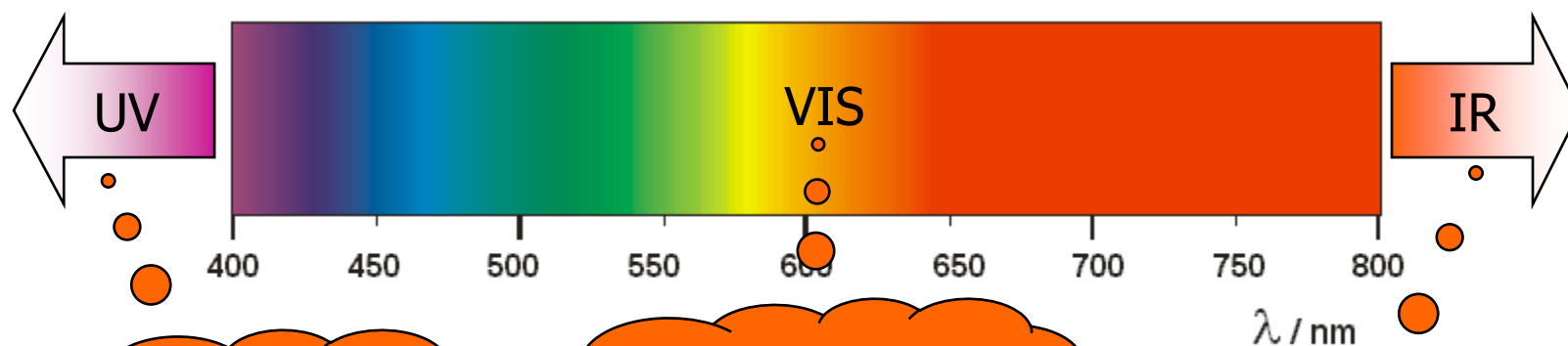


Spektroskopie v UV-VIS oblasti



UV-VIS spektroskopie

- pracuje nejčastěji v oblasti 200 - 800 nm
 - lze měřit i < 200 nm či > 800 nm



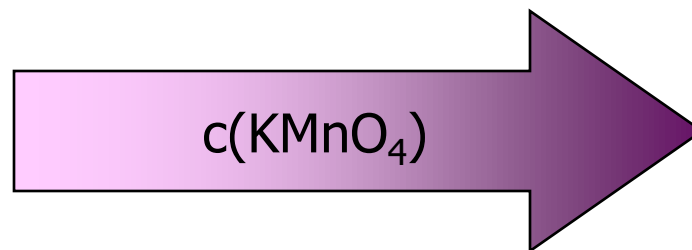
Ultra Violet

VISible

Infra Red

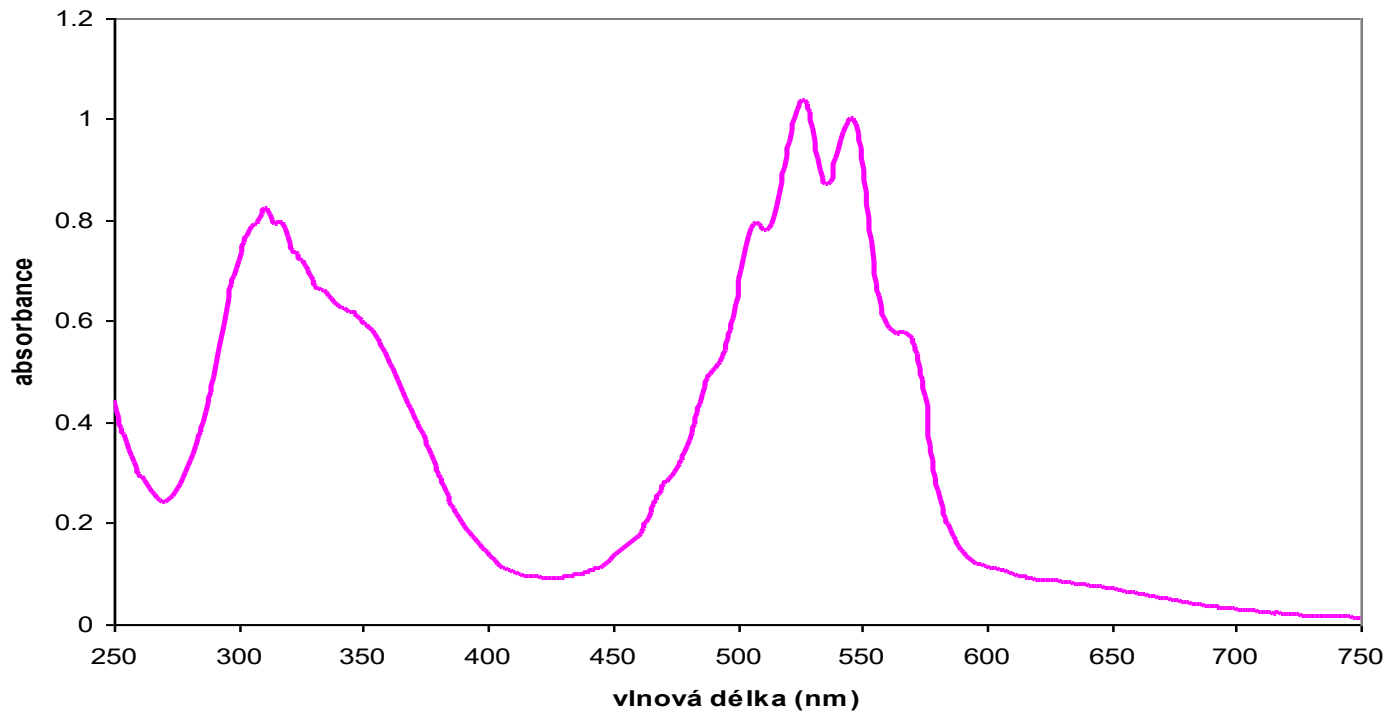
Roztok KMnO_4

- roztok KMnO_4 je červenofialový
- odstín červenofialové závisí na koncentraci

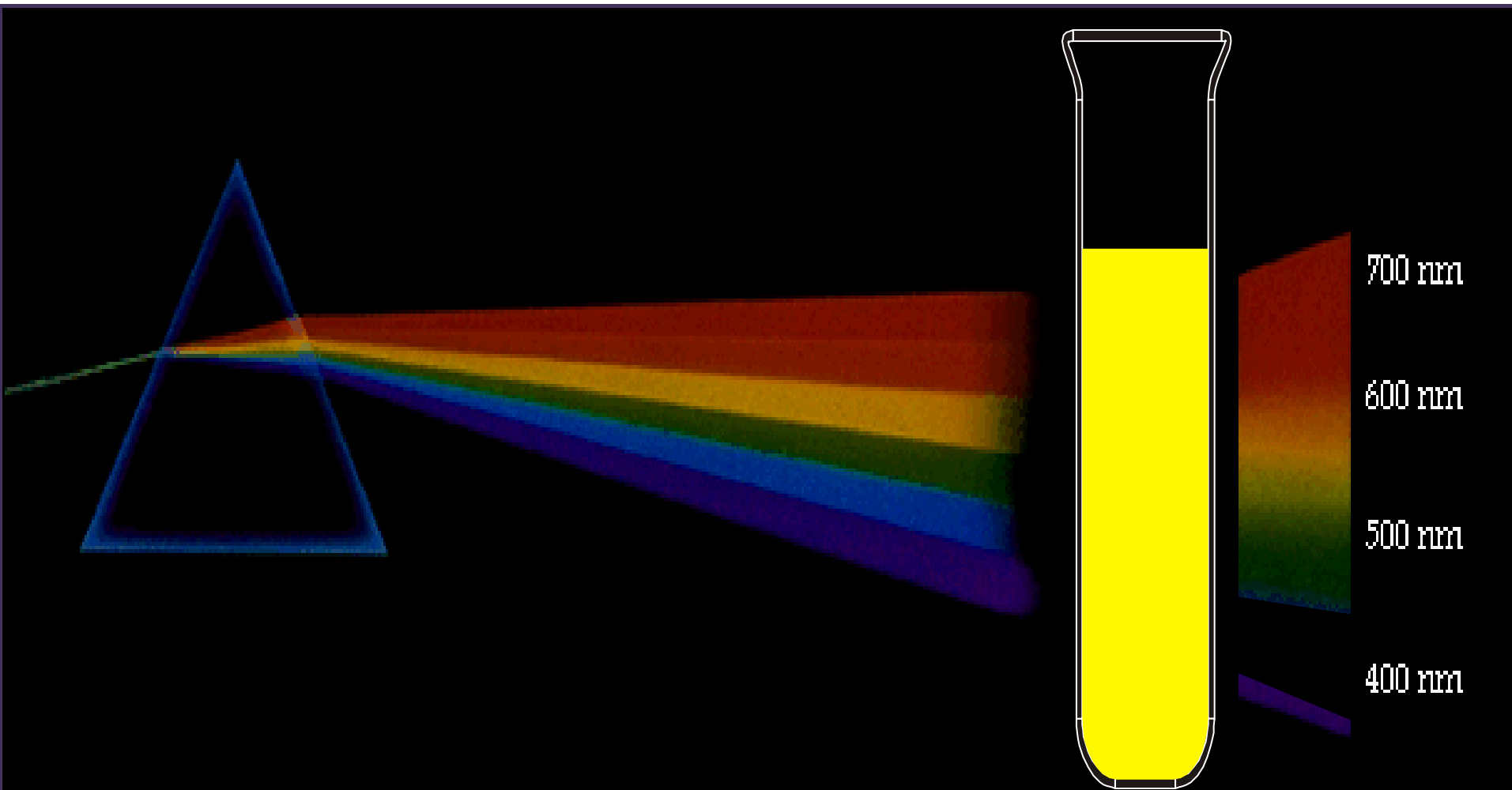


Proč je roztok barevný?

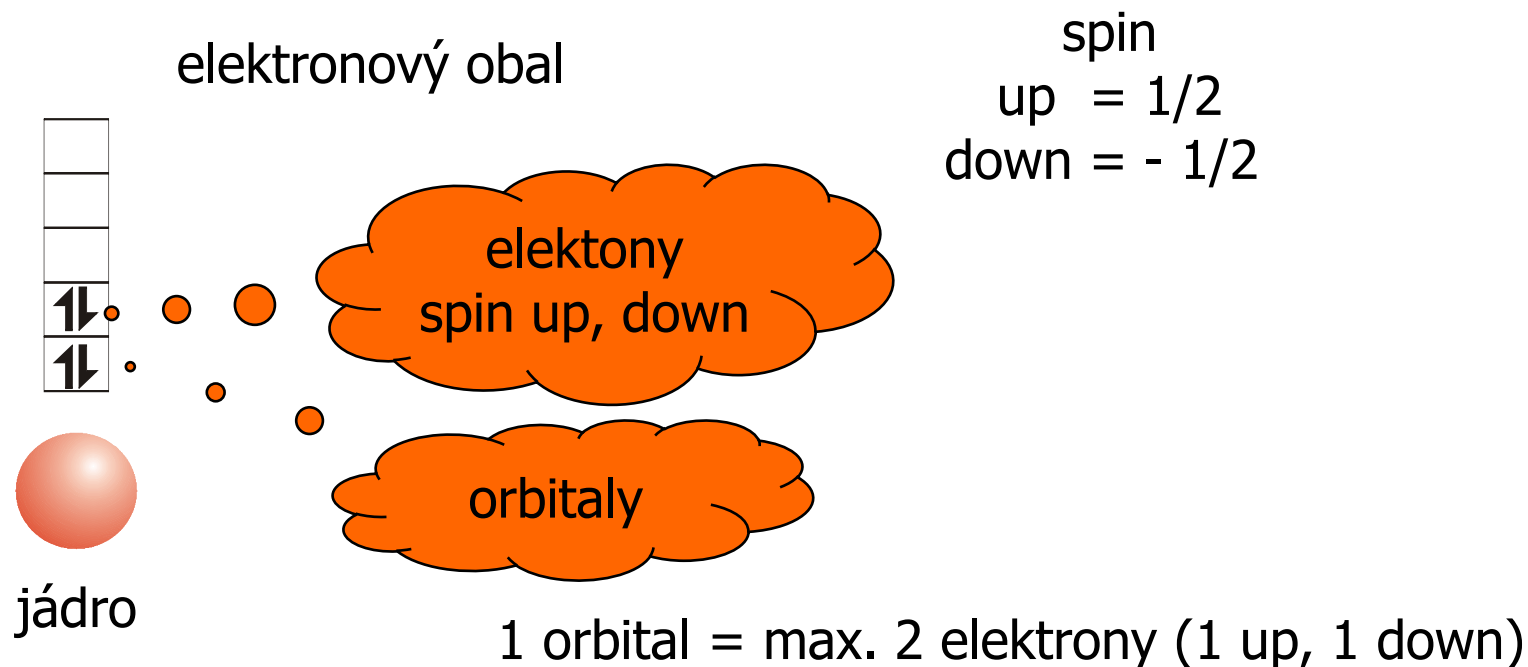
- KMnO_4 absorbuje doplňkovou barvu k červenofialové - zelenou (526 a 546 nm)



Proč je roztok barevný?

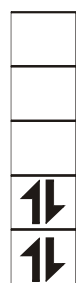


Stavy atomů a molekul



$$\text{spin} = |n.\text{up} + m.\text{down}| \quad 2.1/2 + 2.-1/2 = 0$$

Stavy atomů a molekul



$s = 0$
singlet



$s = 1/2$
doublet



$s = 1$
triplet



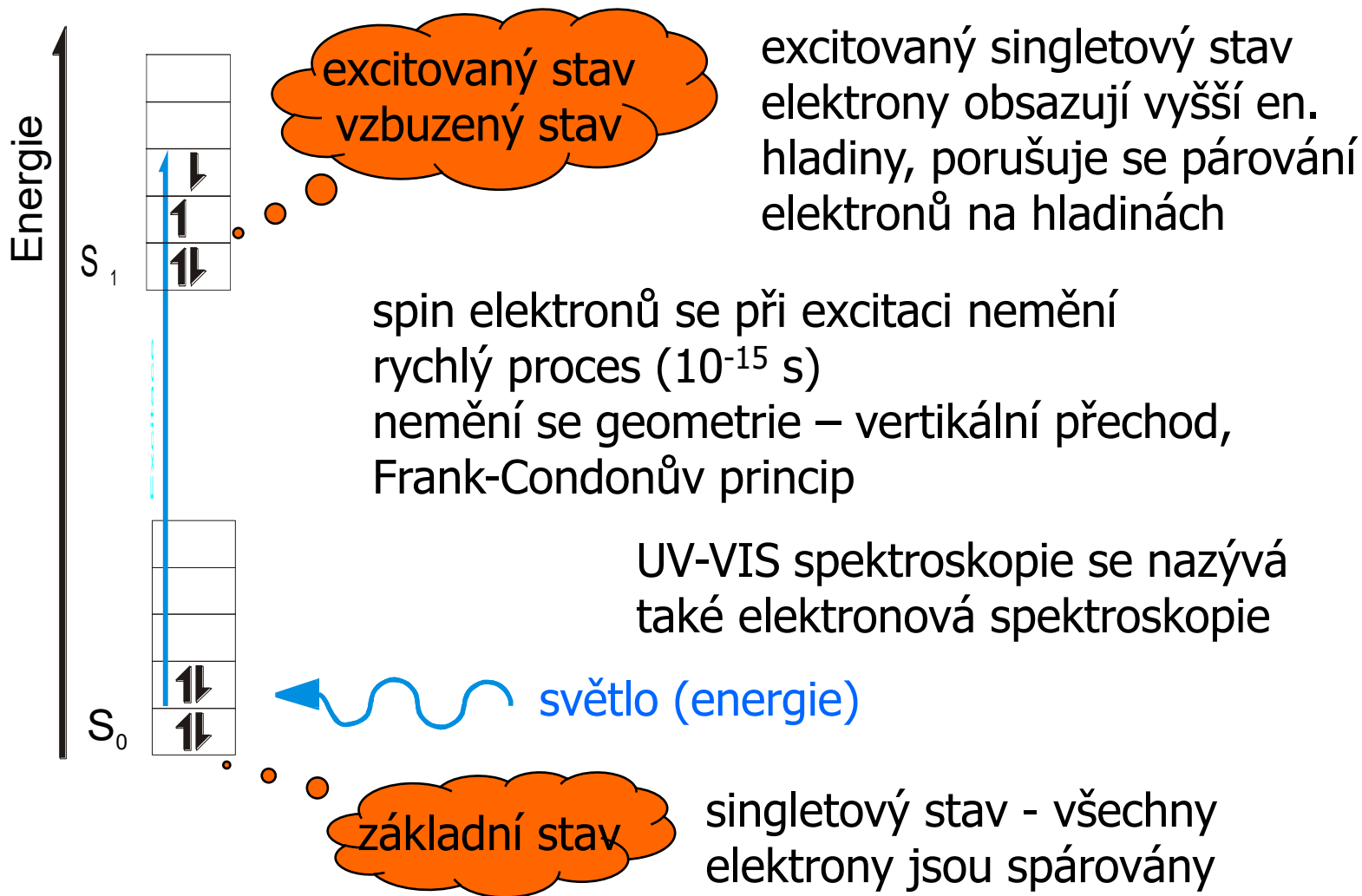
multiplicita stavu $S = 2.s + 1$

$S=1$

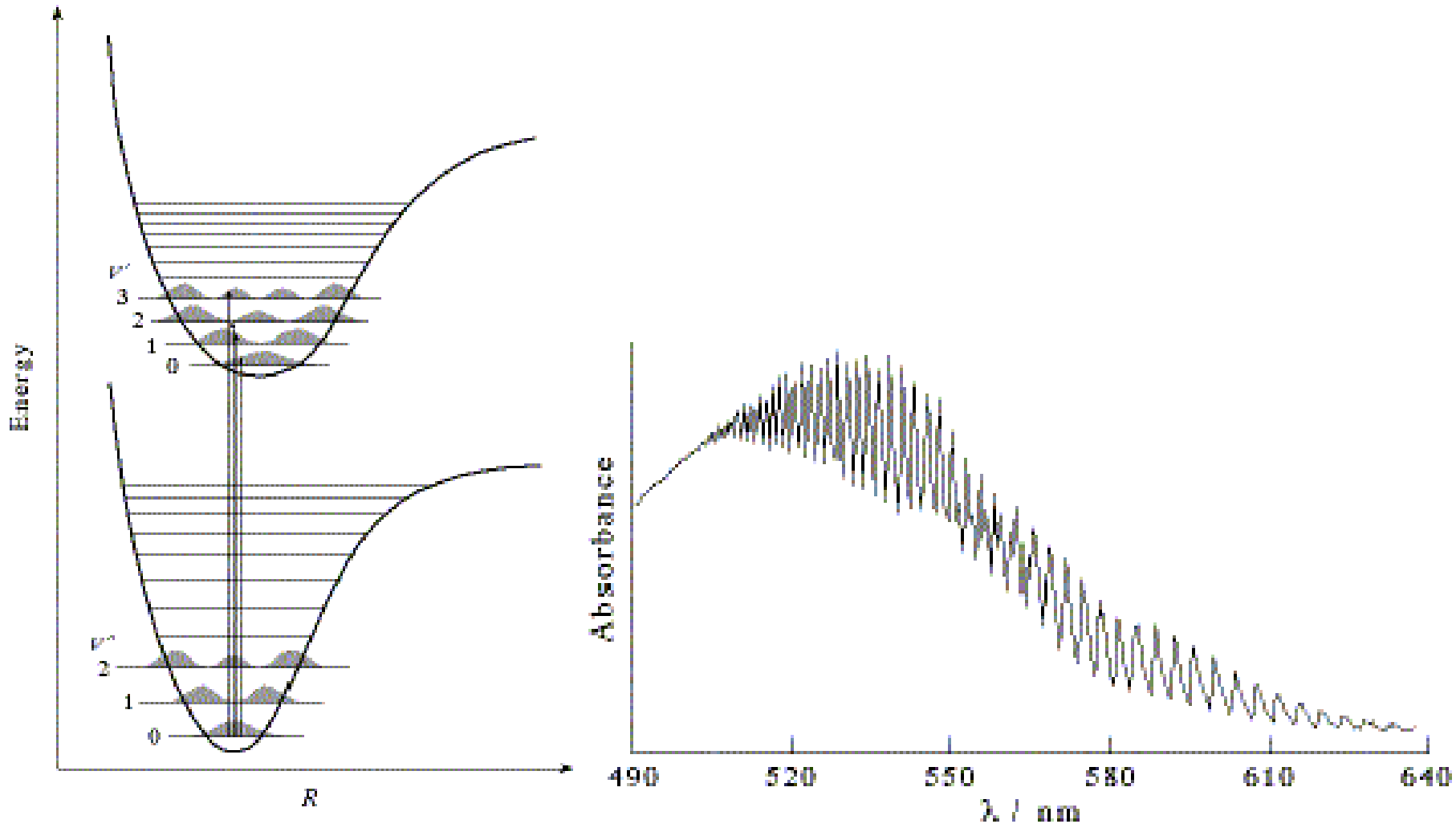
$S=2$

$S=3$

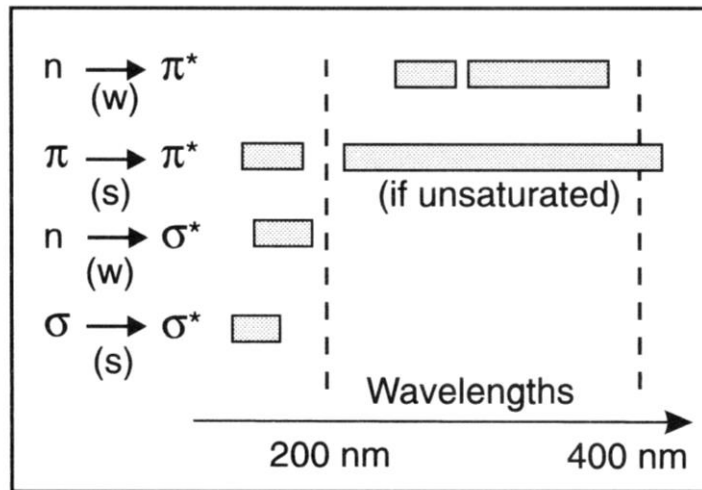
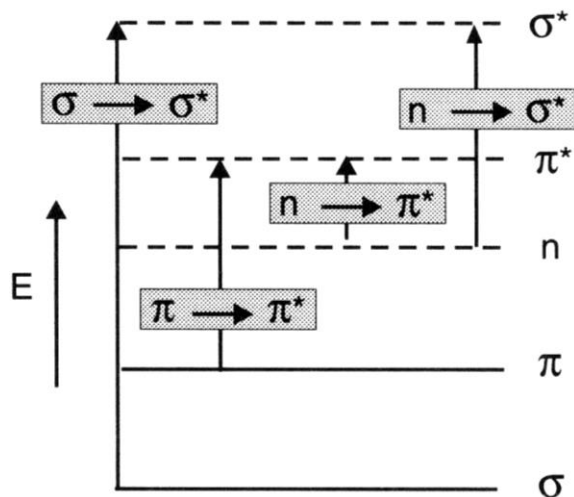
Proč látka absorbuje?



Excitace molekul



Typy přechodů u molekul



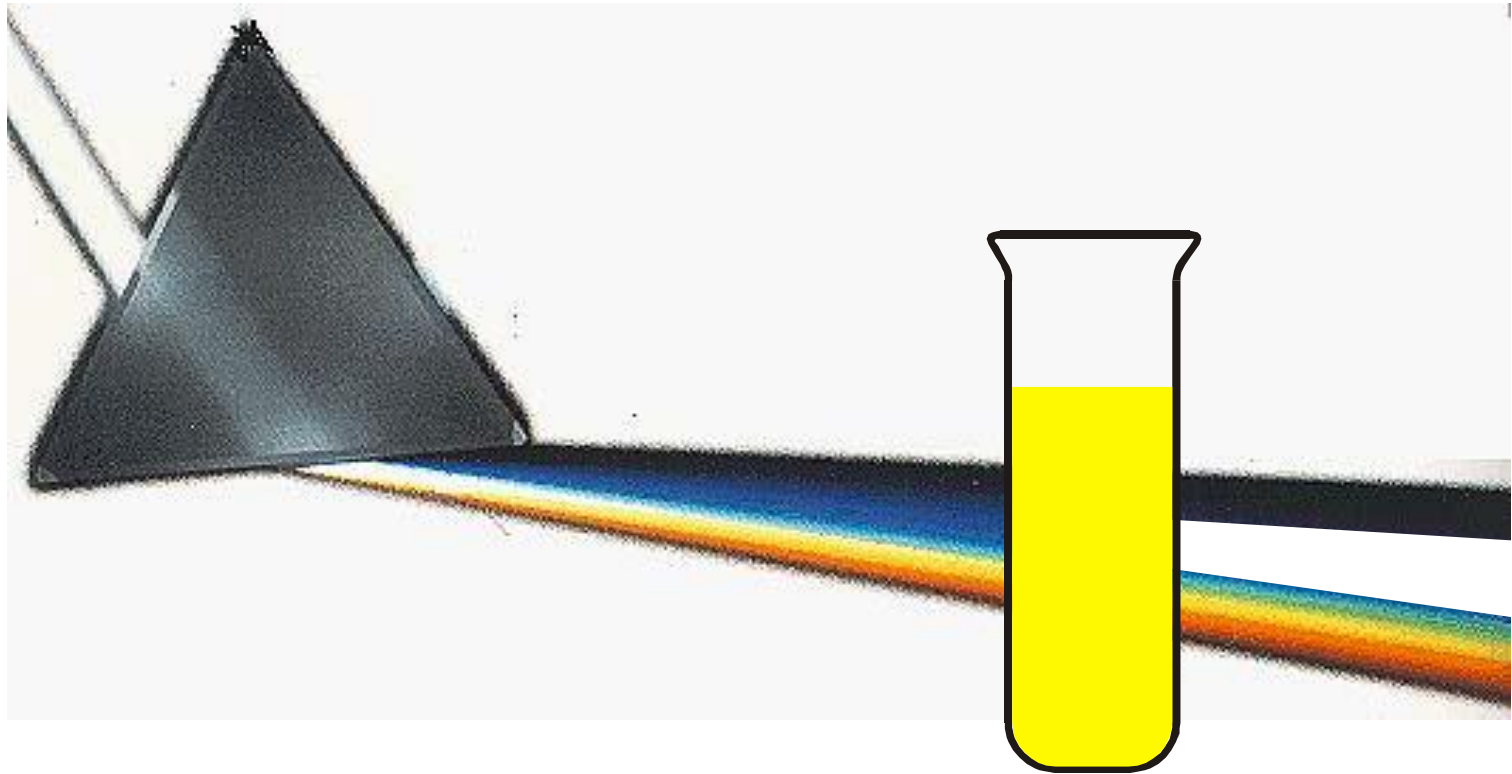
s = Strong transition w = Weak transition

$\pi-\pi^*$ mohou poskytovat všechny molekuly, které obsahují násobné vazby (bez konjugace okolo 200 nm, v případě konjugace *bathochromní posun* = $\uparrow\lambda_{\max}$)

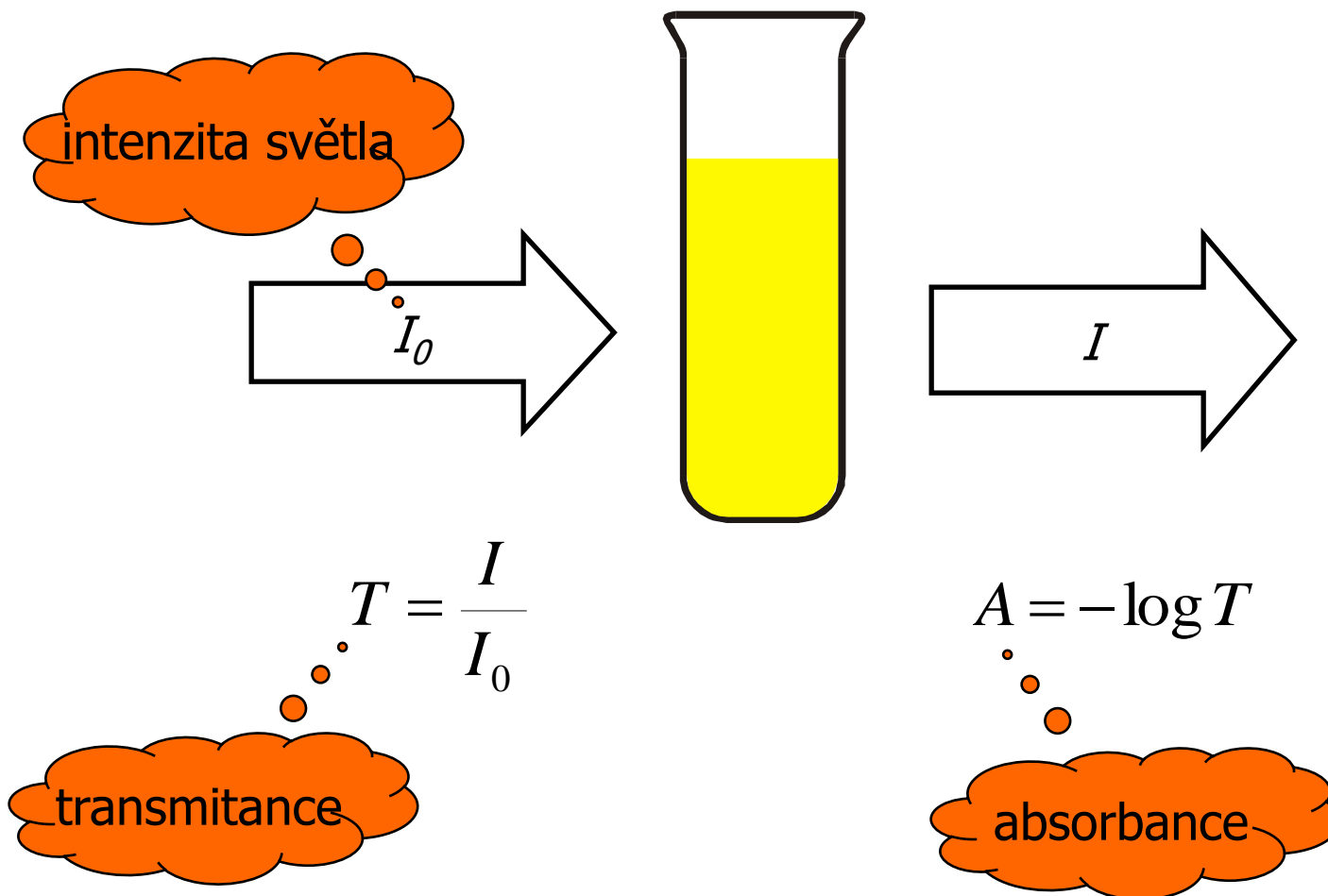
$n-\pi^*$ všechny molekuly s násobnou vazbou a volným elektronovým párem, např. karbonyl ($-\text{C}=\text{O}$ cca 280 nm), azo ($-\text{N}=\text{N}-$), atd.

Symetricky zakázané přechody: $\sigma-\pi^*$ a $\pi-\sigma^*$ (vzdálená UV, nízká intenzita)

Absorpce světla



Absorbance a transmittance



Transmittance



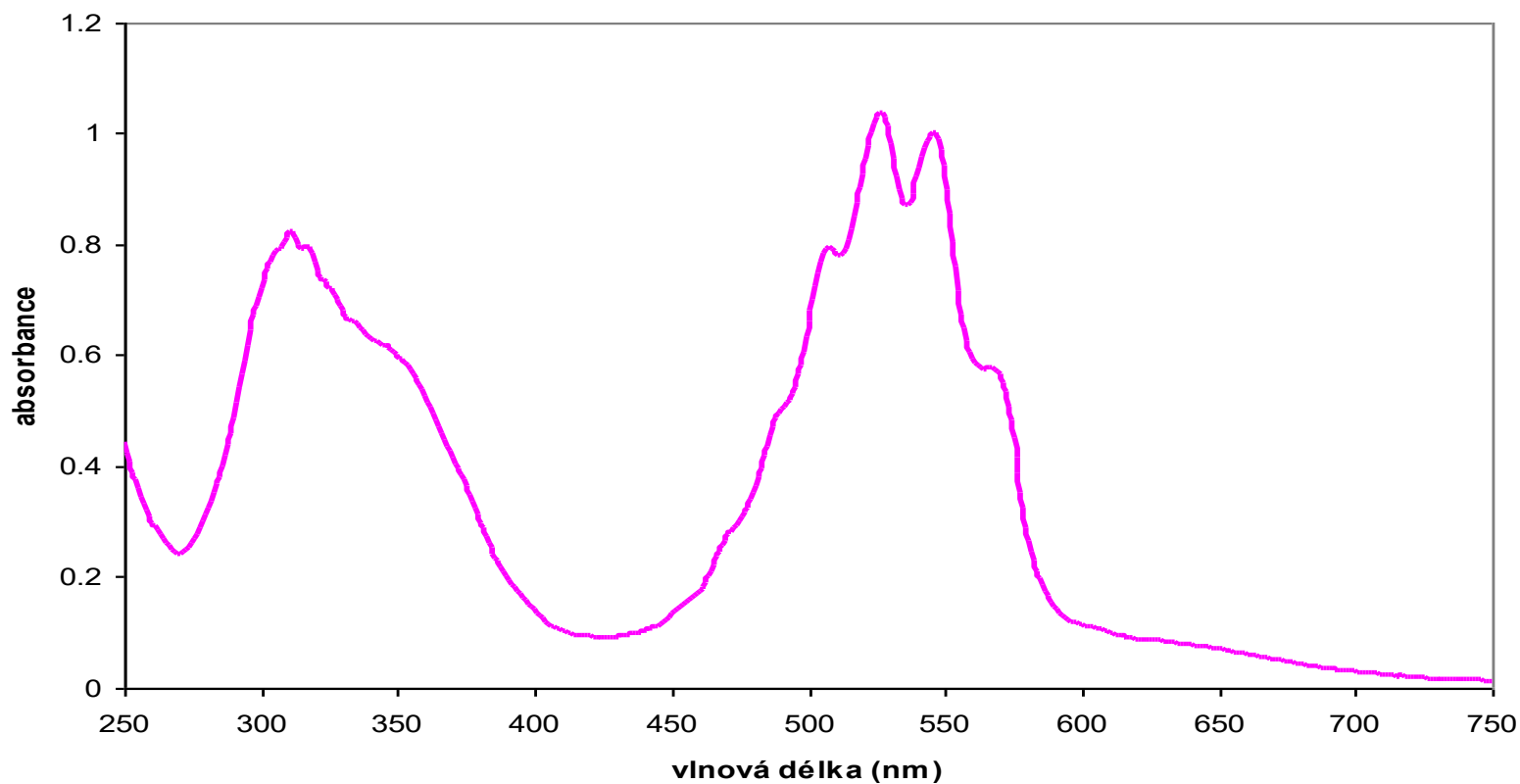
- T nabývá hodnot od 0 do 1 (0 - 100 %)
 - bezrozměrná veličina
 - $T=1$ vzorek pro světlo dokonale propustný
 - $T=0$ vzorek světlo dokonale absorbuje

Absorbance

- A nabývá hodnot od 0 do ∞
 - bezrozměrná veličina
 - $A = 0$ vzorek neabsorbuje
 - $A = \infty$ vzorek absorbuje vše
 - s rostoucí koncentrací c , A roste
 - s rostoucí délkou vzorku l , A roste
 - ε je charakteristikou látky
 - c se udává v mol/dm^3 , l se udává v cm

Spektrum

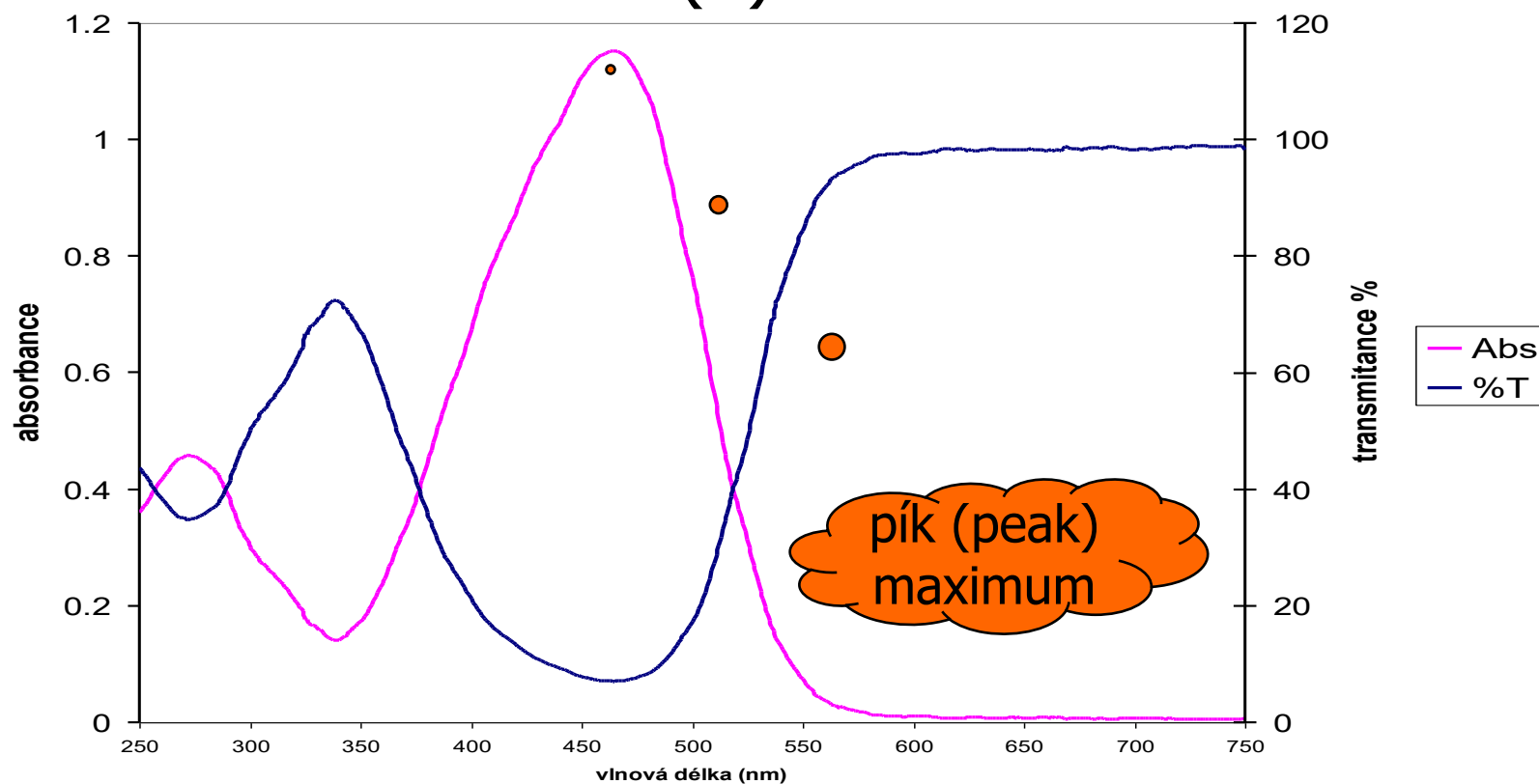
- závislost A na λ



Pozn. spektrum vodného roztoku KMnO_4 (λ_{max} 526 a 546 nm)

Spektrum

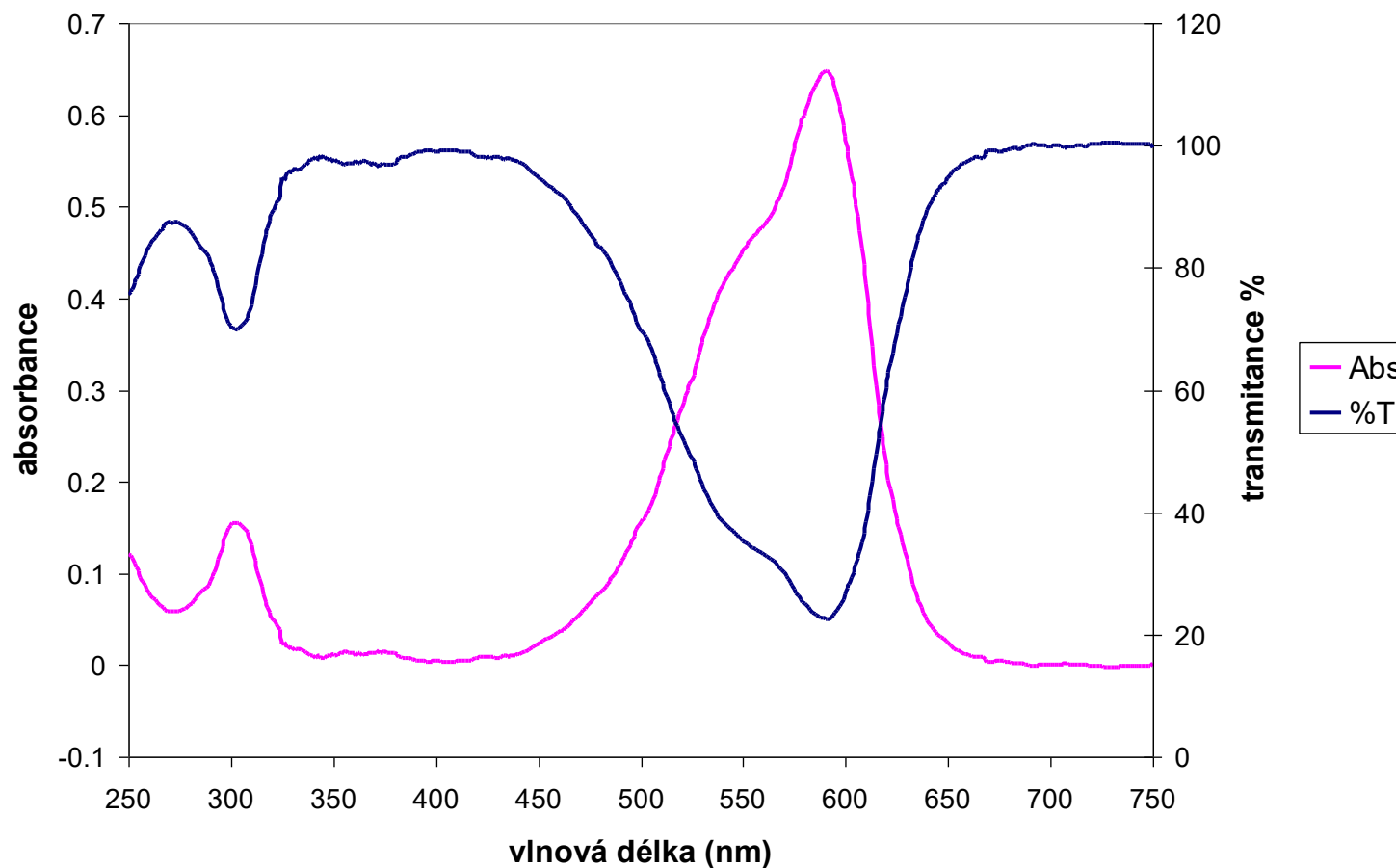
- závislost A (T) na λ



Pozn. spektrum vodného roztoku methylovanže (λ_{\max} 465nm)

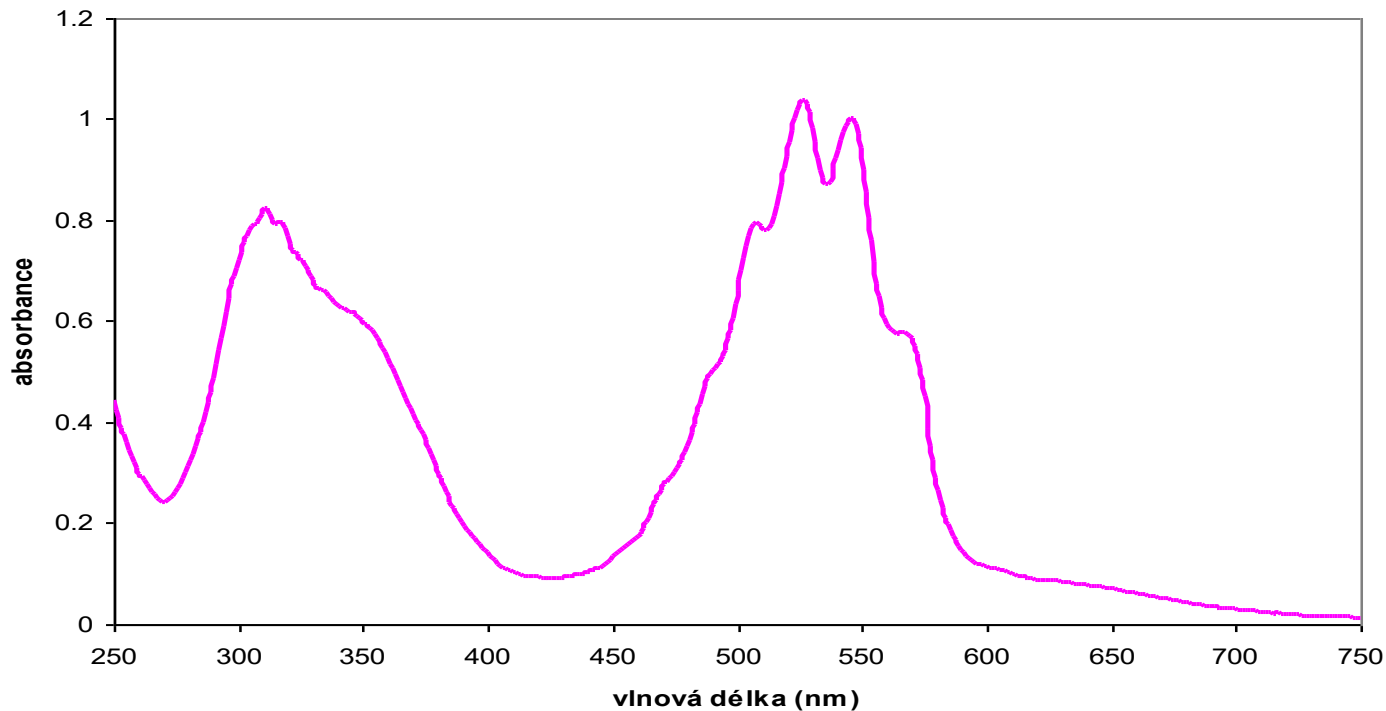
Absorbance a transmittance

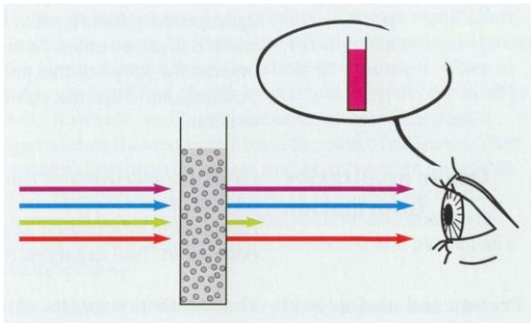
Krystalová violet'



Proč je roztok barevný?

KMnO_4 absorbuje doplňkovou barvu k červenofialové - zelenou (526 a 546 nm)





Doplňkové barvy

Wavelength [nm]	Absorbed color	Complementary color
650-780	red	blue-green
595-650	orange	greenish blue
560-595	yellow-green	purple
500-560	green	red-purple
490-500	bluish green	red
480-490	greenish blue	orange
435-480	blue	yellow
380-435	violet	yellow-green

Doplňkové barvy

Vlnové délky a barvy absorbovaného záření a příslušné doplňkové barvy (barvy roztoku)

Absorbované záření (nm)	Barva absorbovaného záření	Barva doplňková (barva roztoku)
400-435	fialová	žlutozelená
435-480	modrá	žlutá
480-490	zelenomodrá	oranžová
490-500	modrozelená	červenooranžová
500-560	zelená	purpurová
560-580	zelenožlutá	fialová
580-595	žlutooranžová	modrá
595-610	červenooranžová	zelenomodrá
610-760	červená	modrozelená

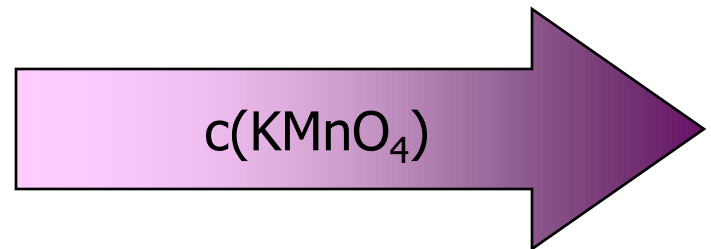
Při dopadu bílého světla

- záření *zcela odraženo* = vzorek jako *bílou*
- záření *zcela pohlceno* = vzorek jako *černou*

Vzorek *část světla pohltí* a *část odrazí* = lidské oko vidí vzorek v barvě odraženého záření (*doplňková barva*)

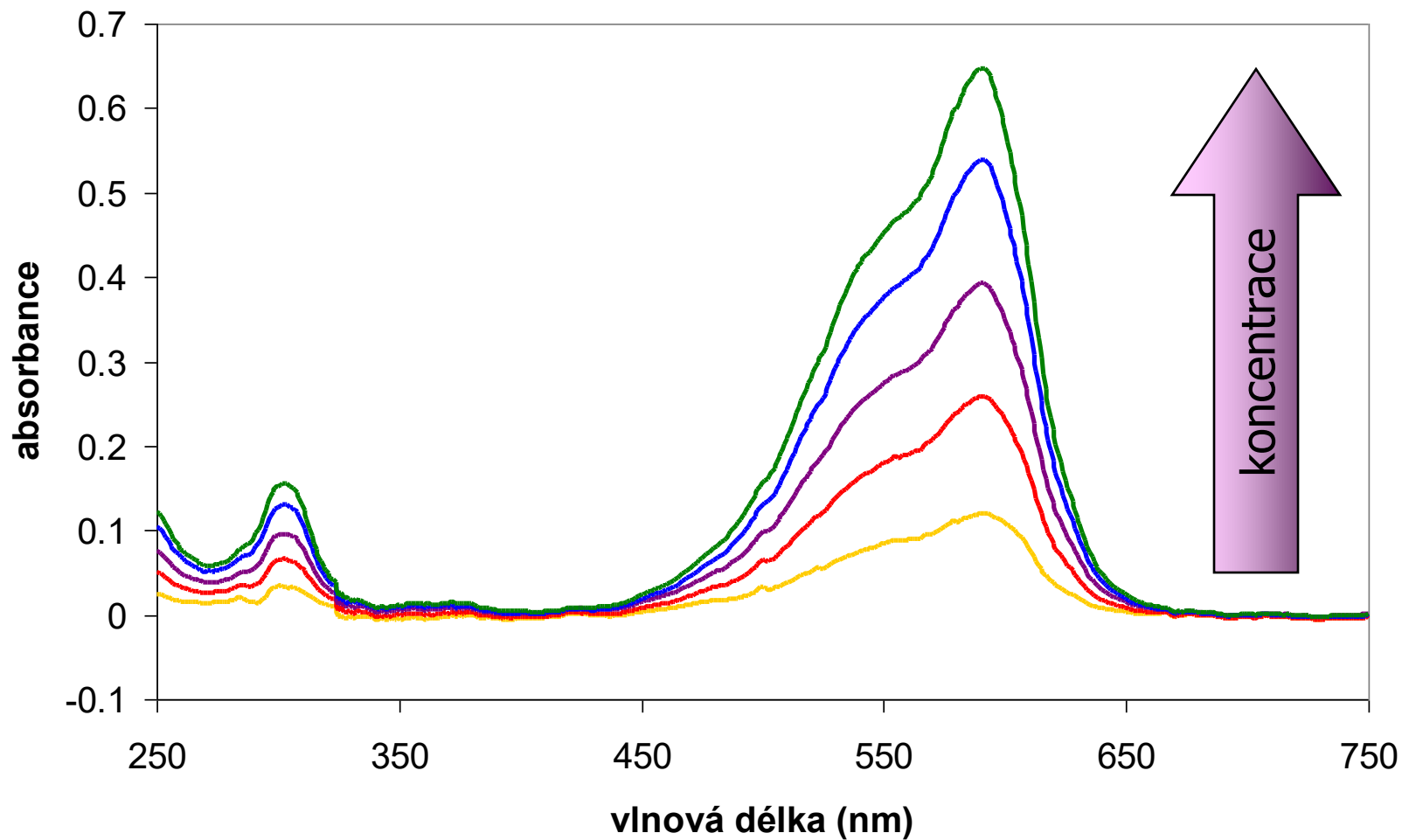
Roztok KMnO_4

- roztok KMnO_4 je červenofialový
- odstín fialové závisí na koncentraci

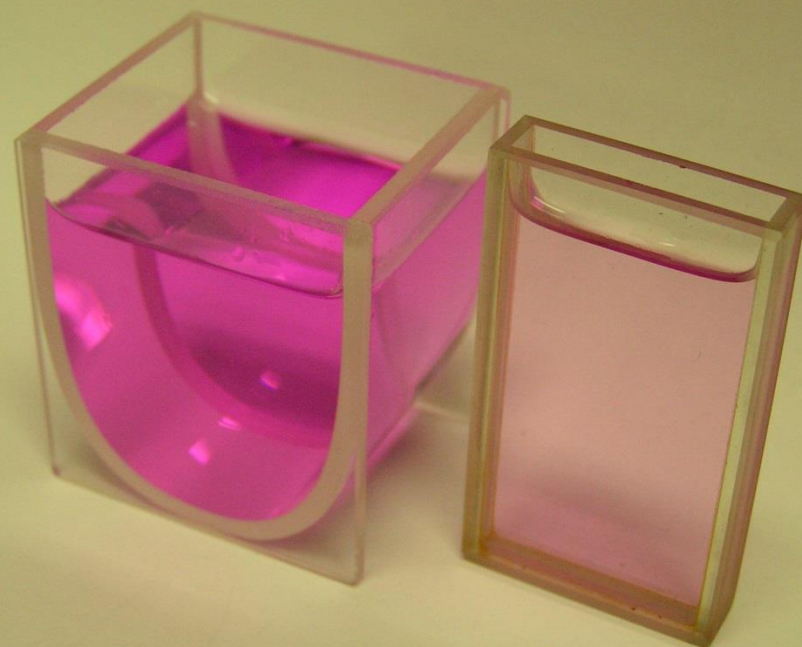
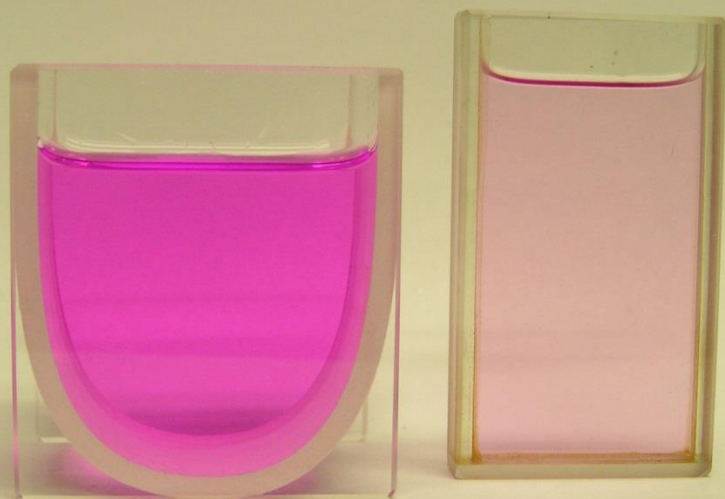


s rostoucí koncentrací c roste intenzita zbarvení,
tedy roste i absorbance A

Spektrum krystalové violeti

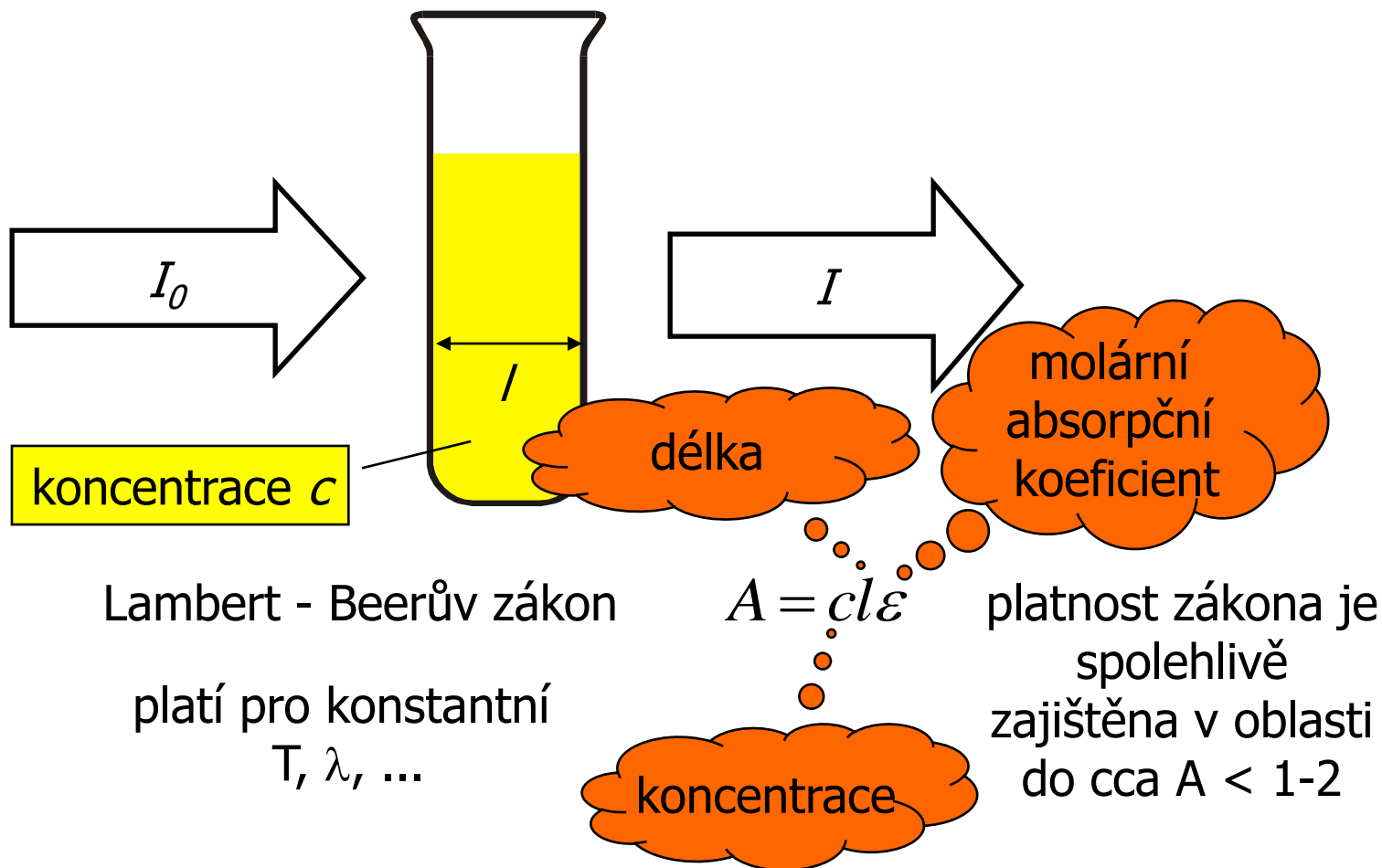


Vliv délky optické dráhy



S rostoucí délkou optické dráhy paprsku, tedy s širší kyvetou, roste i absorbance

Lambert-Beerův zákon



Lambert – Beerův zákon

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

- s rostoucí koncentrací c , A roste
- s rostoucí délkou vzorku l , A roste
- ε je charakteristikou látky – konstanta (pro danou λ)
 c se udává v mol/dm³, l se udává v cm

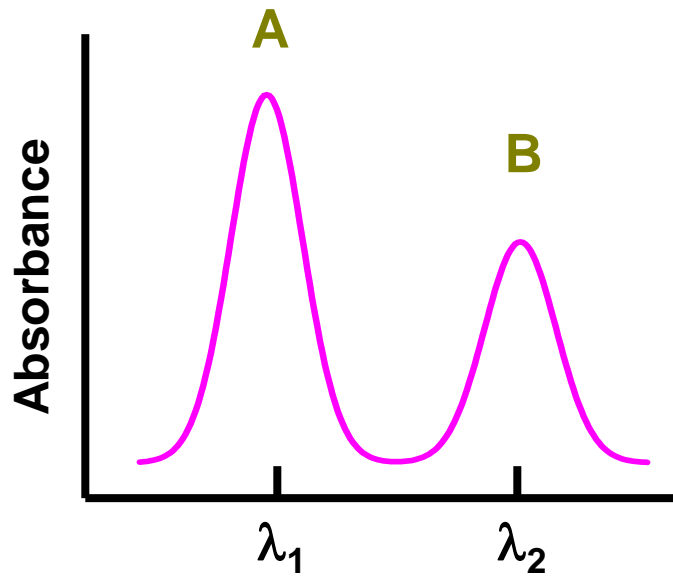
Vícesložkový systém

- za přítomnosti více složek platí

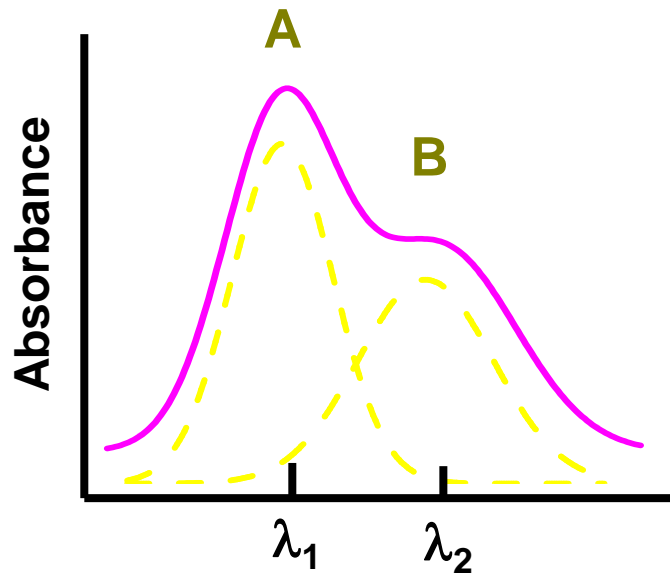
$$A = l \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i$$

- výsledná absorbance je součtem příspěvků všech složek v systému

Směsi

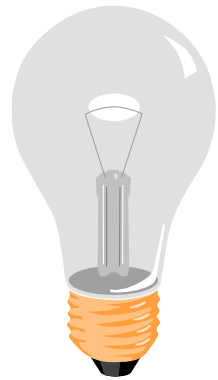


bez překrytí pásů

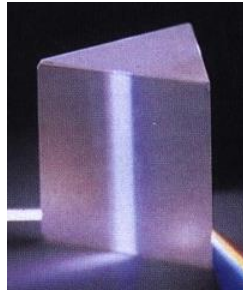


s překrytím pásů

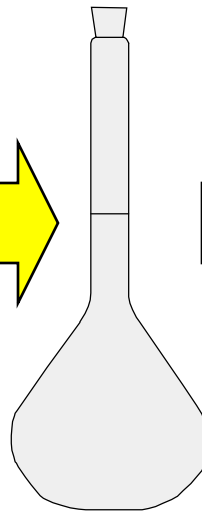
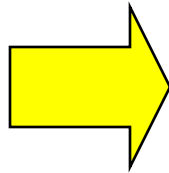
Schéma spektrometru



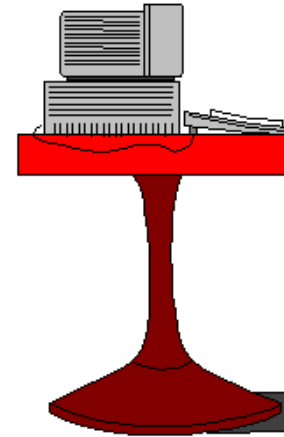
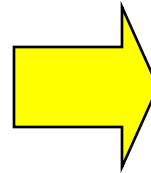
zdroj



hranol



vzorek



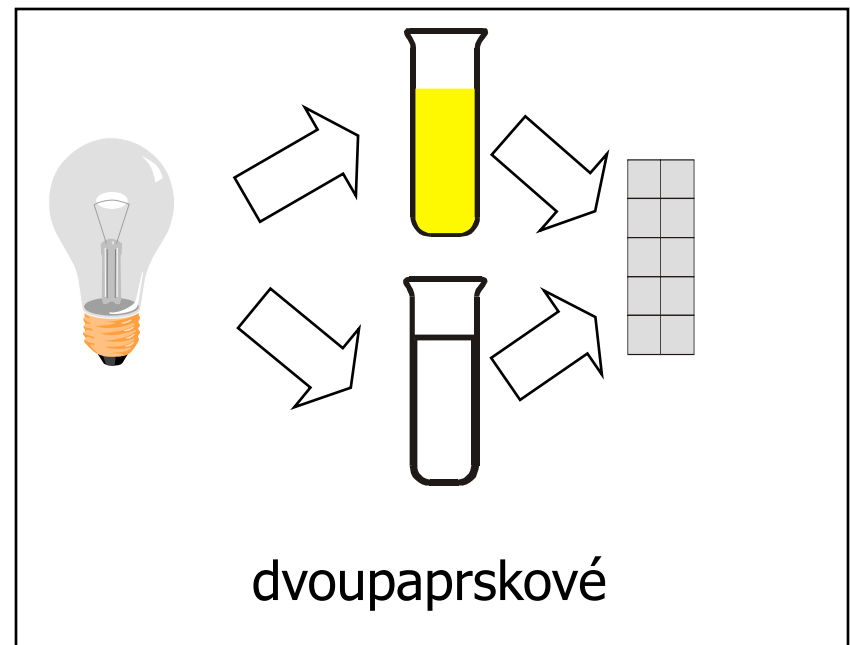
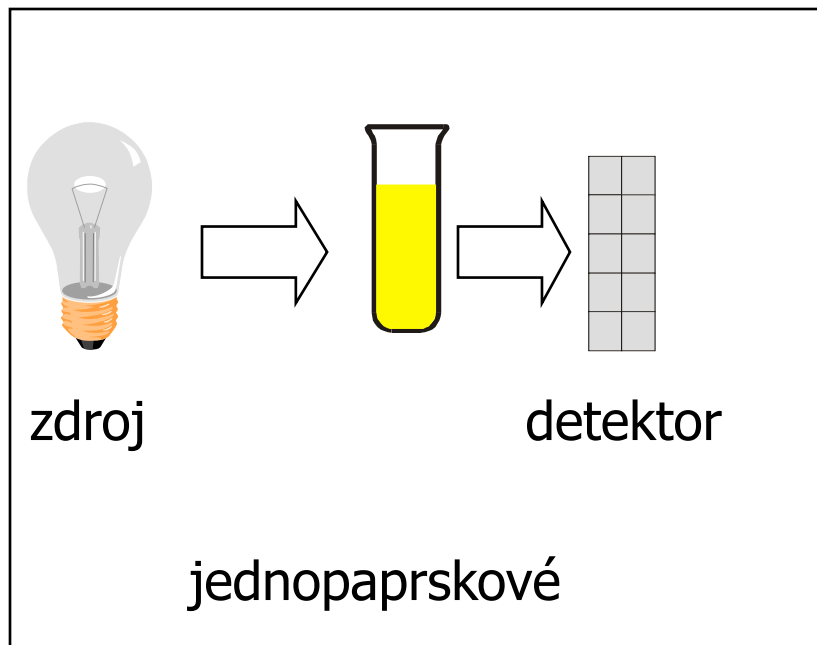
detektor



obsluha

Experimentální měření

- měří se intenzita světla I_0 a I
- za konstantní délky kyvety / (1 cm)
- uspořádání



Experimentální uspořádání



□ jednopaprskové

- nutno měřit 2x
 - 1 měření slepý vzorek (blank)
 - 2 měření zkoumaná látka

□ dvoupaprskové

- měří se přímo proti slepému vzorku

Experimentální měření



☐ zdroje

- pro UV oblast - deuterové lampy
- pro VIS oblast - halogenové, kryptonové lampy

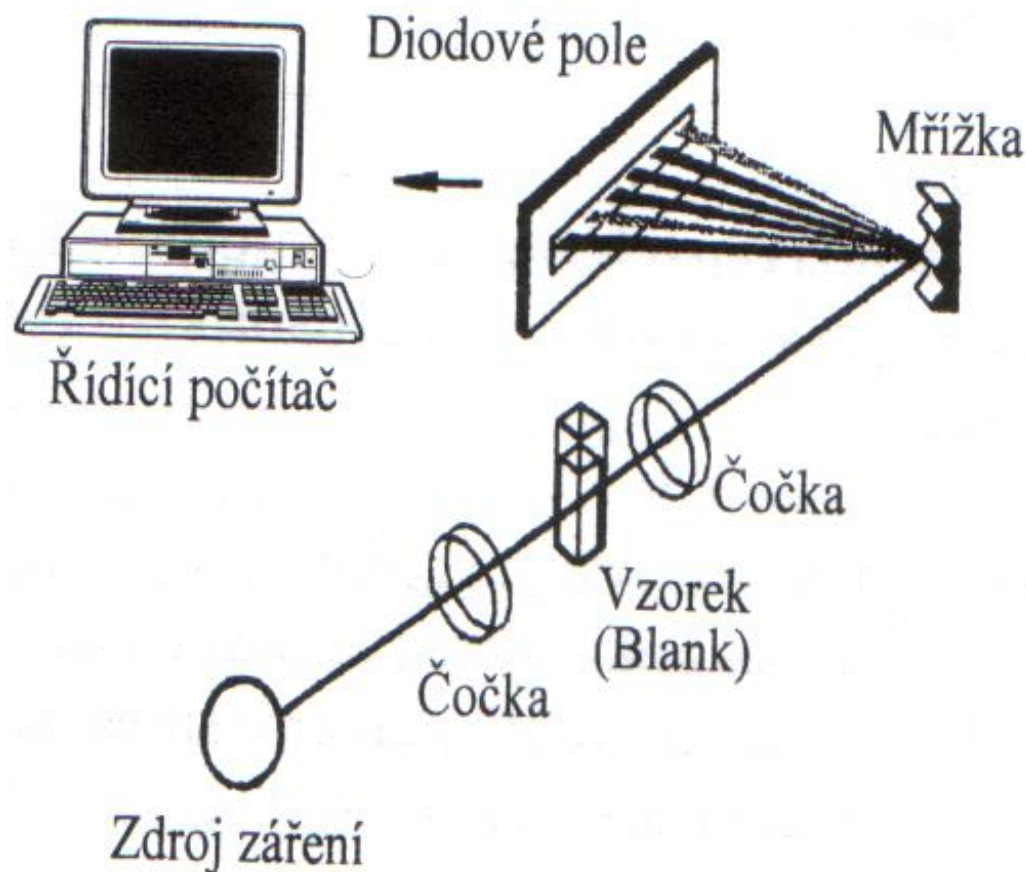
☐ kyvety

- pro UV oblast - křemenné sklo
- pro VIS oblast - sklo, plasty

☐ detektory

- diode array vs. mřížka + detektor

Schema diode-array spektrofotometru



Charakteristiky přístrojů

- rozsah (např. 200 - 1100 nm)
- přesnost (např. 2 nm)
- čas na sejmutí spektra (např. 1 s.)
- příslušenství - zásobník na více kyvet, směšovací nástavec atp.
- programové vybavení

Přístroje na měření



□ spektrometry

- měření pouze za jedné vlnové délky
- snímání spekter

□ kolorimetry

- zjednodušený spektrometr
- zejména pro terénní praxi

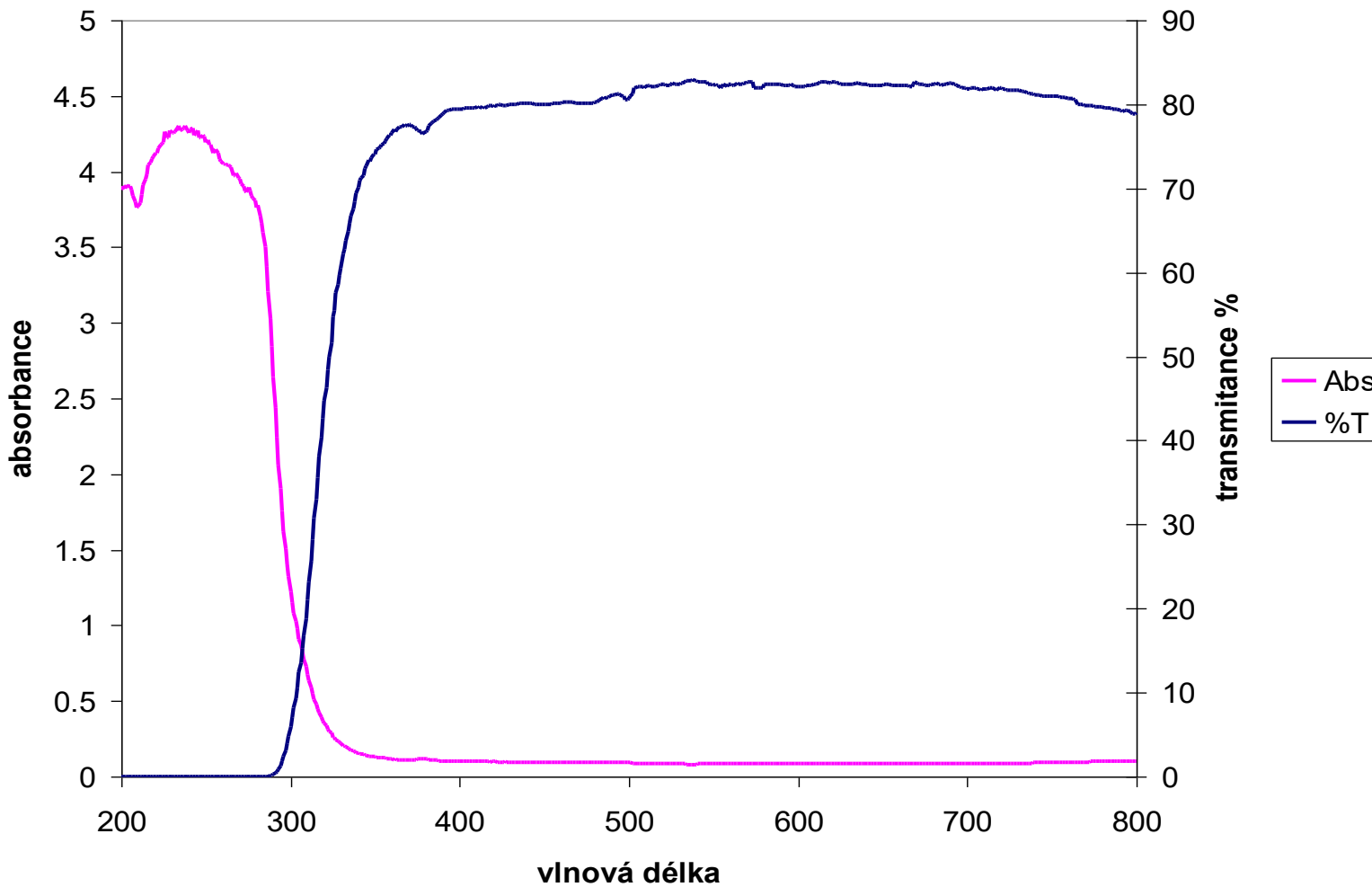
UV spektroskopie



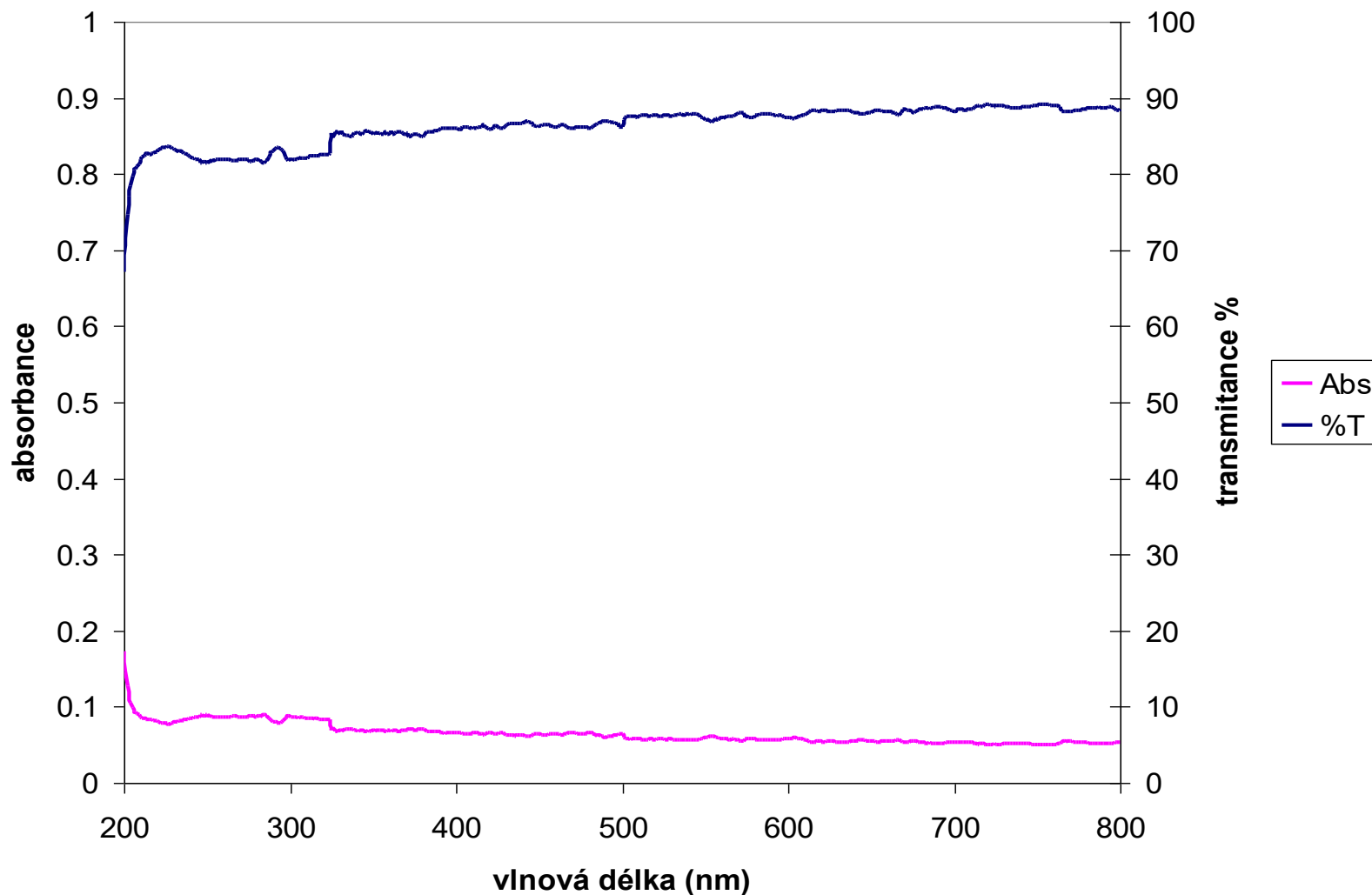
- sklo a plasty absorbují $< \sim 300$ nm
 - používají se křemenné kyvety

- vzduch absorbuje < 200 nm
 - nutná evakuace aparatur
 - oblast 10 - 200 nm - vakuová UV oblast

Spektrum skla



Spektrum křemenné kyvety



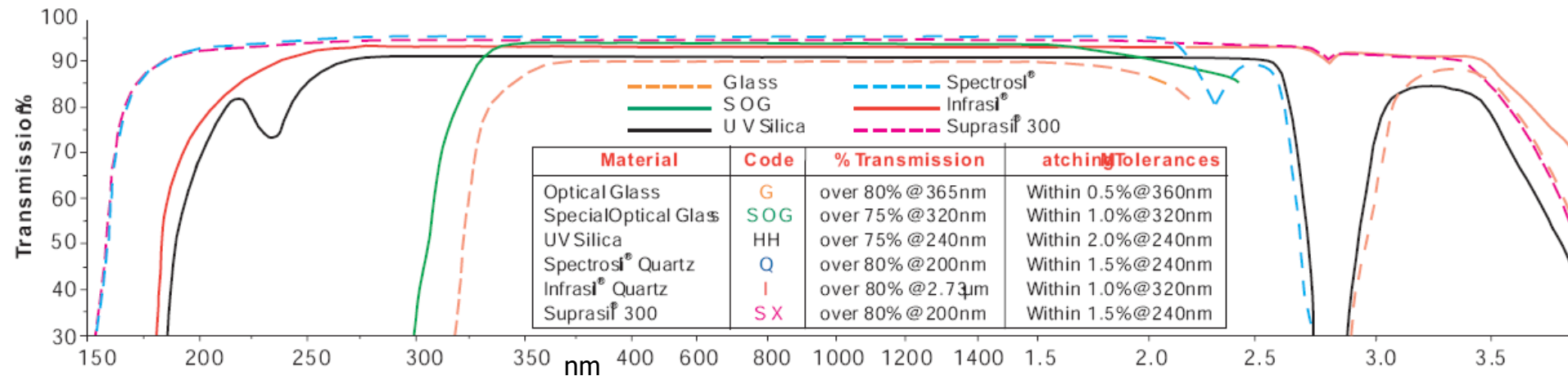
Kyvety pro UV/VIS



ukázky kyvet pro UV/VIS spektroskopii

vlastnosti komerčních materiálů pro výrobu kyvet

Window material transmission properties

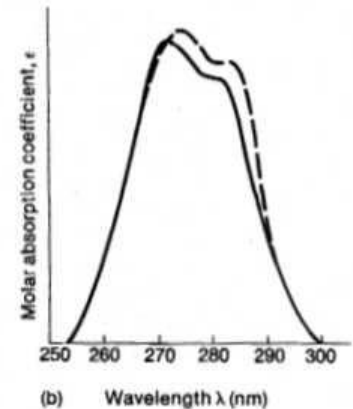
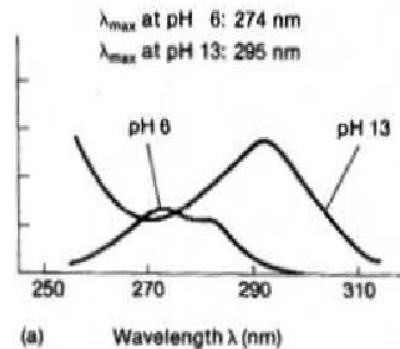
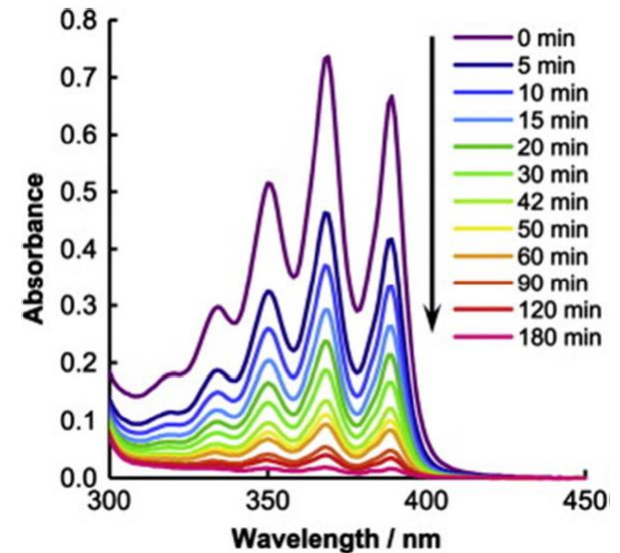


Registered Trade Marks INFRASIL[®] & SUPRASIL300[®] Heraeus Quarzglas GmbH, Hanau / Main, Germany
SPECTROSIL[®] Thermal Syndicate, England. PYREX[®] Corning Glass Works, U.S.A

The above information illustrates the approximate transmission ranges of the guaranteed materials used in the production of Starna cells. The traces are for a thickness of 5 mm, which is approximately double the total thickness of the windows that are used in the construction of most cells.

Využití

- detekce a stanovení
- kinetická měření
- stanovení pK_a
- stabilita látek
- vliv prostředí



Detekce pomocí UV-VIS



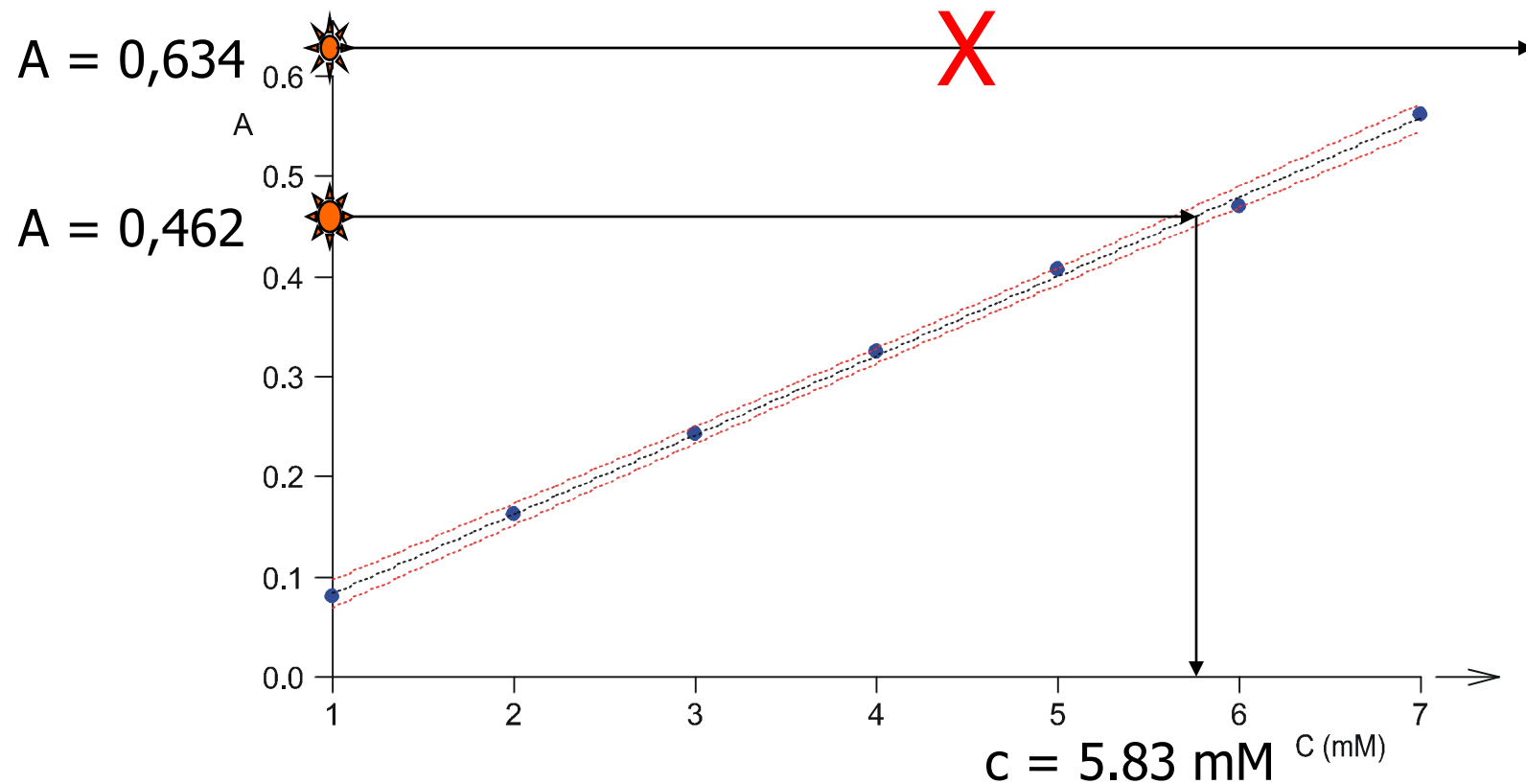
- řada látek má **charakteristické spektrum**
- obvykle však bývají ve vzorcích směsi látek a jednoznačná identifikace se stává nemožnou

Stanovení látky

☐ kalibrační přímka

- proměří se A pro několik hodnot c

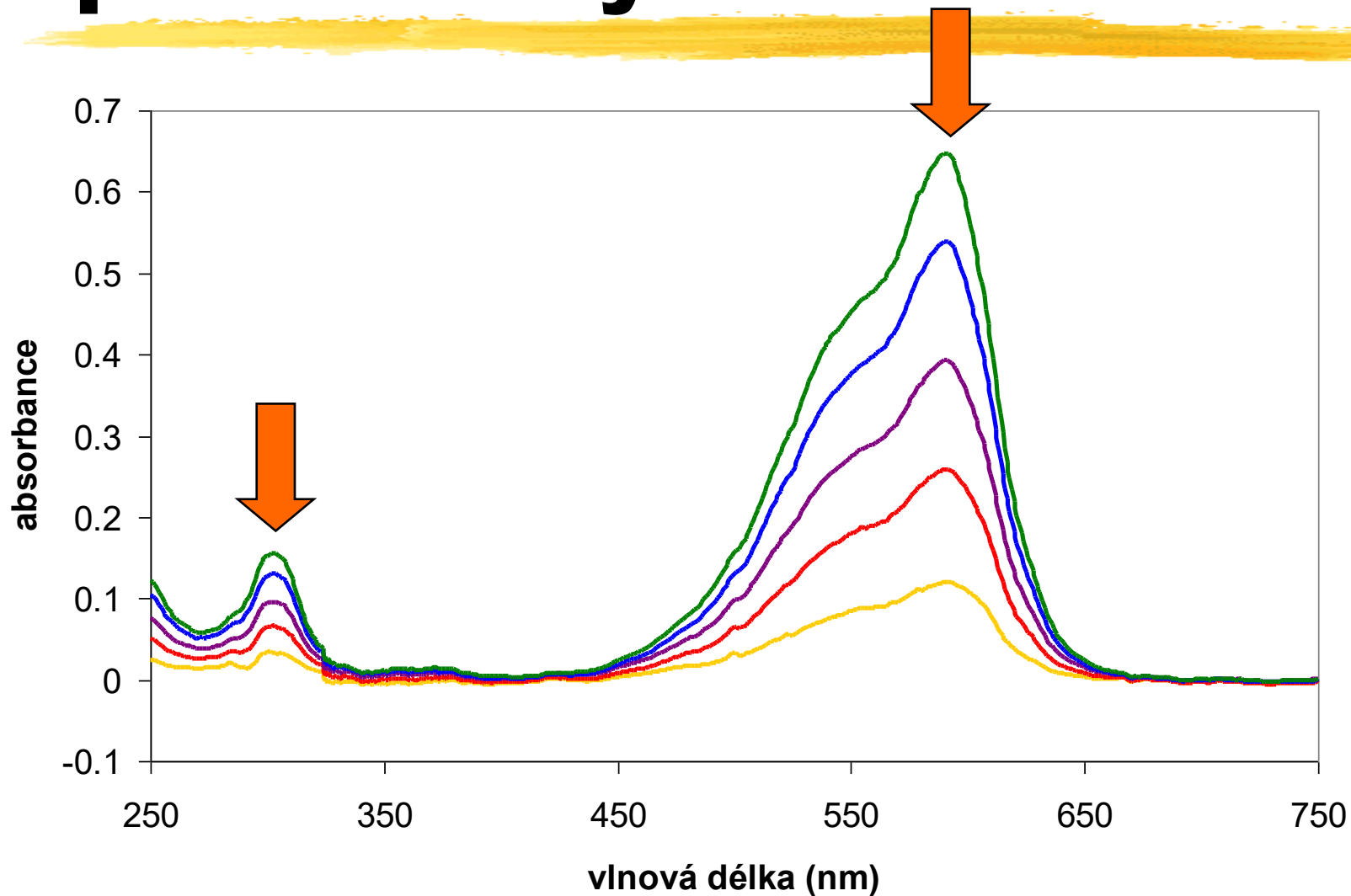
☐ ze změřené A se odečte c



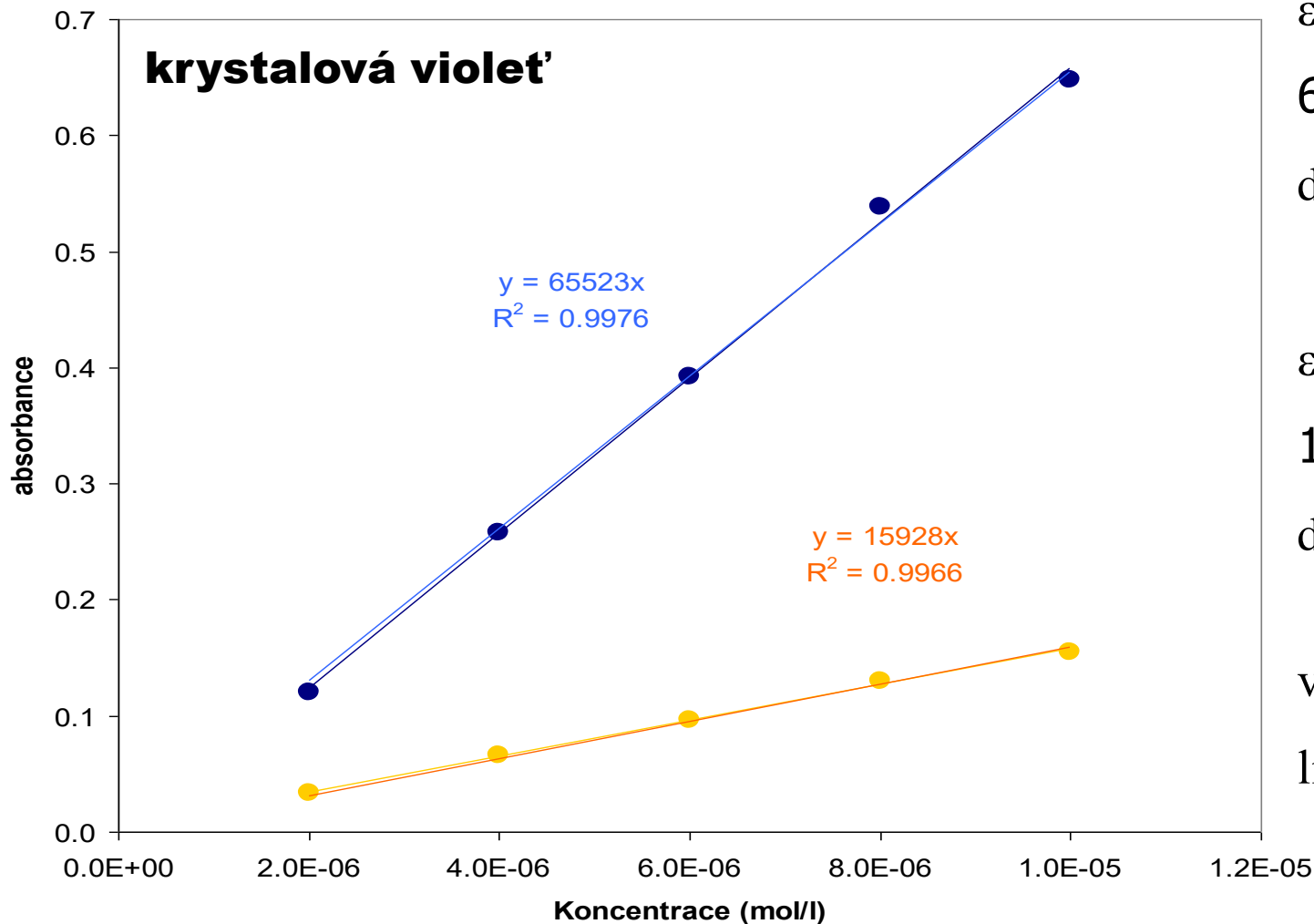
Stanovení ϵ

- sestrojí se kalibrační přímka $A = kc$
- jelikož $A = \epsilon cl$, $l = \text{konst.} = 1 \text{ cm}$
- směrnice k je rovna ϵ
- $[\epsilon] = \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Spektrum krystalové violeti



Lambert-Beerův zákon



$\epsilon(591\text{nm})$

65523

$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\epsilon(303\text{nm})$

15928

$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

vypočteno

lineární regresí

Směs Tyrosin a Tryptofan

A = Tyrosin (Tyr)

B = Tryptofan (Trp)

$\lambda_1 = 240 \text{ nm}$

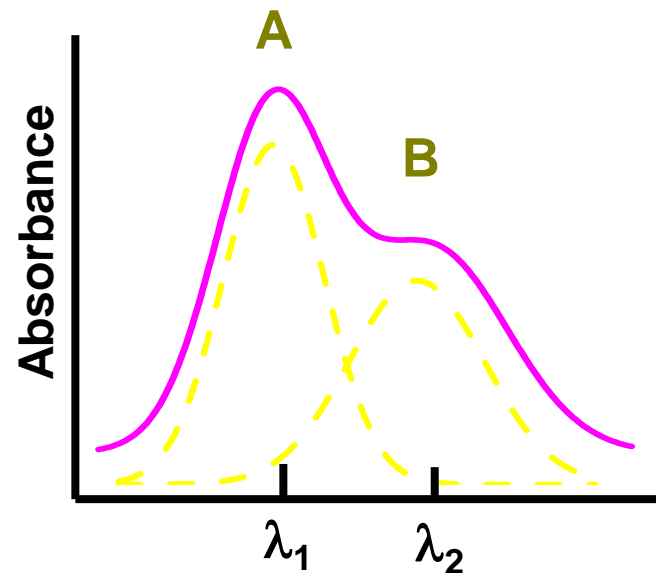
$\lambda_2 = 280 \text{ nm}$

$\epsilon_{240}(\text{Tyr}) = 11,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1,500$

$\epsilon_{240}(\text{Trp}) = 1,950$

$\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5,380$

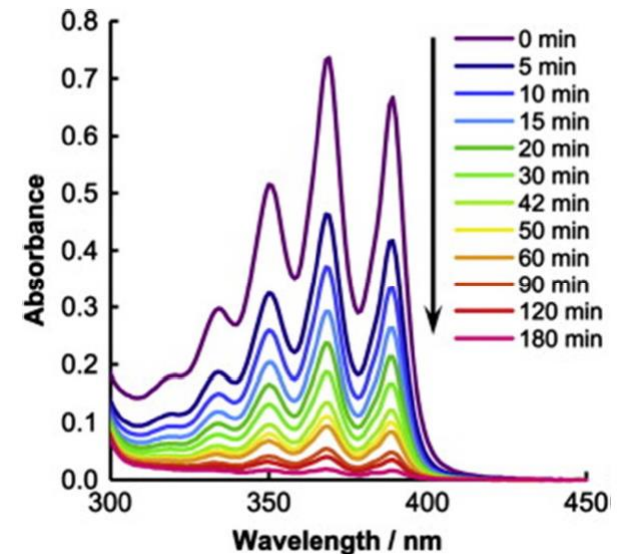


$$A_{240} = [\epsilon_{240}(\text{Tyr}) \cdot c(\text{Tyr}) + \epsilon_{240}(\text{Trp}) \cdot c(\text{Trp})] \cdot L$$

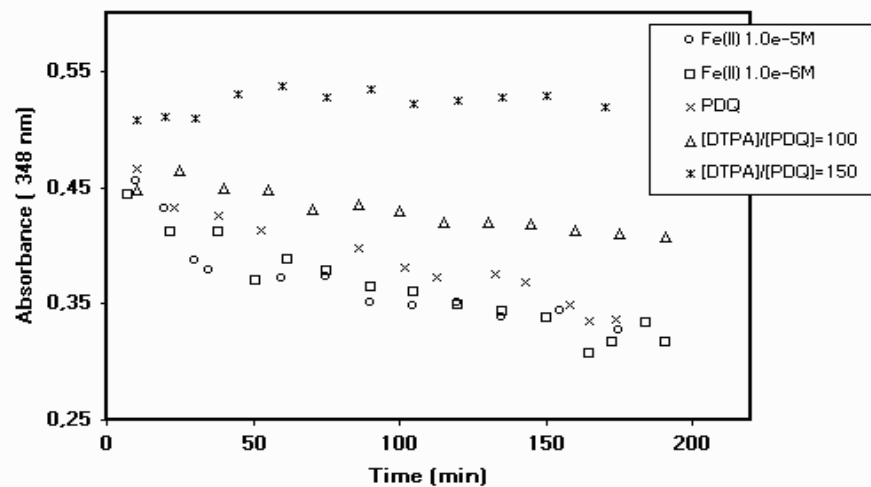
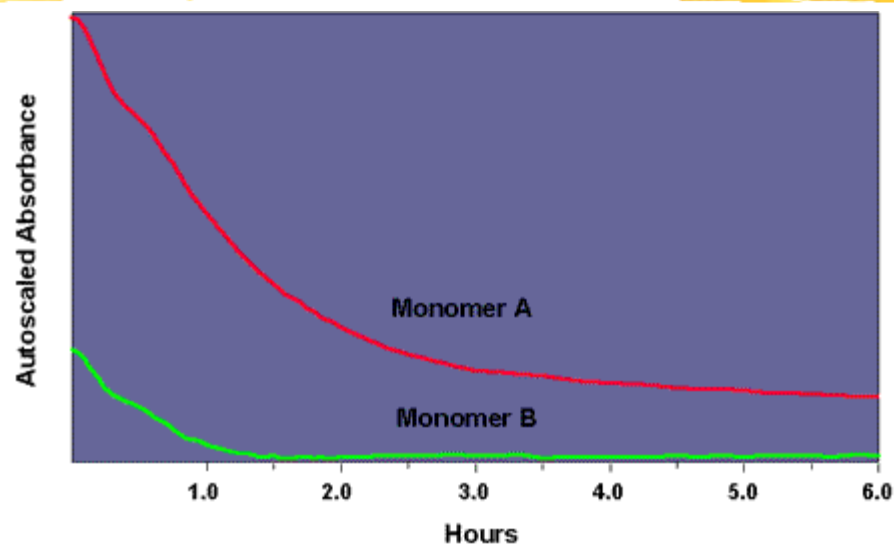
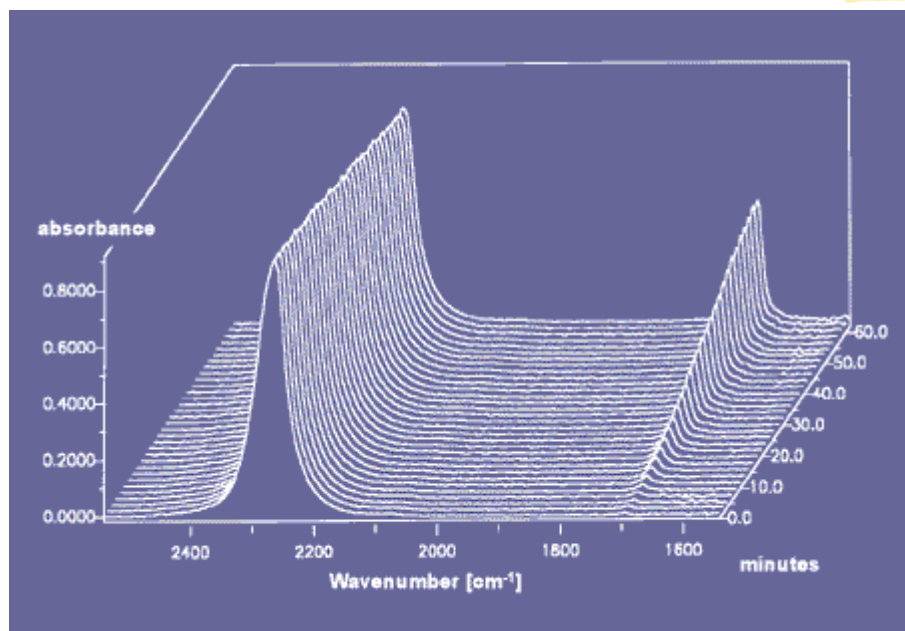
$$A_{280} = [\epsilon_{280}(\text{Tyr}) \cdot c(\text{Tyr}) + \epsilon_{280}(\text{Trp}) \cdot c(\text{Trp})] \cdot L$$

Kinetická měření

- měří se změna A v závislosti na čase
 - snímá se celé spektrum
 - měří se za konstantní λ



Kinetické křivky



Kinetická měření

- měří se reakce s $T_{1/2} > 1 \text{ s}$
- pro rychlejší reakce je nutné
 - použít směšovací nástavec
 - použít techniku stop-flow
 - kinetickou laserovou spektroskopií

Stanovení pK_a

- měří se A v závislosti na pH
- $HB + H_2O \rightleftharpoons B^- + H_3O^+$

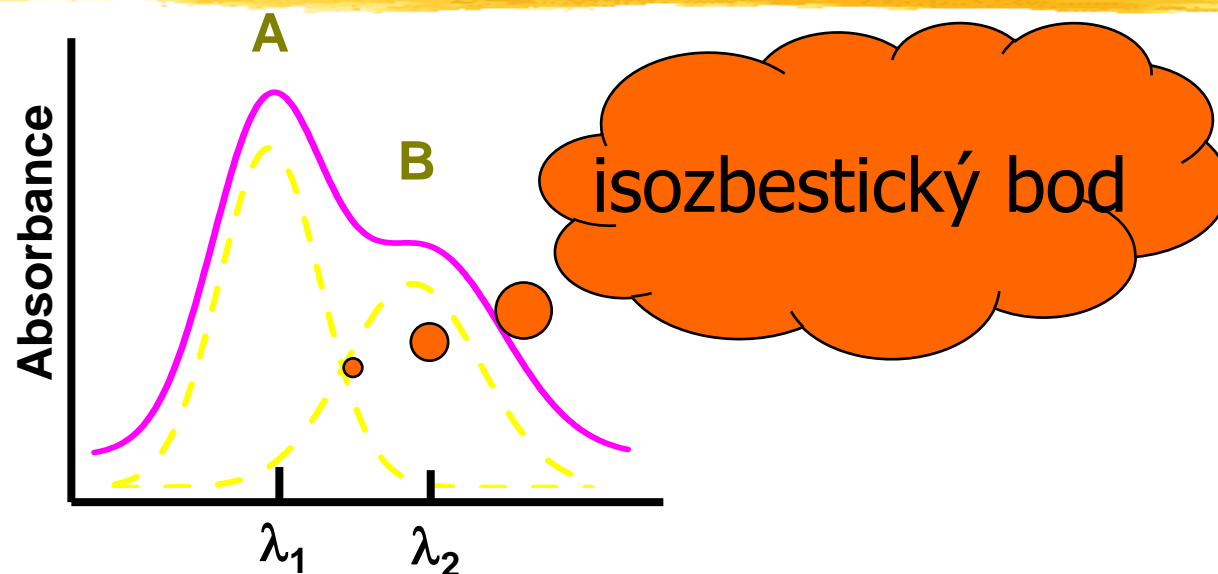
$$K_a = \frac{a_{H_3O^+} a_{B^-}}{a_{HB}}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{a_{HB}}{a_{B^-}}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{A_{B^-} - A}{A - A_{HB}}$$

$$\frac{a_{HB}}{a_{B^-}} = \frac{A_{B^-} - A}{A - A_{HB}}$$

Isozbestický bod



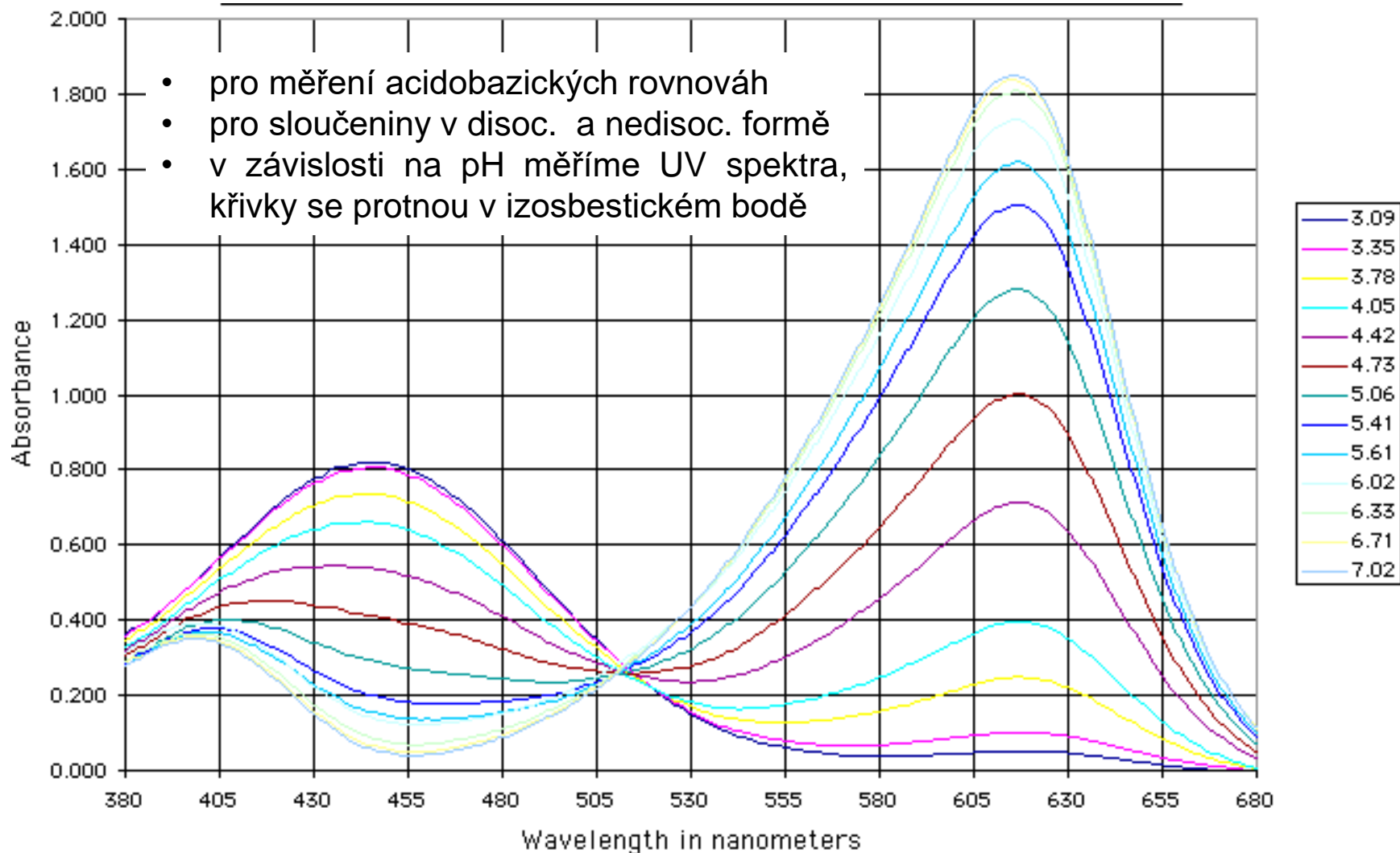
Jestliže při určité vlnové délce jsou molární absorpční koeficienty dvou látek rovny, tato vlnová délka se označuje jako **isozbestický bod**.

V isozbestickém bodě lze snadno vypočítat celkovou koncentraci obou látek:

$$\varepsilon_A = \varepsilon_B = \varepsilon \quad \longrightarrow \quad A = \varepsilon_A c_A L + \varepsilon_B c_B L = \varepsilon \cdot L \cdot [c_A + c_B]$$

Izosbestický bod

bromkresolová zeleň

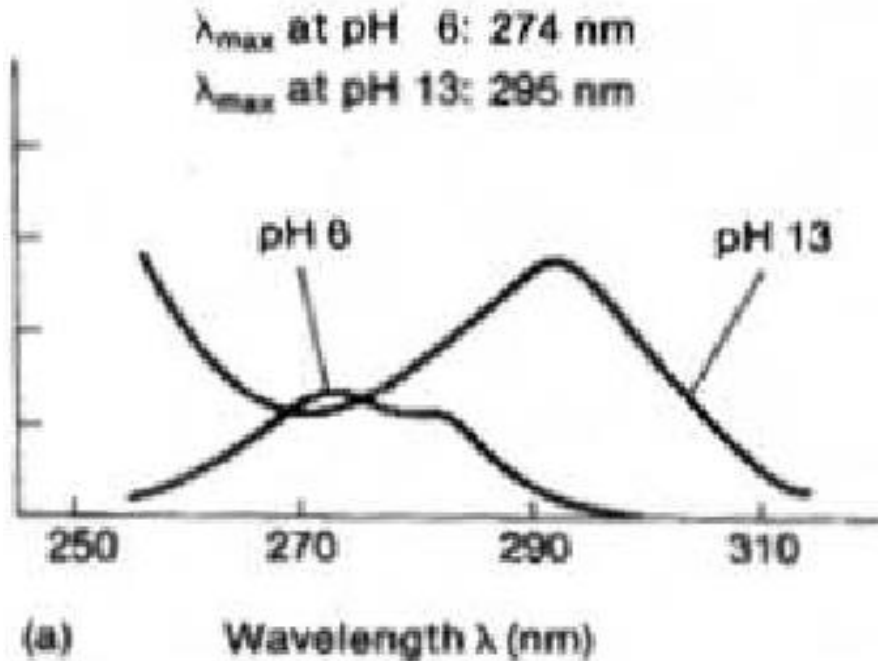


Vliv prostředí

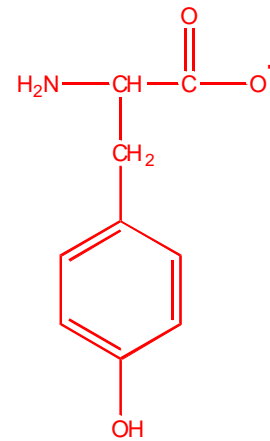


- pH
- polarita prostředí
 - přítomnost tenzidu

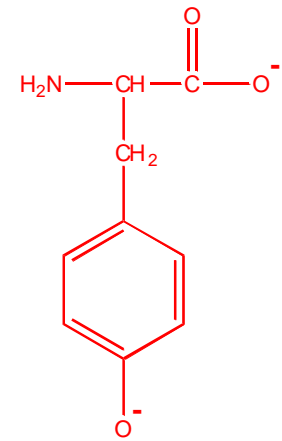
Vliv pH



pH = 6



pH = 13



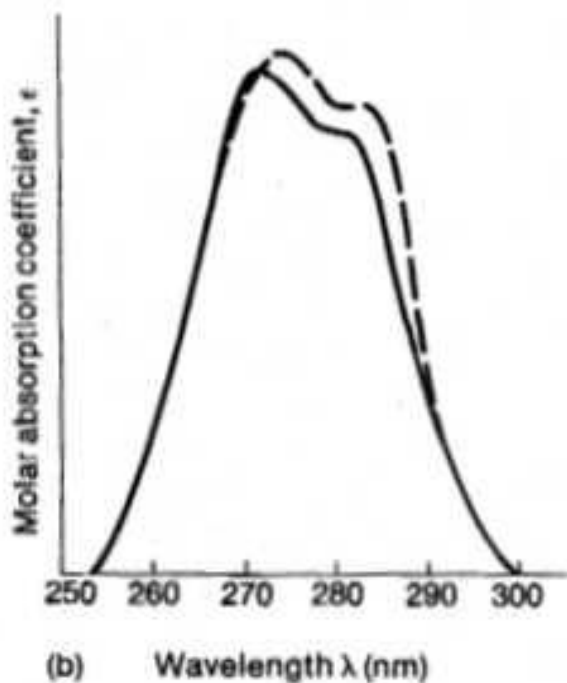
$pK_a(\text{OH}) = 10.1$

Spektrum tyrosinu

s rostoucím pH dochází k posunu abs. maxima λ_{\max} k **delším vl. délkám** a růstu absorbance v důsledku deprotonace fenolické OH skupiny

Vliv solventu

spektrum tyrosinu



— Solvent = H₂O

- - - Solvent = 20% Ethylene Glycol /
80% H₂O

v méně polárním prostředí se λ_{\max} posouvá k delším vlnovým délkám - **batochromní posun (červený posun)**

solvatace ovlivňuje rozložení energetických hladin základního a excitovaného stavu

absorpční spektrum může ovlivnit i přítomnost povrchově-aktivních látek!

- Při rozpouštění se může měnit elektronová struktura rozpouštěné látky, což se projeví posunem λ_{\max}
- Podstatný vliv polarity rozpouštědla a tvorba vodíkových vazeb
- Polarita ovlivňuje absorpci chromoforů C-C a C≡C
- V polárnějších rozpouštědlech se posouvají maxima ke kratší λ - **hypsochromní posun (modrý posun)**

Spektrofotometr SPECORD S600





Základní parametry:

Rozsah vlnových délek: 325–1100 nm

Šířka štěrbin: 5nm

Přesnost vln. délek: ± 2 nm

Opakovatelnost vln. délek: $< \pm 1$ nm

Fotometrický rozsah: -3A až +3A

Fotometrická přesnost: ± 0.002 A (0–0,3A)

Fotometrická opakovatelnost: ± 0.002 A

Šum: ≤ 0.001 při 0 A; ≤ 0.001 A při 1 A; ≤ 0.002 A při 2 A

Stabilita: $< 0,002$ A/h

rychlost skenování: až 1200 nm/min

Datové rozlišení: 1 nm

Číslo dokladu: LKra.N 17-028
Referent: Lucie Krajcarová

Datum: 4.5.2017
Datum platnosti: 2.6.2017

Dodavatel:

Pragolab s.r.o.

Nad Krocínkou 55
190 00 Praha 9

IČ: 48029289, DIČ: CZ48029289
Firma zapsána u Měst. soudu v Praze
oddíl C, vložka 14590
Tel: +420 284 813 020
e-mail: pragolab@pragolab.cz
Internet: www.pragolab.cz

Platební údaje:

Způsob úhrady: Bankovním převodem
Požadovaná záloha: 0,00 Kč
Úrok: 0,5
Splatnost dní: 14

Odběratel:

**Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální
chemie**

RNDr. Eva Otyepková, Ph.D.
17. listopadu 12
771 46 Olomouc

IČ: 61989592, DIČ: CZ61989592
Tel: +420 585 634 425
e-mail: eva.otyepkova@upol.cz

Obchodní údaje:

Doprava:

Vis spektrofotometr Genesys 30 (Thermo Scientific) s možností skenování celého spektra a zobrazením na displeji

Popis	Číslo	Množství	Cena za jedn.	Cena bez DPH	DPH	Cena celkem
GENESYS 30 Vis with EU Power Cable	840-277300	1 Ks	79 300,00	79 300,00	21%	95 953,00
Instalace a zaškolení		1 Ks	5 400,00	5 400,00	21%	6 534,00
Celkem:		2 mj		84 700,00		102 487,00

Záruka na zařízení je 24 měsíců od instalace, mimo dílů spotřebního charakteru.
V ceně je zahrnuto dopravné a balné.

V případě objednání uvádějte číslo této nabídky. Objednávku, prosím, zasílejte na pragolab@pragolab.cz.