

Лекція 2.2

Спектральні методи

План

1. Фотоелектрокалориметрія
2. Ультрафіолетова спектрофотометрія
3. Інфрачервона спектрофотометрія

1. Фотоелектрокалориметрія

Фотоелектрокалориметричні методи дають можливість виміряти інтенсивність поглинання світла за допомогою спеціальних приладів – фотоелектрокалориметрів (ФЕК) або спектрофотометрів (СФ). Аналітичні лабораторії обладнані фотоелектрокалориметрами різних типів: ФЕК-56-2, ФЕК-Н-57, КФК-2, КФК-3 тощо. Усі ці прилади складаються з освітлювача, світлофільтрів, фотоелементів, системи регулювання опорів, мікроамперметра. У комплект входить набір спеціальних кювет.

Принцип вимірювання світло поглинання забарвлених розчинів за допомогою таких приладів полягає в тому, що потік світла, який проходить крізь кювету з розчином або розчинником, потрапляє на фотоелемент і перетворюється на електричну енергію, що вимірюється мікроамперметром.

Розглянемо принцип роботи фотоелектрокалориметра на прикладі одного із сучасних приладів — КФК-2 (калориметр фотоелектричний концентраційний). Він призначений для вимірювання коефіцієнтів пропускання і оптичної густини рідких розчинів у діапазонах довжин хвиль від 315 до 980 нм та визначення на підставі цих даних концентрації речовин у розчинах (рис. 1).

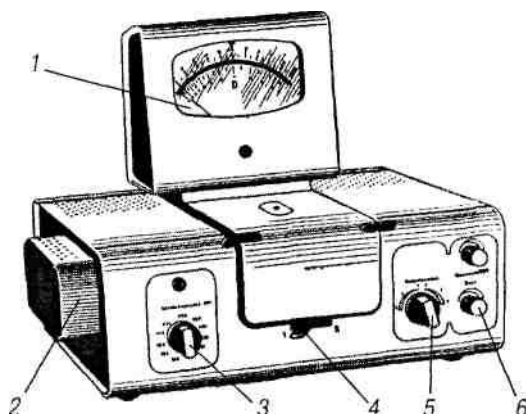


Рис. 1 Фотоелектроколориметр КФК-2

Оптичну схему фотоелектроколориметра КФК-2 наведено на рис. 2.

Пучок світла від лампи 1 проходить крізь конденсор 2, діафрагму 3, об'єктиви 4,5 і світлофільтри 6,7,8.

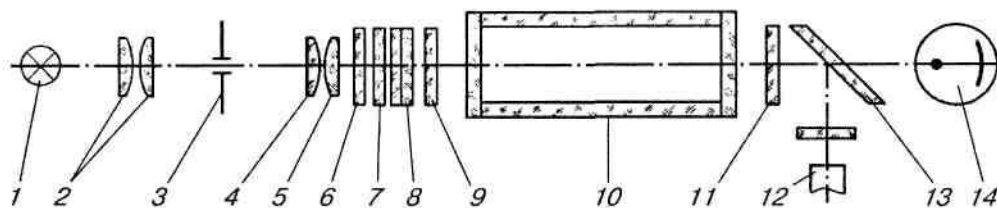


Рис. 2 Оптична схема фотоелектроколориметра КФК-2

Кювету 10 з досліджуваним розчином вводять у світловий потік між захисними стеклами 9,11. Пластина 13 розділяє світловий потік на два потоки: один потрапляє на фотодіод 12, другий — на фотоелемент 14.

Фотоприймачі працюють у різних ділянках спектра: фотоелемент у ділянці 315—540 нм; фотодіод — у ділянці 590—980 нм. Підключення фотоприймачів здійснюється перемикачем, який має шість положень. У перших трьох положеннях (1—3), позначених чорним кольором, працює фотоелемент, у трьох інших (7—3), позначених червоним кольором, — фотодіод. Струм фотоприймача підсилюється і подається на вимірювальний прилад (мікроампер-метр), що фіксує струм, сила якого пропорційна інтенсивності світлового потоку, що проходить крізь досліджуваний розчин.

Визначення концентрації речовин у розчині

Визначення концентрації речовини в розчині слід проводити в такій послідовності:

- вибір світлофільтра;
- вибір кювети;
- побудова калібрувального графіка для даної речовини;
- вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину та визначення концентрації речовини в розчині.

Вибір світлофільтра. Наявність у колориметрі вузла світлофільтрів і набору кювет дає змогу підібрати таку їх комбінацію, за якої похибка у визначенні концентрації буде найменшою.

Вибір світлофільтрів проводять так. У кювету наливають розчин і визначають його оптичну густину при всіх наявних світлофільтрах. За одержаними даними будують криву залежності оптичної густини розчину (вісь ординат) від довжини хвилі (вісь абсцис), що відповідає максимуму коефіцієнта пропускання світлофільтрів, і відмічають ділянку кривої, де оптична густина має максимальне значення. Світлофільтр для роботи вибирають такий, щоб довжина хвилі, яка відповідає максимуму його коефіцієнта пропускання, припадала на відмічену ділянку спектральної кривої досліджуваного розчину.

Вибір кювети. Відносна похибка визначення концентрації речовини в розчині залежить від того, на якій ділянці шкали колориметра виконують роботу. Вона є найменшою, коли значення оптичної густини розчину дорівнює $\sim 0,4$. Тому під час роботи на колориметрі рекомендується шляхом відповідного вибору кювет працювати поблизу цього значення оптичної густини.

Попередній вибір кювет проводять візуально, відповідно до інтенсивності забарвлення розчину. Якщо розчин інтенсивно забарвлений, слід користуватися кюветами з малою робочою довжиною і навпаки.

У заздалегідь підібрану кювету наливають розчин і вимірюють його оптичну густину. Значення оптичної густини розчину має становити 0,3—0,5, у разі одержання інших значень беруть кювету з більшою робочою довжиною, якщо $D < 0,3$, і з меншою, — якщо $D > 0,5$.

Побудова калібрувального графіка для даної речовини. Для побудови калібрувального графіка готують низку розчинів досліджуваної речовини з відомими концентраціями. Забарвлені стандартні розчини повинні бути виготовлені за тих самих умов, що й забарвлені розчини досліджуваної речовини. За допомогою фотоелектроколориметра вимірюють оптичну густину всіх розчинів і будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення молярної концентрації розчину, а на осі ординат — відповідні їм значення оптичної густини.

Калібрувальний графік будують окремо для кожної досліджуваної речовини. Слід зазначити, що навіть для забарвленого розчину тієї самої речовини, але приготовленого з іншим реактивом, значення оптичної густини може бути іншим, оскільки зміниться молярний коефіцієнт поглинання ϵ . У разі заміни кювети також потрібно будувати інший калібрувальний графік, оскільки оптична густина змінюється зі зміною товщини шару розчину l , крізь який проходить пучок світла.

Визначення концентрації речовини. Для визначення концентрації речовини готують її забарвлений розчин і вимірюють його оптичну густину. У деяких випадках, зокрема під час визначення вмісту амоніаку за допомогою реактиву Несслера, зазначають час, що минув від приготування забарвленого розчину до початку вимірювань. Потім за калібрувальним графіком знаходять концентрацію, що відповідає виміряному значенню оптичної густини. Іноді для визначення концентрації досліджуваної речовини користуються таблицею, яку складають за даними калібрувального графіка, або рівнянням калібрувального графіка.

Під час проведення несерійних аналізів концентрацію досліджуваної речовини можна визначити шляхом порівняння оптичних густин

стандартного й досліджуваного розчинів. З цією метою у дві колби вносять однакові об'єми зазначених розчинів. До них добавляють однакові кількості реагентів і вимірюють оптичну густину одержаних забарвлених розчинів. Під час вимірювання оптичної густини в обох випадках застосовують однаково приготовлені розчини порівняння ("нульові" розчини).

Вміст досліджуваної речовини в пробі обчислюють за формулою:

$$C_1 = \frac{D_1 C}{D}$$

де C і C_1 — вміст речовини в стандартному й досліджуваному розчинах, мг/см³; D і D_1 — оптична густина стандартного і досліджуваного розчинів.

Концентрацію речовини можна обчислити і за рівнянням калібрувального графіка, який пов'язує значення оптичної густини розчину D зі значенням її концентрації C рівнянням прямої лінії:

$$D = a + bC,$$

де a — оптична густина розчину за нульової концентрації досліджуваної речовини, b — кутовий коефіцієнт, який дорівнює $\operatorname{tg}\alpha$ (α — кут нахилу прямої). Коефіцієнти a і b розраховують методом найменших квадратів за експериментальними даними вимірювання оптичної густини розчинів. Після розрахунків параметрів a і b та їх інтервальних значень для визначення невідомої концентрації C виконують кілька вимірювань оптичної густини D обчислюють середнє значення оптичної густини D_i і за рівнянням:

$$C_1 = \frac{D_i - a}{b}$$

Визначають значення концентрації C .

2. Ультрафіолетова спектрофотометрія

Фотоелектроколориметричні виміри характеризуються значною похибкою ($\pm 5\%$) порівняно з об'ємними методами аналізу. Це пояснюється тим, що світлові потоки мають широку смугу спектра (40—80 нм) і не є монохроматичними. Для досягнення точніших результатів вимірювання світлопоглинання виконують на спектрофотометрах, у яких світловий потік, що проходить крізь кювету, має певну довжину хвилі. Розкладання білого світла на спектр у спектрофотометрах відбувається за допомогою призм або дифракційних ґраток. На кювету з розчином спрямовують крізь тонку щілину світлові промені з різною довжиною хвилі і підбирають таку її оптимальну довжину, що відповідає максимуму світлопоглинання. Це дає можливість аналізувати навіть суміші речовин, які мають максимуми поглинання при різних довжинах хвиль. Оптичну схему спектрофотометра наведено на рис. 3.

Розкладання білого світла на спектр у цьому приладі здійснюється за допомогою призм (або дифракційних ґраток). Обертаючи призму, на кювету з розчином спрямовують крізь щілину світлові промені з різною довжиною хвилі. Поглинання випромінювання досліджуваним розчином вимірюють при довжині хвилі максимуму вбирання.

В аналітичних лабораторіях застосовують такі спектрофотометри: СФ-26, СФ-42, СФ-46 та ін.

Розрахунок концентрацій речовин за даними спектрофотометричних вимірювань також виконують за допомогою калібрувальних графіків або на підставі закону Бугера—Ламберта—Бера, якщо відомі величини молярного чи питомого поглинання.

УФ-спектроскопія набула значного поширення і використовується для вивчення структури, якісного аналізу органічних речовин та їх кількісного визначення.

Спектроскопія у видимій та УФ-ділянках спектра є одним із важливих і доступних методів аналізу. Його широко застосовують для аналізу багатьох органічних речовин, барвників, лікарських препаратів, контролю за перебігом технологічних процесів, у медичних та біологічних дослідженнях.

Розчинники, які застосовують для спектрофотометричних визначень, мають певні межі пропускання, зумовлені власним поглинанням, наприклад, нижня межа пропускання води становить 200 нм, етанолу — 210 нм.

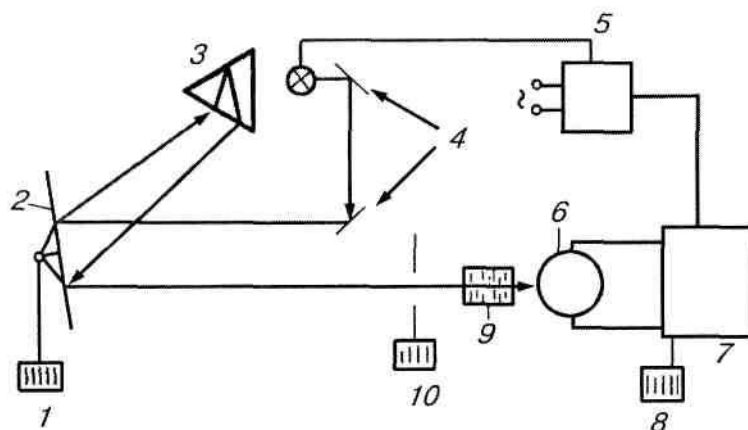


Рис. 3. Оптична схема УФ-спектрофотометра: 1 — ручка встановлення довжини хвилі; 2,4 — дзеркала; 3 — призма; 5 — стабілізатор; 6 — фотоелемент; 7 — підсилювач; 8 — ручка встановлення відлікового потенціометра; 9 — ґрата; 10 — ручка встановлення ширини щілини

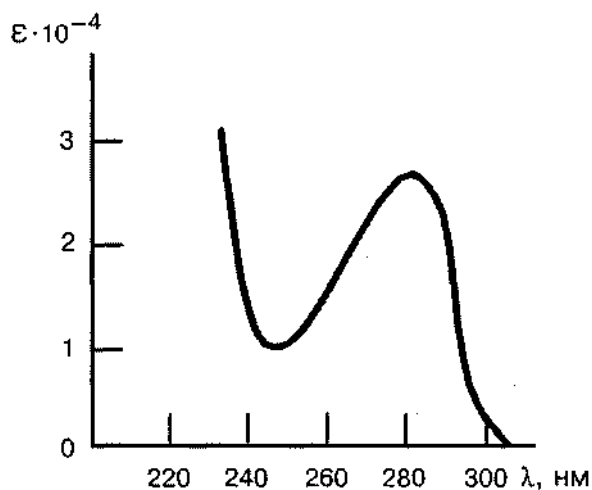


Рис. 4. Спектр поглинання триптофану в 0,1 розчині НСІ

Поглинання світла в УФ-ділянці спектра зумовлене змінами електронного стану молекул, тому спектри вбирання у видимій та ультрафіолетовій ділянці називають *електронними*. Вони характерні для певних класів органічних речовин, оскільки поглинання УФ-ви-промінювання пов'язане з переходом валентних електронів одинарних і кратних зв'язків (σ - і π -електронів) та електронів неподілених пар гетероатомів — N, S, P (n-електронів). В органічних сполуках, що не містять π - і n-електронів, спостерігаються електронні переходи, для яких потрібна більша енергія, і тому вони знаходяться в межах вакуумного ультрафіолету.

Атоми або групу атомів, які здатні поглинати світло, називають *хромофорами*. Наприклад, до складу білків входять хромофорні групи, які поглинають випромінювання в УФ-ділянці спектра. Це пептидний зв'язок і ароматичні цикли амінокислот. Амідна група пептидного зв'язку характеризується смугою поглинання в короткохвильовій ділянці з $\lambda_{max} \sim 190$ нм. Ця смуга дуже інтенсивна і молярний коефіцієнт поглинання її досягає значення $6950 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (у розрахунку на 1 моль амінокислотних залишків).

Ароматичні амінокислоти (триптофан, тирозин і фенілаланін) є основними хромофорами, що визначають поглинання білків при довжині хвилі понад 220 нм. На рис. 4 наведено спектр поглинання триптофану в 0,1 М розчині хлоридної кислоти.

Отже, в спектрі поглинання білків є низка характерних ділянок, за допомогою яких можна визначити внесок різних хромофорів у поглинання, а також коефіцієнт молярної екстинкції. При цьому основний внесок у поглинання білків при $\lambda = 280$ нм роблять лише дві амінокислоти — триптофан і тирозин. Значення коефіцієнта молярної екстинкції ($\epsilon_{280} = 87,7 \cdot 10^3$) є зручним параметром для попередньої оцінки концентрації невідомого білка в розчині.

3. Інфрачервона спектроскопія

ІЧ-спектроскопію широко використовують для ідентифікації, встановлення будови та кількісного визначення речовин, оскільки ІЧ-спектри мають багато смуг поглинання, які характеризують кожний тип зв'язку або функціональну групу. Метод ґрунтується на вивченні коливальних та обертальних спектрів поглинання в ІЧ-ділянці спектра. Виникнення спектра поглинання в ІЧ-ділянці ($4000\text{—}600\text{ см}^{-1}$, $\lambda = 2,5\text{—}16,7\text{ мкм}$) пов'язане з коливанням атомів у молекулі, тобто ІЧ-спектри зумовлені переходами між двома коливальними рівнями молекули.

У спектрах цього типу виявляються коливання, що супроводжуються зміною дипольного моменту молекули. Наприклад, в ІЧ-спектрі бензолу виявляється сім різних коливань.

Експериментальні дослідження значної кількості речовин, молекули яких містять однакові хімічні групи, показали, що вони поглинають ІЧ-промені у вузькому інтервалі частот. Такі частоти називають *характеристичними*, або *груповими*, наприклад O—H, N—H, C=O, C=C, CH, CH₂, CH₃ тощо. Зокрема, характеристичними є коливання груп, що містять легкий атом Гідрогену або кратні зв'язки (рис. 5). Групи, що складаються з атомів, близьких за масою, або містять хімічні зв'язки, що мають однакові силові коефіцієнти, не містять характеристичних смуг поглинання в ІЧ-ділянці спектра.

Коливання, за яких змінюється довжина хімічних зв'язків, називають *валентними* і позначають літерою ν . Якщо під дією ІЧ-випромінювання змінюються кути між зв'язками, такі коливання називають *деформаційними* і позначають δ . Отже, кожна хімічна сполука має свій характерний спектр поглинання в ІЧ-ділянці спектра.

Для прикладу наведемо ІЧ-спектр 2-метил-4-хлорфенолу, який має кілька смуг поглинання різної інтенсивності (рис. 6).

За допомогою таблиць характеристичних частот, що наводяться в довідниках, можна встановити, які функціональні групи відповідають цим смугам, тобто зробити віднесення. Це є основою ідентифікації речовин методом ІЧ-спектрофотометрії.

Наприклад, віднесення смуг в ІЧ-спектрі 2-метил-4-хлорфенолу виглядає так: $\nu_{\text{O-H}}$ 3360 см^{-1} ; $1400, 1200 \text{ см}^{-1}$ — коливання С—О фенолу; $1600, 1498 \text{ см}^{-1}$ — коливання бензольного циклу; $870, 808 \text{ см}^{-1}$ — $\delta_{\text{C-H}}$ бензольного циклу; 760 см^{-1} — $\nu_{\text{C-Cl}}$.

Експериментально ІЧ-спектри речовин у різних агрегатних станах вивчають за допомогою приладів, які називають ІЧ-спектрофотометрами. Найбільшого поширення набули ІЧ-спектрофотометри ИКС-22, ИКС-24, ИКС-29, UR-20 та ін. Останнім часом з'явилися прилади, які можуть вимірювати поглинання світла як в УФ-, так і в ІЧ-ділянках спектра. Вони обладнані комп'ютером, який дає змогу автоматично обробляти спектральні дані. Зазначимо, що оптичну частину цих приладів (призми, лінзи, кювети) виготовляють зі спеціальних оптичних матеріалів, які пропускають інфрачервоні промені (скло, кварц, NaCl, KBr, LiF, CaF₂).

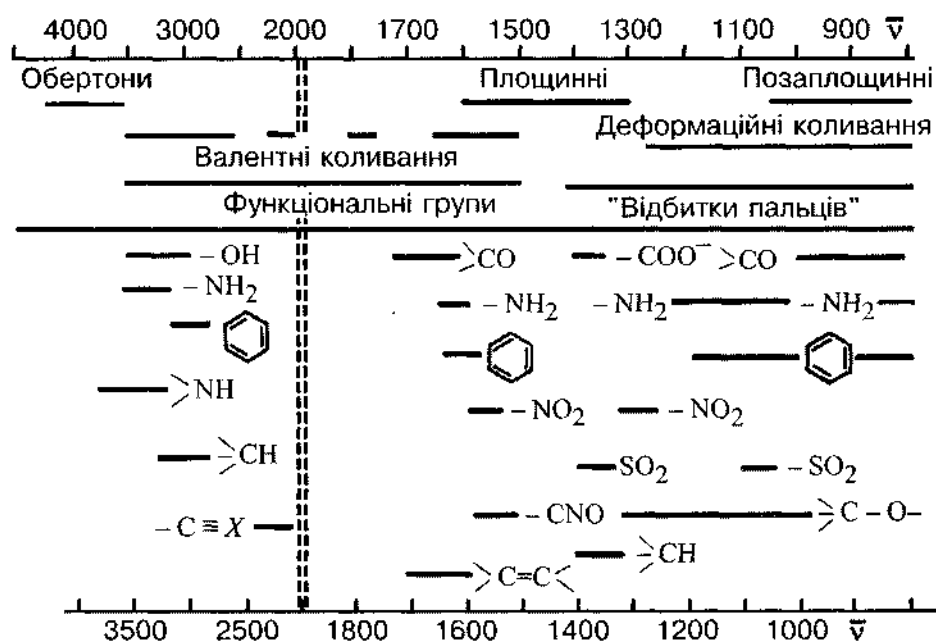


Рис.5. Ділянки коливань в ІЧ-спектрі.

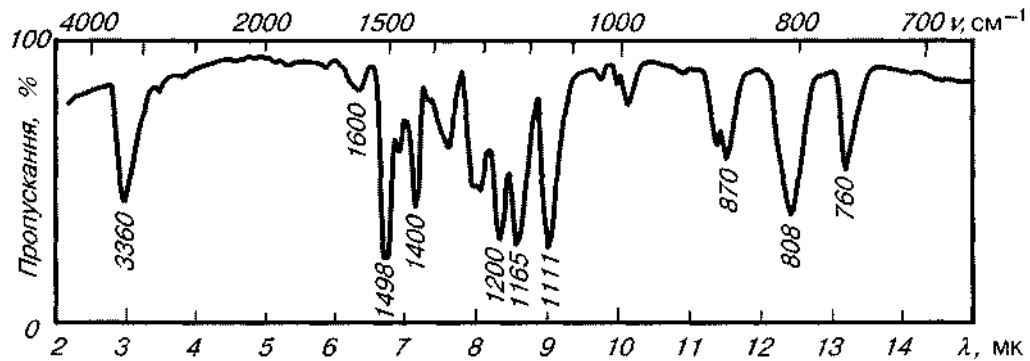


Рис.6. ІЧ-спектр поглинання 2-метил-4-хлорфенолу

Джерелом ІЧ-випромінювання є пресовані стрижні з тонкоподрібненої суміші оксидів цирконію, торію, церію (штифти Нернста) і стрижні (глобари) з карбіду силіцію. Випромінювання, що пройшло крізь досліджуваний зразок, потрапляє на термоелемент, який генерує струм. Він підсилюється і реєструється у вигляді спектрограми.

Так, на рис. 5 наведені ділянки поглинання окремих функціональних груп і структурних елементів молекул органічних сполук.

Інтенсивність поглинання смуги в максимумі, як і в УФ-спектрах, підпорядковується закону Бугера і характеризується молярним коефіцієнтом поглинання ϵ . За цими даними можна ідентифікувати хімічну сполуку та визначити її вміст у досліджуваному зразку.