

SPEKTROFOTOMETRYCZNA ANALIZA ZAWARTOŚCI SUBSTANCJI W PRÓBCE

Zakres materiału:

- roztwory - stężenia, rozcieńczanie;
- podstawy i podział spektroskopii;
- prawa absorpcji: współczynnik absorpcji, addytywność absorpcji, odstępstwa od praw absorpcji, molowy współczynnik absorpcji;
- pojęcia: absorpcja, absorbancja, transmisja, transmitancja, spektroskopia, spektrofotometria;
- budowa spektrofotometru UV/VIS.

1. Podstawy i podział spektroskopii

Spektroskopia to metoda badawcza, określająca oddziaływanie (absorpcję, emisję lub rozpraszanie ramanowskie) promieniowania elektromagnetycznego z materią. Szybki i wszechstronny rozwój spektroskopii jako nauki teoretyczno-doświadczalnej spowodował, że przy omawianiu zarówno jej podstaw jak i specyficznych działów, konieczne jest stosowanie różnych kryteriów podziału.

Podział spektroskopii według zakresu promieniowania:

- spektroskopia kosmiczna 10^{-6} - 10^{-4} nm;
- spektroskopia gamma 10^{-4} -0,1 nm;
- spektroskopia rentgenowska 0,1-10 nm;
- spektroskopia optyczna:
 - a) w bliskim i próżniowym nadfiolecie 100-300 nm
 - b) w zakresie widzialnym 360-830 nm
 - c) w bliskiej (2,5-15 μ m), średniej, dalekiej podczerwieni 0,8-200 μ m;
- radiospektroskopia:
 - a) w zakresie mikrofalowym 0,03-100 cm;
 - b) w zakresie krótkofalowym 10-100 m;
 - c) w zakresie długofalowym 100-4000 m.

Parametrem decydującym o takim podziale jest zakres spektralny. Promieniowanie można określić, podając jego:

- długość fali λ ;
- liczbę falową $\tilde{\nu} = 1/\lambda$;
- częstotliwość ν .

Częstotliwość podaje się w Hz [s^{-1}] lub jednostkach stanowiących wielokrotność herców. Długość fali w obszarze nadfioletu i światła widzialnego wyraża się w:

- a) mikrometrach: $\mu\text{m} = 10^{-4} \text{ cm} = 10^{-6} \text{ m}$, (dawniej mikron: μ);
- b) nanometrach: $\text{nm} = 10^{-7} \text{ cm} = 10^{-9} \text{ m} (= 1 \text{ m}\mu)$;
- c) angstromach: $\text{\AA} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$.

Liczby falowe wyrażają się zwykle w cm^{-1} lub w μm^{-1} .

Zależność pomiędzy energią pochłoniętą a częstotliwością ν lub długością fali wywołującej przejście przedstawia się następująco:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} [J]$$

gdzie h - stała Plancka, c - prędkość światła.

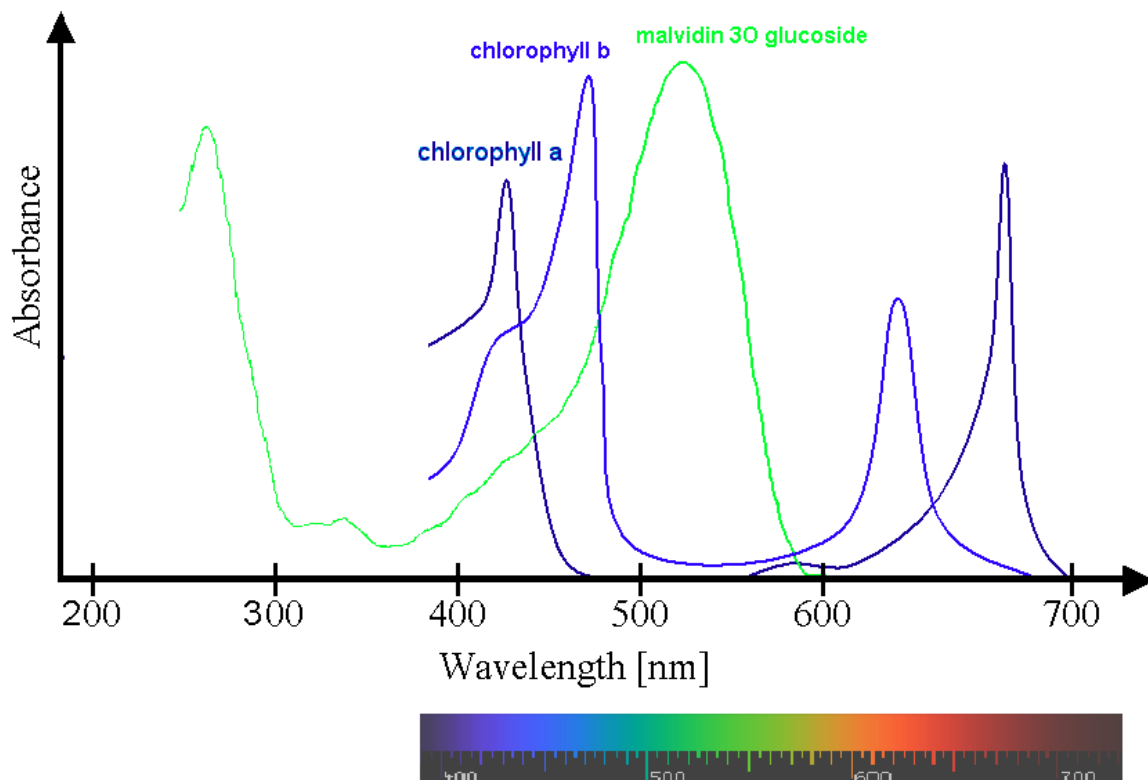
ΔE jest energią pochłoniętą przy przejściu w cząsteczce ze stanu o niższej energii (stan podstawowy) do stanu o energii wyższej (stan wzbudzony). Energia pochłaniania zależy od różnicy energii w stanie podstawowym i wzbudzonym; im mniejsza różnica energii tym większa długość fali. Zauważmy, że wprost proporcjonalna do ΔE jest częstość ν , a tym samym liczba falowa, a nie długość fali. Dlatego w spektroskopii często wyraża się energię w cm^{-1} , mimo że nie są to jednostki energii, lecz liczby falowej, a energia jest do niej tylko proporcjonalna.

Podział spektroskopii według metod otrzymywania widma:

W zależności od metody otrzymywania rozróżniamy trzy rodzaje widm: absorpcyjne, emisyjne i ramanowskie. W związku z tym rozróżniane są działy spektroskopii:

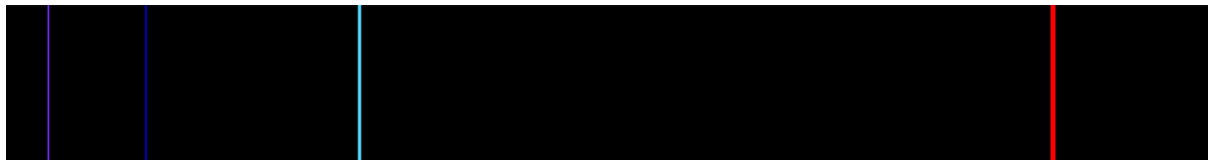
1. spektroskopia absorpcyjna;
2. spektroskopia emisyjna;
3. spektroskopia ramanowska (rozpraszania).

Widma absorpcyjne - można określić jako zbiór wszystkich przejść z niższych poziomów na wyższe. Odpowiadają więc one zwiększeniu energii układu (pochłonięcie fotonu). Najprostszy typ widma absorpcyjnego powstaje, gdy obsadzony jest najniższy poziom energetyczny, tj. podstawowy. Obsadzenie poziomów energetycznych związane jest z równowagą termodynamiczną, która określa temperatura układu. Przyjmuje się, że w temperaturze pokojowej obsadzany jest tylko poziom podstawowy.



Rys. 1. Widma absorpcyjne barwników roślinnych (chlorofili a i b, antocyjanina) w zakresie UV (200-400 nm) i Vis (400-700 nm); źródło: Wikipedia (© CC-BY SA 3.0)

Widma emisyjne - można określić jako zbiór wszystkich przejść z poziomów wyższych na niższe. Przejścia w widmach emisyjnych odpowiadają zmniejszeniu energii, czyli wypromieniowaniu fotonu. Źródłem energii pobudzającej atom lub cząsteczkę do emisji może być temperatura, promieniowanie elektromagnetyczne lub korpuskularne, reakcja chemiczna, wyładowanie elektryczne etc.



Rys. 2. Widmo emisyjne wodoru w zakresie widzialnym; źródło: Wikipedia (© CC0)

Widma ramanowskie - cechą charakterystyczną tego rodzaju widm jest zmiana częstotliwości promieniowania rozproszonego (ν_r) w stosunku do częstotliwości promieniowania padającego (ν_p):

$$\nu_r = \nu_p \pm \nu$$

gdzie ν jest częstotliwością odpowiadającą przejściu elektronowemu dla układu rozpraszającego.

W bardziej ogólnym przypadku (np. w wyższych temperaturach) należy przyjąć, że także wyższe poziomy energetyczne są obsadzone przynajmniej częściowo, co oznacza, że struktura widma absorpcyjnego lub emisyjnego staje się bardziej złożona.

2. Spektroskopia a spektrofotometria

Różnice pomiędzy obu dyscyplinami mogą być łatwo określone poprzez sprecyzowanie dla nich zadań. Spektroskopia zajmuje się badaniami podstawowymi dotyczącymi cząsteczek. Obejmują one:

1. Eksperymentalne otrzymywanie różnych typów widm; $A_i=f(\nu_i)$, $A_i=f(\lambda_i)$;
2. Przeprowadzanie ich analizy;
3. Zapropozowanie schematu poziomów energetycznych charakteryzujących badany układ;
4. Obliczanie (w tych przypadkach, gdy jest to możliwe) teoretycznych energii przejść i porównanie z danymi doświadczalnymi;

5. Otrzymywanie danych dotyczących rozkładu natężeń (oraz takich wartości jak np. moc oscylatora), zarówno teoretycznych jak i eksperymentalnych;
6. Określanie (wyznaczanie) parametrów spektrochemicznych w oparciu o zweryfikowane przez obliczenia teoretyczne dane eksperymentalne (punkt 4);
7. Analiza struktury i stereochemii badanego układu chemicznego w oparciu o użyteczne chemicznie parametry spektralne (punkt 6).

Z kolei spektrofotometria zajmuje się określaniem stężenia lub zawartości atomów lub cząsteczek w danym układzie absorbującym czy emitującym, tj. stanowi podstawę ilościowej analizy chemicznej.

W tym przypadku nie jest szczególnie interesujące określenie rodzaju przejścia lub właściwe przyporządkowanie im danych linii czy pasm, natomiast istotne jest podanie dokładnej funkcji określającej zależności natężenia widma od stężenia.

Na podkreślenie zasługuje również znaczenie metod spektrofotometrycznych w badaniu różnego typu równowag.

3. Prawa absorpcji

Jednym z wielu możliwych oddziaływań promieniowania z materią jest absorpcja. Stanowi ona podstawę spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie i zakresie widzialnym. Pomiar w obszarze UV/VIS przeprowadza się najczęściej dla substancji ciekłych (rozpuszczalniki) lub rozpuszczonych (roztwory próbek stałych w rozpuszczalnikach), rzadziej w fazie gazowej lub stałej (widma refleksyjne). Wielkością mierzoną jest zwykle transmitancja lub absorbcja. Są one zdefiniowane następująco:

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T},$$

gdzie: T – transmitancja, A – absorbcja, I_0 - natężenie promieniowania padającego, I - natężenie promieniowania przechodzącego przez ośrodek absorbujący.

Rozważmy pojemnik szklany (kuwetę) o płaskich równoległych powierzchniach zewnętrznych, przez które przechodzi promieniowanie monochromatyczne. Przyjmijmy, że kuweta jest napełniona substancją absorbującą rozpuszczoną w nie absorbującym rozpuszczalniku. Natężenie promieniowania padającego I_0 , ulega osłabieniu przy przejściu przez ośrodek absorbujący do wartości I .

Oslabienie padającej wiązki światła może być powodowane:

1. Odbiciami na powierzchniach kuwety na granicy z powietrzem i roztworem;
2. Rozpraszaniem przez rysy na kuwecie lub pojedyncze cząstki czy ich skupiska w próbce (takie efekty mogą być powodowane, np. zmętnieniem roztworu niewidocznym gołym okiem);
3. Absorpcją promieniowania przez próbkę.

Część wpływów zakłócających eliminuje się prowadząc odpowiednie pomiary porównawcze względem odnośnika (kuweta zawierająca rozpuszczalnik lub ślełą próbkę). W ten sposób staramy się stworzyć warunki, w których absorpcja światła jest główną przyczyną osłabienia padającego promieniowania.

Ilościowy opis absorpcji energii promieniowania przez materię opiera się na ogólnym prawie, zwanym **prawem Lamberta-Beera**. Zaobserwowano, że natężenie promieniowania zmniejsza się w miarę przenikania w głąb homogenicznego (jednorodnego) ośrodka oraz w miarę zwiększania stężenia rozpuszczonej substancji absorbującej. Nie zależy natomiast od natężenia wiązki padającej I_0 . Bardziej ogólnie można stwierdzić, że zmniejszenie natężenia promieniowania jest proporcjonalne do liczby absorbujących cząstek, znajdujących się na drodze równoległej i monochromatycznej wiązki promieniowania.

Ilościowym wyrazem tej zależności jest **prawo Lamberta-Beera**: Kolejne przyrosty liczby, identycznych absorbujących cząstek na drodze wiązki promieniowania monochromatycznego, absorbują takie same części energii promieniowania przez nie przechodzącego. Najprostsze sformułowanie prawa wyraża się:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = abc ; \text{ gdzie } A = \log \frac{1}{T} .$$

Treść tego prawa możemy wyrazić następująco:

Dla równoległej, ściśle monochromatycznej wiązki promieniowania elektromagnetycznego, absorbancja A jest proporcjonalna do stężenia roztworu c i grubości warstwy absorbującej b .

Współczynnik absorpcji

Współczynnik absorpcji (a) jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji, w danym rozpuszczalniku i przy danej długości fali (liczbie falowej). Jednostka współczynnika absorpcji zależy od jednostek, w jakich wyrażamy towarzyszące wielkości: stężenie c i

grubość warstwy b . W związku z tym, występują również różne określenia współczynnika absorpcji. Wielkość b zwykle podaje się w centymetrach.

Stężenie	Symbol	Określenie
c [g/dm ³]	a	Współczynnik absorpcji
C_M [mol/dm ³]	ϵ	Molowy współczynnik absorpcji

Współczynnik absorpcji a stosowany jest, gdy rodzaj substancji absorbującej, a zatem i jego masa cząsteczkowa, jest nieznana.

Molowy współczynnik absorpcji ϵ jest bardziej wskazany w przypadkach, gdy porównywana jest ilościowo absorbancja różnych substancji o znanych masach molowych.

Wielkości a i ϵ związane są z właściwościami substancji absorbującej, tj. są niezależne od warunków pomiaru: stężenia i grubości warstwy, podczas gdy absorbancja A odzwierciedla właściwości określonej próbki.

Widmo absorpcji można więc określić jako funkcję (zależność) molowego współczynnika absorpcji od częstotliwości (lub długości fali) absorbowanego promieniowania: $\epsilon_i = f(\nu_i)$ (lub $\epsilon_i = f(\lambda_i)$), która jest charakterystyczna dla substancji absorbującej (chromofora) w danym rozpuszczalniku.

Addytywność absorbancji

Prawo to dotyczy roztworów i mieszanin wieloskładnikowych. Wyraża ono absorbancję poszczególnych składników (A_1, A_2, \dots, A_M), co można przedstawić w następujący sposób:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_M = \sum_M^1 A_i$$

$$\text{czyli } A = a_1bc_1 + a_2bc_2 + \dots + a_Mbc_M.$$

Oczywiście addytywność absorbancji jest spełniona, jeśli pomiędzy składnikami środowiska absorbującego nie ma żadnych oddziaływań chemicznych. Oznacza ona, że każde indywiduum absorbuje tak, jakby inne były nieobecne.

Z prawa Beera wynika, że współczynnik absorpcji jest wielkością stałą, niezależną od stężenia, grubości warstwy absorbującej i natężenia promieniowania padającego.

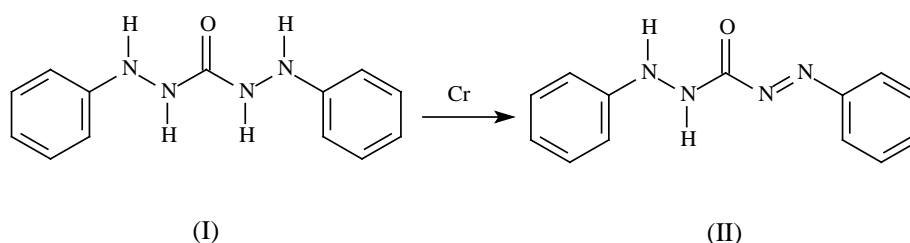
Prawo to nie dostarcza żadnych informacji o wpływie temperatury, rodzaju rozpuszczalnika lub długości fali. W praktyce stwierdzono, że temperatura ma jedynie

drugorzędny wpływ, o ile nie zmienia się w niezwykle szerokim zakresie. Ze zmianą temperatury zmienia się natomiast stężenie, ze względu na zmianę gęstości, a co za tym idzie, objętości roztworu. Można oczekiwać mniejszych lub większych zmian absorbancji ze zmianą temperatury, jeżeli substancja absorbująca znajduje się w roztworze w stanie równowagi z inną substancją, lub z nie rozpuszczoną substancją stałą (np. roztwór nasycony).

Natomiast nie można przewidzieć, w jakiś ogólny sposób, wpływu zmiany rozpuszczalnika na absorpcję danej substancji rozpuszczonej. W UV powstają ograniczenia ze względu na zakres przepuszczalności danego rozpuszczalnika dla promieniowania z tego zakresu.

Można wyróżnić dwie grupy czynników zakłócających absorpcję promieniowania przez układ: związane z próbką lub instrumentalne.

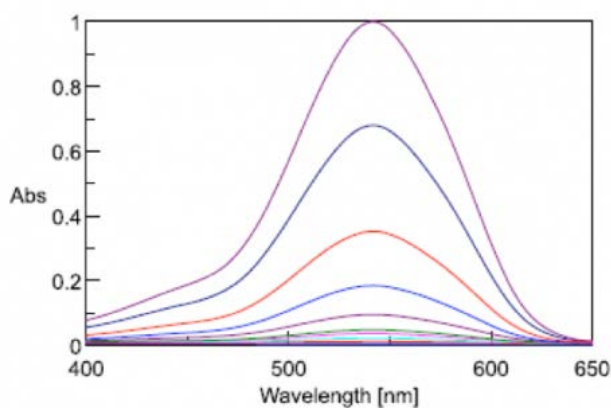
Celem ćwiczenia jest określenie zawartości chromu(VI) **metodą difenylokarbazydową** w próbce dichromianu(VI) potasu o nieznanym stężeniu, przy wykorzystaniu spektroskopii UV/VIS. Podstawą czulej kolorymetrycznej metody oznaczania chromu jest reakcja redox pomiędzy Cr(VI) i difenylokarbazydem. W środowisku kwaśnym Cr(VI) utlenia 1,5-difenylokarbazyd (I) do difenylokarbazonu (II), sam natomiast ulega redukcji do Cr(III). Elektrododatni kompleks Cr³⁺ z difenylokarbazonem (posiadający barwę fioletkową), absorbuje promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widzialnym. Bezpośrednie zmieszanie roztworu Cr(III) z difenylokarbazonem nie prowadzi do utworzenia kompleksu o takim zabarwieniu.



Metodą difenylokarbazydową można uważać za specyficzną dla chromu(VI). Oznaczeniu przeszkadzają tylko większe ilości jonów żelaza, wanadu, molibdenu, miedzi i rtęci, wielokrotnie przewyższające stężenie chromu(VI) w roztworze. Usuwa się je ekstrakcyjnie lub przez zamaskowanie.

Kwasowość badanego roztworu wywiera pewien wpływ na natężenie zabarwienia, dlatego też należy ją utrzymywać zawsze na tym samym poziomie.

Molowy współczynnik absorpcji barwnego produktu reakcji Cr(VI) z difenylokarbazydem wynosi 41700 przy $\lambda_{\max} = 546$ nm. Metoda ta jest ponad 100 razy bardziej czuła niż metoda chromianowa, w której wykorzystuje się barwność jonów Cr₂O₇²⁻ lub CrO₄²⁻ i jest stosowana zwłaszcza do oznaczania śladów chromu.



Rys. 3. Widmo absorpcyjne kompleksu Cr(VI) z difenylokarbazydem w zakresie widzialnym; źródło: www.jascoinc.com (©Jasco)

Odczynniki:

Dichromian(VI) potasu, $K_2Cr_2O_7$;

Kwas siarkowy(VI);

Difenylokarbazyd (DFK);

Aceton;

Woda destylowana.

Aparatura:

Kolba miarowa (500 lub 1000 mL);

Kolba miarowa (500 mL);

Kolba miarowa (100 mL);

Kolby miarowe (50 mL) – 9 sztuk;

Kolby miarowe (10 mL) – 2 sztuki;

Pipeta wielomiarowa (5 mL);

Pipeta wielomiarowa (2 mL);

Pipeta wielomiarowa (1 mL);

Spektrofotometr;

Kuwety z tworzywa sztucznego do spektrofotometru.

Wykonanie ćwiczenia:

1. W kolbie miarowej (1000 mL) przygotować wodny roztwór podstawowy Cr(VI) z dichromianu(VI) potasu o stężeniu 0,01 mg/mL, tj. **1 mL tego roztworu zawiera 0,01 mg Cr(VI)**.
2. W kolbie miarowej (1000 mL) przygotować wodny roztwór H_2SO_4 o stężeniu 0,05 mol/dm³.
3. W kolbie miarowej (25 mL) przygotować acetonowy roztwór difenylokarbazydu o stężeniu 0,25%.
4. Przygotować roztwory wzorcowe Cr(VI):
 - Do 6 kolbek miarowych (50 mL) odmierzyć pipetą: 0,0 (**ślepa próba**); 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 mL podstawowego roztworu Cr(VI).
 - Do każdej kolbki dodać 1 mL roztworu DFK, dopełnić roztwór kwasem siarkowym (0,05 M) do kreski i wymieszać.

5. Przygotować roztwór Cr(VI) o nieznanym stężeniu:

- Otrzymany do analizy roztwór Cr(VI) uzupełnić w kolbie miarowej (100 mL) wodą destylowaną.

- Do kolbek o pojemności 50 mL pobrać 3 równe próby (po 2 mL) z roztworu do analizy, dodać 1 mL DFK do każdej kolbki, dopełnić do kreski kwasem siarkowym i wymieszać.

6. Zmierzyć absorbancję roztworów wzorcowych oraz 3 próbek roztworu badanego przy $\lambda_{max} = 546 \text{ nm}$, stosując **ślepą próbę** jako odnośnik. **Uwaga!** Należy zmierzyć absorbancję wszystkich roztworów wzorcowych (począwszy od najniższego do najwyższego stężenia), a następnie wykonać pomiar dla badanych próbek. Należy odczekać około 2 min. od przygotowania mieszaniny reagentów do odczytu absorbancji.

7. Korzystając z dowolnego programu typu „arkusz kalkulacyjny” lub „edytor wykresów” wykreślić wykres zależności absorbancji od stężenia dla roztworów wzorcowych $A=f(c)$, tzw. **krzywą kalibracyjną**. Stężenie (c) należy wyrazić w $\mu\text{g/mL}$. **Nie należy łączyć punktów odcinkami**. Dopasować do uzyskanych punktów eksperymentalnych regresję liniową.

8. Korzystając z **krzywej kalibracyjnej** (dokładniej, z równania regresji) obliczyć stężenie Cr(VI) dla każdej z trzech prób roztworu badanego; wynik uśrednić.

9. Obliczyć zawartość Cr(VI) (w μg) w otrzymanym od prowadzącego roztworze (korzystając ze średniej absorbancji każdej z trzech prób A, B, C roztworu badanego).

Uwaga! Na podstawie stężenia odczytanego z krzywej wzorcowej, obliczyć zawartość Cr(VI) (w μg) w 50 mL próby. Następnie pamiętając, że do pomiarów absorbancji pobierano tylko 2 mL analizy z kolbki o pojemności 100 mL, należy obliczyć zawartość Cr(VI) w roztworze otrzymanym od prowadzącego.

Protokół powinien zawierać:

Tytuł ćwiczenia, nazwiska osób wykonujących ćwiczenie, numer grupy, datę;

Obliczenia dotyczące wszystkich przygotowywanych roztworów (wykonanie ćwiczenia, punkty 1-3);

Wykres zależności absorbancji od stężenia zgodnie z wytycznymi z punktu 7 (wykonanie ćwiczenia);

Obliczone z równania regresji wartości dla próbek badanych;

Obliczenia dla zawartości chromu(VI) w 100 mL próbki badanej (wykonanie ćwiczenia, punkt 9).