

# **MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE**

v UV a viditelné oblasti spektra

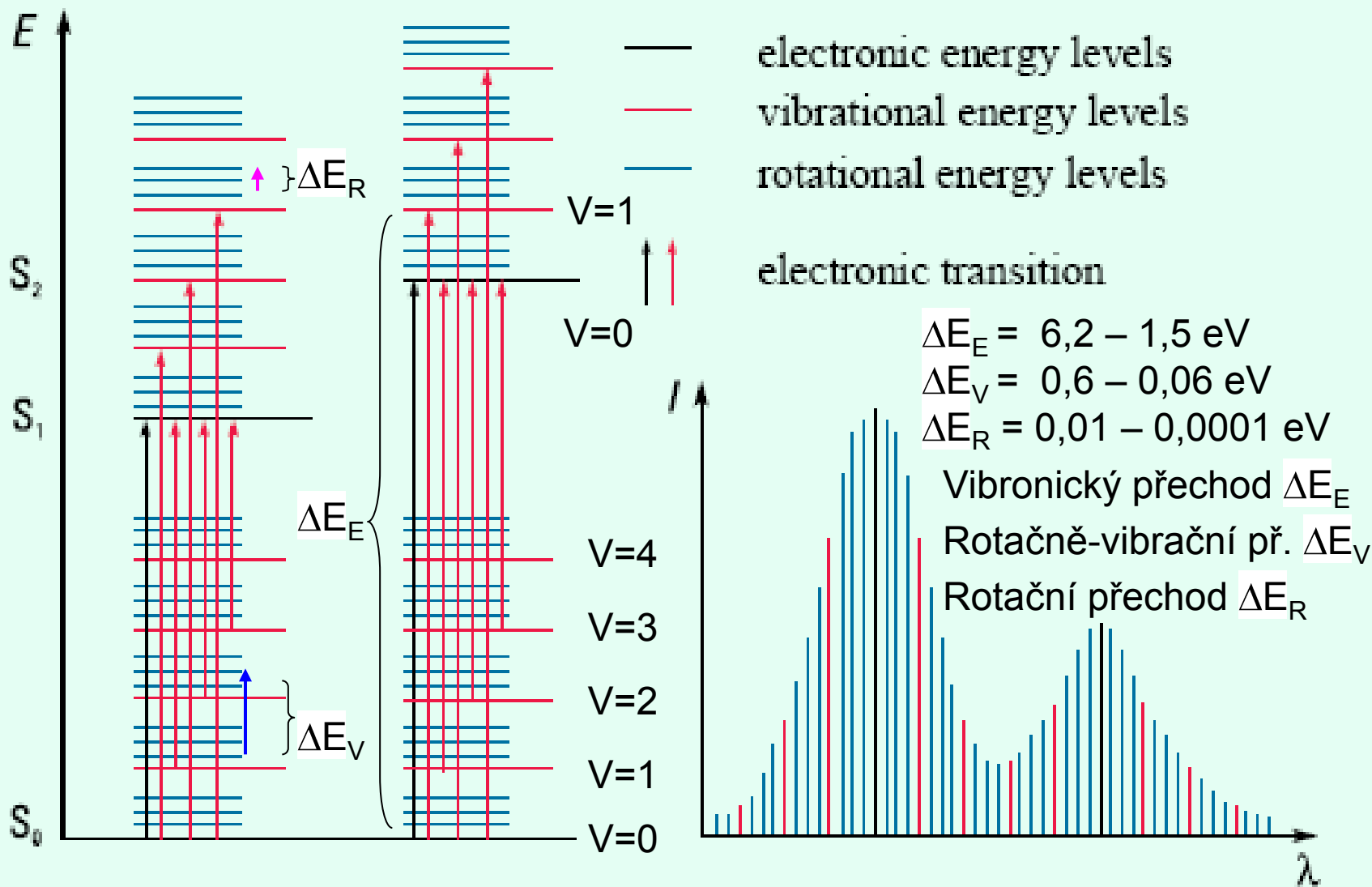
# ENERGIE MOLEKULY

- $E_M = E_T + E_R + E_V + E_E$
- $E_E > E_V > E_R > E_T$

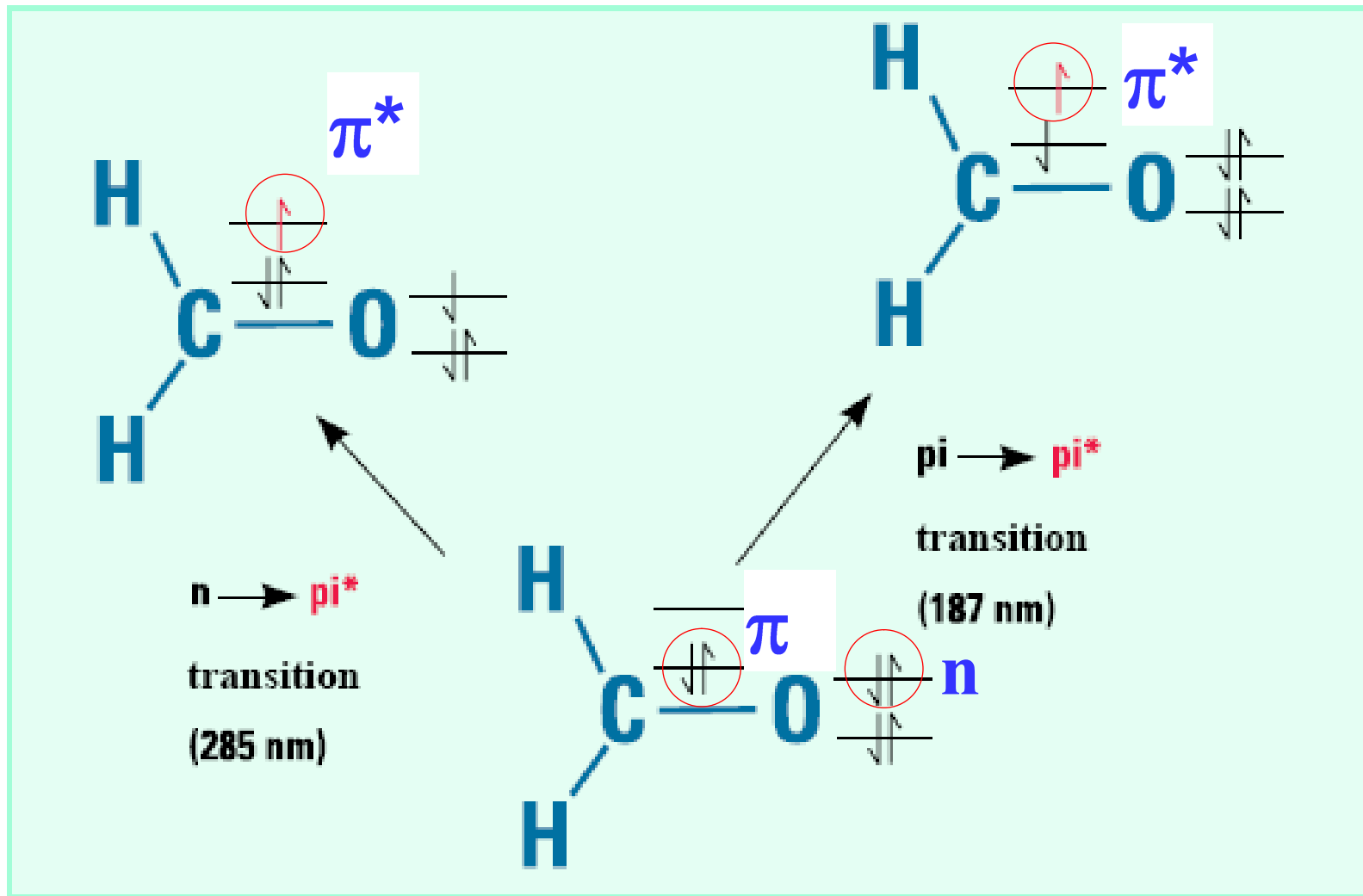
Kvantovaná energie  $\Rightarrow$  energetické hladiny:

- Rotační  $\Rightarrow$  přechody mezi rotačními stavy  $\Rightarrow$   
**rotační spektra (MW)**
- Vibrační  $\Rightarrow$  přechody mezi vibračními stavy  $\Rightarrow$   
**vibrační spektra (IR)  $\Delta E_V \approx X \cdot 10^4 \cdot \Delta E_R$**
- Elektronové  $\Rightarrow$  přechody mezi elektronovými stavy  $\Rightarrow$   
**elektronická spektra (UV-Vis)  $\Delta E_E \approx X \cdot 10^2 \cdot \Delta E_V$**

# ENERGETICKÉ PŘECHODY V MOLEKULE A MOLEKULOVÁ SPEKTRA

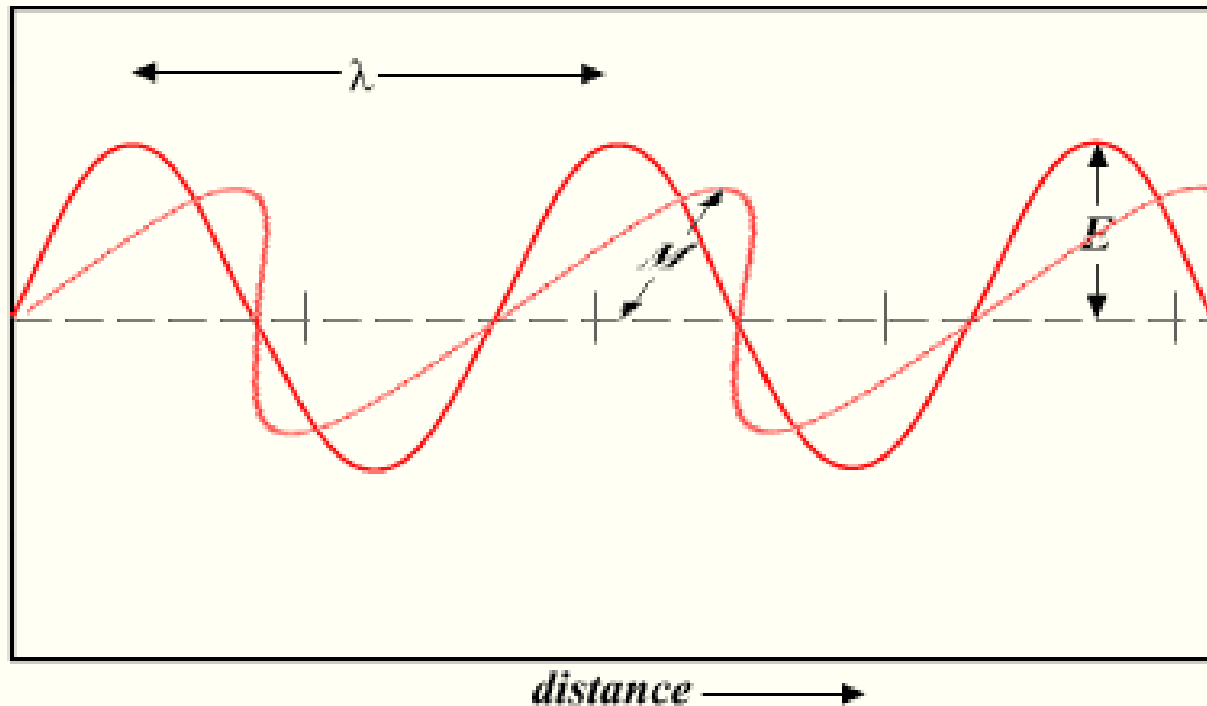


# ELEKTRONICKÉ PŘECHODY VE FORMALDEHYDU



# ELEKTROMAGNETICKÉ VLNĚNÍ

*Light Wave*

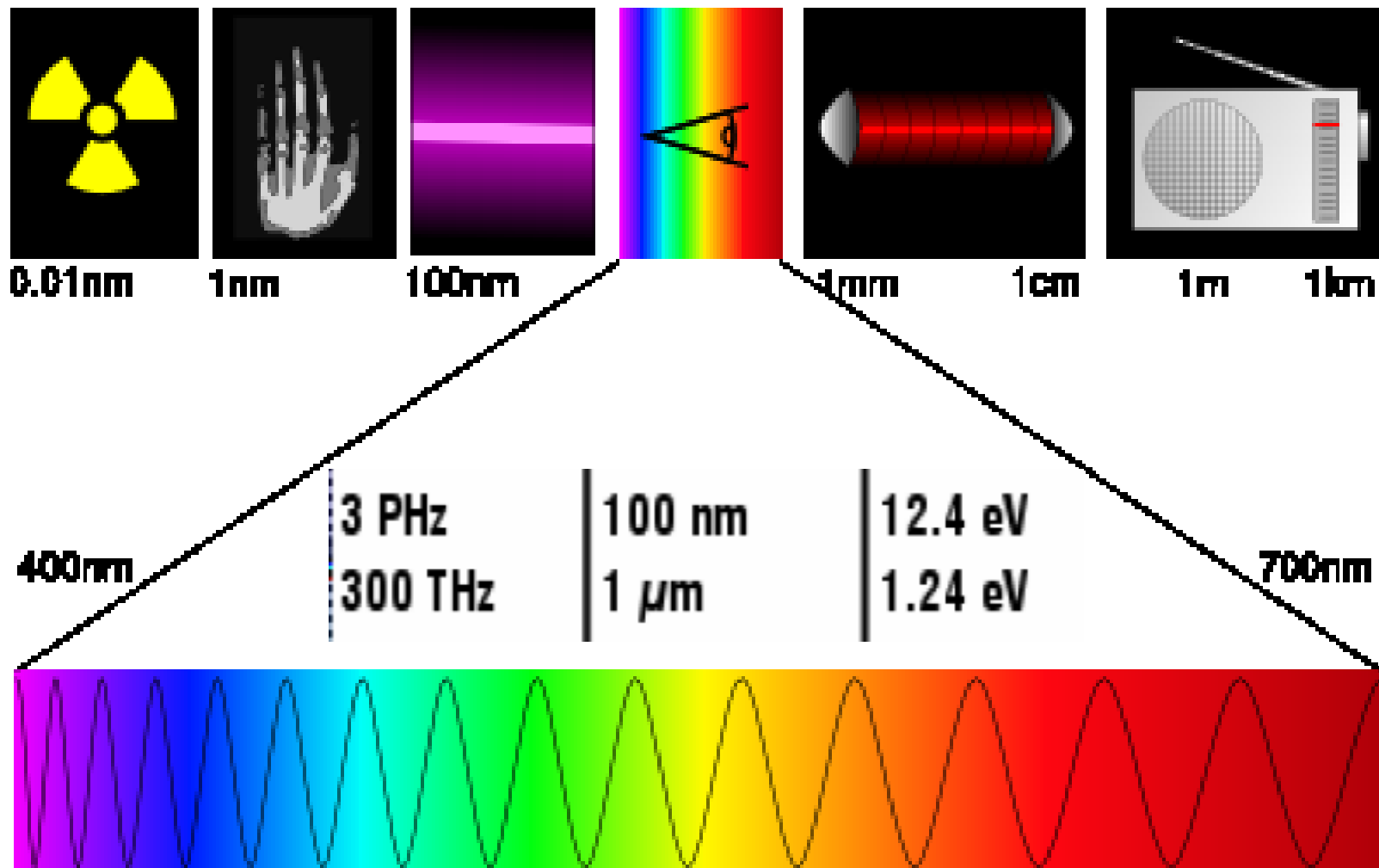


$\lambda$  = wavelength

$E$  = amplitude of  
electric field

$M$  = amplitude of  
magnetic field

# SPEKTRUM ELEKTROMAGNETICKÉHO ZÁŘENÍ



# ZÁŘENÍ UV - Vis

Ultraviolet

Visible

Infrared



$$E = h\nu = hc/\lambda$$

$c$  je rychlost světla ( $3 \times 10^8$  m/s)

$h = 6.65 \times 10^{-34}$  J·s = 4.1  $\mu$ eV/GHz

je Planckova konstanta

# VIDITELNÉ SVĚTLO

Záření o vlnových délkách 400 - 800 nm je viditelné světlo, které je absorbováno a emitováno elektrony v atomech a molekulách, když přecházejí mezi energetickými hladinami.

<u>Barva</u>	Vlnová délka	Frekvence
<u>červená</u>	~ 625 až 740 nm	~ 480 až 405 THz
<u>oranžová</u>	~ 590 až 625 nm	~ 510 až 480 THz
<u>žlutá</u>	~ 565 až 590 nm	~ 530 až 510 THz
<u>zelená</u>	~ 520 až 565 nm	~ 580 až 530 THz
<u>azurová</u>	~ 500 až 520 nm	~ 600 až 580 THz
<u>modrá</u>	~ 430 až 500 nm	~ 700 až 600 THz
<u>fialová</u>	~ 380 až 430 nm	~ 790 až 700 THz



# INTERAKCE ZÁŘENÍ S LÁTKOU

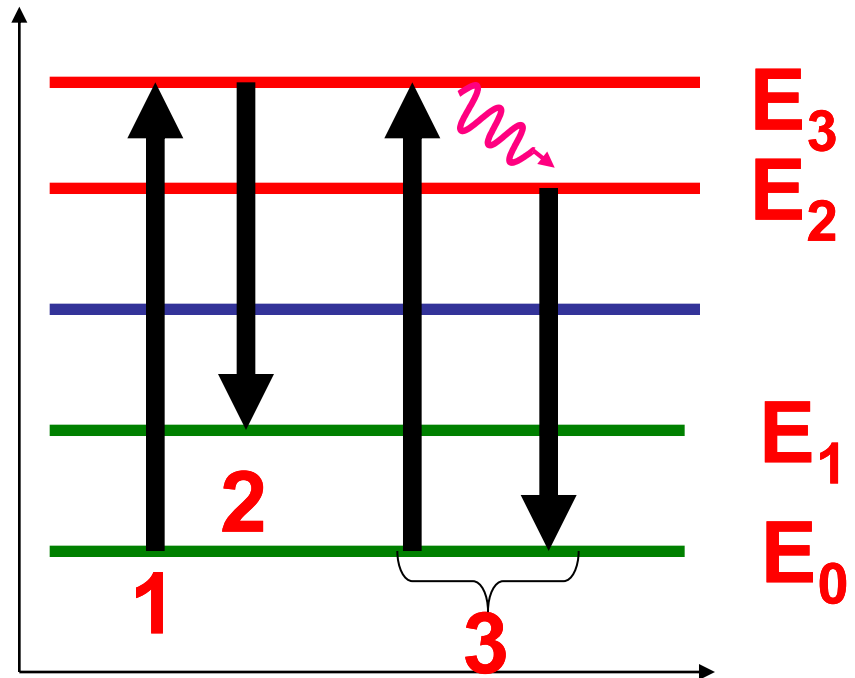
- Absorpce **1**
- Emise **2**
- Luminiscence **3**

$$E_3 > E_2 > E_1 > E_0$$

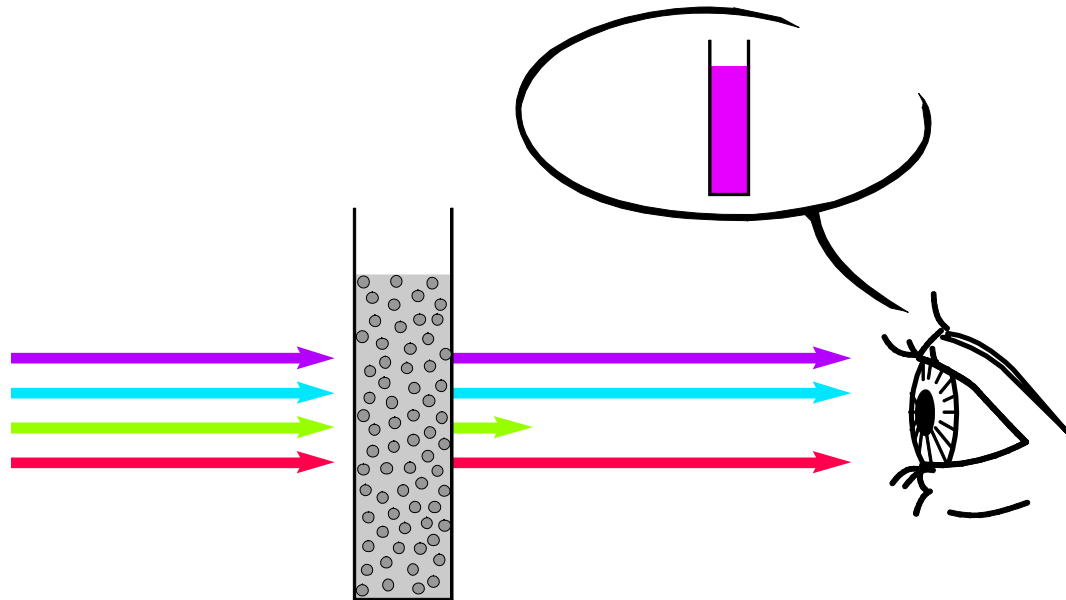
$$h\nu_{\text{abs}} = E_3 - E_0$$

$$h\nu_{\text{em}} = E_3 - E_1$$

$$h\nu_{\text{lum}} = E_2 - E_0$$

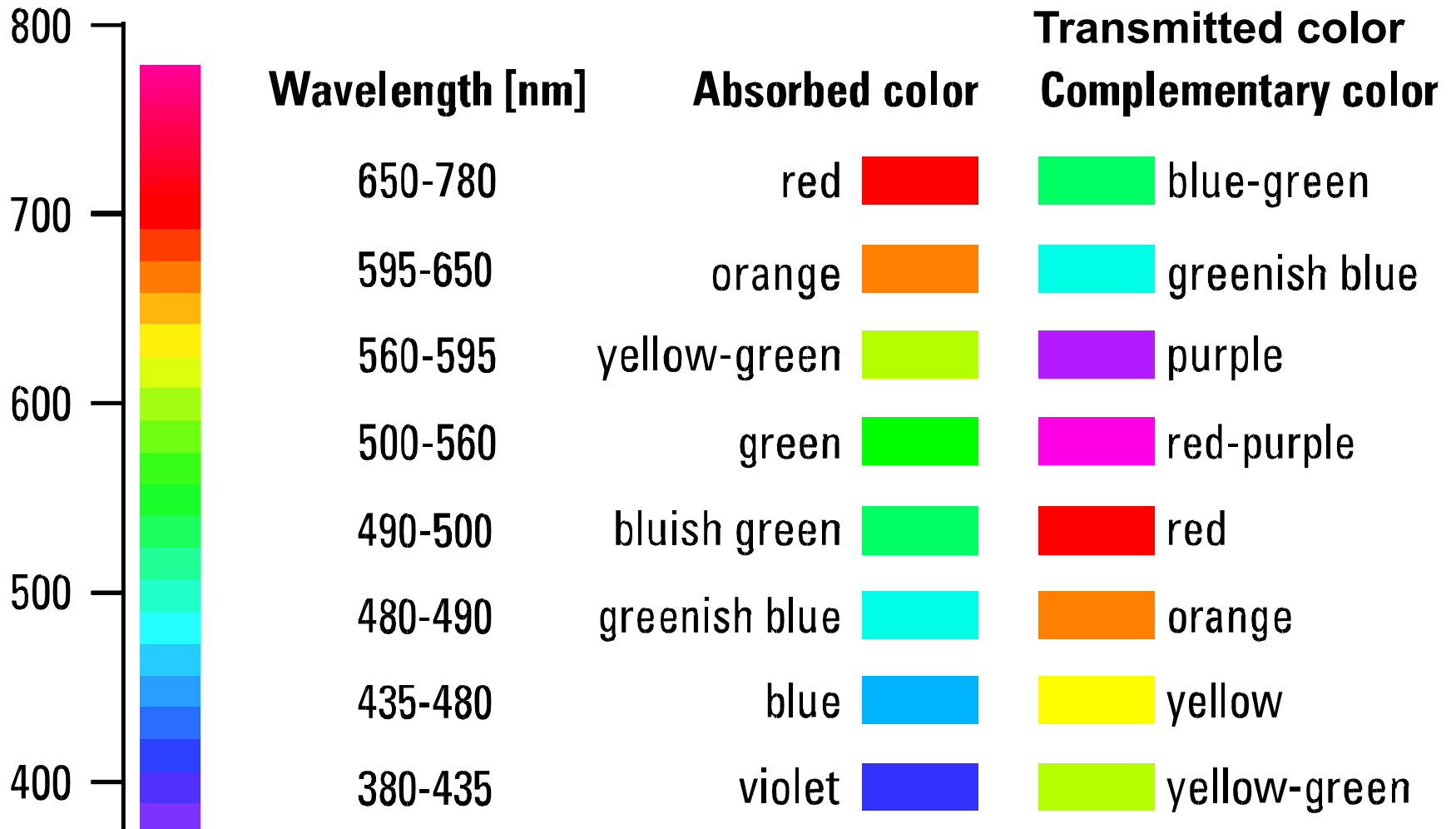


# PROPUSTNOST A BARVA



**Lidské oko vidí komplementární barvu, světlo vlnových délek, pro něž je látka propustná**

# ABSORPCE A KOMPLEMENTÁRNÍ BARVY



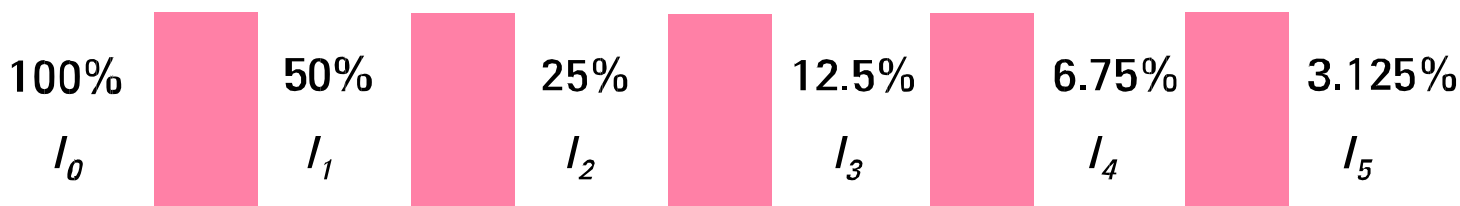
# UV-Vis spektroskopie

## Fotometrie

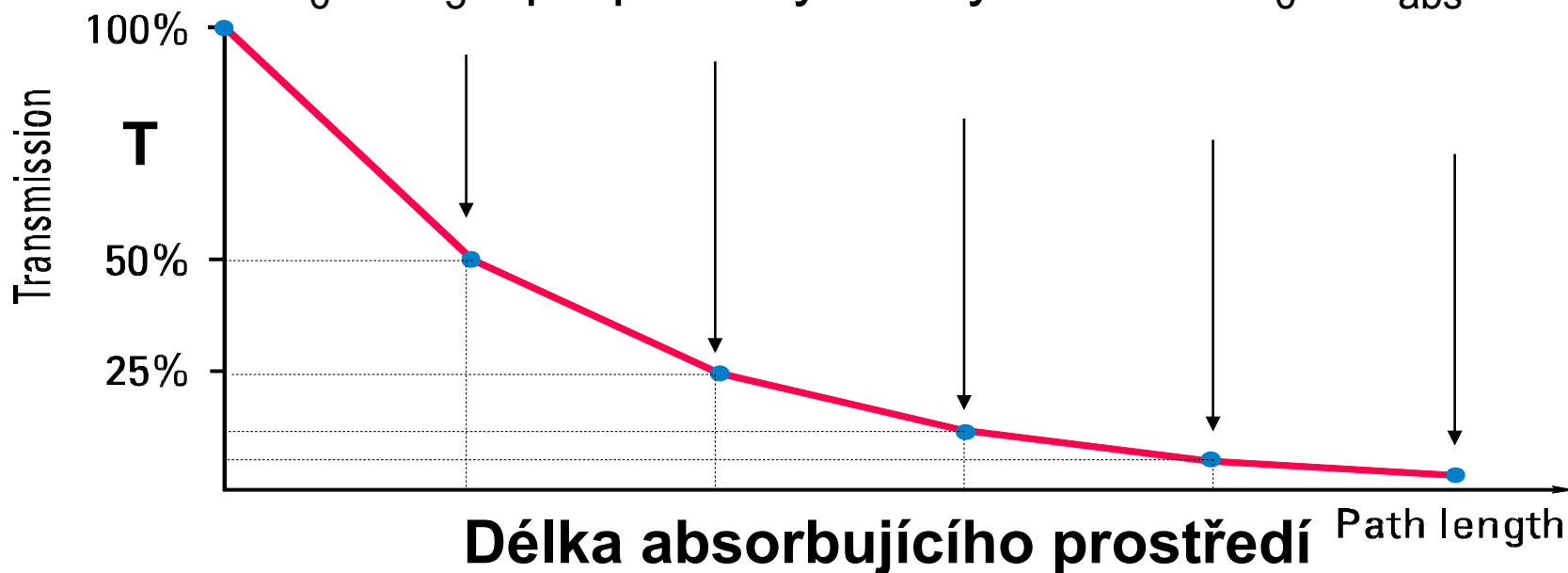
- Signál: zářivý tok  $\Phi$  (W), dopadající  $\Phi_0$ 
  - Emisní
  - Absorpční
  - Luminiscenční (fluorescenční, fosforescenční)
- Transmittance  $T = (\Phi/\Phi_0)$ ;  $(\Phi/\Phi_0) \times 100$  (%)
- Absorbance  $A = \log(\Phi_0/\Phi) = -\log T$ ;  $0 \leq A \leq \infty$

# Transmitance a délka absorbujícího prostředí: zákon Bouguer-Lambert

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} = e^{-\text{konst} \times \text{délka absorbujícího prostředí}}$$

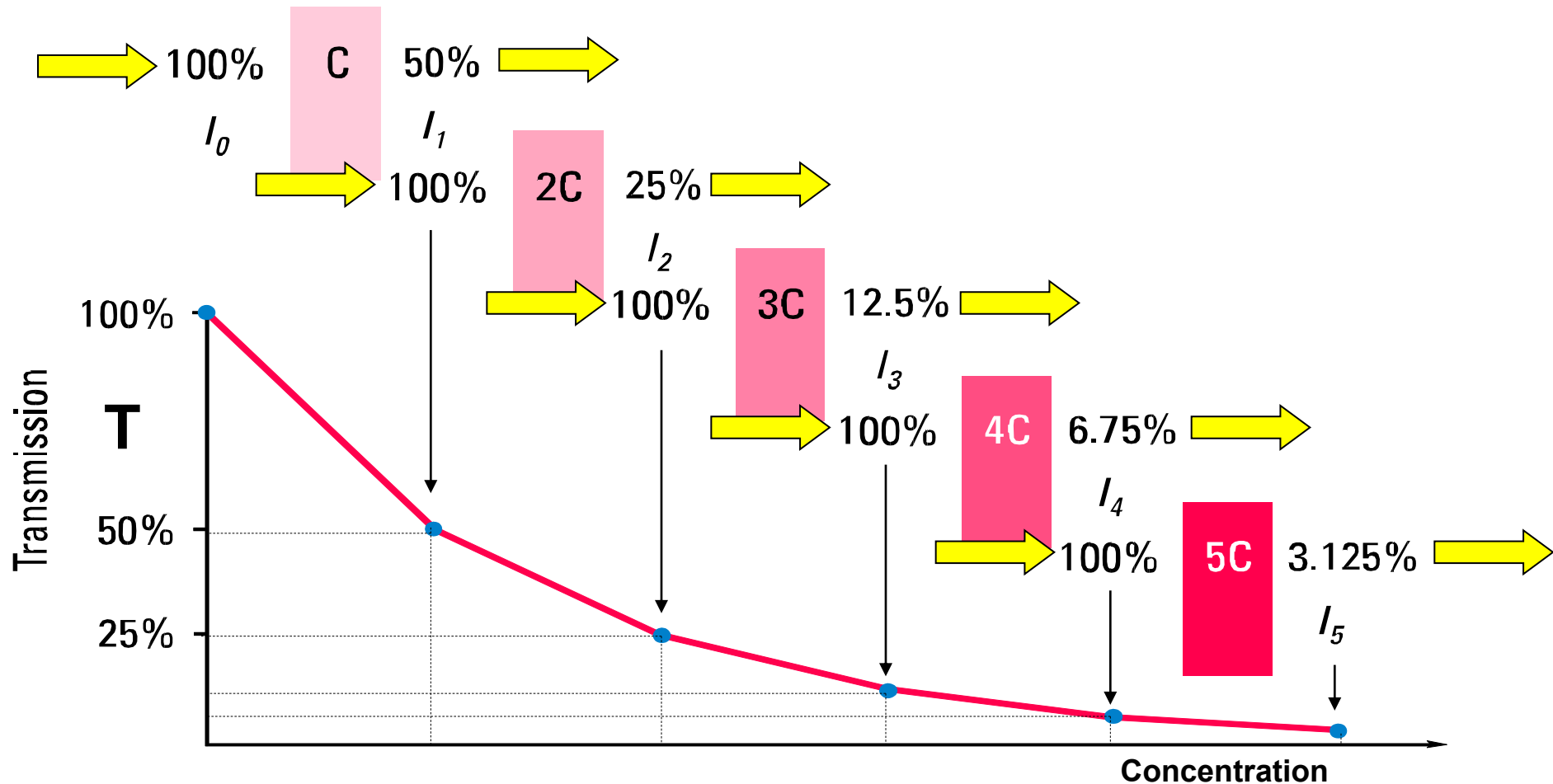


$I_0$  až  $I_5$  = propuštěný zářivý tok  $\Phi = \Phi_0 - \Phi_{\text{abs}}$



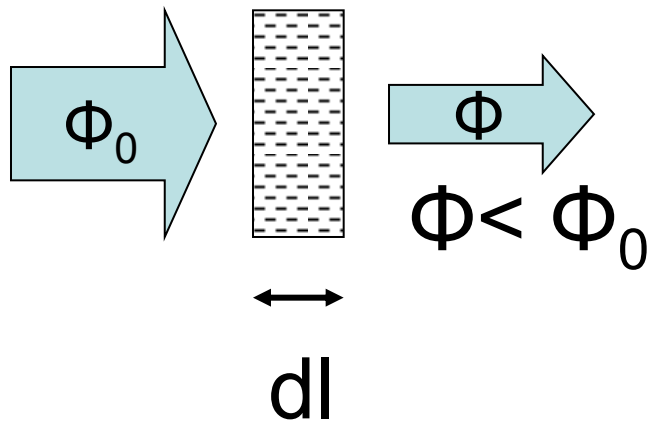
# Transmittance a koncentrace zákon Beerův

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} = e^{-\text{konst} \times \text{koncentrac} \times \text{e}}$$



# UV-Vis spektroskopie

## Bouguert-Lambert-Beerův zákon



$$d\Phi = \Phi - \Phi_0$$

$$-d\Phi = k \cdot \Phi \cdot dl$$

$$-d\Phi/\Phi = k \cdot dl$$

$$\int_{\Phi_0}^{\Phi} -\frac{d\Phi}{\Phi} = k \int_0^l dl \quad \int \frac{dx}{x} = \ln x$$

$$\ln(\Phi_0/\Phi) = k \cdot l \quad k = \epsilon_{\lambda} \cdot c$$

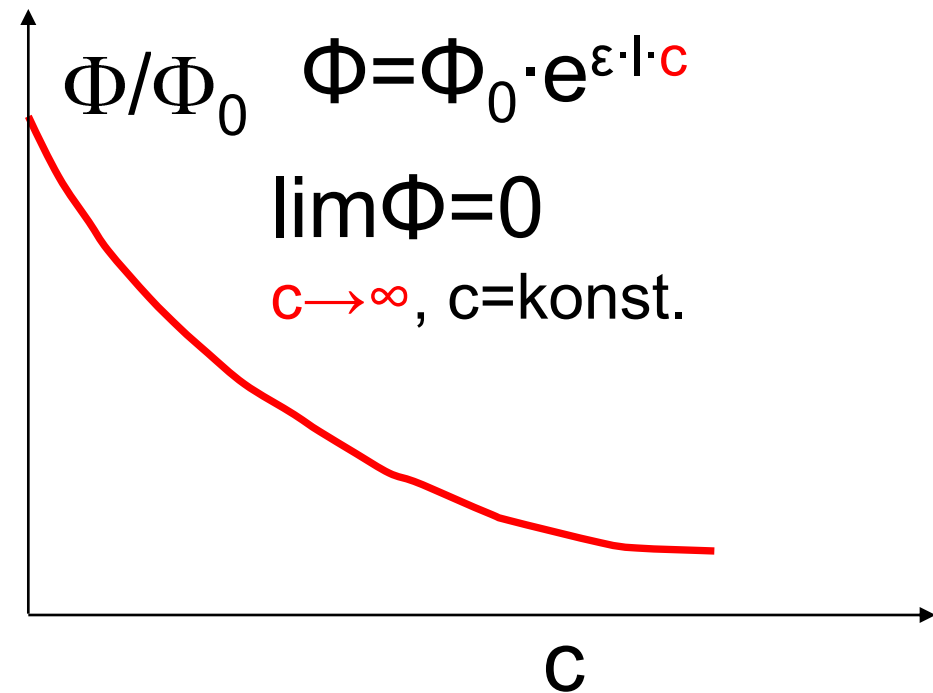
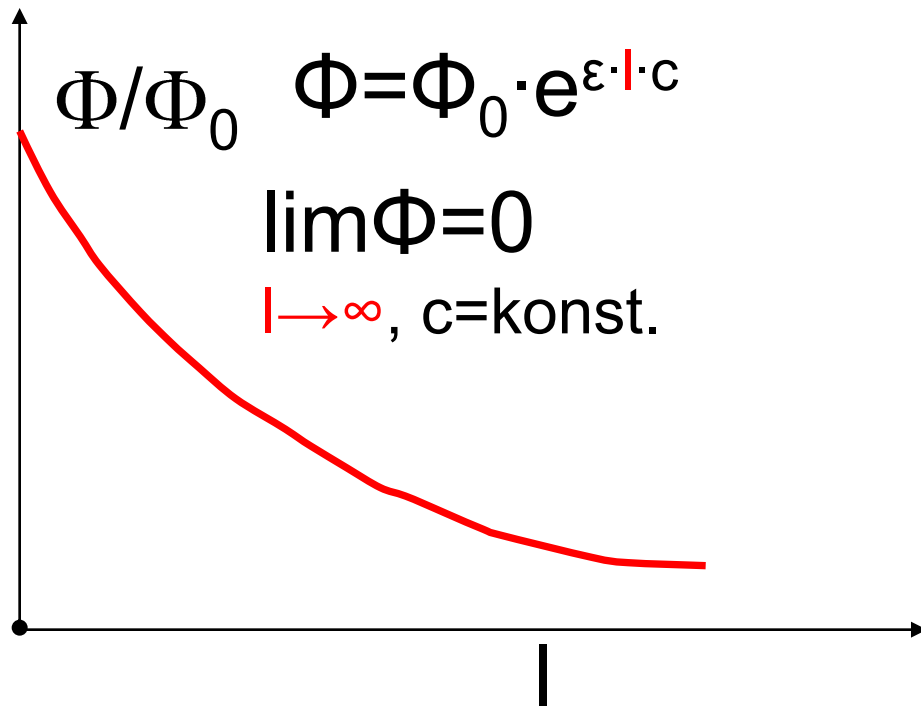
$\epsilon_{\lambda}$  je molární absorpční koeficient při  $\lambda$

$c$  je koncentrace

# UV-Vis spektroskopie

## Bouguert-Lambert-Beerův zákon

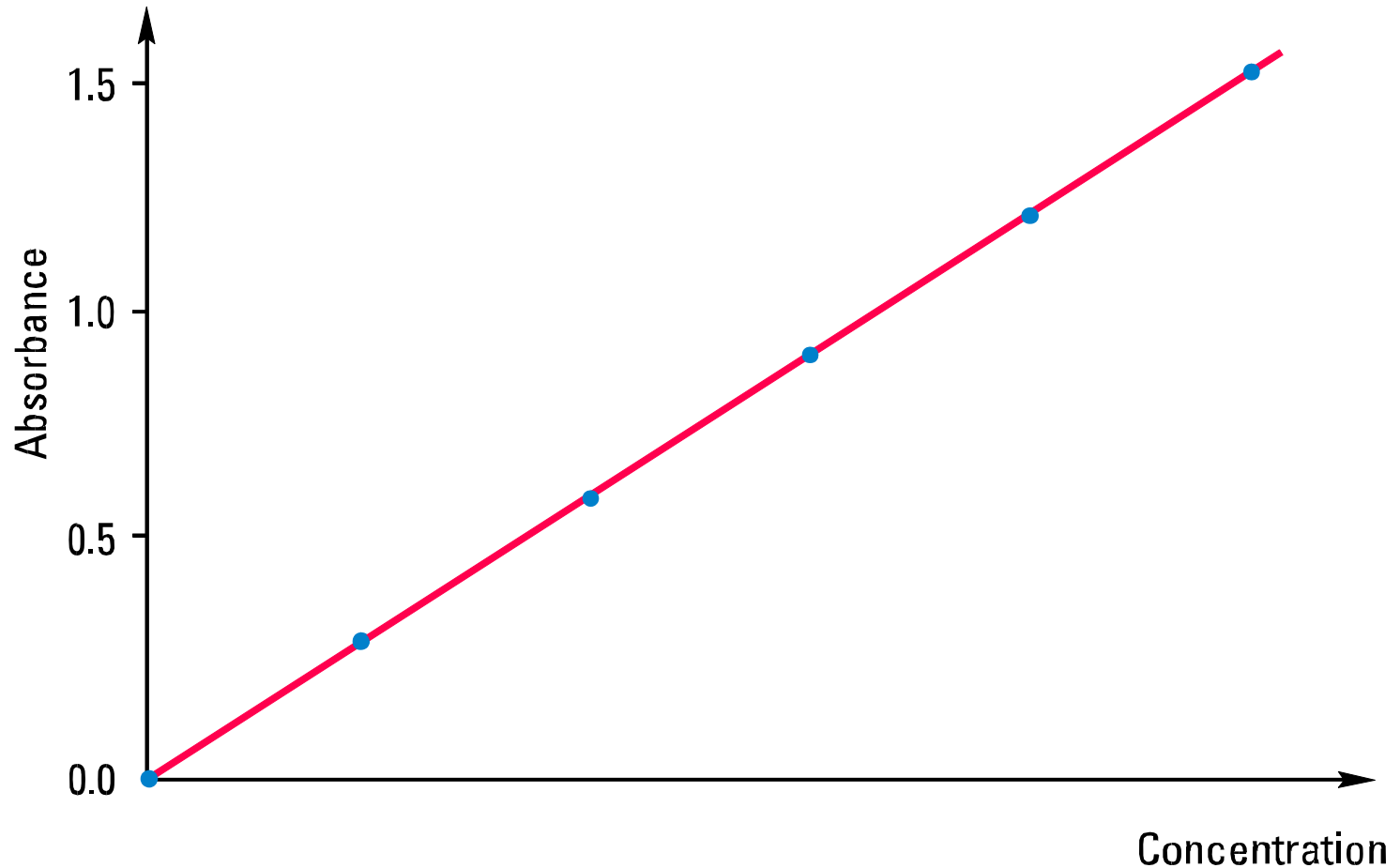
$$\frac{\Phi}{\Phi_0} = \exp(-\varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c) \Rightarrow$$





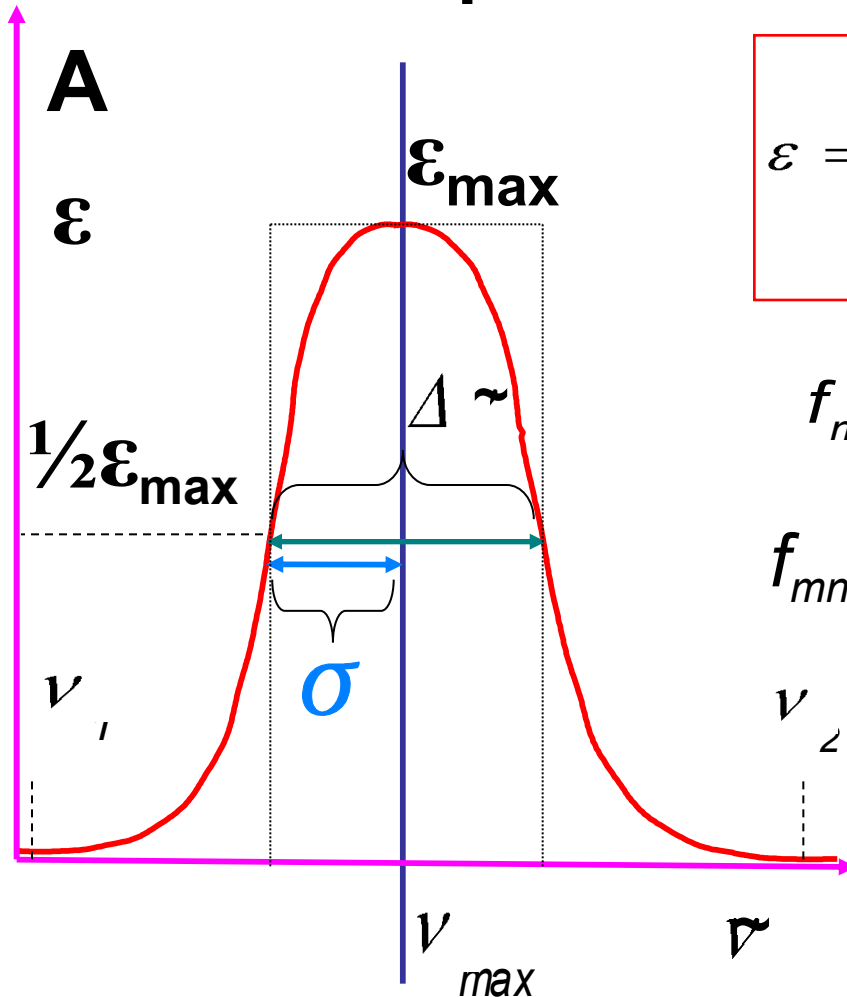
# Bouguert-Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log T = -\log \left( \frac{I}{I_0} \right) = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$



# Charakteristika absorpčního píku

## Gaussův profil



$$\epsilon = \epsilon_{max} \exp \left[ - \frac{\nu - \nu_{max}}{\delta} \ln 2 \right]^2$$

$$f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon \cdot d\nu$$

$f_{mn}$  = síla oscilátoru  $\sim$  plocha píku

$$f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \cdot \epsilon_{max} \cdot \Delta \sim$$

$$f_{mn} = \frac{8\pi \cdot c \cdot \nu_{max}}{3h \cdot e^2} R_{mn}^2$$

$R_{mn}$  = moment přechodu

# Charakteristika absorpčního píku

## Síla oscilátoru $f_{mn}$

$$f_{mn} = \frac{8\pi \cdot c \cdot \nu_{max}}{3h \cdot e^2} R_{mn}^2$$

$$R_{mn} = \int_{-\alpha}^{+\alpha} \Psi_m \cdot \vec{R} \cdot \Psi_n \cdot d\tau$$

$R_{mn} \neq 0$  , když je součin funkcí v integrálu funkce sudá.

- Sudá funkce  $f(+x) = f(-x)$
- Lichá funkce  $f(-x) = -f(x)$

$c$  = rychlost světla

$h$  = Planckova konstanta

$e$  = náboj elektronu

$R_{mn}$  = moment přechodu

$\vec{R}$  je vektor dipólmomentu

$\Psi_m$  ,  $\Psi_n$  jsou vlnové funkce

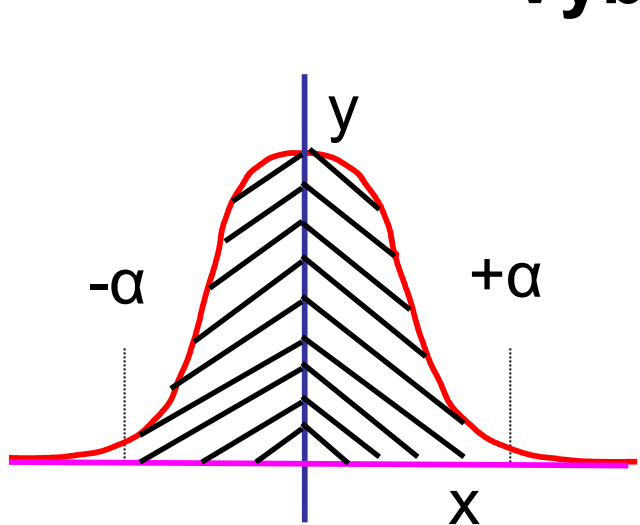
horního a dolního stavu

spektrálního přechodu

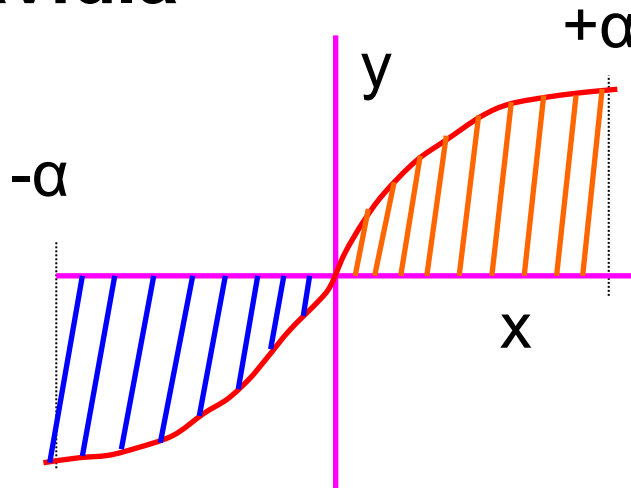
$d\tau$  = prostorový element

# Charakteristika absorpčního píku

## Výběrová pravidla



Sudá funkce:  $\int f(x)dx \neq 0$



Lichá funkce:  $\int f(x)dx = 0$

Sudá x sudá = lichá x lichá = sudá

Sudá x lichá = lichá x sudá = lichá

**Sudá** funkce při inverzi vzhledem k počátku **nemění** znaménko  
**Lichá** funkce při inverzi zachovává velikost, ale **mění** znaménko

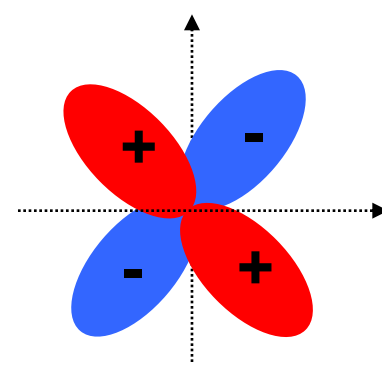
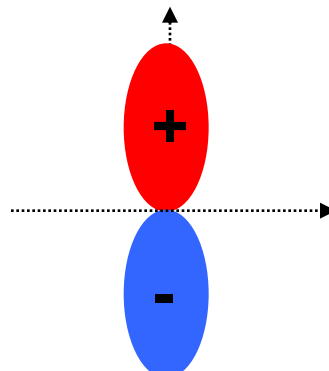
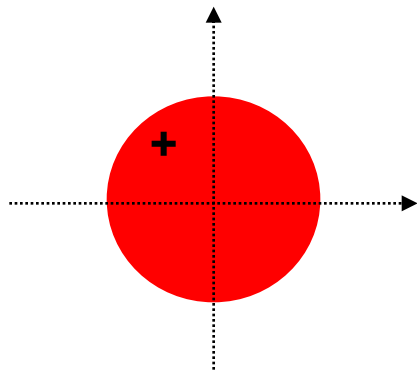
# Charakteristika absorpčního píku

## Výběrová pravidla

$$R_{mn} = \int_{-\alpha}^{+\alpha} \Psi_m \cdot \vec{R} \cdot \Psi_n \cdot d\tau \quad R_{mn} \neq 0$$

Aby  $R_{mn} \neq 0$ , musí být  $R_{mn}$  funkce **sudá**:

1. Vektor dipólového momentu  $\vec{R}$  je funkce **lichá**
2. Součin  $\Psi_m \cdot \Psi_n$  musí být proto funkce **lichá**.
3. Potom  $\Psi_m$  musí být **lichá** a  $\Psi_n$  **sudá** nebo naopak.



Sudá funkce **s orbital**   Lichá funkce **p orbital**   Sudá funkce **d orbital**

# Charakteristika absorpčního píku

## Výběrová pravidla

- Molekulové orbitaly MO
- Lineární kombinace atomových orbitalů MO-LCAO

$$\Phi_a = c_1 \cdot \Psi_1 + c_2 \cdot \Psi_2$$

$$\Phi_b = c_1 \cdot \Psi_1 - c_2 \cdot \Psi_2$$

- $\Psi_1$  a  $\Psi_2$  jsou atomové orbitaly,  $c_1$  a  $c_2$  konstanty
- $\Phi_a$  je vazebný molekulový orbital
- $\Phi_b$  je protivazebný molekulový orbital

# Výběřová pravidla

## Symbolika a členění molekulových orbitalů

- Osově kvantové číslo  $\lambda$  je analogií vedlejšího (orbitálního) kvantového čísla  $l$  u atomů.
- $\lambda$  kvantuje úhlový (orbitální) moment hybnosti elektronu na dané energetické hladině molekuly; nabývá celočíselných hodnot  $\lambda = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$
- Pro jednoelektronové orbitály odpovídající jednotlivým hodnotám  $\lambda = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$  se užívá značení  $\sigma, \pi, \delta, \varphi, \gamma$  podobně jako značení  $s, p, d, f, g$  pro atomové orbitály.
- Protivazebné orbitály se značí  $\sigma^*, \pi^* \dots$
- Celkové orbitální kvantové číslo  $\Lambda$  je analogií celkového vedlejšího kvantového čísla  $L$  u atomů.
- $\Lambda$  respektuje přítomnost více než 1 elektronu na dané hladině a platí  $\Lambda = \Sigma \lambda_i$

# Výběřová pravidla

## Symbolika a členění molekulových orbitalů

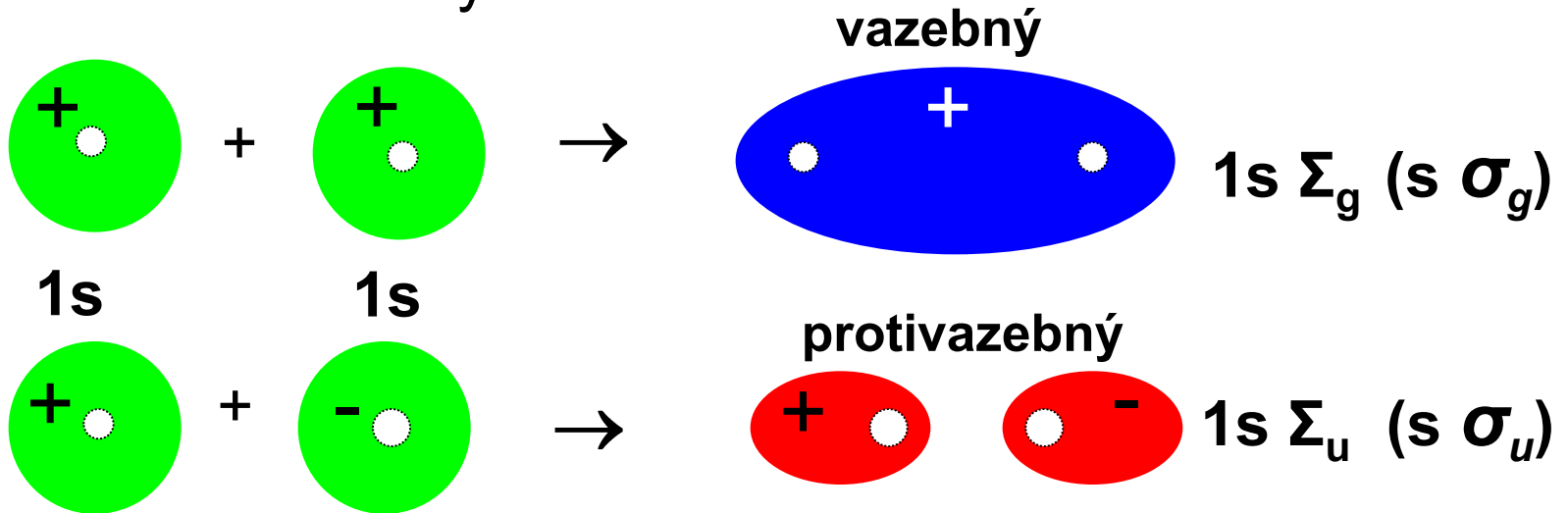
- Značení orbitalů pro  $\Lambda = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$  se provádí velkými písmeny  $\Sigma, \Pi, \Delta, \Phi, \Gamma$  analogicky ke značení atomových orbitalů  $S, P, D, F, G$ .
- Celkové spinové kvantové číslo  $S = \sum s_i$
- Multiplicita termu (hladiny) je  $2S + 1$
- Energetická hladina se zapisuje jako  $^{2S+1}\Lambda$ , tedy konkrétně  $^2\Sigma, ^3\Sigma, ^2\Pi, ^2\Delta$ .
- Molekulové orbitály se rozdělují podle symetrie vůči počátku souřadnic umístěnému uprostřed mezi oběma atomy (sudé a liché funkce).
- Sudé molekulové orbitály se označují dolním indexem  $g$  (gerade), liché orbitály  $u$  (ungerade).



# Výběřová pravidla

## Symbolika a členění molekulových orbitalů

- Kombinace atomových orbitalů



vazebný  $\Phi_a = c_1 \cdot \Psi_1 + c_2 \cdot \Psi_2$

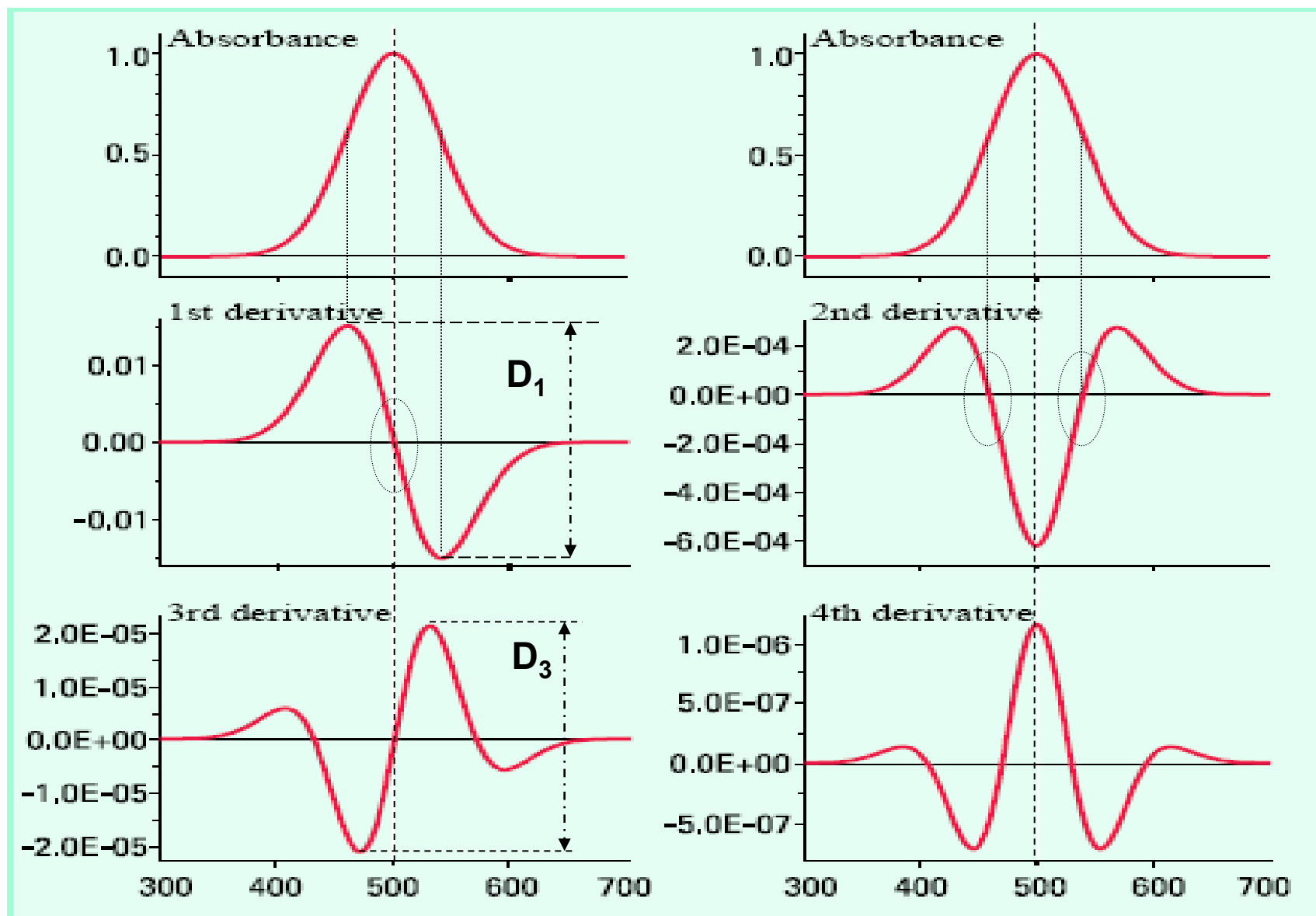
protivazebný  $\Phi_b = c_1 \cdot \Psi_1 - c_2 \cdot \Psi_2$

# Výběřová pravidla

## Symbolika a členění molekulových orbitalů

- Přechody jsou možné:
  - gerade  $\rightarrow$  ungerade (g  $\rightarrow$  u)
  - ungerade  $\rightarrow$  gerade (u  $\rightarrow$  g)

# Derivační spektrofotometrie



# Derivační spektrofotometrie

## 1. derivace

$$\frac{dA}{d\lambda} = f'(\lambda); \quad 1.\text{derivace} = 0; \quad \lambda_{\max}; \lambda_{\min}$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = \max; \quad \text{inf lex . bod na rostoucí funkci}$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = \min; \quad \text{inf lex . bod na klesající funkci}$$

Přesné určení polohy maxim  $\lambda_{\max}$  širokých absorpčních pásů a inflexních bodů

# Derivační spektrofotometrie

## 2. derivace

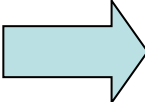
$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = f''(\lambda) = 0; \approx \text{inflexní body}$$

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} < 0; \text{min}; \approx \text{max } A = f(\lambda)$$

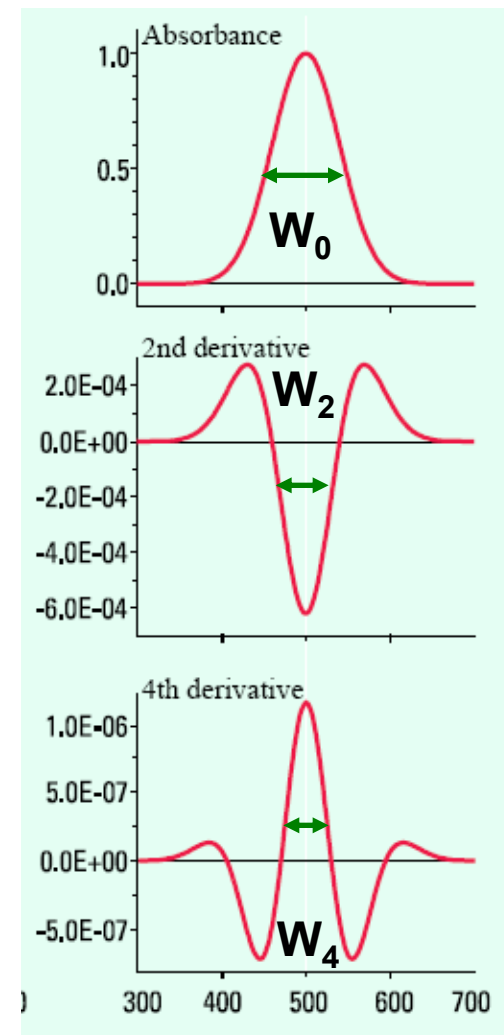
$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} > 0; \text{max}; \approx \text{min } A = f(\lambda)$$

Přesné určení polohy maxim a minim  $\lambda_{\text{max}}$  a  $\lambda_{\text{min}}$  širokých absorpčních pásů a inflexních bodů

# Derivační spektrofotometrie

- S rostoucím  $n$  sudé derivace klesá šířka centrálního Gaussova píku
- Sudé derivace mají vždy centrální pík s alternujícím znaménkem, který  koinciduje s původním píkem ( $\lambda_{\max}$ )

Derivace $n$	Pološířka FWHM	W (%)	Orientace ústřeniho píku
0	$W_0$	100	+
2	$W_2$	53	-
4	$W_4$	41	+
6	$W_6$	34	-

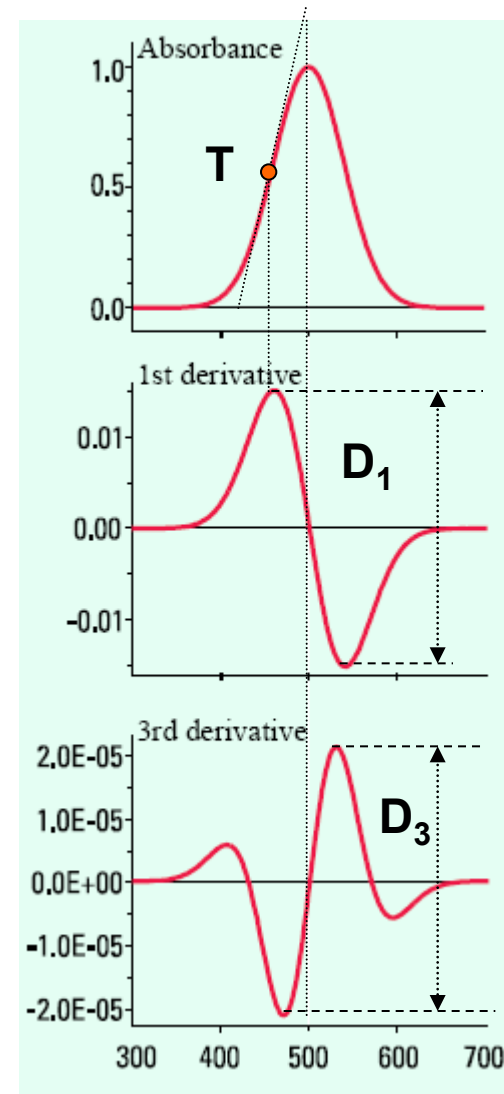


# Derivační spektrofotometrie

- Lichá derivace ( $n+1$ ) stupně jakožto derivace  $n$ -té derivace obsahuje maximum a minimum.
- Velikosti maxima a minima jsou rovny směrnici tečen v inflexních bodech  $n$ -té derivace.
- Užší = strmější profil tedy poskytuje větší amplitudu jako rozdíl y-souřadnic mezi max. a min. liché derivace  $D_1, D_3$ .
- Čím užší pík, tím strmější křídla Gaussova profilu, tj. větší absolutní hodnota směrnice v inflexním bodě.

$$D_n = \left( \frac{1}{W} \right)^n$$

**Amplituda  $D_n$   $n$ -té derivace je nepřímo úměrná  $n$ -té mocnině šířky píku  $W$ .**



# Derivační spektrofotometrie

- Derivace Lambert-Beer-Bouguer zákona =  
zvýšení citlivosti:  $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$

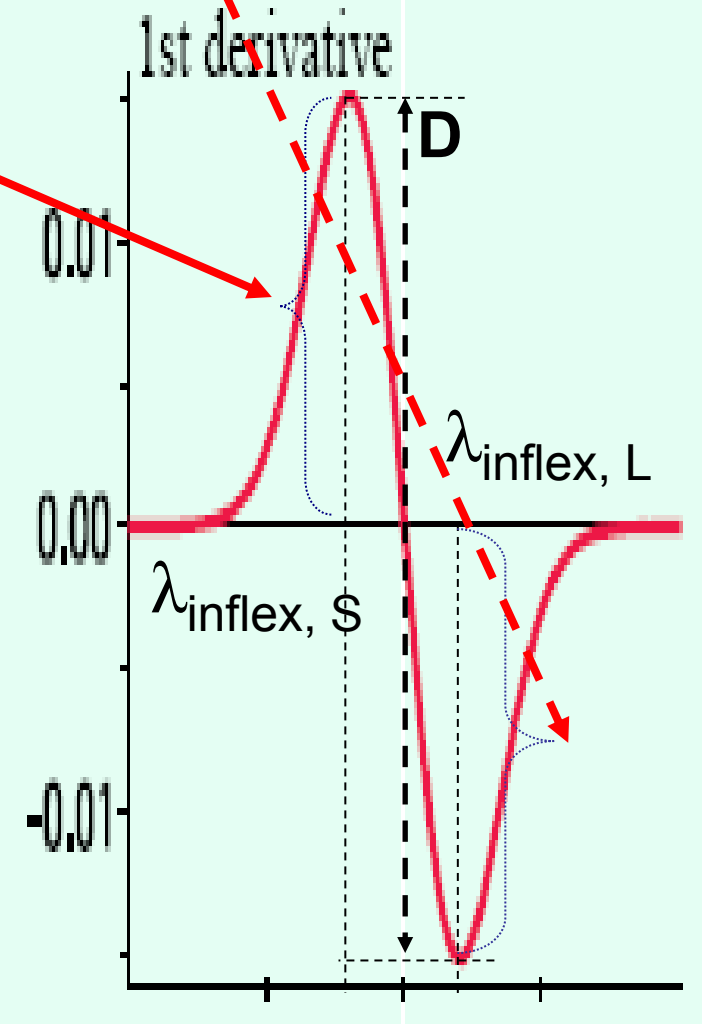
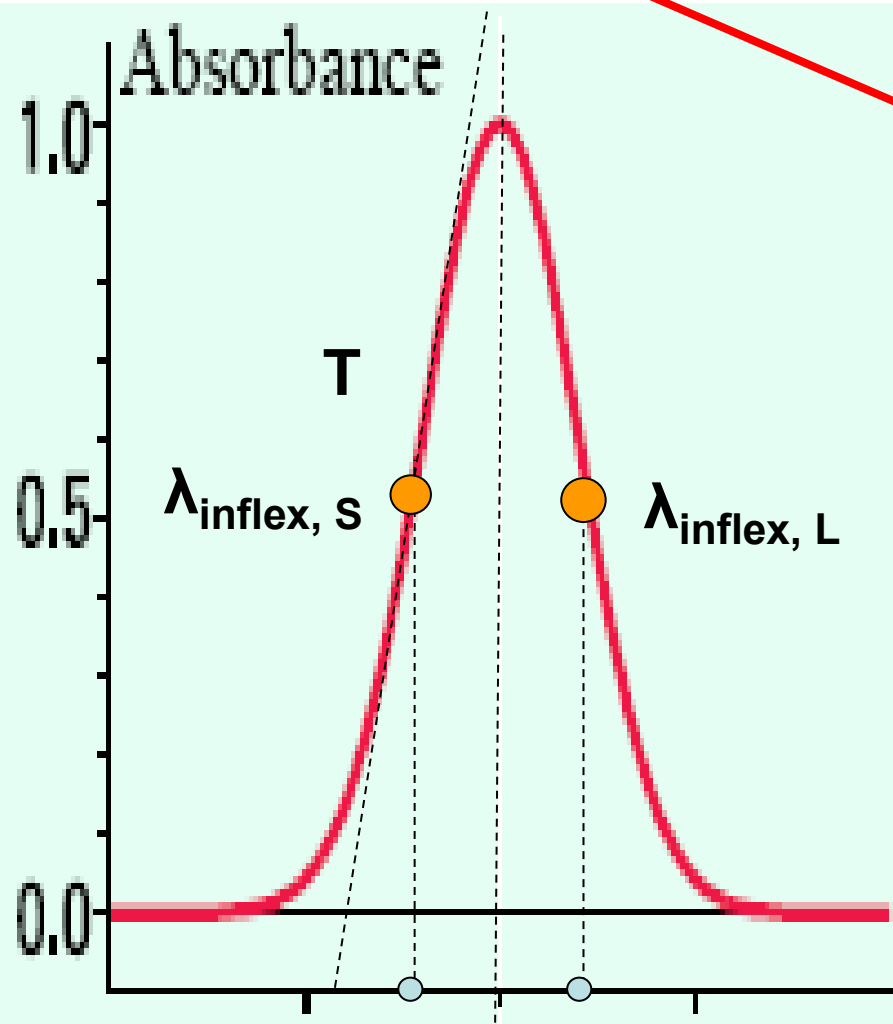
$$D = \left( \frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},S}} - \left( \frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},L}} = k \cdot c$$

- $\lambda_{\text{inflex},S,L}$  je vlnová délka inflexního bodu při kratší (S) a delší (L) části spektra

- Amplituda  $n$ -té derivace  $D_n$  je úměrná koncentraci
- S rostoucím stupněm derivace roste citlivost jakožto směrnice  $k$  kalibrační přímky



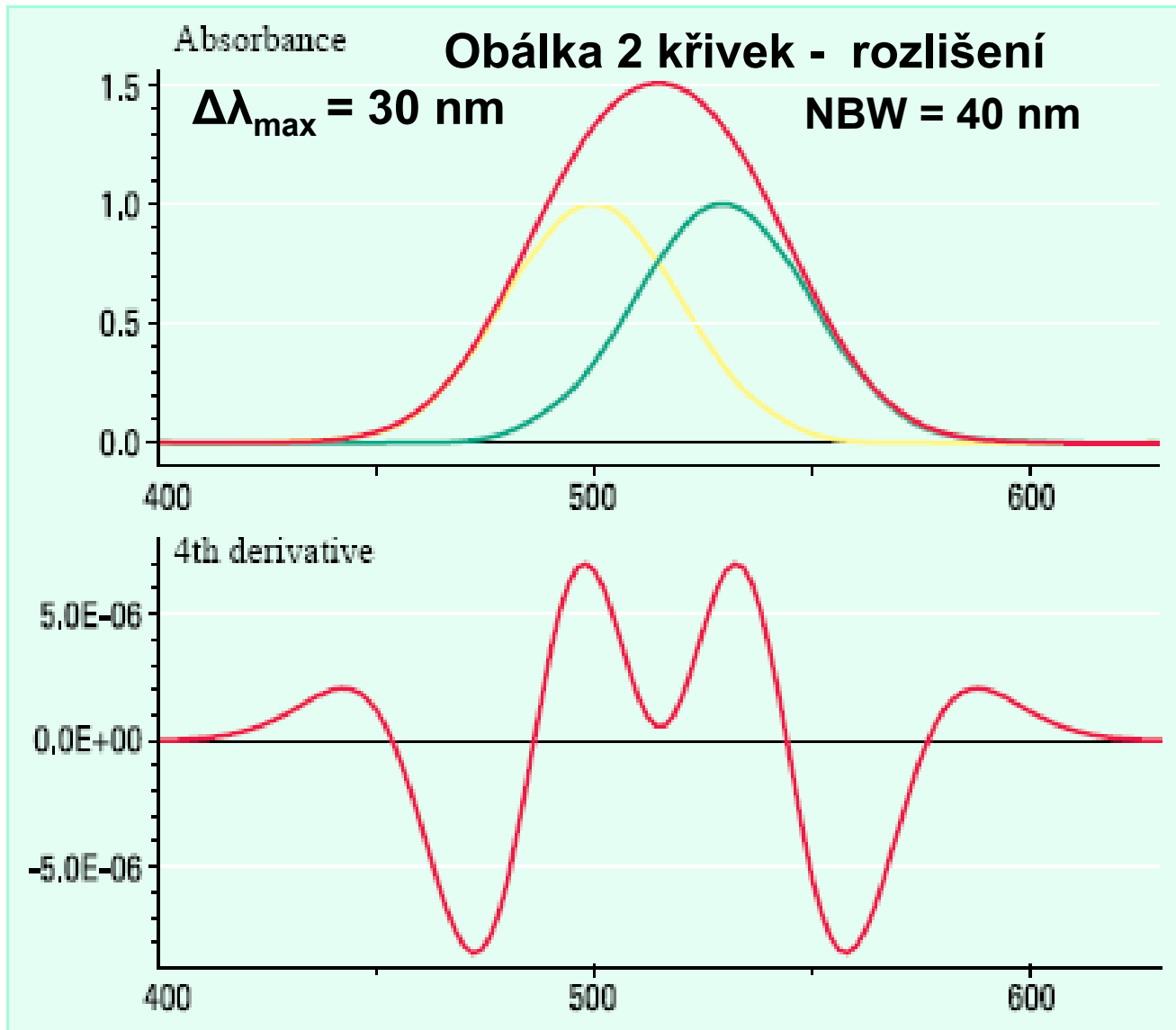
$$D = \left( \frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},S}} = \left( \frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},L}} = k \cdot c$$



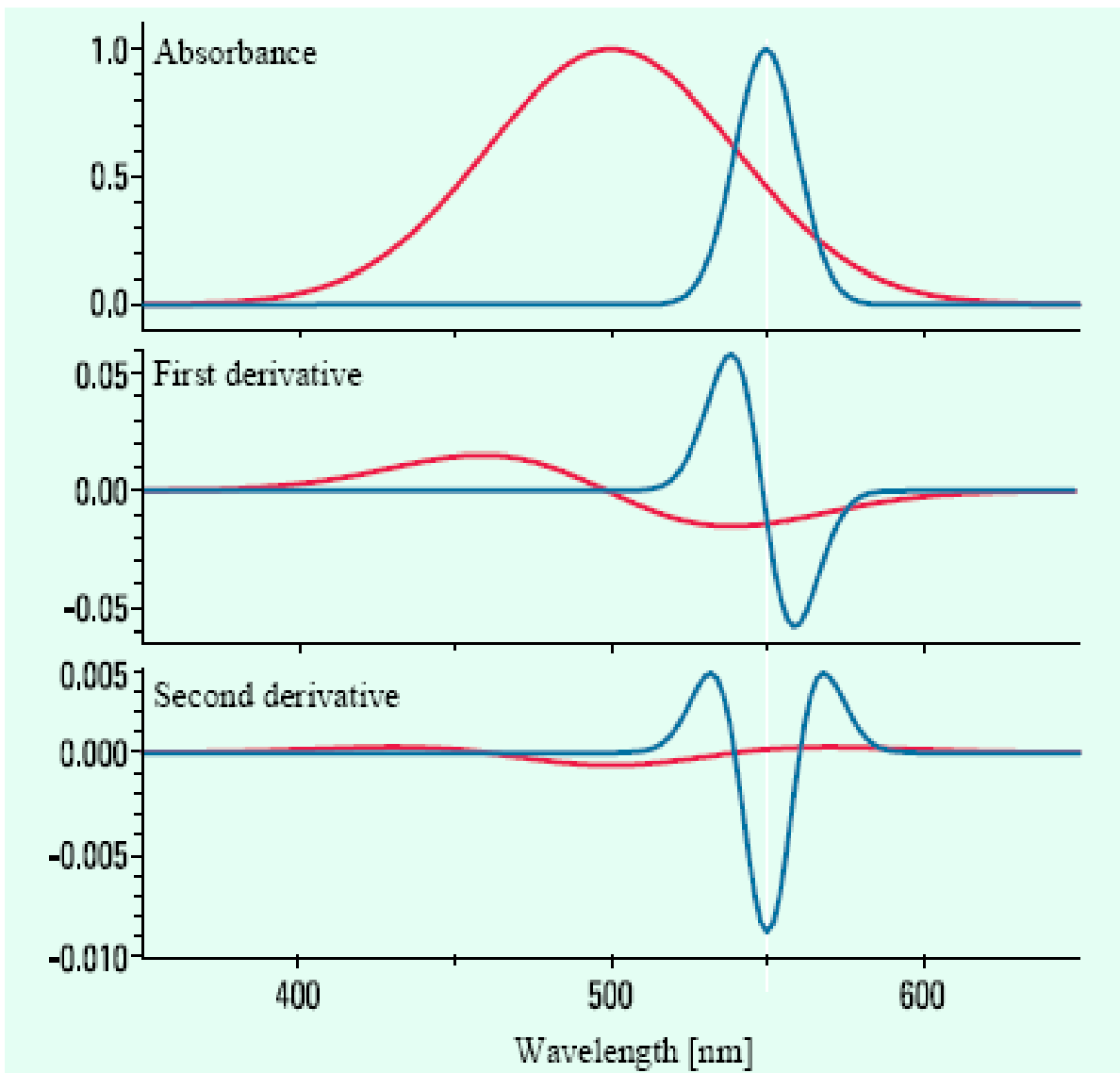
# Derivační spektrofotometrie

- Velikost derivace v inflexních bodech profilu píku je nezávislá na velikosti pozadí, pokud je v rozsahu  $\Delta\lambda$  šířky absorpčního pásu přibližně konstantní.
- Derivováním spekter superponovaných na zvýšeném pozadí korigujeme pozadí a zvyšujeme poměr **S/B**, podstatný pro určení meze detekce
- Derivace absorpčních pásů na šikmém pozadí (rozptyl záření) umožňuje určit přesnou vlnovou délku  $\lambda_{\max}$ .

# Derivační spektrofotometrie



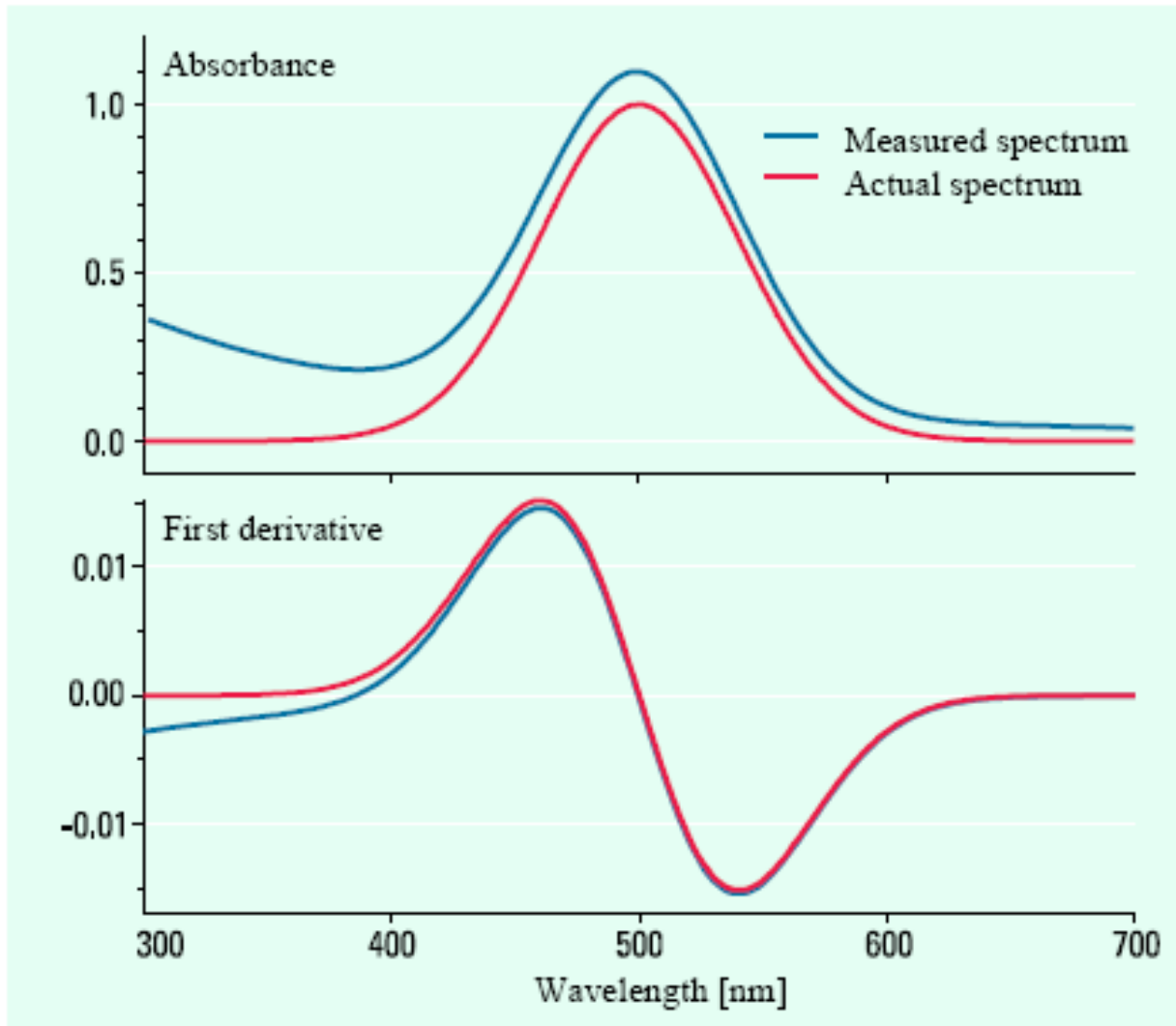
# Derivační spektrofotometrie



$$\frac{D_{A,n}}{D_{B,n}} = \left( \frac{W_B}{W_A} \right)^2$$

Při stejné absorbanci (výška píku) dává užší pás větší amplitudu  $D = \Delta(dA/d\lambda) \Rightarrow$  lepší citlivost  $\Rightarrow$  odlišení od širšího pásu.

# Derivační spektrofotometrie



Korekce vlivu  
rozptýleného  
záření

# Derivační spektrofotometrie

- Zlepšení rozlišení překrývajících se absorpčních pásů ⇒
  - Odhalení pásů příslušejících nečistotám
  - Přesné určení  $\lambda_{\max}$  širokých absorpčních pásů
- Zvýšení citlivosti měření
- Eliminace pozadí
  - Rayleighova rozptylu
  - Konstantního pozadí (v závislosti na  $\lambda$ )
  - Neselektivní absorpce matrice
- Zlepšení poměru signál/pozadí

# Derivační spektrofotometrie

## Tvorba derivačních spekter

**1) Elektronicky**: výstupní napětí proporcionální absorbanci je diferencováno vzhledem k času – vhodné pro skenující monochromátory:

– **Analogové derivační obvody**:

- Zesilovač
- Derivační členy RC
- Pásové filtry pro redukci šumů určitých frekvencí
- Kombinace derivačních členů pro vyšší derivace

**Analogová derivační spektrofotometrie** –

**zvýšení citlivosti ve srovnání s „klasickou fotometrií“  $5^n$  – násobné, kde  $n$  = řád derivace **x** každý RC-člen snižuje poměr S/N faktorem 2.**

# Derivační spektrofotometrie

Elektronická tvorba derivačních spekter –  
diferencování vzhledem k času:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dA}{d\lambda} \cdot \frac{d\lambda}{dt} \quad \frac{d\lambda}{dt} = \textit{konst} \cdot (\textit{nm} \cdot \textit{mm}^{-1}) = S$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{1}{S} \cdot \frac{dA}{dt}$$

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = \frac{1}{S^2} \frac{d^2 A}{dt^2}$$



# Derivační spektrofotometrie

## Tvorba derivačních spekter

**2) Opticky**: rychlá modulace  $\lambda$  záření  $\Rightarrow$  do kyvety;

Modulace  $\lambda$  = rychlé změny  $\lambda$ , periodické skenování

$\lambda$  v malém intervalu  $\Delta\lambda$ ;  $\Delta\lambda \ll \text{FWHM}$  absorpčního pásu. Derivační spektrum – jako funkce času (konstatní rychlost skenu  $d\lambda/dt$  )

$$\frac{d\Phi}{d\lambda} = \frac{d\Phi}{dt} \frac{dt}{d\lambda}$$

$\frac{d\Phi}{dt}$  se měří elektronickým  
diferenciačním členem

# Derivační spektrofotometrie

## Tvorba derivačních spekter – opticky

a) Modulace  $\lambda$ : provedení modulace vlnové délky:

- i. rychlým periodickým skenem monochromátoru  $\lambda$
- ii. kmitající planparalelní destičkou (posun paprsku)
- iii. oscilací vstupní nebo výstupní štěrbiny (změna úhlu dopadu paprsku na mřížku)

střídavý fotoproud  $\sim$  změně  $\Phi$  v úzkém intervalu  $\Delta\lambda$ :

1.derivace spektra  $\sim$  1. harmonická fotoproudu (AC)

2.derivace spektra  $\sim$  2. harmonická fotoproudu (AC)

# Derivační spektrofotometrie

## Tvorba derivačních spekter – opticky

b) Dvouvlňová spektrofotometrie: spektrometr se dvěma monochromátory, které skenují simultánně s rozdílem  $\Delta\lambda = 1$  až 5 nm. Dva monochromatické paprsky procházejí střídavě kyvetou (rotující sektor, zrcadlo).

# Derivační spektrofotometrie

## Tvorba derivačních spekter

**3) Matematicky:** v současné době nejvíce používáno

Aproximace 1. derivace: polynom, Savitzky-Golay

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{A(\lambda + \Delta \lambda) - A(\lambda - \Delta \lambda)}{2\Delta \lambda}$$