Chapter 14. Applications of Ultraviolet-Visible Molecular Absorption Spectrometry

14C-2 슬릿 나비의 효과

- 슬릿 나비 변화의 효과 : 기체

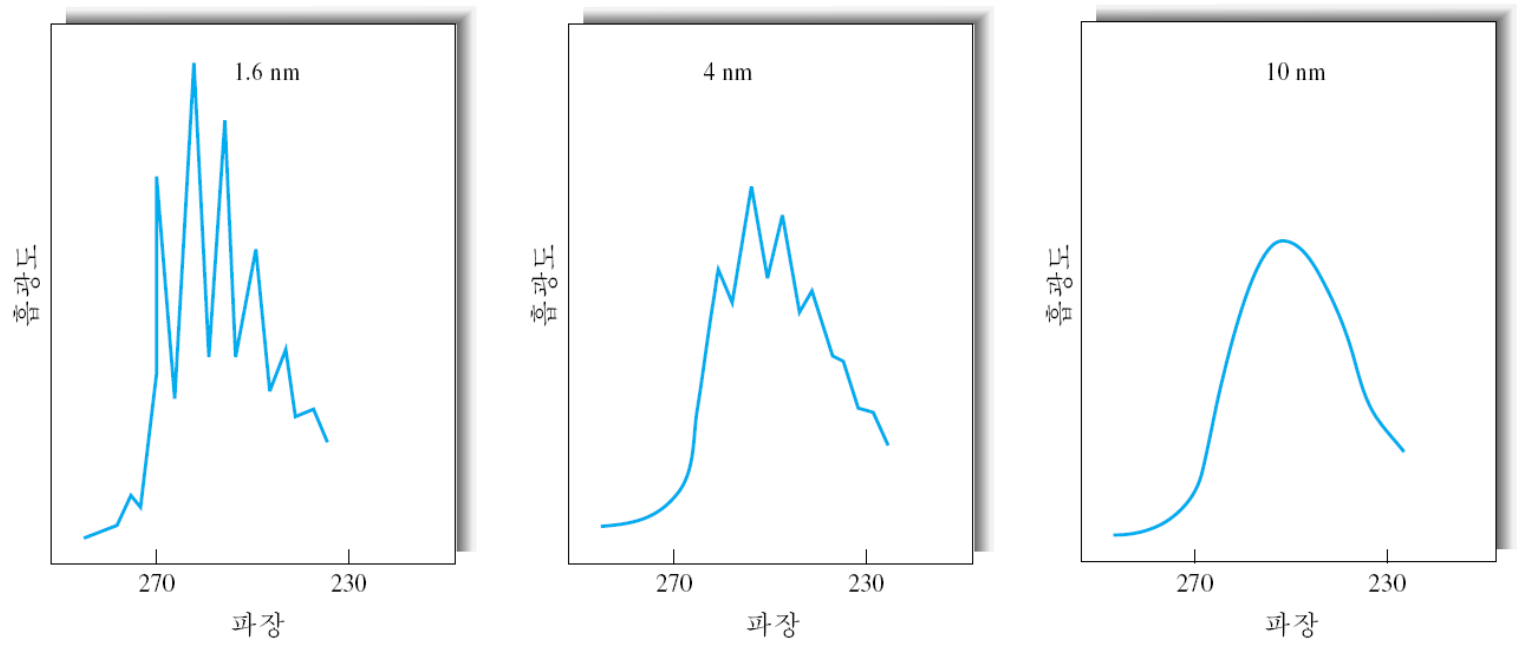


그림 13-8 벤젠 증기시료에 대해 자세한 스펙트럼구조에 대한 띠폭의 효과. 스펙트럼 띠폭이 증가함에 따라 스펙트럼에서 자세한 구조는 사라진다. 10 nm의 띠폭에서 다만 넓은 흡수 띠가 관찰된다.

- 용액 스펙트럼
  - 정성적 스펙트럼 : 최소의 슬릿 나비로 측정

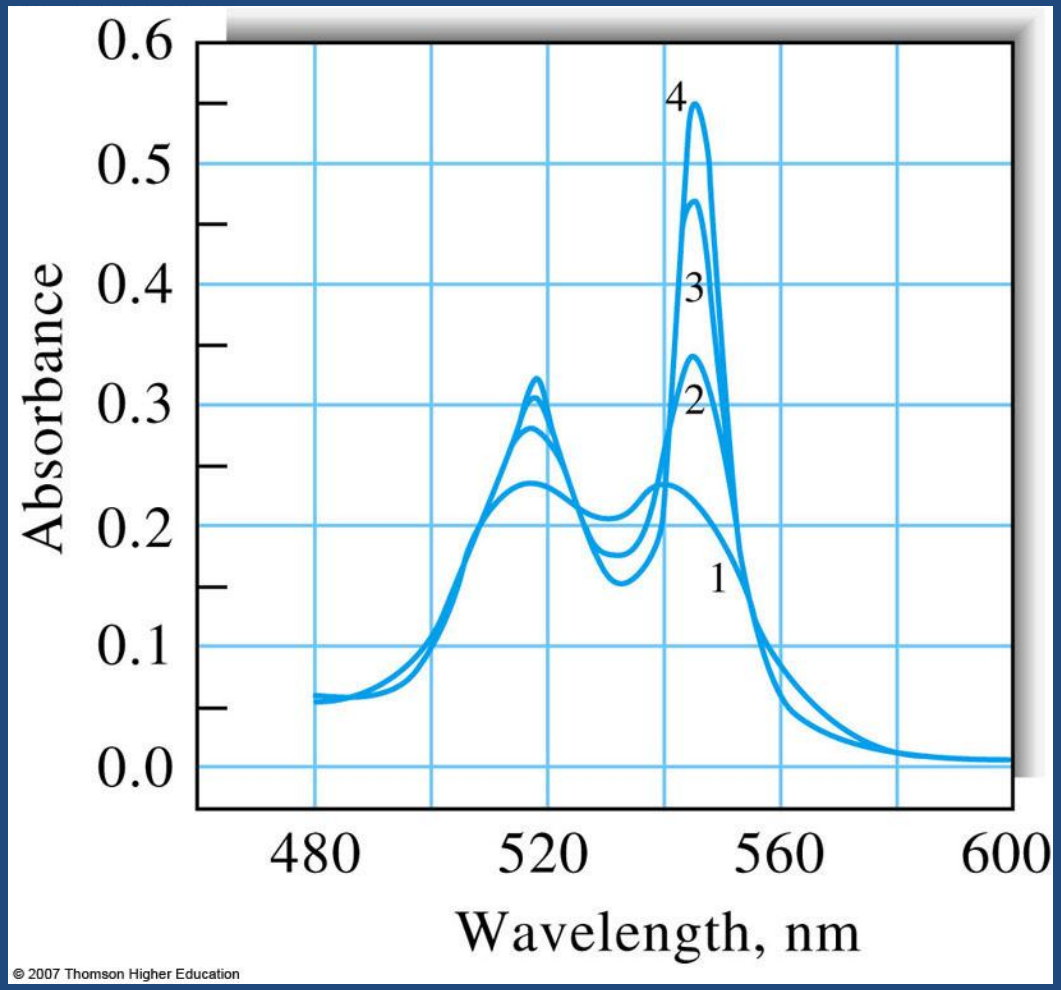
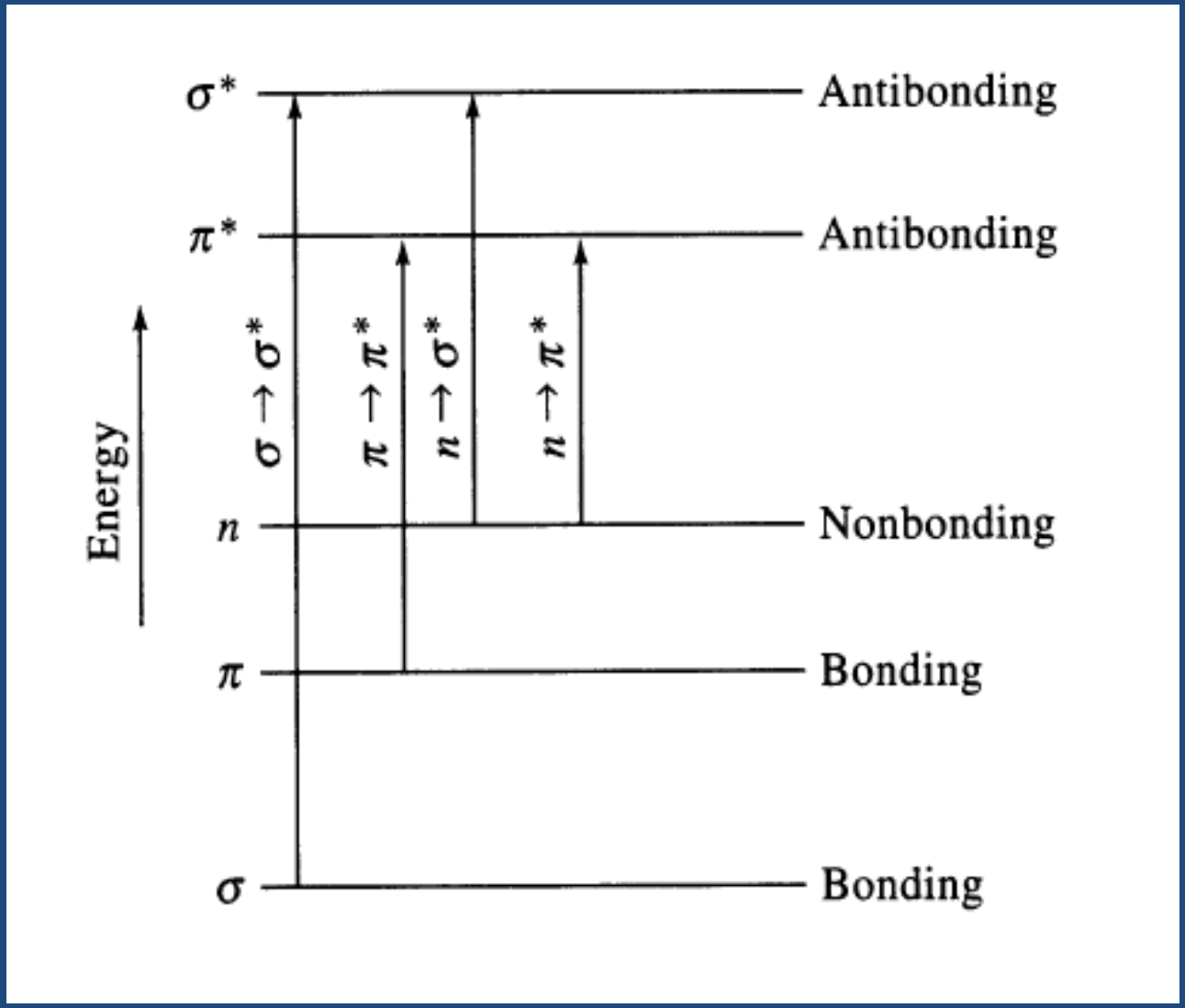


그림 14-7. 네 개의 띠폭에서 환원된 cytochrome c의 스펙트럼. (1) 20 nm, (2) 10 nm, (3) 5 nm, 및 1 nm.

14C-3 작용기의 검출

- 발색단으로 작용하는 작용기 검출
  - 280~290 nm 영역에 나타나는 약한 흡수 띠가 용매의 극성이 증가함에 따라 보다 짧은 파장 쪽으로 이동하면 카르보닐기가 존재한다는 것을 의미 : 단파장 또는 청색 이동 (hypsochromic or blue shift)
  - 260 nm 부근에서 약한 흡수 띠 : 방향족 고리가 존재함을 의미

봉우리 파장에 미치는 용매의 효과



[봉우리 파장에 미치는 용매의 효과]

- 청색이동 (blue shift) : 단파장 이동
  - 용매의 극성에 따라 짧은 파장 쪽으로 이동 ($n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$)
  - 비공유 전자쌍의 용매화 증가로 n 궤도함수의 에너지 낮아지기 때문
  - 물 또는 알코올과 같은 극성용매에서 특히 큰 효과 (30 nm 이상)
  - 흡수 화학종의 비공유 전자쌍과 수소결합을 하기 때문
  - 낮아진 n 궤도함수 에너지 ≒ 수소결합 에너지

[봉우리 파장에 미치는 용매의 효과]

- 적색이동 (red shift) : 장파장 이동
  - 용매의 극성에 따라 $\pi \rightarrow \pi^*$ 와 $n \rightarrow \pi^*$ 전이는 긴 파장 쪽으로 이동
  - π^* 상태의 안정화 (에너지 감소)로 장파장 이동

TABLE 14-4 Absorption Characteristics of Aromatic Compounds

Compound		E_2 Band		B Band	
		λ_{max}, nm	ε_{max}	λ_{max}, nm	ε_{max}
Benzene	C_6H_6	204	7900	256	200
Toluene	$C_6H_5CH_3$	207	7000	261	300
m-Xylene	$C_6H_4(CH_3)_2$	—	—	263	300
Chlorobenzene	C_6H_5Cl	210	7600	265	240
Phenol	C_6H_5OH	211	6200	270	1450
Phenolate ion	$C_6H_5O^-$	235	9400	287	2600
Aniline	$C_6H_5NH_2$	230	8600	280	1430
Anilinium ion	$C_6H_5NH_3^+$	203	7500	254	160
Thiophenol	C_6H_5SH	236	10,000	269	700
Naphthalene	$C_{10}H_8$	286	9300	312	289
Styrene	$C_6H_5CH{=}CH_2$	244	12,000	282	450

© 2007 Thomson Higher Education

- 방향족 화합물
  - 세 가지 세트의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전이
- 예) 벤젠
  - 184 nm : 강한 흡수봉우리, ε_{max} = ~ 60,000
  - 204 nm : E_2 띠, 약한 띠, ε_{max} = 7900
  - 256 nm : B 띠, 아주 약한 봉우리, ε_{max} = 200
  - 두 개의 긴 파장 띠만 연구 : 보통의 분광 광도계로 연구 가능하기 때문

화합물		E_2 띠		B 띠	
		λ_{max}, nm	ε_{max}	λ_{max}, nm	ε_{max}
Benzene	C_6H_6	204	7,900	256	200

- 조색단 (auxochrome)
  - 자신은 자외선 영역에서 흡수되지 않고, 발색단의 흡수 파장을 더 긴 파장 쪽으로 이동시키며, 발색단의 흡수 정도도 증가시키는 작용기
  - 방향족 고리의 π 전자와 상호 작용할 수 있는 하나의 n 전자쌍을 가짐
  - π^* 상태 안정화 → 에너지 낮춤 → 장파장 이동
  - -OH 와 $-NH_2$: 벤젠의 조색단 효과

- 벤젠에 대한 고리 치환 효과 (특히 B 띠)
  - benzene (256 nm) < phenol (270 nm) < phenolate ion (287 nm)

  → phenolate ion이 phenol 보다 비공유 전자쌍을 더 많이 가지고 있기 때문

TABLE 14-4 Absorption Characteristics of Aromatic Compounds

Compound		E_2 Band		B Band	
		λ_{max}, nm	ε_{max}	λ_{max}, nm	ε_{max}
Benzene	C_6H_6	204	7900	256	200
Toluene	$C_6H_5CH_3$	207	7000	261	300
m-Xylene	$C_6H_4(CH_3)_2$	—	—	263	300
Chlorobenzene	C_6H_5Cl	210	7600	265	240
Phenol	C_6H_5OH	211	6200	270	1450
Phenolate ion	$C_6H_5O^-$	235	9400	287	2600

– aniline (280 nm) > anilinium 양이온 (254 nm)

→ 비공유 전자쌍을 잃게 되므로

TABLE 14-4 Absorption Characteristics of Aromatic Compounds

Compound		E_2 Band		B Band	
		λ_{max}, nm	ε_{max}	λ_{max}, nm	ε_{max}
Aniline	$C_6H_5NH_2$	230	8600	280	1430
Anilinium ion	$C_6H_5NH_3^+$	203	7500	254	160
Thiophenol	C_6H_5SH	236	10,000	269	700
Naphthalene	$C_{10}H_8$	286	9300	312	289
Styrene	$C_6H_5CH{=}CH_2$	244	12,000	282	450

[발색단의 conjugation 영향]

- Conjugation
  - π^* 궤도함수의 에너지 감소 → 최대 흡수 파장은 장파장 이동
  - 발색단의 conjugation : 흡수는 additive
    - 1,3-butadiene, $CH_2=CHCH=CH_2$: conjugation 안된 경우에 비해 30 nm 이동
    - 3개의 이중결합이 conjugation → 적색이동 증가

TABLE 14-3 Effect of Multichromophores on Absorption

Compound	Type	λ_{max}(nm)	ϵ_{max}
$CH_3CH_2CH_2CH{=}CH_2$	Olefin	184	~10,000
$CH_2{=}CHCH_2CH_2CH{=}CH_2$	Diolefin (unconjugated)	185	~20,000
$H_2C{=}CHCH{=}CH_2$	Diolefin (conjugated)	217	21,000
$H_2C{=}CHCH{=}CHCH{=}CH_2$	Triolefin (conjugated)	250	—
$CH_3CH_2CH_2CH_2C(=O)CH_3$	Ketone	282	27
$CH_2{=}CHCH_2CH_2C(=O)CH_3$	Unsaturated ketone (unconjugated)	278	30
$CH_2{=}CHC(=O)CH_3$	α,β-Unsaturated ketone (conjugated)	324	24
		219	3,600

14D 흡광도 측정에 의한 정량 분석

- 분광광도법과 광도법의 중요한 특성
  - 유기물 및 무기물에 대한 넓은 응용성
  - 낮은 검출한계 : 10^{-4}~10^{-5} M 정도
  - 보통이거나 높은 선택성 (selectivity)
  - 좋은 정확도 (accuracy)
  - 쉽고 편리하게 데이터를 수집

14D-1 범위

흡광 화학종에의 응용

- 유기 화합물 : 유기발색단 작용기 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 경우
- 무기 화학종
  - 전이금속 이온 : 용액에서 색을 띠고 있으므로 분광광도법 측정에 의해서 정량이 가능
  - 특징적인 흡수 띠 : 아질산, 질산, 크롬산이온, 질소산화물, 할로겐 및 오존

흡광하지않는 화학종에 대한 응용 : 착화제

- 무기 화학종
  - 티오시안산 (SCN) : 철, 코발트, 몰리브덴
  - 과산화수소 : 티탄, 바나듐 및 크롬
  - 요오드화이온 : 비스무트, 팔라듐 및 텔루르
- 유기 착화제
  - 철 정량에 사용되는 o-phenanthroline
  - 니켈에 대한 dimethylglyoxime
  - 구리에 대한 diethyldithiocarbamate
  - 납에 대한 diphenyldithiocarbazone

14D-2 상세한 조작과정

- 농도와 흡광도 사이의 재현성 있는 관계를 나타내는 실험 조건 개발

① 파장선택 : λ_{max} (최대흡수파장)
  - 단위 농도 당 흡광도 변화가 최대
  - Beer 법칙이 가장 잘 적용
  - 정밀도와 정확도 증가

② 흡광도에 영향을 주는 변수

- 용매의 성질, 용액의 pH, 온도, 전해질의 농도 및 방해물질의 존재 등
- 흡광도가 영향을 받지 않는 분석 조건을 선택

③ 셀의 세척과 취급법

- 좋은 품질의 짝 맞춘 한 쌍의 셀을 사용 : 정기적으로 서로에 대해 검정
- 셀을 씻고 말리는 적당한 방법을 사용
  - 측정하기 전에 셀 표면을 분광용급 메탄올을 적신 렌즈종이로 세척 → 방치 : 메탄올은 증발

④ 흡광도와 농도 사이의 관계 측정

- 외부표준법
  - 알고 있는 분석물 농도의 증가에 따른 감응신호 (흡광도, 봉우리높이, 봉우리넓이)를 측정
  - 최소 제곱법으로 얻은 기울기와 절편을 이용하여 검정곡선 작성
  - 시료의 감응신호를 측정 → 검정곡선의 방정식에서 미지시료 농도를 계산

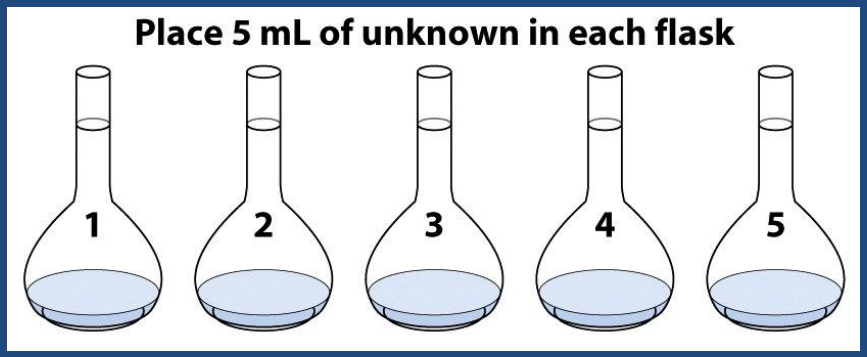
- 검정곡선 : 예상되는 시료의 농도를 포함하는 일련의 표준용액을 이용
- 몰흡광계수 측정 : 한 개의 표준용액만을 사용하는 것은 위험

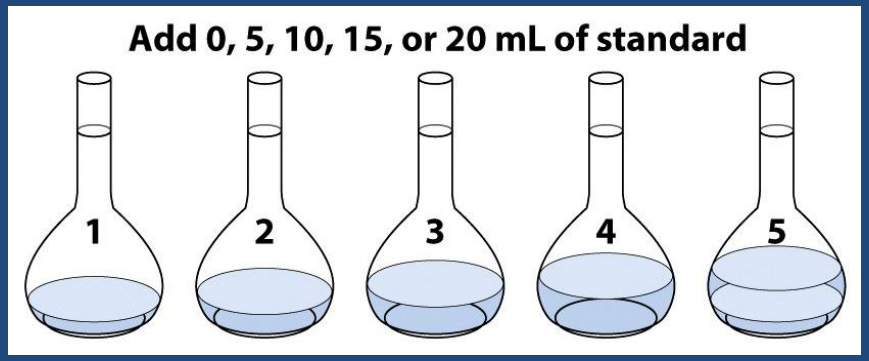
- 표준 용액
  - 시료 matrix에 있는 다른 화학종의 농도도 시료의 조성과 비슷 → 측정된 흡광도에서 다양한 성분의 효과를 최소화
  - 황산이나 인산 : 금속이온들과 무색 착물을 형성하려는 경향 → 흡광도 감소 → 시료에 들어있는 양과 거의 같은 양을 표준용액에 넣어주면 상쇄 가능

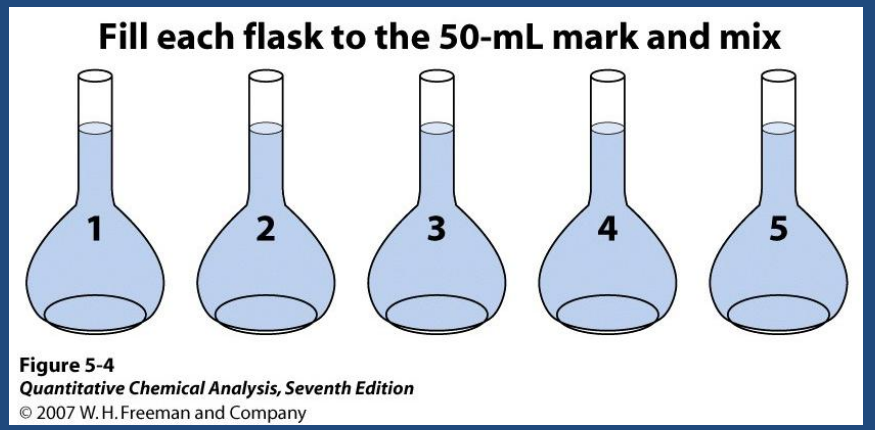
- 시료와 비슷한 매트릭스의 표준물을 만들기가 불가능한 경우 (토양, 광물, 조직과 같은 복잡한 물질) → 표준물 첨가법 (standard addition method)을 이용

⑤ 표준물 첨가법

- 같은 양의 시료용액에 표준용액을 각각 일정량씩 첨가 → 일정한 부피로 희석







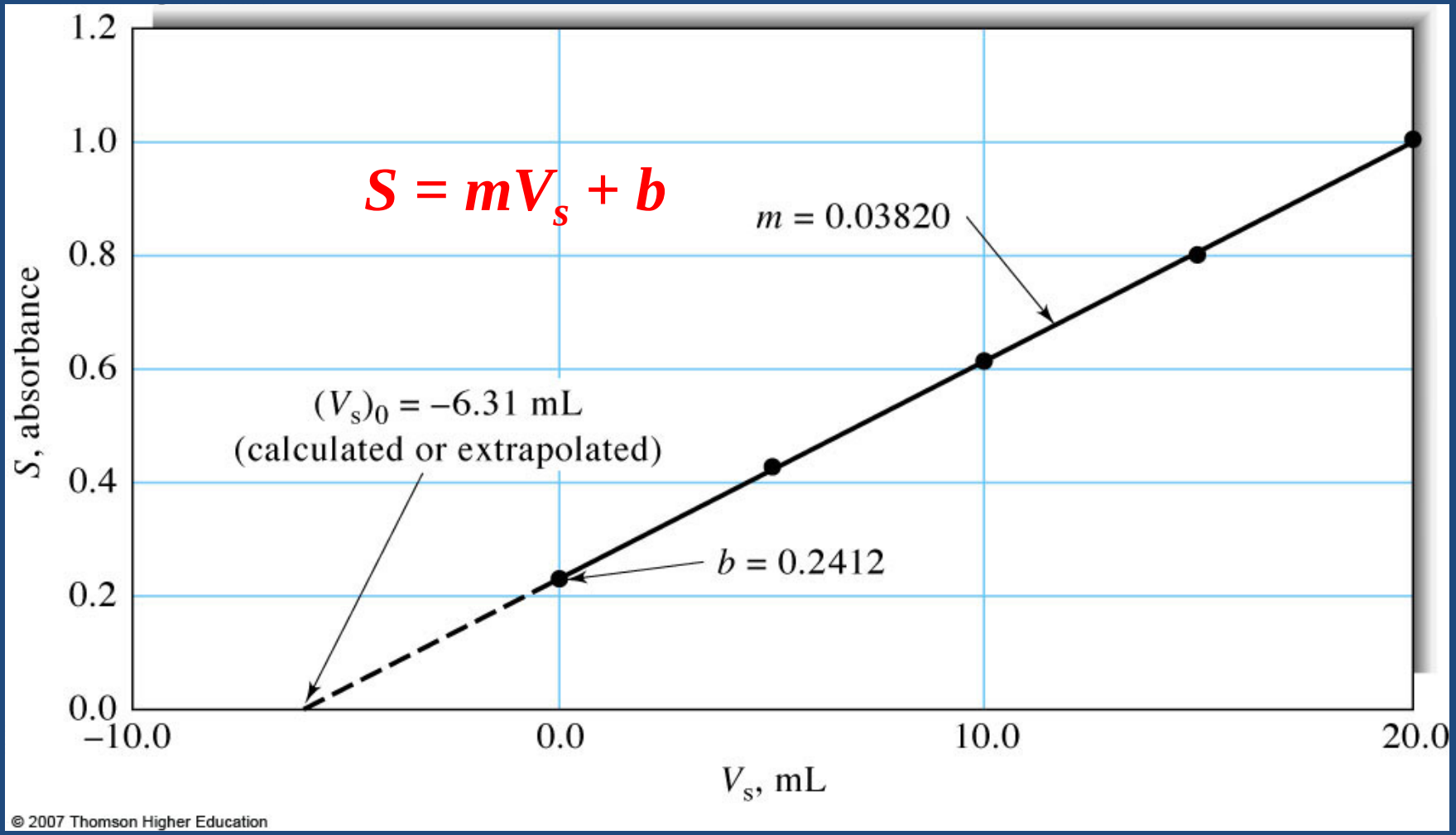


그림 1-10. 표준물첨가법의 직선검정도시. 미지용액의 농도는 기울기 m과 절편 b로부터 계산하거나 외연장법으로 계산할 수 있다.

- 기기의 감응 S $$S = \frac{kV_s c_s}{V_t} + \frac{kV_x c_x}{V_t}$$

  - k : 비례상수
  - V_s : 표준용액의 부피, V_t : 전체용액의 부피
    V_x : 시료용액의 부피
  - C_s :표준용액의 농도, C_x : 시료용액의 농도

  - $V_s\, C_s$ = (L) (mol/L) = mol $\rightarrow$ mol/ V_t = M

- 검량선 : $S = mV_s + b$

$$S = \frac{kV_s c_s}{V_t} + \frac{kV_x c_x}{V_t}$$

$$m = \frac{kc_s}{V_t} \qquad b = \frac{kV_x c_x}{V_t}$$

$$\frac{b}{m} = \frac{\frac{kV_x c_x}{V_t}}{\frac{kc_s}{V_t}} = \frac{V_x c_x}{c_s} \Rightarrow c_x = \frac{bc_s}{mV_x}$$

- 2 개의 시료만 이용하는 경우
  - S_1 : 희석된 시료, S_2 : 시료+표준+희석

$$S_1 = \frac{kV_x c_x}{V_t} \qquad S_2 = \frac{kV_x c_x}{V_t} + \frac{kV_s c_s}{V_t}$$

$$\frac{S_2}{S_1} = \frac{\frac{kV_x c_x}{V_t} + \frac{kV_s c_s}{V_t}}{\frac{kV_x c_x}{V_t}} = \frac{\frac{k(V_x c_x + V_s c_s)}{V_t}}{\frac{kV_x c_x}{V_t}} = \frac{V_x c_x + V_s c_s}{V_x c_x} = 1 + \frac{V_s c_s}{V_x c_x}$$

$$c_x = \frac{S_1 c_s V_s}{(S_2 - S_1)V_x}$$

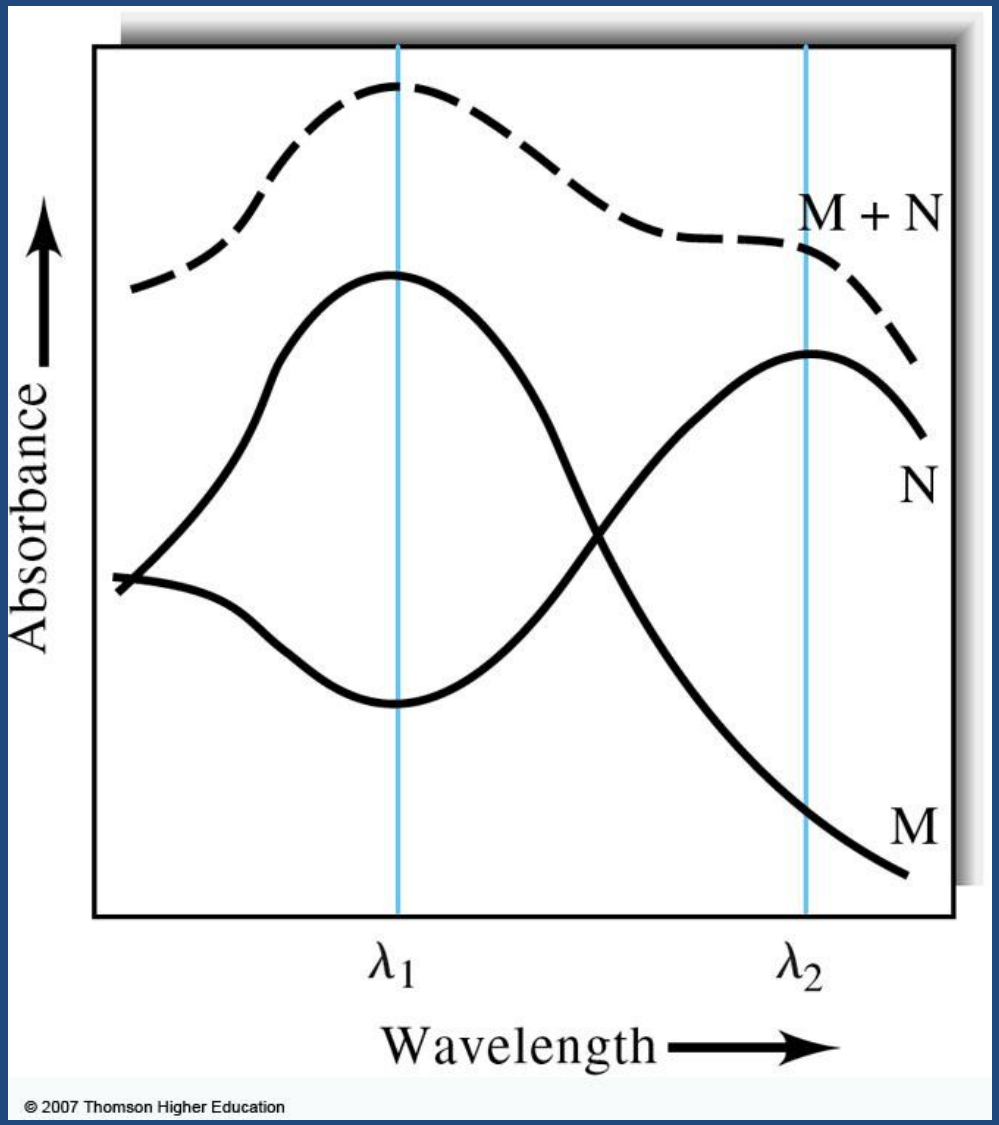
⑥ 흡수물질의 혼합물의 분석

- 혼합물의 흡광도

$$A = \varepsilon_X b[X] + \varepsilon_Y b[Y] + \varepsilon_Z b[Z] + \cdots$$

$$A' = \varepsilon_X' b[X] + \varepsilon_Y' b[Y] \quad (\lambda'\text{에서})$$

$$A'' = \varepsilon_X'' b[X] + \varepsilon_Y'' b[Y] \quad (\lambda''\text{에서})$$



몰흡광계수가 현저하게 다른 두 개의 파장 선택

$$A_1 = \varepsilon_{M_1} b c_M + \varepsilon_{N_1} b c_N$$

$$A_2 = \varepsilon_{M_2} b c_M + \varepsilon_{N_2} b c_N$$

그림 14-9. 각개 성분의 스펙트럼과 두 성분 혼합물 (M+N)의 흡수스펙트럼. 수직의 점선은 두 성분의 정량을 위한 **적합한 파장**을 나타낸다.

14D-3 미분 및 이중-파장 분광 광도법

- 미분 분광 광도법
  - 파장에 대한 흡광도 또는 투광도의 일차 또는 고차 미분 값을 파장의 함수로 도시
  - 상세구조 확인 가능
  - 두 가지 이상의 분석성분이 존재할 때에도 분석물의 농도를 더 쉽고 정확하게 측정

미분 스펙트럼의 응용

- 정성분석
  - 특징 증강 (feature enhancement) : 겹친 스펙트럼을 갖는 화합물들을 식별 가능하게 하는 기술
- 혼합물의 정량분석

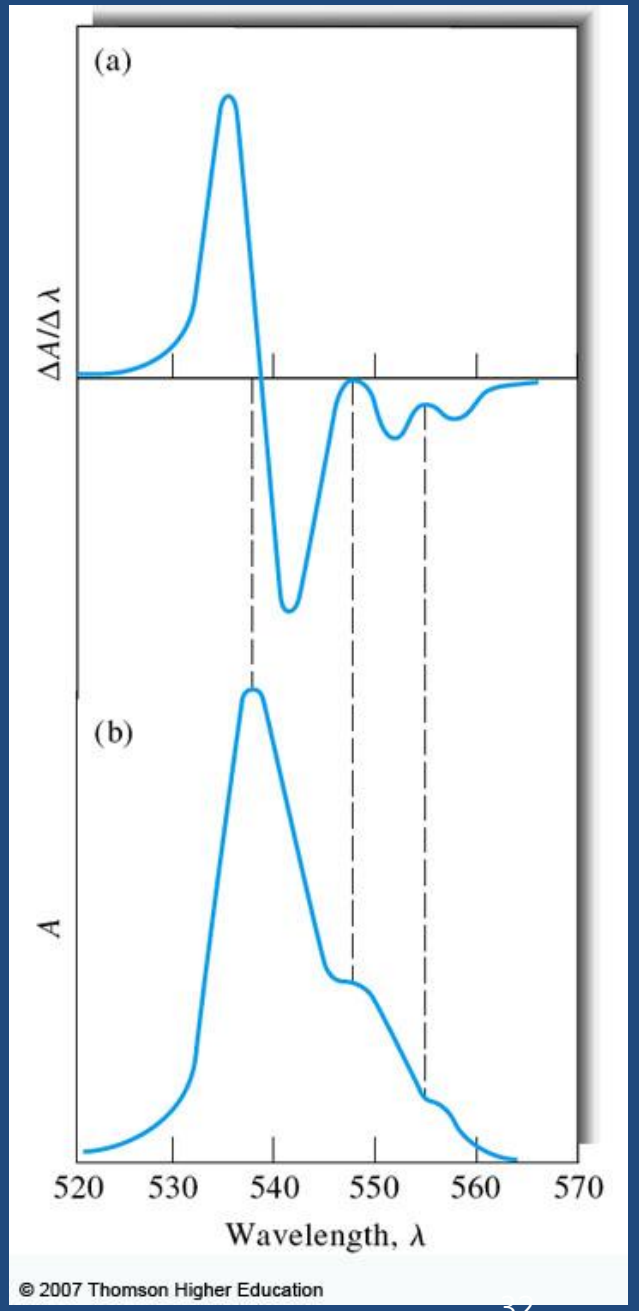
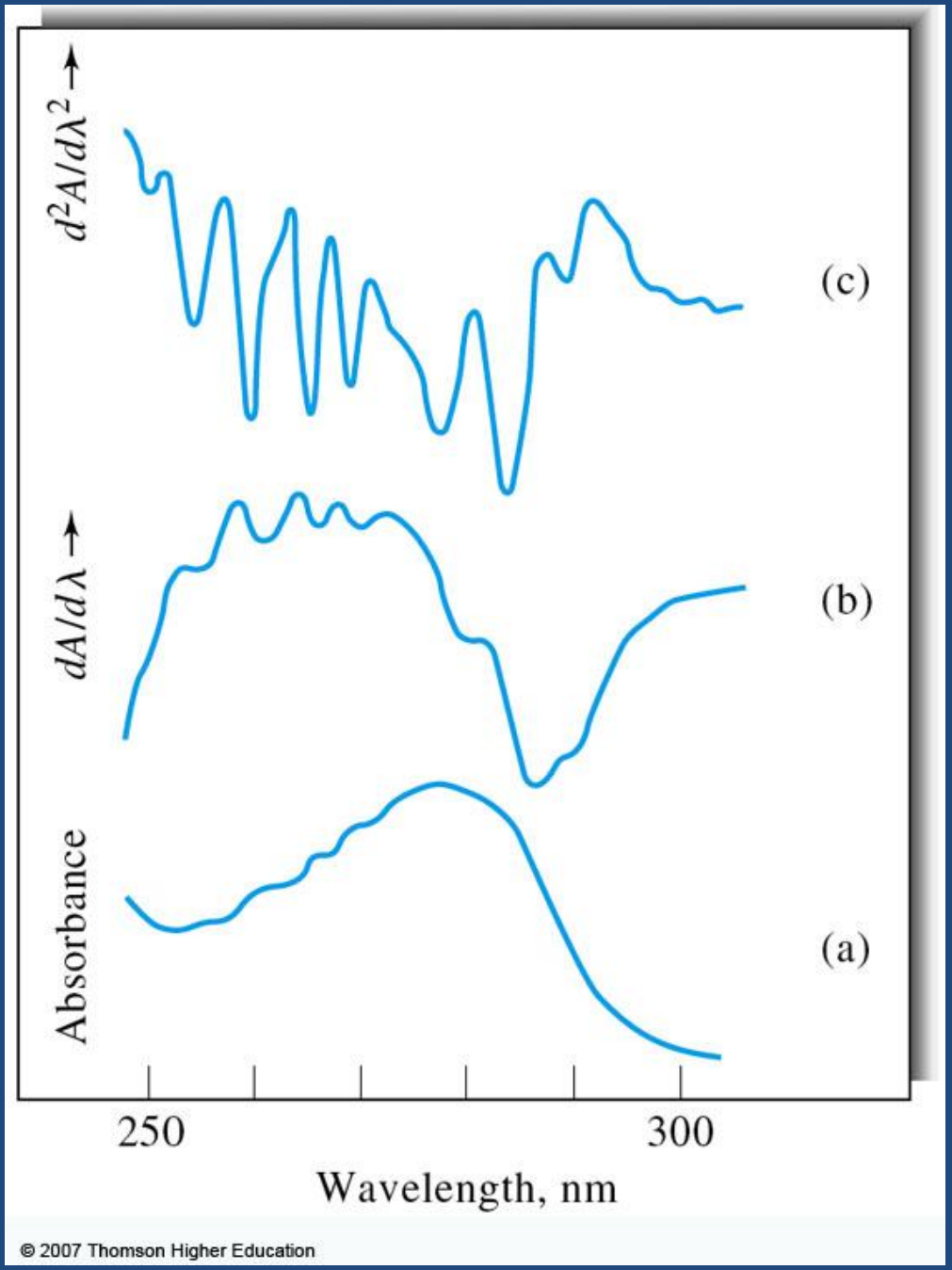


그림 14-10. 미분스펙트럼 (a)와 표준스펙트럼 (b)의 비교. 겹쳐진 세 개의 흡수봉우리로 이루어진 스펙트럼을 미분 도시함으로써 미세한 상세구조를 보여 준다.

- 혼탁한 용액에 존재하는 분석성분의 스펙트럼 측정에 유용
  - 예) 세 가지 아미노산인 tryptophan, tyrosine 및 phenylalanine 240~300 nm 영역에서 예리한 흡수 띠 → bovine 또는 달걀 알부민과 같은 커다란 단백질분자는 복사선을 심각하게 산란 → 단순한 흡수 봉우리



© 2007 Thomson Higher Education

그림 14-11. bovine albumin의 흡수스펙트럼: (a) 원래의 스펙트럼, (b) 1차 미분스펙트럼, (c) 2차 미분스펙트럼.

- 광도법 적정 곡선의 이해
- 착물의 조성 분석 분석법 이해