

**Przygotowanie próbek biologicznych do analizy.
Badanie preparatów farmaceutycznych oraz tkanek i płynów fizjologicznych,
laboratorium**

Spektrofotometria UV-Vis

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Spektrofotometria

Spektrofotometria w zakresie nadfioletu (UV) i promieniowania widzialnego (Vis) jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych w analizie chemicznej. Zjawisko pochłaniania energii promieniowania elektromagnetycznego przez materię (absorpcja) znalazło szerokie zastosowanie zarówno w badaniach struktury cząsteczek, jak też w jakościowej i ilościowej analizie chemicznej. Promieniowanie elektromagnetyczne można zdefiniować jako postać energii występującą w formie fal, czyli rozchodzących się z prędkością 3×10^8 km/s periodycznych zmian pola elektrycznego i magnetycznego. Falowy charakter promieniowania elektromagnetycznego określają liczbowo następujące wielkości:

- długość fali [nm, m],

- częstość drgań [Hz; 1 Hz = 1 cykl/s]

Promieniowanie elektromagnetyczne poza charakterem falowym przejawia także charakter korpuskularny, a więc wiązkę promieniowania można określić też jako zbiór kwantów (porcji) energii biegnących w kierunku rozchodzenia się promieniowania. Energia E pojedynczego kwantu (fotonu) promieniowania określona przez Plancka, wiąże się z podanymi uprzednio wielkościami charakteryzującymi falę elektromagnetyczną równaniem:

$$E = h \times \nu = h \times c / \lambda$$

gdzie:

h – stała Plancka ($6,62 \times 10^{-34}$ J \times s)

c – prędkość światła (3×10^8 km/s)

Z zależności powyższej wynika, że energia promieniowania elektromagnetycznego jest wprost proporcjonalna do częstości drgań, a odwrotnie do długości fali. Energia jaką niesie ze sobą promieniowanie elektromagnetyczne z tego zakresu (UV-Vis) powoduje zmiany elektronowe w cząsteczkach, zwane przejściami elektronowymi, które to z kolei przejścia powodują zaabsorbowanie określonej ilości energii. Istnieją pewne reguły określające prawdopodobieństwo przejścia elektronu z jednego do innego stanu elektronowego. Noszą one nazwę reguł wyboru:

1. Aby nastąpiła absorpcja promieniowania muszą istnieć takie dwa stany kwantowe cząsteczki Ψ_m i Ψ_n , których różnica energii odpowiada energii h promieniowania padającego;

$$E_n - E_m = h \times \nu_{n,m} = \Delta E$$

2. Absorpcja promieniowania musi być związana ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki - μ

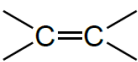
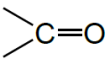
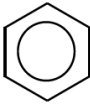
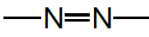
Rozróżniamy następujące rodzaje przejść elektronowych w związkach organicznych:

<i>orbital</i>	<i>orbital</i>
δ wiążący	δ^* antywiązący
π wiążący	π^* antywiązący
n wiążący	δ^* antywiązący
n wiążący	π^* antywiązący

Wzbudzenie elektronowe ma miejsce wówczas, gdy w wyniku absorpcji promieniowania zachodzi przeniesienie elektronu z orbitalu o niższej energii na wolny orbital o energii wyższej. W kompleksach metali przejściowych mamy do czynienia z przejściami, w których uczestniczą elektrony d .

Chromofory

Specyficzne układy cząsteczek i wiązań mających zdolność pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UV-Vis noszą nazwę chromoforów. Poniżej przedstawiono typowe chromofory i odpowiadające im przejścia elektronowe.

chromofor	związek	rodzaj przejścia	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l/mol \times cm]
	etylen	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	13000
	aceton	$\pi \rightarrow \pi^*$	185	950
	benzen	$n \rightarrow \pi^*$	277	20
		$\pi \rightarrow \pi^*$	200	8000
	azometan	$n \rightarrow \pi^*$	347	1
			255	220

W związku z absorpcyjnymi właściwościami niektórych związków sformułowano szereg zależności pomiędzy ilością zaabsorbowanej energii a pewnymi cechami fizycznymi substancji. Są to:

Prawo Lamberta

Wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości b ulega osłabieniu, co można ująć równaniem:

$$I = I_0 e^{-kb}$$

gdzie:

I_0 – natężenie światła padającego

I – natężenie światła po przejściu przez ośrodek

b – grubość warstwy absorbującej

k – współczynnik absorpcji

Po zlogarytmowaniu:

$$\ln I_0/I = k \times b = A$$

czyli:

$$A = \log I_0/I \times a \times b$$

gdzie:

$$a = 0,4343k$$

A – absorbancja

Absorbancja jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, jeśli wiązka promieniowania monochromatycznego przechodzi przez jednorodny ośrodek absorbujący.

Inną wielkością określającą absorpcję promieniowania jest transmitancja:

$$T = I/I_0$$

$$A = \log 1/T$$

Prawo Lamberta-Beera

Prawo to dotyczy absorpcji promieniowania przez roztwory.

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 „b”.

$$A = \log I/I_0 = a \times b \times c$$

Prawo addytywności absorpcji

Absorbancja roztworu wieloskładnikowego równa się sumie absorbancji poszczególnych składników.

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

A_1, A_2, A_3, A_n – absorbancja poszczególnych składników

Jeżeli stężenie wyrazimy w *mol/l* to równanie ma postać:

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

ε - molowy współczynnik absorpcji

Budowa spektrofotometru

Urządzenia, które służą do pomiaru absorpcji nazywamy spektrofotometrami. Podstawowymi elementami składowymi spektrofotometru UV-Vis są:

1. źródło promieniowania

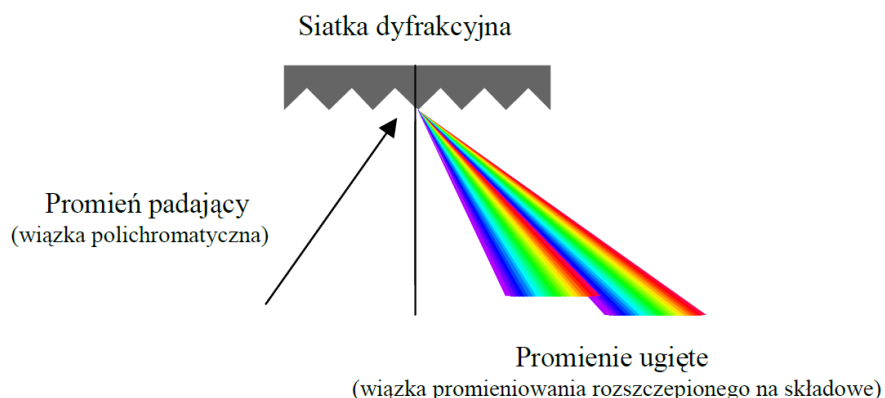
(lampy deuterowe 180 – 380 nm)

(lampy wolframowo-halogenowe pow. 380 nm)

(wysokociśnieniowe lampy ksenonowe – cały zakres)

2. monochromator

W chwili obecnej najczęściej wykorzystywanym elementem rozszczepiającym są siatki dyfrakcyjne. Dawniej do tego celu wykorzystywano pryzmaty.



3. Kuweta

Element pozwalający na umieszczenie komórki pomiarowej. Używa się do tego celu kuwet zbudowanych z kwarcu lub stopionej krzemionki.

4. Detektor

Zadaniem detektora jest pomiar natężenia promieniowania. Stosowane są detektory fotoelektryczne, które przetwarzają energię promieniowania elektromagnetycznego na energię elektryczną. Są to:

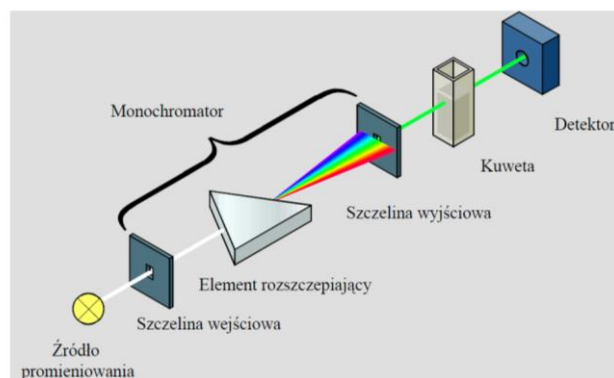
- fotokomórki
- fotopowielacze
- fotodiody

W fotodiodach stosuje się materiały półprzewodnikowe, w których pod wpływem absorpcji fotonów następuje wzbudzenie nośników ładunku (elektronów) z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa. Pod wpływem kwantu h powstają nośniki ładunku i płynie prąd proporcjonalny do liczby zaabsorbowanych fotonów.

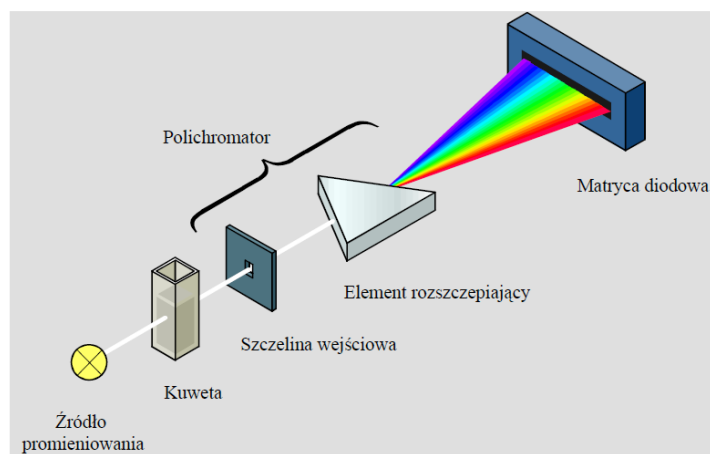
5. Rejestratory

Funkcję rejestratorów w nowoczesnych przyrządach pełnią komputery.

W praktyce coraz częściej zamiast klasycznych spektrofotometrów używa się spektrofotometrów z detekcją równoległą, czyli tzw. spektrofotometrów z matrycą diodową (DAD). Najistotniejszą różnicą pomiędzy klasycznym spektrofotometrem i spektrofotometrem typu DAD (diode-array) jest to, że w tym pierwszym monochromator znajduje się przed próbką i przez próbkę przepuszcza się sukcesywnie kolejne wiązki światła monochromatycznego, natomiast w przypadku stosowania matrycy diodowej przez próbkę przepuszcza się promieniowanie polichromatyczne a rozszczepienie wiązki następuje po przejściu przez próbkę. I tak promieniowanie obejmujące całe spektrum z zakresu UV-Vis pada w tym samym momencie na matrycę fotodiodową, co umożliwia detekcję wszystkich długości fal jednocześnie. Każda z fotodiod jest przeznaczona do pomiaru wąskiego zakresu promieniowania elektromagnetycznego (od 1 do kilku nm).



Schemat spektrofotometru klasycznego



Schemat spektrofotometru z matrycą diodową

Odczynniki

- aceton
- acetaldehyd
- 2-propanol
- 0,1 mol/l kwas benzoesowy w metanolu
- metanol
- woda dejonizowana

Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):

Kwas solny - C Produkt żrący R34, Xi Produkt drażniący R37

Kwas benzoesowy - R40

Izopropanol - F Produkt wysoce łatwopalny R11, Xi Produkt drażniący R36

R67

Aceton - F Produkt wysoce łatwopalny R11; Xi Produkt drażniący R36, R66, R67

Aldehyd octowy - F+ Produkt skrajnie łatwopalny R12, R40; Xi Produkt drażniący R36/37

- Pierwsza pomoc:

- w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
- w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
- w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
- w przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wypłukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

Aparatura

- spektrofotometr HP 8453
- kuweta kwarcowa (1 cm)
- kolby miarowe o pojemności 10 ml (4 szt.)
- mikropipety nastawne (200 μ l, 20 μ l)
- tryskawka

Przygotowanie roztworów

- a) 0,05 ml acetonu w 10 ml wody dejonizowanej
- b) 0,1 ml acetaldehydu w 10 ml wody dejonizowanej
- c) 0,05 ml 2-propanolu w 10 ml wody dejonizowanej
- d) 0,025 ml kwasu benzoowego w 10 ml wody dejonizowanej

Wykonanie ćwiczenia

1. Zarejestrować widma UV-Vis wody dejonizowanej, metanolu i przygotowanych roztworów.
2. Omówić różnice w zarejestrowanych widmach, uwzględniając strukturę cząsteczkową poszczególnych związków. Wskazać liczbę maksimum absorpcji dla każdego z badanych związków.
3. Wskazać, który z badanych związków jest najlepszym rozpuszczalnikiem do analiz metodą spektrofotometrii UV-Vis i wyjaśnić dlaczego.
4. Uzupełnić następujące zdania:
 - a) 2-propanol **wykazuje / nie wykazuje** zdolność do absorpcji promieniowania, ponieważ w swojej strukturze **zawiera / nie zawiera** wiązanie podwójne.
 - b) Aceton, acetaldehyd i kwas benzoowy **wykazują / nie wykazują** zdolność do absorpcji ponieważ swojej strukturze **zawierają / nie zawierają** wiązanie podwójne.
 - c) Aceton i acetaldehyd posiadają grupę jako chromofor.
 - d) Aceton posiada w otoczeniu grupy dwie grupy
 - e) Acetaldehyd posiada w otoczeniu grupy grupę i
 - f) Otoczenie grupy w strukturze acetonu i acetaldehydu wpływa na różnicę w na widmie.
 - g) Kwas benzoowy w swojej strukturze posiada i , co wpływa na obecność dwóch
 - h) Metanol absorbuje promieniowanie przy niskich / wysokich wartościach długości fali od do nm.
 - i) Woda **absorbuje / nie absorbuje** promieniowania w zakresie od do nm.
 - j) **Woda / metanol** jest najlepszym rozpuszczalnikiem do analiz metodą spektrofotometrii UV-Vis.