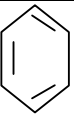


# ANALIZA SPECTROFOTOMETRICĂ CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ

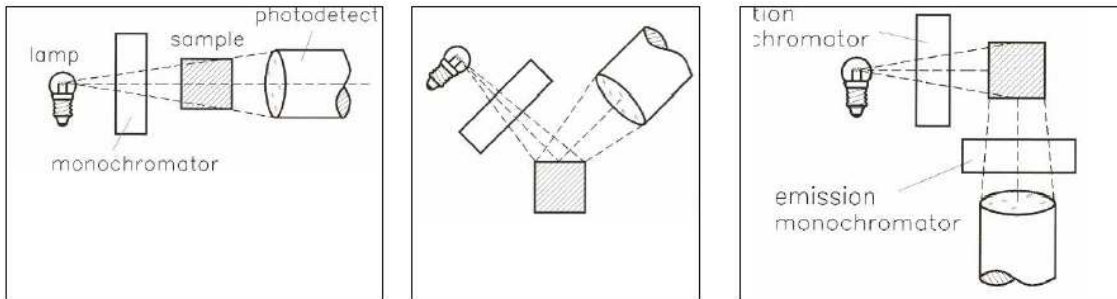
Spectrometria de absorbție moleculară are aplicații atât în analiza cantitativă cât și în cea calitativă. Spectrometria de absorbție moleculară efectuată în cele trei domenii spectrale UV-VIS-IR nu dă aceleași rezultate în ce privește analiza calitativă și cantitativă. Astfel datorită unor maxime de absorbție limitate în domeniul UV-VIS acest domeniu este folosit preponderant în analiza cantitativă. Datorită domeniului IR este folosit preponderent în domeniul analizei calitative.

<b>Lungimi de undă și poziții ale benzii de absorbție specifice maximilor de absorbție pentru legături cromofore și grupări funcționale în domeniul spectral UV și IR</b>			
Domeniul UV		Domeniul IR	
Grupare cromoforă	Lungime de undă( $\lambda_{\max}$ )[nm]	Grupare funcțională	Poziția benzii de absorbție [ $\text{cm}^{-1}$ ]
C=C	175	C-H	2850-2960
C≡C	175	=C-H	3020-3100
	195	C=C	1650-1670
	223	≡C-H	3300
C=O	160	C≡C	2100-2260
	185	C-Cl	600-800
	280	C-Br	500-600
R-NO <sub>2</sub>	200	C-I	500
	274	O-H	3400-3640
C≡N	165	C-OH	1050-1150
C=C-C=C	217	$\text{>C-H}$	3030
C=C-C=O	220		
	315	N-H	3310-3500
C=C-C≡C	220	C-N	1030-1230
	230	C=O	1670-1780
	184	COOH	2500-3100
	204	C≡N	2210-2260
	255	NO <sub>2</sub>	1540

## Analiza spectrofotometrică cantitativă

Intensitatea unui fascicol cu radiații luminoase ce cade pe o suprafață lichidă, gazoasă sau solidă suferă absorbție, reflecții, refracții sau provoacă fluorescență (fig.1). În fotometria moleculară cantitativă se determină cantitatea de radiații:

- absorbită de probă la traversarea acesteia de o radiație electromagnetică (fotometrie la substanțe lichide transparente),
- absorbită de probă la reflexia radiației de probă (fotometrie la corpuri solide netransparente),
- emisă de probă pe o lungime de undă superioară lungimii de undă a radiației incidente (fotometrie de fluorescență și fosforescență),
- cantitatea de radiație absorbită de probă printr-o emisie de aceeași lungime de undă ca aceea specifică specie chimice analizate (spectrofotometrie de absorbție atomică).



**Fig 1.** Fenomene optice ce au loc la trecerea unui fascicul de radiație printr-un mediu transparent lichid.  $I_0$ -intensitatea radiației incidente,  $I_a$ -intensitatea radiației absorbite,  $I_t$ -intensitatea radiației transmise.

În cazul fotometriei de absorbție diminuarea intensității radiației depinde de grosimea stratului pe care-l traversează aceasta, de natura substanței sau substanțelor care compun stratul și de concentrația substanțelor din strat. Aceste dependențe sunt valabile pentru orice lungime de undă și pentru orice mediu omogen, în care scăderea intensității radiației se datorează numai absorbției, indiferent dacă mediul absorbant este gaz, lichid, solid sau soluție.

$$I_0 = I_a + I_t$$

Din punct de vedere matematic aceste dependențe sunt descrise de legea Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I_t} = a \cdot b \cdot c$$

unde:

- a- coeficient de absorbție (absorbanță) sau coeficient de extincție ce reprezintă o mărime specifică substanței
- b- grosimea stratului străbătut de radiație
- c- concentrația substanței

Această lege stă la baza analizei cantitative colorimetrice și fotometrice. Trebuie specificat că se face abstracție de celălalte fenomene fizice precum difuziune, refracție, polarizare. În această analiză se mai definesc următoarele mărimi:

- **Transmitanța (T):**

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

- **Indicele de transmitanță**- transmitanța unui strat cu grosimea de 1 cm.
- **Opacitatea** (inversul transmitanței):

$$\frac{1}{T} = \frac{I_0}{I_t}$$

sau sub formă procentuală:  $\%T = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100$

- **Absorbanța (A)** logaritmul cu semn schimbat (cologaritmul) al transmisiei (transmitanței):

$$A = -\log T$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I_t} = a \cdot b \cdot c$$

**Absorbanța (A) = Extincție (E) = Densitatea optică (D)**

Având în vedere expresia procentuală a transmitanței (T) se poate scrie pentru absorbanță (A) următoarea relație:

$$A = \log \frac{100}{\%T} = \log 100 - \log \%T$$

sau:

$$A = 2 - \log \%T$$

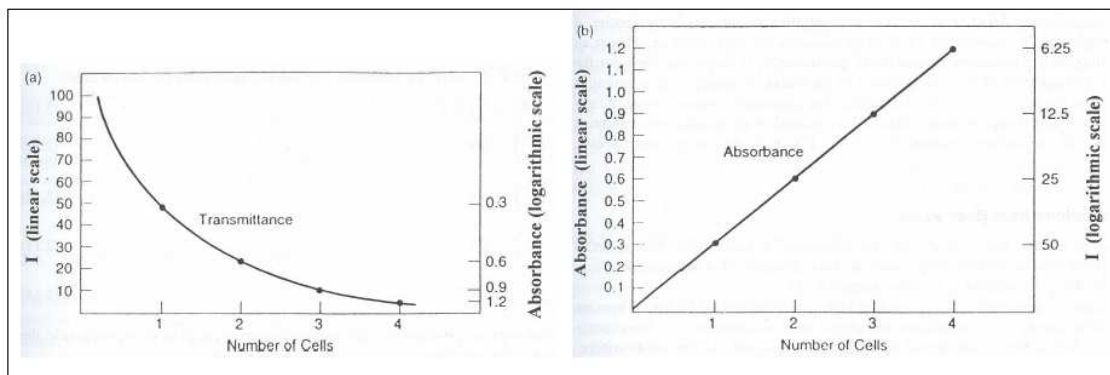
și

$$\%T = \text{antilog}(200 - A)$$

Relațiile de mai sus reprezintă defapt expresia matematică a legii Lambert-Beer. Absorbanța este aditivă, motiv pentru care mai multe straturi din aceeași substanță, cu aceeași concentrație, suprapuse dau o absorbție totală egală cu suma absorbanțelor parțiale.

O aplicație importantă a legii Lambert-Beer o constituie determinarea concentrației anumitor specii chimice dintr-un amestec lichid, solid sau gazos de substanțe. Pentru a putea individualiza această determinare este nevoie de separarea informativă acelei specii chimice din amestec prin condensarea numai a valorii absorbantei specifice corespunzătoare lungimii de undă la care acea specie are absorbție maximă. În acest scop este necesar ca radiația incidentă folosită pentru iradiere să fie monocromatică cu lungimea de undă corespunzătoare absorbantei maxime a acelei specii chimice iar legea Lambert-Beer are expresia:

$$A = \epsilon_{\text{mol}} \cdot c_{\text{mol}} \cdot b$$

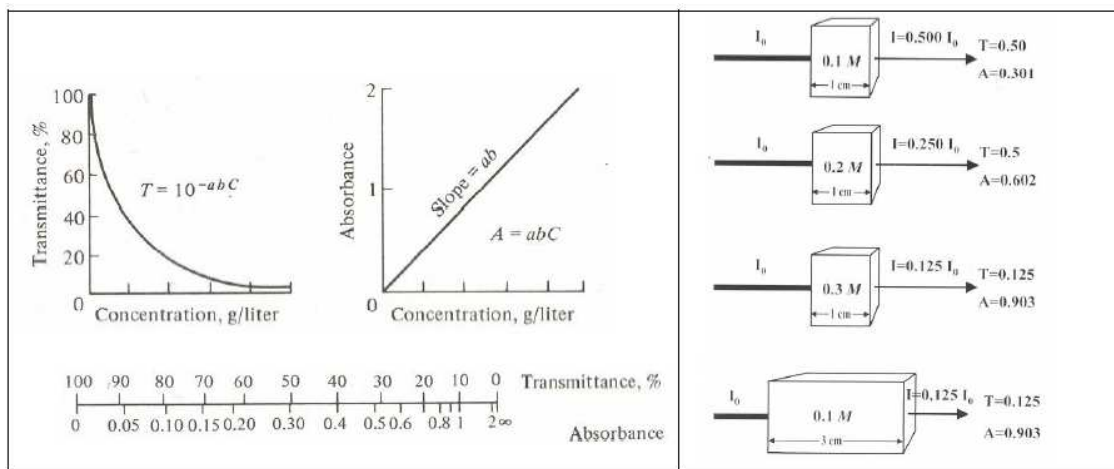


**Fig.2.** Expresia grafică a tipurilor de dependențe între transmitanță (T), absorbanță (A), intensitatea radiației ( $I_t$ ) și grosimea stratului de soluție (b).

**Coefficientul molar de absorbție ( $\epsilon$ )** reprezintă raportul dintre absorbanță și produsul dintre concentrația molară a soluției și grosimea stratului de soluție străbătut de radiație:

$$\epsilon_{\text{mol}} = \frac{A}{c_{\text{mol}} \cdot b}$$

Coefficientul molar de absorbție reprezintă o constantă a substanței absorbante, el caracterizează sensibilitatea unei reacții de culoare și limitei de concentrații între care este posibilă dozarea substanței prin fotometrie. Mărimea acestui coeficient variază în limite largi. Legea Lambert-Beer este valabilă la toate tipurile de spectroscopie de absorbție atomică și moleculară.



**Fig.3.** Expresia grafică a dependenței dintre:a) transmisia și concentrația soluției, b) dintre absorbantă și concentrația soluției, c) dispunerea gradațiilor de transmisie și de absorbantă pe sacara gradată a unui spectrofotometru analog, d) prezența sugestivă a influenței transmisiei și absorbantei de către grosimea de strat respectiv de către concentrație.

În ambele cazuri arătate mai sus pentru determinarea concentrației pe cale fotometrică pentru a avea determinare matematică trebuie să existe doar două variabile în expresia legii Lambert-Beer: una dependentă ,concentrația-c, și una independentă (absorbanța-A ,în primul caz, sau grosimea de strat-b ,în cel de-al doilea caz) ceilalți parametri din relație trbuind să fie constanți. Pentru rezoluție și sensibilitate ridicată se folosește o radiație luminoasă cu o bandă spectrală îngustă a cărei lungime de undă trebuie să se plaseze în zona maximului de absorbție a speciei de analizat. În cazul în care maximul de absorbție spectrală nu este cunoscut el se determină din reprezentarea grafică a absorbției la diferite lungimi de undă.

### Abateri ale legii Lambert-Beer

Așa cum rezultă din legea Lambert-Beer, pentru o anumită substanță dată și o grosime de strat precisă, dependența între absorbție (A) și concentrație este lineară (fig.4.). Această dependență este valabilă însă numai în domeniul concentrațiilor mici de până la  $10^{-2}$  moli/l. În asemenea soluții diluate fiecare moleculă a substanței de analizat absoarbe lumină monocromatică independentă de moleculele vecine. La concentrații mai mari se ajunge la erori importante de măsurare. Soluția determinării concentrației pe cale fotometrică și la soluții concentrate constă în diluarea controlată a acestora sau dacă nu este posibil folosirea unor cuve de grosime mai mică. Dimpotrivă dacă concentrațiile sunt foarte mici, sub limita de detecție, se folosesc cuve cu grosimea stratului de soluție mare (până la 100 mm la lichide și sute de mm la gaze).

Dacă substanța analizată își modifică proprietățile fizico-chimice în funcție de concentrație apar abateri de la liniaritate (fig.5). Aceste abateri pot avea două cauze: chimice și fizice. Cauzele chimice sunt generate de modificarea coeficientului molar de extincție (de absorbție) ca urmare a apariției unor reacții chimice la diferite concentrații. Asemenea reacții deplasează echilibrul chimic, pot apărea complecși, se modifică indicele de refracție. Cauzele fizice sunt generate de:

- Reflexie și absorbție de pe pereții cuvelor. De regulă, la celule de grosime normală, abaterea de la liniaritate, datorită reflexiei, este mică și se poate neglija. La celule de grosime mică a soluției această abatere nu mai poate fi neglijată și este necesară practicarea unor factori de corecție.
- Imposibilitatea asigurării unor radiații incidente monocromatice. În situația unei radiații cu mai multe lungimi de undă în compunere,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ , legea Lambert-Beer este valabilă separat pentru fiecare lungime de undă în parte. Acest lucru duce însă la un coeficient mediu de extincție molară ( $\epsilon$ ) diferit de coeficientul corespunzător unei anumite lungimi de undă.
- Variații de temperatură. La determinări de mare precizie se lucrează în condiții termostatate deoarece se face simțită influența modificărilor de temperatură asupra indicelui de reflexie, absorbție și refracție.
- Turbiditate ridicată a probei. La probe turbide se ajunge la împrăștierea importantă ale radiației incidente, care sunt percepute de senzorul fotoelectric drept concentrații, ceea ce duce la erori importante de măsurare.

Domeniul de valabilitate a legii Lambert-Beer se determină experimental pentru fiecare caz în parte prin construirea graficului absorbției (A) sau a transmisiei (T) în funcție de concentrație (c).

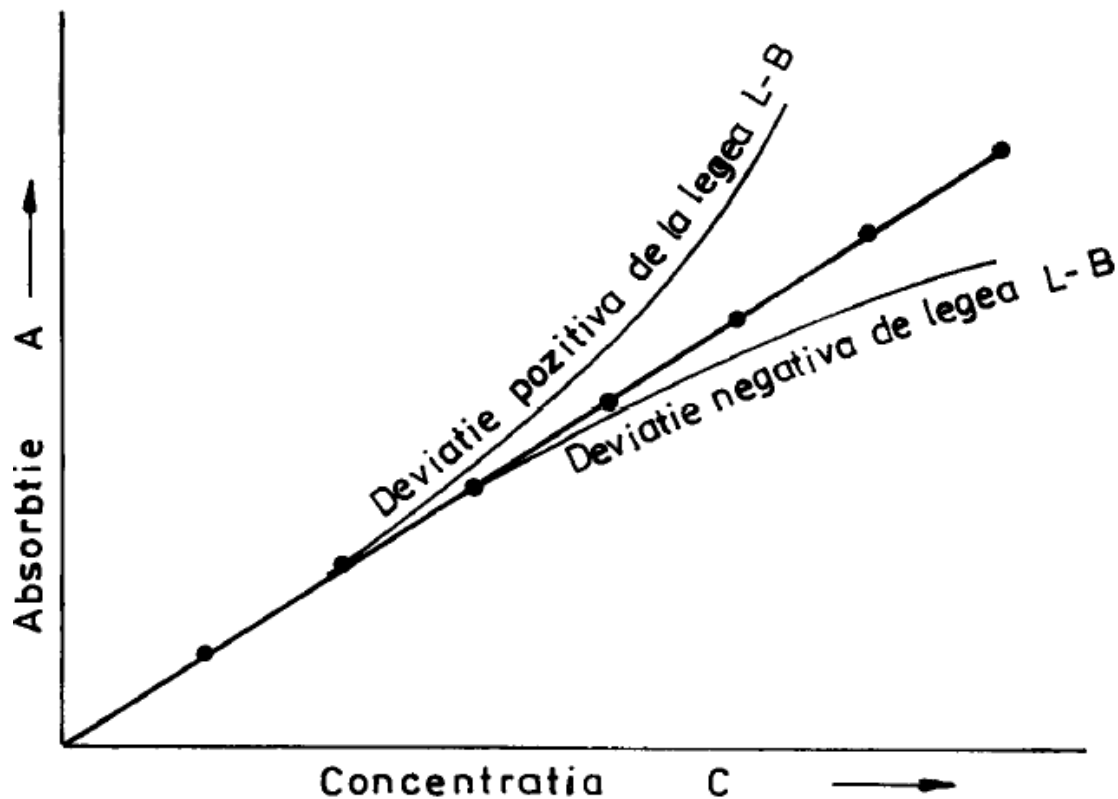


Fig.5. Abaterea de la liniaritate

### Determinarea concentrației unei substanțe din dependența dintre absorbantă și concentrație

În acest caz este necesar ca absorbanta să depindă numai de concentrație speciei de analizat, respectiv:

- Grosimea stratului soluției de analizat,
- Lungimea de undă a radiației,
- Natura solventului, natura substanței de analizat,
- Temperatura soluției de analizat,
- pH soluției de analizat.

trebuie cunoscute și menținute constant pe toată perioada măsurării. Măsura în care se reușește acest lucru influențează în mare parte performanța în fotometria cantitativă. Având în vedere legea lui Lambert-Beer determinarea concentrației substanței de analizat din valoarea măsurată a absorbantei (sau extincției), în condițiile grosimei constante a soluției și a celorlalți parametri enumerați mai sus, se poate face în două moduri:

- cu ajutorul unui etalon de concentrație cunoscută,
- cu ajutorul unui factor constant (coeficient molar de extincție).

### **Determinarea concentrației prin comparație cu un etalon de concentrație cunoscută.**

Cea mai simplă metodă de determinare a concentrației pe cale fotometrică este aceea de a compara absorbanta (A) unei soluții de concentrație cunoscută a substanței de analizat cu absorbanta ( $A_x$ ) a unei soluții de concentrație necunoscută a aceleiași substanțe. Este evident că fiind vorba de aceeași substanță, absorbantele molare sunt identice iar substanța analizată trebuie să aibă aceeași grosime, ceea ce presupune folosirea de cuve identice. Expresia celor două extincții este:

$$A = \epsilon_{mol} \cdot b \cdot c$$

$$A_x = \epsilon_{mol} \cdot b \cdot c_x$$

Unde:  $\epsilon_{mol}$ -coeficientul de extincție molară printru soluția de concentrație cunoscută, respectiv de concentrație necunoscută,

b-grosimea probei din cuvă,

c-concentrația cunoscută a probei de referință,

$c_x$ - concentrația necunoscută a probei analizată.

Prin împărțirea celor două ecuații se obține:

$$\frac{A}{A_x} = \frac{\epsilon_{mol} \cdot b \cdot c}{\epsilon_{mol} \cdot b \cdot c_x}$$

Iar după simplificarea coeficientului molar și a grosimii stratului de electrolit care e sunt aceleași pentru ambele probe, ecuația de mai sus devine:

$$\frac{A}{A_x} = \frac{c}{c_x}$$

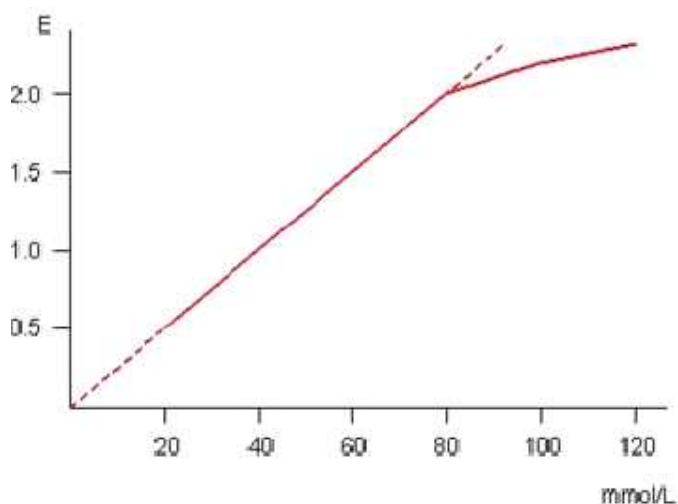
Ecuația din care se poate calcula concentrația necunoscută este:

$$c_x = \frac{A_x}{A} \cdot c$$

Calculul concentrației prin comparație este folosit totdeauna atunci când una din componentele sistemului suferă variații în timp. Deasemenea este valabil numai atunci când dependența între absorbantă și concentrație este liniară. În cazul în care această dependență este neliniară apar erori de determinare care sunt cu atât mai mari cu cât abaterea de la liniaritate este mai mare. Pentru siguranța determinării concentrației în zona liniară, mai ales dacă este vorba de concentrații mai mari, se recomandă realizarea unui grafic de etalonare cu concentrații cunoscute. În domeniul concentrațiilor mici se obține o dependență liniară între absorbantă și concentrație, iar la concentrații mari dependență neliniară. Determinarea concentrației necunoscute a probei analizate cu ajutorul curbei de etalonare se face prin extrăchilarea absorbantei măsurate pentru acea probă pe axa abscisei unde se citește concentrația ei. Pentru determinări de precizie se recomandă numai lucrul în zona liniară a curbei de etalonare. La fotometre moderne prevăzute cu microprocesor, perechile de valori de



absorbție-concentrație cu care se realizează curba de etalonare sunt memorate, extrapolarea efectuându-se automat, apararul afișând direct numeric valoarea concentrației.



**Fig.6.** curbă de etalonare cu evidențierea limitei superioare de liniaritate.

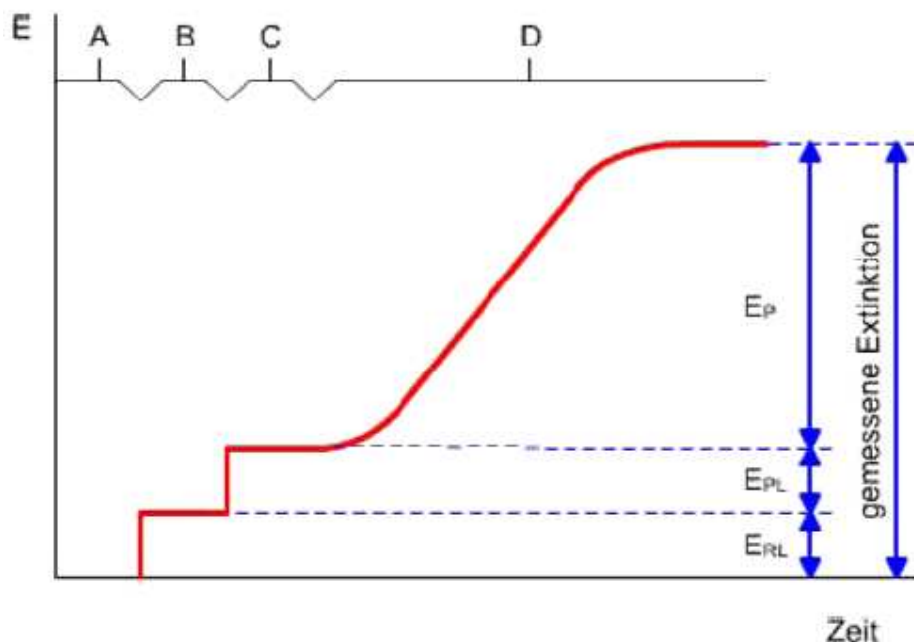
**Erori posibile la determinarea absorbanței soluțiilor.** Absorbanța finală măsurată ( $A_{\text{măsurat}}$ ) în cadrul unei determinări pentru o soluție este o absorbantă cumulativă și se compune din:

- absorbanta probei de analizat sau a produsului de reacție ( $A_{\text{probă}}$ ),
- absorbanta datorată culorii proprii a probei ( $A_{\text{culoare proprie}}$ ),
- absorbanta datorată reactivilor ( $A_{\text{reactiv}}$ ).

Absorbanța datorată culorii proprii a probei și absorbanta datorată reactivilor denaturează valoarea reală a absorbantei speciilor chimice de analizat sau a produsului de reacție ca atare la măsurări de mare acuratețe, aceste absorbante se scad din valoarea absorbantei globale măsurate, motiv pentru care poartă și denumirea de absorbanta de compensare și se poate scrie:

$$A_{\text{măsurat}} = A_{\text{probă}} + A_{\text{culoare proprie}} + A_{\text{reactiv}}$$

sau exprimând grafic se obțin dependențele din figura:



**Fig.7.** Componentele absorbanței măsurate și succesiunea determinării în timp a celor trei componente.

- A- Fotometrul este reglat la zero,
- B- Se fotometrează reactivii fără reactivul de bază,
- C- Se introduce proba ce prezintă o culoare individuală și se fotometrează ,
- D- Se adaugă reactivul de bază, are loc reacția de culoare după care se fotometrează din nou.

Absorbanța finală va cuprinde absorbanta probei măsurate dar și cele două absorbante nedorite de compensare.

### **Determinarea concentrației cu ajutorul unui factor constant (coeficient molar de absorbantă)**

La majoritatea determinărilor fotometrice de absorbție, există în domeniul de măsurare o dependență liniară între concentrația substanței de analizat și absorbția de lumină, astfel încât să se poată aplica legea Lambert-Berr. În această situație dacă coeficientul molar de extincție este cunoscut se poate determina concentrația substanței de analizat fără curbă de etalonare folosind legea Lambert-Beer:

$$c_{mol} = \frac{A}{\epsilon_{mol} \cdot b}$$

## Determinarea concentrației necunoscute a substanței din dependența dintre grosimea de strat și concentrații cunoscute ale substanței

La acest procedeu se egalizează absorbția soluției de concentrație cunoscută cu absorbția soluției de concentrație necunoscută prin modificarea grosimii stratului de soluție. La egalizarea intensităților luminoase transmise prin cele două soluții, absorbțiile:

$$A_1 = \varepsilon \cdot b_1 \cdot c_1$$

$$A_x = \varepsilon \cdot b_x \cdot c_x$$

vor fi egale între ele:  $A_1 = A_x = b_1 \cdot c_1 = b_x \cdot c_x$

de unde :  $c_x = \frac{b_1}{b_x} \cdot c_1$

Din relația de mai sus rezultă și principiul determinării concentrației ( $c_x$ ) și anume determinarea se rezumă la măsurarea grosimii stratului ( $b_1$  și  $b_x$ ), efectuarea raportului între ele și înmulțirea raportului cu valoarea concentrației cunoscute ( $c_1$ ).

## Determinarea pe cale fotometrică a concentrațiilor amestecurilor de substanțe

Legea Lambert-Beer se poate aplica și la soluții ce conțin mai mulți componenți cu condiția ca între aceștia să nu existe interacțiuni. Pentru exprimarea extinției o soluție ce conține mai mult de o specie se poate folosi următoarea expresie:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n$$

Unde :

$\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_n$ - coeficienți de absorbanță molară ai substanțelor 1,2,...,n din soluție

$c_1, c_2, c_n$  – concentrațiile molare ale substanțelor 1,2,...,n în soluție

b- grosimea stratului de soluție.

Relația de mai sus este defapt expresia matematică a aditivității absorbanței unei soluții la o lungime de undă dată în funcție de absorbanțele substanțelor ce compun soluția. Pentru două specii absorbante ,x și y, absorbanța amestecului, este dată de relația:

$$A = \varepsilon_x \cdot b \cdot c_x + \varepsilon_y \cdot b \cdot c_y$$

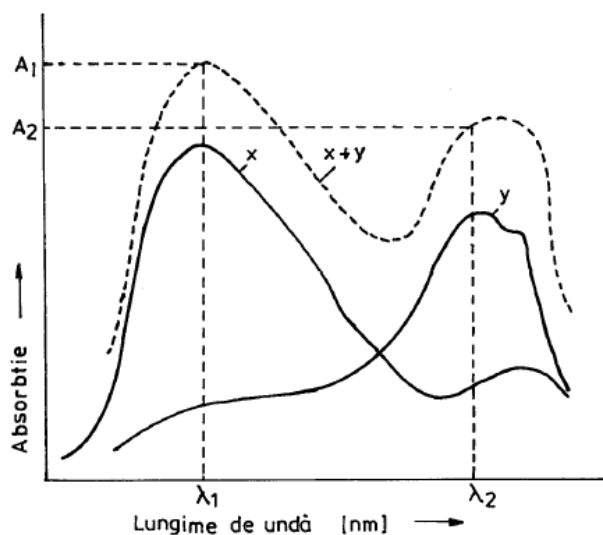
Unde:  $\epsilon_x, \epsilon_y$ - coeficienții de absorbanță molari ai substanțelor x,y

b- grosimea stratului absorbant

$c_x, c_y$ - concentrațiile celor două substanțe din amestec.

Dacă se determină absorbanța celor două substanțe și absorbanța amestecului lor se obțin spectre din fig. 8. în care cu linie continuă sunt reprezentate spectrele de absorbtie ale celor două substanțe pure în soluție, iar cu linie punctată spectrul de absorbtie al amestecului celor două substanțe.

**Fig.**  
**8**



Spectrele de absorbtie ale substanțelor pure (x) și (y) și spectrul de absorbtie a amestecului (x) și (y) , la aceleași concentrații .

Deoarece sunt două substanțe a căror concentrație trebuie determinată, vor trebui efectuate două măsurători. Practic, se aleg două lungimi de undă pentru măsurare, una la care are loc maximul absorbtiei pentru substanța x ( $\lambda_1$ ) și cealaltă la care are loc maximul de absorbtie pentru substanța y ( $\lambda_2$ ). Se poate scrie atunci:

$$A_1 = A_{x_1} + A_{y_1} = \epsilon_{x_1} \cdot b \cdot c_x + \epsilon_{y_1} \cdot b \cdot c_y$$

$$A_2 = A_{x_2} + A_{y_2} = \epsilon_{x_2} \cdot b \cdot c_x + \epsilon_{y_2} \cdot b \cdot c_y$$

Unde:  $A_1$  și  $A_2$ - absorbanțele amestecului la lungimile de undă  $\lambda_1, \lambda_2$ ,

$A_{x_1}$  și  $A_{y_1}$  – absorbanțele substanțelor x și y la lungimea de undă  $\lambda_1$ ,

$A_{x_2}$  și  $A_{y_2}$  - absorbanțele substanțelor x și y la lungimea de undă ,  $\lambda_2$ ,

$\epsilon_{x_1}$  și  $\epsilon_{y_1}$  -coeficienți de absorbanță molari ale substanțelor x și y la lungimea de undă

$\lambda_1$ ,

$\epsilon_{x,\lambda_2}$  și  $\epsilon_{y,\lambda_2}$  -coeficienți de absorbantă molară ale substanțelor x și y la lungimea de undă  $\lambda_2$ ,

Cunoscându-se concentrațiile molare ale celor două soluții pure prin citirea absorbțiilor celor două soluții la lungimile de undă  $\lambda_1$  și  $\lambda_2$ , se determină extincțiile lor molare. Din sistemul de două ecuații de mai sus singurele necunoscute rămân  $c_x$  și  $c_y$  care se pot calcula prin găsirea soluției sistemului. Dacă spectrul substanței x nu se suprapune peste cel al substanței y la lungimea de undă  $\lambda_2$ , concentrația substanței y va poate fi determinată prin-o singură citire a absorbției acesteia la lungimea de undă  $\lambda_2$ . Concentrația substanței x poate fi apoi calculată din absorbția amestecului la lungimea de undă  $\lambda_1$  din care se scade absorbția substanței y la aceeași lungime de undă, așa cum rezultă din ecuațiile sistemului. Atunci când concentrația unei substanțe din amestec este mult mai mare decât a celeilalte absorbția sa va fi mult mai mare la ambele lungimi de undă, astel încât determinarea concentrației celei de a doua substanțe se va face cu erori. Aparatele moderne digitale au încorporate programe de calcul ce permit determinarea simultană a concentrației substanțelor din amestec.