

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Obsah kapitoly

Teorie, základní pojmy

UV spektra organických sloučenin

Zásady měření

UV spektra biologicky významných látek

Dvousložková a vícesložková analýza

Derivační spektrometrie

Automatizace spektrofotometrického měření - FIA

Teorie UV-VIS spektrometrie

Absorpce elektromagnetického záření

- změna energetického stavu molekuly
 - změna elektronového stavu
(obsazenost orbitalů): 150-600 kJ/mol
 - změna vibračního stavu: 2-60 kJ/mol
 - změna rotačního stavu: cca 3 kJ/mol
- vztah k vlnové délce absorbovaného záření

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

$$h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s (Planckova konstanta)}$$

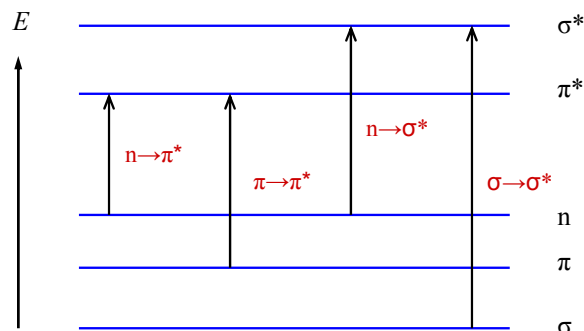
Spektrální oblasti

Označení	λ	Absorbující látky
Vzdálená ultrafialová oblast far UV (vakuová oblast)	<190 nm	nasyčené sloučeniny monoénové sloučeniny
Blízká ultrafialová oblast near UV	190-380 nm	polynenasycené a aromatické sloučeniny
Viditelná oblast VIS	380-780 nm	barevné látky

Komplementarita barev

λ (nm)	Barva absorbovaného světla	Barva absorbující látky
400-435	fialová	žlutozelená
435-480	modrá	žlutá
480-490	zelenomodrá	oranžová
490-500	modrozelená	červenooranžová
500-560	zelená	purpurová
560-580	zelenožlutá	fialová
580-595	žlutooranžová	modrá
595-620	červenooranžová	zelenomodrá
620-760	červená	modrozelená

Energetické změny při elektronových přechodech



Pravděpodobnost přechodu ovlivňuje absorpční koeficient

- souvislost se spinovým stavem excitovaného elektronu:

- 1) přechod S_0 (základní singlet) $\rightarrow S_1$ (vyšší singlet) je spinově dovolený
 $\Rightarrow \epsilon_{\max} \approx 10^3 - 10^5 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- 2) přechod $S_0 \rightarrow T_1$ (triplet) je spinově zakázaný
 $\Rightarrow \epsilon_{\max} \approx 10^0 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Základní pojmy

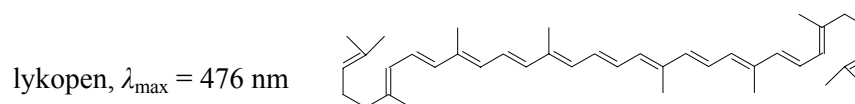
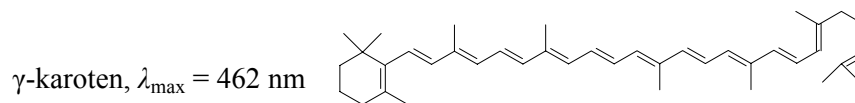
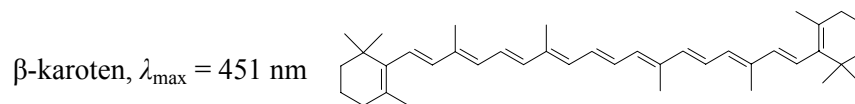
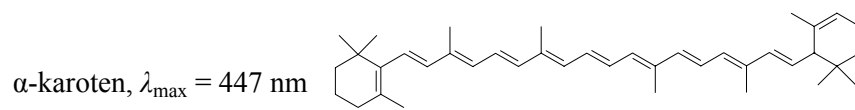
- **chromogen** = absorbující látka
- **chromofor** = skupina (seskupení atomů v molekule), která způsobuje absorpci v UV-VIS oblasti
- **auxochrom** = substituent nebo skupina atomů s volným elektronovým párem (např. $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$); v konjugaci s π -elektronovým chromoforem obvykle vyvolává posun λ_{\max} k delším vlnovým délkám
- **bathochromní posun** (červený posun) = posun λ_{\max} k delším vlnovým délkám vyvolaný chemickou modifikací molekuly nebo vlivem rozpouštědla
- **hypsochromní posun** (modrý posun) = posun λ_{\max} ke kratším vlnovým délkám
- **hypochromní efekt** = snížení ϵ_{\max}
- **hyperchromní efekt** = zvýšení ϵ_{\max}

Chromofory a odpovídající přechody

Chromofor, příklad sloučeniny	Přechod	λ_{\max} (nm)
H ₂ O	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	183
C-C a C-H, CH ₄	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	cca 170, 173
C-X, CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , CH ₃ I	$n \rightarrow \sigma^*$	180-260, 187, 215, 258
C=C, H ₂ C=CH ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	160-190, 162
H ₂ C=CH-CH=CH ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	217
C=O, H-CH=O	$n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$	270, 170-200, 270, 185
H ₂ C=CH-CH=O	$n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$	328, 208
C=N	$n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$	190, 300
N=N	$n \rightarrow \pi^*$	340
C=S	$n \rightarrow \pi^*$	500
NO ₂	$n \rightarrow \pi^*$	420-450
N=O	$n \rightarrow \pi^*$	630-700

Konjugované polyeny

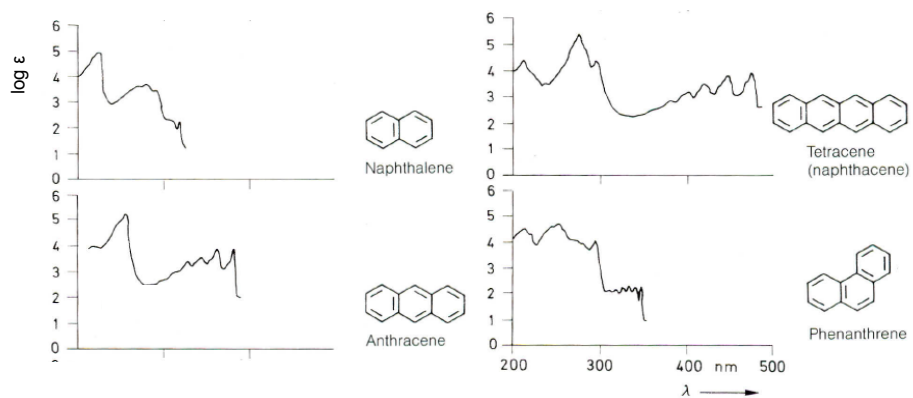
n	H-(CH=CH) _n -H		CH ₃ -(CH=CH) _n -CH ₃	
	λ_{\max} (nm)	log ϵ	λ_{\max} (nm)	log ϵ
2	217	4,3	223	4,4
3	268	4,7	275	4,5
4	304	?	310	4,9
5	334	5,1	341	5,1



Benzoidní aromatické sloučeniny

Sloučenina	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$
Benzen	204	3,9	254	2,0	-	-
Toluen	207	3,8	261	2,4	-	-
Brombenzen	210	3,9	261	2,3	-	-
Fenol	211	3,8	270	3,2	-	-
Benzaldehyd	250	4,1	280	3,0	320	1,7
Acetofenon	246	4,0	280	3,0	320	1,7
Kys. benzoová	230	4,1	273	3,0	-	-
Anilin	230	3,9	280	3,5	-	-
Styren	247	4,0	281	2,0	-	-
Skořicový aldehyd	285	4,4	-	-	-	-
Kys. skořicová	273	4,3	-	-	-	-
Bifényl	248	4,2	-	-	-	-

Spektra kondenzovaných aromatických uhlovodíků



Pětičlenné heterocykly

Sloučenina	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$
Furan	200	4,0	-	-
Furfural	227	3,3	272	4,1
2-Acetylfuran	225	3,4	269	4,1
Pyrrol	210	4,2	240	2,5
2-Acetylpyrrol	250	3,6	287	4,2
Thiofen	-	-	235	3,7
2-Acetylthiofen	260	3,9	285	3,7
Thiazol	-	-	240	3,6

Šestičlenné heterocykly

Sloučenina	λ_{\max} (nm)	$\log \varepsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \varepsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \varepsilon$
Pyridin	195	-	250	3,3	-	-
2-Pikolin	-	-	262	3,4	-	-
Pyrazin	-	-	260	3,7	-	-
Chinolin	227	4,6	275	3,7	313	3,4
Isochinolin	218	4,9	262	3,6	317	3,5
Pyrimidin	-	-	-	-	343	3,3
Indol	225	4,7	270	3,8	-	-

Zásady spektrometrického měření

- výběr kyvety
 - křemenné – pro UV oblast
 - skleněné – pro VIS
 - b 0,1-5 cm \Rightarrow optimální rozsah A 0,1-2
- výběr rozpouštědla
- záznam spektra
 - rychlost skenu \uparrow \Rightarrow horší opakovatelnost
 - spektrální interval
 - užší (0,2-0,5 nm) \Rightarrow vysoké rozlišení, horší opakovatelnost
 - širší (1,5-4 nm) \Rightarrow malé rozlišení, lepší opakovatelnost měření absorbance – vhodné pro široké absorpční pásy (VIS oblast)
- ředění vzorku – jen pro stabilní absorbující látky

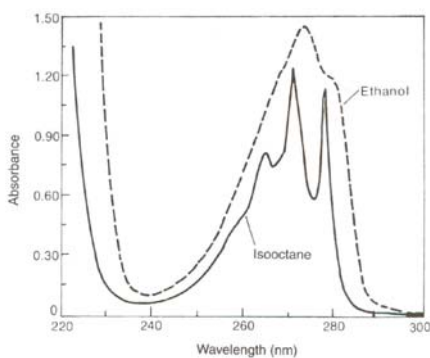
Rozpouštědla pro UV spektrometrii

Rozpouštědlo	Spodní mez λ (nm)	Rozpouštědlo	Spodní mez λ (nm)
acetonitril, voda	190	chloroform	240
isooktan, cyklohexan	195	ethylacetát	260
hexan	201	dimethylformamid	270
methanol, ethanol	205	octová kys.	270
1,4-dioxan	215	benzen	280
diethylether	220	toluen	285
glycerol	230	pyridin	300
dichlormethan	233	aceton	330

Vliv rozpouštědla na absorpční spektrum

V různých rozpouštědlech se mírně liší:

- hodnoty λ_{\max} , ε
- tvar spektra (interakce rozpouštědlo-analyt)



Spektrum fenolu
změřené v ethanolovém
a isooktanovém roztoku

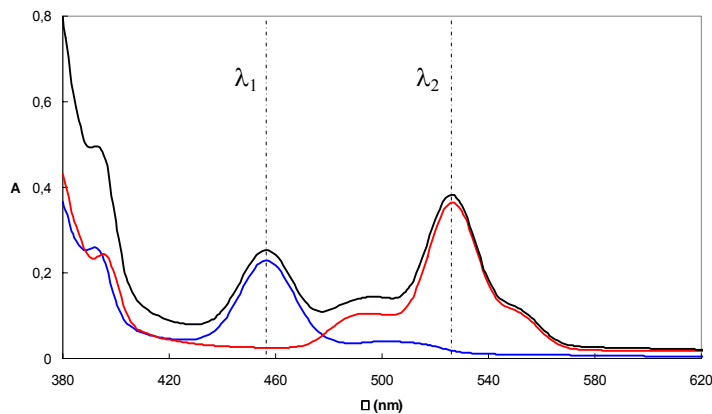
Biologicky významné látky

Látka	λ_{\max} (nm)	ε (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
NAD, NADP	260	15 000
NADH, NADPH	260	15 000
	340	6 200
FMN, FAD	260	15 000
	375	10 000 (FMN) 9 000 (FAD)
	445	12 500 (FMN)
	450	11 000 (FAD)
pyridoxal	250	3 000
	320	6 000

Další biologicky významné látky

Látka	λ_{\max} (nm)	ε (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
cholesterol	235	20 000
kalciferoly	265	18 300
β -karoten	450	120 000
retinol	330	45 000
<i>trans,trans</i> -9,12- oktadecenová kys.	231	35 000
adenosin	267	12 300
guanosin	248	11 000
cytidin	271	9 100
thymidin	267	9 650
uridin	262	8 500

Analýza dvou složek vedle sebe



Aditivita absorbance:

$$A_{\lambda_1} = b \cdot (\epsilon_{A\lambda_1} \cdot c_A + \epsilon_{B\lambda_1} \cdot c_B)$$

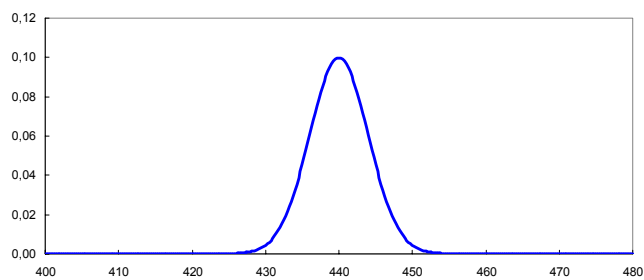
$$A_{\lambda_2} = b \cdot (\epsilon_{A\lambda_2} \cdot c_A + \epsilon_{B\lambda_2} \cdot c_B)$$

\Rightarrow

$$c_A = \frac{A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} \cdot \epsilon_{B\lambda_1} / \epsilon_{B\lambda_2}}{b \cdot (\epsilon_{A\lambda_1} - \epsilon_{A\lambda_2} \cdot \epsilon_{B\lambda_1} / \epsilon_{B\lambda_2})}$$

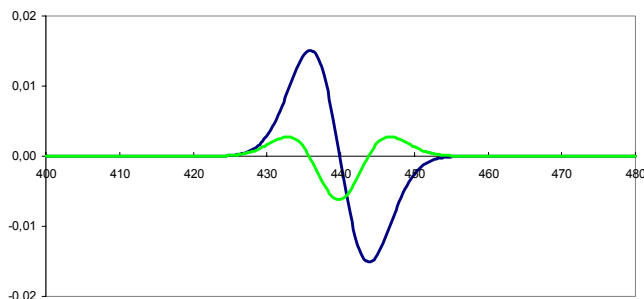
$$c_B = \frac{A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} \cdot \epsilon_{A\lambda_2} / \epsilon_{A\lambda_1}}{b \cdot (\epsilon_{B\lambda_2} - \epsilon_{B\lambda_1} \cdot \epsilon_{A\lambda_2} / \epsilon_{A\lambda_1})}$$

Derivační spektrometrie



Původní spektrum

A vs. λ



1. derivace

$dA/d\lambda$ vs. λ

2. derivace

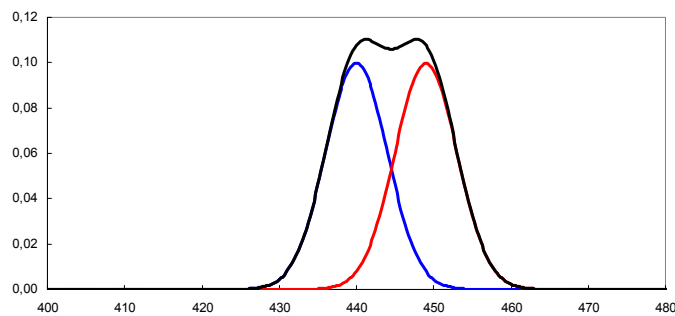
$d^2A/d\lambda^2$ vs. λ

$$T = \Phi / \Phi_0$$

$$A = -\log_{10} T = -2,303 \cdot \ln T = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

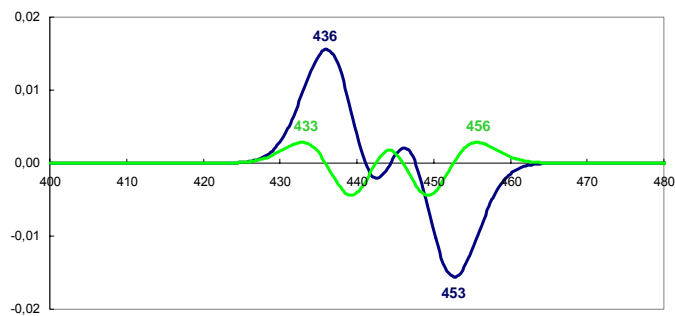
$$dA/d\lambda = -2,303 \cdot (1/T) \cdot dT/d\lambda = b \cdot c \cdot d\varepsilon/d\lambda$$

⇒ první (i druhá) derivace absorbance
je rovněž přímo úměrná koncentraci absorbující látky



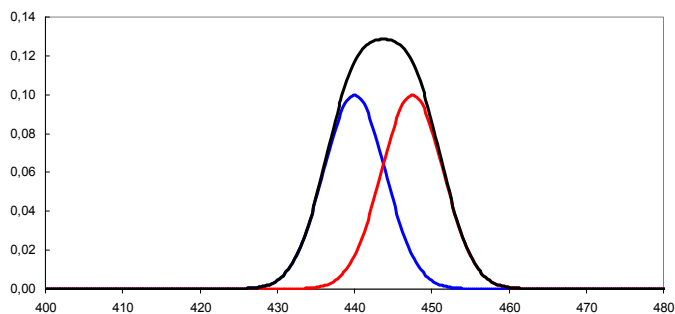
Dvě složky
šířka pásů: 20 nm
shodná výška pásů
 $\Delta\lambda_{\max} = 9 \text{ nm}$

původní spektrum
A vs. λ



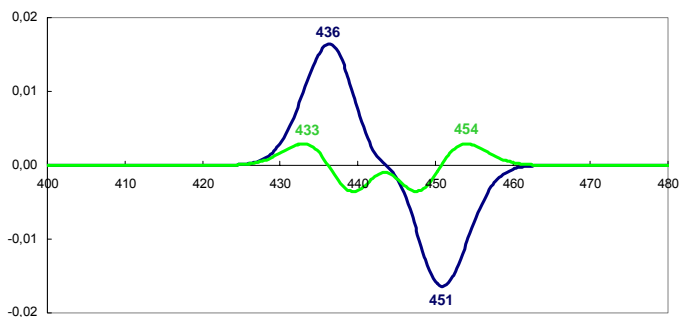
první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ

druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ



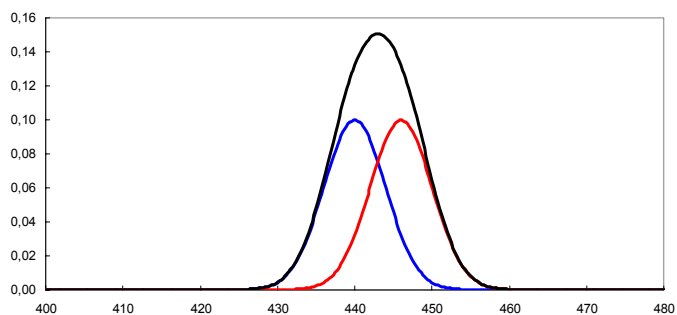
Dvě složky
šířka pásů: 20 nm
shodná výška pásů
 $\Delta\lambda_{\max} = 7,5$ nm

původní spektrum
 A vs. λ



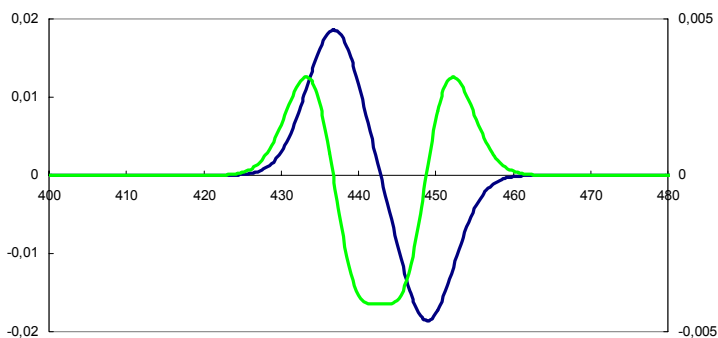
první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ

druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ



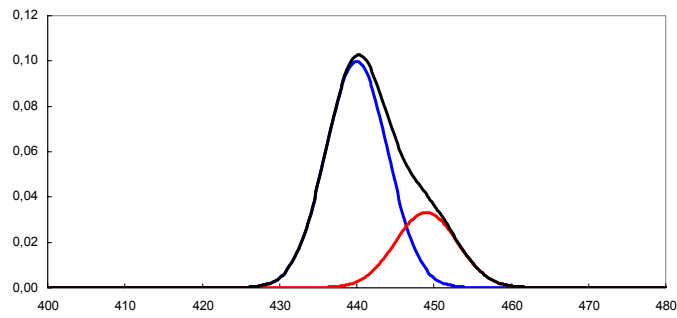
Dvě složky
šířka pásů: 20 nm
shodná výška pásů
 $\Delta\lambda_{\max} = 6$ nm

původní spektrum
 A vs. λ

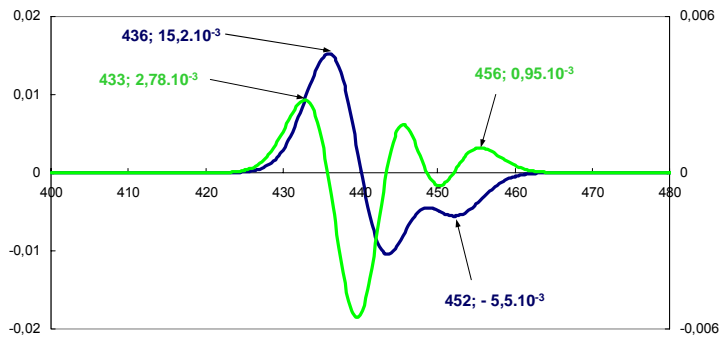


první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ

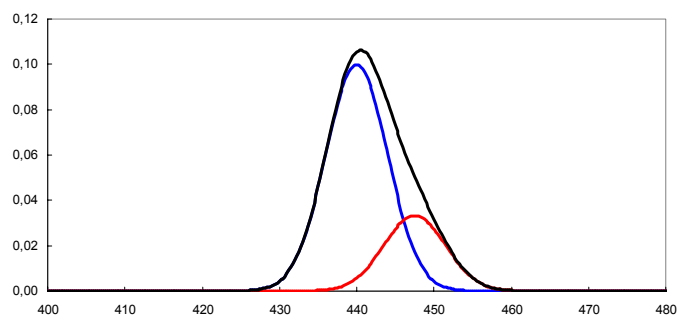
druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ



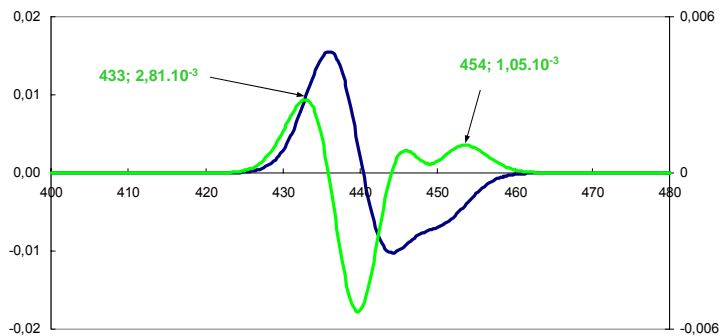
Dvě složky
 šířka pásů: 20 nm
 $\Delta\lambda_{\max} = \Delta\lambda_{\max} / 3$
 $\Delta\lambda_{\max} = 9 \text{ nm}$
 původní spektrum
 A vs. λ



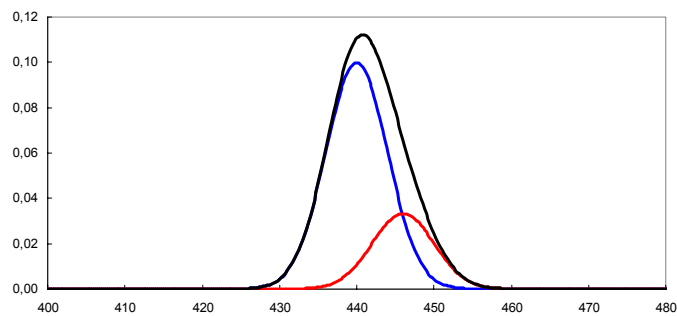
první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ
 druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ



Dvě složky
 šířka pásů: 20 nm
 $\Delta\lambda_{\max} = \Delta\lambda_{\max} / 3$
 $\Delta\lambda_{\max} = 7,5 \text{ nm}$
 původní spektrum
 A vs. λ

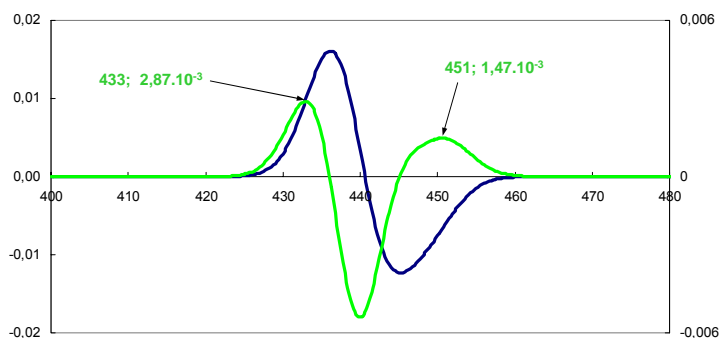


první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ
 druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ



Dvě složky
 šířka pásů: 20 nm
 $\Delta\lambda_{\max} = \Delta\lambda_{\max} / 3$
 $\Delta\lambda_{\max} = 6 \text{ nm}$

původní spektrum
 A vs. λ



první derivace
 $dA/d\lambda$ vs. λ

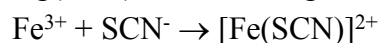
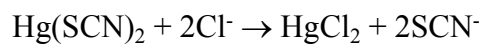
druhá derivace
 $d^2A/d\lambda^2$ vs. λ

Průtoková analýza - FIA

- FIA = *flow injection analysis*
- alternativa k běžnému vsádkovému provedení reakce (vzorek + činidlo v nádobě)
- průtokové uspořádání přípravy vzorku, reakce analytu s činidlem a měření – jednotlivé operace probíhají v toku činidla nebo nosného roztoku, do něhož je injektován vzorek
- efektivní způsob automatizace spektrometrické analýzy (UV-VIS spektrofotometrie, AAS, AES...)

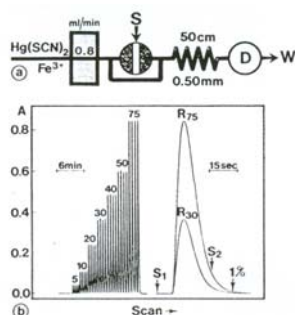
Příklad použití FIA

Spektrofotometrické stanovení chloridů



měření rhodanátového komplexu železa ($\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$)

FIA uspořádání:



peristaltické čerpadlo pumpuje kontinuálně činidlo

nástřik 30 μl vzorku každých 38 s
kapilára stočená do spirály zajišťuje promíchání

detektor: fotometr s mikrocelou (10 μl)

kalibrace 5-75 mg/l

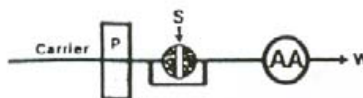
analýza 100 vzorků za hodinu

Instrumentace pro FIA

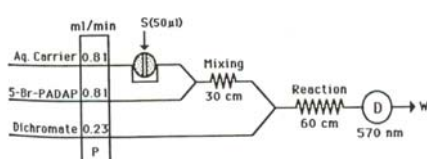
- zařízení pro odběr vzorků
- peristaltické čerpadlo (hadičky s průměrem 0,25-4 mm, průtok 0,0005-40 ml/min)
- PTFE kapiláry a spojky
- nízkotlaký injektor (smayčka 5-500 μl)
- pomocná zařízení
mikrokolony, filtry, ventily, termostat
- detektor

Některá uspořádání analyzátorů na principu FIA

- dávkování do toku diluentu
(využití v AAS, ICP pro analýzu koncentrovaných vzorků)



- dávkování vzorku do toku činidla, detekce
- dávkování vzorku do toku diluentu, spojení s tokem činidla, detekce
příklad: generování hydridů As, Se, Sb, Te, Sn... v AAS, ICP
- dávkování do toku diluentu, spojení postupně s toky dvou činidel



stanovení SCN^- :
 tvorba barevného produktu analytu
 s činidlem 5-Br-PADAP
 (2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-
 diethylaminofenol)
 za přít. ox. činidla ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

- technika „stopped flow“

Další možnosti využití FIA

- prekoncentrace analytu (sorpce a eluce, koprecipitace a rozpouštění, převedení na těkavou sloučeninu...)
- detekce nestabilních reakčních produktů přesným časováním měření