



Spectrometrie

SPECTROSCOPISCHE DETECTIE IN DE VLOEISTOFCHROMATOGRAPHIE:

Theorie, Apparatuur, Interpretatie en Toepassingen: Deel I

H. LINGEMAN

VRIJE UNIVERSITEIT, VAKGROEP ANALYTISCHE CHEMIE, DE BOELELAAN 1083, 1081 HV AMSTERDAM, TEL.: 20 444 7539, FAX.: 20 444 7543

INLEIDING

In een aantal artikelen zullen de principes (b.v. chromoforen), apparatuur, kwantitatieve aspecten, interpretatie, foutenbronnen en toepassingen van spectroscopische detectietechnieken (absorptie, fluorescentie, chemiluminescentie, enz.) in het ultraviolette en zichtbare gedeelte van het spectrum aan de orde komen.

Deel I houdt zich met name bezig met de vraag of een verbinding wel of niet kan worden gedetecteerd na een vloeistofchromatografische scheiding. Om deze vraag te kunnen beantwoorden moeten er drie vragen worden beantwoord:

- Absorbeert de te detecteren verbinding;
- Waar absorbeert de te detecteren verbinding (golflengte, frequentie, energie);
- Hoe sterk absorbeert de te detecteren verbinding (transmissie, absorptie, intensiteit).

1.1 EIGENSCHAPPEN VAN LICHT

Licht is elektromagnetische straling en kan beschreven worden met zowel de deeltjes- als de golftheorie. Lichtgolven bestaan uit loodrecht op elkaar staande, oscillerende elektrische en magnetische velden. Het vlak waarin de elektrische component ligt wordt het polarisatievlak genoemd. 'Gewoon' licht trilt in alle richtingen loodrecht op de voortplantingsrichting; het is in alle richtingen gepolariseerd. Als de elektrische component slechts in één vlak wordt uitgezonden wordt er gesproken van gepolariseerd licht.

De golflengte (λ) van licht is de afstand tussen de toppen van de golven. De eenheid van golflengte is m. De frequentie (ν) is het aantal volledige oscillaties dat een golf per s maakt. De eenheid van frequentie is s^{-1} (1/s) en 1 oscillatie per s wordt ook wel 1 Hertz (Hz) genoemd. Een andere belangrijke parameter is het golfgetal (σ). Het golfgetal is de reciproke van de golflengte ($1/\lambda$) en wordt voornamelijk gebruikt bij infrarood (IR) en Raman spectroscopie en meestal uitgedrukt in cm^{-1} .

De golflengte en de frequentie kunnen eenvoudig uit elkaar worden berekend met behulp van Vergelijking 1:

$$c = \nu \cdot \lambda \quad (1)$$

In deze vergelijking is c de lichtsnelheid ($2,99792458 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ in het vacuüm). Meestal wordt echter niet in het vacuüm gemeten hetgeen betekent dat niet de lichtsnelheid maar c/n gebruikt moet worden. n is hier de brekingsindex van het medium waarin gemeten wordt.

Attentie! Voor golflengten die in het zichtbare (VIS) gebied (380 - 780 nm) van het spectrum liggen, geldt dat n meestal groter is dan 1 zodat het licht langzamer beweegt dan in het vacuüm. In doorstroomsystemen waar het licht een aantal grensvlakken (lucht, kwarts, mobiele fase, enz.) met verschillende brekingsindex moet passeren, betekent dit dat de frequentie hetzelfde blijft, maar dat de golflengte verandert.

De energie (E) van het licht wordt meestal uitgedrukt in kJ.mol^{-1} en kan berekend worden met behulp van Vergelijking 2:

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

In deze vergelijking is h de constante van Planck ($6,6260755 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$). Verder valt te zien dat de energie recht evenredig is met de frequentie en het golfgetal en omgekeerd evenredig met de golflengte. Een foton is een lichtdeeltje met een energie gelijk aan $h \cdot \nu$.

Het elektromagnetisch spectrum wordt historisch gezien als volgt ingedeeld:

- Kosmische straling ($E > 1,2 \times 10^8$ kJ.mol⁻¹);
- γ -Straling ($1,2 \times 10^7 > E < 1,2 \times 10^8$);
- Röntgen straling ($12.000 > E < 1,2 \times 10^7$);
- Ultraviolet (UV) straling ($310 > E < 12.000$);
- VIS straling ($150 < E < 310$);
- IR straling ($0,12 < E < 150$);
- Microgolven ($0,0012 < E < 0,12$);
- Radiogolven ($E < 0,0012$ kJ.mol⁻¹).

Spectroscopische detectie in de vloeistofchromatografie (LC) wordt meestal uitgevoerd met behulp van UV of VIS licht. Dit betekent dat gebruik gemaakt wordt van golflengten van ca. 190 - 380 nm (UV) en van 380 - 780 nm (VIS).

1.2 INTERACTIE VAN LICHT MET DEELTJES

De interactie van licht met een molecuul kan op verschillende manieren plaatsvinden:

- Transmissie;
- Absorptie;
- Reflectie;
- Refractie (breking);
- Verstrooiing;
- Luminescentie (chemiluminescentie, fosforescentie, fluorescentie).

Ten behoeve van detectie in LC worden met name absorptie- en luminescentie-technieken gebruikt. In een enkel geval worden transmissie-metingen gedaan. Reflectie, refractie en verstrooiing zijn in dit geval storende processen en zullen dan ook alleen als zodanig worden behandeld. Reflectie, refractie en verstrooiing treedt op aan grensvlakken (lucht - kwarts, kwarts - vloeistof, enz.), zodat het verschil in brekingsindex tussen de verschillende materialen zo klein mogelijk moet worden gehouden en het licht altijd loodrecht ingestraald moet worden op de doorstroomcel.

Bij absorptie van een foton door een molecuul, wordt de energie hiervan verhoogd en komt het molecuul in een aangeslagen toestand. De levensduur (stabiliteit) van een aangeslagen (electronen) toestand is relatief erg kort (ca. 10^{-12-15} s), zodat het molecuul direct daarna weer een foton afgeeft en terugkeert

naar de grondtoestand. De totale hoeveelheid licht die wordt geabsorbeerd is de som van de elektronen-, vibratie en rotatie-energie, waarbij de energieverhouding van deze overgangen ongeveer 100 : 10 : 1 is. In Figuur 1 is te zien dat op iedere elektronenovergang een aantal vibratie-overgangen zijn gesuperponeerd en dat op iedere vibratie overgang een aantal rotatie overgangen zijn gesuperponeerd.

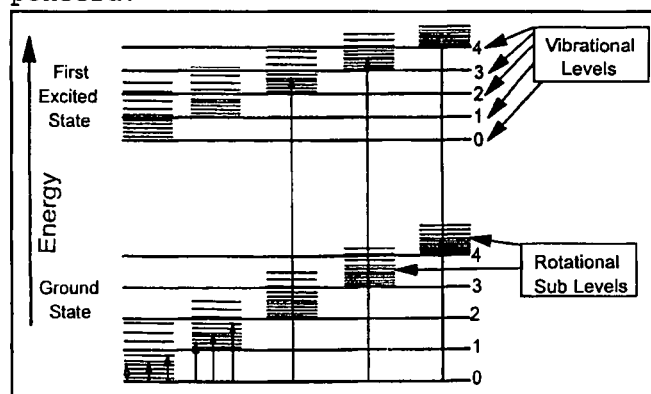


Fig. 1: Energieniveaus van een molecuul.

Indien benzeen wordt bestraald met licht van 256 nm zal het molecuul vanuit de grondtoestand (dit is het laagste elektronen- en vibratieniveau) in één van de hogere vibratieniveaus van de eerste aangeslagen electronentoestand komen. Van hieruit valt het molecuul weer terug naar de grondtoestand waarbij de opgenomen energie weer vrijkomt als botsingswarmte. Deze overgangen zijn gekwantiseerd, dat wil zeggen dat er een nauwkeurig vastliggende hoeveelheid aan energie wordt opgenomen of afgestaan, en alleen dan als de desbetreffende overgang op grond van zogenaamde verbodsbepalingen is toegestaan.

Attentie! De brede banden die in UV-VIS spectra voorkomen zijn het gevolg van het feit dat elektronenovergangen gepaard gaan met overgangen die veel minder energie vragen: de overgangen tussen vibratie- en rotatieniveaus ('handvormig' spectrum van benzeen - zie sectie 1.5).

Literatuur:

Meer informatie over de hierboven genoemde onderwerpen kan gevonden worden in:

B.J. Clark, T. Frost and M.A. Russell (Eds.), U.V. Spectroscopy, Chapman and

Hall, London, 1993.

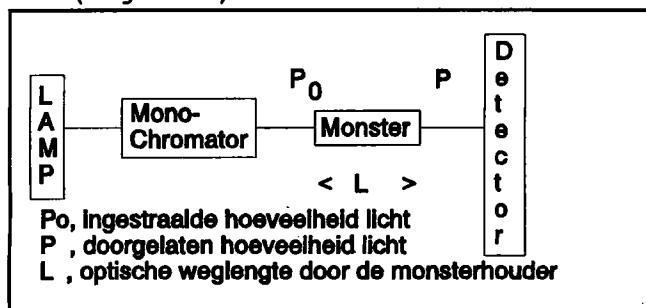
H.-H. Perkampus, U.V. Spectroscopy and its Applications, Springer, Berlin, 1992.

Licht met een golflengte van 190 - 780 nm heeft voldoende energie om met name de buitenelectronen van een molecuul in een hogere baan te brengen.

Attentie! Dit betekent dat met behulp van VIS absorptie in de eerste plaats informatie wordt verkregen over de buitenelectronen van een atoom of molecuul en in mindere mate over de binnenelectronen, terwijl met UV straling informatie wordt verkregen over de binnenelectronen en ionogene functies in een molecuul.

Met andere woorden er kan alleen gezegd worden of bepaalde structurelementen wel of niet aanwezig zijn met als gevolg dat UV-VIS spectroscopie in tegenstelling tot bijvoorbeeld IR spectroscopie (informatie over vibratie overgangen) zelden worden gebruikt voor de identificatie van onbekende verbindingen.

Absorptiemetingen kunnen worden uitgevoerd met een eenvoudig systeem bestaande uit een lichtbron, monochromator, doorstroomcel (monsterhouder) en detector (Figuur 2).



Schematische weergave van een eenvoudige absorptiespectrometer

In deel II van deze serie zal de apparatuurtechnische kant van absorptiemetingen verder worden uitgewerkt.

Absorptie van licht houdt in dat het vermogen (P of I) - de energie per seconde en per eenheid oppervlak van de lichtbundel - afneemt. Indien een monster bestraald wordt met licht met een vermogen van P_0 (of I_0), de lengte waar-

over het monster bestraald wordt l is, en het vermogen van het licht dat door het monster heen komt P (of I) is, dan kan de transmissie (T) worden berekend volgens Vergelijking 3:

$$T = P / P_0 = I / I_0 \quad (3)$$

T heeft daarom altijd een waarde tussen 0 en 1. Vaak wordt echter het percentage transmissie ($\%T$) gebruikt en dit is $100 \times T$.

De meest gebruikte grootte om aan te geven hoeveel monochromatisch (van één bepaalde kleur) licht door een monster wordt geabsorbeerd is de absorptie (A) ofwel de extinctie (E). In Vergelijking 4 wordt het verband tussen T en A gegeven:

$$A = \log (P_0/P) \log (I_0/I) = - \log T \quad (4)$$

Attentie! Belangrijk is hierbij om in te zien dat indien het merendeel van het opvallende licht door het monster wordt geabsorbeerd, T bijna 0 is, A relatief groot is (Tabel I)

Tabel I: Verband tussen Absorptie (A) en Transmissie (T)

P/P_0	$\%T$	A
1	100	0
0,1	10	1
0,01	1	2
0,001	0,1	3

Bij absorptieprocessen wordt de hoeveelheid energie die wordt doorgelaten gemeten. Dit betekent dat om betrouwbare metingen te kunnen doen er minimaal 10% doorgelaten moet worden. Dus T moet tussen de 10 en 100 liggen en A tussen 0 en 1.

Voor monochromatisch licht kan de wet van Lambert-Beer worden gebruikt. De wet is gegeven in Vergelijking 5:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

In deze vergelijking is ϵ de molaire absorptie (extinctie coëfficiënt) en heeft als eenheden $M^{-1} \cdot cm^{-1}$; c de concentratie, wordt uitgedrukt in M ($mol \cdot l^{-1}$) en l de weglengte, wordt uitgedrukt in

cm. Dit betekent dat A een dimensieloos getal is.

Attentie! A wordt vaak uitgedrukt in absorptie eenheden (aufs - absorbance units full scale). Dit is slechts een willekeurige en relatieve manier om aan te geven dat het om de absorptie van een molecuul gaat.

De molaire absorptie is een fysisch-chemische constante van een verbinding die gebruikt kan worden voor structuurbevestiging van een verbinding. Deze constante is wel afhankelijk van het oplosmiddel waarin het molecuul is opgelost, de zuurtegraad (pH) en een aantal andere parameters. De invloed van deze parameters zal in de volgende sectie nader worden besproken.

Attentie! In oudere literatuur wordt vaak de specifieke extinctie ($E_{1\%, 1\text{cm}}$) gebruikt in plaats van ϵ . De specifieke extinctie is de extinctie van een oplossing die 1 g verbinding bevat per 100 ml oplossing, bij een weglengte van 1 cm. In Vergelijking 6 is weergegeven hoe beide specifieke grootheden in elkaar kunnen worden omgerekend:

$$\epsilon = M (\text{molecuulgewicht}) \times E_{1\%, 1\text{cm}} / 10 \quad (6)$$

Voorbeeld!

Wat is de absorptie en de transmissie van een oplossing die 0,005 M is en een verbinding bevat die een molaire extinctie heeft van $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. De weglengte van de cuvet (monsterhouder) is 15 mm?

Vergelijking 5 kan hiervoor worden gebruikt. $\epsilon = 350$, $c = 0,005$ en $l = 1,5$. A is nu $(350 \times 0,005 \times 1,5) = 2,625$. Uit vergelijking 4 ($A = -\log T$) volgt nu dat $T = 10^{-2,625} = 0,00234$ of wel 0,234%.

De wet van Beer kent een aantal beperkingen. In het algemeen geldt dat voor verdunde oplossingen ($< 0,01 \text{ M}$) de absorptie van een oplossing lineair toeneemt met de concentratie hiervan, bij hogere concentratie neemt de absorptie minder sterk toe; er is dan geen lineair verband meer tussen concentratie en absorptie. De belangrijkste redenen hiervoor zijn dat bij hogere concentraties moleculen onderling interacties

aangaan waarbij nieuwe deeltjes met andere spectroscopische eigenschappen ontstaan en dat door de sterke absorptie van licht, moleculen in het begin van de monsterhouder meer licht ontvangen dan moleculen achter in de monsterhouder.

Literatuur:

Details over absorptiespectroscopie kunnen worden gevonden in de volgende handboeken:

C. Burgess and A. Knowles (Eds.), *Techniques in Visible and Ultraviolet Spectrometry*, Vol. 1, Chapman and Hall, London, 1981.

J.D. Ingle Jr. and S.R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1988.

D.A. Skoog and J.J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Saunders College Publishers, Fort Worth, 1992.

D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1995.

1.3 ENERGIE-NIVEAUS EN SOORTEN OVERGANGEN

Het UV-VIS gedeelte van het electromagnetische spectrum wordt onderverdeeld in:

- **Vacuüm-UV:** het gebied beneden 190 nm. Licht en kwarts beginnen beneden een golflengte van 190 nm te absorberen. Om toch een spectrum te kunnen opnemen moet in het vacuüm worden gewerkt. Bovendien is de doorlaatbaarheid van de meeste oplosmiddelen beneden de 190 nm gering. Voor analytische doeleinden wordt het vacuüm-UV zelden gebruikt;
- **'Gewone' UV:** 190 - 380 nm;
- **Zichtbare gebied:** 380 - 780 nm. De maximale gevoeligheid ligt voor het oog bij 550 nm. Wit licht is een combinatie van straling met golflengten tussen de 380 en 780 nm.

Attentie! In een spectrum wordt vaak de golflengte uitgezet tegen de absorptie van een verbinding in aufs. De plaats van de maxima, minima en buigpunten zegt iets over de structuur van de verbinding terwijl de hoogte van de maxima een maat is voor de hoeveelheid die van de verbinding aanwezig is.

Het gedeelte van een molecuul dat verantwoordelijk is voor de absorptie van licht wordt de chromofoor genoemd. Verbindingen die uitsluitend UV licht kunnen absorberen hebben zelf geen kleur en bestaan dus in vloeibare vorm als een kleurloze vloeistof en zijn in vaste vorm wit. Verbindingen die ook VIS licht kunnen absorberen hebben altijd een kleur, zowel in oplossing als in vaste vorm. Dit betekent dat van een gekleurde verbinding aangegeven kan worden waar deze licht zal absorberen. Een blauw gekleurde verbinding zal de complementaire kleur van blauw absorberen. In dit geval is dat oranje zodat het absorptie-maximum tussen de 580 nm en 620 nm zal liggen (Tabel II).

Tabel II: Kleuren en golflengtes behorende van het zichtbare gedeelte van het elektromagnetische spectrum

Absorptiemaximum (nm)	kleur	Waargenomen Complementaire (absorptie) kleur
380 - 420	groen - geel	violet
420 - 440	geel	violet - blauw
440 - 470	oranje	blauw
470 - 500	rood	blauw - groen
500 - 520	paars	groen
520 - 550	violet	geel - groen
550 - 580	violet - blauw	geel
580 - 620	blauw	oranje
620 - 680	blauw - groen	rood
680 - 780	groen	paars

In organische moleculen komen drie soorten (buiten)electronen voor:

- **σ-Electronen**: deze vormen enkele bindingen, bijvoorbeeld de C-C- en C-H-bindingen in alkanen;
- **π-Electronen**: deze worden aangetroffen in dubbele bindingen (voorbeelden: $\text{CH}_2=\text{CH}_2$, benzeen), een dubbele binding bestaat dus uit twee σ-electronen en twee π-electronen, een drievoudige binding uit twee σ-electronen en vier π-electronen;
- **n-Electronen of niet-gebonden electronen**: deze worden aangetroffen op heteroatomen zoals N, O, S en de halogenen (Voorbeelden: $\text{CH}_3\text{-O-CH}_3$, $\text{CH}_3\text{-NH}_2$).

Bij absorptie van straling gaan de electronen over van de grondtoestand naar een aangeslagen toestand, dat wil zeggen: de σ- en de π-electronen gaan van

een bindende electronenbaan over naar een antibindende ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ en $\pi \rightarrow \pi^*$) baan. n-Electronen hebben geen overeenkomstige n*-baan beschikbaar en gaan naar een σ*- of π*-baan.

Attentie! De electronen bevinden zich in moleculaire electronenbanen (MO's) die ontstaan door combinatie van atomaire electronenbanen (AO's). Bij de vorming van een σ-binding tussen twee atomen ontstaan uit twee AO's twee σ-MO's: een bindende (σ) met een lage en een antibindende (σ*) met een hogere energie dan de oorspronkelijke AO's.

De energiever verschillen tussen grond- en aangeslagen toestand zijn verschillend voor de verschillende typen electronen (Figuur 3).

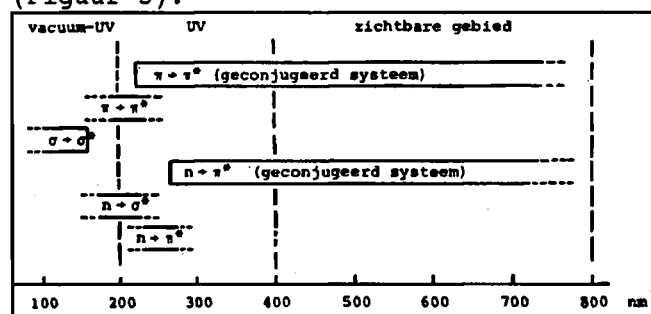


Fig. 3: Ligging van de absorptiemaxima behorende bij de verschillende electronenovergangen

Deze zijn het grootst voor σ-electronen, en het kleinst voor de n-electronen. Dus $\sigma \rightarrow \sigma^*$ overgangen liggen in het kortgol-vige UV gebied en $n \rightarrow \pi^*$ overgangen in het langgol-vige UV gebied.

Alle moleculen waarin dezelfde chromofoor in een gelijksoortige omgeving voorkomt geven een absorptieband bij vrijwel dezelfde golflengte en met vrijwel dezelfde intensiteit. Komen in een molecuul onafhankelijk van elkaar meerdere chromoforen voor, dan is het spectrum de som van de spectra van de afzonderlijke chromoforen. Substitutie met atomen of atoomgroepen die vrije electronenparen bevatten maar zelf niet in het UV-gebied absorberen blijkt vaak te leiden tot een verschuiving van het absorptiemaximum naar langere golflengte en/of verandering van de intensiteit. Dergelijke atomen (atoomgroepen) worden auxochromen genoemd.

Attentie!
Verschuiving naar langere golflengte is bathochrome of roodverschuiving;
Verschuiving naar kortere golflengte is

hypsochrome of blauwverschuiving;
Verhoging van de intensiteit is hyperchrom effect;
Verlaging van de intensiteit is hypochrom effect.

Enkele voorbeelden van chromoforen zijn gegeven in de Tabellen III en IV en het effect van auxochromen is te zien in Tabel V.

Tabel III: UV-absorptie van chromoforen

Chromofoor	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Type overgang
(a)	(b)		
-C-C-	150	groot	$\sigma \rightarrow \sigma^*$ alkaan
-C-H	150	groot	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
(-C=C-	180	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$ alkeen
C ₆ H ₁₃ CH=CH ₂	175	13.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
(-C≡C-	170	3.000	$\pi \rightarrow \pi^*$ alkyn
C ₆ H ₁₁ C≡C-CH ₃	180	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
	195	2.000	
	225	160	
-O-	180	2.500	$n \rightarrow \sigma^*$ ether
-N-	190	3.000	$n \rightarrow \sigma^*$ amine
(-C=O	160	16.000	$n \rightarrow \sigma^*$ carbonyl
	190	900	$\pi \rightarrow \pi^*$
	290	100	$n \rightarrow \pi^*$
CH ₃ -(C=O)-CH ₃	185	1.000	$n \rightarrow \sigma^*$ keton
	280	15	$n \rightarrow \pi^*$
CH ₃ -(C=O)-H	180	groot	$n \rightarrow \sigma^*$ aldehyde
	295	15	$n \rightarrow \pi^*$
(-COOH	200	< 100	$n \rightarrow \pi^*$ carboxyl
CH ₃ -COOH	205	40	$n \rightarrow \pi^*$
CH ₃ -(C=O)-NH ₂	215	60	$n \rightarrow \pi^*$ amido
CH ₃ N=NCH ₃	340	5	$n \rightarrow \pi^*$ azo
CH ₃ NO ₂	280	20	$n \rightarrow \pi^*$ nitro
C ₆ H ₅ NO	300	100	
	665	20	$n \rightarrow \pi^*$ nitroso
C ₂ H ₅ ONO ₂	270	10	$n \rightarrow \pi^*$ nitraat
-C-Cl	170	200	$n \rightarrow \sigma^*$
-C-Br	200	300	$n \rightarrow \sigma^*$
-C-I	260	400	$n \rightarrow \sigma^*$
Anorganische ionen			
Nitraat	313		
Carbonaat	217		
Nitriet	280, 360		
Azido	230		

- (a) In deze kolom zijn alleen die bindingen opgenomen die verantwoordelijk zijn voor de genoemde absorptie. ~ betekent dat aan dat atoom nog twee of drie andere bindingsplaatsen zijn. Bijvoorbeeld bij het alkaan betekent ~ dat er aan het C-atoom nog ruimte is voor drie H-atomen.
- (b) Het gaat hier om globale waarden. De golflengte en de intensiteit zijn enigszins afhankelijk van de alkylsubstituenten.

Attentie!

Uit Tabel III kunnen een aantal belangrijke conclusies worden getrokken.

Ten eerste: De grootste energieovergangen - en dus de hoogste ϵ -waarden zijn te vinden bij de $\sigma \rightarrow \sigma^*$ overgangen gevolgd door de $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ en tenslotte de $n \rightarrow \pi^*$ overgangen (Tabel IV).

Ten tweede: De ϵ -waarde wordt lager naar mate de maximum golflengte van absorptie langer is bij één en dezelfde chromofoor (zie carbonylgroep).

Ten derde: Enkele bindingen kunnen zelden worden gemeten met behulp van UV-VIS spectroscopie (< 200 nm).

Literatuur:

Uitgebreide informatie over chromoforen kan gevonden worden in:

R.M. Silverstein, G.C. Bassler and T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., Wiley, New York, 1991.

Organic Electronic Spectral Data, Wiley, New York, 1960 - 1995 (Over a quarter of a million entries).

Tabel IV:

Voorbeelden van $n \rightarrow \sigma^*$ overgangen

Verbinding	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
H ₂ O	165	1480
CH ₃ OH	185	150
CH ₃ Cl	175	200
CH ₃ I	260	365
(CH ₃) ₂ S	230	140
(CH ₃) ₂ O	185	2250
CH ₃ NH ₂	215	600
(CH ₃) ₃ N	225	900

Attentie! Uit Tabel IV kan afgelezen worden dat water een maximum heeft bij 165 nm en methanol een maximum bij 185 nm. In omkeer-fase (reversed-phase) LC wordt meestal gebruik gemaakt van hoge concentraties water en methanol (of acetonitril) in de mobiele fase. Het gevolg hiervan is dat metingen bij een golflengte lager dan 200 nm nagenoeg onmogelijk is.

Tabel V: Voorbeelden van auxochrome groepen

Verbinding	Auxochroom	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
Benzeen		254	230
Tolueen	-CH ₃	262,5	270
Fenol	-OH	270	1450
Aniline	-NH ₂	280	1430
Thiofenol	-SH	269	700

Auxochromen groepen zijn meestal atomen met vrije elektronenparen, polariseerbare atomen en groepen die een lading kunnen dragen. Een methyl groep heeft dan ook slechts een klein auxochrome effect (Tabel VI).

Tabel VI:
Auxochrome effect van de methyl-groep

Verbinding	$\lambda_{\max}$ (nm)
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-H}$	177 nm
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_3$	179 nm
$(\text{CH}_3)_2\text{-C=CH-CH}_3$	196 nm

Attentie!

Auxochrome groepen hebben alleen effect als deze direct aan de chromofoor zijn gebonden. Bijvoorbeeld het spectrum van $\phi\text{-CH}_2\text{-OH}$, ϕ is het symbool voor een benzeenring, lijkt veel meer op dat van $\phi\text{-CH}_3$ dan op dat van $\phi\text{-OH}$. De verklaring hiervoor is dat mesomere en inductieve effecten zich voornamelijk over één enkele binding afspelen en in veel mindere mate over twee enkele bindingen. In het algemeen heeft substitutie met een electrondonerende groep een langere maximum absorptiegolflengte en een hogere ϵ -waarde tot gevolg en substituenten met een electronzuigende groep het tegengestelde effect.

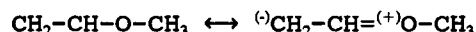
Behalve substitutie met auxochromen heeft ook vergroten van het geconjugeerde systeem een verschuiving van het absorptiemaximum naar langere golflengte tot gevolg. De verschuivingen worden verklaard door een verandering van de energieniveaus in de desbetreffende moleculen. In geconjugeerde systemen is het energieverval tussen het hoogste bezette niveau en het laagste onbezette niveau kleiner dan in een geïsoleerd systeem. Het gevolg van conjugatie op $\lambda_{\max}$ en $\epsilon_{\max}$ is te zien in Tabel VII.

Tabel VII: Effect van conjugatie op de absorptie van organische moleculen

Verbinding	Type molecuul	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$	Olefin	184	10.000
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$	Diölefin (niet geconjugueerd)	185	20.000
$\text{CH}_2=\text{CHCH=CH}_2$	Diölefin (wel geconjugueerd)	217	21.000
$\text{CH}_2=\text{CHCH=CHCH=CH}_2$	Triölefin (wel geconjugueerd)	250	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{-(C=O)-CH}_3$	Keton	282	27
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-(C=O)-CH}_3$	Niet geconjugueerd	278	30
$\text{CH}_2=\text{CH-(C=O)-CH}_3$	Geconjugueerd	324	24

Zoals in Tabel VII is te zien mogen de absorpties van multichromoforen bij elkaar worden opgeteld, indien deze chromoforen van elkaar gescheiden zijn door tenminste één enkele binding. Conjugatie van chromoforen heeft echter een heel grote invloed op de spectrale eigenschappen van een verbinding. Bijvoorbeeld 1,3-butadien ($\text{CH}_2=\text{CHCH=CH}_2$) heeft een maximum dat 20 nm langer is dan van het overeenkomstige niet geconjugueerde diene. Indien drie dubbele banden met elkaar worden geconjugueerd is de bathochrome verschuiving nog groter (± 40 nm).

Een soortgelijk effect treedt op bij atomen die vrije elektronenparen bezitten. Deze elektronenparen kunnen deelnemen aan delocalisatie van de π -electronen:



daardoor wordt ook hier het energieverval tussen het hoogste bezette en het laagste niet-bezette niveau kleiner. In het algemeen worden $\pi \rightarrow \pi^*$ -overgangen pas belangrijk als er in een molecuul een geconjugueerd systeem aanwezig is (Tabel VII): dan verschuift het absorptiemaximum naar het goed toegankelijke gewone UV-gebied.

In het geval van de carbonyl groep zijn zowel de vrije elektronenparen van de zuurstof ($n \rightarrow \pi^*$, 240 nm) als de dubbele binding van C=O ($\pi \rightarrow \pi^*$, 190 nm) in het spectrum te zien. De carbonyl band is met name belangrijk in peptiden en eiwitten. Deze verbindingen worden dan ook vaak gedetecteerd op de aanwezigheid van de aromaatring (tyrosine, tryptofaan, fenylalanine) of de aanwezigheid van de amide band (Tabel VIII). In spectrometrie wordt de amideband (ca. 215 nm) niet vaak gebruikt voor detectie

omdat het minder betrouwbaar is dan het meten van de aromaatband, maar in LC wordt deze band wel veel gebruikt omdat detectie bij 220 - 230 nm een significant hoger signaal geeft.

Tabel VIII: Absorptie van carbonyl bevattende chromoforen

Verbinding	$\lambda_{\max}$ (nm)
-CO-OH	205
-CO-OC ₂ H ₅	205
-CO-NH ₂	215
-CO-NH-R	215

Een andere belangrijke groep van verbindingen zijn de aromatische verbindingen. Aromatische koolwaterstoffen worden gekarakteriseerd door drie groepen van $\pi \rightarrow \pi^*$ -overgangen (dubbele bindingen).

Het meest bekende voorbeeld hiervan is benzeen. Het heeft een sterke absorptieband bij 184 nm ($\epsilon = 60.000$), een zwakkere band bij - de E₂ band - bij 204 nm ($\epsilon = 7.900$) en een nog zwakkere band - de B band - bij 256 nm ($\epsilon = 200$ nm). De drie karakteristieke benzeenbanden worden sterk beïnvloed door eventueel aanwezige substituenten. Voorbeelden hiervan zijn in Tabel IX te vinden.

Tabel IX: Absorptiebanden van aromatische verbindingen

Verbinding	Structuur	E ₂ -band		B-band	
		$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$
Benzeen	C ₆ H ₆	204	7.900	256	200
Tolueen	C ₆ H ₅ CH ₃	207	7.000	261	300
m-Xyleen	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂			263	300
Chloorbenzeen	C ₆ H ₅ Cl	210	7.600	265	240
Fenol	C ₆ H ₅ OH	211	6.200	270	1.450
Fenolaat ion	C ₆ H ₅ O ⁻	235	9.400	287	2.600
Aniline	C ₆ H ₅ NH ₂	230	8.600	280	1.430
Anilinium ion	C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺	203	7.500	254	160
Thiofenol	C ₆ H ₅ SH	236	10.000	269	700
Naftaleen	C ₁₀ H ₈	286	9.300	312	289
Styreen	C ₆ H ₅ CH=CH ₂	244	12.000	282	450

Indien substituenten elkaar elektronisch beïnvloeden dan is het spectrum moeilijker te voorspellen, maar in het algemeen geldt dat er een verschuiving naar langere golflengten met een toename van de molaire extinctie zal plaatsvinden. Meta en ortho substituenten geven meestal vergelijkbare spectra, terwijl para substitutie duidelijk verschillende spectra geeft. Bij kleurstoffen die bestaan uit aromatische systemen, waarbij het resonantiesysteem is uitgebreid,

auxochrome groepen aanwezig zijn, kruisconjugatie plaats vindt evenals ladingsoverdracht tussen de ringen en de substituenten, vindt inderdaad een verschuiving plaats naar langere golflengte met een hogere intensiteit. De enige complicerende factor is de neiging tot aggregatie ten gevolge van niet-polaire interacties van de ringen met polaire interacties van zowel de chromofore groepen als sulfonaat (-SO₃⁻) groepen die tot doel hebben om de oplosbaarheid te verbeteren.

Een laatste belangrijke groep van verbindingen zijn de heterocyclische verbindingen. Heteroalicyclische systemen hebben hun absorptie-eigenschappen te danken aan de heteroatomen en de hiermee overeenkomende vrije elektronenparen, terwijl heteroaromatische systemen zich meestal gedragen als gesubstitueerde aromaten. Deze laatste groep van verbindingen kunnen het best op dezelfde manier worden behandeld als aromatische verbindingen. Pyridine, bijvoorbeeld, kan beschouwd worden als een mono-gesubstitueerd benzeenderivaat met als gevolg een verschuiving naar een langere golflengte. Het verlies aan symmetrie heeft een hogere intensiteit tot gevolg en verder is er een langgolfige $n \rightarrow \pi^*$ overgang, die erg zwak is, omdat de elektronen gedeeltelijk in het ringsysteem worden getrokken.

Samenvattend! Als een onbekende verbinding met behulp van een UV-VIS detector moet worden gedetecteerd dan moet er worden gezocht naar:

- Een aromatische of heteroaromatische (zes)ringstructuur. In dit geval zal er in ieder geval absorptie bij 255 nm (of hoger) plaats vinden en de molaire absorptie zal in de duizenden liggen zodat gevoelige detectie mogelijk is;
- Een geconjugerd systeem. In dit geval zal er in ieder geval absorptie boven de 220 nm plaats vinden en de molaire absorptie is 1.000 of hoger, zodat detectie relatief eenvoudig is;
- Sterk absorberende afzonderlijke chromoforen (b.v. NO₂) of chromoforen die geconjugerd zijn met een auxochrome groep. Deze kunnen ook gedetecteerd worden maar minder gevoelig dan de aromatische en geconjugeerde systemen;
- Geïsoleerde chromoforen of zware

atomen (b.v. I) eventueel gekoppeld aan een auxochrome groep. Deze kunnen slechts in een beperkt aantal gevallen worden gedetecteerd, maar de detectiegevoeligheid is matig;

- Indien geen van de bovengenoemde structuurelementen aanwezig is moet gederivatiseerd worden of moet een andere detectietechniek worden gekozen.

1.4 INVLOED VAN HET OPLOSMIDDEL OP DE ABSORPTIE

Indien er een groot verschil in polariteit bestaat tussen de aangeslagen toestand en de grondtoestand van een molecuul, is de golflengte waarbij het maximum optreedt enigszins afhankelijk van het oplosmiddel. Daarom is het van belang bij een spectrum te vermelden welk oplosmiddel is gebruikt. Enkele voorbeelden van dergelijke verschuivingen zijn gegeven in Tabel X.

Tabel X: Veranderingen in het spectrum van aceton en mesityloxyde $[(CH_3)_2C=CH-CO-CH_3]$ onder invloed van het oplosmiddel

Verbinding	Oplosmiddel			
	Water	Methanol	Ethanol	n-Hexaan
ACETON:				
λ_{max}	264,5	270	272	279
ϵ_{max}	17,4	15,5	15,2	14,8
MESITYLOXYDE:				
λ_{max}	244,5	238	237	229,5
ϵ_{max}	10.000	10.700	12.600	12.600

Is de grondtoestand sterker polair is dan de aangeslagen toestand ($n \rightarrow \pi^*$ -overgangen), dan ligt het maximum in een polair oplosmiddel bij kortere golflengte dan in een apolair oplosmiddel. Bij $\pi \rightarrow \pi^*$ -overgangen is juist de aangeslagen toestand sterker polair dan de grondtoestand. Daarom ligt het maximum dan ook in een polair oplosmiddel bij langere golflengte dan in een apolair oplosmiddel.

Attentie! Een belangrijke conclusie die hieruit getrokken kan worden is dat het bij het detecteren van concentraties die dicht bij de detectiegrens liggen bijzonder belangrijk is dat de detectiegolflengte wordt aangepast aan de actuele water/methanol of water/acetonitril verhouding in de mobiele fase.

Een ander effect van het oplosmiddel, is de absorptie van het oplosmiddel zelf. In Tabel XI is voor een aantal oplosmiddelen de 20 en 80% transmissiewaarde gegeven. De 20% transmissiewaarde geeft aan wat de laagste golflengte is die nog gebruikt kan worden tijdens LC metingen met absorptiedetectie.

Tabel XI: Transmissiewaarden voor oplosmiddelen

Oplosmiddel	Golflengte (nm)	
	20% oplosmiddel	80% oplosmiddel
n-Heptaan	200	220
Acetonitril	190	205
n-Hexaan	200	220
Ethylacetaat	260	275
Cyclohexaan	220	240
Aceton	340	350
Isooctaan	210	235
Ethanol	210	240
Tetra	265	280
Dioxaan	220	270
Tolueen	290	310
Benzeen	280	300
Chloroform	250	260
Tetrahydrofuraan	245	270
Dichloorethaan	230	245
Methanol	210	235
Dichloormethaan	235	245
Water	190	
Diethylether	210	
Isopropanol	210	235

Attentie! Belangrijke conclusies uit Tabel XI zijn dat bijvoorbeeld het gebruik van ethylacetaat tijdens vloeistof-vloeistof extracties (LLE), het gebruik van aceton tijdens eiwitprecipitatie reacties, het gebruik van chloroform tijdens vaste stof-vloeistof extracties (SPE) voor aanzienlijke problemen (hoog achtergrondsignaal) kan zorgen indien de organische vloeistof niet kwantitatief wordt verwijderd voordat de LC scheiding wordt uitgevoerd. Bij het samenstellen van eluentia voor normaal-fase (normal-phase) scheidingen moeten aceton, benzeen, chloroform, ethylacetaat, tetra en tolueen, indien mogelijk, worden vermeden. Bij omkeer-fase scheidingen moeten alleen lage concentraties aan tetrahydrofuraan worden gebruikt.

1.5 INVLOED VAN DE pH OP DE ABSORPTIE

Bij verandering van de pH van de oplossing zal het absorptiemaximum alleen verschuiven als de chromofoor verandert met de pH. Voorbeelden zijn de fenolische hydroxylgroep, en de aromati-

sche aminogroep. De zuurstof in een fenol heeft twee vrije elektronenparen die kunnen deelnemen aan de delocalisatie van de π -electronen van de ring, en het fenolaat anion heeft er drie (Figuur 4).

Omgekeerd heeft aniline een vrij elektronenpaar op de stikstof, het anilinium kation geen (Figuur 4).

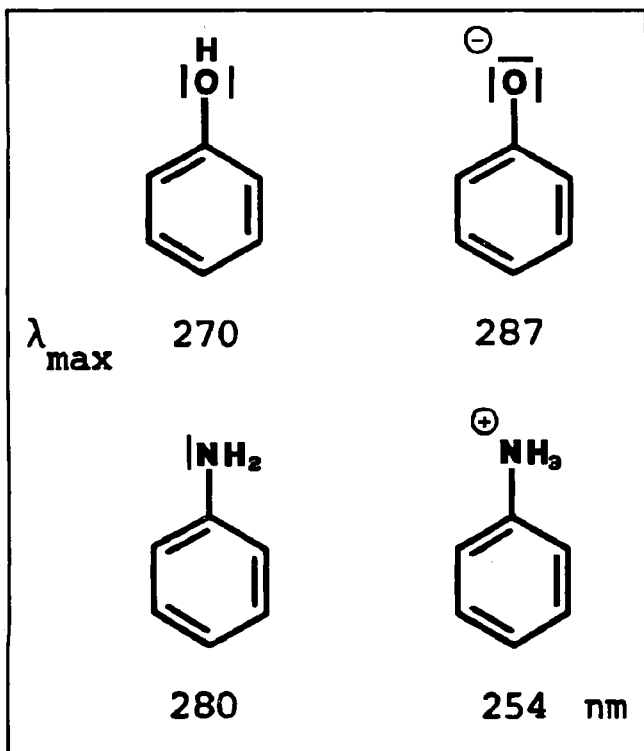


Fig.4: Het fenolaat anion heeft meer resonantiemogelijkheden dan fenol; het aniliniumion heeft er minder dan aniline

Het gevolg is dan ook dat het spectrum van aniline in zuur milieu lijkt op dat van benzeen: in zuur milieu hebben aniline en benzeen dezelfde chromofoor (Figuur 5).

Attentie! Opvallend is dat de B-band van benzeen niet alleen een maximum heeft bij 256 nm, maar dat er een 'handvormig' spectrum te zien is rond deze golflengte. De zes scherpe pieken die zijn waar te nemen komen overeen met de verschillende vibratieovergangen binnen één en dezelfde elektronenovergang. Het hier getoonde spectrum is zeer karakteristiek voor benzeen.

1.6 INTENSITEIT VAN EEN ABSORPTIEBAND

Men kan aannemelijk maken dat de molaire extinctie evenredig is met:

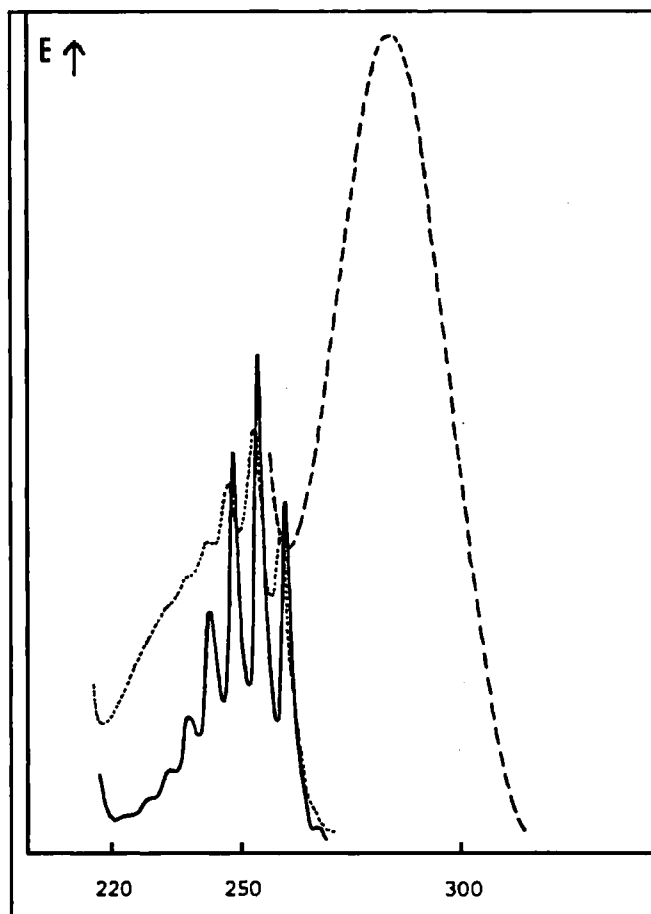


Fig. 5: UV-spectrum van benzeen in ethanol (-----), aniline (- - - -) en aniline in aangezuurde ethanol (. . . .)

- De grootte van de chromofoor (de oppervlakte van een chromofoor ligt in de grootte-orde van nm^2); naarmate de oppervlakte groter is, is de kans door een foton geraakt te worden ook groter;
- De kans dat een foton een elektron werkelijk in een hoger energieniveau brengt, de excitatie-waarschijnlijkheid; deze kans is verschillend voor verschillende typen chromoforen;
- Het getal van Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), dat is het aantal moleculen in een mol.

Uitgaande van een gemiddelde oppervlakte voor een chromofoor en een excitatie-waarschijnlijkheid van 1, kan worden berekend dat de extinctie maximaal ca. 100.000 kan bedragen. Verbindingen die een hogere molaire extinctie bezitten

weinig.

1.7 WEERGEVEN VAN EEN ABSORPTIESPECTRUM

In de literatuur worden UV-spectra op verschillende manieren weergegeven (Figuur 6).

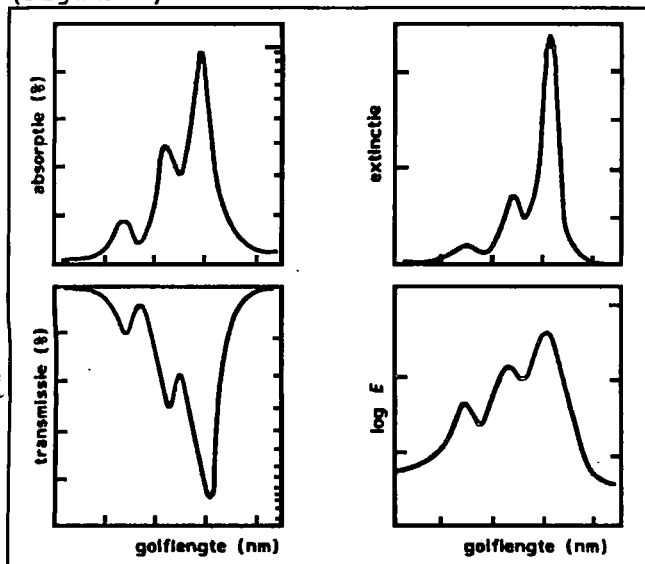


Fig. 6: enkele mogelijkheden voor het weergeven van een spectrum

Op de horizontale as worden de golflengte (λ) (of de frequentie ν) uitgezet. Gebruik van het golfgetal (σ) komt bij UV-spectra weinig voor. De frequentie is een fundamentele grootheid dan de golflengte en bovendien evenredig met de energie van het opgenomen lichtkwant. Op de verticale as wordt de transmissie (of %T), de extinctie of de logaritme van de extinctie afgezet. Het gebruik van de extinctie (A of E) heeft als voordeel dat deze evenredig is met de concentratie. Log E geeft een curve waarvan de vorm onafhankelijk is van de concentratie: bij verandering van de concentratie verschuift de curve over het gehele gebied met een zelfde bedrag. Bovendien kunnen zeer hoge en zeer lage extincties in één figuur worden weergegeven.

Voor bijvoorbeeld correlatie en structuuropheldering verdient het gebruik van $\log \epsilon$ tegen λ (of ν) de voorkeur, bij het weergeven van spectra van mengsels en voor gehaltesbepalingen E. Meestal wordt E tegen λ uitgezet.

Attentie! De extinctie van een mengsel is gelijk aan de som van de extincties die elk van de componenten afzonderlijk zou hebben in het mengsel.