

składem badanej próbki. Ze względu na dużą czułość metody spektrofotometryczne stosuje się do oznaczania małych stężeń substancji w próbce (do  $10^{-4}\%$ , tj. 1 ppm). Przez zastosowanie metod zagęszczania śladów czułość zwiększa się do  $10^{-6}$ , a nawet do  $10^{-7}\%$ . Między innymi dlatego spektrofotometria jest metodą najczęściej stosowaną w analizie śladów [3.17]. Rzadziej jest stosowana do oznaczania dużych stężeń substancji. Można wtedy stosować spektrofotometrię różnicową albo oznaczyć substancję w postaci związków o małych molowych współczynnikach absorpcji. Obiektywne oznaczenie spektrofotometryczne charakteryzuje się dużą precyzją. Błędy względne precyzji zawierają się zwykle w granicach  $\pm 2\text{--}\pm 5\%$  i można je zredukować o rząd wielkości przez zastosowanie spektrofotometrii różnicowej ( $\pm 0,2\text{--}\pm 0,5\%$ ). Kolorymetria charakteryzuje się prostą techniką pomiarową oraz często nieskomplikowaną i dość taną aparaturą. Dotyczy to przede wszystkim łatwo dostępnych kolorymetrów fotoelektrycznych. Oznaczenia spektrofotometryczne są dokładniejsze od wykonanych w kolorymetrach fotoelektrycznych, ale koszt spektrofotometrów jest o wiele większy. Stosując spektrofotometr można oznaczyć obok siebie kilka składników i wyeliminować całkowicie lub w dużym stopniu wpływ substancji przeszkadzających.

Spektrofotometria ustępuje niektórym metodom instrumentalnym pod względem czasochłonności. Jednoczesne oznaczenie tą metodą (bez wstępnego rozdzielania) większej liczby pierwiastków nie jest możliwe, w przeciwieństwie np. do spektrografii emisyjnej lub fluorescencji rentgenowskiej.

Spowodowane jest to dość małą selektywnością spektrofotometrii. Wzrost selektywności metod spektrofotometrycznych uzyskuje się dzięki maskowaniu jonów przeszkadzających i doborowi odpowiedniego pH środowiska reakcji. Pozwała to czasami na oznaczenie kilku składników obok siebie i wyeliminowanie całkowite lub w dużym stopniu substancji przeszkadzających. Nową techniką spektrofotometryczną pozwalającą niejednokrotnie na większą selektywność jest spektrofotometria pochodna. Wymaga ona jednak stosowania spektrofotometrów wyposażonych w mikroprocesory. Ostatnio obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania tą techniką. O ile do roku 1984 ukazały się 42 publikacje na jej temat, to w pięcioleciu 1990–1994 liczba publikacji wyniosła 138 [3.28]. Dotyczyły one oznaczania zarówno związków nieorganicznych, jak i organicznych, które ostatnio dominowały.

Spektrofotometria jest wśród metod instrumentalnych metodą najbardziej „chemiczną”. Zazwyczaj związki barwne tworzą się w wyniku reakcji z odpowiednimi odczynnikami spektrofotometrycznymi.

Metody spektrofotometryczne są powszechnie stosowane nie tylko w analizie chemicznej, lecz także w analizie biochemicznej, klinicznej i farmaceutycznej.

Spektrofotometria w podczerwieni (IR) ma dużo mniejsze zastosowanie analityczne. Jest ona natomiast ważną metodą identyfikacji i badania struktury związków organicznych.

## 3.3. Spektrometria ramanowska

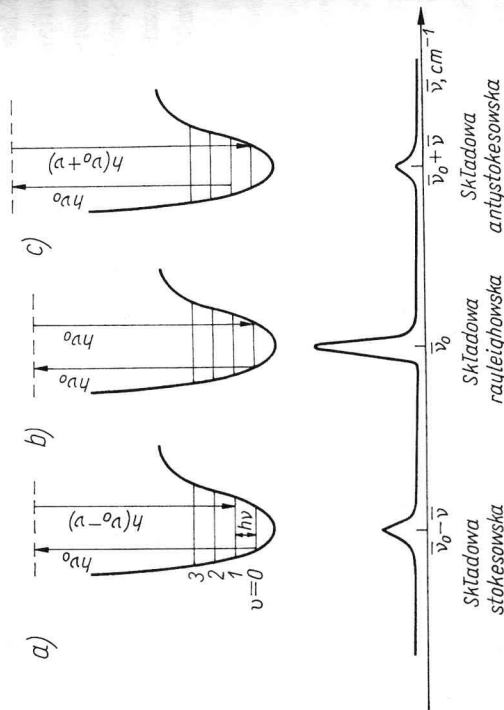
### 3.3.1. Podstawy teoretyczne

Spektrometria Ramana (R) obejmuje badania widm promieniowania elektromagnetycznego rozproszonego niesprężysto na cząsteczkach danej substancji. Zjawisko rozproszenia polega (zgodnie z teoriami klasycznymi) na wymuszaniu drgań wewnątrzatomowych i wewnątrzcząsteczkowych układów elektrycznych. Takie drganie dipoli elektrycznych indukowanych przez falę elektromagnetyczną odbywa się z częstotliwością fali wzbudzającej (różną od częstotliwości własnej drgającego oscylatora). Indukowany dipol elektryczny jest więc źródłem fali elektromagnetycznej o częstotliwości promieniowania wzbudzającego. Gdyby częstotliwość promieniowania wzbudzającego była równa częstotliwości własnej drgań dipoli, zachodziłaby absorpcja [3.21].

Zmiany stanu energetycznego oscylacyjno-rotacyjnego cząsteczek pod wpływem promieniowania mogą więc być rejestrowane nie tylko jako widma w podczerwieni, lecz także jako widma rozproszenia Ramana.

Po napromieniowaniu badanej cząsteczki monochromatycznym światłem o częstotliwości  $\nu_0$ , w wyniku absorpcji zwiększa się jej stan energetyczny o kwant  $h\nu_0$ . Cząsteczka osiąga wyższy – nietrwały – stan energetyczny i dąży do pozbycia się nadmiaru energii przez emisję fotonu o tej samej energii  $h\nu_0$  (energia oscylacyjno-rotacyjna cząsteczki się nie zmienia) lub fotonu o innej energii, jeżeli energia oscylacji cząsteczki zmieni się o kwant ściśle pasujący do jej poziomów oscylacyjnych.

Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z oscylującą cząsteczką można przedstawić za pomocą przejść energetycznych – rys. 3.48 [1.3], [3.22].



RYСУNEK 3.48. Schemat powstawania widma ramanowskiego: a) rozproszenie stokesowskie, b) rozproszenie Rayleigha, c) rozproszenie antystokesowskie,  $\nu_0$  – częstotliwość promieniowania wzbudzającego,  $\nu$  – częstotliwość oscylacji własnej

a) Rozproszenie Stokesa; część energii padającego kwantu  $h\nu_0$  cząsteczka zużywa na zwiększenie częstotliwości drgań własnych, resztę emituje w postaci promieniowania rozproszonego o energii  $h\nu_0 - h\nu$ . Po akcie emisji zasób energii cząsteczki jest większy o  $h\nu$ . Liczba faliw oscylacji zmienia się z  $\nu = 0$  do  $\nu = 1$ , w widmie pojawiają się linie leżące przy większej długości fali, tzw. *linia Stokesa*.

b) Rozproszenie Rayleigha; przed aktem absorpcji fotonu  $h\nu_0$  cząsteczka znajdowała się w stanie podstawowym o liczbie kwantowej oscylacji  $\nu = 0$ . Po czasie równym czasowi życia cząsteczki w stanie wzbudzonym zachodzi emisja promieniowania o tej samej częstotliwości  $\nu_0$ , cząsteczka wraca do stanu podstawowego.

c) Rozproszenie antystokesowskie; cząsteczka znajdująca się w wyższym stanie energetycznym niż podstawowy, o liczbie kwantowej oscylacji  $\nu = 1$ , po akcie absorpcji fotonu wzbudzającego  $h\nu_0$  emituje promieniowanie rozproszone o energii  $h\nu_0 + h\nu$  i wraca do stanu podstawowego

$\nu = 0$ . Powstający w widmie prążek leży w obszarze fal krótszych i nazywa się *prążkiem antystokesowskim*.

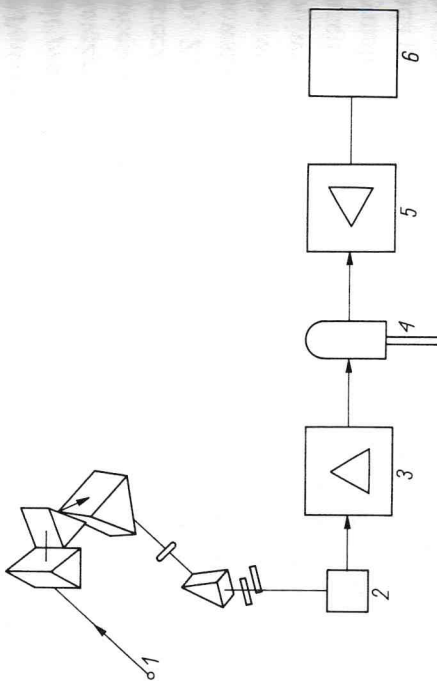
Natężenie pasm stokesowskich jest około 100 razy większe niż pasm antystokesowskich, gdyż w temperaturze pokojowej tylko niewielka liczba cząsteczek substancji znajduje się w stanie oscylacyjnym wzbudzonym ( $\nu > 0$ ). Z tego powodu w praktyce korzysta się tylko z obszaru pasm stokesowskich. Linie stokesowskie i antystokesowskie są położone symetrycznie względem pasma wzbudzającego o częstotliwości  $\nu_0$ , gdyż ich częstotliwości wynoszą  $(\nu_0 - \nu)$  i  $(\nu_0 + \nu)$ . Linie te są indywidualną cechą substancji, nie zależą od częstotliwości promieniowania wzbudzającego. Maksymalna liczba pasm w widmie Ramana (bez pasm Rayleigha) odpowiada podwojonej wartości drgań normalnych. Dla nieliniowej  $N$ -atomowej cząsteczki liczba drgań normalnych wynosi  $3N - 6$ . Ze względu na reguły wyboru liczba obserwowanych pasm jest zwykle mniejsza. W widmie ramanowskim aktywne są drgania symetryczne względem środka symetrii (szkielet węglowy), natomiast drgania asymetryczne (grup funkcyjnych) powodują powstawanie widm w podzerwieni. Wynika stąd, że oba rodzaje widm oscylacyjnych uzupełniają się wzajemnie.

Zgodnie z ogólną regułą najintensywniejsze linie w widmie Ramana odpowiadają drganiom wiązań niepolarnych, które mogą ulegać polaryzacji.

Badanie widm Ramana umożliwia identyfikację cząsteczek, badanie ich struktury, a także analizę ilościową.

### 3.3.2. Schemat spektrometru ramanowskiego

W spektrometrii ramanowskiej stosuje się monochromatyczne promieniowanie wzbudzające z zakresu widzialnego lub nadfioletu. Dawniej spektrometry były wyposażone w lampy rтięciowe, obecnie stosuje się głównie lasery helowo-neonowe emitujące czerwoną linię  $\lambda = 622,3$  nm o dużym natężeniu i lasery argonowe o dwóch silnych liniach 514,5 i 488 nm. Ostatnio stosuje się lasery barwnikowe umożliwiające przetwarzanie na różne długości fal. Pomiar światła rozproszonego odbywa się najczęściej pod kątem  $90^\circ$  do kierunku padania promieniowania wzbudzającego. Na rysunku 3.49 [3.33] przedstawiono schemat spektrometru do rejestracji widm Ramana. Ze źródła promieniowania  $I$  (laser) za pomocą



RYSUNEK 3.49. Schemat spektrometru ramanowskiego

układu optycznego wyodrębnia się monochromatyczną wiązkę promieniowania, która pada prostopadle na kuwetę z próbką 2. Promieniowanie emitowane przez próbkę pada na monochromator siatkowy 3 umieszczony pod kątem  $90^\circ$ , skąd kierowane jest do detektora 4 – najczęściej fotopowielacza, wzmacniacza 5, a następnie do rejestratora 6.

### 3.3.3. Znaczenie spektrometrii ramanowskiej

Podobnie jak widma w podczerwieni widma ramanowskie stosuje się głównie do identyfikacji substancji i do badania struktury cząsteczek. Podstawą analizy ilościowej jest wprost proporcjonalna zależność natężenia pasma  $I$  od stężenia  $c$  substancji nasświetlanej wiązką wzбудzającą

$$I = ac \quad (3.50)$$

gdzie  $a$  – współczynnik rozproszenia charakterystyczny dla danej substancji.

Do wyznaczenia stężenia substancji w analizowanej próbce stosuje się metodę krzywej wzorcowej sporządzonej na podstawie widm serii rozcieńczeń o znanym stężeniu.

Do zalet spektrometrii ramanowskiej należy to, że próbka może być w dowolnym stanie skupienia, a próbki proszkowe nie wymagają wstęp-

niego przygotowania. Można rejestrować widma próbek kilkumiligramowych lub mniejszych (najmniejsze stężenie wynosiło  $0,04 \text{ mg/l}$  [3.21]). Probka ciepla może być umieszczona w naczynku szklanym pojemności 0,1 ml lub zatopiona w kapilarach szklanych pojemności 0,02 ml. Stosownie kuwet szklanych jest znacznie łatwiejsze niż higroskopijnych okienek z NaCl lub KCl używanych w podczerwieni. Bez trudu daje się rejestrować widmo w obszarze małych liczb falowych (poniżej  $400 \text{ cm}^{-1}$ ), co dla zakresu podczerwieni wymaga specjalnych urządzeń. Uzyskane widmo jest prostsze, ponieważ natężenie nadtonów i tonów złożonych (patrz s. 190 i 195) jest dużo mniejsze niż w podczerwieni. Tak więc widma Ramana są nie tylko uzupełnieniem widma w podczerwieni, lecz mają także wiele zalet, dzięki którym spektrometria ramanowska wykazuje często przewagę nad spektrofotometrią IR.

## 3.4. Spektrometria fluorescencyjna cząsteczkowa

Metoda badania substancji na podstawie pomiaru natężenia promieniowania fluorescencyjnego cząsteczek nazywa się *fluorymetrią* (analiza fluorescencyjna, analiza fluorymetryczna), a na podstawie pomiaru natężenia promieniowania fosforescencyjnego cząsteczek – *fosforymetrią*. Fluorymetria i fosforymetria należą do emisyjnych metod cząsteczkowych, natomiast do emisyjnych metod atomowych należy fluorescencyjna spektrometria atomowa (s. 137) i spektrometria fluorescencyjna rentgenowskiej (s. 341). W tym rozdziale omówiono fluorymetrię i fosforymetrię. W metodach tych wzбудzenie odbywa się przez pochłonięcie promieniowania o odpowiedniej częstotliwości (wzбудzenie optyczne).

### 3.4.1. Fluorescencja i fosforescencja

Fluorescencja i fosforescencja są przypadkami fotoluminescencji. Termin luminescencja wprowadzony przez Wiedemanna obejmuje wszelkiego rodzaju emisję promieniowania elektromagnetycznego (niezależnie od promieniowania termicznego), następującą w czasie nie krótszym niż