczynnik absorpcji**, zapisywany zazwyczaj jako $a_{1\text{cm}}^{1\%}$. Jest to wartość absorbancji roztworu o stężeniu 1% o grubości warstwy 1 cm. Nie zmienia to oczywiście w niczym samego prawa, inne są tylko wartości współczynników:

$$A = a_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot c \cdot l$$

stężenie c wyrażamy wówczas oczywiście w procentach!

Absorbancja to wartość logarytmu dziesiętnego z odwrotności transmitancji T , zaś transmitancja to stosunek natężenia światła wychodzącego z próbki I_x do natężenia światła padającego na próbkę I_o :

$$T = \frac{I_x}{I_o}$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_o}{I_x}$$

Warto zauważyć, że dla pełnej przepuszczalności (brak absorpcji promieniowania $I_x = I_o$) $A = 0$, zaś dla roztworu absorbującego 90% promieniowania ($I_x = 0,1 \cdot I_o$ tylko 10% promieniowania przechodzi przez próbkę) $A = 1$. $A=2$ oznacza, że próbka pochłonęła aż 99% światła, a aparat musi pracować na podstawie tylko 1% promieniowania wyemitowanego przez źródło światła.

W praktyce osłabienie natężenia promieniowania następuje po przejściu przez każdy roztwór, nawet teoretycznie nie zawierający substancji absorbujących (*drobne odbicia i rozproszenia na ściankach kuwety, załamania w czasie przechodzenia przez granice faz (powietrze-ścianka kuwety-roztwór-ścianka kuwety-powietrze), obecność drobnych zanieczyszczeń mechanicznych roztworu (zmętnienie) oraz innych, poza oznaczanym, składników roztworu, które teoretycznie nie absorbują światła, ale przy dużych stężeniach też wnoszą swój udział w sumarycznej absorbancji*).

W związku z tym, zarówno przy wyznaczaniu krzywej wzorcowej (o tym już za chwilę) jak i pomiarach musimy stosować tzw. „ślepej próby” lub bardziej prawidłowo - próbe odniesienia.

Pomiar absorbancji spowodowanej wyłącznie obecnością substancji oznaczanej zasadza się na pomiarze wartości absorbancji „ślepej próby”, czyli próby, która jest identyczna z próbką badaną, za wyjątkiem obecności w niej substancji badanej (wynik nazwijmy A') i pomiarze absorbancji próbki badanej, czyli ($A' + A_{\text{ozn.}}$). Odejmując od wartości absorbancji próbki badanej wartość absorbancji „ślepej próby” otrzymujemy wartość absorbancji zależną wyłącznie od zawartości substancji oznaczanej ($A_{\text{ozn.}}$):

$$(A' + A_{\text{ozn.}}) - A' = A_{\text{ozn.}}$$

Najczęściej odbywa się to tak, że identyczna wiązka światła przechodzi równocześnie przez próbkę badaną i „ślepa próbkę” (przyrządy dwuwiazkowe) i aparat mierzy od razu różnicę. W aparatach jednowiazkowych najpierw przepuszczamy wiązkę światła przez „ślepa próbkę”, aparat „zapamiętuje” tę wartość, a następnie wymieniamy próbkę na próbkę badaną i aparat podaje nam różnicę, czyli szukane $A_{\text{ozn.}}$. Każda z tych metod ma swoje wady i zalety.

Znając wartość $A_{\text{ozn.}}$ (zmierzone), grubość warstwy absorbującej (zastosowana kuweta) i współczynnik absorpcji, bez trudu ze wzorów podanych na początku, obliczymy stężenie badanej substancji w próbce mierzonej (w roztworze w kuwecie).

Największy problem jest z wartością współczynnika absorpcji. Jego wartość głównie zależy od substancji, ale w dość znacznym stopniu także między innymi od długości fali stosowanego promieniowania i oddziaływań międzycząsteczkowych, a te zależą pośrednio od polarności substancji i rozpuszczalnika, temperatury i stężenia.

Ponieważ światło w spektrokolorymetrach nie jest nigdy monochromatyczne (wiązka składa się z fal o nieco różnych długościach – tzw. spektralna szerokość wiązki, parametr związany z konkretnym przyrządem) można krótko powiedzieć, że wartość współczynnika absorpcji zależy nie tylko od badanej substancji, ale także od tego **czym** (aparatura) i **w czym** (fizykochemiczne parametry roztworu) oraz w jakiej temperaturze dokonujemy pomiaru.

Jest i drugi problem związany z pomiarami kolorymetrycznymi (ogólniej spektroskopowymi) i prawem Lamberta-Berra. Ze wzoru wynika, że zależność między stężeniem a absorbancją jest liniowa (wprost proporcjonalna). W praktyce jest tak tylko wówczas, gdy oddziaływania w roztworze nie są zbyt silne, stężenia mierzone nie różnią się zbyt, promieniowanie jest monochromatyczne (tego warunku nie spełnia prawie żaden przyrząd) a temperatura pomiarów stała. *Prawo Lamberta-Beera zostało wyprowadzone przy założeniu monochromatyczności wiązki światła, stałej temperatury i braku oddziaływań międzycząsteczkowych – niestety często się o tych założeniach nie pamięta.*

Tak więc przed przystąpieniem do pomiarów nigdy nie wiemy ani ile dokładnie wynosi w warunkach pomiaru współczynnik absorpcji ani w jakim zakresie stężeń wolno nam stosować zasadę liniowości zależności absorbancji od stężenia. Do wybrnięcia z tych tarapatów służy nam **krzywa wzorcowa**.

Krzywa wzorcowa pozwala nam stwierdzić, czy w interesującym nas zakresie stężeń badanej substancji obowiązuje prostoliniowa zależność absorbancji od stężenia i ile wynosi w warunkach naszego doświadczenia (pomiarów) wartość współczynnika absorpcji.

W celu wyznaczenia krzywej (a właściwie prostej :) wzorcowej przygotowujemy kilka roztworów zawierających różne - ale dokładnie znane – ilości oznaczanego związku. Skład tych wzorcowych roztworów powinien być taki, jak późniejsze badane próbki (lub przynajmniej bardzo zbliżony, bo czasem dokładnego składu roztworu analizowanego nie znamy). Roztworów przygotowujemy co najmniej 5, a najczęściej około 10. Stężenia w poszczególnych roztworach wzorcowych powinny być tak dobrane, by równomiernie pokrywały cały interesujący nas zakres stężeń, a jednocześnie tak, by ich absorbancje nie były mniejsze od 0,1 ani większe od 1. Ten zakres wartości absorbancji zależy w dużej mierze od klasy stosowanego przyrządu, ale bez względu na przyrząd nie należy schodzić poniżej wartości 0,1, bo wówczas dość znacznie zwiększamy błąd pomiaru (a tym samym obniżamy dokładność oznaczenia).

Warto tu wspomnieć i o tym, że nie należy tych roztworów wzorcowych przygotowywać przez kolejne rozcieńczanie jednego, stężonego roztworu wyjściowego (co jest niestety powszechnie stosowaną praktyką - czyste lenistwo!), bowiem wówczas ewentualny błąd popełniony przy sporządzaniu roztworu wyjściowego przeniesie się na wszystkie roztwory wzorcowe i na wyniki naszych oznaczeń!!

Po sporządzeniu serii roztworów wzorcowych o różnych stężeniach oznaczanej substancji mierzymy ich absorbancje wobec „ślepej próby” i na podstawie uzyskanych danych (stężenie (oś x) – absorbancja oś y)) wyznaczamy przebieg krzywej wzorcowej i obliczamy wartość współczynnika absorpcji. Dokonujemy tego przez wyznaczenie równania regresji liniowej (arkusz kalkulacyjny). Wartość współczynnika determinacji (R^2) określa nam liniowość naszych danych („zgodność z prawem Lamberta-Beera”), powinna być ona równa co najmniej 0,95 lub więcej (w zależności od wymaganej dokładności oznaczeń). Wartość współczynnika regresji (**a**) to nasz współczynnik absorpcji, zaś wartość **b** (przecięcie prostej z osią y) powinna być bliska 0. Wartości ujemne świadczą o błędzie w doświadczeniu, większe od zera mogą być spowodowane brakiem prostoliniowości w układzie stężenie-absorbancja (lub też błędem) – tak czy inaczej w przypadku wartości **b** znacznie różniących się od zera (powyżej 0,01) należy przeanalizować sytuację.

Po stwierdzeniu prostoliniowości w interesującym nas zakresie stężeń i wyznaczeniu wartości współczynnika absorpcji możemy przystąpić do pomiarów badanych próbek – wyznaczenie absorbancji badanej próbki wobec „ślepej próby” pozwala z wzoru Lamberta obliczyć wartość stężenia **c** badanego roztworu (tego w kuwecie), a po uwzględnieniu procesów obrabiania próbki (np. rozcieńczenia) zawartość oznaczanej substancji w badanym materiale.

Jeśli w wybranym przez nas zakresie stężeń widzimy wyraźny brak prostoliniowości, zawężamy zakres do przedziału **praktycznie** prostoliniowego. Czasem dzielimy większy przedział o krzywoliniowym przebiegu na dwa o przebiegach **praktycznie** prostoliniowych i różnych wartościach **a** i **b**.

Z reguły nie wolno ekstrapolować otrzymanego wykresu poza sprawdzony zakres stężeń!

Kiedyś (gdy brak komputerów powodował, że obliczanie równań regresji było dość uciążliwe) krzywą wzorcową wyznaczano graficznie, tworząc ręcznie wykres na papierze milimetrowym. Jest to jednak metoda niejednoznaczna (każdy sporządzi nieco inny wykres z tych samych danych!) i obciążona ryzykiem dość dużego błędu i z tych powodów należy ją wysłać do lamusa.

Przykład wyznaczenia krzywej kalibracji:

Wyznaczenie krzywej kalibracji dla oznaczeń **substancji** w **rozpuszczalniku**
 grubość warstwy - 1 cm
 długość fali analitycznej - 572 nm

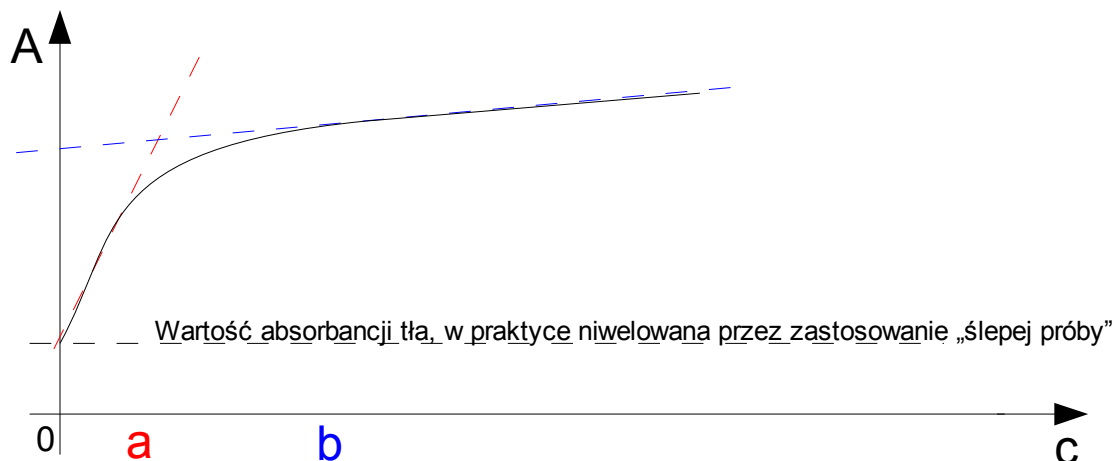
nr kolbki	stężenie [mol/dm ³]	A
1	2,10E-004	0,135
2	3,80E-004	0,251
3	5,50E-004	0,348
4	7,20E-004	0,476
5	8,90E-004	0,562
6	1,06E-003	0,694
7	1,23E-003	0,782
8	1,40E-003	0,891
9	1,57E-003	1,024
10	1,74E-003	1,122

molowy współczynnik absorpcji
 przejście przez 0 – bardzo dobrze
 liniowość – bardzo dobra

a = 643,81
b = 0,0008
R² = 0,9991



Poniżej przedstawiono hipotetyczny przebieg krzywej wzorcowej dla substancji nie spełniającej założeń prawa Lamberta – Beera (przebieg poszczególnych odcinków mocno przejaskrawiono, w celu wyraźnego przedstawienia istoty problemu).



Dla zakresu stężeń od 0 do a mamy przebieg praktycznie prostoliniowy, przechodzący przez początek układu współrzędnych – pełna zgodność z prawem Lamberta – Beera.

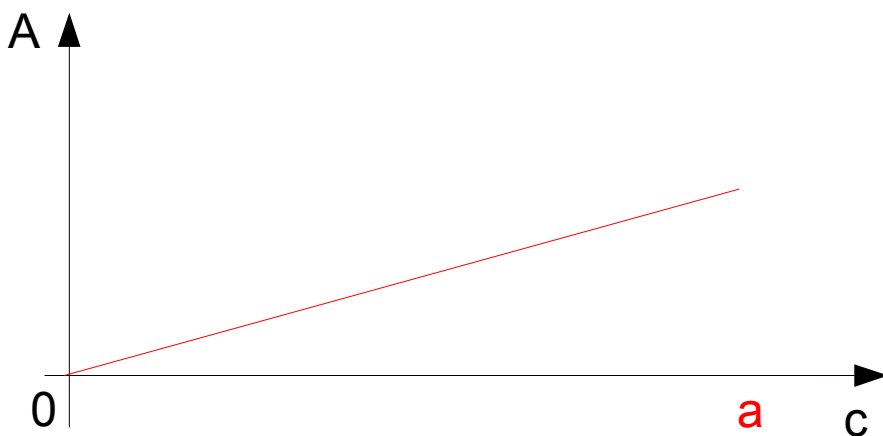
Dla stężeń powyżej b przebieg jest prostoliniowy, lecz o innej wartości współczynnika absorpcji i nie przechodzi on przez początek układu.

Zakres stężeń od a do b jest krzywoliniowy – tu „niezgodność” z prawem Lamberta jest nie do zaakceptowania.

Na tym „zbiorczym” wykresie widać, jak niebezpieczne jest interpolowanie przebiegu krzywej wzorcowej poza zakres sprawdzony doświadczalnie.

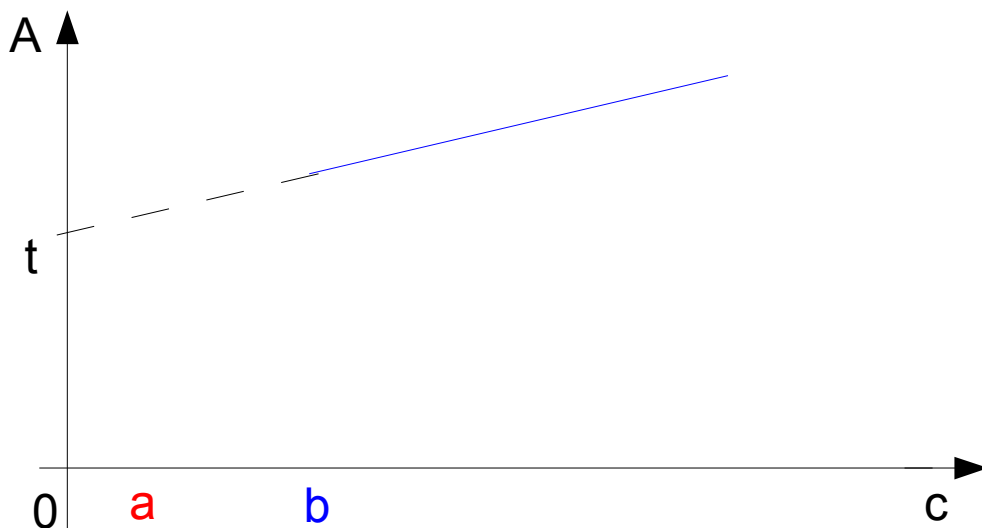
W praktyce poszczególne wykresy krzywych wzorcowych zarejestrowanych w odniesieniu do „ślepej próby” wyglądałyby następująco:

a) $A = \epsilon \cdot c$, stężenie wyliczamy z prostego przekształcenia wzoru $c = A/\epsilon$



b) $A = \epsilon \cdot c + t$ stężenie wyliczamy z wzoru $c = (A - t)/\epsilon$

Tu równanie regresji dla krzywej i równanie do obliczania stężenia powinniśmy wyznaczyć niezależnie (w pierwszym przypadku za zmienną niezależną biorąc c , w drugim przypadku za zmienną niezależną biorąc A). Stosowany zazwyczaj sposób prostego przekształcenia równania regresji opisującego krzywą wzorcową w równanie obliczania stężenia na podstawie wartości absorbancji, tak jakby to było równanie funkcji a nie regresji, jest formalnie błędem, choć różnice zazwyczaj są niewielkie (ale są!).



c) Zakres zależności absorbancji od stężenia (zakres między stężeniem **a** oraz stężeniem **b**), w obrębie którego nie należy przeprowadzać analiz

