

SPEKTROFOTOMETRIA ABSORPCYJNA UV-VIS

Spektroskopia optyczna to dziedzina nauki obejmująca badanie materii przy użyciu promieniowania elektromagnetycznego, które w danym układzie może być wytwarzane lub może z układem oddziaływać. Jedną grupą metod spektroskopowych wykorzystuje fakt, że pochłonięta przez materiał energia może być oddana przez składniki układu w postaci promieniowania elektromagnetycznego, które następnie jest poddawane analizie (metody emisyjne). Inne typy spektroskopii bazują na badaniu zjawisk jakie zachodzą podczas oddziaływania analizowanej próbki z promieniowaniem elektromagnetycznym pochodzącym z zewnętrznego źródła. Tę grupę metod nazywamy absorpcyjnymi. Należy do nich spektrofotometria absorpcyjna w nadfiolecie (UV) i zakresie widzialnym (VIS), która opiera się na analizie absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez substancje w stanie stałym, gazowym lub ciekłym. Wynikiem badań spektrofotometrycznych jest widmo absorpcyjne, które jest indywidualne dla każdego związku, a absorpcja promieniowania elektromagnetycznego jest uzależniona od czynników takich jak stężenie badanej substancji i grubość warstwy absorbującej [3].

Spektrofotometria UV-Vis posiada szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, z tego powodu jednym z podstawowych urządzeń wyposażających pracownię badawczą jest spektrofotometr. Z badań widm absorpcyjnych najczęściej korzyści czerpie chemia analityczna w której spektrofotometrię wykorzystuje się m.in. do jakościowej i ilościowej analizy związków chemicznych, badań równowag chemicznych, potwierdzania tożsamości substancji czy kontroli czystości produktów [3]. Spektrofotometria UV-Vis jest również wykorzystywana w innych dziedzinach nauki takich jak biologia, farmacja, medycyna, badania żywności, rolnictwo oraz badania materiałów.

Charakterystyka promieniowania elektromagnetycznego

Spektrofotometria jest to metoda badań wykorzystująca zjawisko absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez materię. Promieniowanie elektromagnetyczne ma dwoistą naturę – falową i korpuskularną. Charakter falowy możemy scharakteryzować jako rozchodzące się w przestrzeni i czasie zaburzenie pola elektromagnetycznego. Wielkości jakimi opisane są fale to jej długość - λ i częstość drgań - ν . W próżni są one ze sobą powiązane zależnością:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (1.1)$$

gdzie: λ - długość fali [m]

ν - częstość drgań [Hz]

c - prędkość światła w próżni, wynosząca $3 \cdot 10^8$ m/s

Wraz ze wzrostem częstości promieniowania elektromagnetycznego coraz bardziej ujawnia się jego korpuskularny charakter. Oznacza to, że należy traktować je jako zbiór oddzielnych fotonów rozchodzących się w kierunku promieniowania. Fotony nie posiadają masy, ale mają pęd i niosą ze sobą energię, która jest opisana przez równanie Plancka:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1.2)$$

gdzie: E - energia promieniowania

h - stała Plancka

Zależność podana powyżej łączy korpuskularny i falowy charakter promieniowania elektromagnetycznego to znaczy opisuje foton za pomocą częstości i długości fali.

W tabeli 1.1. przedstawiono podział widma elektromagnetycznego i jego właściwości. Promieniowanie α charakteryzuje się najwyższą energią i najmniejszą długością fali, jego kwanty są emitowane przez jądra niektórych pierwiastków promieniotwórczych, techniką analityczną do badania jest np. analiza aktywacyjna. Promieniowanie o niższej energii to otrzymywane w lampach rentgenowskich promieniowanie X. Tym oddziaływaniem zajmuje się rentgenowska spektroskopia emisyjna czy rentgenowska spektroskopia absorpcyjna. Promieniowanie o energii rzędu dziesięciu elektronowoltów i długości fali od 10 nm 770 nm to promieniowanie z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego, stosowane jest

w spektrofotometrii UV-Vis czy spektroskopii widm elektronowych. Większą długość fali posiada promieniowanie podczerwone używane w spektrofotometrii IR i spektroskopii Ramana. Promieniowaniem o niższej energii i dłuższej długości fali są mikrofałe, które używa się w spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Fale radiowe to ostatni rodzaj promieniowania, charakteryzują się one długością fali dłuższą niż 1 m i najmniejszą energią, stosowane są w spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego [1].

Tabela 1.1. Charakterystyka różnych rodzajów promieniowania elektromagnetycznego [5]

Rodzaj promieniowania	$\lambda[\text{m}]$	Energia [eV]*
γ	10^{-13} - 10^{-10}	$\sim 10^7$
Rentgenowskie	10^{-10} - 10^{-8}	$\sim 10^5$
UV, Vis	10^{-8} - 10^{-6}	~ 10
IR (podczerwień)	10^{-6} - 10^{-4}	$\sim 10^{-1}$
Mikrofałe	10^{-3} - 10^{-1}	$\sim 10^{-3}$
Fale radiowe	>1	$<10^{-6}$

*1 eV= $1,6 \cdot 10^{-19}$ J

Wiązania chemiczne i przejścia elektronowe w cząsteczkach

Absorpcja promieniowania w zakresie UV-VIS jest związana z przejściami elektronów w cząsteczce na wyższe poziomy energetyczne. Zmiana stanów energetycznych to proces bardzo złożony, ponieważ na całkowitą energię cząsteczki składają się energie związane z różnymi formami ruchu. W cząsteczce wieloatomowej można wyróżnić [9]:

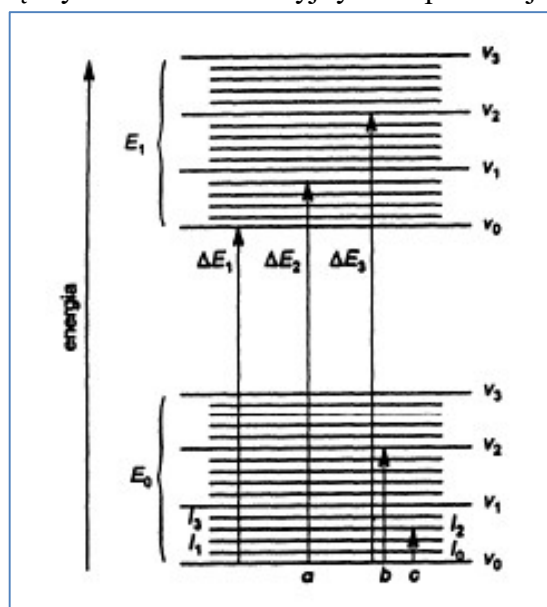
- Energię translacji – będącą wynikiem swobodnego ruchu cząsteczki w przestrzeni
- Energię rotacji – związaną z obrotem cząsteczki wokół osi przechodzącej przez jej środek masy
- Energię oscylacji – związaną z drganiami atomów wokół położenia równowagi, analogicznie do oscylacji sprężystości połączonych kulek,
- Energię elektronową – obejmuje energię kinetyczną elektronów w cząsteczce i energię potencjalną związaną z przyciąganiem elektronów przez jądro i odpychaniem przez sąsiednie elektrony.

Energia translacji zmienia się w sposób ciągły, z kolei energia rotacji, oscylacji i elektronowa są skwantowane, za ich pomocą możemy wyrazić całkowitą energię cząsteczki:

$$E = E_{\text{el}} + E_{\text{osc}} + E_{\text{rot}} \quad (1.3)$$

Zależność między energiami poziomów rotacyjnych, oscylacyjnych i elektronowych jest następująca: $E_{\text{el}} \gg E_{\text{osc}} \gg E_{\text{rot}}$. Każda cząsteczka posiada kilka dozwolonych stanów oscylacyjnych, z kolei każdemu stanowi oscylacyjnemu odpowiada kilka dozwolonych stanów rotacyjnych. Schemat przejść elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych jest przedstawiony na rysunku 1.1. Jeśli cząsteczka zaabsorbuje ilość energii odpowiadającą różnicy dwóch poziomów to może przejść do stanu wyższej energii ($\Delta E = h\nu = E_1 - E_0$). Przejście między stanami rotacyjnymi spowoduje promieniowanie z zakresu mikrofal i dalekiej podczerwieni (10^{-3}m do 10^{-5}m). Przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi wywołają fale odpowiadające bliskiej podczerwieni (10^{-5}m do 10^{-6}m). Z kolei fale elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego i ultrafioletowego ($2 \cdot 10^{-7}\text{m}$ - $8 \cdot 10^{-7}\text{m}$) spowodują przejścia w zakresie stanów elektronowych [6]. Efektem tego jest elektronowe widmo absorpcyjne które jest przedmiotem badań spektrofotometrii UV-Vis.

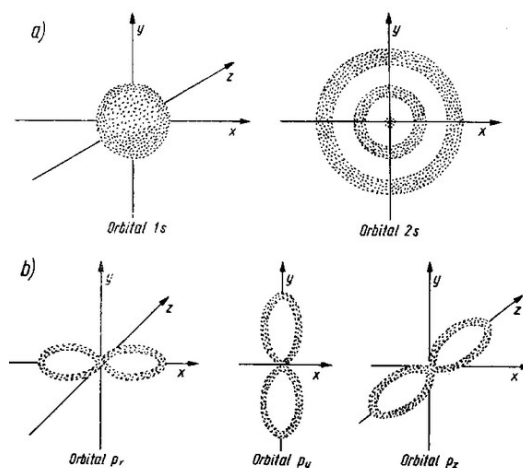
Rys. 1.1. Schemat przejść elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych w cząsteczce dwuatomowej; E - poziomy elektronowe, v- poziomy oscylacyjne, l -poziomy rotacyjne,
a - przejścia elektronowe, b - przejścia oscylacyjne,
c - przejścia rotacyjne [10]



Wiązania chemiczne w cząsteczkach

Elektrony w atomach różnią się od siebie wieloma czynnikami. Z tego względu zostały opisane przez cztery liczby kwantowe. *Główna liczba kwantowa n* określa energię elektronu, powłokę na której on się znajduje oraz jej rozmiar przestrzenny. Liczba kwantowa n może wynosić 1,2,3...7, a liczba elektronów jaką pomieści dana powłoka wynosi $2n^2$. *Poboczna liczba kwantowa l* przyjmuje wartości od 0 do $n-1$, decyduje ona o kształcie powłoki i liczbie orbitali oraz określa moment pędu elektronu w atomie. *Magnetyczna liczba kwantowa* przyjmuje wartości od $-l$ do l i opisuje ona kierunek orbitali w przestrzeni. *Spinowa liczba kwantowa* określa spin elektronu a jej wartość wynosi $-1/2$ lub $+1/2$. W atomie nigdy nie będzie dwóch elektronów które będą miały takie same wszystkie liczby kwantowe o czym mówi zasada Pauliego.

Elektron w mechanice kwantowej jest opisany nie jako punkt, ale jako obszar prawdopodobieństwa wystąpienia ładunku elektrycznego w przestrzeni okołojądrowej. Stąd orbital to obszar przestrzeni za którego konturem prawdopodobieństwo znalezienia się elektronu jest praktycznie równe zero. Orbitale występujące w atomach, różnią się od siebie kształtem oraz wielkością. Na ich objętość ma wpływ główna liczba kwantowa n oraz ładunek działający na elektron (im większy ładunek ma jądro atomu, tym silniej jest przyciągany elektron, a orbital mniejszy - słabiej związane elektrony mogą się bardziej oddalać). Kształt orbitalu s jest zbliżony do kuli, a orbitalu p można porównać do figury powstałej przez obrót liczby 8 wokół dłuższej osi (rys. 3.2.). Orbitale p są ułożone wzdłuż osi układu współrzędnych, różnią się one kierunkiem, lecz mają jednakową energię.



Rys. 1.2 Kształty orbitali a) typu s ; b) typu p [11]

Jeśli dwa atomy reagują ze sobą, tworzą się między nimi wiązania kowalencyjne. Powstaje nowy, wspólny orbital, przez połączenie elektronów pochodzących z dwóch atomów. Sytuacja taka występuje np. w przypadku połączenia dwóch atomów wodoru, w rezultacie tworząc cząsteczkę H_2 (rysunek 1.3.) czy reakcja orbitali s i p co ma miejsce w czasie reakcji wodoru z tlenem : $H+Cl \rightarrow HCl$ (rysunek 1.4.).



Rys. 1.3. Tworzenie orbitalu cząsteczkowego z dwóch orbitali typu s [12]

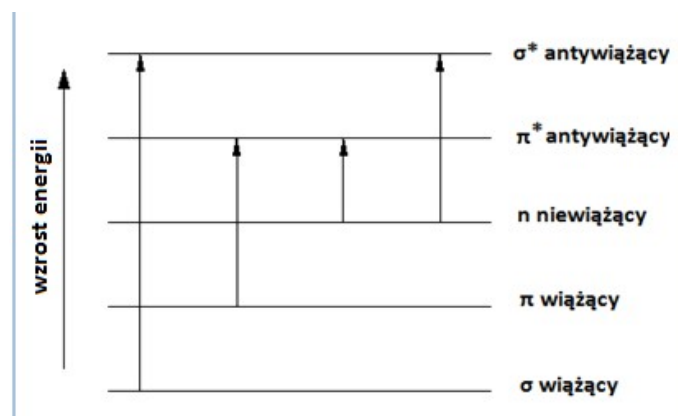


Rys. 1.4. Tworzenie orbitalu cząsteczkowego z orbitali typu s i p [12]

W wyniku dodawania lub odejmowania orbitali atomowych tworzą się tzw. orbitale cząsteczkowe, oznaczone symbolami σ , π , δ ..., odpowiadające stanom elektronów w cząsteczce. Orbitale cząsteczkowe posiadają zróżnicowane rozłożenie ładunku. W przypadku dużej koncentracji ładunku ujemnego między jądrami następuje osłabienie odpychania jądro-jądro, a układ jest trwały. Taki orbital nazywamy wiążącym i ma on niższą energię niż energia któregośkolwiek orbitalu atomowego. Mniejsza gęstość ładunku ujemnego nie niweluje w takim stopniu odpychania dodatnio naładowanych jąder co skutkuje nietrwałością układu. Ten typ orbitalu nazywany jest antywiązącym, oznacza się go np. σ^* .

Przejścia elektronowe w cząsteczkach

Absorpcja promieniowania w zakresie UV-Vis związana jest z różnymi typami przejść elektronów walencyjnych. Elektrony te tworzą wiązania pojedyncze – σ , wielokrotne – π , oraz nie zlokalizowane w żadnym z wiązań tzw. elektrony wolnych par elektronowych n . Kolejność poziomów energetycznych orbitali i możliwości przejść elektronowych przedstawiono na rysunku 1.5.



Rys. 1.5. Kolejność poziomów energetycznych poszczególnych orbitali i możliwości przejść elektronowych [7]

Długości fali przy których zachodzą następujące przejścia[1]:

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ $\lambda < 200$ nm;

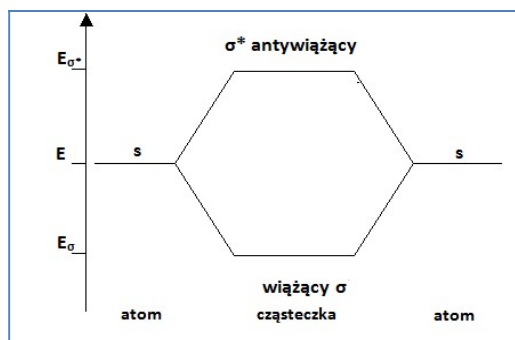
$n \rightarrow \sigma^*$ $\lambda \sim 170-210$ nm;

$\pi \rightarrow \pi^*$ $\lambda \sim 250-600$ nm;

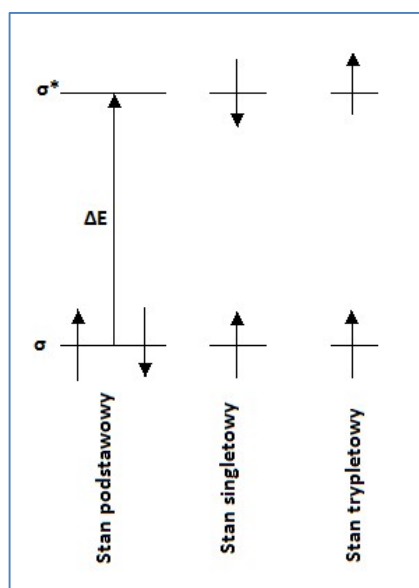
$n \rightarrow \pi^*$ $\lambda \sim 250-300$ nm;

Przejściami $N \rightarrow V$ nazywamy przejścia orbitali σ , π wiążących na te same orbitale antywiązące. Przejście $\sigma \rightarrow \sigma^*$ wymaga największej energii, a pasma mu odpowiadające leżą w zakresie nadfioletu ($\lambda < 200$ nm). Przejście między orbitalem wiążącym π , a tym samym antywiązącym, odpowiada absorpcji na pograniczu obszarów UV i widzialnego. Przejścia elektronów niewiązących do poziomu antywiązącego σ^* i π^* nazywają się $N \rightarrow Q$. Zbliżoną energię do przejść $N \rightarrow V$ posiada $n \rightarrow \sigma^*$ ($\lambda \sim 170-210$ nm). Najniższa energia potrzebna jest do przejścia $n \rightarrow \pi^*$, zależy szczególnie od rodzaju związku. Absorpcja następuje w bliskim ultrafiolecie lub zakresie widzialnym.

Absorpcja promieniowania powoduje przejście jednego z wiążących elektronów na orbital antywiązący. W zależności od zakresu energii kwantu elektron zmienia miejsce na σ^* lub π^* . Na rysunku 1.6. przedstawiono energię orbitali atomowych s , wiążących σ i antywiązących σ^* . Zmiana poziomu energetycznego na wyższy może wiązać się ze zmianą orientacji spinu. Jeśli tak się stanie mówimy o trypletowym stanie cząsteczek, jeśli nie, nazywa się to stanem singletowym. Częściej spotykany wśród cząsteczek jest stan singletowy. Stan singletowy i trypletowy cząsteczki przedstawiono na rysunku 1.7.



Rys. 1.6 Energia orbitali atomowych s, wiążących σ i antywiązących σ^* [1]



Rys. 1.7. Stan singletowy i trypletowy cząsteczki; strzałki oznaczają zorientowanie spinów w przestrzeni [1]

Pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego oraz ultrafioletu jest możliwe ze względu na obecność w cząsteczkach ugrupowań nienasyconych. Są to układy posiadające wiązania podwójne, potrójne, sprzężone układy takich wiązań jak i wiązania zawierające niewiążące się pary elektronowe, nazwane chromoforami. W tabeli 1.2. przedstawiono typowe chromofory i odpowiadające im przejścia elektronowe.

Tab. 1.2. Przykładowe chromofory i odpowiadające im przejścia elektronowe [13]

chromofor	związek	rodzaj przejścia	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\max}$ [l/mol $\times$ cm]
<chem>C=C</chem>	etylen	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	13000
<chem>C=O</chem>	aceton	$\pi \rightarrow \pi^*$	185	950
<chem>c1ccccc1</chem>	benzen	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	277 200	20 8000
<chem>N=N</chem>	azometan	$n \rightarrow \pi^*$	347 255	1 220

Prawa absorpcji promieniowania elektromagnetycznego

Podczas padania wiązki promieniowania na substancję to tylko jego część przechodzi przez substancję, a pozostała część ulega odbiciu, rozproszeniu i absorpcji, co opisuje poniższy wzór:

$$I_0 = I_{od} + I_r + I_p + I \quad (1.4)$$

gdzie: I_0 - natężenie światła padającego,

I_{od} - natężenie światła odbitego

I_r - natężenie światła rozproszonego

I_p - natężenie światła pochłoniętego

I - natężenie światła przechodzącego

Natężenie promieniowania odbitego jest zazwyczaj niewielkie ze względu na to, że wiązka pada na próbkę prostopadle, podobnie w przypadku klarownych roztworów rozproszenie nie jest duże. Główną przyczyną osłabienia promieniowania jest jego absorpcja. Została ona opisana niezależnie przez Bouguera (1728 r.) i Lamberta (1760 r.). Pierwsze prawo absorpcji mówi o zależności osłabienia promieniowania od grubości warstwy absorbujących cząsteczek ośrodka przez które przechodzi jego wiązka [1]

I prawo absorpcji

I prawo absorpcji mówi, że wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości l ulega osłabieniu zgodnie z równaniem [7]:

$$I = I_0 e^{-kl} \quad (1.5)$$

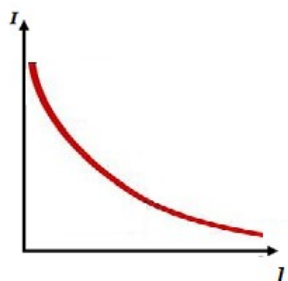
gdzie: I_0 - natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego padającego na jednorodny ośrodek absorbujący

I - natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący

k - współczynnik absorpcji

e - podstawa logarytmu naturalnego

Wykresem tej zależności jest funkcja wykładnicza:



Rys. 1.8. Wykres natężenia promieniowania w zależności od grubości ośrodka absorbującego

Po przekształceniu i zlogarytmowaniu wzoru (1.5.), otrzymujemy:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \cdot l = \varepsilon \quad (1.6)$$

gdzie: ε - ekstynkcja promieniowania elektromagnetycznego

Po przekształceniu oraz zastąpieniu stałej k nową stałą - a , zawierającą współczynnik wynikający ze zmiany logarytmu naturalnego na dziesiętny ($a = 0,4343 \cdot k$), otrzymamy:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot l \quad (1.7)$$

gdzie A to zdolność pochłaniania promieniowania zwana **absorbancją**.

Zatem I prawo osłabienia promieniowania mówi, że **absorbancja** jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, jeśli wiązka promieniowania monochromatycznego przechodzi przez jednorodny ośrodek absorbujący.

Wielkością związaną również z absorpcją promieniowania jest **transmitancja** T , inaczej określana jako przepuszczalność. Można ją określić jako stosunek natężenia wiązki promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący do natężenia promieniowania padającego na ten ośrodek

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1.8)$$

Związek transmitancji z absorbancją przedstawiono poniżej:

$$A = -\log T \quad (1.9)$$

Transmitancja zazwyczaj jest podawana w procentach, stąd:

$$T[\%] = \frac{I}{I_0} 100\% \quad (1.10)$$

II prawo absorpcji

Prawo Bouguera-Lamberta zostało rozszerzone dla roztworów. II prawo absorpcji mówi o zależności natężenia promieniowania od stężenia substancji absorbującej. Jeśli przez c oznaczymy stężenie roztworu to wiązka promieniowania po przejściu przez roztwór o grubości l ulega osłabieniu zgodnie z równaniem

$$I = I_0 e^{-k l c} \quad (1.11)$$

Po przekształceniu:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-k l c} \quad (1.12)$$

Zastąpienie stałej k stałą a , ($a=0,4343 \cdot k$) pozwoli na zapisanie prawa w poniższej postaci :

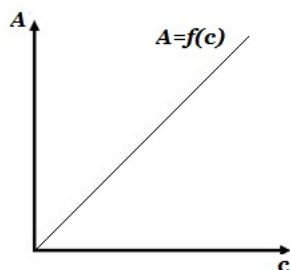
$$\log \frac{I_0}{I} = a \cdot l \cdot c \quad (1.13)$$

Z kolei zastąpienie logarytmu (I_0/I) absorbancją pozwoli nam na zapisanie prawa Bouguera-Lamberta-Beera w tej formie:

$$A = a \cdot l \cdot c \quad (1.14)$$

Stąd II prawo absorpcji można sformułować:

Jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu c i do grubości warstwy absorbującej



Rys. 1.9. Zależność absorbancji od stężenia substancji absorbującej

III prawo absorpcji (prawo addytywności absorpcji)

Absorbancja roztworu wieloskładnikowego równa się sumie absorbancji poszczególnych składników:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (1.15)$$

gdzie: $A_1, A_2, \dots, A_n$ – absorbancje poszczególnych składników.

Jeżeli wykorzystujemy wzór w postaci:

$$A = a l c \quad (1.16)$$

to wielkość a oznacza właściwy współczynnik absorpcji wyrażony w $\text{dm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ lub $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, a stężenie wyrażamy w $\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}$ lub $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Z kolei jeśli równanie to przyjmuje postać:

$$A = \epsilon c l \quad (1.17)$$

to ϵ jest molowym współczynnikiem absorpcji, wyrażonym w $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ lub $\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$, zaś stężenie w $[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$ lub $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$.

Ograniczenia w stosowaniu prawa Lamberta-Beera

Według II prawa absorpcji absorbancja zależy od stężenia w sposób wprost proporcjonalny, jednak w rzeczywistości spotykamy się z odstępstwami od tej zależności. W praktyce zdarzają się zarówno odchylenia ujemne jak i dodatnie od charakteru liniowego tego prawa. Przyczyny można podzielić następująco:

1) Podstawowe ograniczenia praw

Prawo Lamberta-Beera jest spełnione tylko dla roztworów o $c < 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. W ich przypadku współczynnik ε nie jest zależny od współczynnika załamania światła n i rzeczywistego molowego współczynnika absorpcji jak ma to miejsce w wypadku roztworów bardziej stężonych [7].

Przyczyną odchylenia od przebiegu liniowego może być też występowanie innych zjawisk związanych z oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego z materią. Zakładamy, że jedynym jego oddziaływaniem jest absorpcja, jednak przejście wzbudzonej cząsteczki X^* do stanu podstawowego X jest możliwe również poprzez emisję kwantu fluorescencji. Jeśli takie kwanty dotrą do detektora, transmitancja będzie podwyższona, a zatem absorbancja będzie niższa od rzeczywistej [7, 14].

2) Czynniki chemiczne

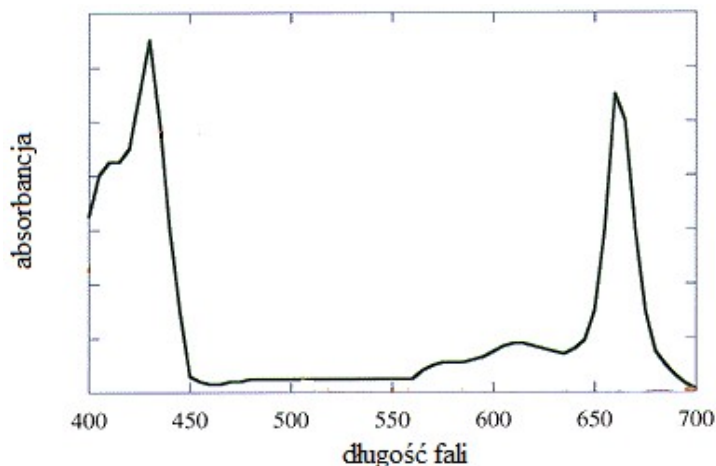
Czynniki chemicznymi mogącymi powodować odchylenia od prawa Lamberta-Beera są reakcje chemiczne zachodzące w analizowanym roztworze takie jak zmiana pH, oddziaływanie cząsteczek między sobą – dysocjacja, asocjacja, czy inne procesy jak solwatacja. Na odchylenia wpływ może mieć oddziaływanie cząsteczek substancji rozpuszczonej z rozpuszczalnikiem lub sobą np. kondensacja, polimeryzacja, kompleksowanie [1, 7, 15].

3) Czynniki aparaturowe

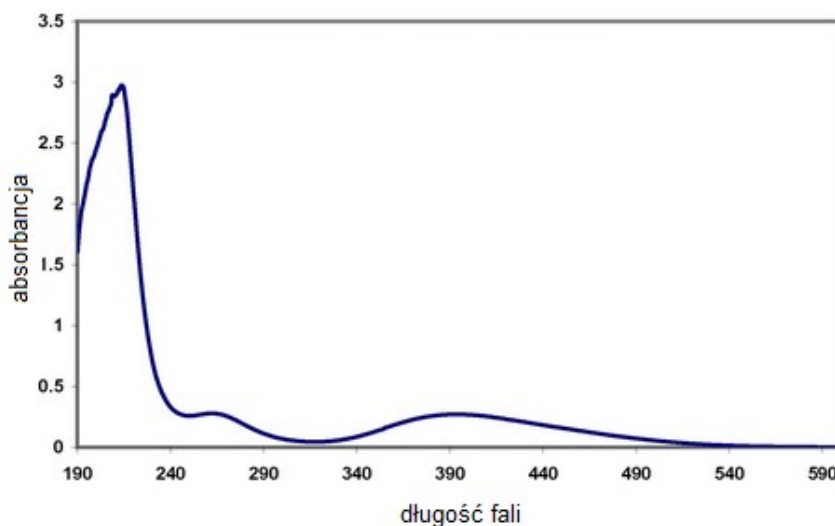
Niedostateczna monochromatyzacja promieniowania jest zasadniczym czynnikiem odstępstwa od prostoliniowości II prawa absorpcji. W jej przypadku odchylenia występują zarówno ujemne jak i dodatnie. Niekorzystny wpływ na charakterystykę ma również promieniowanie rozproszone czyli takie które dociera do detektora z pominięciem przedmiotu badanego. Ilość rozproszonego promieniowania mniej lub bardziej wpływa na ujemne odchylenia od prawa Lamberta-Beera [7]. Obecnie jednak czynniki aparaturowe praktycznie nie występują ze względu na coraz lepsze parametry spektrofotometrów.

Zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis

Graficznym zapisem zależności absorbancji od długości fali przechodzącej przez roztwór jest widmo absorpcyjne. Przykładowe widma absorpcji zostały przedstawione na rysunku 1.10. oraz 1.11.



Rys.1.10. Widmo absorpcyjne chlorofilu w zakresie widzialnym [20]



Rys.1.11. Widmo absorpcyjne roztworu bromu w wodzie. Pik absorpcji występuje w ultrafiolecie [21]

Badanie widm absorpcji poszczególnych substancji przynosi wiele cennych informacji. Z położenia maksimów absorpcji danego związku chemicznego można wnioskować o układzie poziomów energetycznych w cząsteczce [16]. Tak więc spektrofotometria UV-Vis może być wykorzystana do identyfikacji związków absorbujących promieniowanie z zakresu 200 – 800 nm. Widmo pozwala określać związek jednorodny i jest cechą charakterystyczną dla danego związku. Należy przy tym uwzględnić fakt, że czynniki takie jak: rozpuszczalnik, pH roztworu, warunki pomiarowe, zdolność rozdzielcza przyrządu czy temperatura pomiaru mają również wpływ na wygląd krzywej absorpcji.

Spektrofotometria UV-Vis nie zawsze umożliwia zidentyfikowanie związku w sposób jednoznaczny, ze względu na podobny wygląd widm związków należących do tej samej grupy. Często jest ona wykorzystywana jako metoda wstępna lub uzupełniająca, a stosowana razem z innymi technikami takimi jak spektroskopia NMR (magnetyczny rezonans jądrowy) czy IR przynosi największe korzyści. Obecnie duże znaczenie ma system komputerowej identyfikacji związków, dzięki któremu z wykorzystaniem bibliotek różnych spektroskopii (UV-Vis, NMR) można szybko rozpoznać strukturę związku porównując ją do widm znalezionych w bibliotece.

Dzięki badaniu widm spektrofotometrem w zakresie UV-Vis możemy porównać widmo próbki z widmem wzorca co umożliwi potwierdzenie tożsamości danej substancji. Spektrofotometria jest również sposobem na sprawdzenie czystości związku – można na przykład sprawdzić czy alkohole zanieczyszczone są związkami aromatycznymi. Zatem badanie widm w zakresie 180- 800 nm mogą dostarczyć odpowiedzi na pytania czy w danym związku występują wiązania podwójne lub wolne pary elektronowe [3,7].

Związki organiczne podzielono na kilka grup ze względu na charakterystyczną absorpcję promieniowania w zakresie UV-Vis[7]:

- Związki zawierające jedynie elektrony σ , np. węglowodory nasycone – nie absorbują one promieniowania w tym obszarze i mogą być stosowane jako rozpuszczalniki przy badaniach spektrofotometrycznych.
- Związki nienasycone zawierające elektrony π (chromofory) – absorbują promieniowanie w zakresie 180-800 nm. Dla węglowodorów nienasyconych z izolowanymi wiązaniami podwójnymi obserwuje się intensywne pasmo absorpcyjne przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ w przedziale 165-200 nm o $\epsilon_{\max}$ w zakresie 6000-12000 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Sprzężenie wiązań podwójnych prowadzi do przesunięcia maksimów absorpcji w kierunku fal dłuższych z równoczesnym wzrostem ich intensywności.

- Związki zawierające chromofor karbonylowy (aldehydy, ketony, kwasy karboksylowe i ich estry) wykazują silną absorpcję w wyniku przejść elektronowych trzech typów $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$.
- Związki aromatyczne dają trzy pasma absorpcyjne. Wprowadzenie podstawników do pierścienia benzenowego wywołuje zmiany w widmie, zależne od natury podstawnika.

Spektrofotometria UV-Vis posiada kilka zalet, które wyróżniają ją spośród innych technik, jest jedną z najczęściej stosowanych metod instrumentalnych w analizie ilościowej. Spektrofotometrię cechuje duża czułość, która jest ważnym kryterium oceny metody. Możemy rozróżnić czułość spektrofotometrycznej reakcji dla której obiektywnym wyznacznikiem jest wartość molowego współczynnika absorpcji, a także czułość danej metody spektrofotometrycznej dotyczącej oznaczania badanego składnika w określonym materiale i w konkretnych warunkach. W ocenie metody spektrofotometrycznej istotna jest dolna granica oznaczalności, którą określa się za pomocą współczynnika W_k , który wyraża stężenie analizowanej substancji. Jako metody czułe określa się te o współczynniku ϵ powyżej $10000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a o niskiej czułości te poniżej $1000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [3,7].

Innym walorem spektrofotometrii jest duża precyzja oznaczeń. Zależy ona od zakresu oznaczanych stężeń i od klasy aparatu. Spektrofotometria pozwala uzyskać wyniki których niepewność nie przekracza $\pm 0,2\%$ [7].

Spektrofotometria pozwala również na osiągnięcie dobrej selektywności oznaczeń. Mają na nią wpływ takie czynniki jak: wielkość pH roztworu, możliwość eliminacji obcych składników metoda maskowania czy ekstrakcji, charakter rozpuszczalnika, ale decydujące znaczenie ma charakter głównej reakcji czyli wybiórczość danego odczynnika w stosunku do określonego jonu [3,7].

Przykładowe zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis to [7] :

- 1) Analiza ilościowa kationów metali
Opracowane są procedury oznaczeń dla wszystkich kationów metali i to na wiele sposobów. Kationy są zazwyczaj oznaczane w postaci barwnych kompleksów chelatowych z odczynnikiem organicznymi, barwnych kompleksów par jonowych, a także barwnych kompleksów z prostymi ligandami nieorganicznymi,
- 2) Analiza ilościowa anionów nieorganicznych
Spektrofotometria UV-Vis jest główną metodą w analizie anionów nieorganicznych. Oznaczane są wszystkie aniony, ale do najczęściej stosowanych należą: azoty (VI), azotany (III), fosforany, fluorki i krzemiany. Analiza tych anionów używana jest zarówno w rolnictwie jak i w laboratoriach zajmujących się środkami spożywczymi i ochroną środowiska.
- 3) Analiza ilościowa związków organicznych
W analizie ilościowej związków organicznych spektrofotometria używana jest głównie w zakresie nadfioletu. Warto jednak zaznaczyć, że metoda ta, nie jest selektywna i dopiero w połączeniu z chromatografem pozwala na analizę ogromnej grupy związków organicznych i metaloorganicznych.
- 4) Badanie równowag reakcji chemicznych
Główne zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis to wyznaczanie stałych dysocjacji kwasów i zasad oraz ustalanie składów i stałych wartości związków kompleksowych.

BUDOWA I ZASADA DZIAŁANIA SPEKTROFOTOMETRÓW UV-VIS

Spektrofotometr UV-Vis jest przyrządem do pomiaru absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie nadfioletu oraz światła widzialnego przez ciecze, ciała stałe oraz gazy. Każdy spektrofotometr składa się z kilku głównych części takich jak:

- Źródło promieniowania
- Monochromator
- Komora do umieszczenia kuwety pomiarowej
- Detektor mierzący natężenie promieniowania
- Wskaźnik, rejestrator, komputer

Źródło promieniowania

Źródłem promieniowania są lampy wykonane z różnych materiałów, w zależności od ich okresów pracy. W zakresie ultrafioletu stosuje się lampy deuterowe bądź rtęciowe, mają one zakres od 180 do 360 nm. W zakresie widzialnym używane są lampy wolframowe, których zakres sięga od 350 nm do bliskiej podczerwieni oraz halogenowe a zakres od 340 do 1200 nm. Zatem dwie lampy w UV-Vis pokrywają cały zakres długości fali. Istnieją również wysokociśnieniowe lampy ksenonowe które emitują ciągłe promieniowanie o stałej mocy w całym zakresie promieniowania UV-Vis (190-900nm) i są one coraz częściej stosowane w budowie spektrofotometrów, gdyż wystarczające jest wtedy jedna lampa [3].

Monochromator

Monochromator jest podstawowym elementem spektrofotometru, którego celem jest wyizolowanie z emitowanego promieniowania, wąskiego pasma o żądanym zakresie. Im mniejszy jest ten zakres, tym światło jest bardziej monochromatyczne. W skład monochromatora wchodzi: szczelina wejściowa, kolimator, element rozszczepiający promieniowanie oraz szczelina wyjściowa. Zadaniem szczeliny wejściowej oraz kolimatora (w spektrofotometrach zazwyczaj tę funkcję pełnią zwierciadła) jest prowadzenie równoległej wiązki promieniowania wzdłuż głównej osi optycznej, aż trafi ona na siatkę dyfrakcyjną. Zadaniem siatki jest rozszczepienie promieniowania, jest ona wykonana z przezroczystej płytki na której nałożone są równoległe, nieprzezroczyste rysy o stałym rozstawie (rysunek. 2.1.) Obecnie wykonuje się je techniką holograficzną. Poniższy wzór opisuje rozmieszczenie poszczególnych linii dla siatki odbijającej[1] :

$$k\lambda = a(\sin\alpha \pm \sin\theta) \quad (2.1)$$

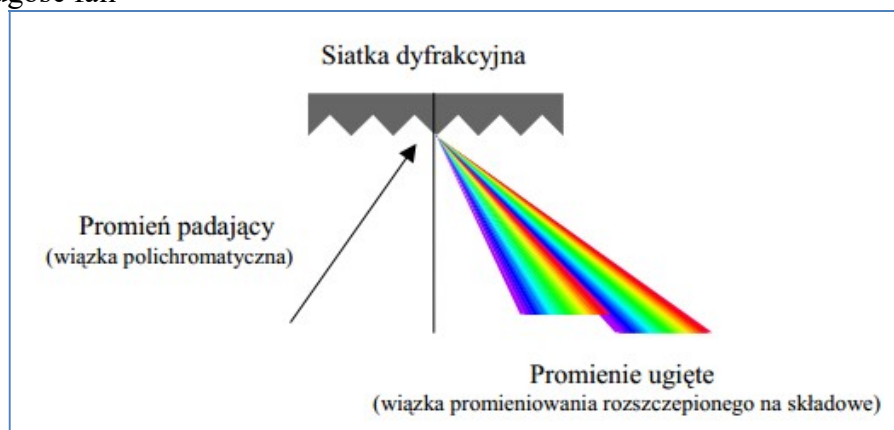
gdzie: α – kąt padania wiązki promieniowania na siatkę względem normalnej do siatki

θ – kąt ugięcia promieni

a – odległość między rysami (stała siatki)

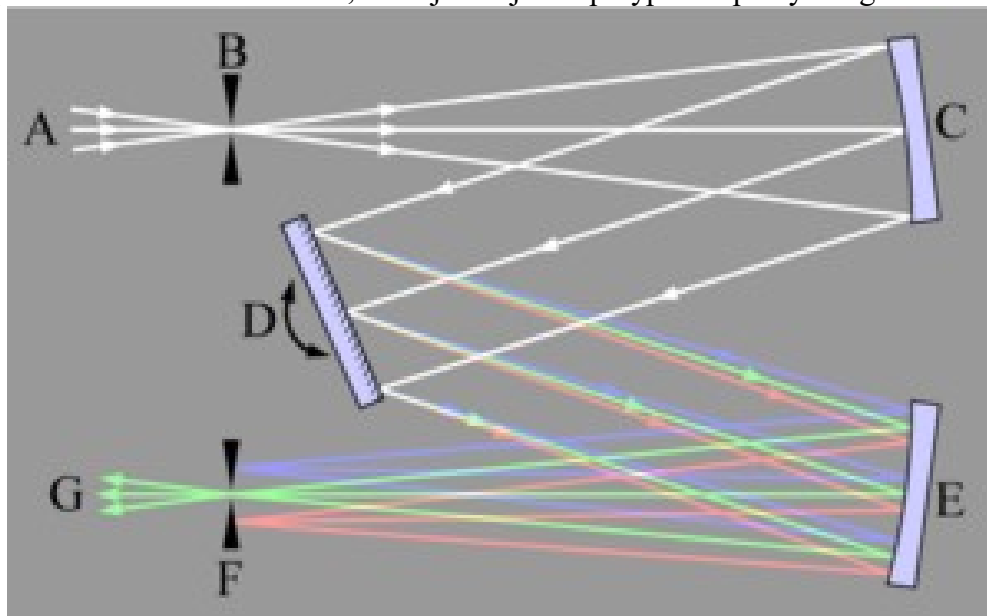
k – rząd widma

λ – długość fali



Rys. 2.12. Schemat działania siatki dyfrakcyjnej [13]

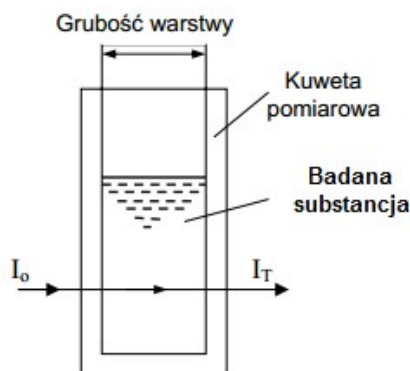
Występuje kilka układów monochromatorów które są używane w spektrofotometrach, są to: Littrowa, Eberta i Czernego-Turnera. W układzie Littrowa szczeliny są asymetrycznie ustawione względem siatki, a wklęsłe zwierciadło występuje w roli kolimatora. Układ Eberta charakteryzuje się wklęsłym zwierciadłem w roli kolimatora oraz niesymetrycznie ustawionymi szczelinami wobec elementu rozszczepiającego. Układ Czernego-Turnera (rysunek 2.2.) jest podobny do Eberta natomiast posiada on dwa zwierciadła, a nie jedno jak w przypadku powyższego.



Rys. 2.2. Przykładowy monochromator typu Czernego-Turnera. A-źródło promieniowania, B- szczelina wejściowa, C,E - zwierciadła, D - siatka dyfrakcyjna, F - szczelina wyjściowa, G – detektor [17]

Kuweta pomiarowa

Do pomiaru absorpcji cieczy i gazów używa się kuwet pomiarowych. Aby spełniały one swoje zadanie muszą być wykonane z materiały który zapewnia maksymalną transmisję promieniowania w danym zakresie. W celu badania fali o długości mniejszej niż 380 nm. (UV) używa się kuwet ze stopionej krzemionki bądź kwarcu (umożliwia on badanie w zakresie od 180 – 1000 nm). Aby mierzyć absorpcje promieniowania o długości fal w zakresie światła widzialnego kuweta może być wykonana ze szkła optycznego, kwarcu bądź z tworzyw sztucznych. Kuwety pomiarowe muszą być wykonane bardzo dokładnie, dokładnie znana powinna być grubość warstwy absorbującej – cieczy lub gazu. Ważne też aby kuweta była odporna na substancje chemiczne, które są w niej analizowane, oraz by była odpowiednio oznakowana – długość drogi optycznej i materiał z jakiego jest wykonana. Standardowe kuwety mają grubość 10 mm, ale bywają też mniejsze np.: 1,2,5 mm, oraz większe: 20, 50 mm [1,7]. Na rysunku 2.3. przedstawiono schemat kuwety pomiarowej.



Rys. 2.3. Schemat kuwety pomiarowej; I_o - natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego, I_T - natężenie promieniowania przechodzącego przez roztwór

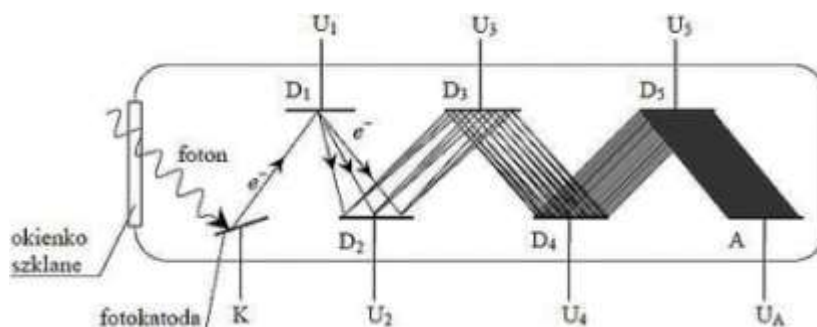
Detektor

Detektory w spektrofotometrach odbierają kwanty promieniowania elektromagnetycznego i zamieniają ich energię w energię elektryczną. Muszą spełniać one kilka warunków, takich jak wysoka czułość tzn. wykrywać najmniejsze zmiany w natężeniu światła oraz niski poziom szumów własnych. Detektory powinny działać również w sposób liniowy, tzn. wielkość elektryczna na wyjściu detektora powinna być proporcjonalna do natężenia promieniowania na jego wejściu. Do spektrofotometrów UV-Vis najczęściej używanymi detektorami są:

- Fotokomórki
- Fotopowielacze
- Fotodiody

Fotokomórki działają na zasadzie zjawiska fotoelektrycznego zewnętrznego. Energia fotonów padających na fotokatodę pozwala na uwolnienie z niej elektronów. Są one następnie przyspieszane w polu elektrycznym między anodą i katodą co wywołuje przepływ prądu elektrycznego. W zależności od materiału z jakiego wykonana jest katoda, fotokomórki mają różną czułość. Zazwyczaj w spektrofotometrach są dwie wymienne fotokomórki: „niebieska” – czuła w zakresie od 200 do 650 nm., zbudowana z 3 warstw, o składzie Ag - stopCs/Sb - Sc; „czerwona” do długości fali powyżej 650 nm., fotokatoda zbudowana z 3 warstw Ag - stop Cs/CsO – Cs.

Fotopowielacze również wykorzystują zjawisko fotoelektryczne oraz zjawisko wtórnej emisji elektronów. Są one zbudowane z fotokatody, kilku dynod (układu powielającego) i anody (rysunek 2.4.). Kwanty promieniowania elektromagnetycznego wybijają elektrony z fotokatody. Te są przyspieszane w polu elektrycznym i padają na dynody, wybijając przy tym wtórne elektrony. Każdy padający elektron wybija kilka nowych, stąd następuje wzmocnienie fotoprądu.



Rys. 2.4 . Schemat fotopowielacza , UA –anoda, U1,U2...U5 - dynody[19]

Innym często stosowanym rodzajem detektora są fotodiody, które działają na zasadzie zjawiska fotoelektrycznego wewnętrznego. Są one wykonane z półprzewodnikowych materiałów, na których absorpcja fotonów powoduje wzbudzenie elektronów (nośników ładunku) z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa. Najczęściej stosowanymi złączami są te typu *p-i-n* oraz *p-n*. Fotodioda *p-i-n* jest zbudowana z czystego półprzewodnika, na który z jednej strony nanosi się półprzewodnik typu *p* – z niedoborem elektronów, a z drugiej półprzewodnik typu *n* tzn. z nadmiarem elektronów. Po obydwu stronach przykładane są elektrody, które podłączane są do źródła napięcie, co powoduje polaryzację diody w kierunku zaporowym. Podczas przechodzenia przez warstwę zaporową złącza, promieniowanie elektromagnetyczne prowadzi do powstania nośników ładunków czyli przez diodę płynie prąd, który jest proporcjonalny do liczby zaabsorbowanych fotonów.

Do zalet fotodiod należą: niewielkie wymiary, duża szybkość odpowiedzi na sygnał, stabilność i niski poziom szumów oraz duża czułość. W spektrofotometrach nowej generacji często używa się detektorów w postaci matryc diodowych. Są to szeregi złożone z kilkuset fotodiod, które charakteryzują się wielokanałową detekcją co pozwala na szybką odpowiedź i szeroki przedział liniowości wskazań [1,3,7].

Sygnał z detektora, zostaje wzmocniony i przesłany do układu pomiarowego. Sposób sterowania spektrofotometru zależy od jego klasy. Urządzenia niższej klasy są sterowane w sposób

„ręczny”, natomiast nowocześniejsze, są sterowane przez komputer, który może stanowić część przyrządu bądź być oddzielnym układem. Mierniki w spektrofotometrach niższej klasy mogą być typu: wychyleniowego, kompensacyjnego lub cyfrowego. W układach wychyleniowych stosowanych w spektrofotometrach jednowiązkowych, przyrządem pomiarowym jest najczęściej galwanometr, wyskalowany w jednostkach absorbancji i transmitancji. Układy kompensacyjne polegają na zrównoważeniu działania jakie jest powodowane przez wprowadzenie badanej próbki w bieg promieni. Można to spowodować przez użycie przesłony lub przez zmianę wielkości prądowych. Mierniki typu kompensacyjnego są dokładniejsze od wychyleniowych i stosuje się je w urządzeniach dwuwiązkowych. Powyższe mierniki należą do układów analogowych, obecnie częściej sygnał analogowy przetwarzany jest na cyfrowy i wyświetlany na odpowiednim wyświetlaczu - jest to znacznie dokładniejszym sposobem [1,3,7].

Integralnym elementem spektrofotometrów klas wyższych jest komputer, którego zadaniem jest:

- Przetwarzanie sygnału analogowego w sygnał cyfrowy
- Diagnostyka przyrządów, w tym sprawdzanie prawidłowości działania podzespołów
- Korekcja parametrów pomiarowych (np. korekcja linii podstawowej)
- Sterowanie pomiarem (dobór parametrów)
- Obliczanie i wyświetlanie wyników pomiarowych
- Optymalizacji rejestrowanych widm i stosunku sygnału do szumu
- Analiza statystyczna wyników pomiarowych
- Porównywanie wyników pomiarowych z danymi odniesienia przechowywanymi w pamięci
- Magazynowanie danych w pamięci komputera

Elementem potrzebnym do zapewnienia poprawnego działania spektrofotometru jest również układ stabilizujący napięcie zasilające. Jest on zazwyczaj sprzężony z przyrządem, bądź urządzenia są zasilane z komputera.

Podział spektrofotometrów oraz parametry je charakteryzujące

Istnieje wiele sposobów podziału spektrofotometrów w zależności np. od sposobu rejestrowania, zakresu czy konstrukcji. Na klasę spektrofotometru mają wpływ głównie dwie z jego części składowych: monochromator oraz detektor.

Ze względu na sposób rejestracji, spektrofotometry dzielą się na punktowe i samorejestrujące. Spektrofotometry punktowe dokonują pomiarów, kolejno przy każdej długości fali. Odbywa się to zazwyczaj przy pomocy metody wychyleniowej bądź kompensacyjnej i charakteryzują się dużą precyzją pomiaru. Spektrofotometry samorejestrujące to zazwyczaj urządzenia dwuwiązkowe, automatycznie rejestrujące widmo przy pomocy komputerów w które są wyposażone. Pomiar trwa krócej niż w przypadku spektrofotometrów punktowych, lecz bezwładność układu rejestrującego może prowadzić do zniekształcenia widma [2,7].

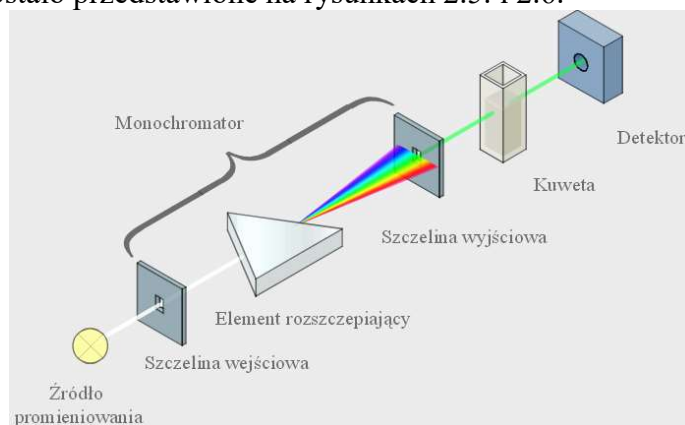
W zależności od przebiegu wiązki promieniowania, spektrofotometry dzieli się na jednowiązkowe i dwuwiązkowe:

- Jednowiązkowe - w których wiązka przechodzi najpierw przez próbkę odniesienia a następnie przez próbkę z badanym roztworem
- Dwuwiązkowe - wiązka promieniowania jest dzielona na dwie identyczne wiązki równoległe, w bieg jednej wprowadzany jest próbka odniesienia, a w drugiej próbka badana.

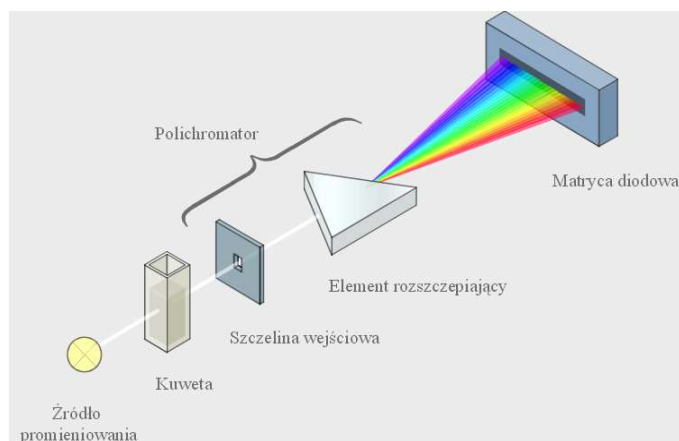
Względy ekonomiczne zdecydowały, że częściej używane są aparaty jednowiązkowe, ponieważ koszt części optycznej przewyższa koszt elektronicznych urządzeń zapewniających stabilność układu.

Powyżej wymienione rodzaje należą do spektrofotometrów klasycznych. Charakteryzują się one sposobem badania zwanym skanowaniem tzn. dla określonej długości fali rejestrowane jest widmo i mierzona wielkość absorbancji, następnie monochromator zmienia długość fali, i absorbancja jest mierzona dla kolejnej wielkości. Obecnie produkowane są również spektrofotometry które badają wiele długości fali jednocześnie – spektrofotometry z detekcją równoległą. W ich przypadku

Wiązka promieniowania polichromatycznego jest kierowana na badaną próbkę, a następnie na układ rozszczepiający. Badanie rozszczepionego widma w całym zakresie umożliwia zastosowanie matrycy fotodiod. Jest to szereg detektorów, ustawionych w taki sposób aby każda dioda mierzyła natężenia promieniowania dla określonej długości fali. Jednoczesna odpowiedź wielu fotodiod sprawia, że spektrofotometry charakteryzują się dużą szybkością pomiaru, co jest ogromną zaletą w badaniach układów nietrwałych, analiz wieloskładnikowych i będących w przepływie [1, 5, 7]. Spektrofotometry klasyczne oraz spektrofotometry z detekcją równoległą różnią się od siebie również budową, co zostało przedstawione na rysunkach 2.5. i 2.6.



Rys. 2.5 .Budowa spektrofotometru klasycznego [13]



Rys. 2.6. Budowa spektrofotometru z detekcją równoległą [13]

Ze względu na znaczące różnice w budowę, możliwości analityczne oraz osiągane parametry, wszystkie dotychczas produkowane parametry zostały podzielone na cztery generacje [3]:

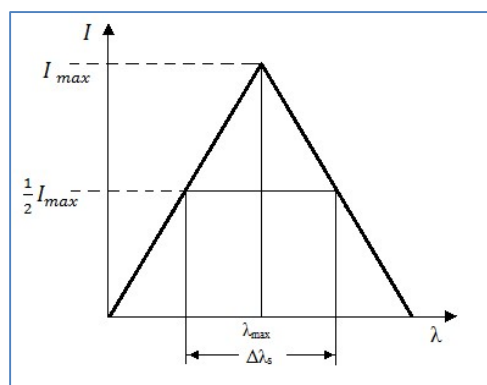
- Spektrofotometry pierwszej generacji - produkowane w latach 1945- 1970, z elektronicznym odczytem lampowym;
- Spektrofotometry drugiej generacji – z elektronicznym układem półprzewodnikowym z cyfrowym odczytem, przystosowane do współpracy z zewnętrznym układem mikrokomputerowym, produkowane na początku lat 70.
- Spektrofotometry trzeciej generacji – zawierają wbudowany mikrokomputer do sterowania działaniem poszczególnych zespołów aparatu i przetwarzania uzyskiwanych wyników pomiarowych, pojawiły się przy końcu lat siedemdziesiątych;
- W pełni skomputeryzowane, z zastosowaniem nowych metod rozszczepienia (dyspersja dwuwymiarowa) i detekcji promieniowania optycznego (detekcja wielokanałowa), umożliwiające znacznie większą szybkość pomiaru i czułość.

Oprócz standardowych spektrofotometrów UV-Vis produkowane są również spektrofotometry Vis mające zastosowanie tylko w zakresie widzialnym absorpcji. W przypadku gdy analizowane substancje nie mają pasm absorpcji w ultrafiolecie, a tylko w zakresie od 350 nm

do około 780 nm wystarczające będą spektrofotometry Vis. Są one znacznie tańsze od urządzeń pokrywających cały zakres UV-Vis m.in. ze względu na wykorzystywane źródło promieniowania. Spektrofotometria w zakresie UV-Vis wymaga stosowania drogich lamp ksenonowych które emitują promieniowanie w całym tym zakresie lub stosowania dwóch lamp. Światło widzialne emitują znacznie tańsze lampy wolframowe lub halogenowe i wystarczająca jest tylko jedna z nich. Na mniejsze koszty produkcji spektrofotometrów Vis wpływają również elementy optyczne takie jak kuwety, które mogą być wykonane ze szkła lub tworzyw sztucznych, nie tak jak w przypadku badania fal o długości mniejszej niż 380 nm gdzie używany jest kwarc, który jest znacznie kosztowniejszy w obróbce.

W celu określenia klas spektrofotometrów oraz ich możliwości zastosowań używa się wielu parametrów, podstawowe znaczenie mają [1,3,7] :

- **Zakres spektralny** przyrządu – Najczęściej konstruowane są przyrządy o zakresie widzialnym (Vis) – 360 do 800 nm; UV i widzialnym (UV-Vis) - 200 do 800 nm, oraz ultrafioletowym, widzialnym i bliskiej podczerwieni (UV-Vis-NIR) – od 200 nm do 3000 nm.
- **Szerokość spektralna wiązki** – Wielkość ta jest związana z definicją funkcji szczelinowej monochromatora. Określa ona rozkład energii promieniowania opuszczającą szczelinę wyjściową względem długości fal tego promieniowania, gdy szczelina wejściowa jest równomiernie i całkowicie oświetlona przez źródło [3]. Jeśli monochromator posiada szczeliny równiej wielkości, zakłada się, że funkcja ma kształt trójkąta, którego wierzchołek jest zlokalizowany na wysokości nominalnej długości fali, ustawionej na monochromatorze (rysunek 2.7.). Szerokość spektralna wiązki, to szerokość trójkąta w połowie jego wysokości, obejmuje około 75% promieniowania wychodzącego z monochromatora. W zależności od klasy przyrządu wielkość ta waha się od około 0,05 nm do 5, a nawet 10 nm w urządzeniach słabszych.
- **Spektralna zdolność rozdzielcza** - zdolność spektrofotometru do odróżnienia dwóch pasm absorpcji leżących blisko siebie. Najczęściej za jej miarę przyjmuje się minimalną szerokość wiązki jaka jest możliwa do uzyskania przy podanej długości fali. Przyjmuje wartości od 0,1 nm do 1 nm.
- **Dokładność skali absorbancji** – Zazwyczaj określana dla $A=1$ i przy określonej długości fali. W zależności od urządzenia dokładność sięga od 0,5 do 0,0008 [7]. Jest to wielkość istotna dla oceny wyników i ma na nią wpływ tzw. poziom szumów.
- **Dokładność wyznaczania długości fali** – Wielkość określająca o ile wskazywana długość fali różni się od wartości rzeczywistej – zazwyczaj w granicach od 0,1 nm do 1 nm. W spektrofotometrach do poprawnego działania wymagana jest kalibracja długości fali. W urządzeniach sterowanych komputerowo proces ten jest wykonywany automatycznie.
- **Ilość światła rozproszonego** – Ilość światła o długości innej niż wyselekcjonowana, która dociera do detektora. Podawana jest w procentach i w zależności od klasy aparatu: sięga nawet 1% w przypadku spektrofotometrów niższej klasy, a dla przyrządów lepszej klasy wynosi do 0,0001%



Rys. 2.7 Rozkład natężenia promieniowania opuszczającego szczelinę wyjściową monochromatora w zależności od długości fali tego promieniowania (funkcja szczelinowa); $\Delta\lambda_s$ – szerokość spektralna wiązki [1]

SPEKTROFOTOMETR VIS723G

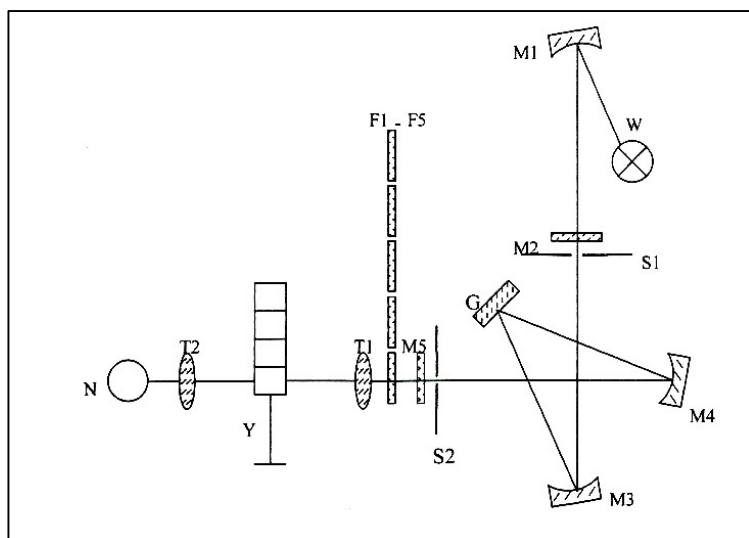
Spektrofotometr VIS 723G jest wielozadaniowym spektrofotometrem w zakresie widma widzialnego. Składa się z zasilacza, źródła światła, monochromatora, przedziału próbek, systemu detekcji, systemu kontroli silników, mikroprocesora, klawiatury oraz wyświetlacza LCD. Do komunikacji zewnętrznej oprócz klawiatury i wyświetlacza wyposażony jest w port RS232 i port drukarki. Na rysunku 3.2. przedstawiono schemat blokowy spektrofotometru, a rysunek 3.3. przedstawia schemat systemu optycznego. Podstawowe parametry urządzenia oraz specyfikacja parametrów spektrofotometru umieszczono w tabelach 3.1. i 3.2.



Rys. 3.13. Stanowisko do pomiarów spektrofotometrycznych



Rys. 3.14. Schemat blokowy spektrofotometru [23]



Rys. 3.15. Schemat systemu optycznego spektrofotometru VIS723G;
W – lampa halogenowa; |G- siatka dyfrakcyjna; M1- zwierciadło skupiające; M3-M4 - zwierciadła ogniskujące; F1-F5 – filtry; Y- komora pomiarowa; ; S1-S2 – szczeliny;
M2- okno zabezpieczające;
T1-T2 – soczewki; N – detektor [23]

Tab. 3.3. Podstawowe parametry urządzenia[23]

Zakres długości	320~1100nm
Zakres pomiaru transmitancji	0%T~200%T
Zakres pomiaru absorbancji	-0,301~3,00A
Szczelina	2nm
Minimalna rozdzielność pomiaru	0,1nm

Tab. 3.4. Specyfikacja głównych parametrów spektrofotometru VIS723G [23]

Dokładność długości fali	±0,5nm
Powtarzalność długości fali	0,2nm
Światło rozproszone	≤0,1%T(NaI, dla 220nm)
Dokładność fotometryczna	±0,5%T (0%T~100%T) ±0,002A (0~0,5 A) ±0,004A (0,5A~1A)
Odtwarzalność fotometryczna	0,2%T
Płaskość linii bazowej	±0,002A
Dryft	≤0,00A/h (przy 500nm; po wygrzaniu)

Spektrofotometr ma funkcję autodiagnostyki to znaczy potrafi rozpoznać większość błędów, informując o nich oraz pokazując wskazówki dotyczące dalszego postępowania, oraz opcję automatycznego zapisu danych, które nie zostaną utracone bez wiedzy użytkownika. Spektrofotometr VIS723G posiada kilka trybów w których można wykonywać badania. Są to:

- pomiary przy wykorzystaniu funkcji skanowania względem długości fali – **uzyskiwanie widma absorpcji**. Przed przystąpieniem do skanowania użytkownik ma możliwość określenia parametrów badania, takich jak
 - mierzona wielkość (transmitancja, absorbancja, ekstynkcja),
 - szybkość skanowania; do wyboru szybka, średnia i wolna,
 - odstęp skanowania; zbyt duży odstęp skanowanie będzie powodował niepełny obraz widma, z kolei zbyt mały odstęp spowoduje zmniejszenie prędkości skanowania oraz może zmniejszyć badany zakres długości fali. Należy optymalnie dobrać odstęp skanowania do długości fali – jeśli chcemy uzyskać widmo w pełnym zakresie długości fali interwał nie może być mniejszy niż 0,5nm. Spektrofotometr pozwala na wybór jednej z dostępnych wartości odstepu: 0,1nm, 0,2nm, 0,5nm, 1,0nm, 2,0nm, 5,0nm.
 - zakres skanowania - pozwala wybrać dolną i górną granicę długości fali
 - skalę osi Y
- **pomiary fotometryczne** (pomiary przy określonej długości fali), możliwy pomiar dla wielu długości fal(maksymalnie 9) w tym samym czasie. W tym trybie również przed pomiarem należy ustawić wartości parametrów takich jak ilość analizowanych długości fal, określenie ich długości, oraz włączenie lub wyłączenie korekcji kuwety.
- **pomiary ilościowe**. Przed przystąpieniem do pomiaru należy ustalić krzywą kalibracyjną, która wiąże ze sobą absorbancję A oraz stężenie C według równania $C=KA+B$. Istnieją na to dwa sposoby : bezpośrednie wprowadzenie parametrów K i B lub poprzez ręczne wpisanie stężenia próbek a następnie pomiar ich absorbancji. Po ustaleniu krzywej kalibracyjnej należy przejść do właściwych pomiarów.
- **pomiary kinetyczne** - możliwe śledzenie zmian parametrów próbki w czasie oraz służy do obliczeń aktywności próbki w określonym odcinku czasu. Stosowany również do sprawdzenia stabilności i szumów urządzenia. W tym trybie przed rozpoczęciem pomiarów należy ustalić czas pomiaru oraz czas próbkowania, z tym, że oba te parametry powinny być do siebie dopasowane – im dłuższy czas pomiaru tym dłuższy powinien być odstęp między pomiarami.
- **pomiary w czasie rzeczywistym** mogą być wykorzystane dla pomiarów fotometrycznych i ilościowych przy ustalonej długości fali. Urządzenie w tym trybie jest cały czas w stanie pomiaru.

Spektrofotometr VIS723G połączony jest z zewnętrznym komputerem. Oprogramowanie UVSoftware umożliwia sterowanie urządzeniem bezpośrednio z komputera, a uzyskane wyniki pozwala zobaczyć i analizować w programie, nie tylko na ekranie spektrofotometru. Program UVSoftware posiada takie same funkcjonalności jak te które są dostępne z panelu sterowania spektrofotometru

LITERATURA

- [1] – Bartosz G., Józwiak Z.: Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
- [2] – Cygański A.: Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1997.
- [3] – Nowicka- Jankowska T.: Spektrofotometria UV/VIS w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1988.
- [5] – Orear J.: Fizyka Tom 2. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1993.
- [6] – Socka J., Alchimowicz M., Białłowicz J. : Fizyka z elementami biofizyki i agrofizyki. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego, Olsztyn 2002.
- [7] –Szczepaniak W. : Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [8] – Trębacz Kazimierz.: Skrypt do ćwiczeń z biofizyki dla studentów biologii i biotechnologii UMCS w Lublinie. Wydawnictwo UMCS, Lublin 2010.
- [9] – Zieliński W.: Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [10] - http://chem.arch.ug.edu.pl/zas/dydaktyka/slady_uv-vis.pdf,
- [11] - <http://www.tribologia.org/ptt/try/tr02.htm>,
- [12] - http://www.szkolnictwo.pl/test,4,5539,15,Wi%C4%85zania_chemiczne_w_%C5%9Bwietle_mechaniki_kwantowej-Typy_orbitali_molekularnych,
- [13] - http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchs/index_pliki/Dokumenty/UV.pdf,
- [14] - <http://www2.chemia.uj.edu.pl/chemanalityczna/dydaktyka/nanotech/%C4%86wiczenie%20labor%20nr%203.pdf>,
- [15] - http://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4236431/9Absorpcyjna_Spektrofotometria_czasteczkowa.pdf,
- [16] - http://pl.wikibooks.org/wiki/Chemia_organiczna/Podstawy_teoretyczne_chemii_organicznej/Budowa_atomu,
- [17] - <http://pl.wikipedia.org/wiki/Monochromator>,
- [18] - <http://www.polymer-carbon.ch.pwr.wroc.pl/instrukcje/UUVIS.pdf>,
- [19] - <http://www.filoma.org/video/fpx128/>,
- [20] - <http://bioenergy.asu.edu/photosyn/education/photointro.html>,
- [21] - <https://gaussling.wordpress.com/2006/10/30/uvvis-spectrum-of-bromine-in-water/>,
- [22] - http://pl.wikipedia.org/wiki/B%C5%82%C4%99kit_metylenowy,
- [23] – Instruction Manual VIS723G Spectrophotometer