



## SPEKTROFOTOMETRYCZNE METODY ANALIZY SUBSTANCJI – SPEKTROFOTOMETRIA UV/VIS

Absorpcja (pochłanianie) promieniowania elektromagnetycznego polega na zmniejszeniu natężenia promieniowania przechodzącego przez daną substancję. Absorpcja ma najczęściej charakter selektywny, czyli zależy od długości fali światła przechodzącego przez daną substancję – stąd widma absorpcji są charakterystyczne dla danych substancji.

Długość fali światła widzialnego zawiera się w przedziale 400-800 nm. Fale krótsze, leżące w obszarze nadfioletu dzieli się na nadfiolet daleki (10-200 nm) oraz nadfiolet bliski (200-400 nm). Pasma absorpcyjne obserwuje się w nadfiolecie bliskim oraz świetle widzialnym (substancje absorbujące promieniowanie z zakresu widzialnego widzimy jako barwne).

Ugrupowania atomów z wielokrotnymi wiązaniami, stwarzającymi możliwość absorbowania światła nazywane są chromoforami. Do typowych chromoforów należą np.: grupa ketonowa, etylenowa, nitrowa, azowa, nitrozowa oraz grupy aromatyczne.

Ilościowy opis absorpcji energii przez substancje ujęty został w postaci matematycznej w prawach Lamberta oraz Beera.

Prawo Lamberta – absorpcja promieniowania monochromatycznego przez jednorodny układ absorbujący jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, przy czym względne zmniejszenie natężenia światła przechodzącego ( $I$ ) przez układ jest niezależne od natężenia światła padającego ( $I_0$ ).

Prawo Beera stwierdza, że absorbancja jest proporcjonalna do stężenia substancji absorbującej

Prawa te opisuje równanie:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \varepsilon c l$$

gdzie:  $\varepsilon$  - molowy współczynnik absorpcji [wielkość charakterystyczna dla danej substancji przy danej długości fali, wyrażana w  $\text{dm}^3/\text{mol cm}$ ],  $c$  – stężenie molowe [ $\text{mol}/\text{dm}^3$ ],  $l$  – droga optyczna [cm].

Przy zachowaniu stałej grubości warstwy absorbującej zależność absorbancji od stężenia ma charakter liniowy, jednak w przy wyższych stężeniach występuje odchylenie od prostoliniowości (dodatnie lub ujemne), spowodowane przemianami chemicznymi zachodzącymi w badanym roztworze.

W układzie zawierającym kilka składników absorbujących, absorbancja układu równa jest sumie absorbancji poszczególnych składników przy danej długości fali:

$$A = \sum_i A_i = (\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \dots) l$$

Podstawowymi elementami aparatury spektrofotometrycznej UV/Vis są: lampa emitująca promieniowanie (wodorowa, deuterowa, wolframowa, ksenonowa, rtęciowa); monochromator (siatka dyfrakcyjna, pryzmat); detektor (fotopowielacz, fotokomórka).

## **SPEKTROFOTOMETRYCZNA ANALIZA ILOŚCIOWA**

Oznaczanie pojedynczego składnika, selektywnie absorbującego światło o określonej długości fali prowadzi się przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji. Pomiary polegają na porównaniu natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę oraz próbkę odniesienia (np. rozpuszczalnik). Do oznaczeń można wykorzystywać również produkty powstające w wyniku reakcji chemicznych badanego związku z odpowiednim odczynnikiem (specyficzność i ilościowość reakcji, trwałość produktu). Zależność między wynikiem pomiaru, a zawartością oznaczanego składnika ustala się za pomocą próbek wzorcowych metodą krzywej kalibracyjnej lub metoda dodatku wzorca. Na podstawie pomiarów sporządza się wykres zależności mierzonej wielkości fizycznej od stężenia substancji, co umożliwia określenie stężenia substancji w badanej próbce.

Ćwiczenie praktyczne: oznaczanie stężenia tiaminy w suplementach diety metodą spektrofotometryczną. Analiza ilościowa metodą dodatku wzorca.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próbkę badanego suplementu diety rozpuścić w 10 ml wody dejonizowanej, mieszać energicznie przez kilka minut, następnie odwirować.
2. Uzyskany supernatant rozcieńczyć wodą 30x.
3. Do kuwety odmierzyć 3 ml rozcieńczonej próbki, zmierzyć absorbancję względem wody przy  $\lambda=290$  nm.
4. Do próbki w kuwecie dodać 25  $\mu$ l wzorca pirydoksyny o stężeniu 1 mg/ml, zawartość kuwety wymieszać i zmierzyć absorbancję.
5. Powyższą czynność powtórzyć jeszcze 3 razy.

Opracowanie wyników i dyskusja:

1. Wyniki pomiarów zestawić w tabeli oraz przedstawić w formie wykresu  $A=f(c)$ , gdzie  $c$  oznacza stężenie dodanego wzorca, przez punkty doświadczalne przeprowadzić prostą regresji i obliczyć stężenie białka w próbce.
2. Obliczyć błąd względny oznaczenia na podstawie rzeczywistej zawartości witaminy w preparacie (korzystając z danych producenta umieszczonych na opakowaniu) i przedyskutować poprawność otrzymanego wyniku.