

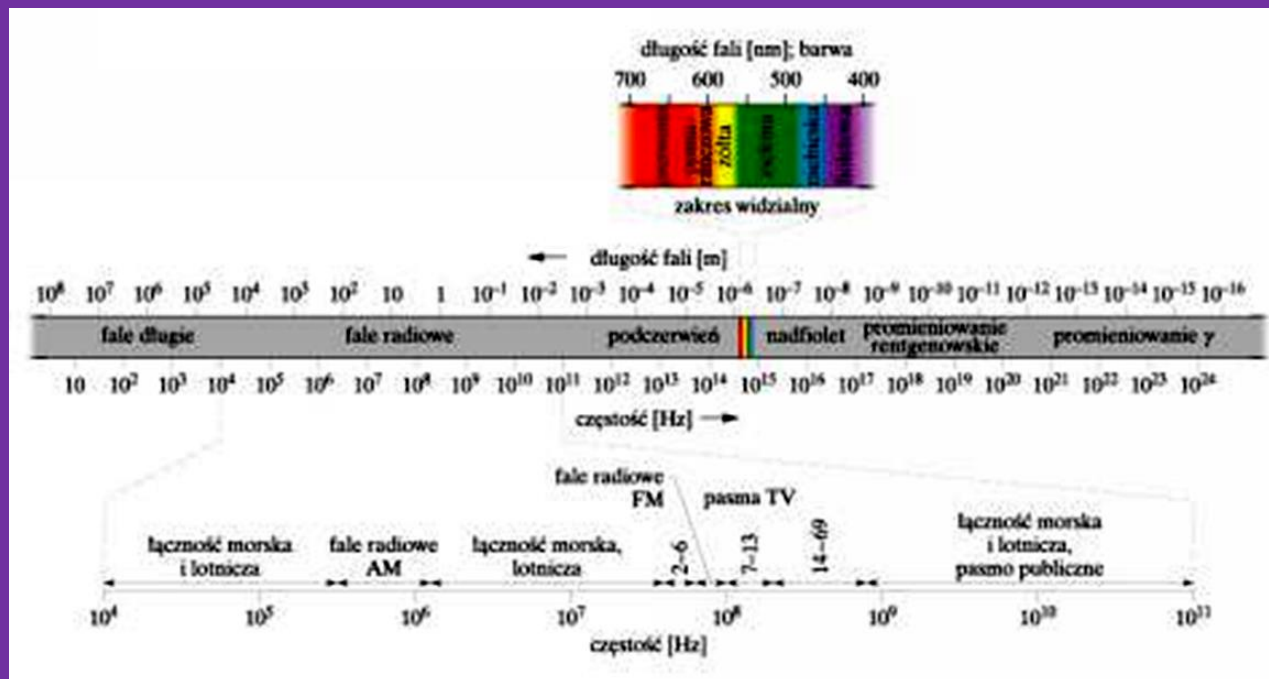
Spektroskopia UV-VIS. Metody optyczne.

Zakres materiału:

- podstawy teoretyczne (omówienie zachodzących zjawisk)
- wykorzystywane techniki i metody badawcze
- stosowana aparatura

UV-VIS

Spektroskopia UV-VIS polega na pomiarze absorpcji promieniowania ultrafioletowego z zakresu 200-400 nm i widzialnego w zakresie 400-750 nm.



UV-VIS - podstawy

Z równania Plancka wynika że:

$$E = h\nu = h \cdot c / \lambda$$

- $h = 6,626\ 069\ 57(29) \cdot 10^{-34}$ J·s
- ν - częstotliwość drgań źródła, które wysyła falę elektromagnetyczną
- c - prędkość światła ($3 \cdot 10^8$ m/s)
- λ – długość fali

UV-VIS -podstawy

Graniczne energie fotonów wyliczone na podstawie równania Plancka dla zakresu UV-VIS:

100 – 10000 kJ/mol

mogą powodować przejście elektronów w cząsteczce ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego.

UV-VIS

Zabsorbowana energia powoduje zmiany:

- stanów elektronowych
- energii oscylacyjnej
- energii rotacyjnej

przy czym:

e. rotacyjna : e. oscylacyjna : e. elektronowa

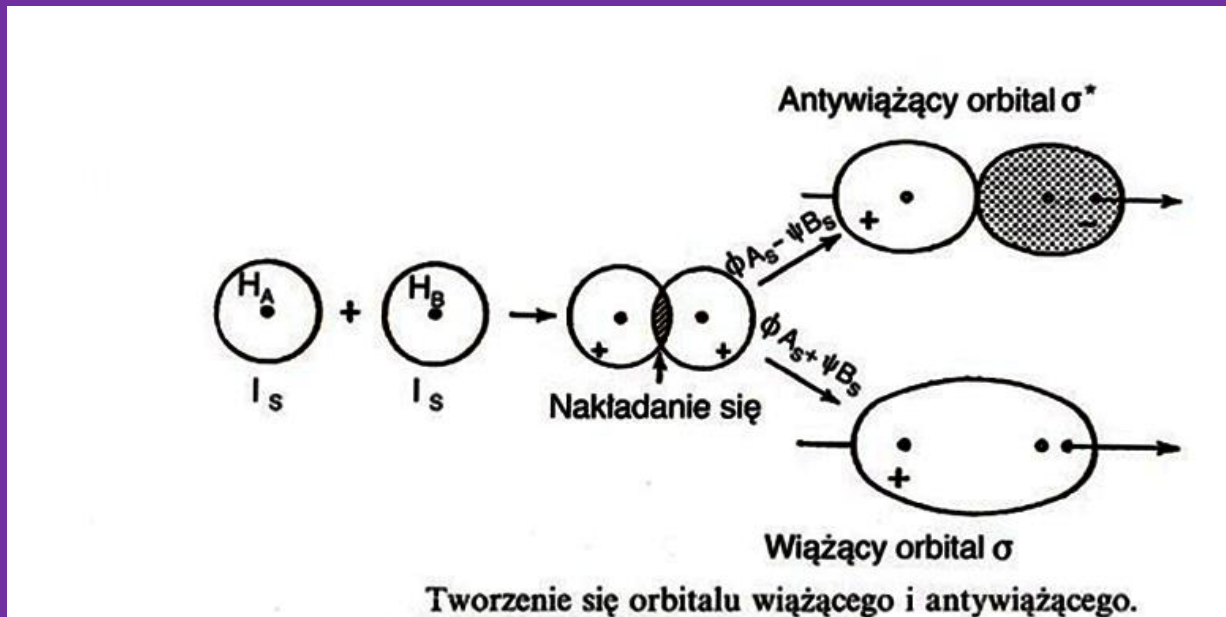
1

10

1000

UV-VIS

Absorpcja promieniowania z zakresu UV lub VIS powoduje przejście elektronu z **wiążącego** orbitalu cząsteczkowego na orbital **antywiązący** (o wyższej energii):



Orbitale cząsteczkowe - podsumowanie

- Orbital wiążący ma energię niższą niż energia stanu podstawowego atomów tworzących cząsteczkę.
- W orbitalu wiążącym gęstość elektronowa pomiędzy jądrami jest duża, w orbitalu antywiązącym jest natomiast mała – co powoduje odpychanie między atomami doprowadzając do osłabienia lub nawet zerwania wiązania.

UV-VIS

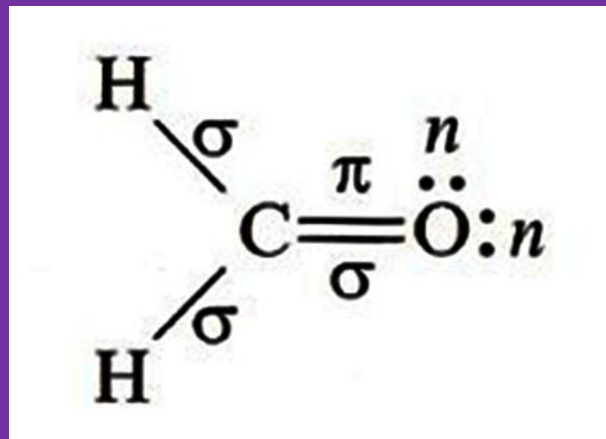
Warunkiem koniecznym absorpcji fotonu, powodującego przejście elektronu z orbitalu wiążącego na antywiążący jest dopasowanie wielkości fotonu do różnicy poziomów energetycznych orbitalu wiążącego i antywiążącego. Różnica ta jest równa:

$$\Delta E = h\nu$$

UV-VIS

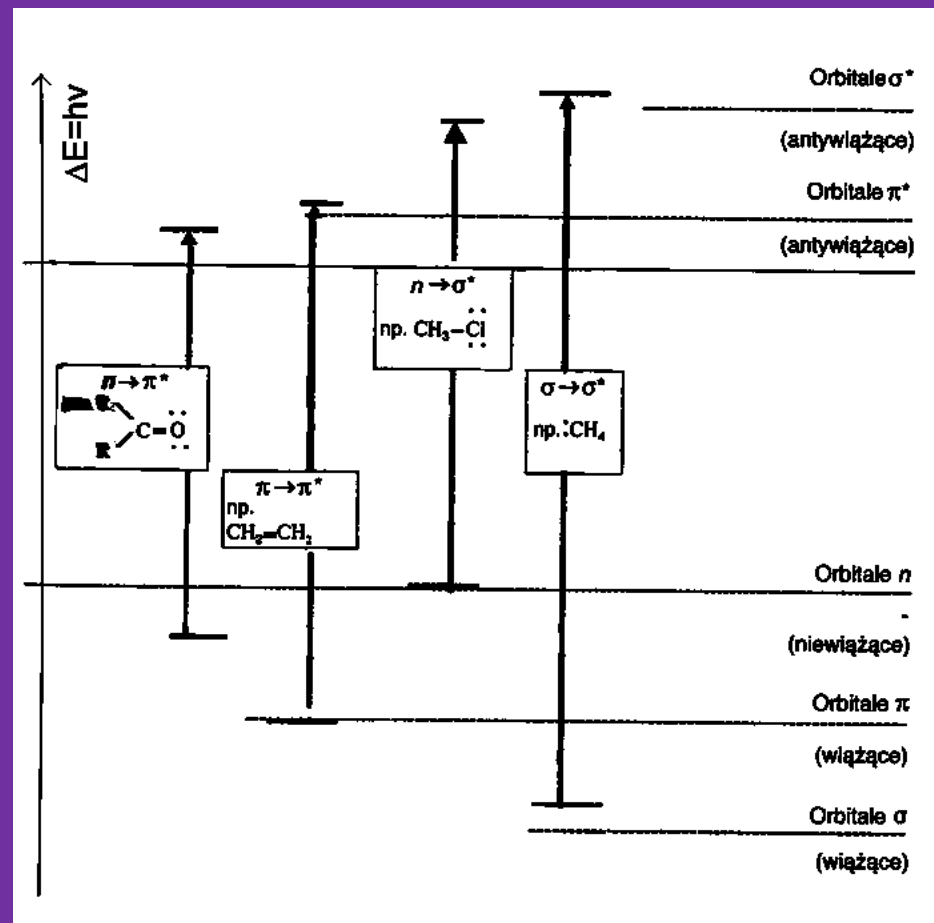
Elektrony walencyjne w cząsteczce związku organicznego podzielić można na 3 rodzaje:

- elektrony σ
- elektrony π
- elektrony n



UV-VIS

Rodzaje możliwych przejść elektronowych w cząsteczkach związków organicznych:



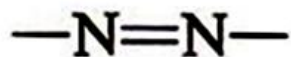
UV-VIS

Analizując np. strukturę metanolu można stwierdzić że pasmo absorpcyjne związane z przejściem $\sigma \rightarrow \sigma^*$ nie będzie w widmie widoczne ponieważ wzbudzenie elektronów w wiązaniu kowalencyjnym C-H wymaga zbyt dużej energii ($\lambda < 160 \text{ nm}$). Widoczne są natomiast pasma absorpcyjne związane z przejściami: $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$

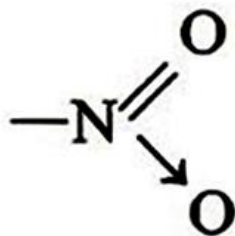
Oznacza to że chromoforami są grupy posiadające elektrony π lub n .

UV-VIS

azowa



nitrowa

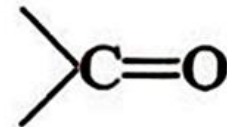


nitrozowa

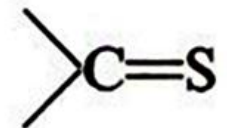


układ *p*-chinoidowy

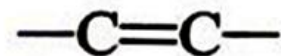
karbonylowa



tionowa



etylenowa



układ benzenowy

Substancje bezbarwne ale mające w swoich cząsteczkach chromofory dają widmo elektronowe w zakresie UV (180-380 nm)

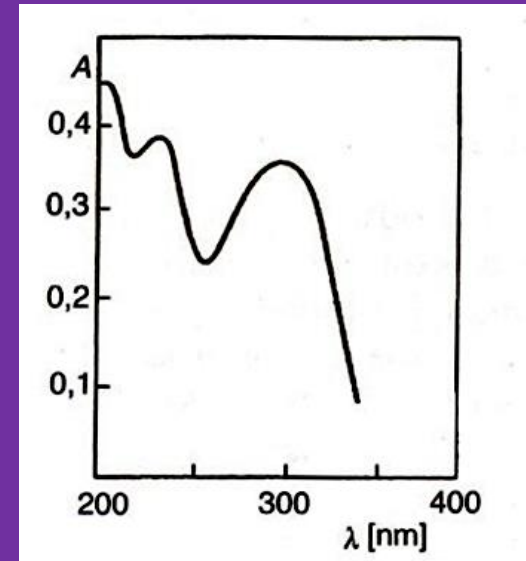
UV-VIS

Pasma absorpcji niektórych chromoforów:

Cząsteczka	Długość fali maksimum pasma λ_{max} [nm]	Dziesiętny molowy współczynnik absorpcji w maksimum ϵ_{max} [$l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
Przejścia $n \rightarrow \sigma^*$		
CH ₃ Br	204	200
CH ₃ I	259	3600
H ₂ O	167	7000
CH ₃ OH	184	150
CH ₃ NH ₂	215	600
(CH ₃) ₃ N	227	900
Przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$		
C ₂ H ₅ CH=C=CH ₂	225	500
CH ₂ =CH-CH=CH ₂	217	21000
CH ₂ =CH-CH=CH-CH=CH ₂	258	35000
CH ₂ =CH-CH=O	210	11500
Benzen	200	8000
Benzen	255	200
Acetofenon aromat.	240	13000
Acetofenon aromat.	278	1100
Przejścia $n \rightarrow \pi^*$		
CH ₃ CHO	294	12
CH ₃ -CO-CH ₃	279	14
Acetofenon	319	50
CH ₃ N=NCH ₃	340	4,5
CH ₂ =CH-CH=O	315	14
t-C ₄ H ₉ NO	665	20

UV-VIS

Widmo elektronowe zazwyczaj charakteryzuje się określając długość fali, przy której pojawia się maksimum absorpcji. Obok przedstawiono widmo elektronowe kwasu salicylowego w którym widoczne są 2 maksima absorpcji.



Kształt pasma absorpcji odpowiadający przejściu $n \rightarrow \pi^*$ zależy od rodzaju stosowanego rozpuszczalnika; w rozpuszczalniku polarnym pasmo jest rozmyte a w niepolarnym – wyraźne. Kształty pasm absorpcyjnych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ tylko w niewielkim stopniu zależą od stosowanego rozpuszczalnika.

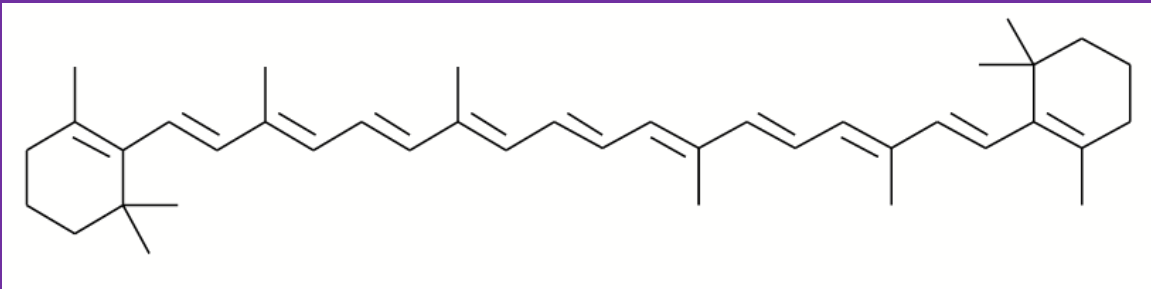
UV-VIS

Czynnikiem decydującym o wielkości absorpcji jest charakter grup chromoforowych w cząsteczkach. Większa ich ilość powoduje silniejszą absorpcję ale również przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych. Takie przesunięcie nazywa się **przesunięciem batochromowym** i może być wywołane obecnością kilku sprzężonych ze sobą wiązań podwójnych lub wprowadzeniu do cząsteczki **grup auksochromowych** (np. $-\text{OH}$ lub $-\text{NH}_2$). Grupy te nie wywołują barwy ale oddziałują na chromofory. Ich wpływ na przesunięcie maksimum absorpcji rośnie w szeregu:



UV-VIS

Dobrym przykładem przesunięcia batochromowego jest żółtopomarańczowa barwa β -karotenu powstająca w wyniku przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ jedenastu sprzężonych wiązań podwójnych.



UV-VIS

Przesunięcie hipsochromowe - przesuwanie się maksimum absorpcji w kierunku krótszych długości fali (np. od czerwieni do nadfioletu). Występuje w przypadku wprowadzenia do cząsteczki danego związku organicznego pewnych podstawników, zwanych grupami hipsochromowymi, charakteryzujących się brakiem wiązań podwójnych i wolnych par elektronowych.

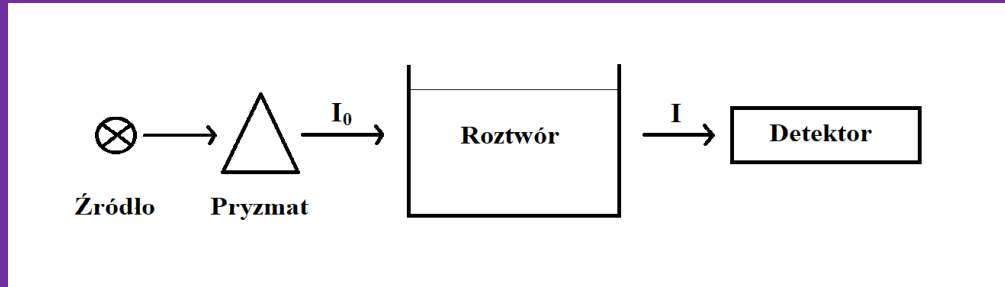
UV-VIS

Podział spektrofotometrii:

1. spektrofotometria w nadfiolecie (UV)(200-380 nm)
2. spektrofotometria w świetle widzialnym: kolorymetria* (VIS) (380-780 nm)
3. Spektrofotometria w podczerwieni (IR) (1-16 μm)

* - podstawą podziału na kolorymetrię i spektrofotometrię VIS są różnice w sposobie pomiaru i w stosowanej aparaturze. Kolorymetrię nazywa się dział analizy oparty na pomiarze lub porównywaniu natężenia zabarwienia roztworów, a spektrofotometrię zespół metod badawczych opartych na pomiarze stosunku natężeń (lub funkcji tego stosunku np. absorbancji) dwóch wiązek promieniowania (jedna jest wiązką odniesienia) w funkcji długości fali. Kolorymetria jest stosowana tylko do oznaczania substancji barwnych, a spektrofotometria również do analizy substancji bezbarwnych (UV , IR)

UV-VIS



Do opisu właściwości absorpcyjnych wielu układów (np. roztworów) stosuje się najczęściej 2 wielkości: **transmitancję** i **absorbancję**.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Transmitancja})$$

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (\text{Absorbancja})$$

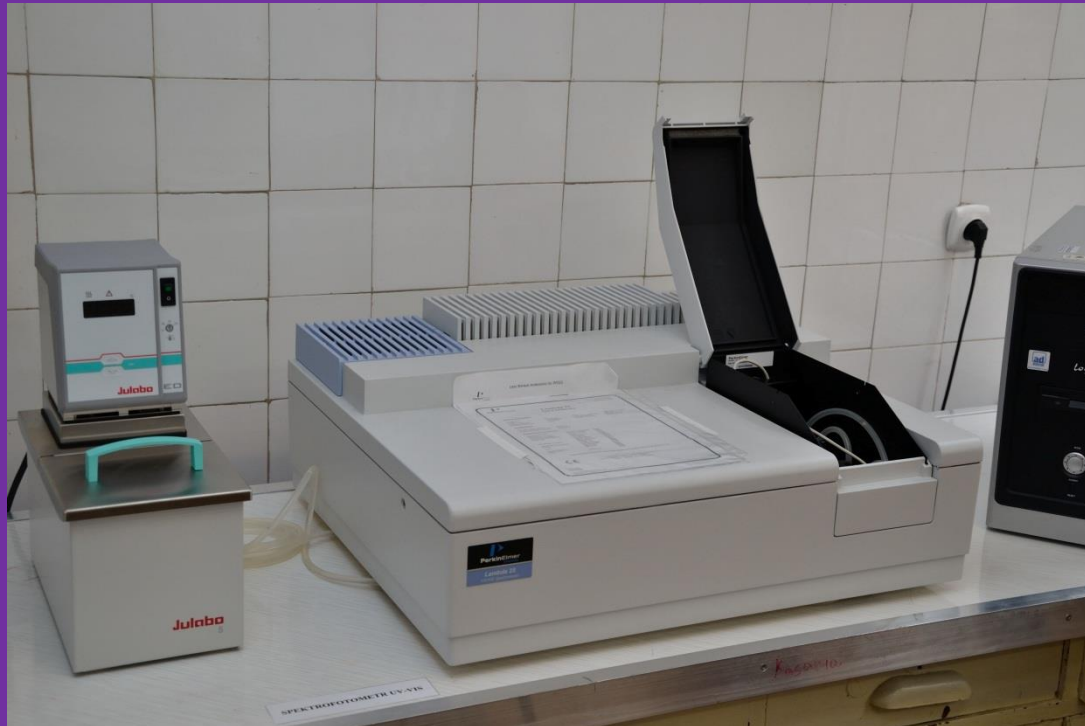
łączy je następująca zależność:

$$A = \lg \frac{1}{T} = -\lg T$$

Aparatura stosowana w spektrofotometrii UV-VIS



Aparatura stosowana w spektrofotometrii UV-VIS



Spektrofotometr Lambda

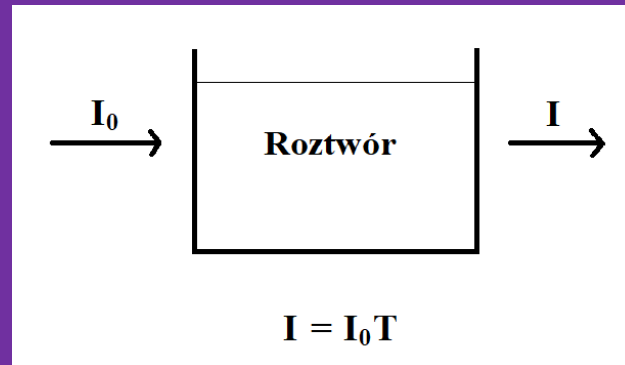
UV-VIS

Aparatura spektrofotometryczna:

- źródła promieniowania ciągłego: lampa wodorowa/deuterowa do 380 nm, od 380 nm lampa wolframowo-halogenowa
- detektory: fotokomórka, fotopowielacz elektronowy, fotoogniwo(kolorymetria)
- monochromatory: pryzmat(dawniej), siatka dyfrakcyjna, filtry(kolorymetria)

UV-VIS

Prawa absorpcji

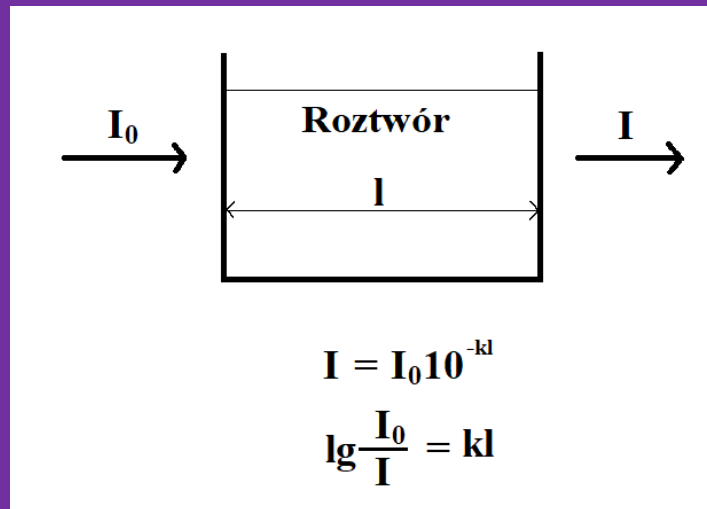


I prawo Lamberta:

natężenie światła monochromatycznego I po przejściu przez ośrodek optycznie jednorodny jest proporcjonalne do natężenia światła padającego I_0

UV-VIS

Prawa absorpcji

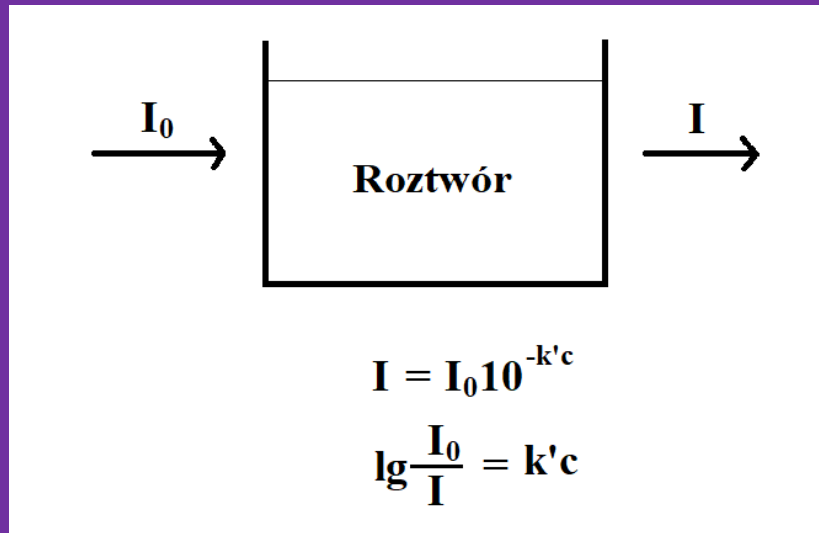


II prawo Lamberta (1760r.):

natężenie światła przechodzącego przez warstwę absorbującą zmniejsza się wykładniczo wraz z liniowym zwiększaniem się grubości warstwy

UV-VIS

Prawa absorpcji



Prawo Beera(1852r.): natężenie światła przechodzącego przez warstwę absorbującą zmniejsza się wykładniczo wraz z liniowym zwiększaniem się stężenia roztworu.

UV-VIS

Prawa absorpcji

Prawo Lamberta-Beera (1889r.)

(pełna nazwa: Prawo Bouguera-Lamberta-Beera-Waltera)

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

gdzie:

ϵ – molowy współczynnik absorpcji

c – stężenie substancji absorbującej

l – grubość warstwy substancji absorbującej

UV-VIS

Molowy współczynnik absorpcji ε jest ważnym parametrem charakteryzującym widmo elektronowe, świadczącym o intensywności absorpcji promieniowania. Ma on również duże znaczenie przy oznaczeniach ilościowych: jego duża wartość (powyżej 10000) pozwala na oznaczanie bardzo małej ilości substancji (zwiększa się czułość oznaczenia). Metody dla których ε jest mniejszy od 1000 uznaje się za mało czułe.

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} [\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$$

UV-VIS

Prawa absorpcji

Prawo addytywności absorbancji:

jeżeli w roztworze znajdują się dwie lub więcej substancji absorbujących promieniowanie UV-VIS, to całkowita absorbancja roztworu (A) jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników:

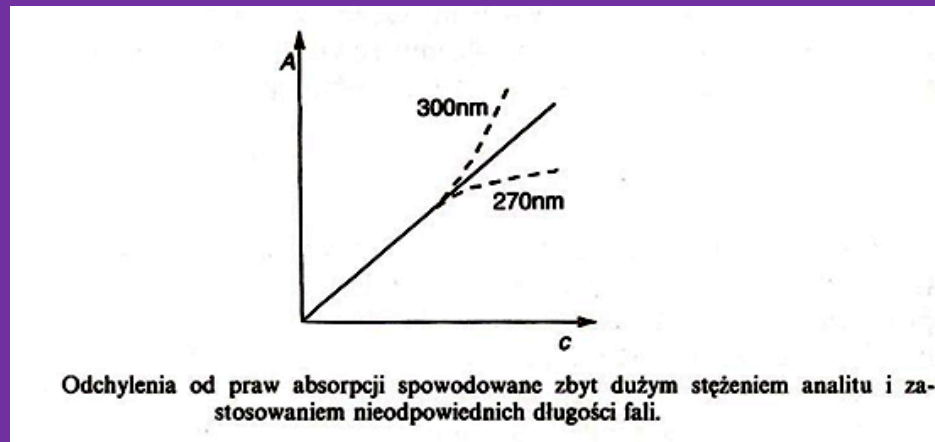
$$A = A_1 + A_2 + A_n = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n) \cdot l$$

gdzie:

A_1, A_2 — absorbancje składników 1 i 2 w roztworze.

UV-VIS

Przyczyny odchylenia od praw absorpcji:



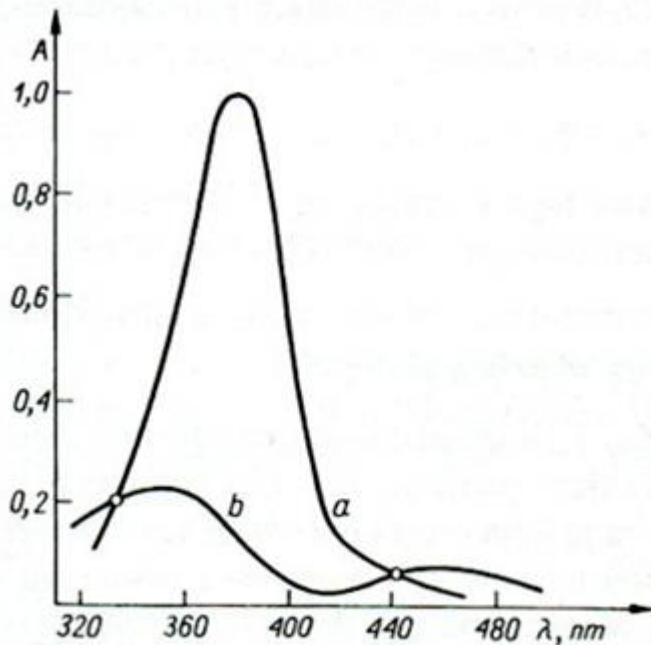
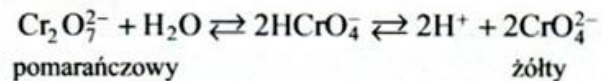
Odstępstwa od praw absorpcji mogą być wywołane czynnikami:

- podstawowe ograniczenia praw (np. za duże stężenia, niepożądana luminescencja)
- aparaturowymi (brak monochromatyczności promieniowania)
- chemicznymi (np. zmiana pH lub stężenia roztworu wpływa na dysocjację, solwatację, kompleksowanie...)

UV-VIS

Chemiczne przyczyny odchyień od praw absorpcji.

Przykład: zmiana barwy z pomarańczowej na żółtą zachodząca podczas rozcieńczania wodnego roztworu dwuchromianu. Zachodzi wtedy reakcja opisana poniższym równaniem:



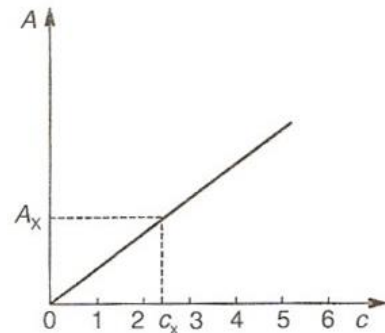
Krzywe absorpcji:

- a) chromianu potasu (0,5 mol/L KOH)
- b) dwuchromianu potasu (1,75 mol/L H₂SO₄)

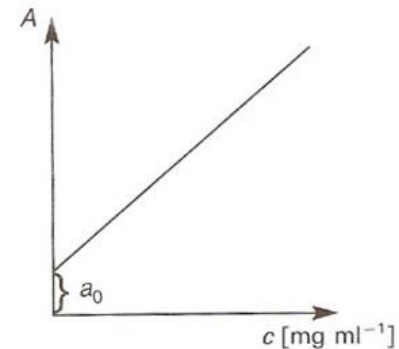
UV-VIS

Analiza ilościowa – metoda krzywej wzorcowej:

1. wybór zakresu stężeń analitu dla których absorbancja pozostaje w przedziale 0,3 – 0,8 (ze względu na małą wartość błędu względnego pomiaru)
2. wybór analitycznej długości fali
3. tworzenie krzywej kalibracyjnej w oparciu o punkty eksperymentalne
4. odczyt stężenia analitu



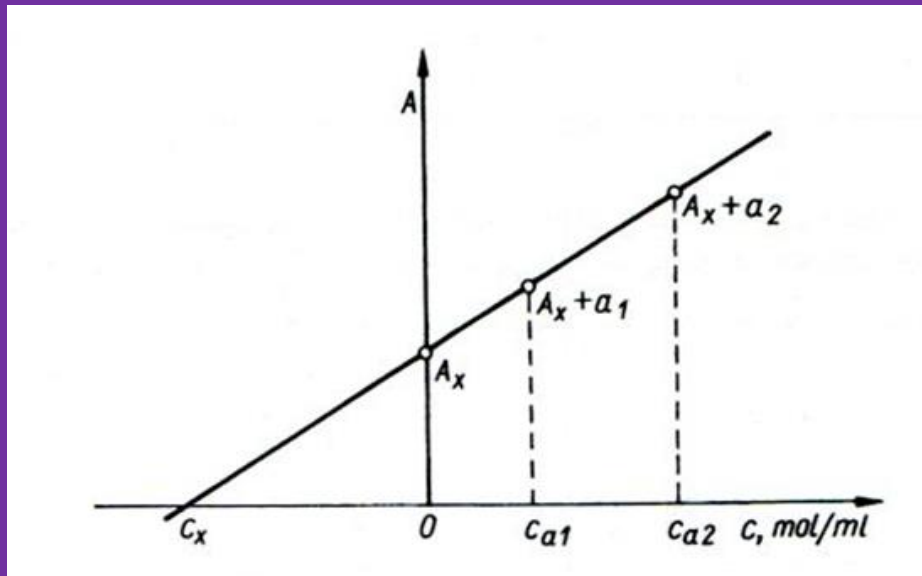
Krzywa wzorcowa dla jednorodnego układu spełniającego prawo Lamberta-Beera.



Krzywa wzorcowa dla roztworu, w którym promieniowanie absorbuje analizowana substancja i rozpuszczalnik.

UV-VIS

Analiza ilościowa – metoda dodawania wzorca



Metoda ta pozwala uniknąć błędów spowodowanych niejednakowym składem roztworu badanego i wzorca. Metoda ta znajduje zastosowanie do oznaczania ilości śladowych analitu obok dużych stężeń substancji towarzyszących.

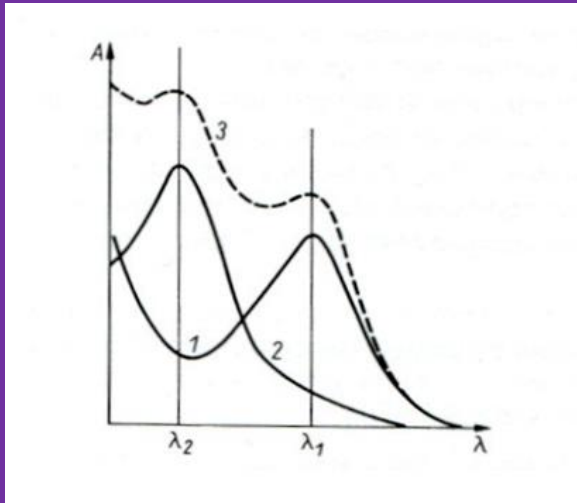
UV-VIS

Analiza ilościowa - układy 2 (i więcej) składnikowe.

Możliwe jest ilościowe spektrofotometryczne oznaczenie kilku składników mieszanie nawet jeśli widma tych składników nakładają się na siebie. Konieczna jest jednak w tym przypadku znajomość molowych współczynników absorpcji wszystkich składników przy ich analitycznych długościach fal a poszukiwane stężenia składników uzyskuje się rozwiązując odpowiednie układy równań.

UV-VIS

Analiza ilościowa - układy 2 (i więcej) składnikowe.



$$A_1 = \varepsilon_{11}c_1 + \varepsilon_{21}c_2$$

$$A_2 = \varepsilon_{12}c_1 + \varepsilon_{22}c_2$$

gdzie: A_1, A_2 – wartości absorpcji próbki przy dwóch analitycznych długościach fali, $\varepsilon_{11}, \varepsilon_{12}$ – wartości molowych współczynników absorpcji (odpowiednio przy λ_1 i λ_2) pierwszego składnika, $\varepsilon_{21}, \varepsilon_{22}$ – odpowiednie wartości molowych współczynników absorpcji dla drugiego składnika, c_1, c_2 – stężenia obu oznaczanych składników

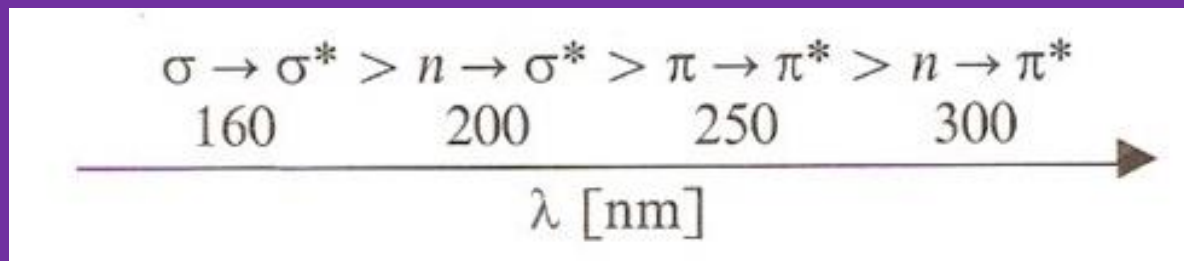
Warunki które muszą być spełnione:

- prawo Beera w wybranym zakresie stężeń
- prawo addytywności absorpcji
- układ krzywych spektrofotometrycznych obydwu składników musi umożliwiać wybór 2 długości fali, przy których raz dominuje absorpcja jednego składnika, a raz drugiego
- brak innych substancji absorbujących

UV-VIS

Zastosowanie spektrofotometrii UV-VIS do identyfikacji substancji organicznych.

Widma UV-VIS dają mniej informacji o strukturze cząsteczkowej niż widma w podczerwieni lub NMR. Wynika to z faktu iż wiele związków nie absorbuje promieniowania powyżej 200 nm, np. węglowodory nasycone albo położenie pasm absorpcji zależy tylko w niewielkim stopniu od budowy cząsteczki. Energie potrzebne do przeniesienia elektronów na wyższe poziomy energetyczne można uszeregować następująco:



Metody optyczne stosowane w chemii analitycznej.

Metody optyczne:

- Najważniejsze metody optyczne które znalazły zastosowanie w chemii analitycznej:
 - REFRAKTOMETRIA
 - POLARYMETRIA
 - NEFELOMETRIA
 - TURBIDYMETRIA

- Rodzaje oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z materią:
 - oddziaływania sprężyste
 - oddziaływania niesprężyste

Metody optyczne oparte są na technice **sprężystego** oddziaływania badanej próbki z padającym na nią promieniowaniem elektromagnetycznym.

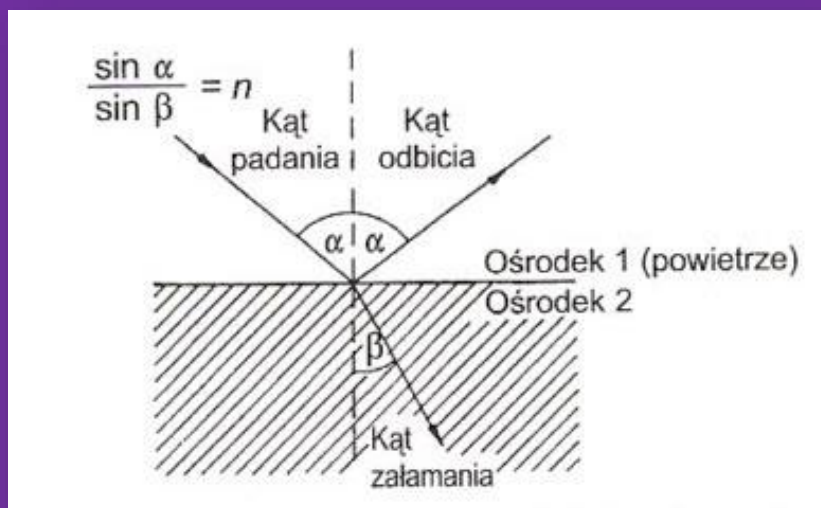
Sprężyste oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego na badaną próbkę **nie wywołuje zmiany energii** tego promieniowania, zmienia natomiast jego kierunek (fali, strumienia fotonów). Zgodnie z modelem *fali sinusoidalnej*, zmianie ulegnie kierunek fali.

Refraktometria

Refraktometria to instrumentalna metoda analityczna wykorzystująca zależność współczynników załamania światła badanych roztworów od ich stężenia. Na tej podstawie wnioskuje się o zawartości oznaczanych substancji. Do pomiarów wykorzystuje się refraktometry.

Załamania fali

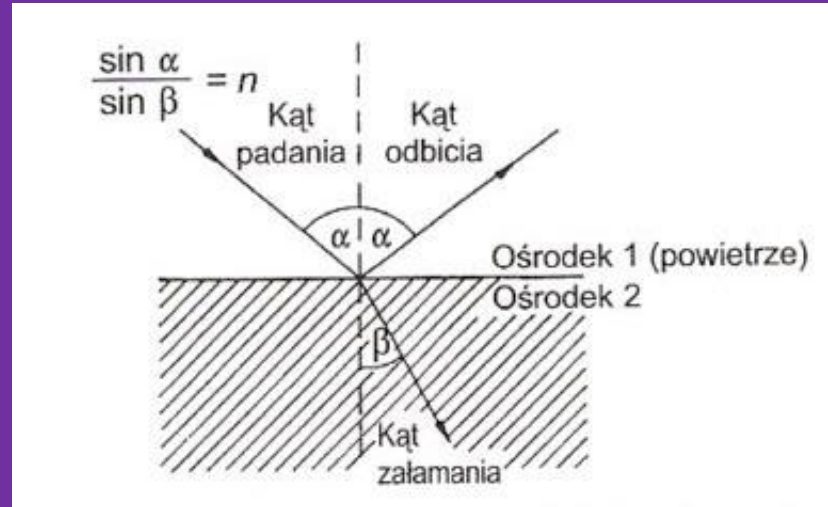
Załamania fali to zmiana kierunku rozchodzenia się fali związana ze zmianą jej prędkości, gdy przechodzi do innego ośrodka. Zmiana prędkości powoduje zmianę długości fali, a częstotliwość pozostaje stała.



Załamanie światła - przykład



Załamanie fali



$$n_{21} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Zgodnie z falową teorią światła:

$$n_{21} = \frac{v_1}{v_2}$$

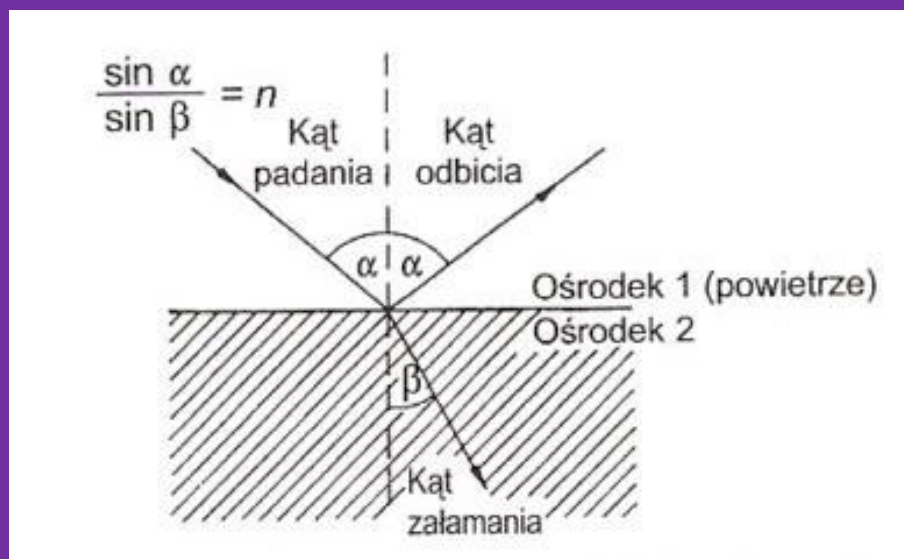
gdzie :

v_1 – prędkość światła w ośrodku 1

v_2 – prędkość światła w ośrodku 2

Załamania fali

Jeżeli kąt padania α jest większy od kąta załamania β to ośrodek 1 jest optycznie rzadszy niż ośrodek 2. Ośrodek optycznie rzadszy to ośrodek o mniejszym współczynniku załamania (większej prędkości rozchodzenia się światła)



Załamanie fali

W literaturze podaje się najczęściej tzw. *bezwzględne współczynniki załamania* czyli wsp. załamania względem próżni (dla gazów) lub względem powietrza (dla cieczy i ciał stałych). Współczynniki załamania zależą od:

- *długości fali świetlnej* (zwiększają się wraz ze zmniejszaniem długości fali świetlnej)
- *temperatury* (maleją wraz ze wzrostem temp.)
- *ciśnienia* (istotne w przypadku gazów)

Załamanie fali

W celu ustandaryzowania i zwiększenia dokładności pomiarów laboratoryjnych współczynników załamania światła używa się światła monochromatycznego o długości fali linii D sodu $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ oznaczając współczynnik załamania symbolem n_D , użycie światła białego spowoduje że pomiar będzie niezbyt dokładny ponieważ poszczególne jego składowe załamują się pod różnymi kątami.

Refraktometria

- Współczynnik załamania światła jest wielkością bezwymiarową a jego wartość dla wodnych roztworów związków nieorganicznych i ciekłych organicznych zawiera się w zakresie: 1.3 - 1.8
- Jest on wielkością charakterystyczną dla danej substancji i umożliwia jej identyfikację a jego zależność od stężenia wykorzystywana jest w analizie ilościowej (**refraktometria**).

Refraktometria

umożliwia również identyfikację badanych substancji oraz badanie struktury związków chemicznych.

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d}$$

gdzie: R_M – refrakcja molowa

M – masa molowa

d - gęstość

Refraktometria

Refrakcja molowa jest wielkością addytywną tzn. stanowi sumę refrakcji przypisanych poszczególnym atomom, grupom funkcyjnym i wiązaniom w danej cząsteczce:

$$R_M = \sum \chi R_a$$

gdzie: χ – liczba atomów lub wiązań w cząsteczce

R_a – refrakcja atomowa

Refraktometria - zastosowanie

Refraktometria umożliwia identyfikację oraz pomiar stężenia wielu substancji np.: białka całkowitego w surowicy krwi, cukru, tłuszczu... Do pomiaru wykorzystuje się liniową zależność współczynnika załamania światła od stężenia oznaczanych substancji. Refraktometria znalazła szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

Polarymetria

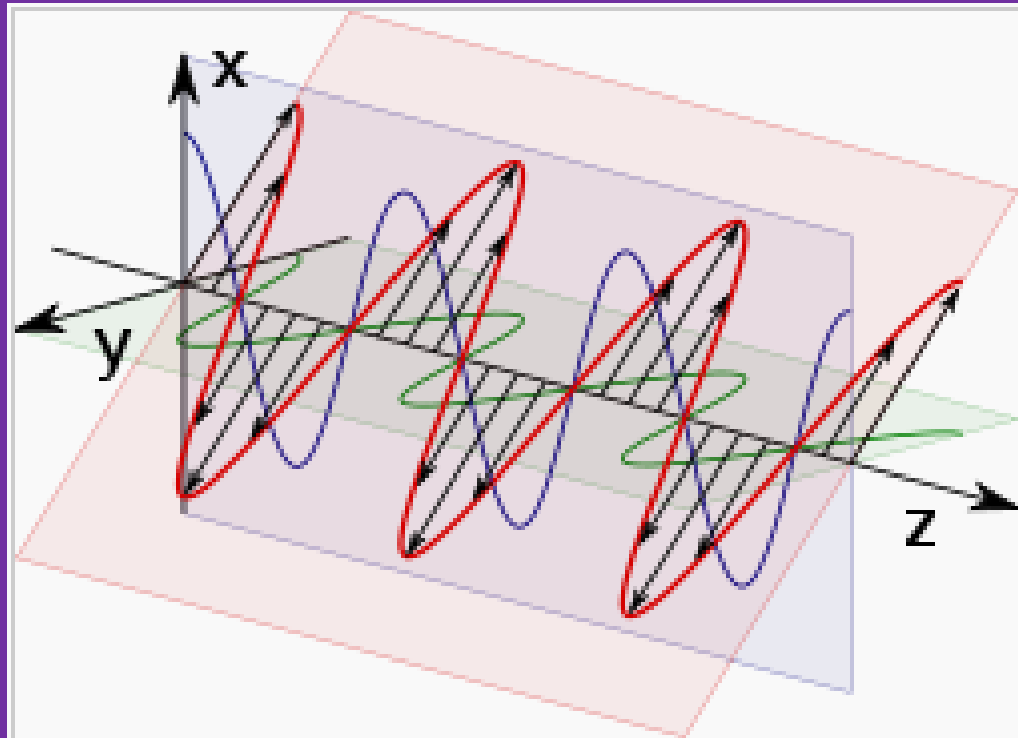
Polarymetria, instrumentalna metoda analityczna, w której wyznacza się aktywność optyczną badanych substancji dzięki pomiarom kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła spolaryzowanego.

Aktywność optyczna substancji związana jest z jej budową przestrzenną. Jeżeli cząsteczki danego związku nie mają elementów symetrii (środka symetrii i płaszczyzny symetrii), są optycznie czynne.

Polarymetria cd.

Cząsteczki asymetryczne są równocześnie cząsteczkami chiralnymi tzn. nie są identyczne z ich odbiciami lustrzanymi, tak jak relacja pomiędzy prawą i lewą dłonią. Cząsteczkami chiralnymi są np. związki organiczne zawierające asymetryczne atomy węgla, fosforu, siarki, azotu. Substancje optycznie czynne mogą skręcać płaszczyznę polaryzacji światła w prawo lub w lewo (tzw. substancje prawo- i lewoskrętne).

Polarymetria

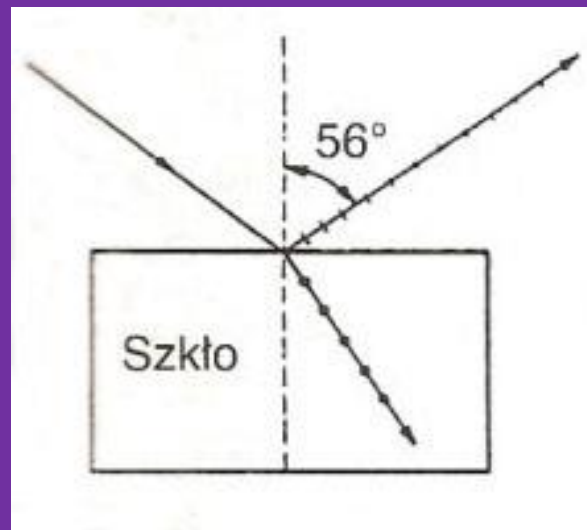


Fala płaska spolaryzowana liniowo (kolor czerwony) oraz jej składowe w kierunkach x i y (kolor niebieski i zielony).

Liniowa polaryzacja światła

Polarymetria

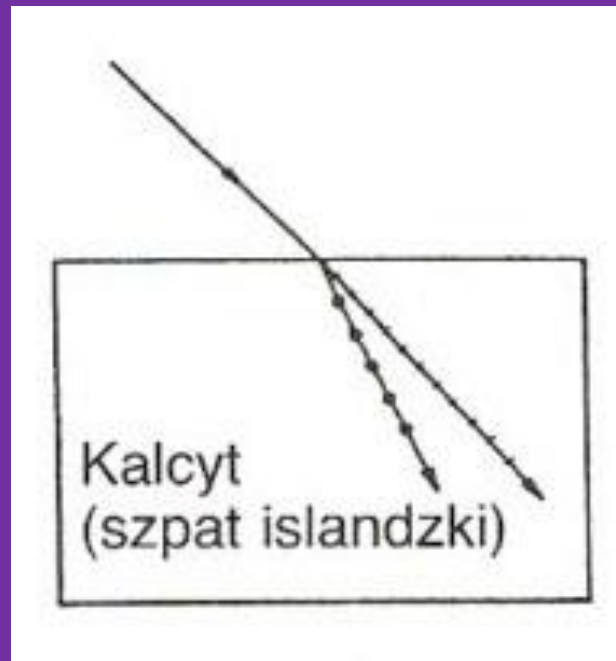
Metody uzyskiwania światła spolaryzowanego:



Odbicie światła od powierzchni pod kątem Brewstera przy którym promień odbity jest prostopadły do promienia załamanej i jest całkowicie spolaryzowany. Dla szkła o $n=1,5$ kąt Brewstera wynosi $56,3^\circ$ a dla wody 53° i zależy od długości fali światła

Polarymetria

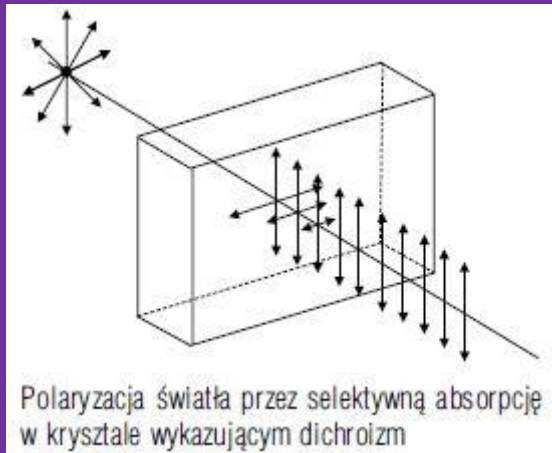
Zjawisko dwójłomności



Promień światła niespolaryzowanego padający na pewne substancje anizotropowe (np. Kalcyt) rozdziela się na 2 promienie spolaryzowane w płaszczyznach wzajemnie prostopadłych.

Polarymetria

- Zjawisko dichroizmu



można obserwować w kryształach wykazujących zależność współczynnika absorpcji od kierunku drgań wektora świetlnego, np. siarczan jodochininy

Efekt wywołany zastosowaniem filtra polaryzacyjnego w aparacie fotograficznym





Efekt wywołany
zastosowaniem
filtra
polaryzacyjnego
w aparacie
fotograficznym

Polarymetria

- Skręcalność właściwa:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot d}$$

gdzie: α – zmierzony kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła; l – grubość warstwy; d – gęstość próbki

jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji. Najczęściej dokonuje się pomiaru wartości kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji w temp. 20°C w świetle linii D sodu ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$)

Polarymetria

- W przypadku roztworów substancji optycznie czynnych do wzoru na skręcalność właściwą wprowadza się wartość stężenia **c** tych substancji w roztworze i wówczas:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c} \cdot 100$$

gdzie: *c* – stężenie
wyrażone w gramach na 100 ml
roztworu; *l* – grubość warstwy
roztworu w decymetrach

Polarymetria

Podstawą oznaczania ilościowego substancji metodą polarymetryczną jest proporcjonalność kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła do stężenia substancji wywołujących to skręcenie:

$$c = \frac{\alpha}{[\alpha]_{\text{D}}^{20} \cdot l} \cdot 100$$

Zastosowanie polarymetrii

W analityce medycznej metoda ta jest stosowana do wyznaczania stężenia glukozy w moczu u osób chorych na cukrzycę. W przemyśle cukrowniczym bada się zawartość procentową sacharozy np. w syropach, soku buraczanym. Pomiar polarymetryczny znajduje zastosowanie w badaniach równowagi i mechanizmów reakcji zwłaszcza wśród optycznie czynnych związków organicznych, a także w stereochemii przy określaniu budowy przestrzennej np. terpenów, białek, steroidów...

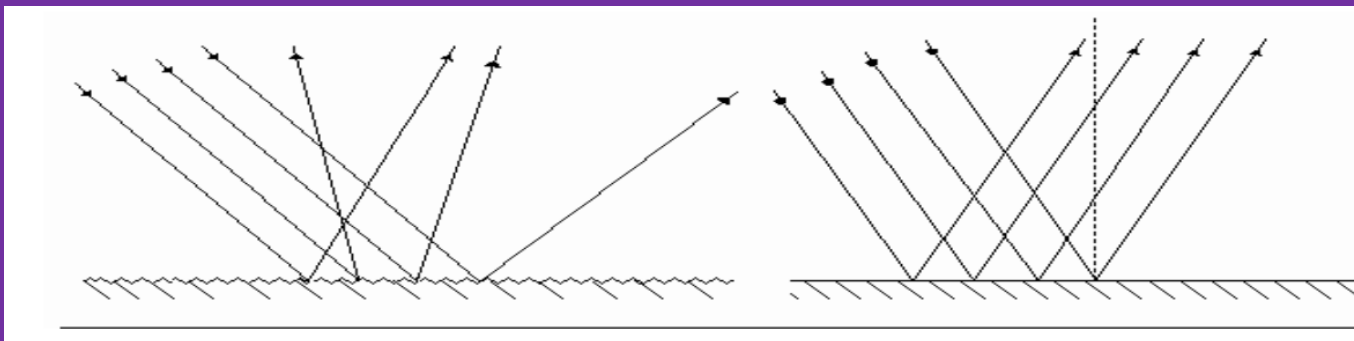
Nefelometria i turbidymetria - wprowadzenie

- *Metody te polegają na pomiarze światła rozproszonego przez roztwór zawierający w przezroczystym ośrodku cząsteczki fazy stałej lub ciekłej w stanie znacznego rozdrobnienia. **Warunkiem rozpraszania jest to, aby współczynniki załamania światła ośrodka i fazy rozproszonej były różne.***

Rozpraszanie energii jest efektem zjawisk towarzyszącym sprężystym oddziaływaniom promieniowania elektromagnetycznego z materią:

- odbicia
- dyfrakcji (ugięcia)
- całkowitego wewnętrznego odbicia
- załamania
- skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego

Rozproszenie światła - odbicie



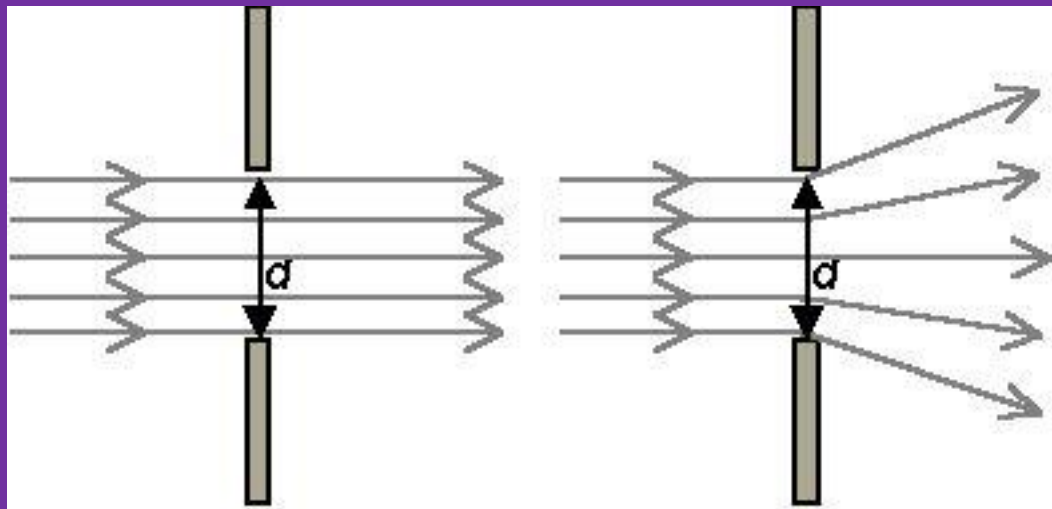
W przypadku gdy światło pada na gładką powierzchnię dla której rozmiary nierówności na jej powierzchni są mniejsze od długość fali świetlnej (ok. $1 \mu\text{m}$) mówimy o **zwierciadle**. W przeciwnym przypadku mamy do czynienia ze zjawiskiem **rozpraszania światła**.

Dyfrakcja

- **Dyfrakcja (ugięcie fali)** to zjawisko fizyczne zmiany kierunku rozchodzenia się fali na krawędziach przeszkód oraz w ich pobliżu. Zjawisko jest wyraźnie obserwowane dla przeszkód o rozmiarach porównywalnych z długością fali.

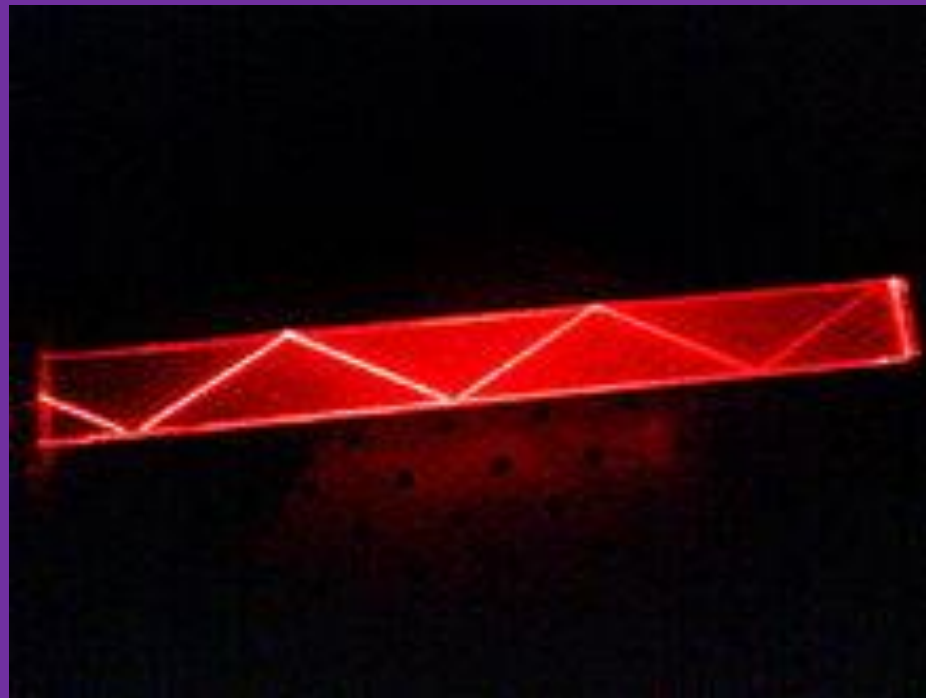
Dyfrakcja

- $d \gg \lambda$ – dyfrakcja nie występuje,
- $d \approx \lambda$ – dyfrakcja zachodzi.



Całkowite wewnętrzne odbicie – przykład:

- Plexiglas – szkło akrylowe



Układy dyspersyjne

- Roztwór właściwy
- Roztwór koloidalny (zol)
 - Zawiesina

Roztwór właściwy

- Jest to jednorodna mieszanina dwóch lub więcej substancji. Cząsteczki tych substancji są w roztworach chaotycznie wymieszane. Substancja rozpuszczona znajduje się w stanie rozproszenia molekularnego. Roztwory właściwe nie rozpraszają światła, są przezroczyste i nie pozostawiają osadu podczas sączenia.

Roztwór koloidalny

- **Roztwór koloidalny** (koloid, układ koloidowy) – niejednorodna mieszanina, zwykle dwufazowa (**koloidy fazowe**), tworząca układ dwóch substancji, w którym jedna z nich (**faza rozproszona**) jest rozproszona w drugiej (**faza ciągła**). Rozdrobnienie (czyli stopień dyspersji) substancji rozproszonej jest tak duże, że fizycznie mieszanina sprawia wrażenie homogenicznej, jednak nie jest to wymieszanie na poziomie pojedynczych cząsteczek. **Koloidy cząsteczkowe** to układy gdzie fazą rozproszoną są makrocząsteczki, na przykład polimery (żelatyna, skrobia, białka) – nie występuje wówczas wyraźna granica fazowa, bo cząsteczki rozpuszczalnika mogą wnikać do wnętrza makrocząsteczki. Roztwory koloidalne nazywane są *zolami*. Wykazują właściwości pośrednie między roztworami właściwymi i zawiesinami. Cząstki rozproszone nie są widoczne nawet pod mikroskopem, ale powodują zjawisko rozproszenia światła. Średnica drobin od 1 do 100 nm.

Zawiesina

Jest to mieszanina dwu, lub więcej substancji, z których jedna stanowi fazę ciągłą zewnętrzną, a pozostałe (nierozpuszczalne w fazie zewnętrznej) są rozproszone w postaci drobin widocznych gołym okiem. Cząstki zawieszony powodują rozproszenie światła przechodzącego przez zawiesinę i osadzają się podczas sączenia lub na dnie naczynia pod wpływem grawitacji. Zawiesina jest układem stosunkowo nietrwałym. Trwałość zależy od rozdrobnienia substancji rozproszonej i gęstości oraz lepkości fazy rozpraszającej. Średnica drobin od 0,1 do 10 μm .

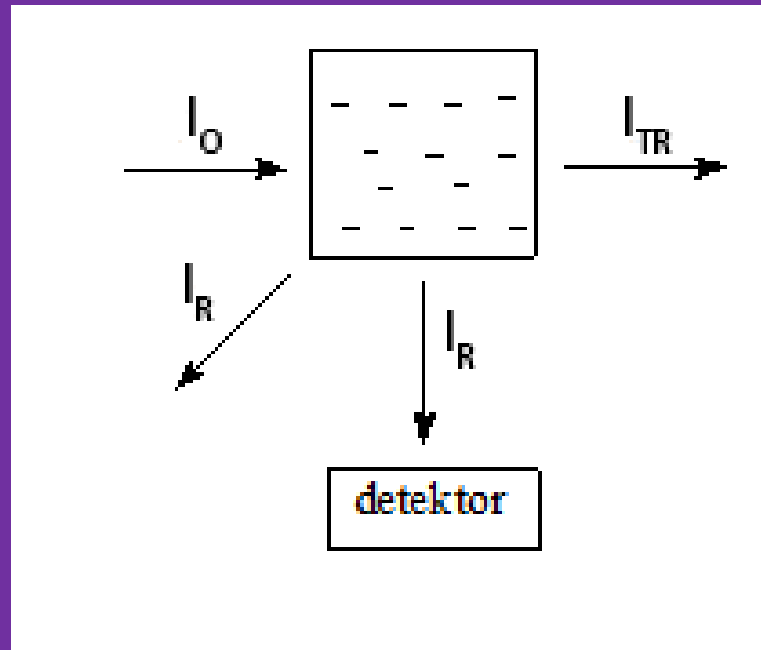
Nefelometria

- Pomiar nefelometryczny polega na badaniu zjawisk zachodzących podczas przechodzenia światła przez ośrodek niejednorodny. Mechanizm tego zjawiska może być różny w zależności od rozmiaru cząstek. W roztworach koloidowych (średnica cząstek od 1-100 nm) promień ulega głównie ugięciu. W przypadku cząstek o większych średnicach następuje rozproszenie światła przede wszystkim na zasadzie odbicia.

Nefelometria

- Jeżeli cały badany układ jest przezroczysty, możliwe jest załamывanie światła na granicach ośrodków o różnej gęstości. Taki mechanizm jest charakterystyczny dla rozproszenia Tyndalla.
- Największą rolę w rozpraszaniu odgrywa dyfrakcja i odbicie. Światło jest wtedy rozpraszane równomiernie we wszystkich kierunkach. Kąt pomiaru promieniowania rozproszonego wynosi najczęściej 90° , co umożliwia oddzielenie promieniowania wiązki pierwotnej od promieniowania rozproszonego.

Idea pomiaru nefelometrycznego



Efekt Tyndalla

- Jeżeli przez roztwór koloidalny przepuści się wiązkę światła, to wskutek uginania się promieni na cząstkach fazy rozproszonej, światło staje się widoczne w postaci tzw. stożka Tyndalla. Intensywność tego zjawiska jest tym większa, im większa jest różnica między współczynnikiem załamania fazy rozproszonej i ośrodka dyspersyjnego.

Efekt Tyndalla - przykład



Nefelometria

- W analizie medycznej nefelometrię stosuje się do oznaczania rozcieńczonych roztworów białek. Intensywność światła rozproszonego I_r na małych kulistych cząstkach koloidu jest opisana wzorem:

$$I_r = F \cdot I_0 \cdot N_{cz} \cdot r^6 \cdot v^4 \cdot \frac{V_{cz}^2}{\lambda^4}$$

F – współczynnik zależny od geometrii układu optycznego aparatury

I_0 – intensywność wiązki pierwotnej

N_{cz} – liczba cząstek rozpraszających

r – promień cząstek

v – liczba falowa ($v = 1/\lambda$)

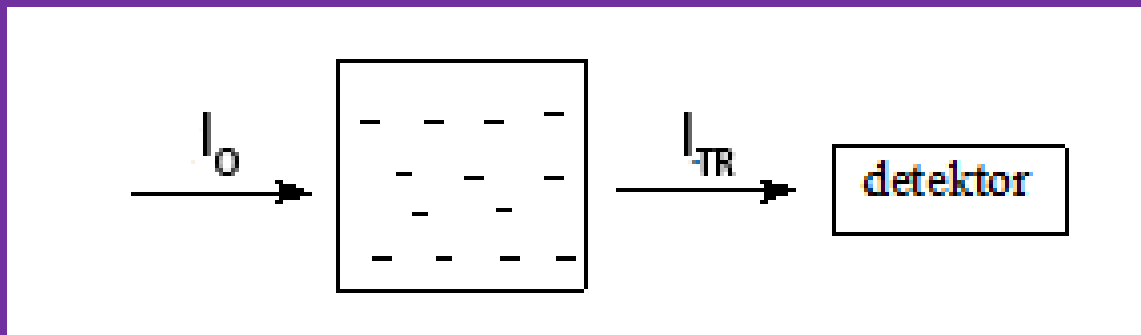
λ – długość fali

V – objętość cząsteczki

Turbidymetria

- Metoda ta umożliwia pomiar stężenia koloidów i zawiesin. Światło padające o natężeniu I_0 może w badanej próbce zostać rozproszone lub zaabsorbowane. Natężenie promieniowania przechodzącego I_{tr} jest więc równe:

$$I_{tr} = I_0 - I_{abs} - I_r$$



Turbidymetria cd.

- W roztworach właściwych I_r jest praktycznie do pominięcia, stąd zależność:
- $I_{tr} = I_0 - I_{abs} - I_r$ ulega uproszczeniu i otrzymujemy:

$$I_{tr} = I_0 - I_{abs}$$

- W bezbarwnych roztworach niewłaściwych (koloidalnych) do pominięcia jest I_{abs} . Wtedy:

$$I_{tr} = I_0 - I_r \quad \text{czyli:}$$

$$I_r = I_0 - I_{tr}$$

Turbidymetria

- Promieniowanie transmitowane jest więc osłabione z powodu rozpraszania promieniowania padającego. Poprzez pomiar I_{tr} uzyskujemy informację o wielkości promieniowania rozproszonego:

- $I_r = I_0 - I_{tr}$

Turbidymetria

- Technikę pomiarów, opartą na pomiarze absorpcji pozornej $I_r = I_0 - I_{tr}$ spowodowanej zmętnieniem roztworów, stosuje się do oznaczania stężeń zawiesin o średnicach lub rozmiarze cząstek powyżej 100 nm. Ta technika pomiarów nazywa się turbidymetrią. Tak zwana absorbanca pozorna A_{poz} (lub Turbidancja S) jest proporcjonalna do stężenia c substancji badanej i długości drogi optycznej l zgodnie z równaniem:

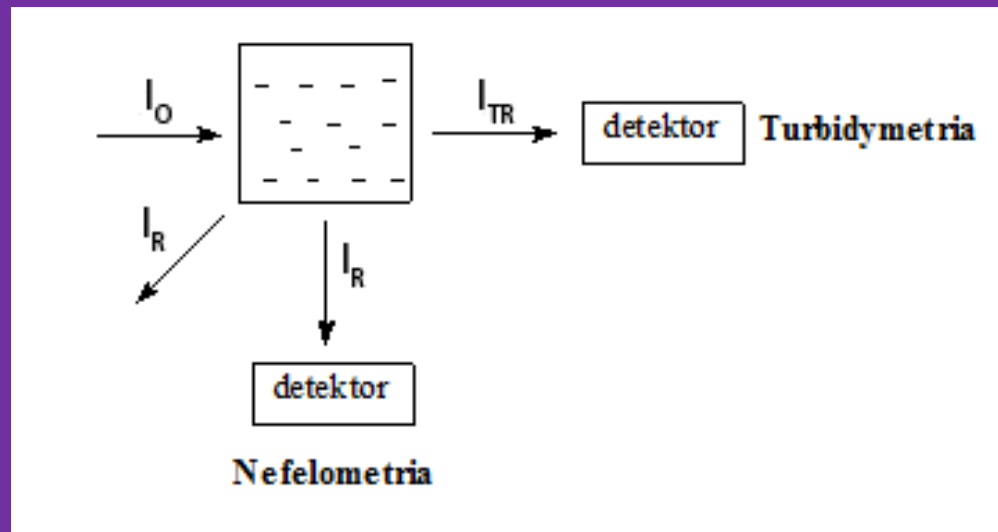
$$A_{poz} = -\log\left(\frac{I_{tr}}{I_0}\right) = \epsilon_{poz} \cdot l \cdot c$$

Turbidymetria

$$A_{\text{poz}} = -\log\left(\frac{I_{\text{tr}}}{I_0}\right) = \epsilon_{\text{poz}} \cdot l \cdot c$$

- ϵ_{poz} jest współczynnikiem empirycznym, zależnym od warunków eksperymentalnych, ma wartość stałą tylko dla identycznych warunków. Pomiar absorbancji pozornej umożliwia określenie stężenia analitu.
- Turbidymetria cechuje się wysoką czułością. Pozwala na oznaczanie roztworów koloidalnych przez wytrącanie nadmiarem odczynnika. Tak oznacza się aniony Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} w stężeniach $10^{-6} - 10^{-9}$ mol/l.

Nefelometria vs turbidymetria



Nefelometria i turbidymetria – uwagi.

Wszystkie pomiary nefelometryczne i turbidymetryczne prowadzone są względem wzorców, w ściśle standaryzowanych warunkach. Szczególnie istotnym jest przestrzeganie ustalonego czasu odczytu liczony od przygotowania roztworów. Oznaczanie turbidymetryczne stosowane jest w przypadku zawiesin o większych stężeniach a nefelometryczne jest dokładniejsze przy większym rozcieńczeniu. Metodami tymi oznacza się m.in. insulinę, cholesterol, hemoglobinę, kwasy nukleinowe w laboratoriach przyszpitalnych

Polecana literatura:

- Szczepaniak Walenty: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2020
- Andrzej Cygański: Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2020
- Ryszard Kocjan: Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000