

MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

v UV a viditelné oblasti spektra

ENERGIE MOLEKULY

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

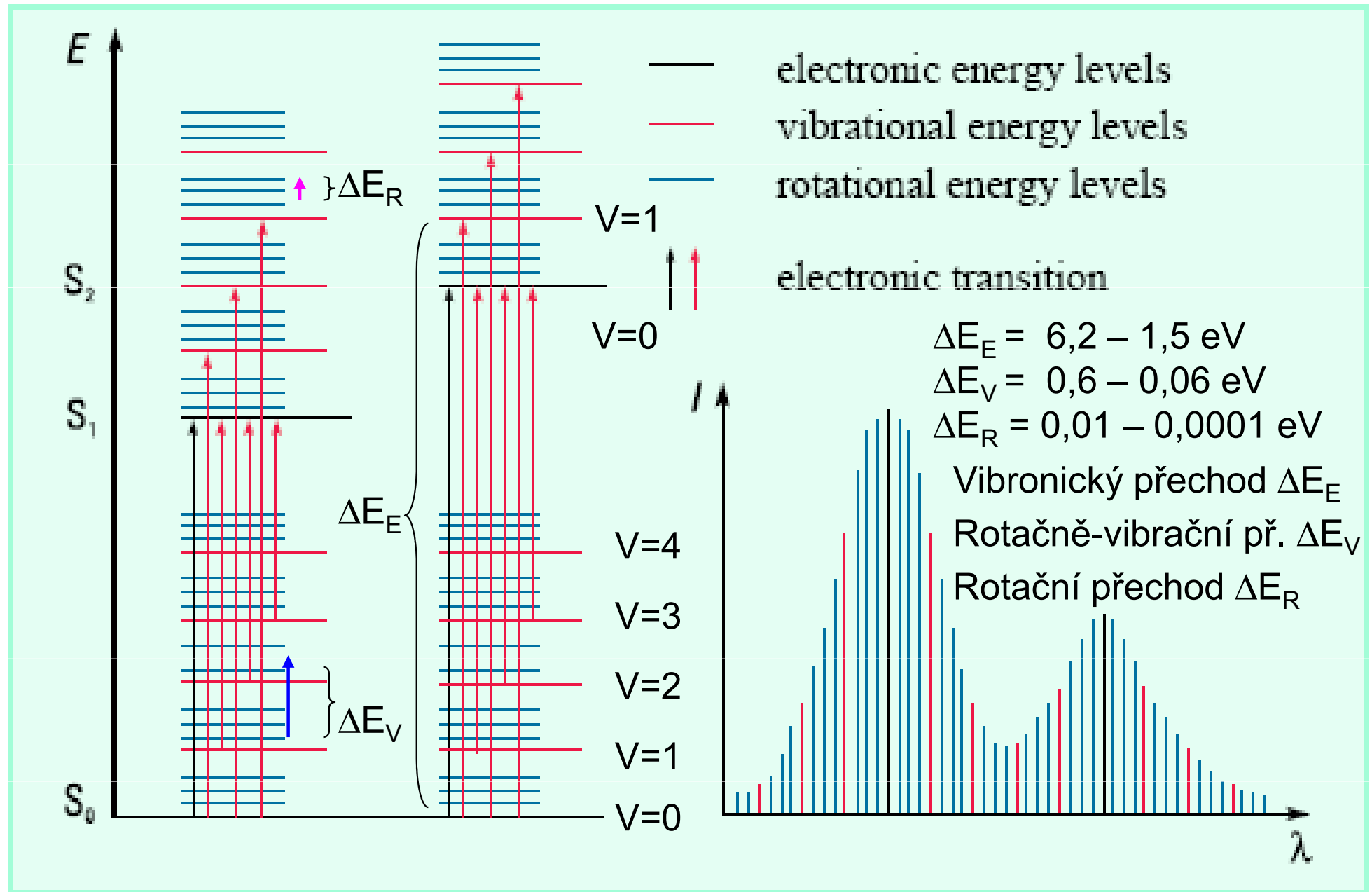
Kvantovaná energie \Rightarrow energetické hladiny:

– Rotační \Rightarrow přechody mezi rotačními stavy \Rightarrow
rotační spektra (MW)

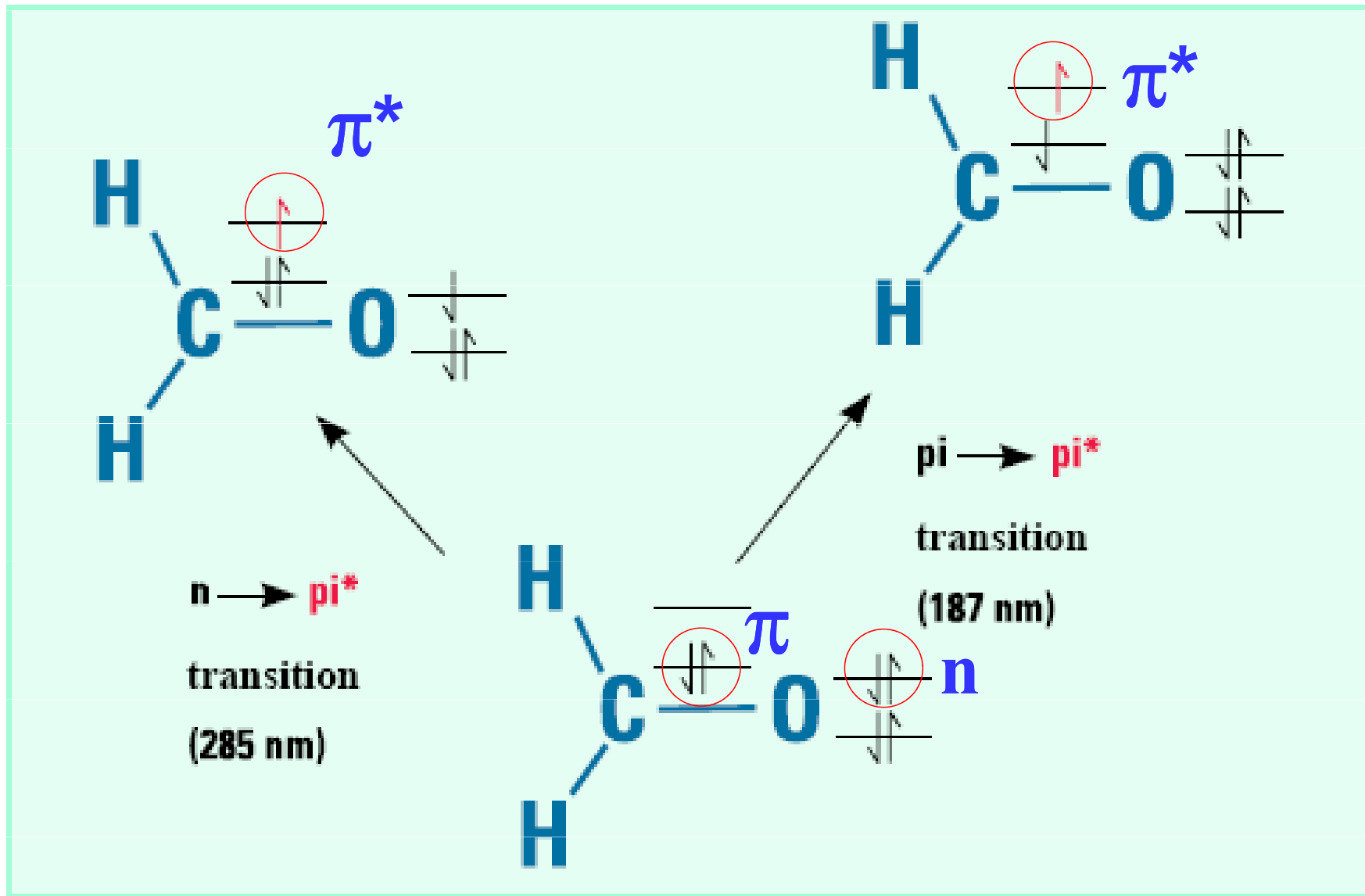
– Vibrační \Rightarrow přechody mezi vibračními stavy \Rightarrow
vibrační spektra (IR) $\Delta E_V \approx X \cdot 10^4 \cdot \Delta E_R$

– 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

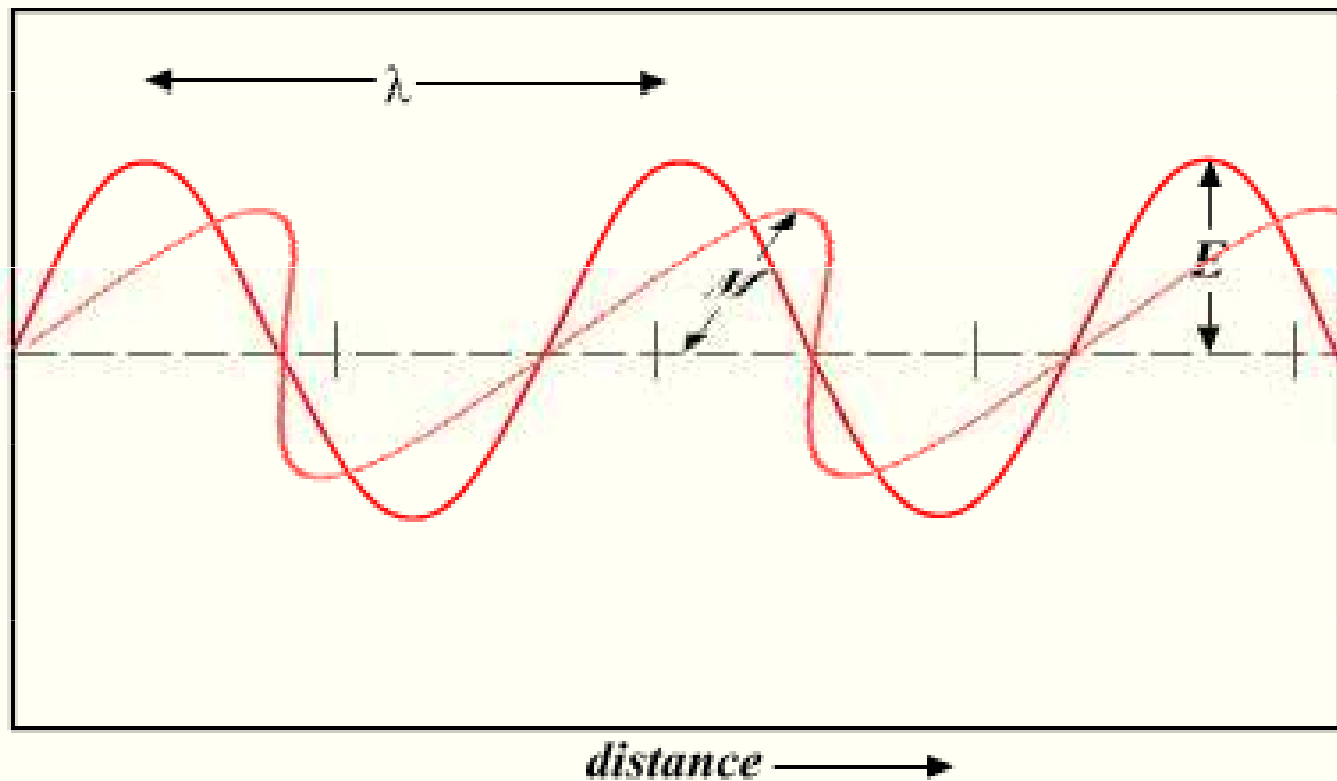


ELEKTRONICKÉ PŘECHODY VE FORMALDEHYDU



ELEKTROMAGNETICKÉ VLNĚNÍ

Light Wave

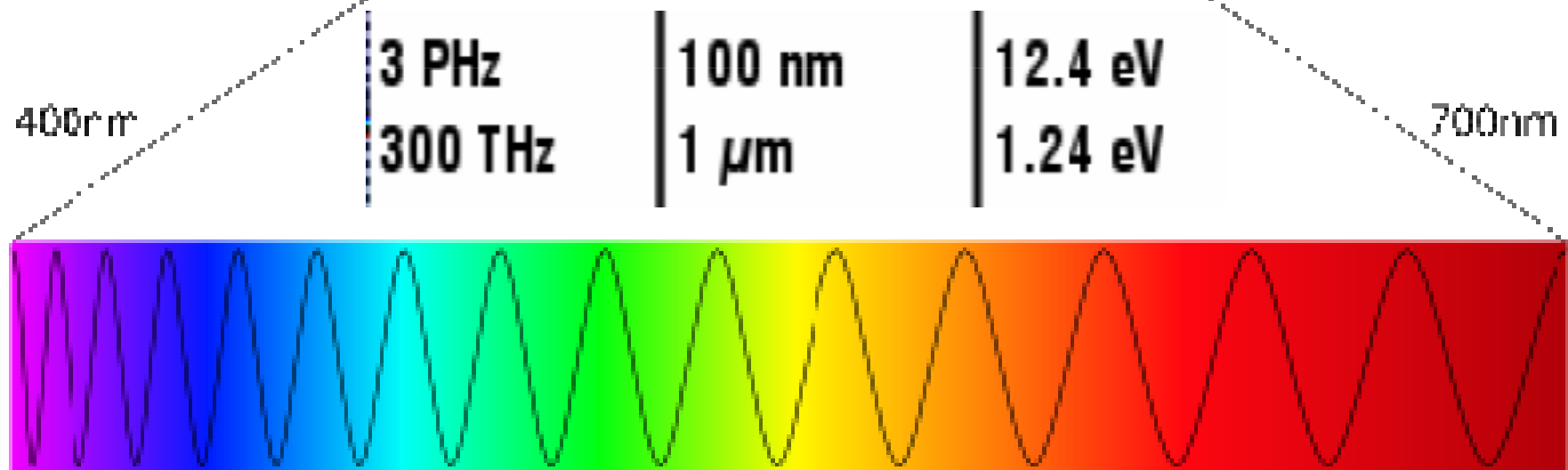
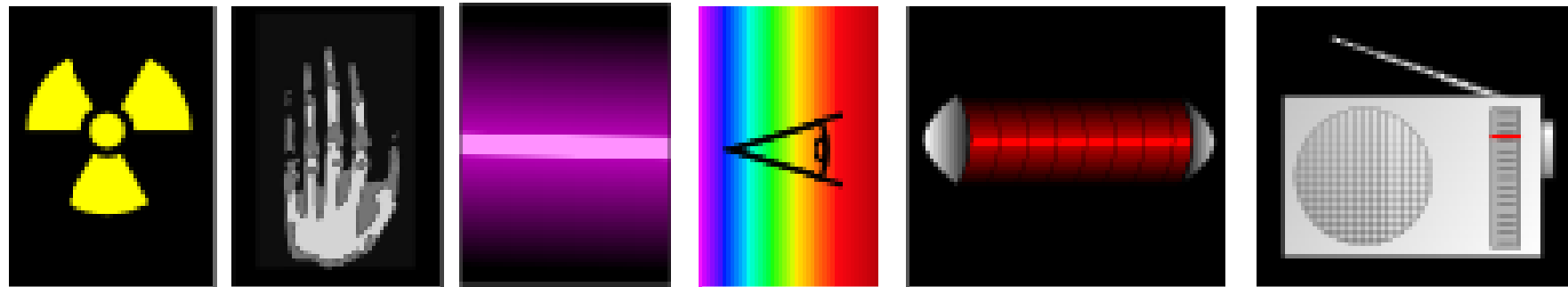


λ = wavelength

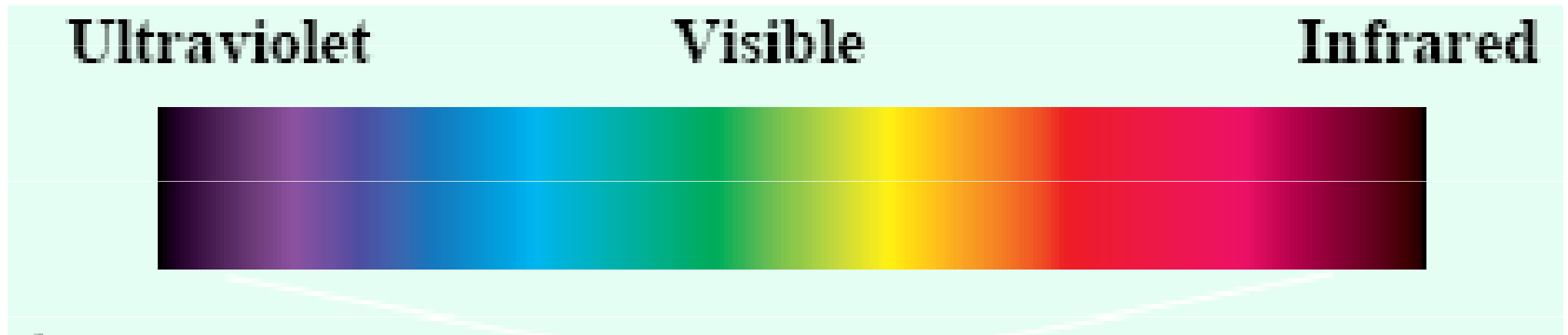
E = amplitude of electric field

M = amplitude of magnetic field

SPEKTRUM ELEKTROMAGNETICKÉHO ZÁŘENÍ



ZÁŘENÍ UV - Vis



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

c je rychlost světla (3×10^8 m/s)

$h = 6.65 \times 10^{-34}$ J·s = 4.1 μ 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

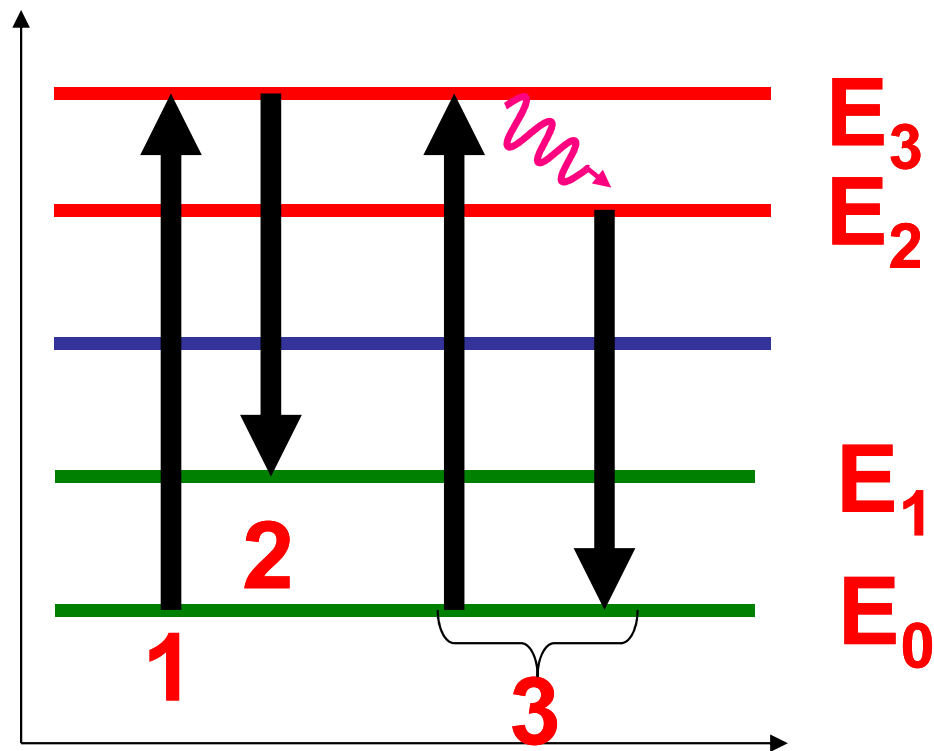
- Absorpce **1**
- Emise **2**
- Luminiscence **3**

$$E_3 > E_2 > E_1 > E_0$$

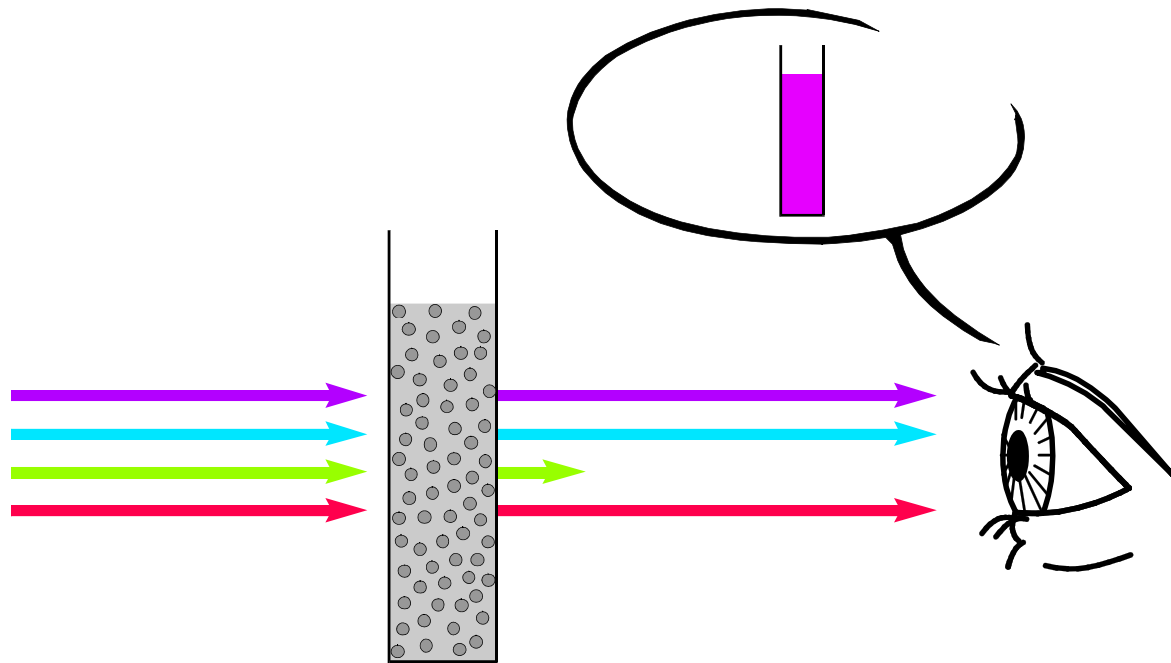
$$h\nu_{\text{abs}} = E_3 - E_0$$

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

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

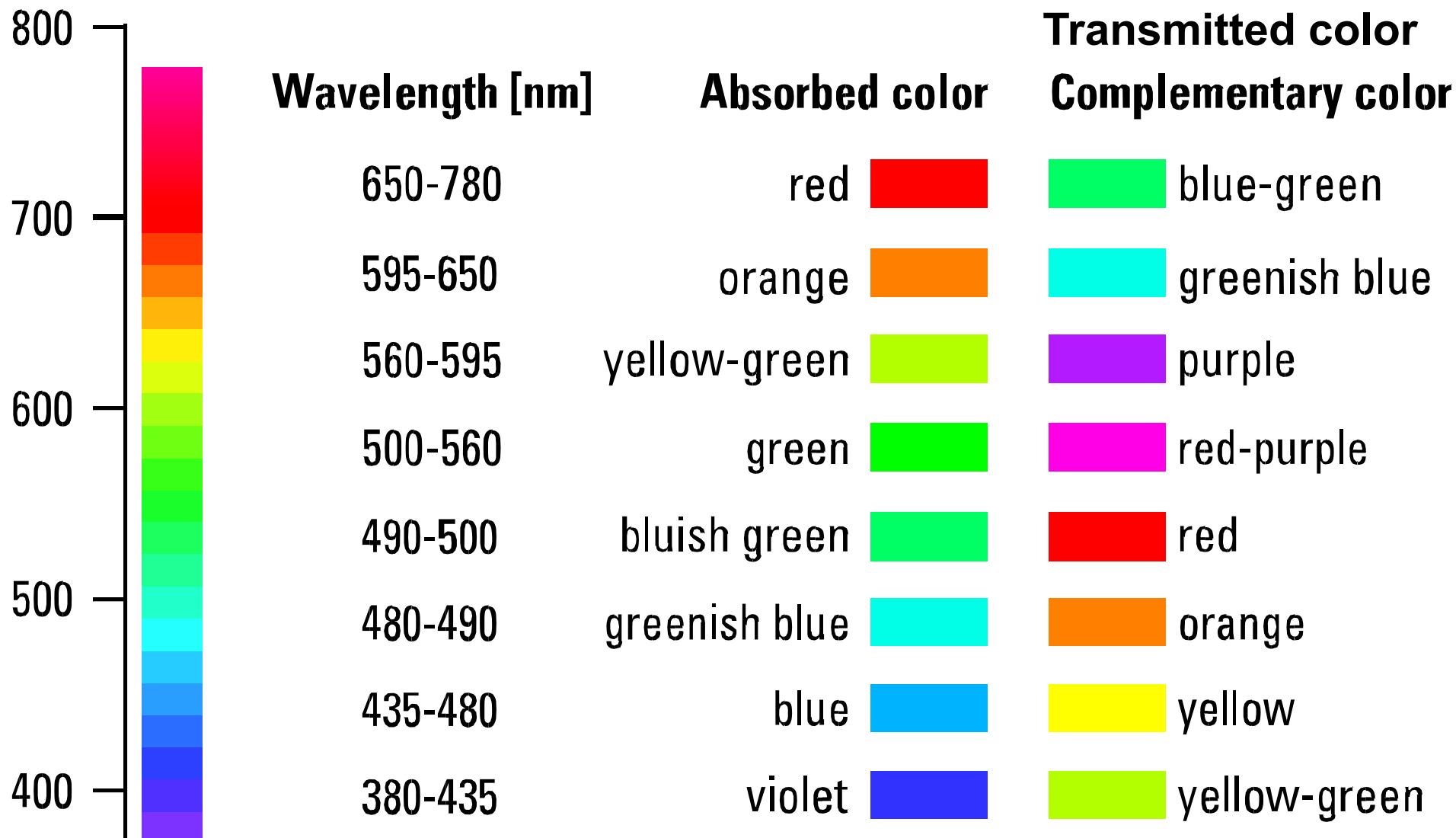


PROPUSTNOST A BARVA



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

ABSORPCE A KOMPLEMENTÁRNÍ BARVY



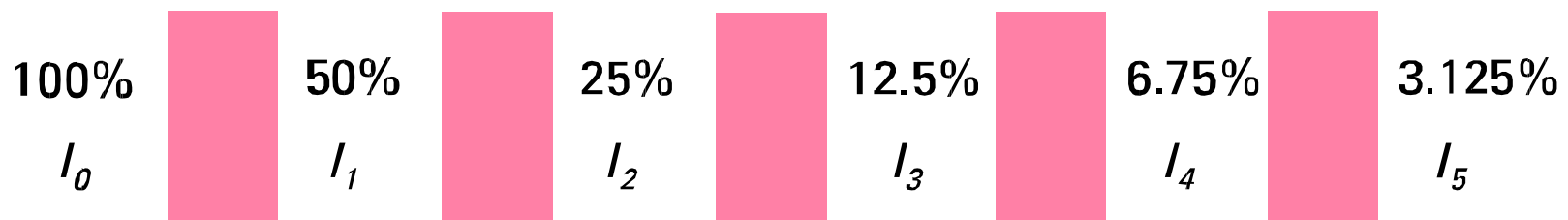
UV-Vis spektroskopie

Fotometrie

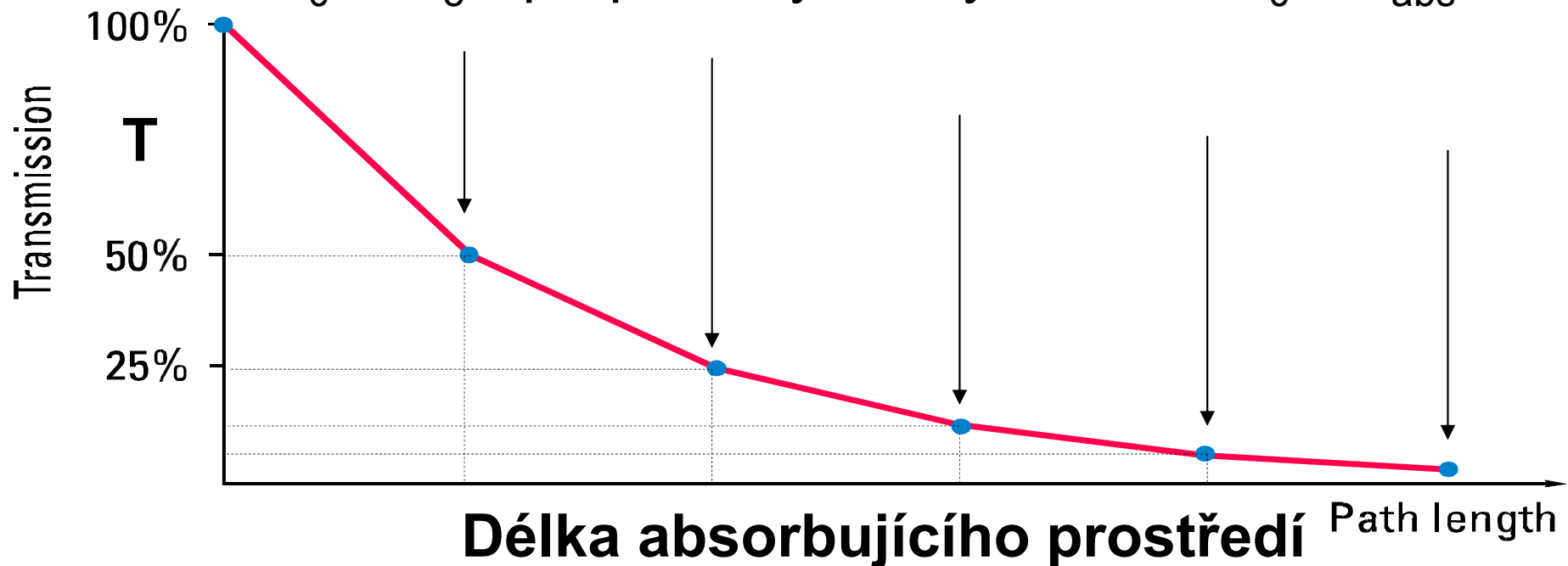
- Signál: zářivý tok Φ (W), dopadající Φ_0
 - Emisní
 - Absorpční
 - Luminiscenční (fluorescenční, fosforescenční)
- Transmittance $T = (\Phi/\Phi_0)$; $(\Phi/\Phi_0)\times 100$ (%)
- Absorbance $A = \log(\Phi_0/\Phi) = -\log T$; $0 \leq A \leq \infty$

Transmitance a délka absorbujícího prostředí: zákon Bouguer-Lambert

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

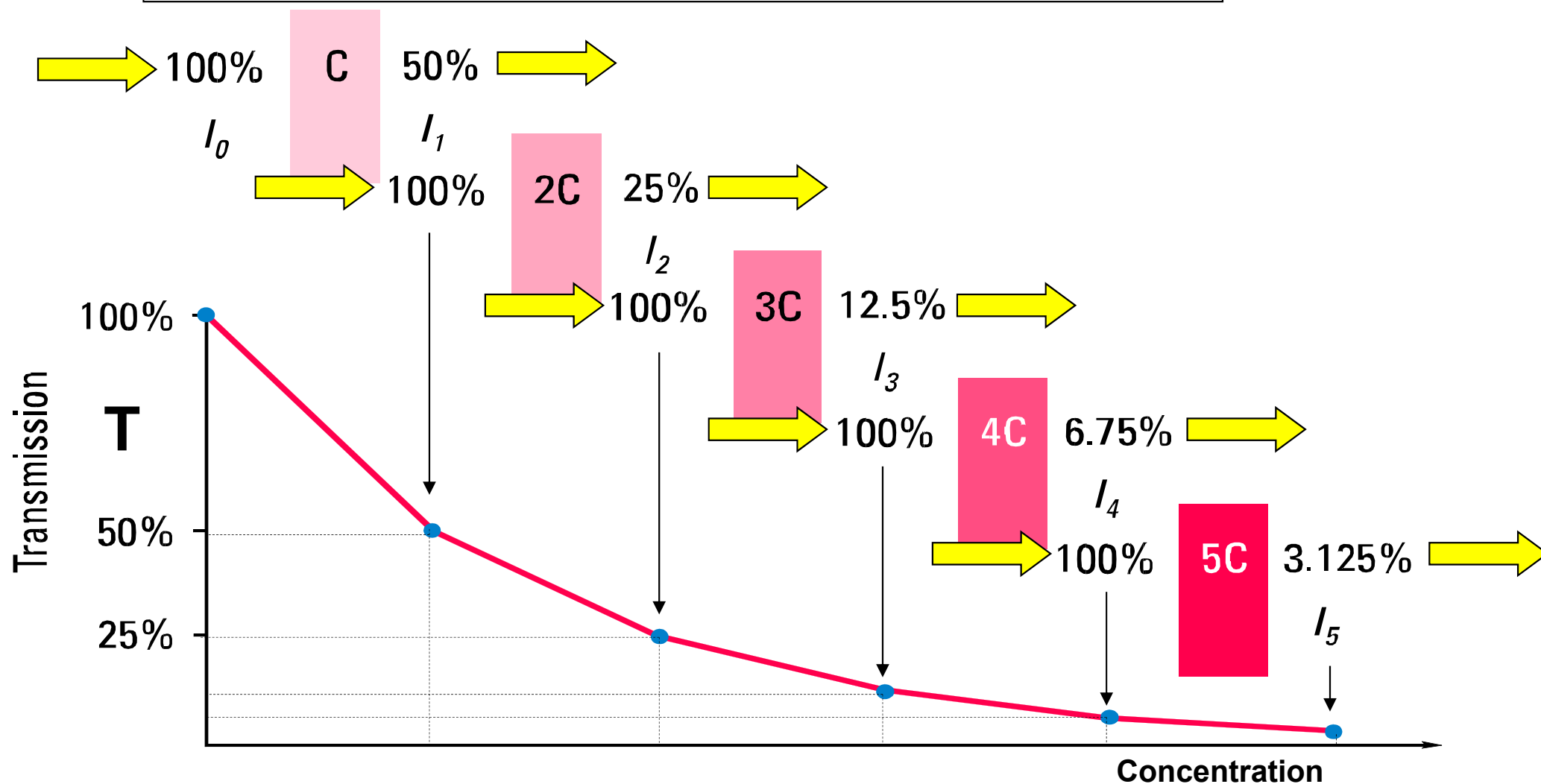


I_0 až I_5 = propuštěný zářivý tok $\Phi = \Phi_0 - \Phi_{\text{abs}}$



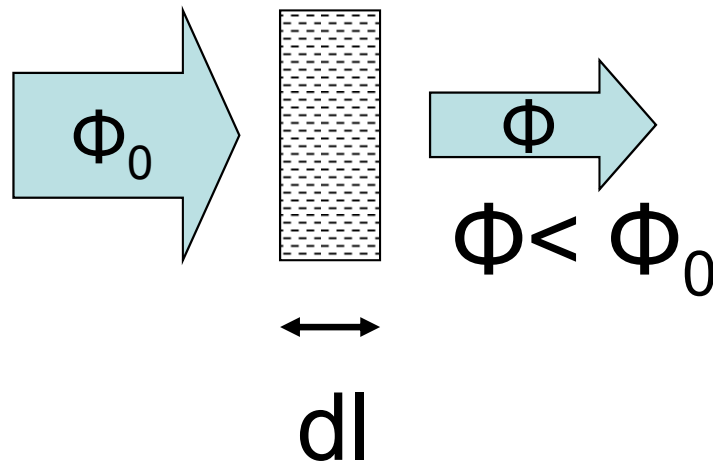
Transmittance a koncentrace zákon Beerův

$$T = \Phi / \Phi_0 = e^{-\text{konst} \times \text{koncentrace}}$$



UV-Vis spektroskopie

Bouguert-Lambert-Beerův zákon



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

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

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

$$\int_{\Phi_0}^{\Phi} -\frac{d\Phi}{\Phi} = k \int_0^l dl \quad \int \frac{dx}{x} = \ln x \quad \int -\frac{dx}{x} = -\ln x = \ln \frac{1}{x}$$

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

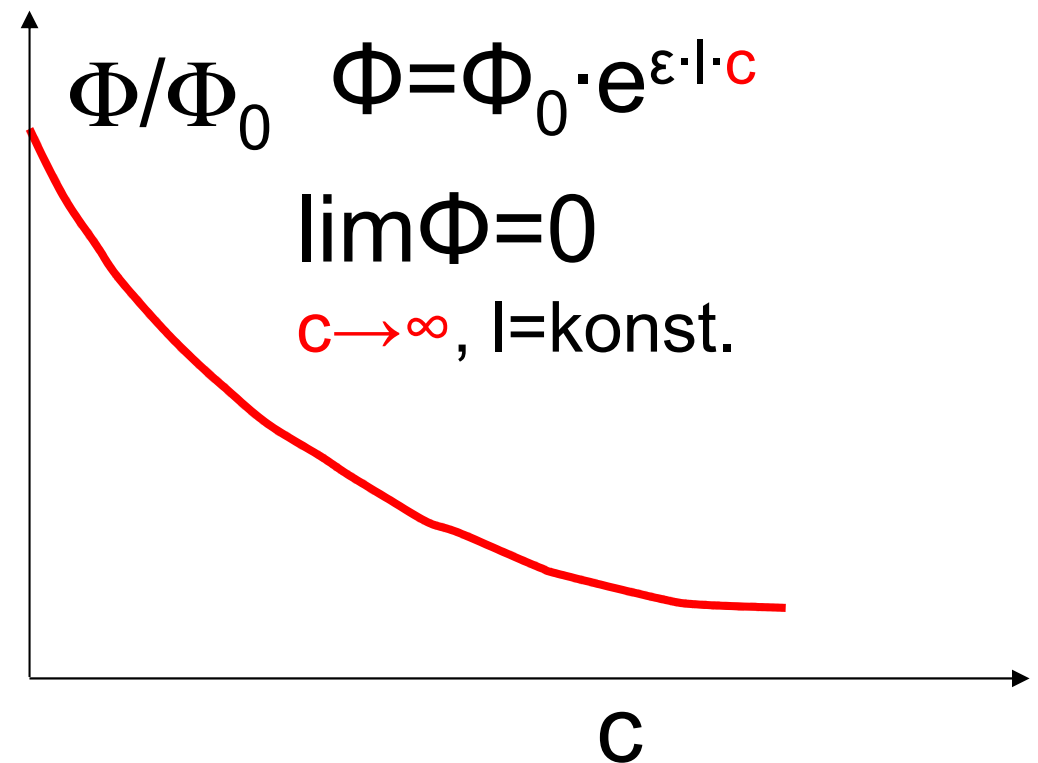
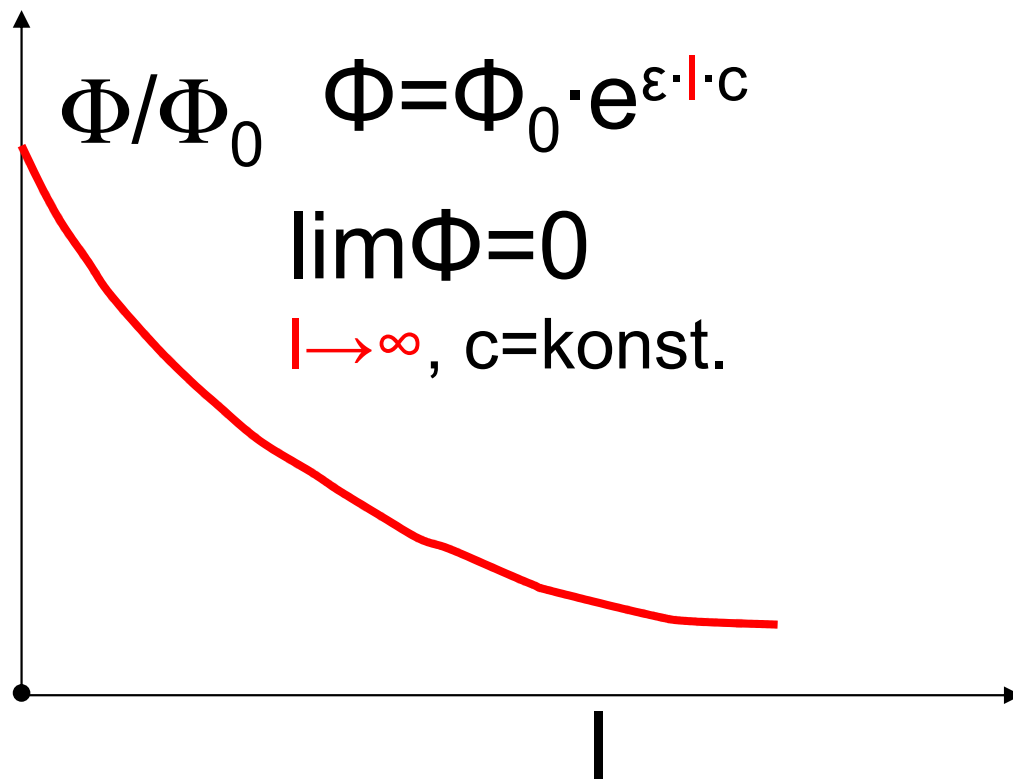
ε_{λ} je molární absorpční koeficient při λ

c je koncentrace

UV-Vis spektroskopie

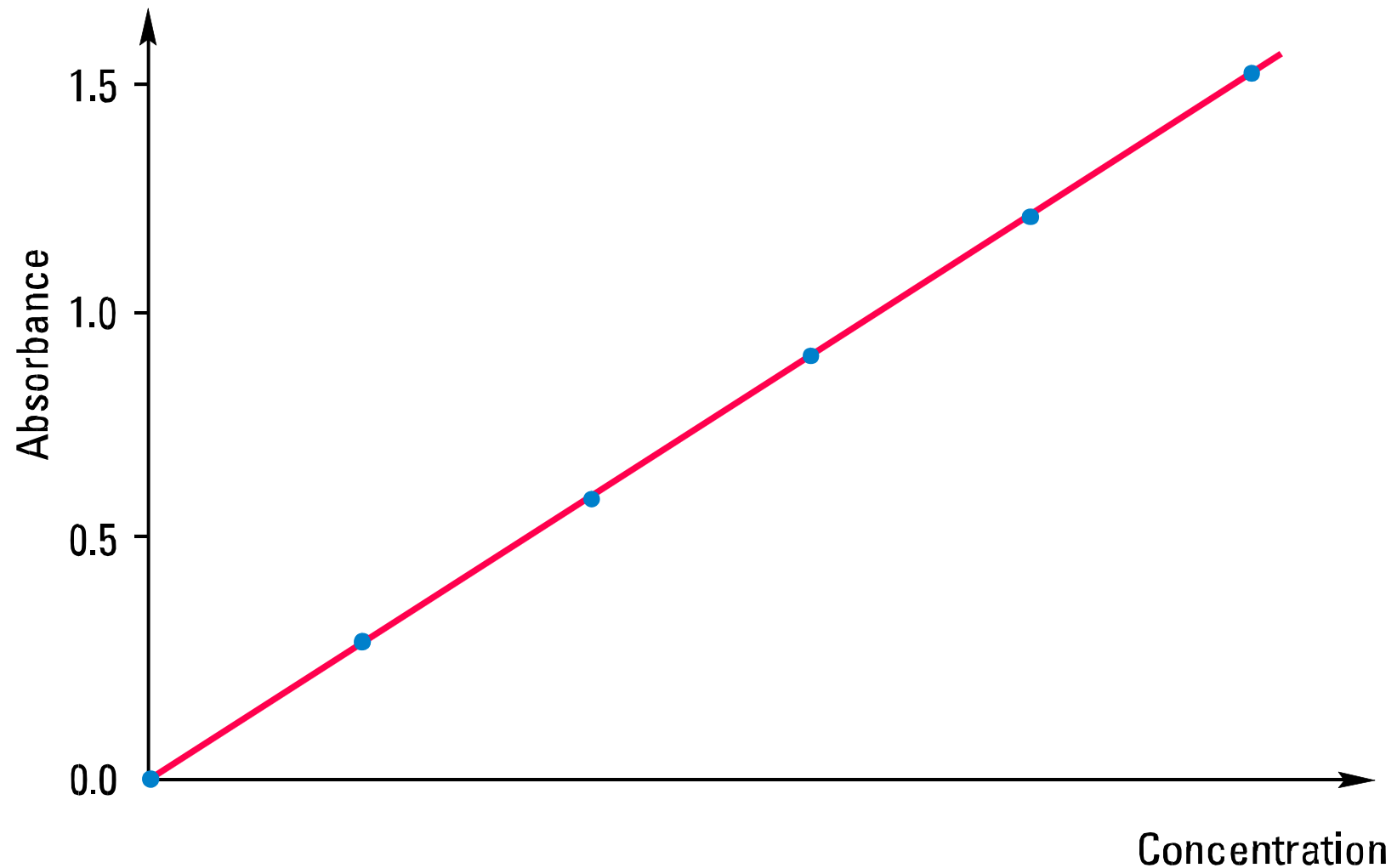
Bouguert-Lambert-Beerův zákon

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



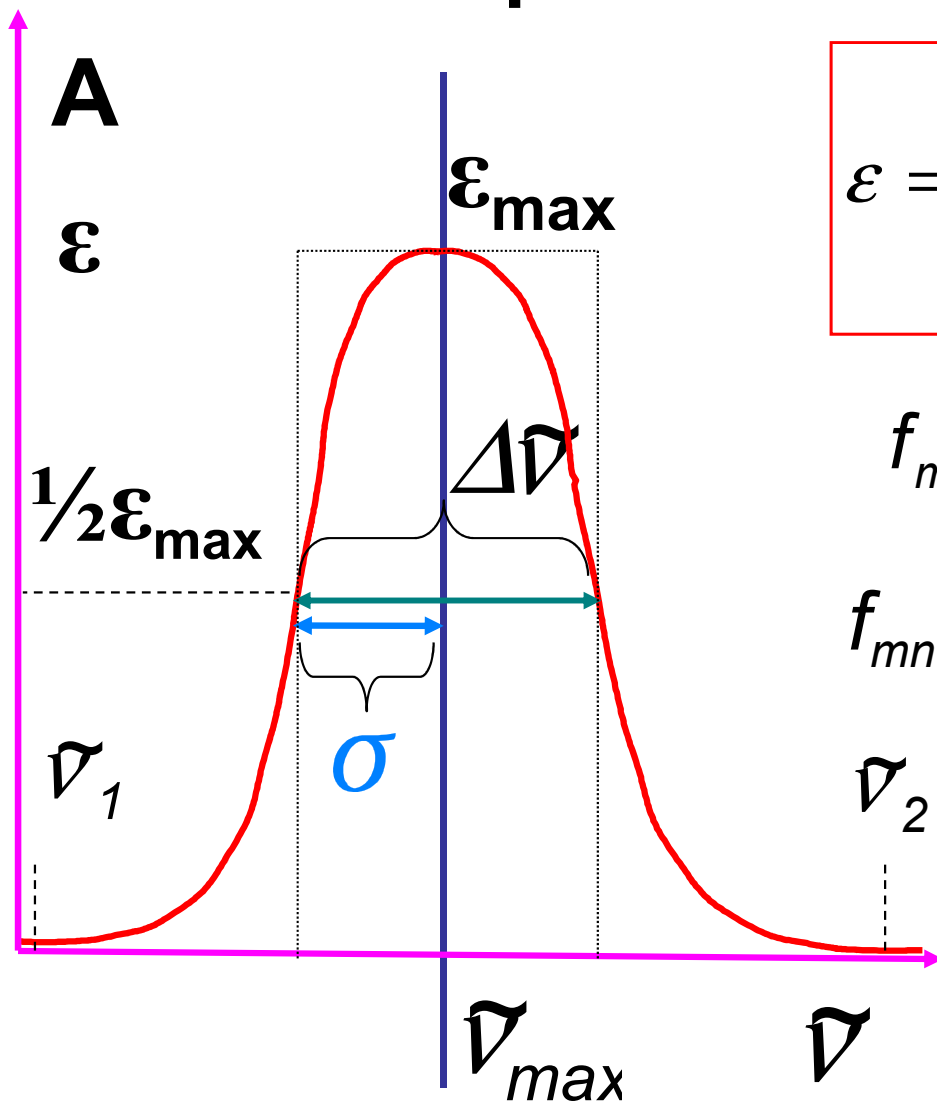
Bouguert-Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log T = -\log(I / I_0) = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$



Charakteristika absorpčního píku

Gaussův profil



$$\varepsilon = \varepsilon_{max} \exp \left[- \frac{(\nu - \nu_{max})^2}{\delta^2} \ln 2 \right]$$

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

f_{mn} = síla oscilátoru ~ plocha píku

$$\nu_2 \quad f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \cdot \varepsilon_{max} \cdot \Delta\nu$$

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

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

Ψ_m , Ψ_n jsou vlnové funkce

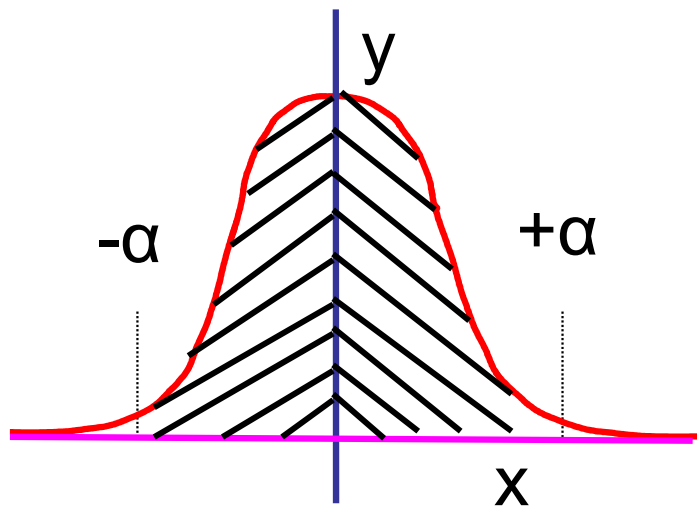
horního a dolního stavu

spektrálního přechodu

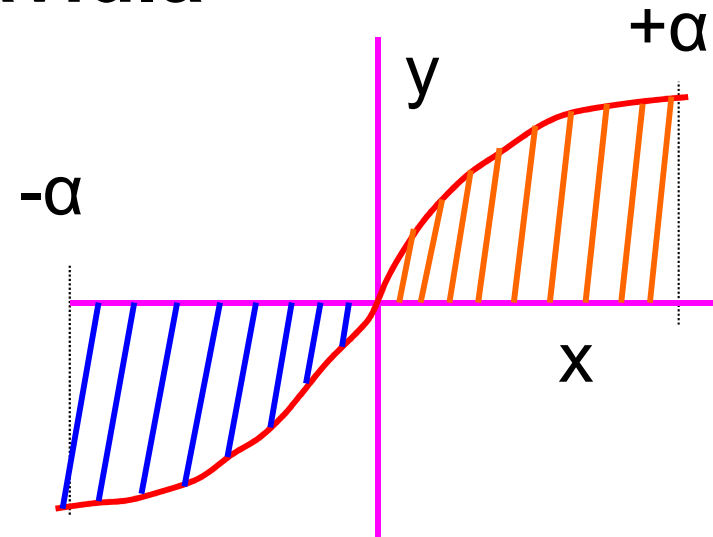
$d\tau$ = prostorový element

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

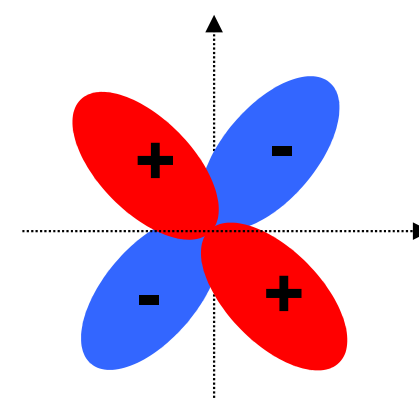
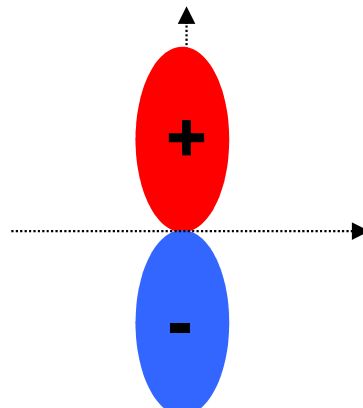
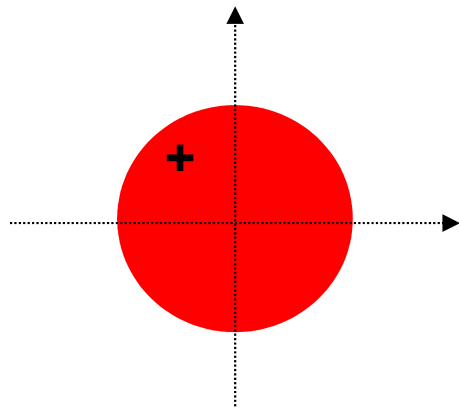
Charakteristika absorpčního píku

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 Ψ_m musí být **lichá** a Ψ_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

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

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

- Ψ_1 a Ψ_2 jsou atomové orbitaly, c_1 a c_2 konstanty
- Φ_a je vazebný molekulový orbital
- Φ_b je protivazebný molekulový orbital

Výběrová pravidla

Symbolika a členění molekulových orbitalů

- Osové kvantové číslo λ je analogií vedlejšího (orbitálního) kvantového čísla l u atomů.
- λ kvantuje úhlový (orbitální) moment hybnosti elektronu na dané energetické hladině molekuly; nabývá celočíselných hodnot $\lambda = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$
- Pro jednoelektronové orbitaly 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 orbitaly.
- Protivazebné orbitaly se značí $\sigma^*, \pi^* \dots$
- Celkové orbitální kvantové číslo Λ je analogií celkového vedlejšího kvantového čísla L u atomů.
- Λ respektuje přítomnost více než 1 elektronu na dané hladině a platí $\Lambda = \sum \lambda_i$

Výběrová pravidla

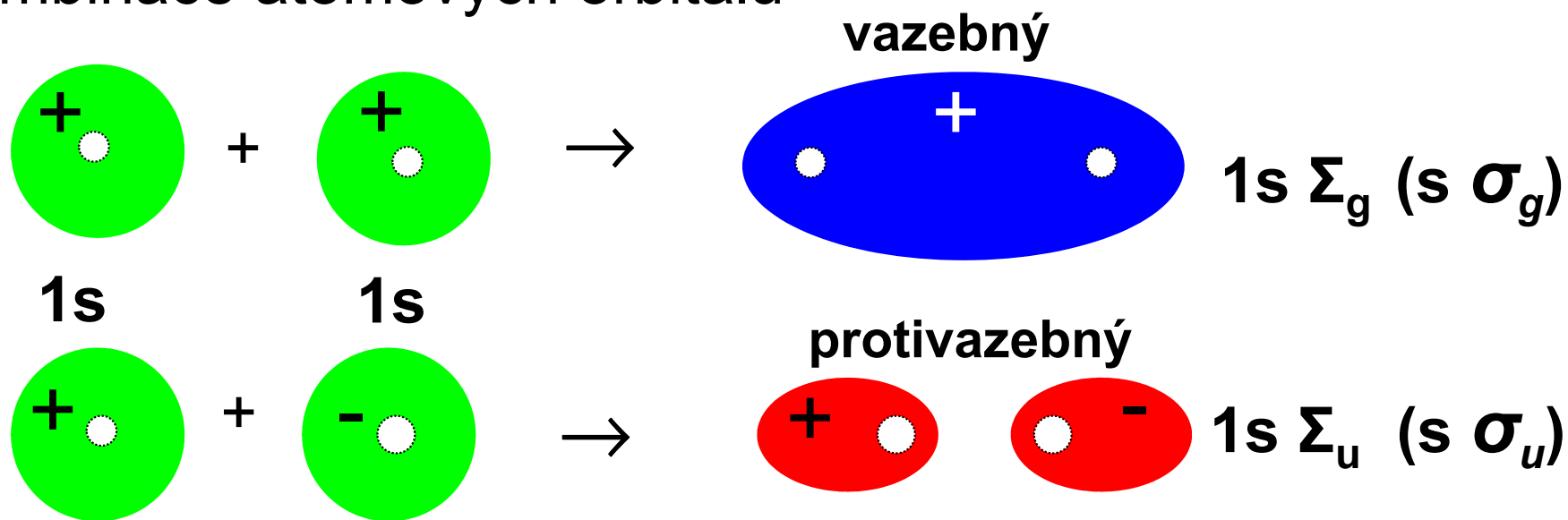
Symbolika a členění molekulových orbitalů

- 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).

Výběrová pravidla

Symbolika a členění molekulových orbitalů

- Kombinace atomových orbitalů



vazebný

$$\Phi_a = C_1 \cdot \Psi_1 + C_2 \cdot \Psi_2$$

protivazebný

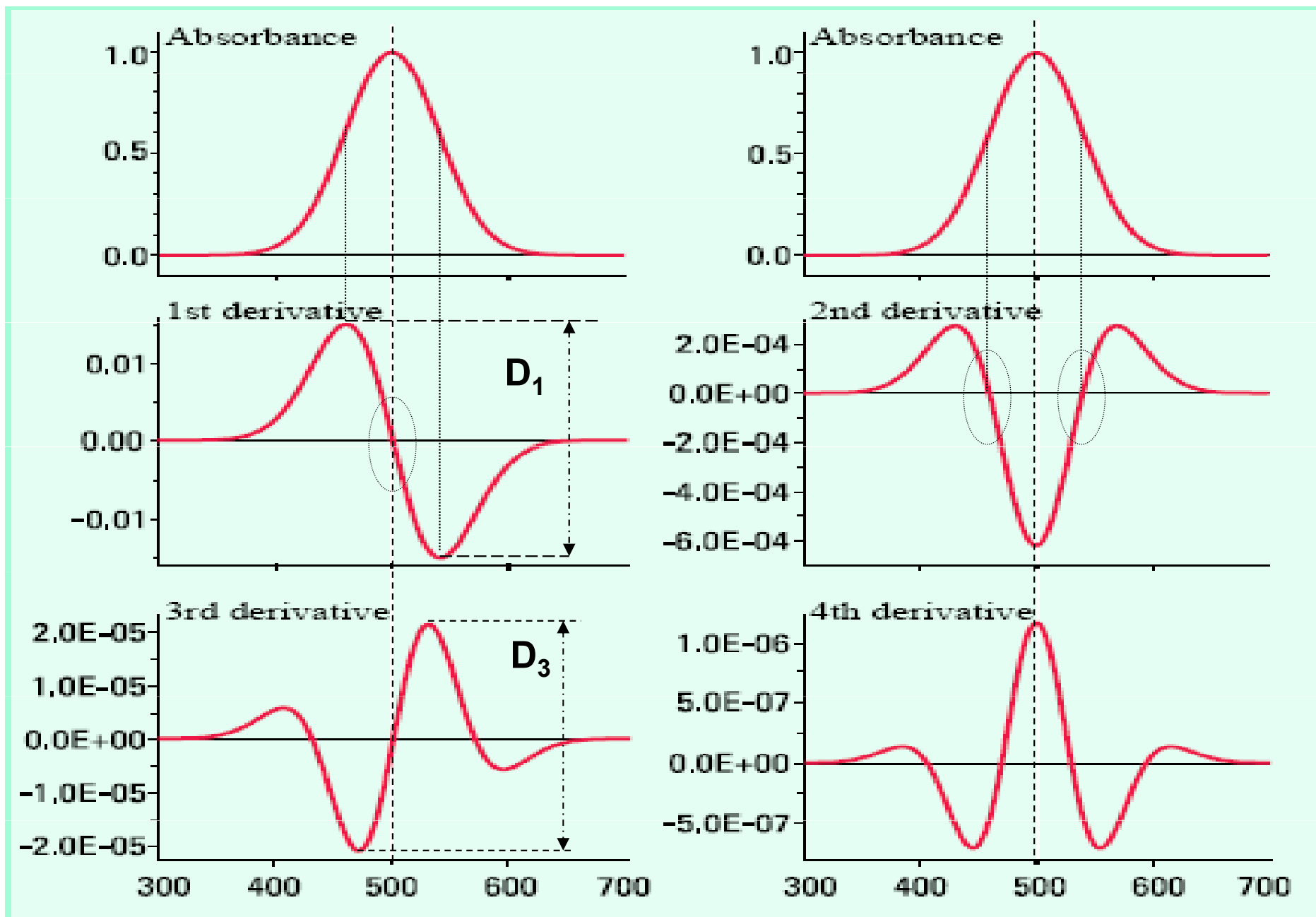
$$\Phi_b = C_1 \cdot \Psi_1 - C_2 \cdot \Psi_2$$

Výběrová 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

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

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

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

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

Derivační spektrofotometrie

2. derivace

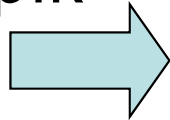
$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = f''(\lambda) = 0; \approx \text{inflexní body}$$

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

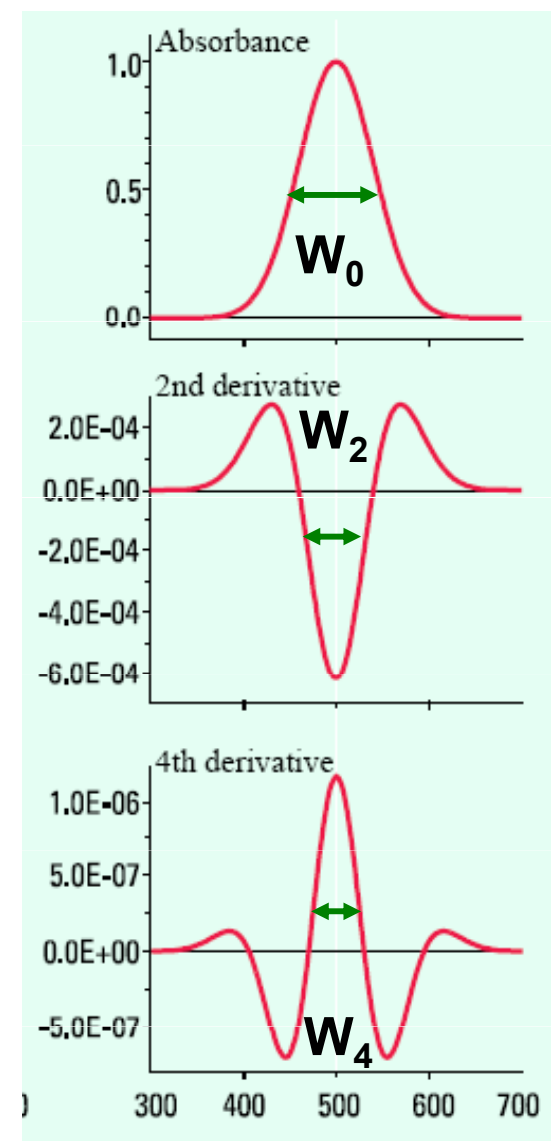
$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} > 0; \text{max}; \approx \text{min } A = f(\lambda)$$

Přesné určení polohy maxim a minim λ_{max} a λ_{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 (λ_{\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	-

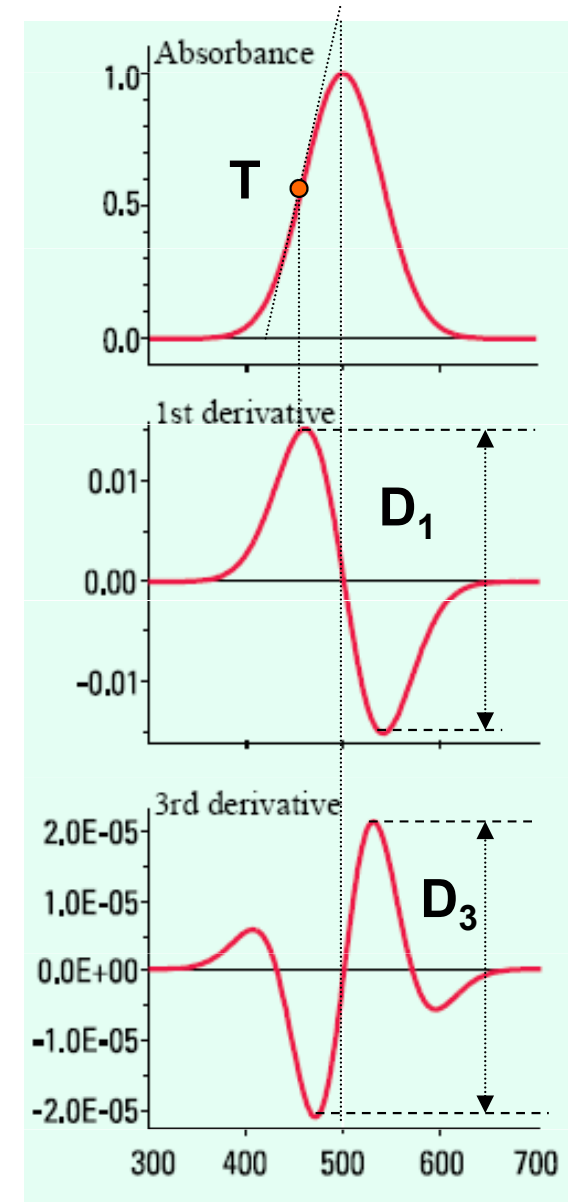


Derivační spektrofotometrie

- 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

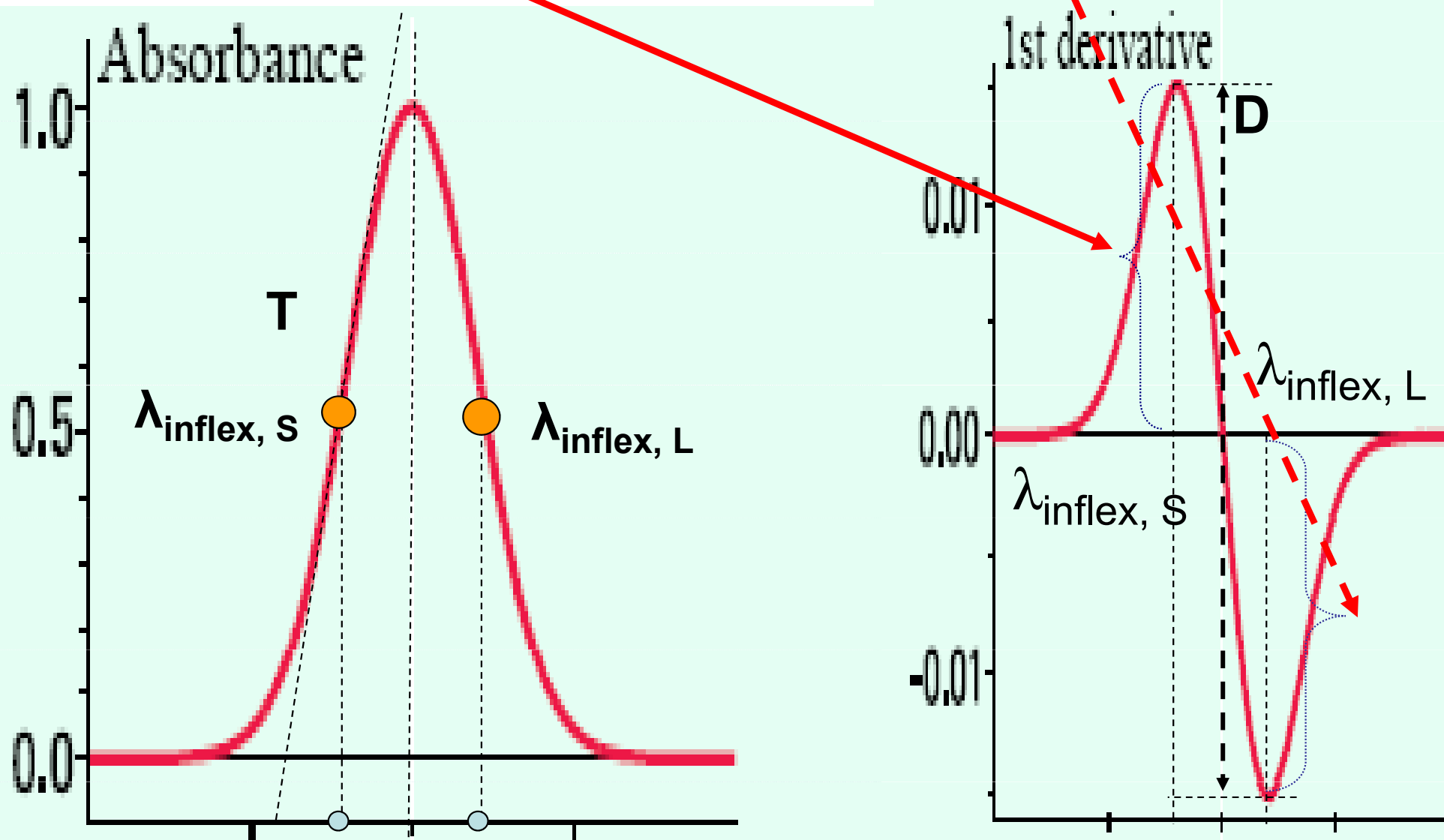
- Derivace Lambert-Beer-Bouguer zákona =
zvýšení citlivosti: $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$

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

- $\lambda_{\text{inflex},S,L}$ 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

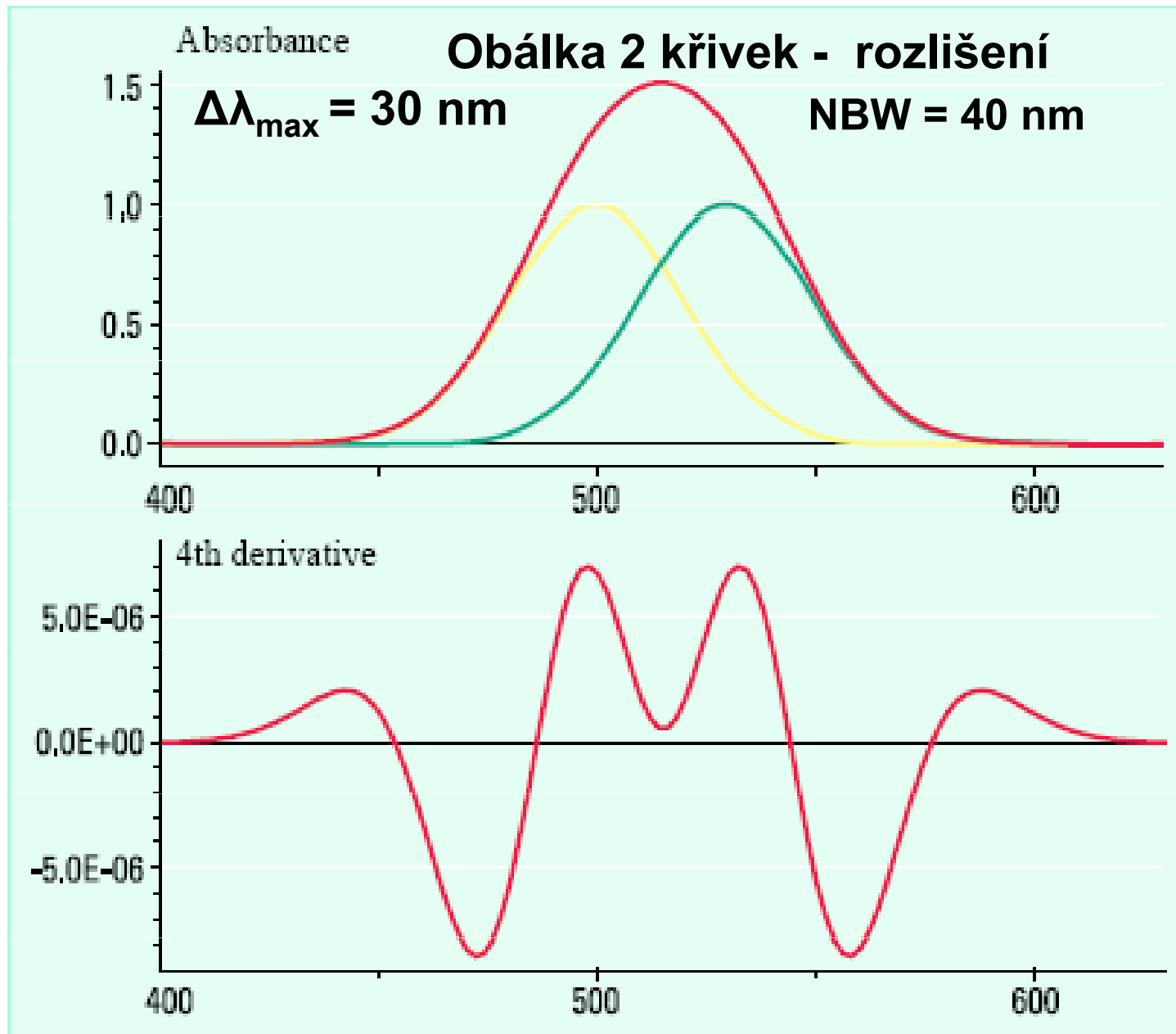
$$D = \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},S}} - \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\lambda_{\text{inflex},L}} = k \cdot c$$



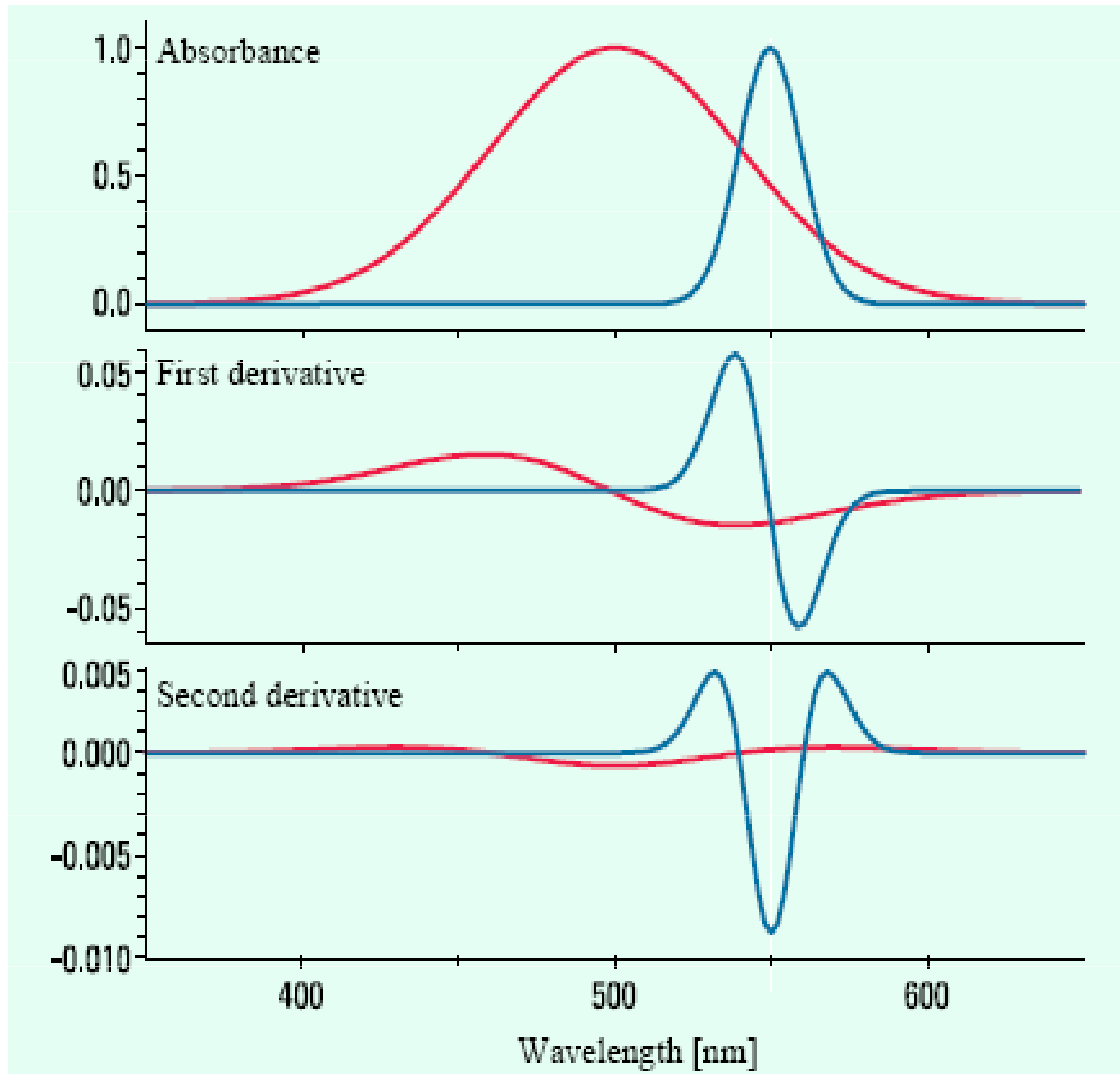
Derivační spektrofotometrie

- 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 λ_{\max} .

Derivační spektrofotometrie



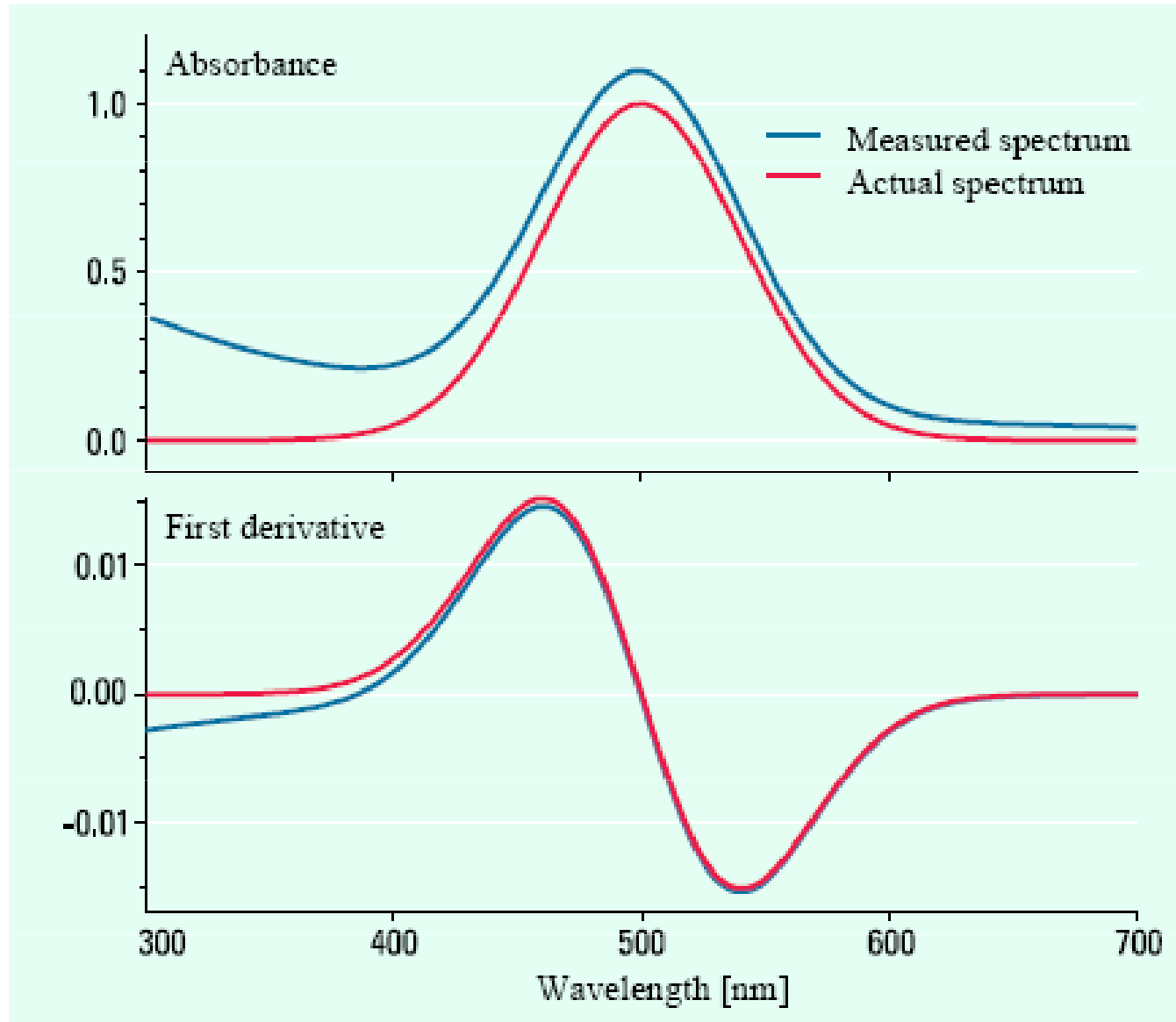
Derivační spektrofotometrie



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

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 λ_{\max} širokých absorpčních pásů
- Zvýšení citlivosti měření
- Eliminace pozadí
 - Rayleighova rozptylu
 - Konstantního pozadí (v závislosti na λ)
 - Neselektivní absorpce matrice
- Zlepšení poměru signál/pozadí

Derivační spektrofotometrie

Tvorba derivačních spekter

1) Elektronicky: výstupní napětí proporcionální absorpanci 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:

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

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

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

Derivační spektrofotometrie

Tvorba derivačních spekter

2) Opticky: rychlá modulace λ záření \Rightarrow do kyvety;
Modulace λ = rychlé změny λ , periodické skenování $\pm\lambda$ 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 λ : provedení modulace vlnové délky:
- i. rychlým periodickým skenem monochromátoru $\pm\lambda$
 - ii. kmitající planparalelní destičkou (posun paprsku)
 - iii. oscilací vstupní nebo výstupní štěrbiny (změna úhlu dopadu paprsku na mřížku)

střídavý fotoproud \sim změně Φ 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

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