



UNIwersYTET GDAŃSKI
WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Analizy Środowiska

SPEKTROFOTOMETRIA UV/VIS

Gdańsk, 2008

1. Wprowadzenie

W metodach spektroskopowych sygnał analityczny powstaje w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego lub korpuskularnego na badaną próbkę. Promieniowanie elektromagnetyczne zachodzi wskutek okresowych zmian pola elektromagnetycznego rozchodzących się w przestrzeni ze skończoną prędkością i związanych z przenoszeniem energii. Promieniowanie elektromagnetyczne składa się z fotonów, czyli kwantów promieniowania (kwantów energii). Charakterystyczną ich własnością jest energia

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

gdzie: E - energia fotonu wyrażona w jednostkach energii (zgodnie z układem SI w dżulach, poprzednio w ergach lub w kaloriach: $1\text{J} = 10^7 \text{erg} = 0,2389 \text{cal}$);
 h - stała uniwersalna Plancka - $6,626 \cdot 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$ ($6,626 \cdot 10^{-27} \text{erg}\cdot\text{s}$, $1,583 \cdot 10^{-34} \text{cal}\cdot\text{s}$);
 ν - częstotliwość drgań promieniowania emitowanego lub absorbowanego, wyrażona w hercach (Hz).

Promieniowanie elektromagnetyczne określa się także przy pomocy długości fali

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2)$$

gdzie: c - prędkość światła w próżni ($3 \cdot 10^8 \text{m/s}$). Wzory (2) i (3) można przekształcić

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad (3)$$

Spektroskopia molekularna (cząsteczkowa) obejmuje badanie widm cząsteczkowych. W ogólnym pojęciu widma cząsteczkowego są zawarte trzy rodzaje widm promieniowania elektromagnetycznego: widmo rotacyjne, widmo oscylacyjno-rotacyjne oraz elektronowo-oscyłacyjno-rotacyjne danej cząsteczki.

Całkowitą energię cząsteczki E można zatem przedstawić jako sumę trzech składników odpowiadających trzem rodzajom ruchu w cząsteczce:

$$E = E_e + E_{os} + E_{rot} \quad (4)$$

gdzie: E_e - energia elektronowa (związana z ruchem elektronów),

E_{os} - energia oscylacyjna (związana z ruchem oscylacyjnym),

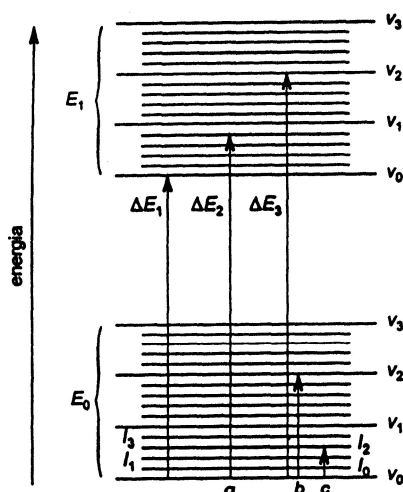
E_{rot} - energia rotacyjna (związana z ruchem rotacyjnym).

Energia elektronowa w cząsteczce (wartość podobna jak w atomie) jest wielokrotnie większa od energii oscylacyjnej, a ta z kolei jest większa od energii rotacyjnej. Różnice pomiędzy poziomami elektronowymi wynoszą kilka elektronowoltów, pomiędzy poziomami oscylacyjnymi

dziesiąte i setne części eV, a pomiędzy poziomami rotacyjnymi tysięczne części eV. Stosunek wartości poszczególnych rodzajów energii jest w przybliżeniu następujący:

$$E_e : E_{os} : E_{rot} = 1000 : 10 : 1$$

Znaczne różnice wartości poszczególnych rodzajów energii powodują, że odpowiednie widma pojawiają się w różnych zakresach spektralnych. Pochłonięcie kwantów promieniowania z zakresu dalekiej podczerwieni jako najmniej energetycznego może powodować tylko zmiany energii rotacji; powstaje wtedy widmo rotacyjne. Zaabsorbowana energia nie wystarcza do zmiany energii oscylacji i energii elektronowej. Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, o większej energii, powoduje przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi. Ponieważ zmianom energii oscylacyjnej towarzyszą zmiany energii rotacyjnej, powstają widma oscylacyjno-rotacyjne. Zmiany energii elektronowej może wywołać tylko zaabsorbowanie promieniowania z zakresu widzialnego i nadfioletu. Ponieważ zmianom tej energii towarzyszą zazwyczaj zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej, powstaje widmo elektronowo-oscyłacyjno-rotacyjne (Rys. 1).



Rys. 1 Schemat przejść elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych w cząsteczce dwuatomowej. E - poziomy elektronowe, v- poziomy oscylacyjne, l - poziomy rotacyjne, a - przejścia elektronowe, b - przejścia oscylacyjne, c - przejścia rotacyjne.

Energie rotacji, oscylacji i elektronowa mogą przyjmować tylko wartości określone warunkami kwantowymi, z których podstawowe można sformułować następująco:

- o Aby nastąpiła absorpcja promieniowania muszą istnieć takie dwa stany kwantowe cząsteczki ψ_m i ψ_n , których różnica energii odpowiada energii promieniowania padającego $h\nu$:

$$E_n - E_m = h\nu_{n,m} = \Delta E \quad (5)$$

Dla 1 mola substancji ΔE przyjmie wartość:

$$\Delta E = h\nu N_A = \frac{hcN_A}{\lambda} = \frac{1,2 \cdot 10^8}{\lambda} J/mol \quad (6)$$

gdzie: N_A - stała Avogadra, h - stała Plancka, λ - długość fali w nm,

ν - częstotliwość promieniowania.

- o Absorpcja promieniowania musi być związana ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki μ . W sposób ilościowy warunek ten opisuje tzw. moment przejścia między stanami elektronowymi, określający prawdopodobieństwo absorpcji dopasowanego, zgodnie z poprzednim warunkiem, fotonu:

$$R_{n,m} = \int \Psi_n \cdot \mu \cdot \Psi_m d\tau \quad (7)$$

gdzie: $R_{n,m}$ - moment przejścia, Ψ_n, Ψ_m - elektronowe funkcje stanów, między którymi zachodzi przejście elektronów, μ - moment dipolowy cząsteczki, $d\tau$ - element objętości.

Przejście elektronowe dozwolone jest wtedy, gdy $R_{n,m} \neq 0$. Przejścia spełniające reguły wyboru noszą nazwę przejść dozwolonych, a niespełniające reguł wyboru - przejść wzbronionych. Miarą intensywności pasma absorpcji jest wartość molowego współczynnika absorpcji ϵ_{max} , przy długości fali w maksimum absorpcji λ_{max} . Wartość ϵ_{max} jest miarą prawdopodobieństwa przejścia i dla przejść wzbronionych ϵ przyjmuje małe wartości (rzędu kilku l/mol·cm) a dla przejść dozwolonych wartości duże (do $1,5 \cdot 10^5$ l/mol·cm).

2. Prawa absorpcji

Promieniowanie elektromagnetyczne, przechodząc przez roztwór, może ulegać: absorpcji, odbiciu i rozproszeniu. Natężenie wiązki padającej wyraża się wzorem:

$$I_o = I_a + I_t + I_r \quad (8)$$

gdzie: I_a - natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór,

I_t - natężenie promieniowania przechodzącego przez roztwór,

I_r - natężenie promieniowania odbitego i rozproszonego.

Ponieważ pomiary absorpcji promieniowania wykonuje się najczęściej w stosunku do roztworu porównawczego (odnośnika), którego skład powinien być zbliżony do składu próbki i który znajduje się w identycznych kuwetach, promieniowanie odbite i rozproszone (I_r) w obu przypadkach jest jednakowe i może być pominięte. Roztwór odnośnika w warunkach pomiaru nie absorbuje promieniowania, gdyż nie zawiera substancji oznaczanej i można przyjąć, że natężenie wiązki promieniowania przechodzącej przez roztwór odnośnika jest równe natężeniu wiązki padającej na roztwór badanej próbki. Stosunek natężenia promieniowania przechodzącego przez próbkę (I_t) do natężenia promieniowania padającego na próbkę (I_a) (równego natężeniu

promieniowania przechodzącego przez odnośnik), nazywamy transmitancją lub przepuszczalnością i oznaczamy

$$T = \frac{I_t}{I_o} \quad (9)$$

Transmitancję najczęściej wyrażamy w procentach

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100\% \quad (10)$$

Może ona przybierać wartości od 0% do 100%.

Natężenie promieniowania zaabsorbowanego zależy od stężenia roztworu i od grubości warstwy absorbującej. Matematycznie zależność tę opisuje prawo Lamberta-Beera, które w postaci logarytmicznej przyjmuje postać

$$A = \lg \frac{I_o}{I_t} = kcl \quad (11)$$

Logarytm dziesiętny stosunku natężenia wiązki promieniowania padającego na badaną próbkę (I_o) do natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę (I_t) nazywany jest absorbancją. Przyjmuje ona wartości z przedziału od 0 do nieskończoności.

Gdy stężenie roztworu jest wyrażone w mol/l, a grubość warstwy jest wyrażona w cm, współczynnik proporcjonalności k nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji (ϵ). Wzór (11) przyjmuje wówczas postać:

$$A = \epsilon l c \quad (12)$$

Jest to podstawowe prawo spektrofotometrii absorpcyjnej.

Zależność między absorbancją a transmitancją wyraża zależność:

$$A = \lg \frac{1}{T} \quad (13)$$

lub gdy transmitancja jest wyrażona w procentach

$$A = \lg \frac{100\%}{T} \quad (14)$$

Zależność odwrotną tj. transmitancji od absorbancji wyraża wzór

$$T = \frac{1}{10^A} \quad \text{a w procentach} \quad T = \frac{100}{10^A} \quad (15)$$

Czułość metody spektrofotometrycznej określa współczynnik proporcjonalności z prawa Lamberta-Beera:

- o molowy współczynnik absorpcji właściwej (ϵ) dla stężenia wyrażonego w mol/l, którego jednostką jest l/(mol·cm);

- o masowy współczynnik absorpcji (a) dla stężenia (ρ) wyrażonego w g/l, którego jednostką jest l/(g · cm). Liczbowo współczynnik absorpcji właściwej jest równy absorbancji roztworu substancji oznaczanej o stężeniu 1 g/l, w kuwecie o grubości 1 cm.

$$a = \frac{\varepsilon}{M} \quad (16)$$

Absorpcję właściwą wyraża się w ml/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}$); jest ona wtedy liczbowo równa absorbancji roztworu oznaczanej substancji o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ (dawniej ppm) w kuwecie o grubości warstwy 1 cm.

Jeżeli w badanym roztworze znajduje się kilka składników, oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo addytywności absorbancji, wg którego absorbancja mieszaniny jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników, a absorbancja pojedynczego składnika jest taka, jakby tylko on jeden znajdował się w badanej próbce. Matematycznie prawo to określają następujące wzory:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i \quad (17)$$

$$A = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i l \quad (18)$$

a dla stężenia masowego;

$$A = a_1 \rho_1 l + a_2 \rho_2 l + \dots + a_n \rho_n l = \sum_{i=1}^n a_i \rho_i l \quad (19)$$

gdzie: A - absorbancja mieszaniny,

A_1, A_2, A_n - absorbancje poszczególnych składników,

c_1, c_2, c_n - stężenia molowe poszczególnych składników,

$\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_n$ - molowe współczynniki absorpcji poszczególnych składników,

a_1, a_2, a_n - współczynniki absorpcji właściwej poszczególnych składników,

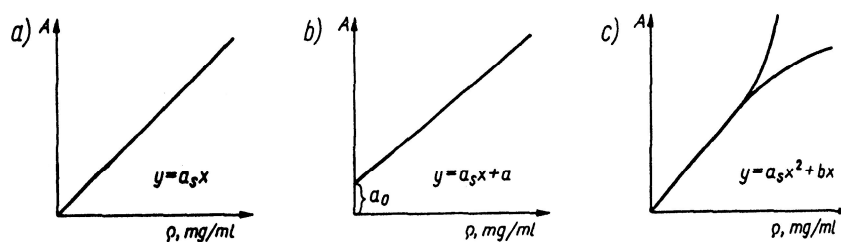
ρ_1, ρ_2, ρ_n - stężenia masowe poszczególnych składników.

3. Analiza ilościowa

Najczęściej do wykonywania ilościowych oznaczeń spektrofotometrycznych jest stosowana metoda krzywej wzorcowej (krzywej kalibracyjnej). Krzywą wzorcową nazywamy przedstawioną graficznie zależność absorbancji od stężenia substancji wzorcowej. Wykonanie takiego wykresu umożliwia bezpośrednio odczytywanie szukanych stężeń na podstawie zmierzonych wartości absorbancji oznaczanych próbek. Prostoliniowy przebieg tej zależności w badanym zakresie świadczy o spełnieniu przez układ prawa Lamberta-Beera. Współczynnik kierunkowy otrzymanej prostej (tangens kąta nachylenia) jest to współczynnik absorpcji oznaczanej substancji (przy jednostkowej grubości warstwy pochłaniającej). W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowuje się 5 - 6 roztworów wzorcowych o coraz większych stężeniach tak dobranych, aby różniły się o około 30% i obejmowały swym zakresem stężenia oznaczanych roztworów.

Nie wystarczy jednorazowe sporządzenie krzywej wzorcowej. Zmiany warunków pracy i temperatury, partii odczynników, wskazań przyrządu powodują przesunięcie się krzywej lub zmianę kąta jej nachylenia. W zależności od tego jak duże są te odchylenia, należy każdorazowo sporządzać krzywą pracy w danym dniu pomiaru, albo korzystać z jednej krzywej wyznaczonej na podstawie kilku serii pomiarów.

Krzywa wzorcowa może przechodzić lub nie przechodzić przez początek układu współrzędnych (Rys. 2).



Rys. 2. Rodzaje krzywych wzorcowych dla układów jednoskładnikowych a) układ spełniający prawo Lamberta-Beera, b) układ spełniający prawo Lamberta-Beera zawierający stałe podłoże, c) układ niespełniający prawa Lamberta-Beera

Przypadek a), gdy $y = a_s x$ spełnione jest prawo Lamberta-Beera; po oznaczeniu absorbancji badanego roztworu A_x stężenie substancji oznaczanej odczytuje się wprost z krzywej wzorcowej (a_s - współczynnik absorpcji właściwej). Przesunięcie prostej kalibracyjnej wzdłuż osi A (przypadek b) bywa spowodowane obecnością, oprócz składnika oznaczanego, innych substancji absorbujących (podłoża, tła). Jeżeli absorbancja podłoża nie zależy od składnika oznaczanego, to eliminuje się jego wpływ przez odjęcie ustalonej wartości a_0 albo wprowadza się jako odnośnik ślepą próbę. Jeżeli układ nie spełnia prawa

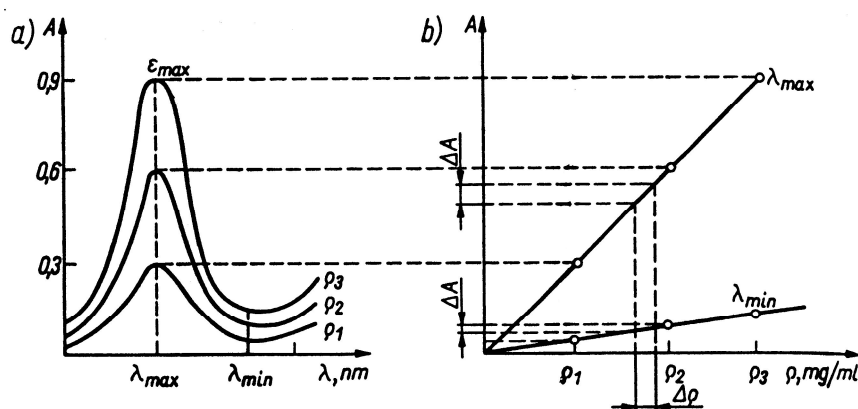
Lamberta-Beera (przypadek c), można również prowadzić oznaczanie korzystając z krzywej wzorcowej, jednakże wymaga to zwiększenia liczby roztworów wzorcowych tak, aby ich stężenia nie różniły się więcej niż 10%.

3.1. Wybór długości fali i stężeń roztworów wzorcowych

W spektrometrii ilościowej należy dokonać wyboru:

- o analitycznej długości fali przy której będą wykonane pomiary,
- o odpowiednich stężeń substancji oznaczanej,
- o metody pomiaru.

Analityczną długość fali λ wybiera się na podstawie krzywej absorpcji (Rys. 3)



Rys. 3. Porównanie dokładności pomiaru absorpcji roztworu dla różnych długości fali: a) krzywe absorpcji, b) zależność absorpcji od stężenia przy λ_{max} i λ_{min} .

Pomiary wykonywane przy λ_{max} odznaczają się największą dokładnością i czułością. Z Rys. 3 widać, że zmiana stężenia w przedziale $\rho_1 - \rho_2$ o $\Delta\rho$ powoduje zmianę absorpcji o ΔA . Przy λ_{max} wartość ΔA jest znacznie większa niż przy λ_{min} . Chociaż praktyczny błąd pomiaru absorpcji jest w przybliżeniu jednakowy ($\pm 0,01$), jest oczywiste, że dla dużych wartości ΔA dokładność pomiaru będzie największa. Dla jednakowych błędów pomiaru absorpcji błąd oznaczenia $\Delta\rho$ będzie dużo większy przy λ_{min} niż przy λ_{max} .

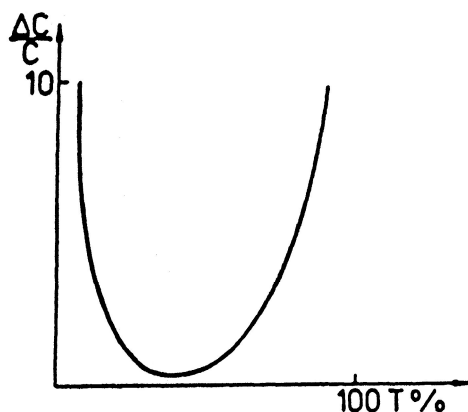
Bardzo małe stężenia substancji barwnej w roztworze są oznaczane z dużym błędem, gdyż przepuszczalność roztworu badanego jest podobna do przepuszczalności roztworu odniesienia i najczęściej bliska 100%. W przypadku intensywnie zabarwionych roztworów tylko mała część promieniowania przechodzi przez roztwór, co także powoduje zwiększenie wyników pomiaru. W celu wyboru najkorzystniejszego stężenia warstwy absorbującej należy znaleźć takie wartości A (T),

aby przy danym błędzie ΔA (ΔT) błąd względny wyznaczenia stężenia $\frac{\Delta c}{c}$ był najmniejszy.

Zależność błędu $\frac{\Delta c}{c}$ od transmisji można wyrazić następującym równaniem:

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{0,434}{T \log T} \Delta T \quad (20)$$

Graficznie zależność błędu względnego stężenia od transmisji przedstawia Rys. 4.



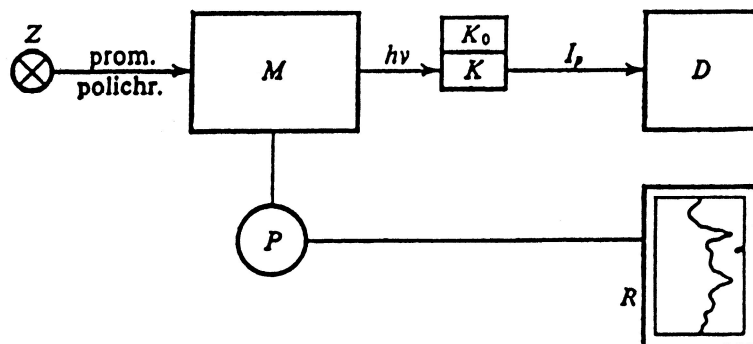
Rys. 4. Zależność między błędem względnym pomiaru a mierzonymi wartościami absorbancji.

Pomiary absorbancji wykonuje się napełniając kuwetę pomiarową roztworem próbki badanej, a kuwetę odniesienia - odnośnikiem, którym jest najczęściej rozpuszczalnik na ogół w metodach bezpośrednich lub ślepa próba (w metodach pośrednich). Metody spektrofotometryczne bezpośrednie są to metody, których podstawą jest selektywna absorpcja oznaczanego składnika. Metody pośrednie to te, w których pomiary absorpcji prowadzi się dopiero po spowodowaniu absorpcji (najczęściej w reakcji powstawania barwnego związku), której wartość jest proporcjonalna do stężenia oznaczanego składnika.

Przygotowując robocze roztwory wzorcowe przez rozcieńczenie wzorcowego roztworu podstawowego, najkorzystniej jest tak dobrać stężenia, aby otrzymać optymalny dla danego spektrofotometru zakres wartości mierzonej absorbancji. Najczęściej używany zakres wartości pomiarowych dla aparatów punktowych wynosi 0,2 - 0,8 wartości absorbancji. Należy obliczyć - na podstawie zależności $c = A/\varepsilon l$ (jeżeli wartość ε jest znana) - stężenie odpowiadające założonym wartościom absorbancji.

4. Aparatura

Do pomiarów absorpcji służą spektrofotometry. Rys. 5 przedstawia blokowy schemat spektrofotometru.



Rys. 5. Blokowy schemat spektrofotometru optycznego: Z - źródło promieniowania ciągłego, M - monochromator, K - kuweta z badanym roztworem, K_o - kuweta z rozpuszczalnikiem (odnośnik), D - układ detektora, R - rejestrator, P - synchroniczny przesuw taśmy rejestratora i bębna monochromatora.

Źródło Z wysyła ciągle promieniowanie elektromagnetyczne. Wyodrębniona przez monochromator M monochromatyczna wiązka promieniowania przechodzi na przemian przez kuwetę K z badaną substancją i przez identyczną kuwetę porównawczą K_o (z odnośnikiem). Kuweta K_o w przypadku pomiarów absorpcji roztworów jest wypełniona tą samą cieczą, w której rozpuszczono substancję badaną. W niektórych przyrządach (tzw. spektrofotometry dwuwiązkowe) promieniowanie wychodzące z monochromatora jest dzielone na dwie wiązki o jednakowym natężeniu, z których jedna przechodzi przez K a druga, jednocześnie, przez K_o . W obu przypadkach, w układzie detektora D , następuje pomiar natężenia wiązki, która przeszła przez kuwetę K (I_p) i przechodzącej przez kuwetę K_o (I_o). Rejestrator R kreśli widmo absorpcyjne badanej substancji w postaci krzywej $A = f(\lambda)$.

5. Możliwości i ograniczenia spektrofotometrycznej analizy ilościowej

5.1. Czulość

Czulość metody definiuje się jako najmniejsze oznaczalne stężenie substancji lub najmniejsza różnica w stężeniach substancji, którą można oznaczyć za pomocą danej metody. Dla metod spektrofotometrycznych obiektywnym, liczbowym wyrażeniem czulości jest molowy współczynnik absorpcji (ϵ). Molowy współczynnik absorpcji nie może przekroczyć wartości $1,5 \cdot 10^5$ (ta wartość wynika z teorii). Najmniejsze stężenie substancji (mol/l) oznaczalne spektrofotometrycznie można obliczyć ze wzoru Lamberta-Beera. Przy założeniu, że $A = 0,02$ (minimalna absorbancja, którą można zmierzyć), $l = 2$ cm (grubość kuwety), $\epsilon = 10^4$ (molowy współczynnik absorpcji średnio czulej metody spektrofotometrycznej)

$$c = \frac{0,02}{2 \cdot 10^4} = 10^{-6} M \quad (21)$$

Jeśli przyjąć masę molową substancji jako przykładowo równą 200 g/mol to minimalne oznaczalne stężenie tej substancji (dla średnio czulej metody, $\epsilon = 10^4$, i klasycznego spektrofotometru) wyniesie

$$c = \frac{10^{-6} \cdot 2 \cdot 10^2}{10^3} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ g/ml} = 0,2 \text{ } \mu\text{g/ml} = 0,2 \text{ ppm}$$

5.2 Technika pomiarów

Technika pomiarów w zakresie UV/Vis jest prosta, a aparatura łatwo dostępna. Większość stosowanych rozpuszczalników jest tania i łatwa do oczyszczenia (typowe z nich to heksan, metanol, woda).

5.3. Zastosowanie spektrofotometrii UV/Vis

Metoda może być stosowana do oznaczania zawartości śladowych oraz do oznaczania czystości głównego składnika.

5.4 Wady metody spektrofotometrii UV/Vis

Zasadniczą wadą tej metody jest duży błąd, który przeciętnie wynosi 5 - 10%, a podczas oznaczania śladów (do 10^{-5} %), ze wstępnym zagęszczaniem, wielkość błędu może wynosić do 30%.