

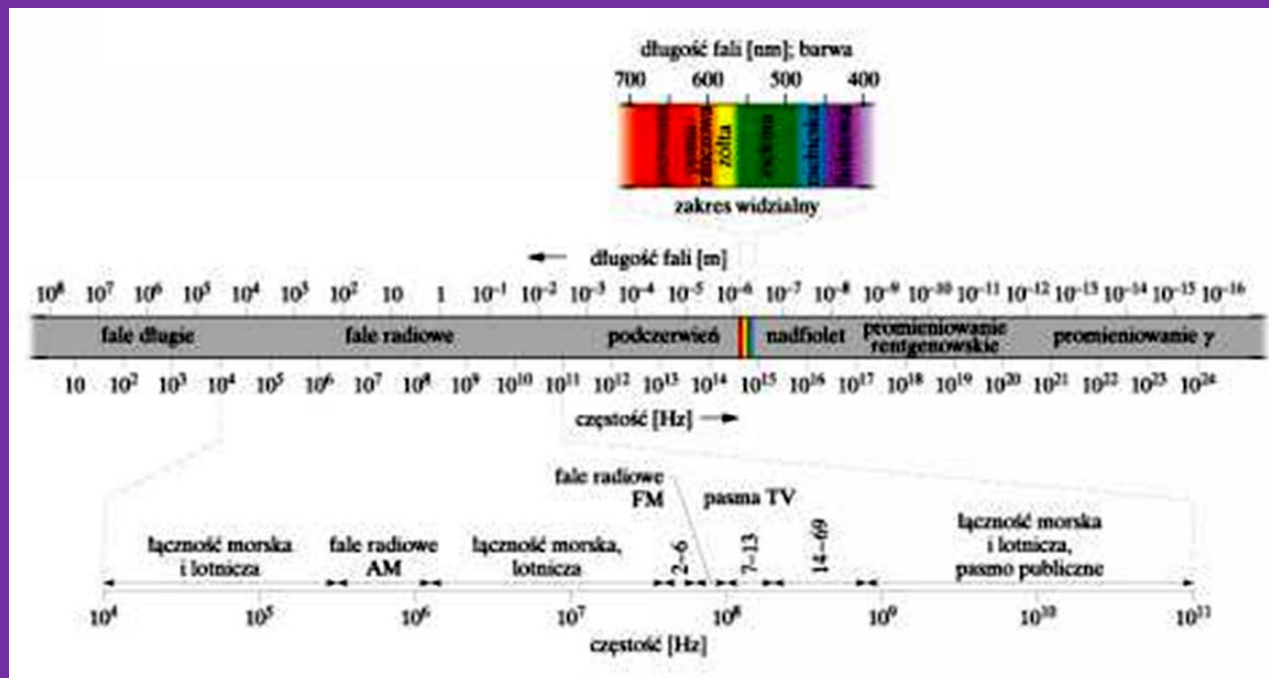
# Spektroskopia UV-VIS. Metody optyczne.

# 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
- $\nu$  - częstotliwość drgań źródła, które wysyła falę elektromagnetyczną
- $c$  - prędkość światła ( $3 \cdot 10^8$  m/s)
- $\lambda$  – 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

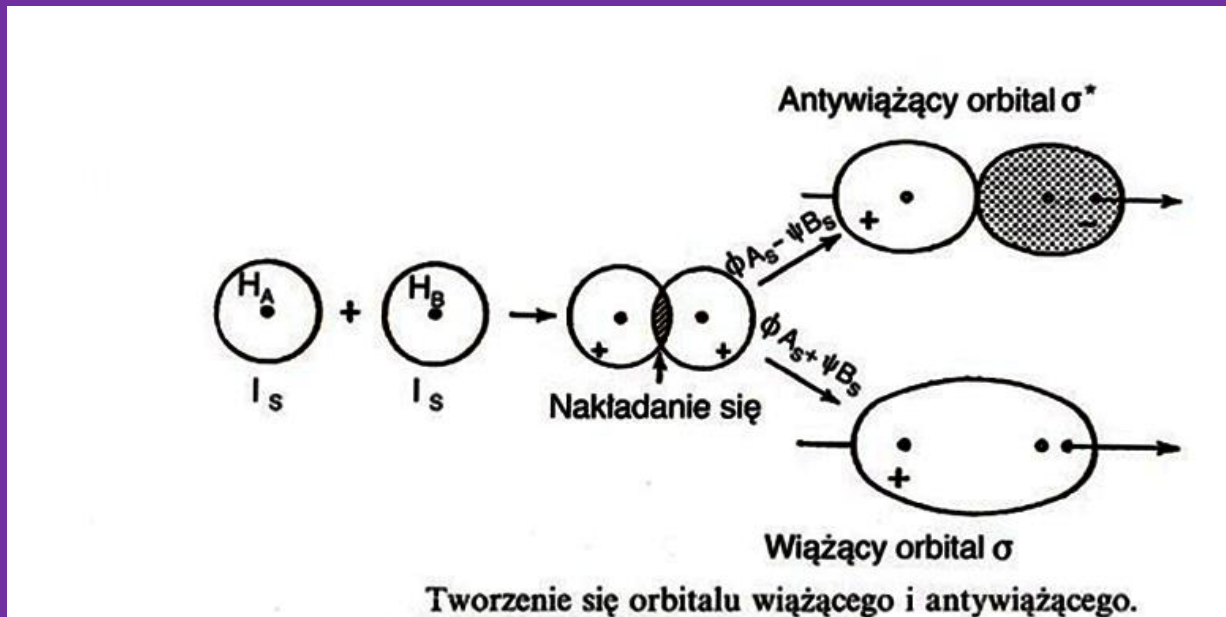
1

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

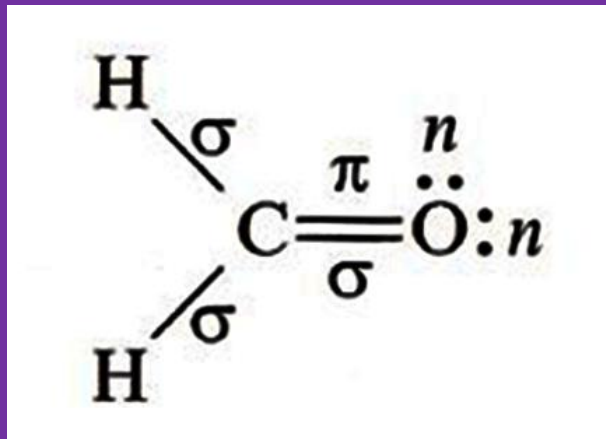
Warunkiem koniecznym absorpcji fotonu, powodującego przejście elektronu z orbitalu wiążącego na antywiązący jest dopasowanie wielkości fotonu do różnicy poziomów energetycznych orbitalu wiążącego i antywiązącego. Różnica ta jest równa:

$$\Delta E = h\nu$$

# UV-VIS

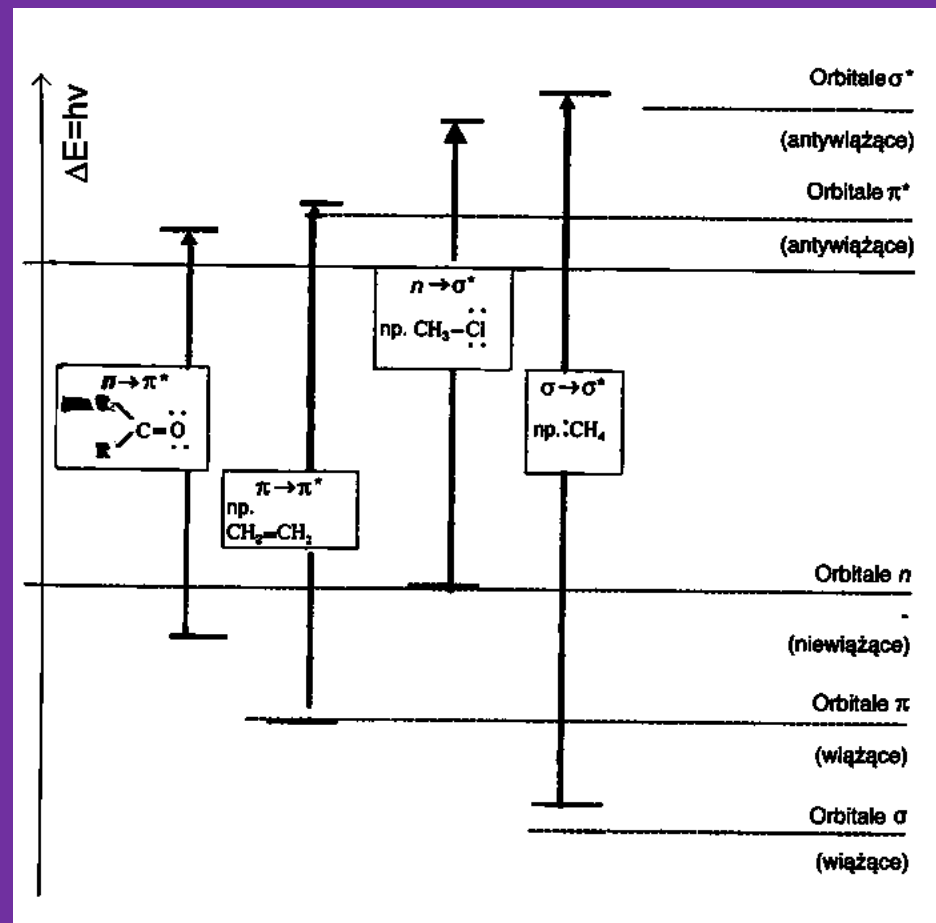
Elektrony walencyjne w cząsteczce związku organicznego podzielić można na 3 rodzaje:

- elektrony  $\sigma$
- elektrony  $\pi$
- elektrony  $n$



# UV-VIS

Rodzaje możliwych przejść elektronowych w cząsteczkach związków organicznych:



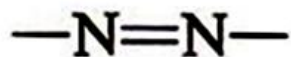
# UV-VIS

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:  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$

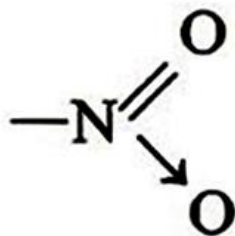
Oznacza to że chromoforami są grupy posiadające elektrony  $\pi$  lub  $n$ .

# UV-VIS

azowa



nitrowa

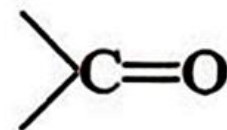


nitrozowa

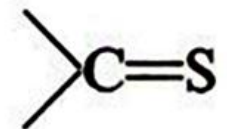


układ *p*-chinoidowy

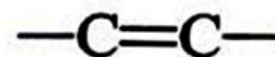
karbonylowa



tionowa



etylenowa



układ benzenowy

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

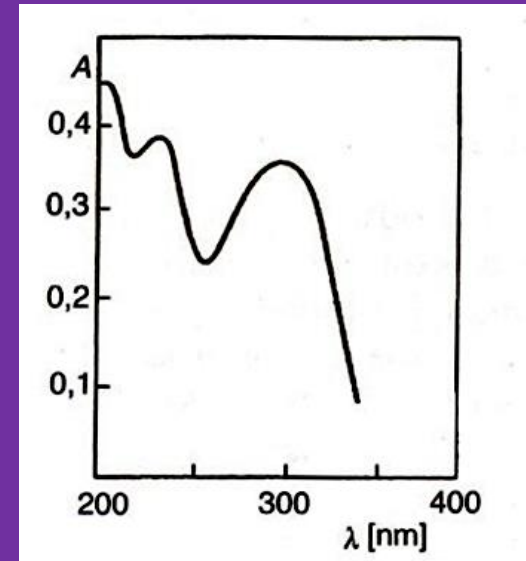
# UV-VIS

## Pasma absorpcji niektórych chromoforów:

Cząsteczka	Długość fali maksimum pasma $\lambda_{max}$ [nm]	Dziesiętny molowy współczynnik absorpcji w maksimum $\epsilon_{max}$ [ $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
Przejścia $n \rightarrow \sigma^*$		
CH <sub>3</sub> Br	204	200
CH <sub>3</sub> I	259	3600
H <sub>2</sub> O	167	7000
CH <sub>3</sub> OH	184	150
CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	215	600
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N	227	900
Przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$		
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CH=C=CH <sub>2</sub>	225	500
CH <sub>2</sub> =CH-CH=CH <sub>2</sub>	217	21000
CH <sub>2</sub> =CH-CH=CH-CH=CH <sub>2</sub>	258	35000
CH <sub>2</sub> =CH-CH=O	210	11500
Benzen	200	8000
Benzen	255	200
Acetofenon aromat.	240	13000
Acetofenon aromat.	278	1100
Przejścia $n \rightarrow \pi^*$		
CH <sub>3</sub> CHO	294	12
CH <sub>3</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	279	14
Acetofenon	319	50
CH <sub>3</sub> N=NCH <sub>3</sub>	340	4,5
CH <sub>2</sub> =CH-CH=O	315	14
t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> 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

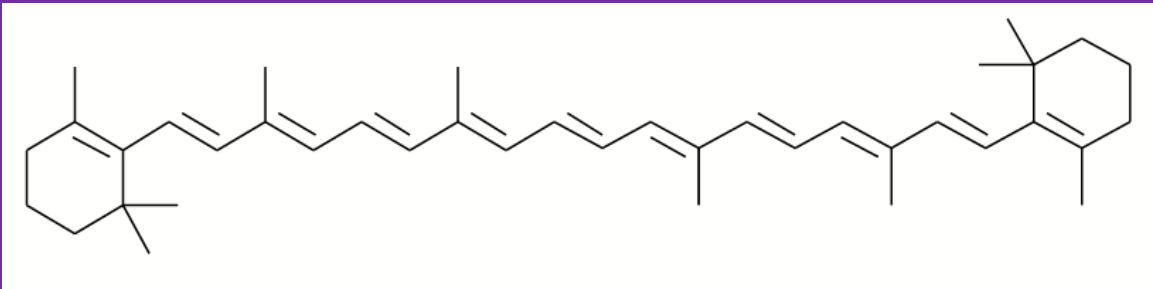
Czynnikiem decydującym o wielkości absorpcji jest charakter grup chromoforowych w cząsteczkach. Większa ich ilość powoduje silniejszą absorpcję ale również przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych. Takie przesunięcie nazywa się **przesunięciem batochromowym** i może być wywołane obecnością 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

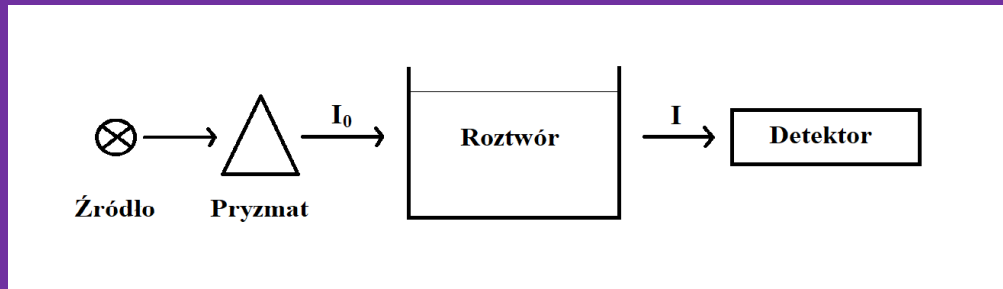
Dobrym przykładem przesunięcia batochromowego jest żółtopomarańczowa barwa  $\beta$ -karotenu powstająca w wyniku przejść elektronowych typu  $\pi \rightarrow \pi^*$  jedenastu sprzężonych wiązań podwójnych.



# 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



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

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

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

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

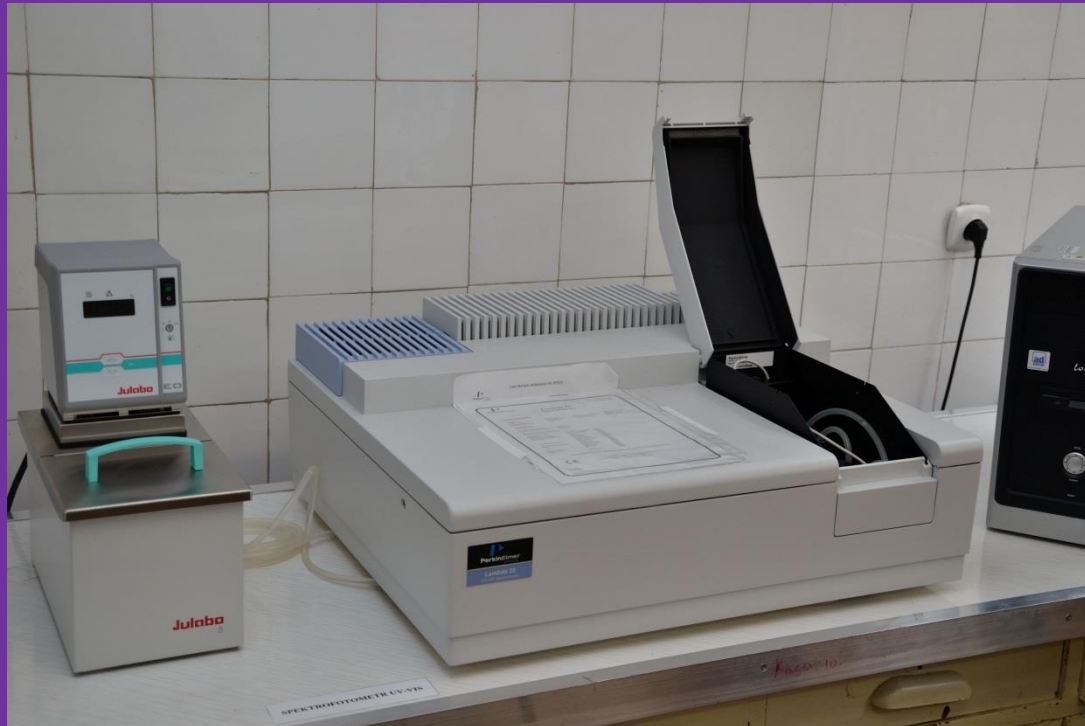
łączy je następująca zależność:

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

# Aparatura stosowana w spektrofotometrii UV-VIS



# Aparatura stosowana w spektrofotometrii UV-VIS



Spektrofotometr Lambda

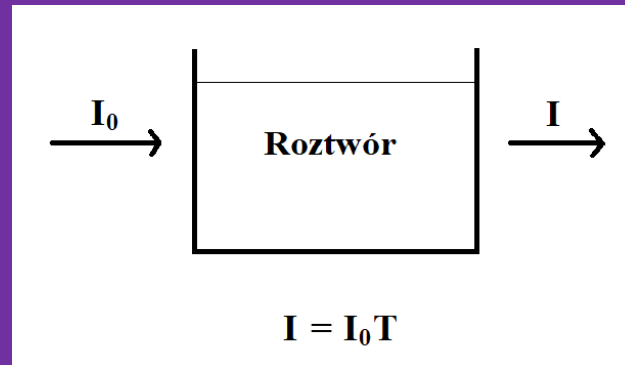
# UV-VIS

## 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

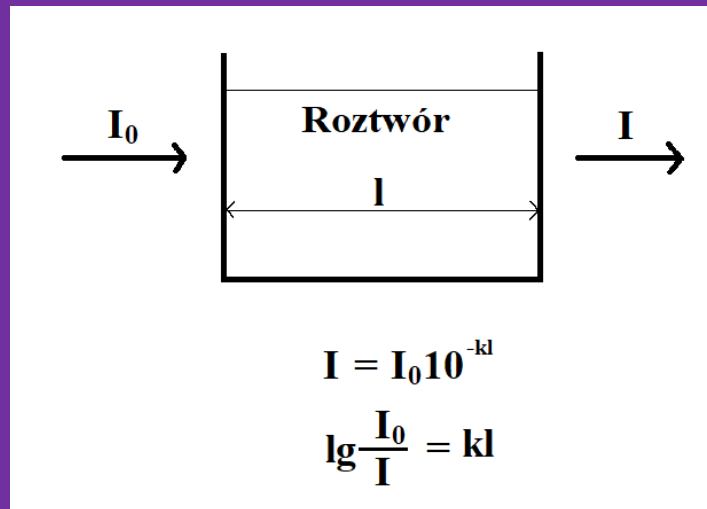


### I prawo Lamberta:

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

# UV-VIS

## Prawa absorpcji



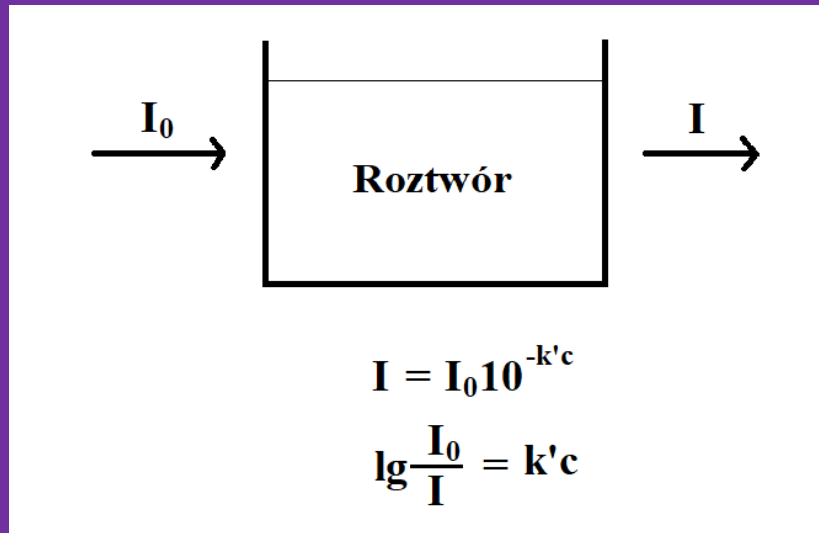
### II prawo Lamberta (1760r.):

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:

$\epsilon$  – molowy współczynnik absorpcji

$c$  – stężenie substancji absorbującej

$l$  – grubość warstwy substancji absorbującej

# UV-VIS

Molowy współczynnik absorpcji  $\varepsilon$  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  $\varepsilon$  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:

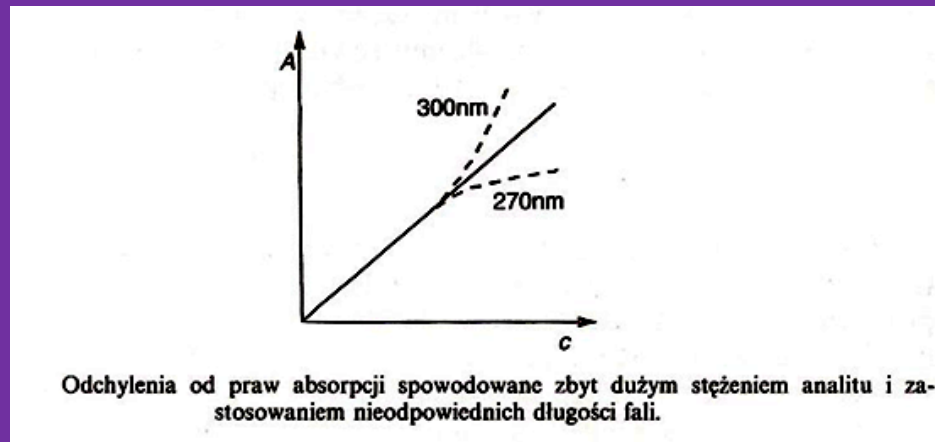
$$A = A_1 + A_2 + A_n = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n) \cdot l$$

gdzie:

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

# UV-VIS

## Przyczyny odchyień od praw absorpcji:



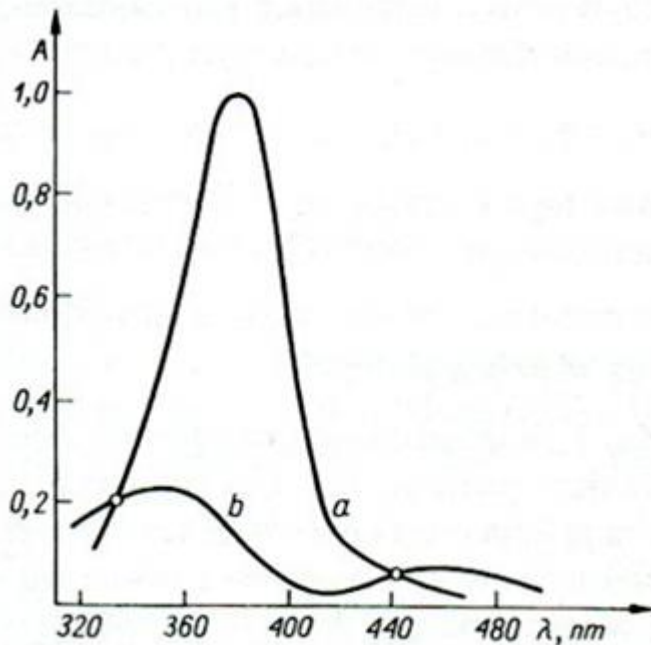
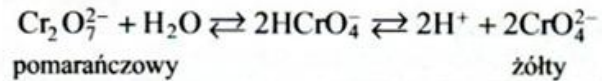
Odstępstwa od praw absorpcji mogą być wywołane czynnikami:

- 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:



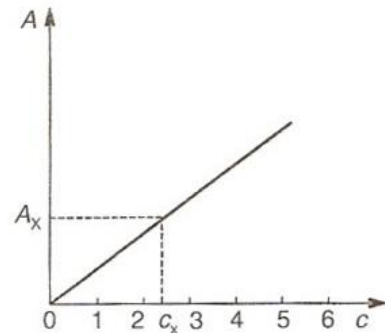
Krzywe absorpcji:

- a) chromianu potasu (0,5 mol/L KOH)
- b) dwuchromianu potasu (1,75 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

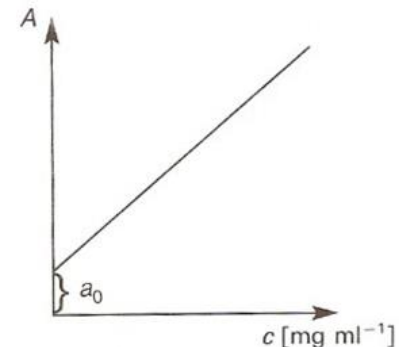
# UV-VIS

## 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



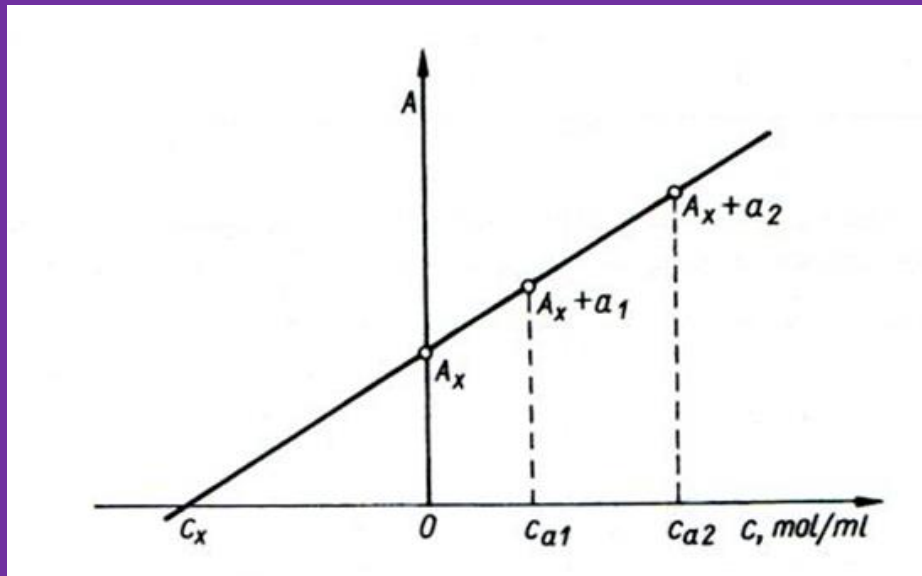
Krzywa wzorcowa dla jednorodnego układu spełniającego prawo Lamberta-Beera.



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.



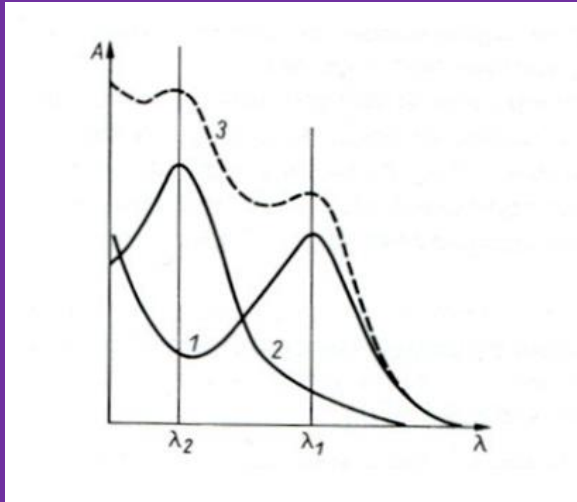
# UV-VIS

**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 absorbancji próbki przy dwóch analitycznych długościach fali,  $\varepsilon_{11}, \varepsilon_{12}$  – wartości molowych współczynników absorpcji (odpowiednio przy  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$ ) 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 absorbancja jednego składnika, a raz drugiego
- brak innych substancji absorbujących

# 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.

# 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



# 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  $\mu\text{m}$ .

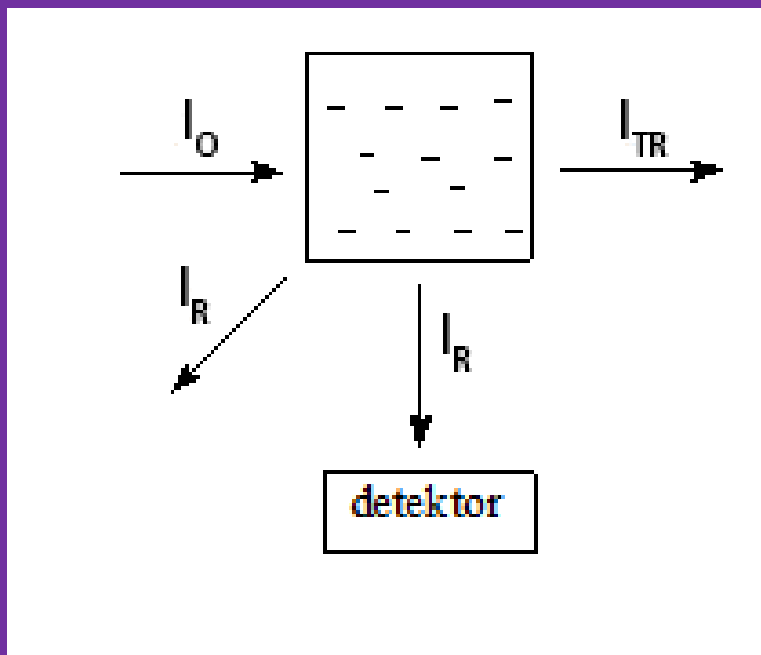
# Nefelometria

- 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  $90^{\circ}$ , co umożliwia oddzielenie promieniowania wiązki pierwotnej od promieniowania rozproszonego.

# Idea pomiaru nefelometrycznego



# 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 ( $v = 1/\lambda$ )

$\lambda$  – długość fali

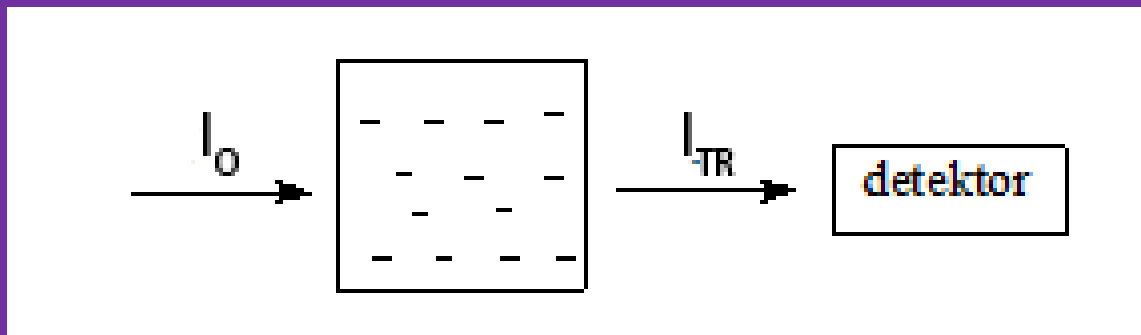
$V$  – objętość cząsteczki



# 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 absorbancja pozorna  $A_{poz}$  (lub Turbidancja S) jest proporcjonalna do stężenia  $c$  substancji badanej i długości drogi optycznej  $l$  zgodnie z równaniem:

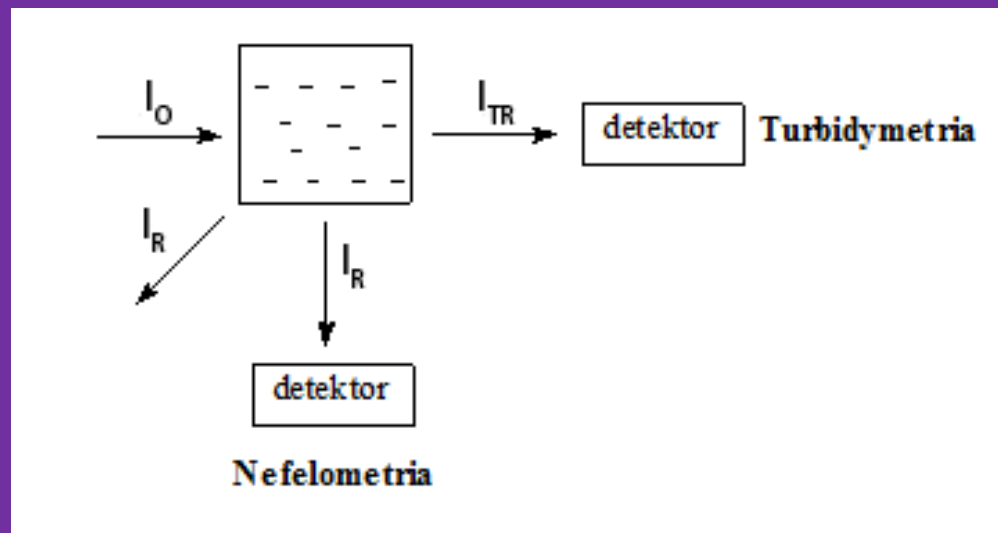
$$A_{poz} = -\log\left(\frac{I_{tr}}{I_0}\right) = \epsilon_{poz} \cdot l \cdot c$$

# Turbidymetria

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

- $\epsilon_{\text{poz}}$  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  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  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