

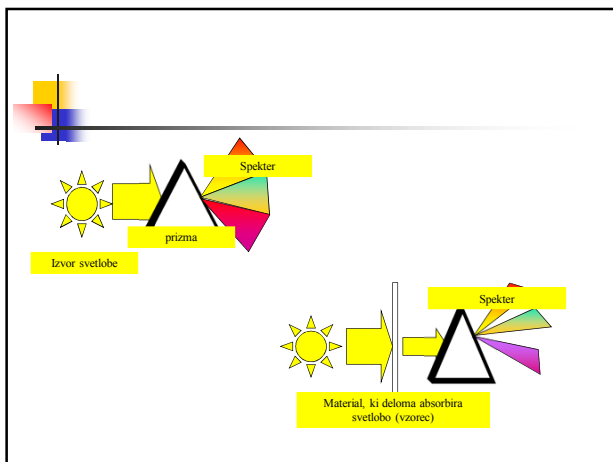
Molekularna spektrometrija

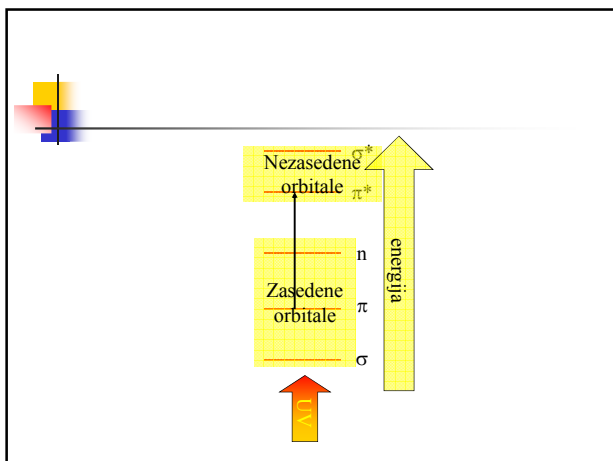
Absorpcija

Fluorescenca

Pojavi v snovi (posledica interakcije EM valovanje - snov):

- Elektronski prehodi
- Vibracije
- Rotacije





Molekularna spektrometrija UV-VIS

Elektronski prehodi (UV-VIS):

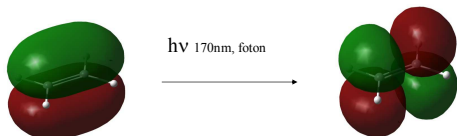
Molekule:



Atomi:

Prehodi zunanjih elektronov

Molekularna spektrometrija UV-VIS



Molekularna absorpcijska spektrometrija

Vibracije (IR):

Sprememba dolžine vezi



Rotacije (IR):

Sprememba energije molekule zaradi rotacij

Molekularna absorpcijska spektrometrija

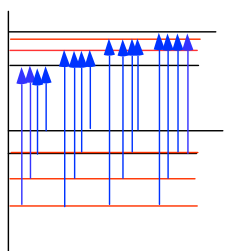
Proces absorpcije:

Vsako elektronsko stanje v molekuli spremlja niz vibracijskih nivojev

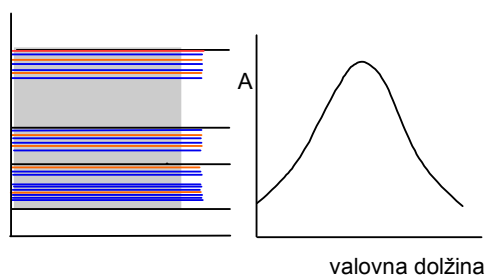
Vsak vibracijski nivo sestavlja več rotacijskih nivojev.

Posledica je zvezni absorpcijski spekter!

Absorpcija



Molekularni absorpcijski spekter



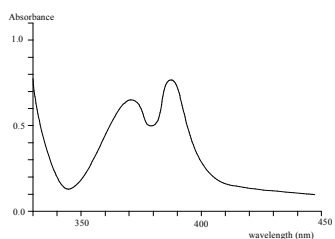
Molekularna absorpcijska spektrometrija

Kvalitativna analiza: UV/VIS, IR

Identifikacija snovi temelji na primerjavi absorpcijskega spektra neznanega vzorca z referenčno substanco!

Predvsem IR spektroskopija!!!

Absorpcijski spekter



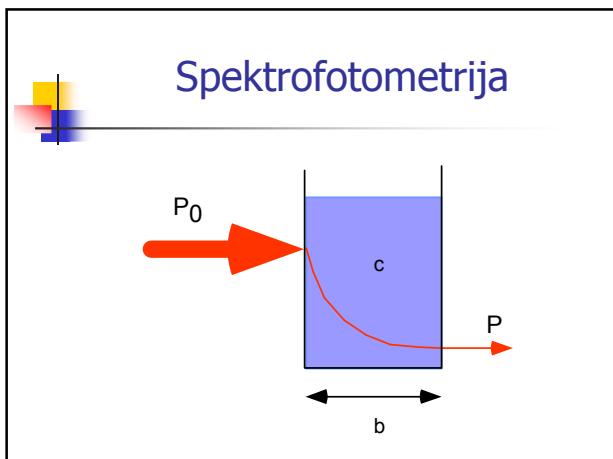
Spektrofotometrija

Kvantitativna analiza

Osnova Beer-Lambert-ov zakon

Predvsem UV/VIS

Beerov- Lambert-ov zakon: Delež absorbirane svetlobe je eksponentna funkcija koncentracije analta in dolžine poti svetlobnega žarka skozi vzorec.



Spektrofotometrija - Beerov zakon

$$-\frac{dP}{dN} = -K \cdot P$$

P.....intenziteta sevanja
 N.....število delcev, ki absorbirajo
 K..... konstanta

$$\int_0^P \frac{dP}{P} = -K \int_0^N dN \qquad \ln \frac{P}{P_0} = -K \cdot N$$

Spektrofotometrija - Beerov zakon

Ker je število delcev, ki absorbirajo (N), odvisno od koncentracije in dolžine poti, velja:

$$K \cdot N = k' \cdot b \cdot c$$

k' absorptivnost (vključuje tudi faktor za pretvorbo naravnega logaritma v desetiški logaritem)

Spektrofotometrija - Beerov zakon

Definiramo prepustnost (transmitanco) kot delež prepuščene svetlobe:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

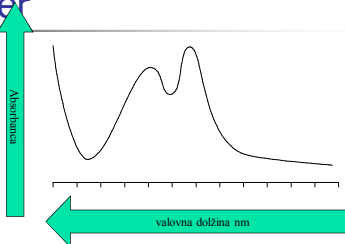
in absorbanco:

$$-\log(T) = A$$

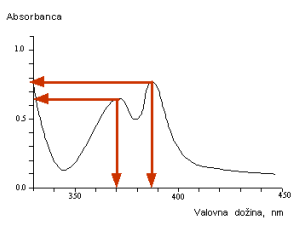
$$A = abc$$

Aabsorbanca

Spekter



Beer Lambert-ov zakon
 $A = \epsilon \cdot c \cdot l$



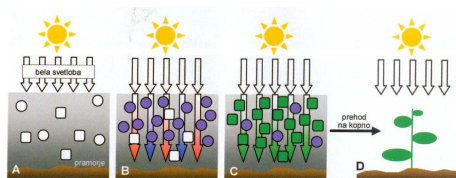
Kaj je komplementarna barva?

Območje val. dolžin (nm)	barva	Komplementarna barva
400-435	Vijolična	Rumeno-zelena
435-480	Modra	Rumena
480-490	Modro-zelena	Oranžna
490-500	Zeleno-modra	Rdeča
500-560	Zelena	Škriatna
560-580	Rumeno-zelena	Vijolična
580-595	Rumena	Modra
595-650	Oranžna	Modro-zelena
650-750	Rdeča	Zeleno-modra

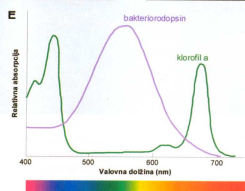
Zakaj je raztopina $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ rdeče barve?

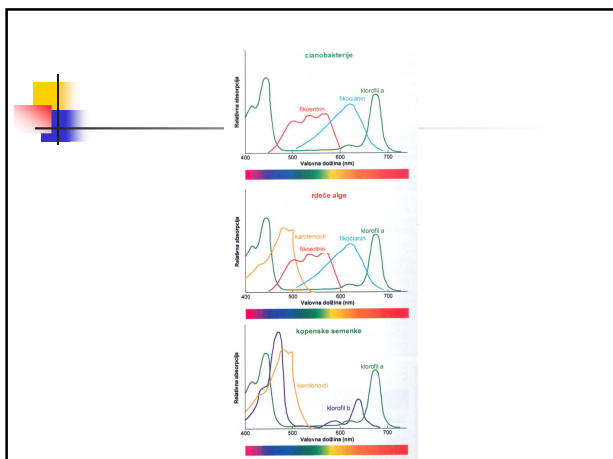
$\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ absorbira zeleno komponento vpadne polikromatske (bele) svetlobe in prepušča rdečo (komplementarno) barvo.

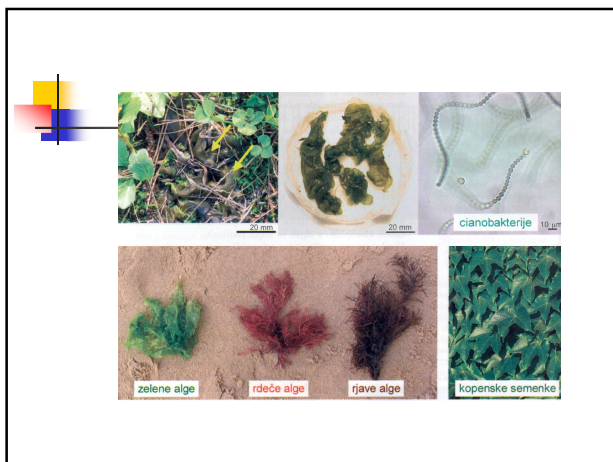
Zakaj so rastline zelene?



Slika 1: Evolucijski razvoj organizmov z zelenim fotosinteznim barvilom klorofilom. Beli krogi in beli kvadrati – dve vrsti heterocentričnih bakterij; vijolični krogi – fotosintetske bakterije z bakteriorodopsinom; zeleni kvadrati – fotosintetske bakterije s klorofilom. Za razlago glej besedilo.







Spektrofotometrija- primer 1

Izračunajte absorbanco za raztopino, ki pri 450 nm prepušča 89% svetlobe!

$T = 89/100 = 0,89$

$A = -\log(T) = -\log(0,89) = 0,051$

Spektrofotometrija

Določevanje koeficienta absorptivnosti:

Uporaba standardnih raztopin! (Standardne raztopine - raztopine z znano koncentracijo)

Če izražamo koncentracijo v mol/L, govorimo o molarnem absorpcijskem koeficientu - ϵ . (? Enota)

Spektrofotometrija- primer 2

Raztopina vsebuje 4,50 mg/L obarvane spojine. Izmerili smo absorbanco 0,30 pri 530 nm v 2 cm celici – kivetu.

Izračunajte a!

$$A = a \cdot b \cdot c$$

a- Absorptivnost, A- Absorbanca, b- dolžina poti, c-koncentracija

$$a = A / (b \cdot c) = 0,30 / (2,00 \text{ cm} \cdot 4,5 \text{ mg/l}) = 0,33 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ l}$$

Spektrofotometrija-primer 3

Raztopina $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})^{2+}$ ima absorbanco 0,20 pri 530 nm v 1,00 cm kivetu. ϵ je $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Izračunajte koncentracijo!

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$C = A / (\epsilon \cdot b) = 0,020 \text{ M}$$

Spektrofotometrija-primer 4

Absorbanca raztopine z neznano koncentracijo MnO_4^- je 0,500 pri 525 nm. Pri enakih pogojih je absorbanca $1,0 \times 10^{-4}$ M raztopine 0,200.

Izračunajte koncentracijo neznanne raztopine!

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{\epsilon b c_x}{\epsilon b c_s} = \frac{c_x}{c_s}$$

$$C_x = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

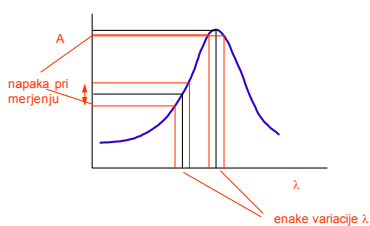
Predpostavili smo linearno odvisnost absorbance od koncentracije!

Spektrofotometrija- merjenje absorbance

Vedno jo poizkušamo meriti pri valovni dolžini, ki ustreza maksimumu absorpcije.

To nam zmanjša napake, izboljša občutljivost in zniža mejo zaznave.

Spektrofotometrija



Spektrofotometrija- merjenje absorbance

Napake pri merjenju absorbance:

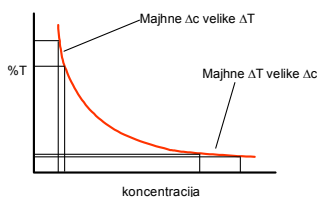
Nizke koncentracije: majhne koncentracijske spremembe povzročijo velike spremembe v prepustnosti (T)

Visoke koncentracije: spremembe v prepustnosti majhne.

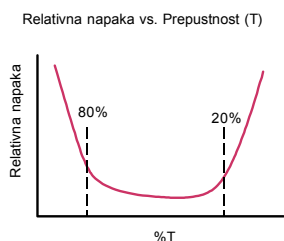
Optimalno območje:

T: 20-80%

Spektrofotometrija



Spektrofotometrija





Spektrofotometrija

VEČKOMPONENTNI SISTEM

Absorbanca je aditivna količina!

$$A_T = a_1 b_1 c_1 + a_2 b_2 c_2$$

Če uporabimo isto kivetto:

$$A_T = (a_1 c_1 + a_2 c_2) b$$



Spektrofotometrija-primer 5

Želimo določiti koncentracijo kovinskega kompleksa (MR), ki absorbira pri 522 nm ($\epsilon = 1,18 \cdot 10^4$) v prisotnosti $1 \cdot 10^{-4}$ M raztopine reagenta (R) ($\epsilon = 5,16 \times 10^2$).

Merjena absorbanca je 0,727 v 1,00 cm kiveti. Kakšna je koncentracija MR v raztopini?

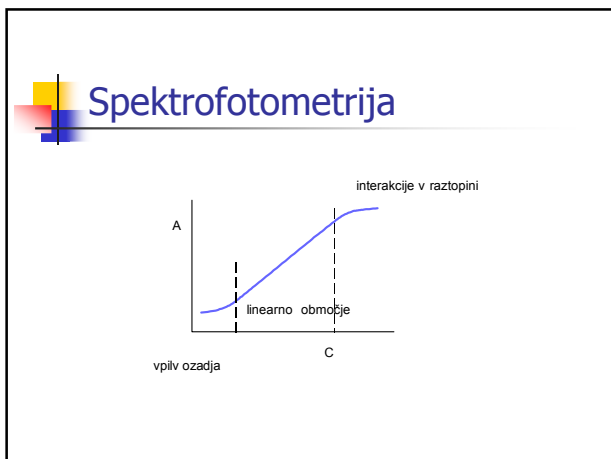


Spektrofotometrija-primer 5.(nadalj)

$$A_T = \epsilon_{MR} c_{MR} + \epsilon_R c_R$$

$$0,727 = 1,18 \times 10^4 c_{MR} + (5,16 \times 10^2)(10^{-4}) M$$

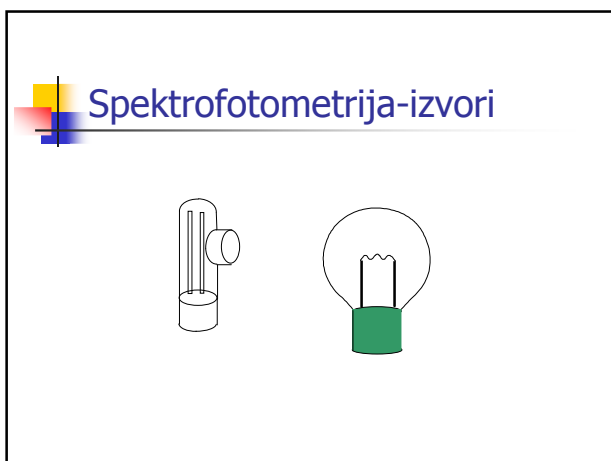
$$c_{MR} = 5,72 \times 10^{-5} M$$



Spektroskopija- izvori (I)

Izvori zveznega valovanja:
 VIS
 volframove žarnice (stabilen napajalnik!)

UV
 devterijeve žarnice



Spektroskopija- Izbira valovne dolžine

Monokromatorji

Zanima nas lahko izbrana valovna dolžina ali območje valovnih dolžin («scan«)

Ne glede na izvor, ne moremo doseči absolutne monokromatske svetlobe

Črtasti izvori so ozpostavljeni Dopplerejemu efektu

Pri monokromatorjih pa moramo upoštevati konstrukcijske značilnosti (širina reže)

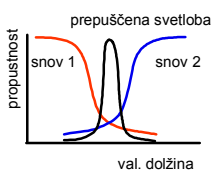
Spektroskopija- Izbira valovne dolžine (I)

Filtri

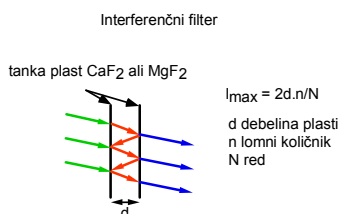
Absorpcijski filtri

Interferenčni filtri

Absorpcijski filtri



Interferenčni filtri



Spektroskopija- Izbira valovne dolžine -Monokromatorji

Prizme:

Vidno, UV področje kremen

IR NaCl, KCl

Prednosti:

Omogoča izbiro valovnih dolžin v širokem območju

Cena

Slabosti:

Majhna disperzija (ločljivost)

Svetloba prehaja skozi material, zato je omejeno območje valovnih dolžin (absorpcija!)

Spektroskopija- Izbira valovne dolžine -Monokromatorji

Uklonske mrežice

Število zarez/mm

UV/vis 300-2000 črt/mm

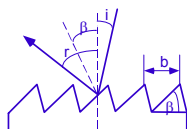
IR 10-200 črt/mm

Število vpliva na ločljivost!

Uklonska mrežica

$$n\lambda = d(\sin i + \sin r)$$

i... vpadni kot
r...kot odbitega žarka
d...razdalja med zarezi
n...red uklona
 λ ...valovna dolžina



Spektroskopija-detektorji (I)

- Pretvorba optičnega signala v električni (merljivi) signal.
- Izbira detektorja zavisi od valovne dolžine!

Spektroskopija-detektorji (II)

Vrste detektorjev:	val. Dolž.	Mejena količina	Področje
fotocelica	150-1000	tok	UV/vis
fotopomnoževalka	150-1000	tok	UV/vis
»Solid state«	350-3000	različno	
termočleni	600-20000	tok	IR
termistorji	600-20000	upor	IR
diode array	150-1000	tok	UV/vis
CCD	UV-VIS		

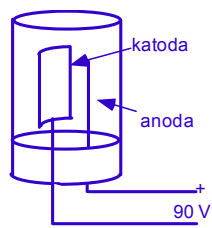
Spektroskopija-detektorji (III)

Fotocelica:

Fotoelektrični efekt: Foton, ki pade na katodo prekrito s posebno površino izbije elektron. Merimo tok, ki je proporcionalen številu fotonov, ki padejo na fotokatodo.

Fotocelice imajo majhen »temni tok«, ki je posledica termičnih vplivov.

Fotocelica



Spektroskopija-detektorji (IV)

Fotopomnoževalke:

Podobno fizikalno ozadje kot pri fotocelicah, s tem, da primarni fototok ojačimo na seriji dinod.

Fotopomnoževalka (I)

Fotopomnoževalka (II)

Fotodiodni niz – "Diode array"

- Serija fotodiod, ki so razvrščene na integriranem vezju
- S to vrsto detektorja lahko hkrati merimo svetlobo različnih valovnih dolžin



Spektrofotometrija- instrumentacija


Instrumenti za UV-VIS spektrometrijo

Instrumenti za IR spektrometrijo



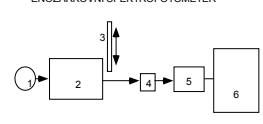
Spektrofotometrija- instrumentacija

- Enožarkovni spektrometri
- Dvožarkovni spektrometri
- Večkanalni spektrometri
- Fluorimetri



Enožarkovni sistem

ENOŽARKOVNI SPEKTROFOTOMETER



1 svetlobni izvor

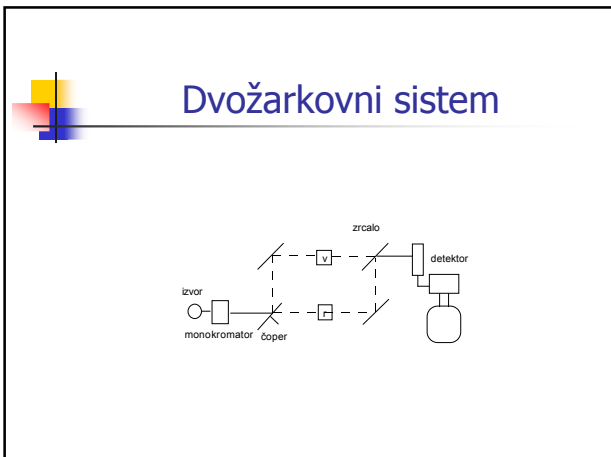
2 izbira valovne dolžine

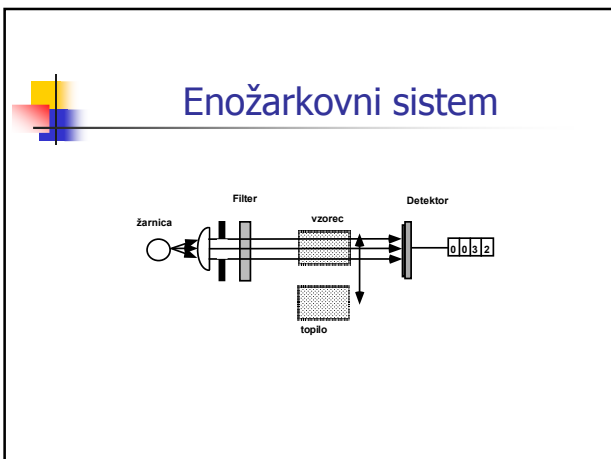
3 zaklop

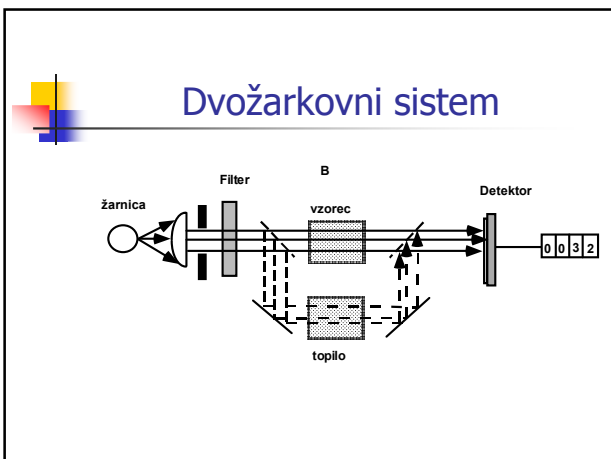
4 kiveta

5 detektor

6 zapis signala







Primer: Spektrofotometrično določevanje železa:

Temelji na nastanku tiocianatnega kompleksa ($\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$), ki ima maksimum absorpcije pri zeleni barvi.

Pri spektrofotometriji moramo torej izbrati komplementarno barvo svetlobe glede na barvo komponente, ki jo želimo določiti.

Območje val. dolžin (nm)	barva	Komplementarna barva
400-435	Vijolična	Rumeno-zelena
435-480	Modra	Rumena
480-490	Modro-zelena	Oranžna
490-500	Zeleno-modra	Rdeča
500-560	Zelena	Škrlatna
560-580	Rumeno-zelena	Vijolična
580-595	Rumena	Modra
595-650	Oranžna	Modro-zelena
650-750	Rdeča	Zeleno-modra
