

*Математичка гимназија
Краљице Наталије 37, Београд*

Принципи спектрофотометрије и примена у аналитичкој хемији

Ученик: Раденковић Исидора

Ментор: Ивана Вуковић

У Београду, 2018. године

Садржај

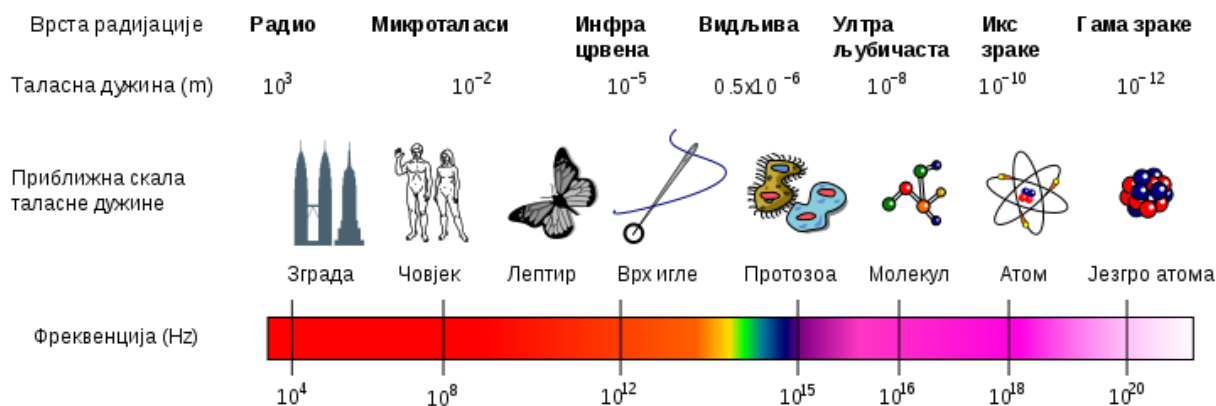
1.	Уводна реч	3
2.	Теоријске основе.....	4
2.1.	Супстанце и светлост.....	4
2.2.	Ламбер-Беров закон.....	7
3.	Апаратура.....	8
4.	Резултати.....	12
5.	Даље примене	14
6.	Закључак.....	17
7.	Литература.....	17

1. Уводна реч

Спектроскопске методе служе за квантитативно и квалитативно одређивање узорака који интерагују са електромагнетним зрачењем. Када меримо ову појаву, бавимо се *спектрометријом*. Подела метода врши се на основу тога с којим делом спектра долази до најјаче интеракције, то јест апсорпције зрачења у одређеном делу спектра.

Најзаступљеније су следеће гране:

- Радио таласи - НМР спектроскопија;
- Инфрацрвено зрачење - инфрацрвена и Раманова спектроскопија;
- Видљиво и *UV* зрачење - атомска, флуоросцентна и *UV/VIS*-спектроскопија;
- Рендгенско зрачење - рендгенска и електронска спектроскопија;
- Гама зрачење - гама спектроскопија



Сл. 1: Спектар електромагнетног зрачења.

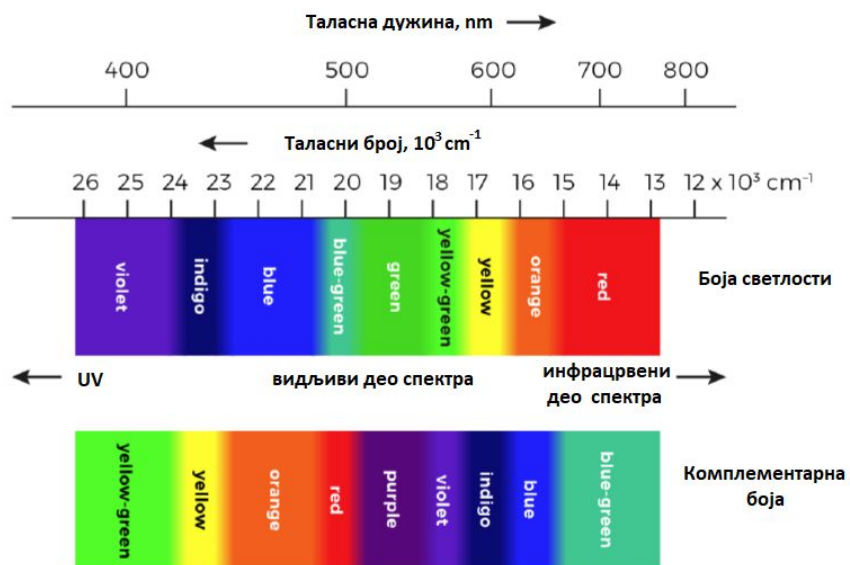
Овај рад посвећен је описивању принципа рада *UV/VIS*-спектрофотометара (скраћено спектрофотометара). Слични теоријски принципи описани овде присутни су у свим

врстама спектроскопије, али се спровођење метода у лабораторијским условима може значајно разликовати. Научници су почели да се баве спектрометријом почевши од Њутнових експеримената у оптици, а о употреби ултраљубичастог и видљивог (УЉ/В) дела спектра електромагнетног зрачења у науци данас биће речи у даљем тексту.

2. Теоријска основа

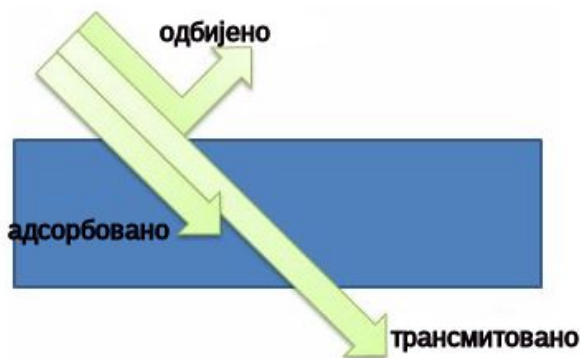
2.1 Супстанце и светлост

Бела светлост је скуп свих таласних дужина у видљивом делу спектра. Неке супстанце апсорбују део овог зрачења, а остали део зрака може да стигне до ока. Зрачење које стигне до рецептора у људском оку се даље обрађује у мозгу и тако стичемо идеју о боји предмета. Дакле, регистравањем неапсорбованог зрачења видљивог дела спектра које је прошло кроз посматрану супстанцу, одређујемо њену боју.



Сл. 2: Комплементарност боја.

Постоји очигледна паралела између начина којим људи виде боје и начина рада спектрофотометра. Наиме, најједноставније објашњење спектрофотометра јесте да се метода заснива на пропуштању електромагнетних зрака УЛВ дела спектра и регистровању пропуштеног зрачења ради даље карактеризације супстанце.



Сл. 3: Зрачење приликом интеракције са супстанцом.

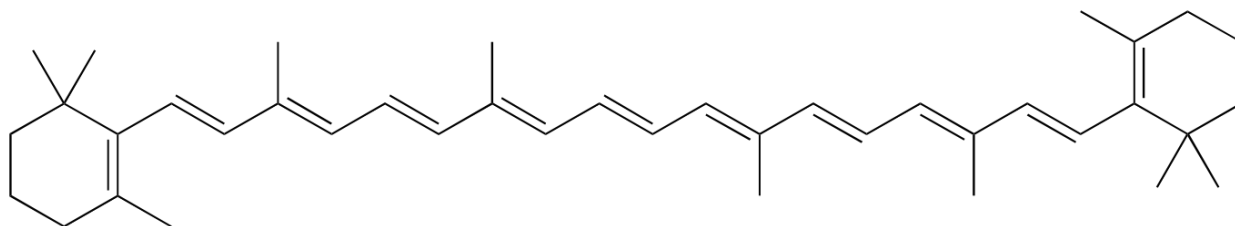
Утицај електромагнетног зрачења на супстанце можемо разматрати помоћу молекулских орбитала једињења. Приликом апсорбовања зрачења, електрони прелазе из *HOMO** у *LUMO*** стање. Размак између ове две орбитале одређен је енергијом неопходном за прелазак из једног стања у друго. Такође, потребно је мање енергије за $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаз, него у случају $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Како је енергија електромагнетног зрачења обрнуто пропорционална таласној дужини зрачења, закључујемо да ћемо $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазе уочавати на већим таласним дужинама од $\sigma \rightarrow \sigma^*$ прелаза. Додатно, енергетски размаци код $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазу у коњугованим π -системима су мањи него у случају појединачних двоструких веза. Ова

**HOMO* - *Highest Occupied Molecular Orbital*, највиша попуњена молекулска орбитала

***LUMO* - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, најнижа непопуњена молекулска орбитала

чињеница нарочито помаже органохемичарима и биохемичарима, с обзиром на то да су двоструке везе честа појава у органским молекулима.

Нпр. молекул β -каротена са 11 коњугованих двоструких веза апсорбује зрачење таласне дужине карактеристичне за плаву боју (450 - 490 nm), а трансмитује зрачење таласне дужине карактеристичне за црвену и жуту боју због чега β -каротен видимо као наранџасту супстанцу.



Сл. 4: β -каротен

2.2 Ламбер-Беров закон

Ламбер-Беров закон представља егзактан запис принципа којим се служи спектрофотометрија:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

При том, A представља апсорпцију, I_0 интензитет упадне светлости, I је интензитет трансмитоване светлости, ε је константа коју називамо апсорбанца или моларни апсорпцијски коефицијент и специфична је за материјал и таласну дужину зрачења, b је оптички пут, то јест дужина коју талас пређе док долази до апсорпције, c је моларна концентрација раствора супстанце.

Из Ламбер-Беровог закона закључујемо да апсорбанција линеарно зависи од концентрације супстанце, што имплицира да можемо доносити закључке о квантитативном саставу.

Важна напомена је да закон важи искључиво за ниске концентрације.

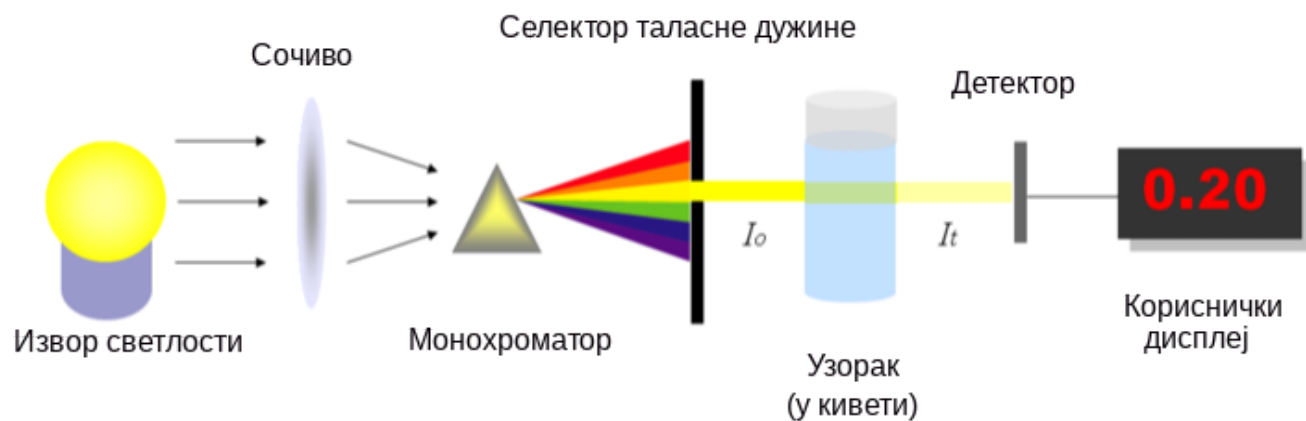
Поред Ламбер-Беровог закона при константним таласним дужинама и варирајућим концентрацијама, супстанце су одређене и спектром вредности које апсорбанција узима при сталној концентрацији, али варирајућој таласној дужини зрачења. Дакле, могућа је и квалитативна карактеризација.

О начинима добијања вредности за апсорбанцију биће речи након упознавања са деловима спектрофотометра.

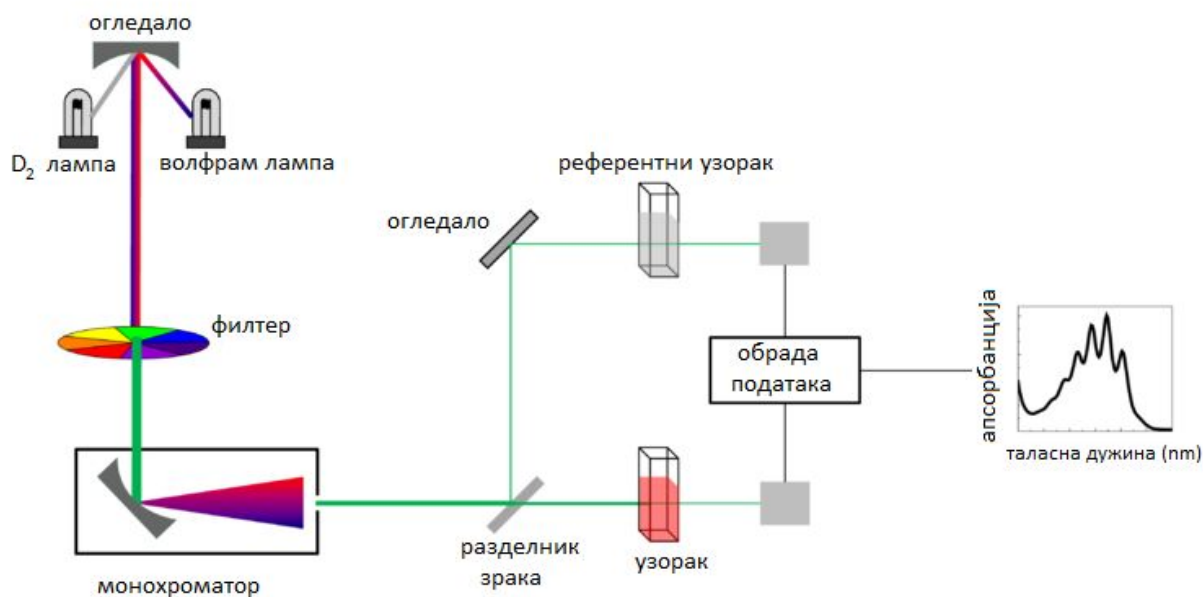
3. Апаратура

У основи сваког спектрофотометра су:

- Извор светлости
- Сочива која усмеравају зраке
- Монохроматор
- Селектор таласне дужине
- Узорак
- Детектор
- Кориснички дисплеј



Сл. 5: Схема спектрофотометра са једноструким снопом.



Сл. 6: Схема спектрофотометра са двоструким снопом.

Извор светлости у спектрофотометрима може се добити на различите начине. Потребно је да покрива спектар видљивог и УВ зрачења, дакле око 250 - 800 nm. Највећу примену имају халогене лампе са волфрамом или ксеноном, као и деутеријумске лампе.

Сочива и рефлектујуће површине користе се како би се спречило нежељено расипање зрака кроз апаратуру и да би се зраци усмерили ка монохроматору, узорку итд.

Монохроматор представља призму којом се постиже ефикасно разлагање таласних дужина светлости која потиче од извора. Монохроматори раде заједно са *селектором таласне дужине* који подешава таласну дужину која ће проћи кроз узорак у одређеном тренутку. Ова два дела се аутоматски координирају тако да се континуално кроз узорак пропусте све таласне дужине на којима је рад са спектрофотометром могућ.

Узорак представља испитивану супстанцу коју анализирамо. Најчешће је део смеше течног агрегатног стања, у познатом растварачу, и налази се у суду малих димензија који се назива кивета. Ширина кивете одређује оптички пут у једначини за Ламбер-Беров закон и њена вредност је најчешће 1 cm, па не мења бројну вредност апсорбације. Потребно је водити доста рачуна о узорку јер свака промена, попут загађења узорка, доводи до другачијих (вероватно погрешних) резултата анализе.

Детектор чине механизми којим се квантификују резултати интеракције електромагнетних таласа и узорка. Осетљивост и прецизност детектора су пресудни фактори квалитета целог апарата и стога се принцип рада детектора највише усавршавао кроз напредовање спектрофотометрије. Најједноставнији детектор састоји се од фотодиода (*photodiode arrays, PDA*) и ради на принципу фотоэффекта. Фотон који стигне до детектора произведе фотоелектрон који се убрза у електричном пољу, а јачина овако настале струје служи за израчунавање апсорпције и добијање резултата анализе. *CCD* и *CMOS* детектори су напреднији од фотодиода, служе се технологијом полупроводника металних оксида, а сигнал се преводи у пикселе.

Кориснички дисплеј је једини део апаратуре који интерагује са корисником. Дисплеј је повезан са детектором и преводи добијене сигнале у резултате стандардизованог облика. Овај део није обавезан с обзиром на то да су *UV/VIS*-спектрофотометри често повезани са рачунарима на којима се могу очитати резултати и упоредити са базом података.

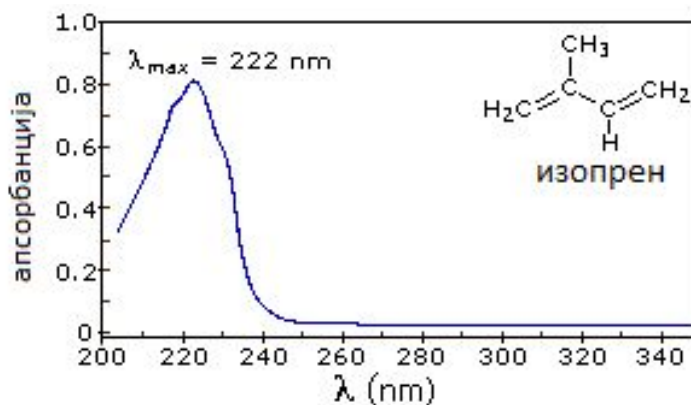


Сл. 7: Приказ лабораторијског спектрофотометра.

Када се у апарат поставе узорци за анализу, спектрофотометар ради на следећи начин: светлост коју производи лампа се монохроматором и селектором филтрира на појединачне таласне дужине, а ови зраци се потом усмеравају кроз узорак, па на детектор. Код спектрофотометара са двоструким снопом, таласи пролазе и кроз референтни узорак о чијој примени ће бити речи у наставку. Спектрофотометри са двоструким снопом дају практичније резултате, док су спектрофотометри са једноструким снопом једноставнији за производњу.

4. Резултати

Спектрофотометри кориснику дају резултат у графичком облику.



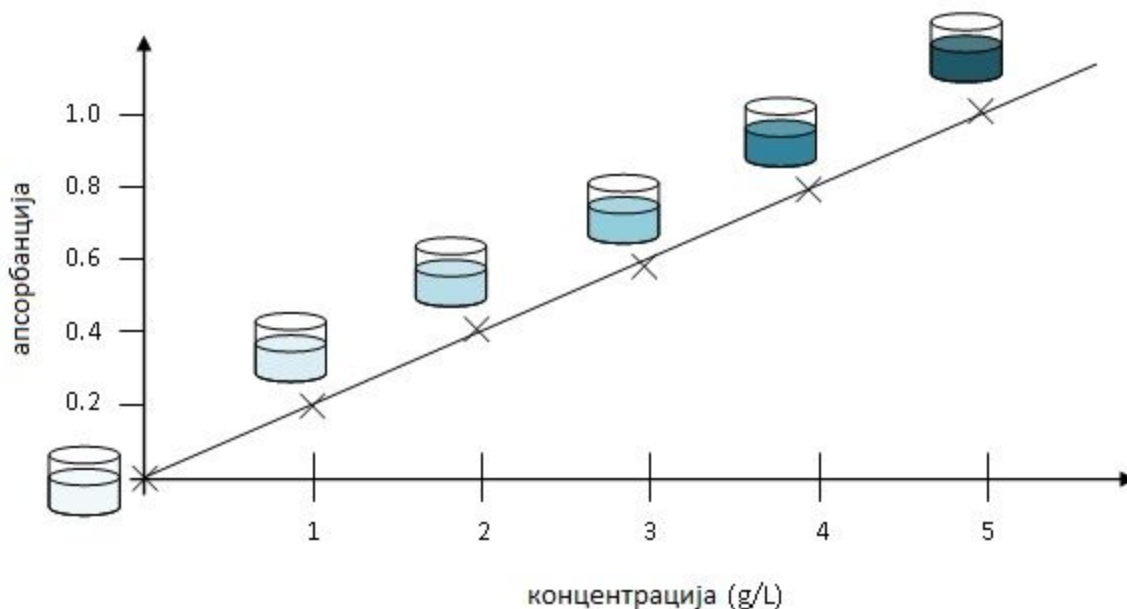
Сл. 8: Пример читавања спектрофотометра.

Добија се график зависности апсорбације од таласне дужине на којој је извршено мерење. Треба напоменути да се валидним резултатима не сматрају било које апсорбације, већ само оне из опсега 0,2 - 0,8. Такође, треба имати у виду и који тип спектрофотометра се користи. Они са једноструким снопом ће у апсорбацији урачунати укупан ефекат свих супстанци присутних у раствору, док ће спектрофотометар са двоструким снопом искористити референтни раствор у ком се налазе растварач и све друге супстанце које нису од интереса и израчунати само ефекат који испитивана супстанца има на апсорпцију.

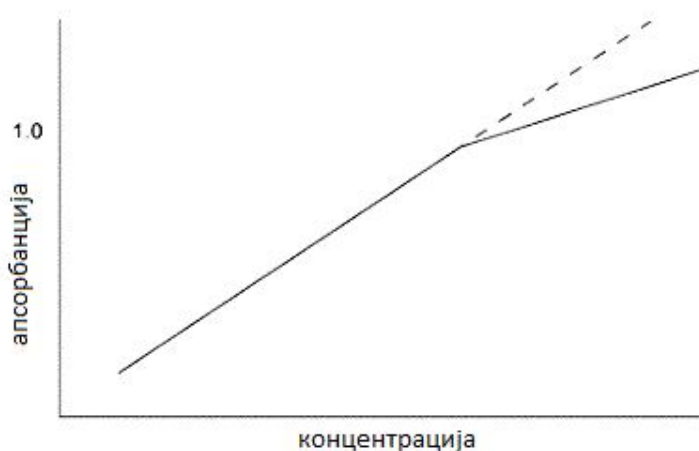
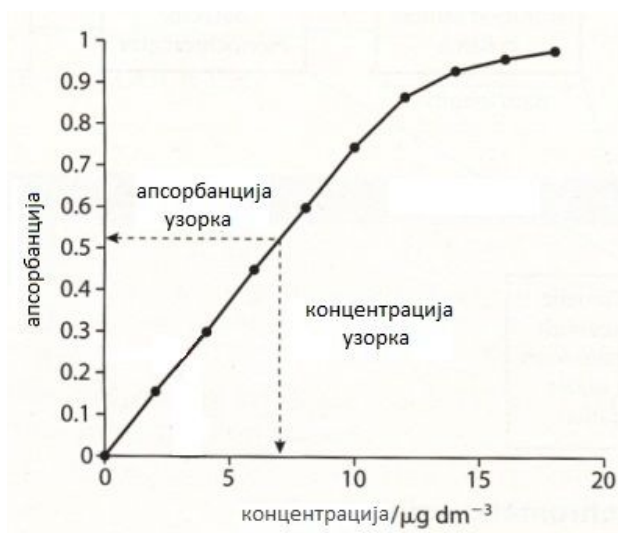
Осим што добијени график може да помогне при квалитативној карактеризацији, спектрофотометрија се најчешће користи за квантитативну анализу. Спектрофотометром одређујемо концентрацију супстанце формирајући калибрациону криву, а ово се може учинити на више начина.

Припремом узорака са познатим концентрацијама испитиване супстанце можемо формирати линеарни график зависности апсорбанције супстанце од њене концентрације. Програми попут *Excel*-а и *Origin*-а линеаризују, одређују коефицијенте правца и грешке ових вредности. Очитану апсорбанцију супстанце у узорку непознате концентрације користимо за израчунавање њене концентрације. Важно је да се добијена концентрација налази између најмање и највеће вредности концентрација које су нам већ познате.

На ширем спектру вредности концентрација, зависност апсорбанције од концентрације се више не може апроксимирати линеарном зависношћу. Ово је уједно и визуелан показатељ да је Ламбер-Беров закон применљив само при ниским концентрацијама, када растворена супстанца не проузрокује промене у распореду наелектрисања раствора чиме би се променила апсорпциона својства.



Сл. 9: Пример добре калибрационе криве, апсорбанција расте са концентрацијом линеарно.



Слике 10 и 11: Губитак линеарности услед раста концентрације.

5. Даље примене

Осим за већ објашњена квантитативна испитивања, спектрофотометрија је изузетно корисна код појединих структурних одређивања. Познавање и малог дела молекула може бити значајно уколико је у питању функционална група класе једињења. Примена је ипак ограничена, и то на једињења која поседују хромофоре - групе које апсорбују електромагнетно зрачење у УЛ/В делу спектра на начин објашњен у поднаслову 2.1. овог

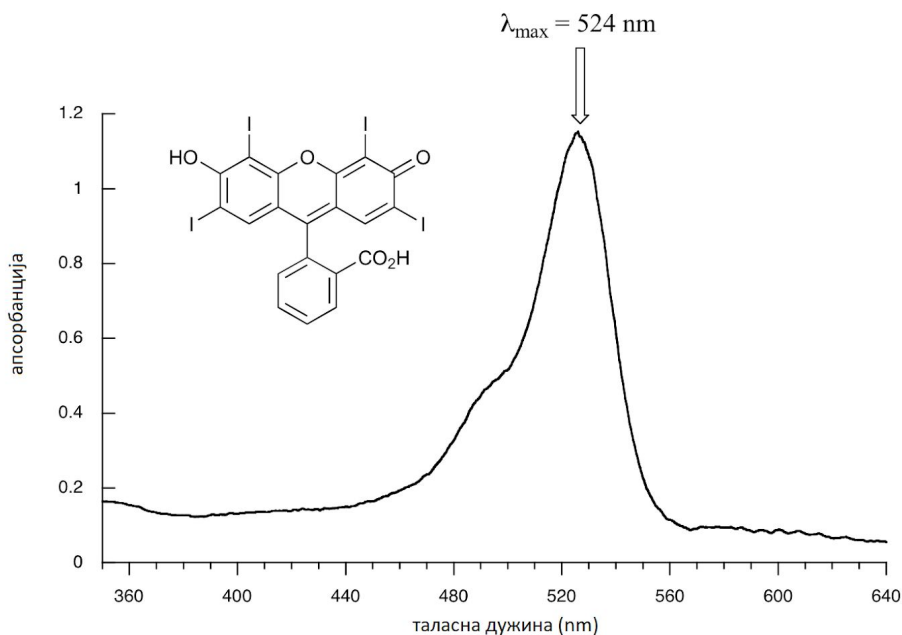
рада. Ова једињења су углавном коњуговани системи и природни производи попут флавона и полиацетилена.

При доношењу закључака о структури разматрају се општи изглед и положај апсорпционих максимума у спектру, као и интензитет пикова (локални максимуми адсорпције). Нпр. спектар са великим бројем пикова у видљивој области указује на дуге коњуговане или полицикличне ароматичне хромофоре, док пикови изражене дужине указују на једноставније коњуговане системе.

Установљена су и емпиријска правила која помажу при одређивању хромофора:

- Вудворд-Физерова правила за диене
- Вудвордова правила за еноне
- Скотова правила за бензоил деривате

Ова правила повезују делове молекула са апсорпционим максимумима.



Сл. 12: Спектар са апсорпционим максимумом на примеру боје за храну црвена #3.

Веома је честа примена за квантитативна одређивања на начин на који је већ описан. Са циљем да се покаже примена методе у истраживачком свету, следи пример из једног научног рада:

Three milliliters of 0.1 M FeCl₃ in 0.1 N HCl was added to the extract, followed immediately by timed addition of 3 mL of 0.008 M K₃Fe(CN)₆. When methanol was present, the FeCl₃ had to be added at the same timed intervals because of a small increase in OD with time of exposure of FeCl₃ to methanol. The optical density was read after 10 min in 1-cm glass cells at 720 nm on a Zeiss PMQ II spectrophotometer which had been zeroed with water. Ten minutes for color development was chosen because the rate of reaction was considerably slower after that time and because a precipitate often formed after 15-20 min. A blank of identical composition, but omitting the sorghum extract, was analyzed and subtracted from all other readings

Results were expressed as catechin equivalents using standard curves prepared daily for the conditions used in the analysis, from fresh solutions of commercial D-catechin.

Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain, Martin L. Price et al.

Подвучени део пасуса представља суштину поступка: апсорбанција искључиво посматране супстанце одређена је одузимањем апсорбанције добијене анализирањем слепе пробе која садржи све супстанце из узорка, осим оне коју анализирамо, и то у истим количинама као и у узорку. Добијена вредност се даље упоређује са стандардизованим, познатим концентрацијама исте супстанце.

6. Закључак

Спектрофотометрија је аналитичка метода са вишеструким предностима. Усавршава се већ деценијама, чиме постаје све прецизнија и кориснија. С обзиром на широк спектар могућности за квантитативна и квалитативна одређивања, спектрофотометрија је есенцијални део инструменталних метода које се користе у аналитичкој хемији, па је и разумевање принципа и примена који су представљени у овом раду од великог значаја за основе знања сваког хемичара.

7. Литература

1. Дејан Гођевац, Веле Тешевић. Структурне инструменталне методе: збирка спектра. Београд: Хемијски факултет, 2005.
2. Др инж. Јелица Мишовић, др инж. Теодор Аст. Инструменталне методе хемијске анализе, IV издање. Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду, 1981.
3. *Douglas A. Skoog, James F. Holler, Stanley R. Crouch. Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole 2007*
4. *Martin L. Price, Larry G. Butler. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain, J. Agric. Food Chem., 1977, 25 (6), pp 1268–1273*
5. Татјана Недељковић. Органска хемија 3: уџбеник за трећи разред средње школе за гимназије општег и природно-математичког смера. Нови Логос, 2015.

6. Grossman, W. E. L. *A comparison of optical detectors for the visible and ultraviolet*. *J. Chem. Ed.* 1989, 66, 697-700.
7. Курс из органске хемије, поглавље о интерпретацији UV спектра на сајту:
<https://courses.lumenlearning.com/suny-mcc-organicchemistry/chapter/interpreting-uv-spectra/>
8. https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Spectrometer/Detectors/Detectors

Додатно, на следећим линковима се налазе слике употребљене у овом матурском раду.

Једине измене у односу на оригиналне верзије слика јесу преводи термина на српски језик:

1. <https://sites.google.com/site/fizikasrednoskolcima/elektromagnetizam/elektromagnetno-zracene>
2. https://50icho.eu/wp-content/uploads/2018/05/PrepProblems-50-IChO_theoretical_20180215.pdf
3. <https://study.com/cimages/multimages/16/rtalight.jpg>
4. <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1518/2017/10/05155233/image031.png>
5. <https://jahschem.wikispaces.com/spectrophotometry>
6. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_UV-_visible_spectrophotometer.png
7. <https://www.fishersci.ca/shop/products/genesys-10s-uv-vis-spectrophotometer-promo/s37281>
8. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectry/uv-vis/spectrum.htm>
9. <https://di.uq.edu.au/files/2647/stdcurve1.jpg>
10. http://perso.numericable.fr/vincent.hedberg/analytical/analytical_exam.htm
11. <http://simulab.ltt.com.au/5/Laboratory/StudyNotes/Graphics/bLawDeviation.gif>
12. <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1518/2017/10/05155243/image039.png>