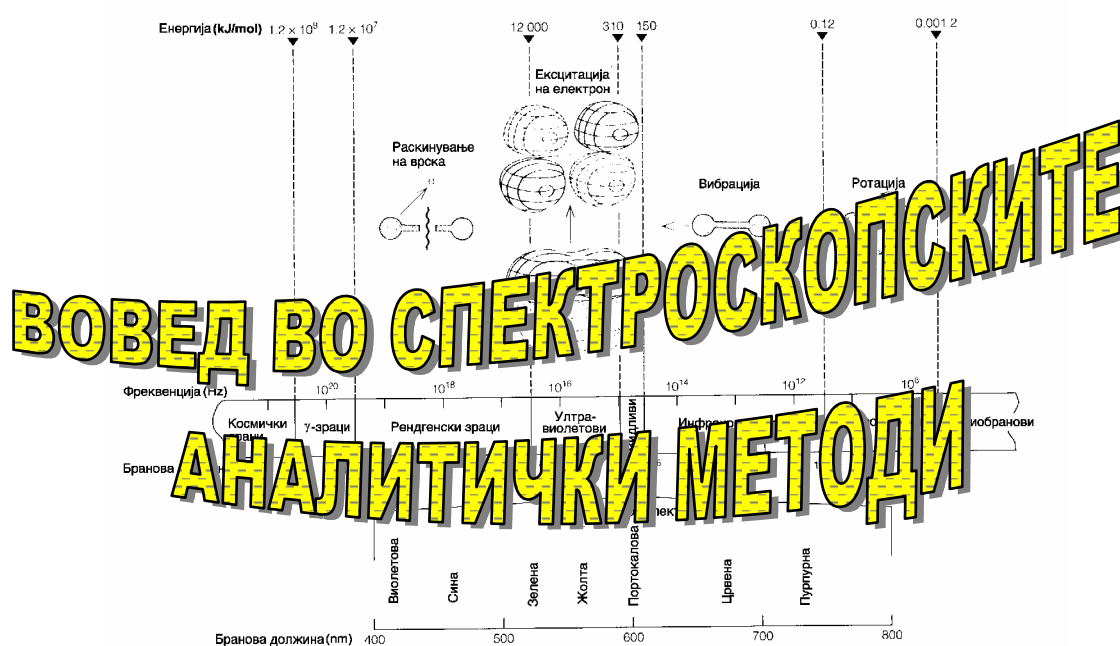


Универзитет „Св. Кирил и Методиј“

Природно-математички факултет, Скопје

Институт за хемија

Игор Кузмановски и Марина Стефова



(за студентите на насоката биологија-хемија)

Скопје, 2002

1. ВОВЕДВО СПЕКТРОСКОПСКИТЕ АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ

Историски, поимот *спектроскопија* се однесува на дел од науката, во кој *светлината* се разложува на одделни бранови со определени бранови должини, давајќи *спектри*. Спектрите, пак, ја одиграле главната улога во развојот на современата *атомска теорија*. Спектроскопијата, исто така, постепено станала и моќна алатка за квалитативна и квантитативна анализа.

На почетокот, под *светлина* се подразбирало само *видливото* зрачење и се развиле техники (колориметрија, фотометрија) кај кои образецот се испитува со помош на таквото електромагнетно зрачење. Усовршувањето на методите придонесло, денес, под поимот спектроскопија да се подразбираат и техники за кои се користат и други видови на електромагнетни бранови како што се ултравиолетови, инфрацрвени, Рендгенски, микробранови и радиобранови. Зависно од видот на употребеното зрачење и од појавата до која тоа доведува при заемдејство со образецот, оптичките аналитички методи може да се класифицираат на:

1. Апсорпциони

- ултравиолетова и видлива спектроскопија¹,
- атомска апсорпциона спектрофотометрија¹ (пламена, електротермичка),
- инфрацрвена спектроскопија,
- Раманска спектроскопија,
- микробранова спектроскопија

2. Емисиони

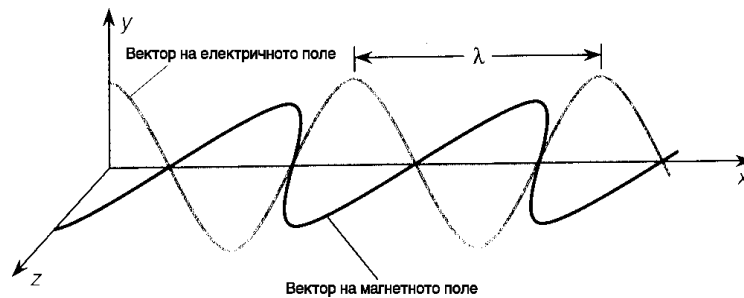
- атомска емисиона спектрометрија (пламена, со индуктивно спрегната плазма, со електрична искра, со електричен лак)
- Рендгенска спектрометрија¹

¹ Спектроскопија - изучување на спектар. Спектрофотометрија- мерење на интензитетот на фото сигналот како функција од концентрацијата. Спектрометрија - мерење на интензитет на сигнал (не електромагнетно зрачење) како функција од концентрацијата.

3. Флуоресцентна спектроскопија (атомска и молекулска)
4. Рефрактометрија
5. Рендгенска дифракција и електронска дифракција
6. Нуклеарно-магнетна резонанца

1.1 СВОЈСТВА НА ЕЛЕКТРОМАГНЕТНОТО ЗРАЧЕЊЕ

Електромагнетното зрачење е вид на енергија која патува низ средната со енормна брзина. Електромагнетниот бран (Слика 1) се состои од две меѓусебно нормални компоненти на електричното и на магнетното поле.



Слика 1. Планарно поларизиран електромагнетен бран со бранова должина λ .

Некои од својствата на електромагнетното зрачење може да се објаснат со параметрите карактеристични за брановите:

- *бранова должина*, λ , е растојанието меѓу две најблиски точки кои осцилираат во фаза. Брановата должина се мери со единиците за должина. За видливата и ултравиолетовата област најчесто се користи nm, од практични причини.
- *фреквенција*, ν , е број на осцилации на бранот во секунда. Се мери во Херци, $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$.

Брановата должина и фреквенцијата се поврзани со релацијата:

$$\nu \lambda = c \tag{1}$$

- во која c е брзина на простирање на електромагнетното зрачење, која изнесува $2,99792458 \cdot 10^8$ m/s во вакуум. Во друга средина брзината на светлината е еднаква на c/n , каде n е индекс на прекршување на средината².
- бранов број, $\tilde{\nu}$, се дефинира како реципрочна вредност од брановата должина и е често користен начин за карактеризирање на електромагнетното зрачење. Најчесто се изразува во реципрочни центиметри, cm^{-1} .
- амплитуда претставува интензитет на електричниот вектор во максимумот на бранот.

Меѓутоа, појавите на апсорпција и емисија на енергија на зрачење не може да се објаснат со брановата природа на електромагнетното зрачење. Овие појави може да се објаснат само ако се земе предвид и корпускуларната природа на електромагнетното зрачење. Тоа значи дека зрачењето треба да се разгледува и како струја од честички³, фотони, чија енергија е пропорционална со нивната фреквенција:

$$E = h\nu \quad (2)$$

каде h е Планкова константа ($6,63 \cdot 10^{-34}$ J s).

1.2 ЕЛЕКТРОМАГНЕТЕН СПЕКТАР

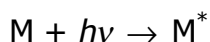
Електромагнетниот спектар опфаќа огромен интервал на бранови должини (енергии). Главните области се означени на Слика 2. Називите на одделните области се одраз на историјата на физичките науки. Треба да се истакне дека не постои дисконтинуитет во својствата на зрачењето на премините од една во друга област од спектарот. Како што се гледа од сликата, електромагнетното зрачење кое нашето око може да го детектира (видливата светлина), опфаќа само мал дел од електромагнетниот спектар.

² За повеќето супстанции, $n > 1$, што значи дека електромагнетното зрачење ќе патува со помала брзина низ материјални средини, одошто низ вакуум.

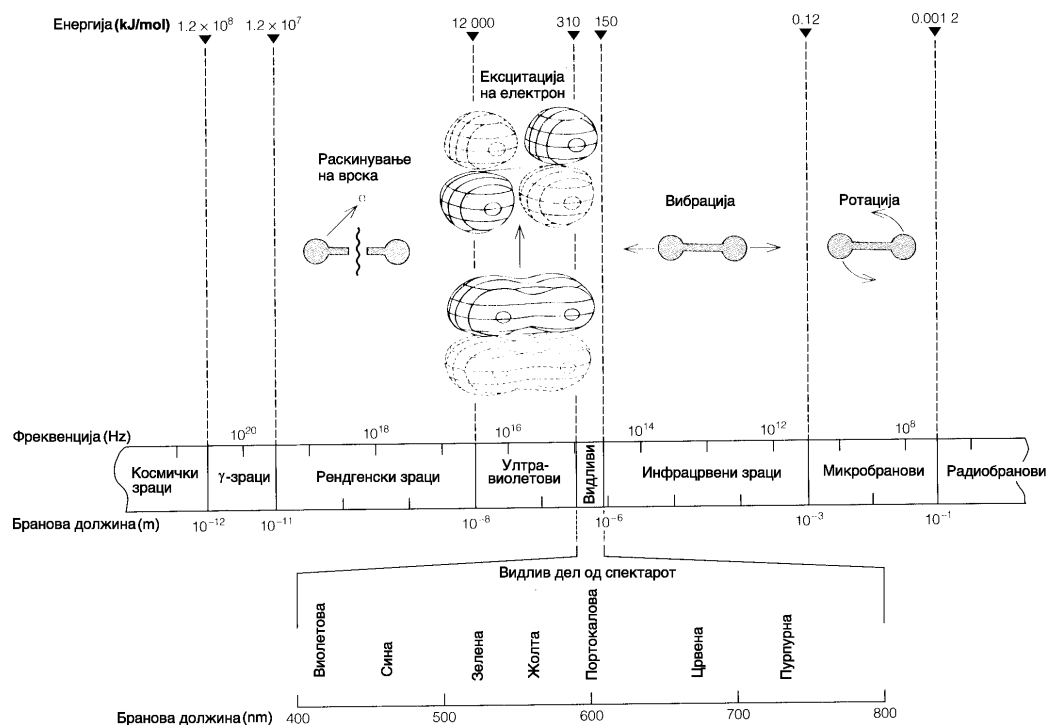
³ Постои предлог од Акад. Ј. Поп-Јорданов за електромагнетното зрачење да се употребува термин **браничка** кој би бил во согласност со неговата двојна природа (*бран-честичка*).

1.3 АПСОРПЦИЈА НА ЗРАЧЕЊЕ

Апсорпција е процес во кој дадена супстанца, во транспарентна средина, селективно го намалува интензитетот на електромагнетното зрачење на определени фреквенции. Според квантната теорија, секоја елементарна честичка (атом, молекула или јон) има единствено множество на енергетски состојби. Состојбата со најниска енергија се нарекува *основна состојба*. На собна температура најголем број елементарни честички се во својата основна состојба. Кога фотон при своето патување наидува на елементарна честичка, апсорпцијата е можна ако (и само ако) енергијата на фотонот е токму колку и енергетската разлика помеѓу основната состојба и некоја од состојбите со повисока енергија. При тоа енергијата на честичката (M , на пример) се зголемува и велиме дека таа преминала во *ексцитирана состојба* (се означува со M^*). Тоа може да се прикаже на следниот начин:



После извесен период (10^{-6} до 10^{-9} s) ексцитираната честичка се



Слика 2. Шематски приказ на електромагнетниот спектар со визуелно претставени процеси на интеракциите со материјата

релаксира, оддавајќи го на околината вишокот енергија се враќа во состојба со пониска енергија. Најчесто, но не секогаш, тоа е основната состојба.

Интеракцијата меѓу електромагнетното зрачење и елементарните честички доведува до различни типови на енергетски промени во зависност од енергијата на зрачењето и од природата на супстанцата (види Слика 2).

Што е боја?

Бојата претставува визуелен феномен кој се јавува како последица на селективна апсорпција на некои фреквенции од упадната светлина од страна на обоениот материјал. Бојата зависи од фреквенциите присутни во упадната светлина, фреквенциите што материјалот ги апсорбира и од фреквенциите кои окоото ги прима.

Зошто црвениот раствор е црвен?

Раствор, како на пр. $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$, е црвен не затоа што комплексниот јон "му додава" црвено зрачење на растворувачот, туку затоа што тој ја апсорбира зелената компонента од упадното бело зрачење, а ја пропушта црвената компонента (комплементарна на зелената). Тоа значи дека бојата што ја гледаме не е онаа боја што супстанцата ја апсорбира, туку нејзината комплементарна боја. Во следната табела се дадени боите од видливиот дел на електромагнетниот спектар и нивните комплементарни бои.

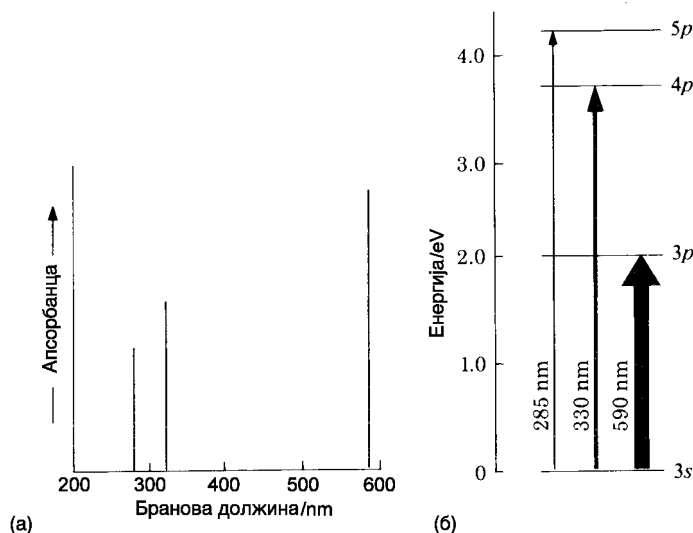
| Бранова должина, nm | Боја | Комплементарна боја |
|---------------------|--------------|---------------------|
| 400-435 | виолетова | жолто-зелена |
| 435-480 | сина | жолта |
| 480-490 | сино-зелена | портокалова |
| 490-500 | зелено-сина | црвена |
| 500-560 | зелена | пурпурна |
| 560-580 | жолто-зелена | виолетова |
| 580-595 | жолта | сина |
| 595-650 | портокалова | сино-зелена |
| 650-750 | црвена | зелено-сина |

Апсорпционите својства на дадена супстанца може згодно да се опишат со нејзиниот *апсорпционен спектар*, кој графички ја изразува зависноста на намалувањето на интензитетот на зрачењето (апсорпцијата) од брановата должина, фреквенцијата или брановиот број.

1.3.1 АТОМСКА АПСОРПЦИЈА

Кога зрак од полихроматско зрачење од ултравиолетовиот (UV) или видливиот (Vis, од англиски visible-видлив) дел од спектарот минува низ средина со атоми во гасна фаза, тогаш интензитетот на зрачењето се намалува само на извесен број бранови должини. На Сл. 36 даден е дијаграм на енергетските нивоа на натриумов атом. Премините на валентниот електрон од основната во некоја од можните ексцитирани состојби настанува со

апсорпција на фотон со енергија која се совпаѓа со енергетската разлика помеѓу ексцитираните состојби и основната. Во ваков случај се добива спектар составен од определен број на тенки (околу 0,005 nm) апсорпциони линии. На Сл. 3а е даден UV/Vis спектарот на гасовит натриум, каде на



Слика 3. а-Апсорпционен спектар на гасовит натриум. б-дијаграм на енергетските нивоа на натриумот со приказ на електронските премини и енергетските нивоа.

ординатата е дадена вредноста на апсорбанца, како мерка за намалувањето на интензитетот на упадното зрачење на дадената бранова должина (за ова подоцна, во поглавјето 1.3.4).

Апсорпционите спектри на алкалните метали се многу поедноставни од оние на елементите кои имаат повеќе електрони во последното енергетско ниво. Особено богати со линии се атомските спектри на преодните метали, кои може да содржат и по неколку илјади линии.

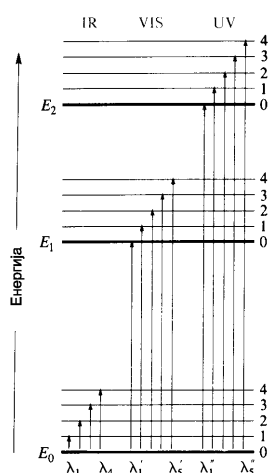
1.3.2 МОЛЕКУЛСКА АПСОРПЦИЈА

За разлика од атомската апсорпција кај која се случуваат само електронски премини, кај молекулската апсорпција се случуваат три вида квантизирани премини под дејство на ултравиолетово, видливо, инфрацрвено и микробраново зрачење.

Ултравиолетовото и видливото зрачење доведува до премини на електроните од молекулски или атомски орбитали со пониска енергија во орбитали со повисока енергија. Како што претходно беше кажано, ваков премин е можен само ако енергијата на фотонот е точно колку енергетската разлика

помеѓу двете орбитали. Овој тип на премин се нарекува *електронски премин*, а процесот на апсорпција *електронска апсорпција*.

Покрај електронските, кај молекулите се можни уште и *вибрациони премини* и *ротациони премини*. Тие настануваат заради постоењето на голем број квантизирани *вибрациони*, односно *ротациони енергетски нивоа*, кои се должат на хемиските врски во молекулата. Енергетските разлики помеѓу вибрационите и ротационите нивоа се помали од оние кај електронските, заради што премините меѓу нив настануваат со апсорпција на инфрацрвено зрачење. Премините во молекулите кои настануваат при апсорпција на зрачење од инфрацрвената, видливата и ултравиолетовата област се илустрирани на Слика 4. Резултат на овие премини се *ленти* во апсорпциониот спектар (види Слика 11 и 12).



Слика 4. Дијаграм на електронски енергетски нивоа: E_1 , E_1 и E_2 (во рамките на кои може да се видат и вибрациони нивоа: 0, 1, 2, 3 и 4) и премини помеѓу нив.

Вкупната енергија на молекулата може да се претстави на следниот начин:

$$E = E_{\text{електронска}} + E_{\text{вибрациона}} + E_{\text{ротациона}} + E_{\text{транслациона}}$$

каде $E_{\text{електронска}}$ е енергијата во врска со електроните во надворешните орбитали на молекулата, $E_{\text{вибрациона}}$ е енергијата на целата молекула што се должи на меѓуатомските вибрации, а $E_{\text{ротациона}}$ се однесува на енергијата поврзана со ротацијата на молекулата околу нејзиниот центар на гравитација. Последниот член во изразот ја претставува транслационата енергија на молекулата.

Односот на големините на енергетските разлики помеѓу соодветните енергетски нивоа е следниот:

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{електронска}} &\approx 10 \Delta E_{\text{вибрациона}} \\ &\approx 100 \Delta E_{\text{ротациона}} \\ &\gg \Delta E_{\text{транслациона}} \end{aligned}$$

1.3.3 ТЕРМИНИ ВО АПСОРПЦИОНАТА СПЕКТРОСКОПИЈА

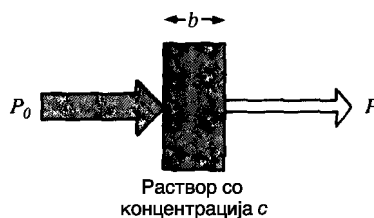
Вообичаените термини и симболи кои се употребуваат во апсорпционата спектроскопија се дадени во Табела 1.

Термините дадени во првата колона се оние кои денес се користат и чија примена се препорачува, додека термините во третата колона може да се сретнат само во постара литература.

Табела 1. Поважни спектроскопски термини и симболи кои се користат во аналитиката.

| Термин и симбол | Дефиниција | Алтернативно име и симбол |
|---|--|--|
| моќ на зрачење P, P_0 | Енергија на зрачење која паѓа на единица површина на детекторот во секунда | Интензитет на зрачење I, I_0 |
| апсорбанца A | $\log(P_0/P)$ | Оптичка густина D Екстинкција E |
| трансмитанца T пат на зрачењето ⁴ b | P/P_0 | Трансмисија T I, d |
| Апсорпционен коефициент ⁴ a | A/bc | Коефициент на екстинкција k |
| моларен апсорпционен коефициент ⁵ ϵ | A/bc | Моларен коефициент на екстинкција ϵ |

На Слика 5 е прикажан раствор со концентрација на аналитот c и дебелина на слојот b . Како последица на интеракции меѓу фотоните и честичките од растворот кои апсорбираат, при минување на зрак низ растворот интензитетот на зрачењето се намалува од P_0 на P .



Слика 5. Намалување на интензитетот на зрачењето како последица на апсорпција од страна на конституентите на растворот

⁴ b се изразува во cm или во друга единица за должина; c се изразува во g/L (g/dm^3) или друга (дадена) единица за концентрација.

⁵ c изразена во mol/L (mol/dm^3), а b во cm .

Трансмитанца на еден раствор се дефинира како дел од упадното зрачење што растворот го пропушта:

$$T = P/P_0 \quad (3)$$

Трансмитанцата е мерка за пропуштеното, односно неапсорбираното зрачење. Обично се изразува во проценти.

Апсорбанцата на еден раствор е дефинирана со изразот:

$$A = -\log_{10} T = \log(P_0/P) \quad (4)$$

Очигледно е дека, спротивно на трансмитанцата, апсорбанцата на еден раствор расте со намалувањето на интензитетот на излезното зрачење.

1.3.4 ЗАВИСНОСТ НА АПСОРБАНЦАТА ОД КОНЦЕНТРАЦИЈАТА: BEER-ОВ ЗАКОН

За *монохроматско зрачење*, апсорбанцата, мерена на определена бранова должина, е пропорционална со дебелината на слојот низ кој минува зрачењето l (пат на зрачењето), како и со концентрацијата на анализот - c . Релацијата помеѓу овие физички величини е дадена со следната равенка

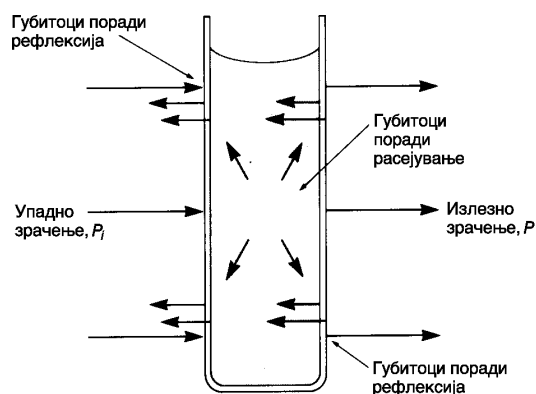
$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c \quad (5)$$

во која коефициентот на пропорционалност - ε , претставува моларен апсорпционен коефициент. Доколку концентрацијата се мери во единици *мол на литар*, а должината на слојот низ кој зрачењето минува во *центиметри*, единиците за моларниот апсорпционен коефициент ќе бидат $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (во SI $\text{mol}^{-1} \text{ m}^2$).

Равенката (5) претставува математичка формулација на Беровиот закон од каде се гледа дека зависноста на физичката величина *апсорбанца* од *концентрацијата* на анализот е *линеарна*. Детали во врска со Беровиот закон во единиците (или поглавјата) што следуваат.

1.3.5 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО МЕРЕЊЕ НА ТРАНСМИТАНЦАТА И АПСОРБАНЦАТА

Апсорбанцата и трансмитанцата, на начинот на кој се дефинирани во Табела 1, не би можеле да се мерат во лабораторија, зашто покрај апсорпцијата на зрачење од анализот (види Слика 6), дел од зрачењето се рефлектира од ѕидовите на киветата, а друг дел, пак, се расејува од поголемите молекули присутни во растворот. Според тоа *намалувањето* на интензитетот на упадното зрачење не се должи *само* на апсорпција од анализот⁶. За да се компензираат овие ефекти, мерењето на интензитетот на трансмитираното зрачење, вообичаено, се врши со споредба со интензитетот на трансмитираното зрачење на чистиот растворувач или, пак, на растворувачот заедно со сите додадени реагенси, но без анализот ("слепа" проба или референтен раствор).



Слика 6. Загуби поради рефлексја и расејување на упадното зрачење.

Значи, експериментално се мери интензитетот на зрачењето, а трансмитанцата и апсорбанцата се пресметуваат врз основа на следните изрази

$$T_{\lambda} = \frac{P_{\text{раствор}}}{P_{\text{растворувач}}} \approx \frac{P}{P_0} \quad (6)$$

⁶ На пример, покажано е дека интензитетот на жолтата светлина која минува низ стаклена кивета полна *само* со вода се намалува за околу 8,5 % како последица на рефлектирање на светлината од ѕидовите на киветата.

$$A_{\lambda} = \log \frac{P_{\text{растворувач}}}{P_{\text{раствор}}} \approx \log \frac{P_0}{P} \quad (7)$$

Во текстот што следува P_0 и P ќе се однесуваат на интензитетот на зрачење после минувањето низ ќелијата која содржи само растворувач и аналит, соодветно.

1.3.6 ПРИМЕНА НА БЕРОВИОТ ЗАКОН ПРИ АНАЛИЗА НА СМЕСИ

Адитивноста на апсорбанцата овозможува Беровиот закон да се применува и за анализа на смеси. Во овој случај Беровиот закон може да се запише во следната форма

$$A_{\text{вкупно}} = \sum_{i=1}^m A_i = \sum_{i=1}^m \epsilon_i \cdot l \cdot c_i \quad (35)$$

каде i се однесува на различните компоненти. Тоа значи дека вкупната апсорбанца на еден раствор се должи на поединечната апсорпција на сите конституенти.

За да може да се користи Беровиот закон во оваа форма помеѓу различните компоненти во смесата не треба да постојат интеракции.

1.3.7 ОГРАНИЧУВАЊА НА БЕРОВИОТ ЗАКОН

За линеарната зависност помеѓу апсорбанцата и дебелината на слојот, при константна концентрација на супстанцата која апсорбира, не се познати отстапувања. Но, Беровиот закон, во основа, е многу едноставен. Тој не ги зема предвид можните интеракции меѓу честичките во образецот. Затоа се можни отстапувања од линеарната зависност меѓу апсорбанцата и концентрацијата. Некои од отстапувањата се *реални ограничувања*, други се должат на начинот на мерење на апсорбанцата (*инструментални отстапувања*), додека *хемиските отстапувања* се резултат на хемиски промени заради промена на концентрацијата на конституентите во образецот.

Реални ограничувања

Беровиот закон многу добро ја опишува појавата на апсорпција на зрачење само кај *разредени* раствори (обично $c < 0,01 \text{ mol/L}$). Со зголемување на концентрацијата се зголемува можноста за интеракции помеѓу растворените честички, при што може да се менуваат и нивните апсорпциони карактеристики⁷. Тоа резултира со нарушување на линеарната зависност на апсорбанцата од концентрацијата.

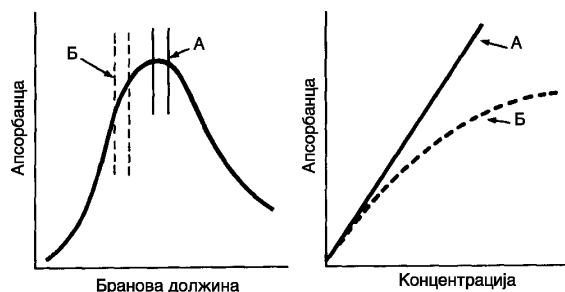
Хемиски отстапувања

Отстапувања од Беровиот закон се појавуваат и кога анализот учествува во рамнотежни процеси (асоцијација, дисоцијација), во реакција со растворувачот или со некој од конститuentите на пробата, при што настануваат продукти со различни апсорпциони карактеристики од оние на анализот.

За илустрација на опишаните отстапувања од Беровиот закон може да послужи раствор од слаба киселина (НА). При повисоки концентрации во растворот ќе преовладува недисоцираната форма (НА), додека со намалување на концентрацијата ќе се зголемува дисоцијацијата. Ако моларните апсорпциони коефициенти на НА и A^- се различни, при разредување, растворот нема да се покорува на Беровиот закон.

Инструментални отстапувања заради полихроматско зрачење

Беровиот закон е ограничен и со фактот дека тој може да се примени само кога апсорбанцата се мери со *монохроматско зрачење* (електромагнетно зрачење со точно определена бранова должина). Вистински монохромат-



Слика 7. Ефект на полихроматското зрачење на Беровиот закон. А-мали отстапувања поради незначителна промена на моларниот апсорпционен коефициент во интервалот на одбраните бранови должини. Б-значително отстапување од линеарноста (ϵ претрпува значителни промени во одбраниот дел).

ски извори, како што се ласерите, не се практични за рутински аналитички инструменти. Заради тоа се користат извори на континуирана полихроматска светлина комбинирани со дифракциона решетка или филтер кој го изолира, повеќе или помалку симетрично, спектралното подрачје околу потребната бранова должина.

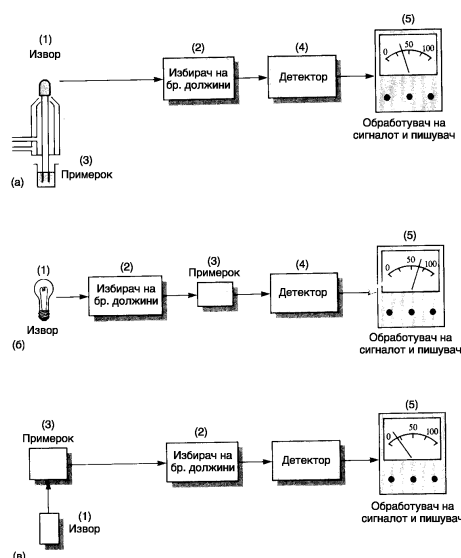
Експериментално е утврдено дека отстапувањата од Беровиот закон заради полихроматско зрачење не се големи. Отстапувањето станува значајно кога употребеното зрачење опфаќа спектрално подрачје во кое супстанцата која апсорбира покажува големи промени на апсорбанцата со промена на брановата должина (види Слика 7).

2. ИНСТРУМЕНТИ ЗА ОПТИЧКА СПЕКТРОСКОПИЈА

Основните делови на инструментите за емисиона, апсорпциона и флуоресцентна спектроскопија се многу слични според својата функција и според она што се бара од нив, независно од тоа дали инструментот е дизајниран за ултравиолетово, видливо или инфрацрвено зрачење. Заради сличноста, овие инструменти спаѓаат во групата *оптички инструменти*.

Повеќето спектроскопски инструменти се состојат од пет компоненти:

1. Извор на зрачење
2. Избирач на бранова должина
3. Сад за образецот
4. Детектор и претворувач на сигналот
5. Обработувач на сигналот и покажувач



Слика 9. Компоненти на различни типови спектрофотометри а-емисионен, б-апсорпционен, в-флуоресцентен

⁷ Во екстреман случај, при мнооогу високи концентрации, растворената супстанца станува растворувач.

На Слика 9 е прикажано како овие делови се вклопени во инструмент за емисиона, апсорпциона и флуоресцентна спектроскопија. Кај емисионата спектроскопија држачот на образецот е електричен лак, искра, загреана површина или пламен, што истовремено предизвикува емисија на карактеристичното зрачење од испитуваниот примерок. Кај апсорпционата и флуоресцентната спектроскопија, пак, неопходен е и извор на зрачење и држач за образецот. При апсорпционите мерења зракот од изворот минува низ избирачот на бранова должина а потоа низ образецот, а во некои инструменти местата на образецот и избирачот на бранова должина се сменети. Кај инструментите за флуоресцентна спектроскопија, изворот предизвикува емисија на карактеристично зрачење од образецот, чиј интензитет се мери во правец нормален на оној на упадното зрачење од изворот.

2.1 ИЗВОРИ НА ЗРАЧЕЊЕ

За апсорпционата и флуоресцентната спектроскопија неопходен е извор кој дава зрачење со постојан и доволно голем интензитет што овозможува лесна детекција и мерење. Во следната табела се наведени вообичаените извори кои се користат во различните оптички инструменти.

Табела 2. Извори на зрачење кои се користат во спектроскопијата

| Извор | Спектрално подрачје λ/nm | Спектроскопија |
|--|--|---|
| КОНТИНУИРАНИ ИЗВОРИ | | |
| Ксенонова лампа | 250 – 600 | Молекулска флуоресцентна; Раманска |
| H₂ и D₂ лампи | 160 – 380 | UV молекулска апсорпција |
| Волфрамова лампа | 350 – 2200 | UV/Vis/блиско-IR молекулска апсорпција |
| Нернстово стапче | 400 - 20 000 | IR молекулска апсорпција |
| ЛИНИСКИ ИЗВОРИ | | |
| Лампа со шуплива катода | UV/Vis | Атомска апсорпција; Атомска флуоресценција |
| Лампа со електрично празнење | UV/Vis | Атомска апсорпција; молекулска флуоресценција; Раман |
| Ласер | Uv/Vis/IR | Раман; молекулска апсорпција; молекулска флуоресценција |

2.2 ИЗБИРАЧИ НА БРАНОВА ДОЛЖИНА

Спектроскопските инструменти се опремени со уред кој го ограничува упадното зрачење само во тесно спектрално подрачје апсорбирано или емитирано од анализаторот. Овие уреди во голема мерка влијаат на селективноста и осетливоста на инструментот. При апсорпционите мерења употребата на потесно спектрално подрачје придонесува за посторого покорување на Беровиот закон. Овде треба да се истакне дека не постои таков избирач на бранова должина кој ќе издвои зрачење со *само една бранова должина*. Овие уреди секогаш даваат едно континуирано спектрално подрачје со бранови должини повеќе или помалку симетрично распределени околу т.н. *номинална бранова должина*. Избирачите на бранова должина се карактеризираат со ширината на спектралното подрачје околу номиналната бранова должина. Во основа постојат два вида вакви уреди: филтри и монохроматори.

- *Филтрите* работат на принцип на апсорпција на целото упадно зрачење освен на ограничено спектрално подрачје (со ширина од 200 nm или повеќе).
- *Монохроматорите*, пак, може да користат за избирање на бранова должина од пошироко континуирано спектрално подрачје. Тие се состојат од отвори, леќи, огледала, прозорчиња и уреди за дисперзија (призми и дифракциони решетки).

Еден квалитетен монохроматор за видливата област може да издвои спектрално подрачје од неколку десетти делови од nm дури и потесно⁸.

2.3 САДОВИ ЗА ОБРАЗЕЦОТ

Садовите за анализираниот образец т.н. *кивети*, мора да се направени од таков материјал кој е пропустлив (транспарентен) за спектралното подрачје во кое се користат. Така, за мерења во ултравиолетовата област (под 350 nm) се неопходни кивети од кварц, кои може да се употребат во широко спектрално подрачје (до 3000 nm). Заради пониската цена, за областа меѓу

375 и 2000 nm, се користат стаклени, а сè повеќе и пластични кивети. Најчесто користен материјал пропустлив за инфрацрвено зрачење е кристален натриум хлорид.

Добрите кивети имаат прозорци кои се нормални на правецот на зракот заради минимизирање на загубите од рефлексивност. Обично се користат кивети со должина (на патот на зракот низ нив) од 1 cm, иако комерцијално се достапни и кивети со должини од помалку од 0,1 cm до 10 cm.

Квалитетот на спектроскопските податоци во голема мерка зависи од начинот на кој киветите се користат и одржуваат. Отисоци од прсти, масти и други нечистотии на ѕидовите значително ја менуваат пропустливоста на киветата. Затоа, пред и по секоја употреба неопходно е темелно чистење, а по чистењето и внимателно ракување. Калибрираните кивети повремено треба да се проверуваат и калибрираат една во однос на друга.

2.4 ДЕТЕКТОРИ И ПРЕТВОРУВАЧИ НА ЗРАЧЕЊЕ

Детектор е уред кој го покажува постоењето на некоја физичка појава. Познати примери за детектори се фотографски филм кој покажува присуство на електромагнетно или радиоактивно зрачење, или нивото на жива во термометар, кој покажува промени на температурата, и сл. Човечкото око е детектор, исто така (види 2.4.1).

Претворувач е специјален вид на детектор кој ги претвора различните сигнали (зрачење, pH, маса, температура) во *електрични* сигнали, кои потоа може да се засилат, управуваат, и конечно да се претворат во броеви кои ја даваат вредноста на почетниот сигнал. Во основа постојат два типа претворувачи, едните реагираат на фотони, а другите на топлина.

- *Фотон детекторите* функционираат врз основа на интеракција на зрачење со реактивна површина која дава електрони (*фотоемисија*) или, пак, која ги доведува електроните во енергетски состојби во кои тие спроведуваат струја (појавата се нарекува *фотоспроводливост*). Само ултравиолетовото, видливото и блиското инфрацрвено зрачење

⁸ Опсегот на бранови должини пропуштен низ образецот зависи од ширината на *щробијата* (т.н. slit) на монохроматорот.

имаат доволно енергија да доведат до овие појави, заради што примената на фотон детекторите е ограничена на бранови должини до околу 2000 nm. Главно се користат четири вида фотон детектори: фотоцевки, фотомултипликаторски цевки, силициумови фотодиоди и фотоволтаични ќелии.

- *Топлински детектори* се користат главно за детекција на инфрацрвено зрачење, при што се мери *зголемувањето на температурата* на зацрнет материјал поставен на патот на зрачењето, што потоа се претвора во електричен сигнал кој се засилува и мери. Бидејќи промените на температурата при апсорпција на инфрацрвено зрачење се многу мали, за избегнување на грешките во мерењето, неопходна е строга контрола на температурата на околината поради што термичките детектори се поставуваат во вакуум.

2.5 ОБРАБОТУВАЧ НА СИГНАЛОТ И ПОКАЖУВАЧ

Обработувач на сигналот е обично електронски уред кој го засилува електричниот сигнал од детекторот. Тој може и да го менува сигналот, но и да изведува математички операции со него (диференцирање, интегрирање, логаритмирање).

Познати се и различни уреди за покажување (отчитување) на резултатите од мерењето, како што се дигиталните покажувачи, скалите на потенциометрите, катодните цевки, мониторите на компјутерите и сл.

3. ПРИМЕНА НА УЛТРАВИОЛЕТОВАТА И ВИДЛИВА СПЕКТРОСКОПИЈА

Молекулската спектроскопија наоѓа широка примена во идентификувањето и квантитативно определувањето на голем број на неоргански и органски супстанции. Ултравиолетовата и видлива спектроскопија, главно, се користи за квантитативна анализа, и во хемиските и клинички лаборатории низ целиот свет е далеку најупотребувана метода.

3.1 АПСОРБИРАЧКИ ВИДОВИ

Претходно беше кажано дека апсорпцијата на ултравиолетовото и видливо зрачење се должи на електронски премини, а за тоа кои видови на молекули и молекулски групации може да апсорбираат ќе стане збор во делот што следи.

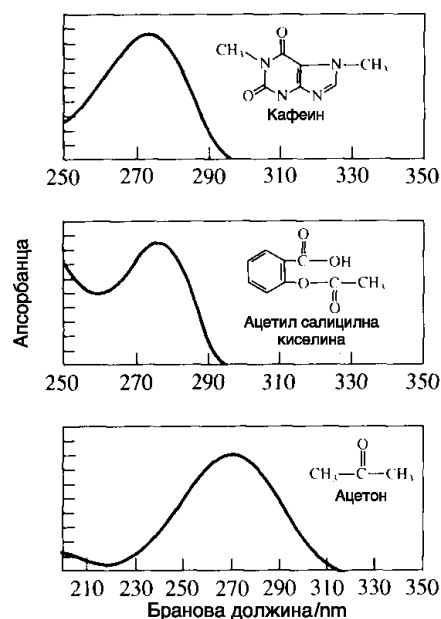
3.1.1 АПСОРПЦИЈА НА ЗРАЧЕЊЕ ОД ОРГАНСКИ СУПСТАНЦИ

Апсорпцијата на зрачење од органски молекули во регионот од 180 nm до 780 nm се должи на интеракции помеѓу фотоните и електроните кои учествуваат во градење на врски или, пак, со електроните локализирани околу атоми од типот на кислород, сулфур, азот и др.

Брановата должина на која органската молекула апсорбира зависи од јачината на врските во неа. За екситација на електроните кои градат C-C врски или C-H врски е потребно електромагнетно зрачење со бранова должина под 180 nm. Поради низа технички проблеми изучувањето на спектрите на единечните врски со UV/Vis спектроскопија не е широко распространето.⁹

⁹ Пречките се во тоа што, кварцот, но и конститuentите на атмосферата апсорбираат во тој дел од спектарот. За оваа цел потребно е да се користат спектрофотометри кои работат под вакуум, и имаат литиумфлуоридна оптика.

Електроните кои учествуваат во градењето на двојни и тројни врски, може да бидат ексцитирани со електромагнетно зрачење од областа помеѓу 780 nm и 180 nm, а како последица, во ултравиолетовата и видлива област од спектарот на ваквите соединенија се јавуваат *ленти* (види Слика 11). Незаситените органски функционални групи кои апсорбираат зрачење во ултравиолетовата и видлива област се нарекуваат **хромофори**. Во Табела 3 е дадена листа на некои позначајни хромофори, и брановата должина на која тие апсорбираат.



Слика 11. Ултравиолетови спектри на типични органски соединенија

Табела 3. Апсорпциони карактеристики на некои поважни хромофори

| Хромофор | Пример | Растворувач | λ_{\max}/nm |
|--------------------|--|------------------|----------------------------|
| Алкен | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$ | <i>n</i> -хексан | 177 |
| Конјугирани алкени | $\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$ | <i>n</i> -хексан | 217 |
| Алкини | $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CC}-\text{CH}_3$ | <i>n</i> -хексан | 178, 196, 225 |
| Карбонилна група | $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$ | <i>n</i> -хексан | 186, 280 |
| Карбоксилна група | CH_3COOH | Етанол | 204 |
| Амидо | CH_3CONH_2 | Вода | 214 |
| Азо | $\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$ | Етанол | 339 |
| Нитро | CH_3NO_2 | Изооктан | 280 |
| Нитрозо | $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$ | Диетил етер | 300, 665 |
| Нитрат | $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$ | Диоксан | 270 |
| Ароматски прстен | Бензен | <i>n</i> -хексан | 204, 256 |

Заситените органски соединенија кои содржат хетероатом, како на пример кислород, азот, сулфур или халоген атом, содржат *слободни елек-*

тронски парови. Електроните од слободните електронски парови може да бидат ексцитирани со зрачење со бранова должина помеѓу 170 и 250 nm. Во Табела 4 се дадени неколку примери. Некои од нив, како на пример алкохолите и етерите се користат и како растворувачи.

Табела 4. Апсорпциони максимуми на органски соединенија со хетероатоми

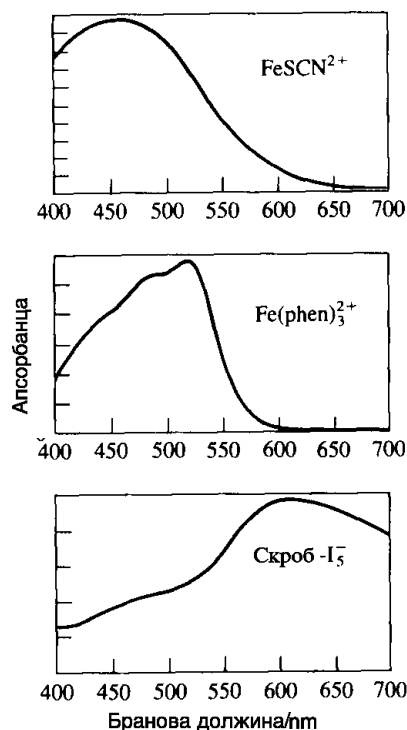
| Соединение | λ_{\max}/nm |
|---------------------------|----------------------------|
| CH_3OH | 167 |
| $(\text{CH}_3)_2\text{O}$ | 184 |
| CH_3Cl | 173 |
| CH_3I | 258 |
| $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ | 229 |
| CH_3NH_2 | 215 |
| $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ | 227 |

3.1.2 АПСОРПЦИЈА НА ЗРАЧЕЊЕ ОД НЕОРГАНСКИ СУПСТАНЦИ

Познато е дека најголемиот број на јоните и комплексите на преодните елементи (барем во некоја од оксидациските состојби во кои може да се најдат) апсорбираат зрачење од видливиот дел од спектарот и затоа се обоени. Во овој случај апсорпцијата на зрачење се должи на премин на електрони од пополнети во непополнети d -орбитали. Енергетската разлика помеѓу d -орбиталите зависи од лигандите, местоположбата на елементот во периодниот систем и неговата оксидациска состојба.

Апсорпција поради пренос на полнеж

Комплексите кај кои доаѓа до пренос на полнеж се состојат од електрондонорна група (најчесто: лиганд) и електрон акцептор (нај-



Слика 12. Спектри на комплекси со пренос на електрони во видливото подрачје

често: метален јон).¹⁰ Кога комплексот апсорбира зрачење, електрон кој му припаѓа на донорот преминува во орбитала која му припаѓа (главно) на акцепторот. Екситираната состојба, според ова, може да се опише како извесен вид на *интерен редокс процес*. Оваа состојба, во споредба со органските хромофори, е различна во тоа што таму ексцитираниот електрон се наоѓа во молекулска орбитала - заедничка за два или повеќе атоми.

Примери за вакви комплекси се FeSCN^{2+} , I_3^- , комплексот на Fe(II) со 1,10-фенантролин и др (Слика 12).

3.2 КВАЛИТАТИВНА АНАЛИЗА

Ултравиолетовата и видлива спектроскопија е многу корисен алат во определувањето на присутни хромоформни групи во органските соединенија. Многу органски соединенија се транспарентни за зрачењето со бранова должина поголема од 180 nm, па затоа појавата на лента во областа од 200 до 400 nm е добар индикатор за присуството на хромоформна група или елемент кој поседува слободен електронски пар. Често, квалитативната анализа се врши со споредба на спектарот на непознатата супстанца со претходно снимени спектри на стандарди (најчесто се врши споредба со спектри собрани во атлас на спектри или доколку се поседува база на податоци која содржи дигитални спектри со автоматско пребарување - со помош на компјутер).

Доколу не поседуваме спектри на стандарди со кои би можела да биде извршена споредба, само од разгледување на спектарот на соединението не секогаш би можеле да добиеме еднозначни резултати за структурата. Во таков случај мора да се обидеме да дојдеме и до други физички или хемиски податоци за соединението како на пример: инфрацрвен спектар, NMR спектар, масен спектар или, пак, растворливост, температура на топење, температура на вриење, индекс на прекршување и сл.

¹⁰ Најчесто, како што беше всушност и спомнато, металниот јон служи како електрон акцептор, а лигандот како електрон донор. Помеѓу неколкуте исклучоци од ова правило се 1,10-фенантролинските комплекси на железо(II) и бакар(I).

3.3 КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА

Како што веќе кажавме, апсорпционата спектроскопија, базирана на апсорпција на зрачење од ултравиолетовото и видливо подрачје, е една од најкористените техники за квантитативна хемиска анализа. Важни карактеристики на спектрофотометриските методи се

1. *Широка примена.* Огромен број на неоргански и органски супстанции апсорбираат зрачење во ултравиолетовото и видливо подрачје. Многу супстанции кои не апсорбираат можат да бидат определени со претходна хемиска обработка, со која се доведуваат во форма која апсорбира.
2. *Висока осетливост.* Границите на детекција во ултравиолетовата и видлива спектроскопија се од 10^{-4} mol/L до 10^{-5} mol/L.
3. *Средна или висока селективност.* Ако може да се најде бранова должина на која анализот апсорбира сам, претходната обработка на пробата не е потребна, а со тоа се забрзува постапката.
4. *Голема точност.* Релативната грешка при определувањето на концентрацијата е во опсегот од 1 % до 5 %.
5. *Едноставност.* Спектрофотометрите се лесни и едноставни за употреба. Овие апарати многу лесно може да се автоматизираат, па новите инструменти се, без исклучок, микропроцесорски.

3.4 ПОСТАПКИ ПРИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИРАЊЕ

Прв чекор при спектрофотометриска анализа секако е подготовка на условите за работа за да се добијат точни и репродуцибилни резултати. Постапките кои се потребни за да се постигне тоа како и објасненијата за нив се дадени во текстот што следи.

- **Избор на бранова должина** - За да се постигне најголема осетливост, мерењето на апсорбанцата се врши на бранова должина каде анализот покажува максимална апсорпција. За оваа цел, прво,

треба да се сними апсорпциониот спектар во UV/Vis подрачјето и од него да се одбере дел од спектарот каде апсорбанцата е максимална, но промената на моларниот апсорпционен коефициент со брановата должина не е голема. Тоа значи дека најпогодни се брановите должини на широките и интензивни ленти.

- **Променливи кои влијаат на апсорбанцата** - Променливи кои можат да влијаат на апсорбанцата се: природата на растворувачот, pH на пробата, температурата, присуството на електролит(и) со висока концентрација и присуство на други супстанции кои апсорбираат на одбраната бранова должина.
- **Чистење и одржување на киветите** - Киветите се направени од материјал транспарентен за зрачењето од ултравиолетовиот и видлив дел од спектарот. За работа во ултравиолетовата област најчесто се користат кивети од кварц, а за спектрофотометрирање во видливиот дел од спектарот се користат стаклени и пластични кивети. Секогаш треба да се води сметка дека квалитетот на снимените спектри во голема мерка зависи од начинот на кој киветите се одржуваат.
- **Концентрациите на стандардите** кои се користат во спектрометријата треба да бидат што е можно поблизу до оние во образецот. Стандардните раствори, т.н. *стандардна серија*, се приготвуваат од еден основен стандард со разредување.

3.5 ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЗАВИСНОСТА ПОМЕЃУ АПСОРБАНЦАТА И КОНЦЕНТРАЦИЈАТА

После подготовката на стандардите и пробите за анализа како и на другите потребни услови, се пристапува кон мерење на апсорбанцата на избраната бранова должина. Потоа собраните податоци треба да се обработат на соодветен начин во зависност од тоа дали се работи за анализа на еднокомпонентен или повеќекомпонентен систем, за да се добијат резултатите од анализата.

3.5.1 ЕДНОКОМПОНЕНТЕН СИСТЕМ - ЛИНЕАРНА РЕГРЕСИЈА¹¹

Регресионата анализа наоѓа многу широка примена, не само во спектроскопијата и хемијата воопшто, туку и во многу други науки. Служи како алатка за *идентификување* на линеарна зависност помеѓу две одбрани променливи или, пак, за предвидување на однесувањето на зависно променлива, од независно променливата. Равенката на права во општ случај може да ја запишеме на следниот начин

$$y = a + bx$$

каде x е независно променлива, y е зависно променлива, b претставува коефициент на правец, а a претставува отсечок од ординатата ($x = 0$).

Дури и ако зависноста помеѓу две физички величини е линеарна, експерименталните резултати само по исклучок може да лежат на правата. Затоа треба да се изврши *проценка* која е вистинската права што ја дефинира зависноста на едната величина од другата (т.е. кои се вредностите за a и b).

Не само во спектроскопијата, туку во аналитиката воопшто, речиси сите методи за определување на концентрација, маса или количество се засноваат на линеарна зависност. Со мерење на дадената физичка величина на раствори со познати концентрации на аналитот се конструира т.н. *калибрациона крива*, а потоа врз основа на добиената линеарна зависност помеѓу *одзивот на инструментот* (т.е. зависно променливата - во нашиот случај апсорбанцата) и концентрацијата (независно променливата) се определува концентрацијата на аналитот во образецот.

Определувањето на вредностите на a и b може да се врши графички. Но таквиот начин на работа е доста субјективен, зашто во принцип можно е да се повлечат безброј прави. Пообјективен начин на работа е со определување на коефициентите a и b по методата на најмали квадрати. Тоа се врши според следните две формули.

¹¹ Во основа според: З. Здравковски, EXCEL низ примери од хемијата и сродните науки, Институт за Хемија, Скопје, 2000, 147

$$a = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \qquad b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

При ова не смеете да заборавиме дека при користењето на овој метод се прават следните постапки:

- Променливата x се мери без грешка,
- За секое x секое y е независно и со нормална распределба,
- Дисперзијата на y за секое x е еднаква,
- Се претпоставува дека стандардната девијација на двата вектора (x и y) е различна од нула.

Често пати, како што и се очекува, равенката на права на зависност на апсорбанцата од концентрацијата е $y = bx$. Тоа значи дека при $c_x = 0$ и $A_x = 0$, иако во некои случаи поради апсорпција на зрачење од страна на некои од конституентите на пробата, при $c_x = 0$, $A_x > 0$.

Примена на Excel за регресиона анализа

Функциите кои за оваа цел се користат во Excel се следните:

за отсечокот од ординатата (a):

INTERCEPT(Y,X)

за коефициентот на правец (b):

SLOPE(Y,X)

Мора да се води сметка дека прво се наведуваат вредностите за зависно променливата **Y**, а потоа за независно променливата **X**. Во спротивно добиените вредности нема да соодветствуваат на вистинските.

4. Литература

1. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 6th Ed., Saunders College Publishing, Fort Worth, 1992.
2. D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* 4th Ed., Freeman, New York, 1995.