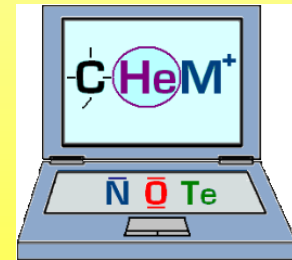


Metody spektrální

- **Metody molekulové spektroskopie**
– **UV-vis oblast**



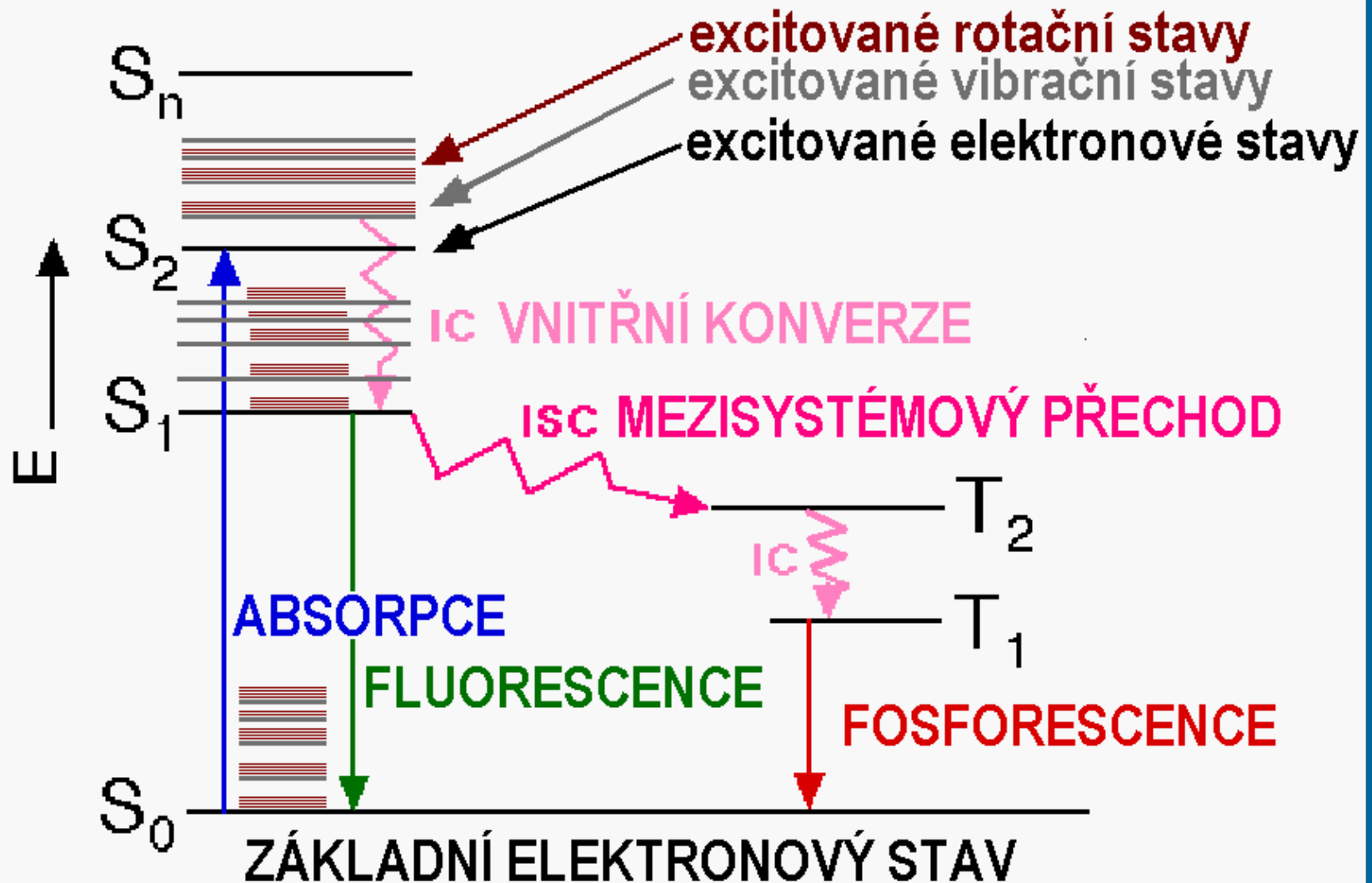
Evropský sociální fond

Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

Absorpční spektro(foto)metrie

- v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti
 - ↳ přechody mezi elektronovými stavy + ...
- v infračervené (IČ) oblasti
 - ↳ přechody mezi vibračními stavy + ...
- v mikrovlnné oblasti
 - ↳ přechody mezi rotačními stavy

Jablonskiho diagram



Absorpční spektrofotometrie

- přechody mezi elektronovými stavy

↳ $\Delta E_{el} \approx 1000 \cdot \Delta E_{vib}$

↳ *vibrační struktura elektronového spektra*

↳ *vibračně-rotační struktura*

- přechody mezi vibračními stavy

↳ $\Delta E_{vib} \approx 100\,000 \cdot \Delta E_{rot}$

↳ *rotační struktura vibračního spektra*

- přechody mezi rotačními stavy

↳ *čistě rotační spektrum*

Absorpční fotometrie

- přechody DOVOLENÉ a ZAKÁZANÉ
- změna dipolového momentu během přechodu (operátor momentu přechodu)

$$M_{nm} = e \int \Psi_n^* \sum_i Z_i \vec{r}_i \Psi_m d\tau$$

IUPAC Compendium of Chemical Terminology

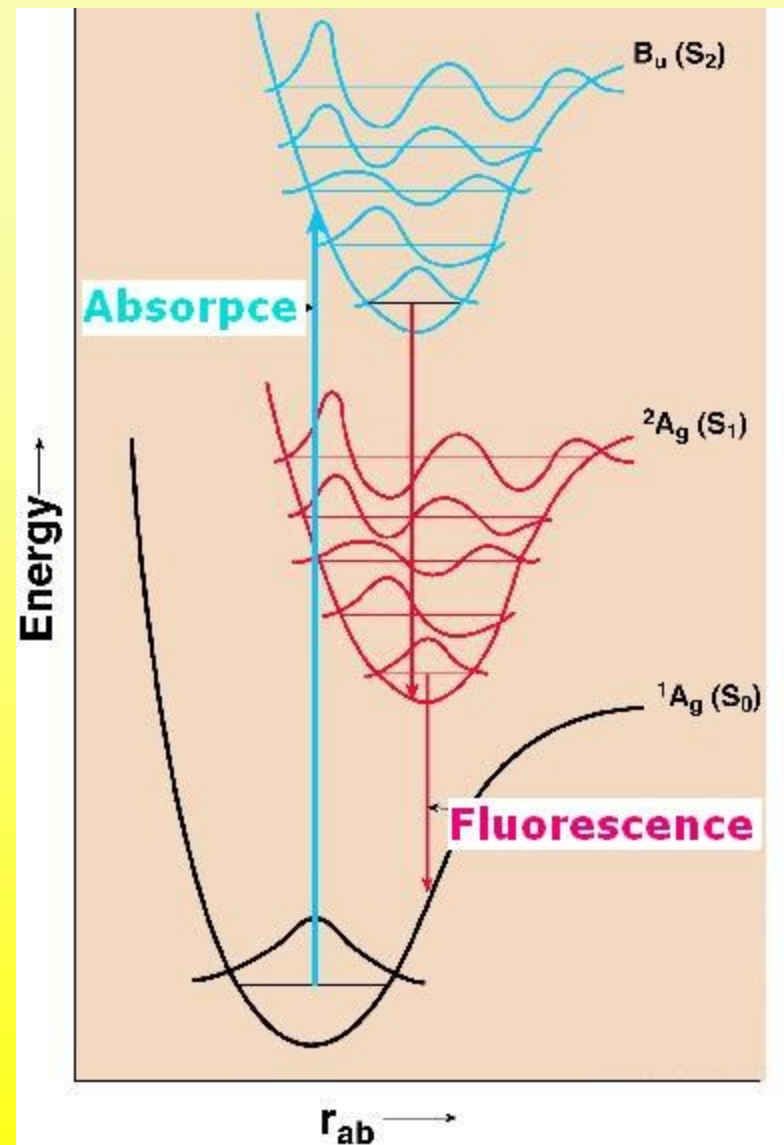
- symetrie molekuly (krystalu) (symetrie výchozího a konečného stavu)
- Born-Oppenheimerova aproximace – oddělení vlnové funkce pro elektrony a pro jádra

Absorpční fotometrie

- rychlost změny stavu
 - nejrychlejší pro elektronové přechody

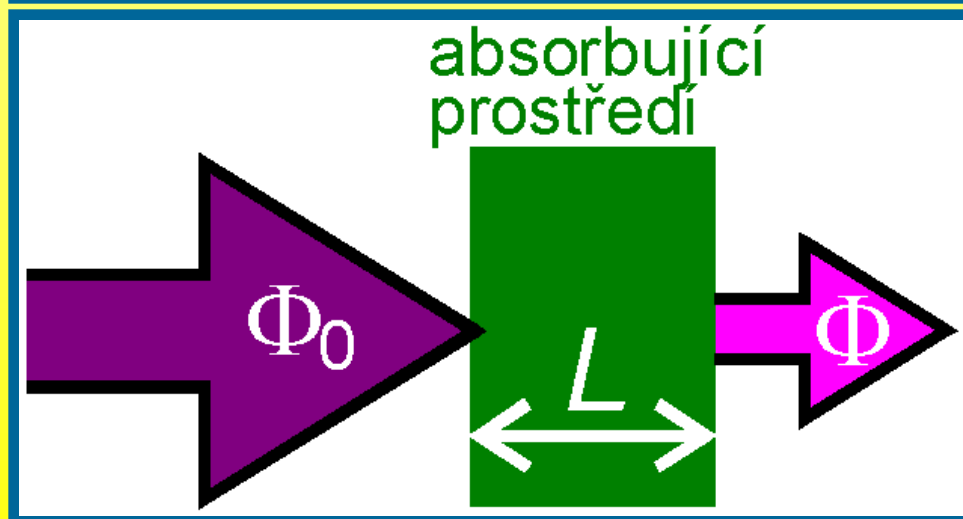
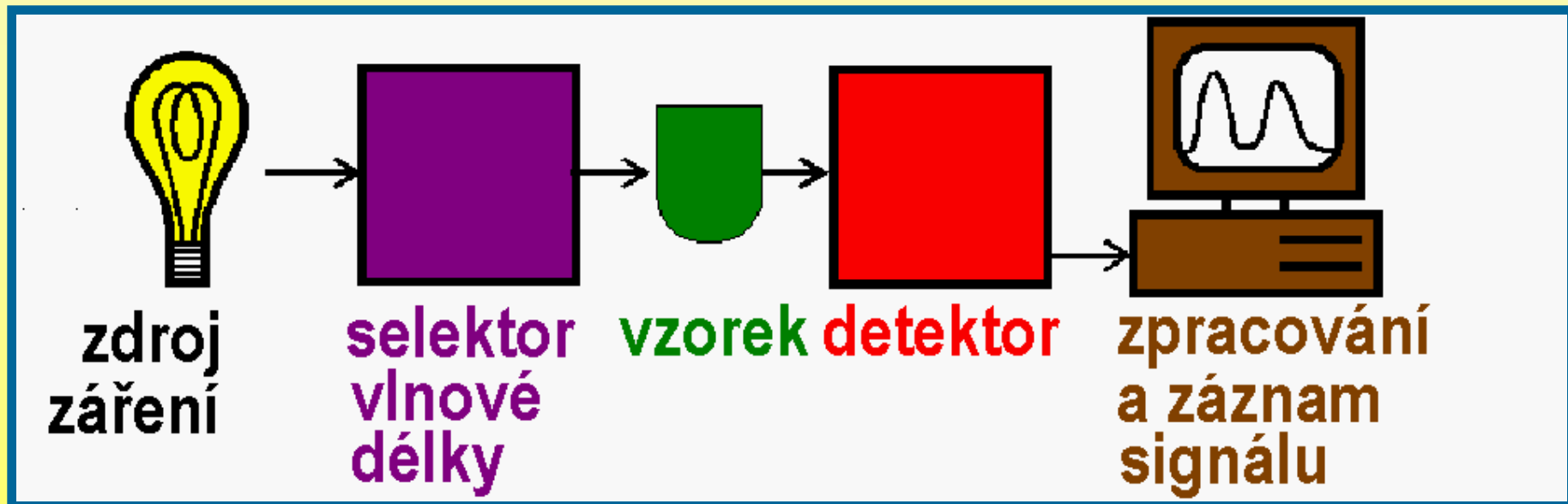
↳ během elektronového přechodu se nezmění geometrie molekuly

Frank-Condonův princip



Absorpční fotometrie

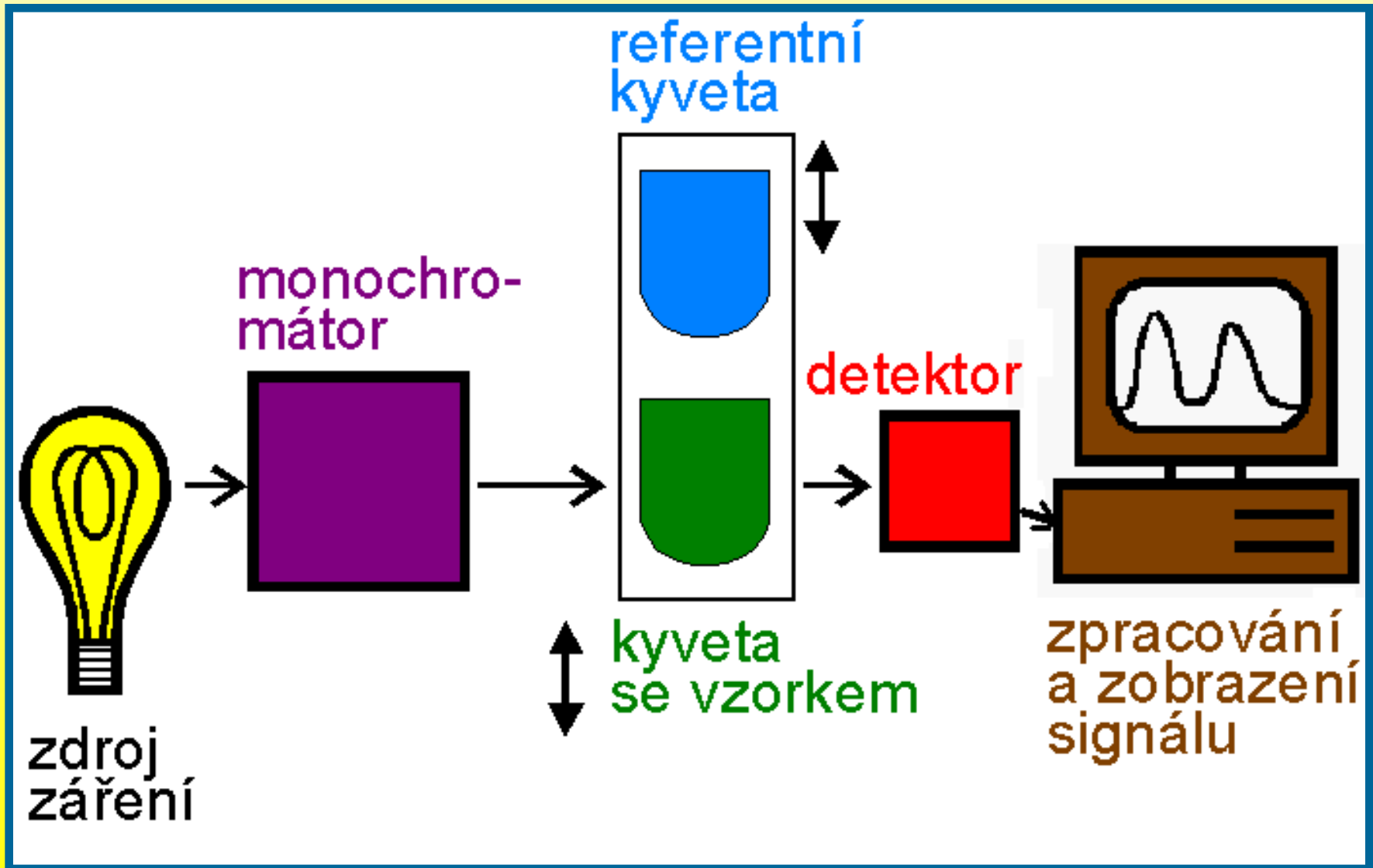
- základní obecné schéma instrumentace



$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

Absorpční fotometrie

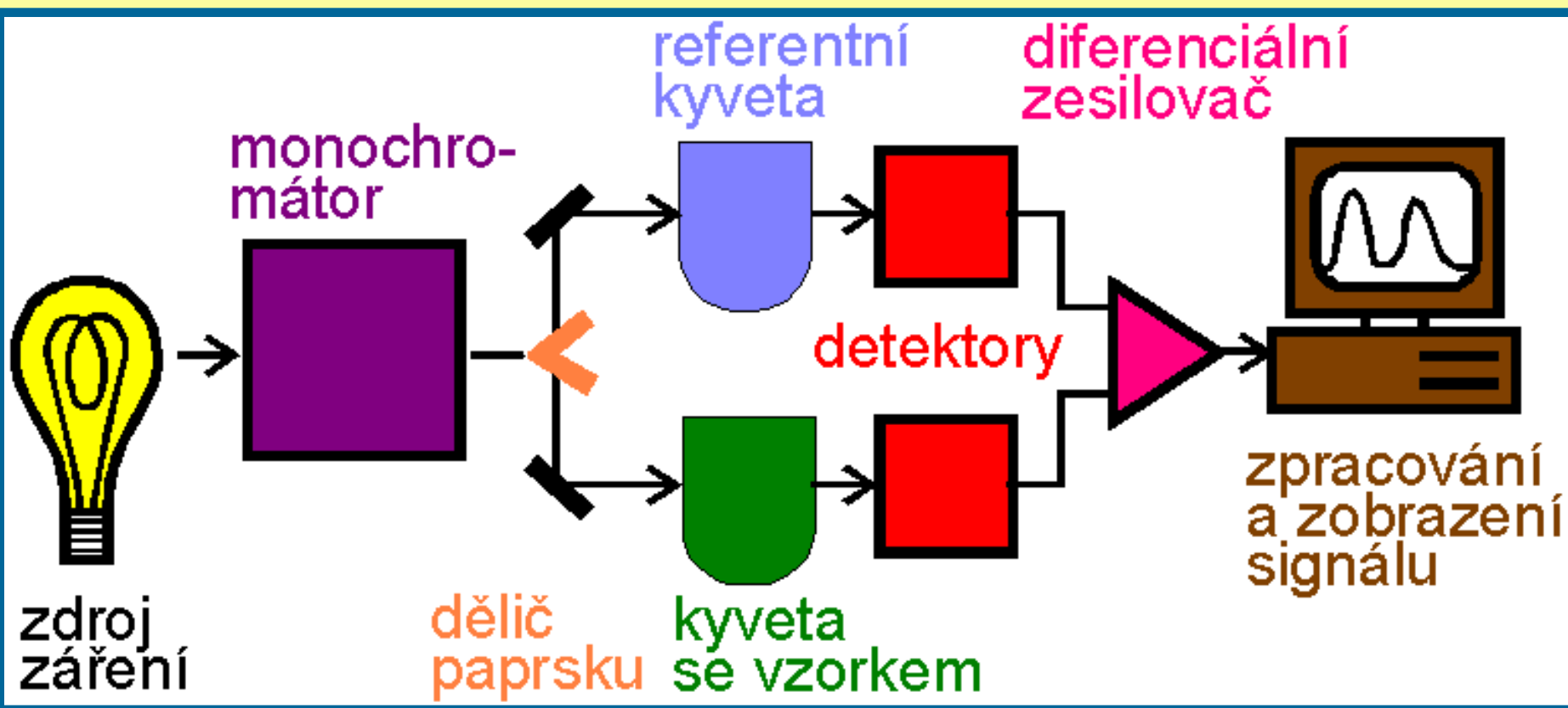
- jednopaprsková instrumentace



Absorpční fotometrie

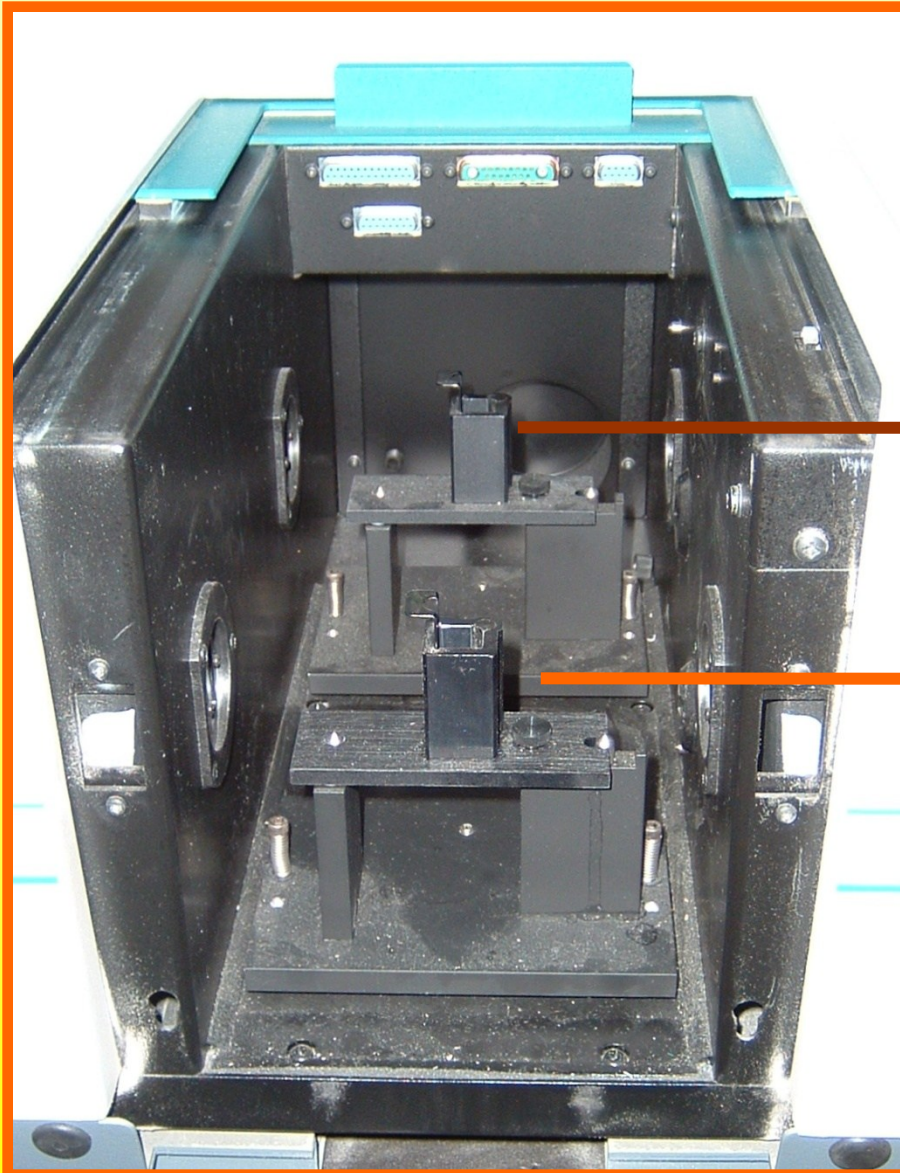
- dvoupaprsková instrumentace

„v prostoru“



MOLEKULOVÁ absorpční/reflexní spektrometrie

- VIDITELNÁ a UV oblast



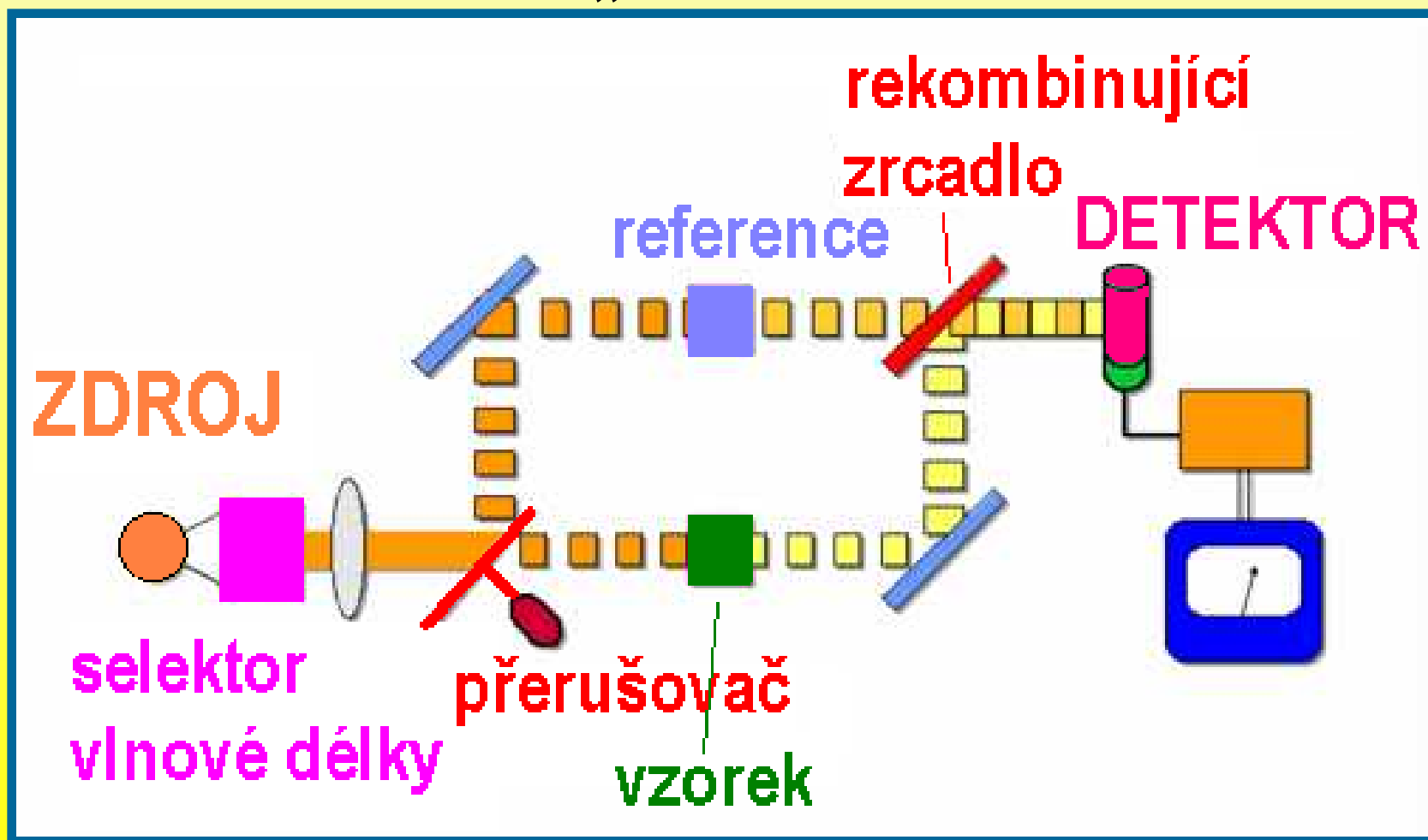
**SROVNÁVACÍ
PAPRSEK**

**MĚRNÝ
PAPRSEK**

Absorpční fotometrie

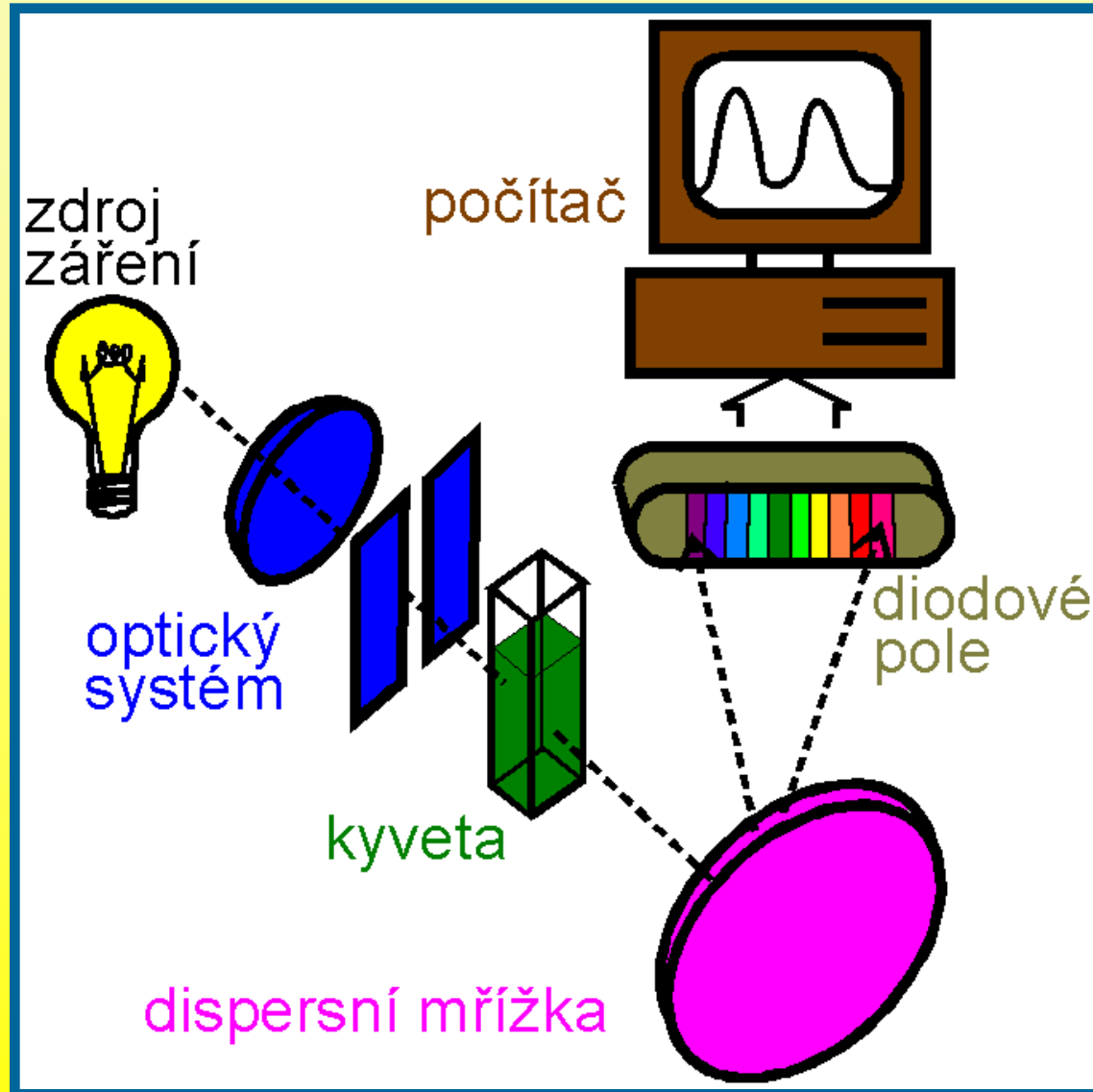
- dvouprusková instrumentace

„v čase“



Absorpční fotometrie

- mnohakanálová detekce



Absorpční fotometrie

- základní veličiny

PROPUSTNOST

$$T_{\lambda} = \frac{\Phi_{\lambda}}{\Phi_{\lambda 0}}$$

ABSORBANCE

$$A_{\lambda} = -\log T_{\lambda}$$

MOLÁRNÍ
ABSORPČNÍ
KOEFCIENT

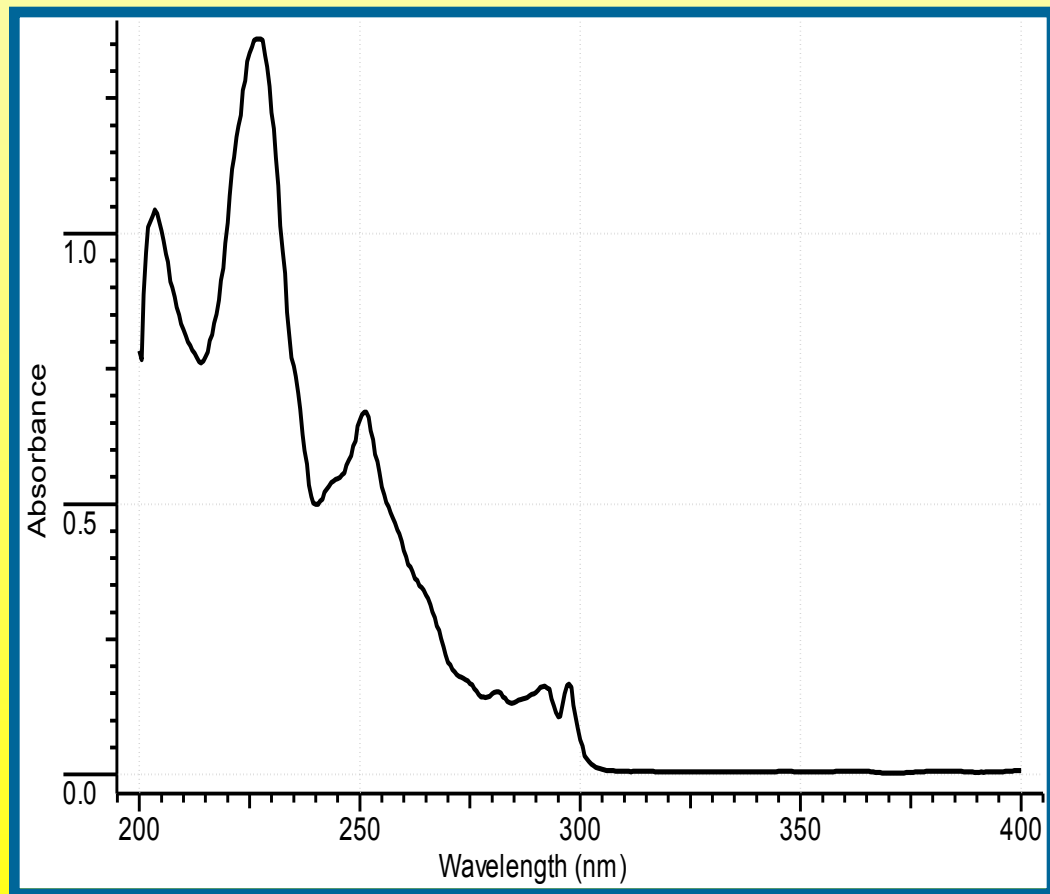
$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} b c$$



Absorpční fotometrie

SPEKTRA

- závislost T , A nebo ϵ na - vlnové délce λ



- vlnočtu

- frekvenci

- energii fotonů

MOLEKULOVÁ SPEKTRA

- pásy

- oddělené

- překrývající se

Absorpční fotometrie

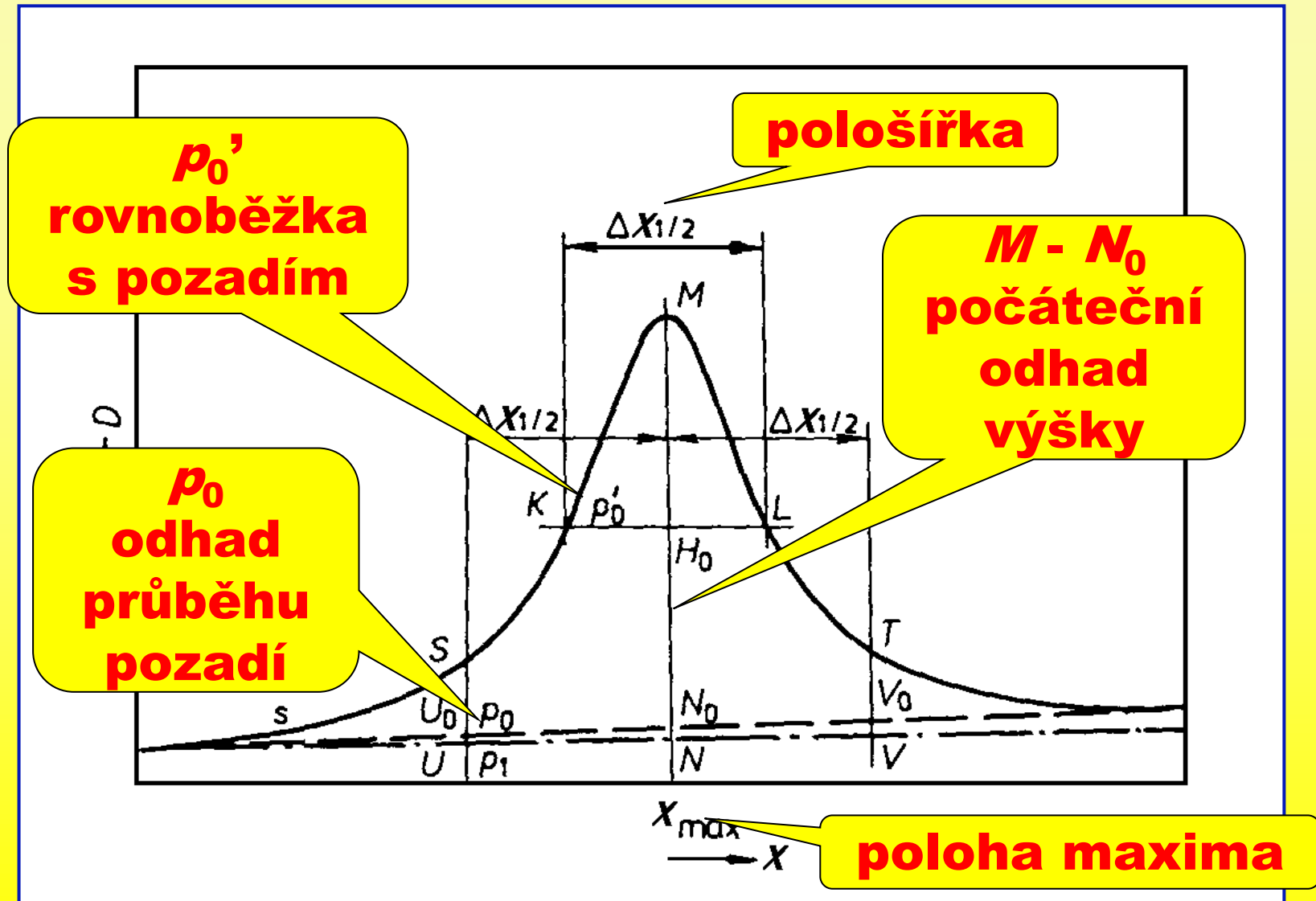
MOLEKULOVÁ SPEKTRA

ZÁKLADNÍ PARAMETRY pásů

- poloha maxima (x_{MAX} , ...)
- výška /intenzita v maximu/ (h , ...)
molární absorpční koeficient
- šířka píku /„pološířka“/ (w , $Y_{h/2}$, ...)
„FWHM“ - „plná šířka
v polovině výšky“

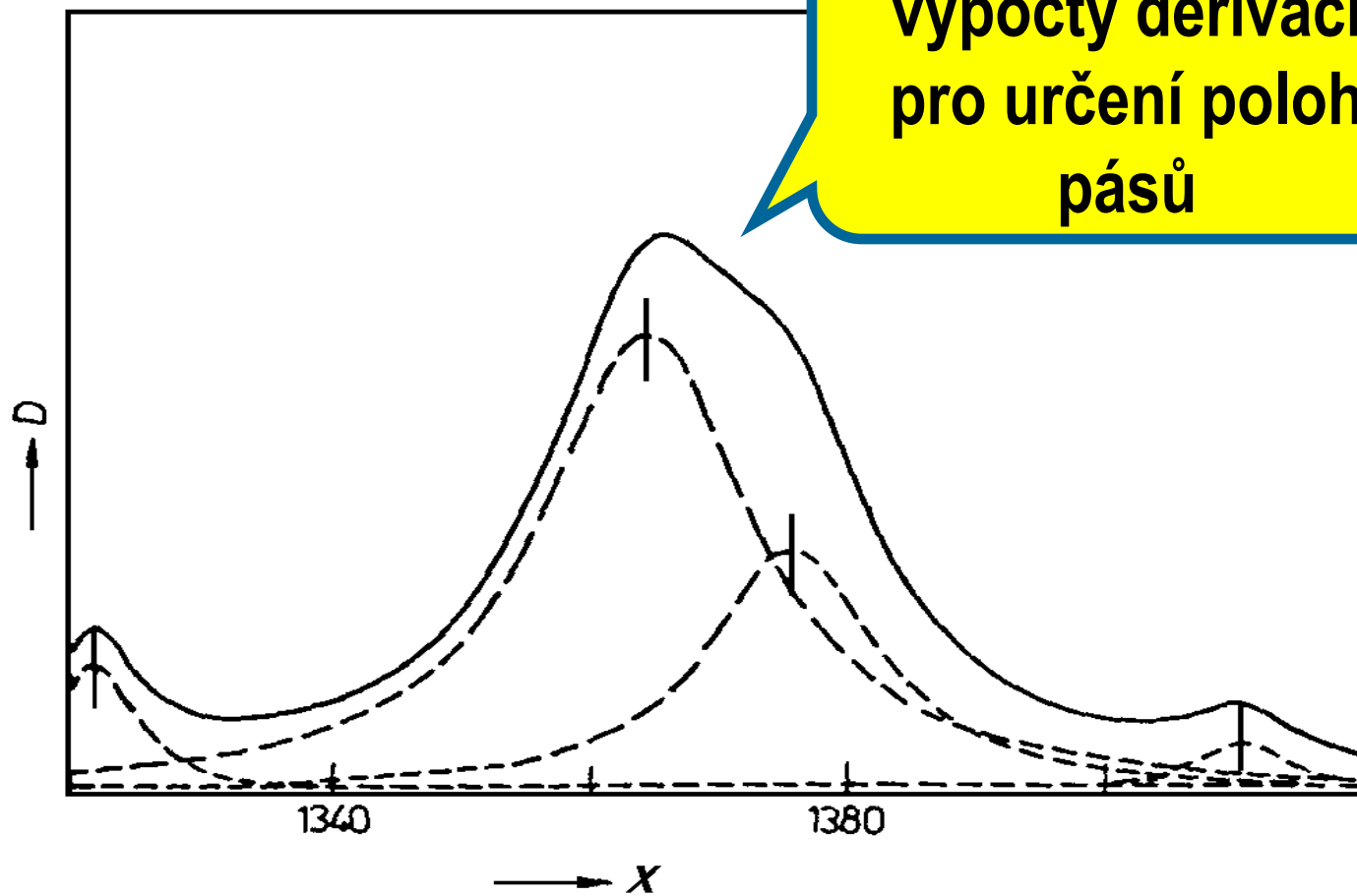
Absorpční fotometrie

IZOLOVANÝ PÍK

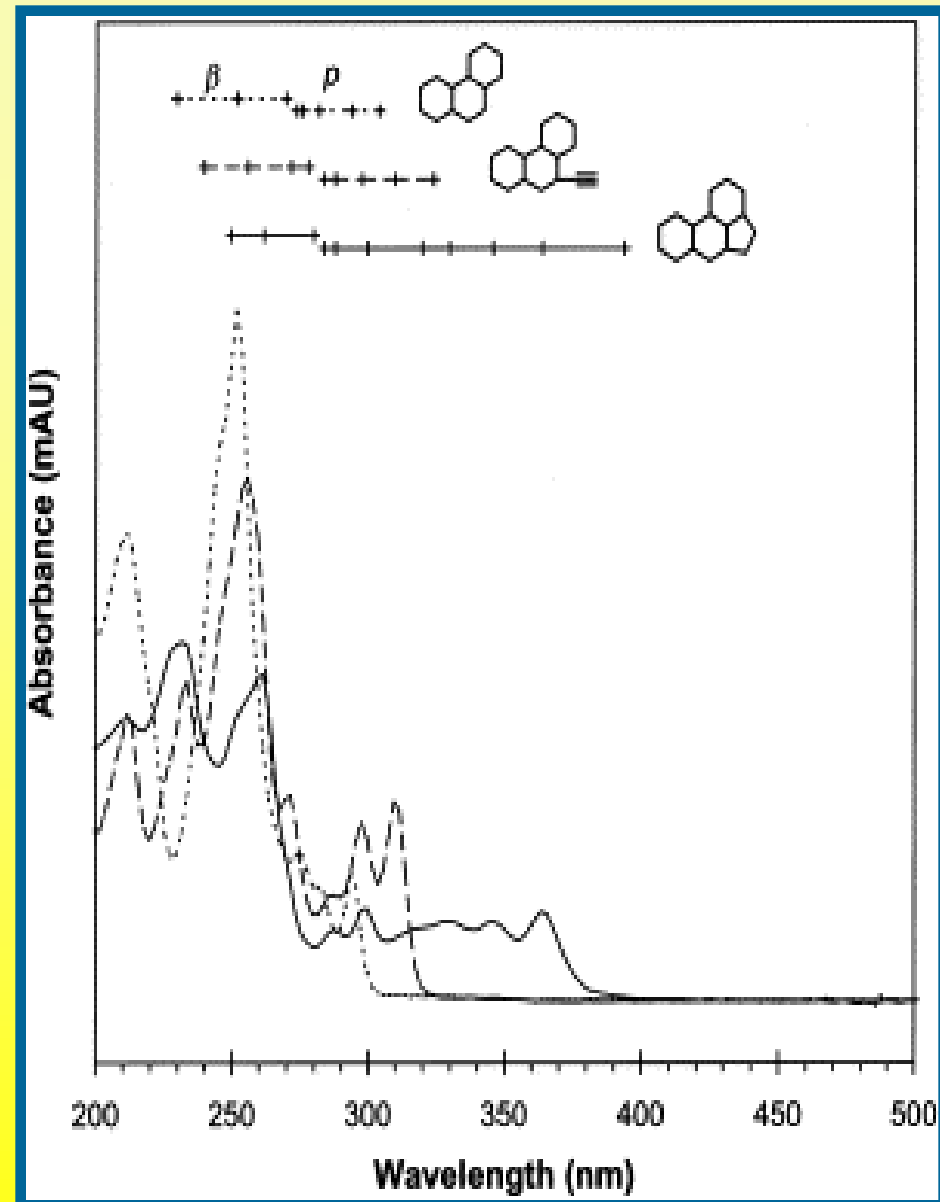
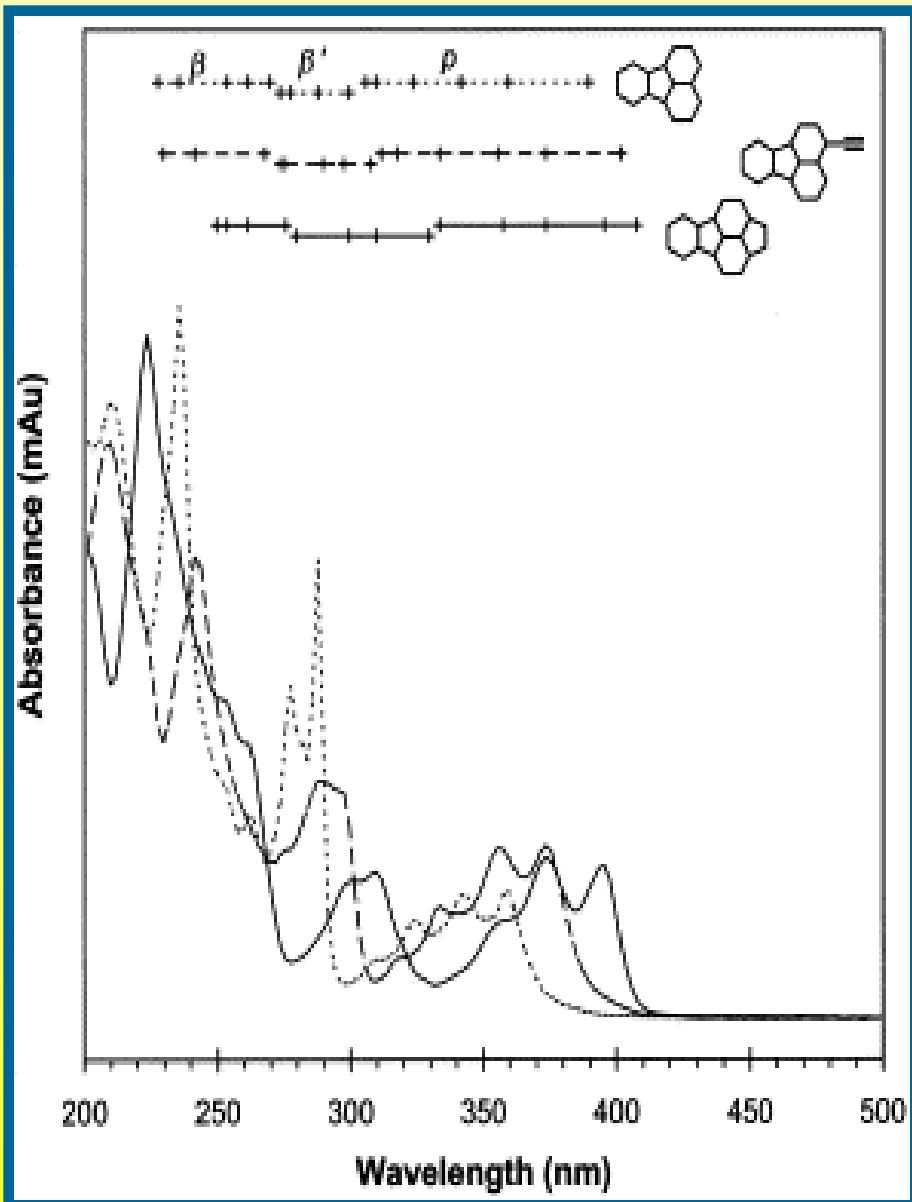


Absorpční fotometrie

SILNĚ PŘEKRYTÝ DUBLET




UV-vis spektrometrie



UV-vis spektrometrie

- 6 TYPŮ přechodů

- 1) $\sigma - \sigma^*$ - nejvyšší energie přechodu
 - 2) $n - \sigma^*$
 - 3) $\pi - \pi^*$
 - 4) $n - \pi^*$
 - 5) přenos náboje (CT charge-transfer)
(MLCT)
 - 6) přechody v ligandovém poli (LF)
(d - d) - nejnižší energie přechodu
- 

UV-vis spektrometrie

1) σ - σ^* PŘECHODY

- orbitaly od jednoduchých vazeb
- absorpce ve vzdálené UV oblasti
pod 180 nm („vakuové UV“)

LÁTKY vykazující pouze σ - σ^* PŘECHODY -

- **VHODNÁ ROZPOUŠTĚDLA** pro běžnou UV-vis spektrometrii

příklad - nasycené alifatické uhlovodíky

UV-vis spektrometrie

2) $n - \sigma^*$ PŘECHODY

- orbitaly s nevazebnými elektrony
 - heteroatomy (substituenty)
nesoucí elektronový pár
 - O, Cl - absorpce pod 200 nm
 - **VHODNÁ ROZPOUŠTĚDLA**
pro běžnou UV-vis spektrometrii



UV-vis spektrometrie

2) $n - \sigma^*$ PŘECHODY

- **N, S, Br, I** - nad 200 nm

- více heteroatomů v molekule

↳ posun λ_{\max} k vyšším hodnotám

CH₃I ($\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$)

CH₂I₂ ($\lambda_{\max} = 292 \text{ nm}$)

CHI₃ ($\lambda_{\max} = 349 \text{ nm}$)

UV-vis spektrometrie

3) $\pi - \pi^*$ PŘECHODY

- dvojn  vazby $-C=C-$

- v ice konjugovaných dvojných vazeb

↳ posun λ_{\max} k vy  ším hodnot m

$-C=C-$ ($\lambda_{\max} = 170 \text{ nm}$)

$-C=C-C=C-$ ($\lambda_{\max} = 220 \text{ nm}$)

$-C=C-C=C-C=C-$ ($\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$)

$-C=C-C=C-C=C-C=C-$ ($\lambda_{\max} = 300 \text{ nm}$)

$-C=C-C=C-C=C-C=C-C=C-$ ($\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$)

UV-vis spektrometrie

4) $n - \pi^*$ PŘECHODY

- dvojné vazby a atomy nesoucí elektronový pár $-C=O$, $-C=S$, $-C=N-$
- mnohdy možný jak $\pi - \pi^*$, tak $n - \pi^*$ přechod
- energie přechodu $n - \pi^*$ nižší vůči energii přechodu $\pi - \pi^*$ v téže molekule na téže funkční skupině
- energie přechodu $n - \pi^*$ silně ovlivněna typem atomu nesoucím elektronový pár

UV-vis spektrometrie

CHROMOFORY

- skupiny odpovědné za absorpci záření

AUXOCHROMY

- skupiny způsobující posun absorpčních maxim
- skupiny způsobující zvýšení intenzity pásů
- -OH, -NH₂, halogeny
 - vliv na změnu dipolového momentu při přechodu

UV-vis spektrometrie

BATHOCHROMNÍ efekt - „červený posun“

HYPSOCHROMNÍ efekt - „modrý posun“

HYPERCHROMICKÝ efekt - zvýšení intenzity
absorpce

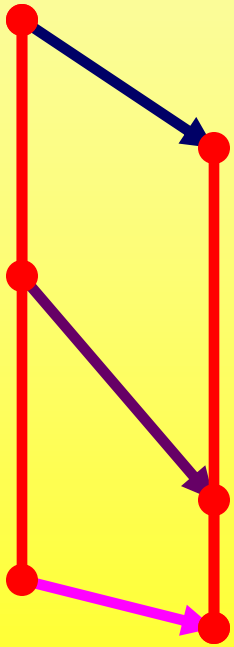
HYPOCHROMNÍ efekt - snížení intenzity
absorpce

UV-vis spektrometrie

EFEKTY ROZPOUŠTĚDEL

- polarita rozpouštědel

- vliv na polohu π^* hladin
 - střední pokles s růstem polarity
- vliv na polohu n hladin
 - silný pokles s růstem polarity
- vliv na polohu π hladin
 - slabý pokles s růstem polarity



UV-vis spektrometrie

EFEKTY ROZPOUŠTĚDEL

- polarita rozpouštědel

- vliv na polohu $n - \pi^*$ přechodů

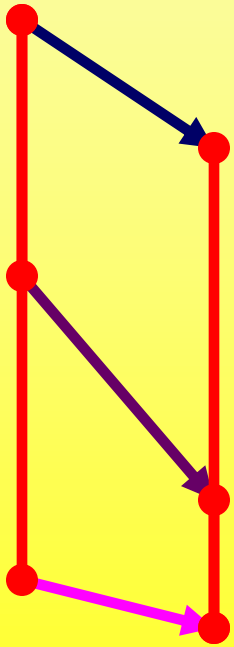
- růst polarity - „modrý posun“

- pokles polarity - „červený posun“

- vliv na polohu $\pi - \pi^*$ přechodů

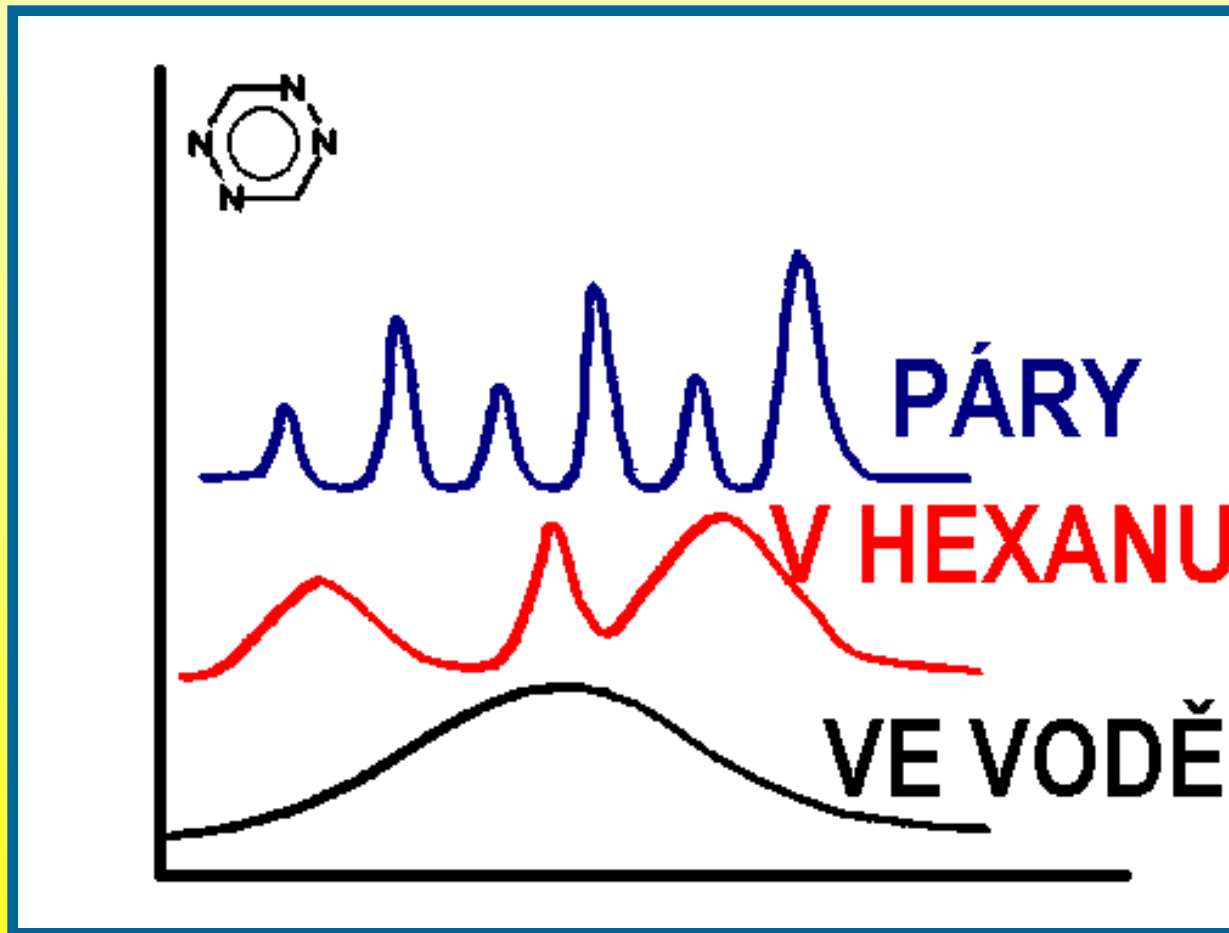
- růst polarity - „červený posun“

- pokles polarity - „modrý posun“



UV-vis spektrometrie

EFEKTY ROZPOUŠTĚDEL



UV-vis spektrometrie

5) přenos náboje (CT charge-transfer)

přenos elektronu z jedné části molekuly
na druhou

- donor a akceptor elektronu

např. MLCT - metal to ligand charge transfer

LMCT - ligand to metal charge transfer

Fe^{2+} a o-fenanthrolin

benzen a jod

toluen a chloroform

UV-vis spektrometrie

6) přechody v ligandovém poli (LF)

(d - d) - nejnižší energie přechodu

- přechody ve viditelné až blízké infračervené oblasti
- sejmutí degenerace d-orbitalů vlivem ligandového pole
- geometrická struktura komplexů
 - oktaedrické pole - např. 6 jednodonorových ligandů
 - tetraedrické pole - např. 4 jednodonorové ligandy

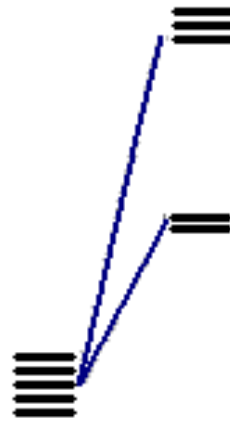
UV-vis spektrometrie

6) přechody v ligandovém poli (LF) (d - d) - nejnižší energie přechodu

ŠTĚPENÍ HLADIN V LIGANDOVÉM POLI



OKTA-
EDRICKÉ



TETRA-
EDRICKÉ



TETRA-
GONÁLNÍ

UV-vis spektrometrie

6) přechody v ligandovém poli (LF)

(d - d) - nejnižší energie přechodu

- spektrochemická řada ligandů

- od ligandu s nejmenším účinkem po
ligand s největším účinkem

příklady ze spektrochemické řady

I^- , Br^- , Cl^- , F^- , ethanol, voda, SCN^- , NH_3 ,
ethylendiamin, o-fenanthrolin, $C=O$

UV-vis spektrometrie

INSTRUMENTACE

- zdroje záření

- UV oblast

- vodíková výbojka, deuteriová výbojka

(160 - 380 nm)

- rtuťová výbojka

- viditelná oblast

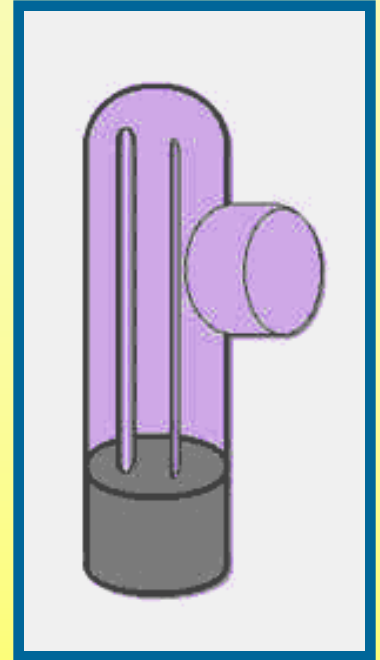
- wolframová žárovka

- halogenová žárovka

(360 - 2200 nm)

- UV + viditelná oblast

- xenonová výbojka



UV-vis spektrometrie

INSTRUMENTACE

- **kyvetový materiál - křemen**
 - sklo (jen VIS)
 - „plexisklo“
 - běžné kyvety – 1 cm, (1 mm – 10 cm)
- **mřížkové monochromátory**
- **fotonásobiče, diodová pole, CCD**
- **příp. pásové a hranové filtry**

Kvantitativní spektrometrie

- specifické aspekty jednotlivých metod

MOLEKULOVÁ absorpční/reflexní spektrometrie

- VIDITELNÁ a UV oblast

- pásové spektrum - malý počet širokých pásů

- většinou v absorpčním módu

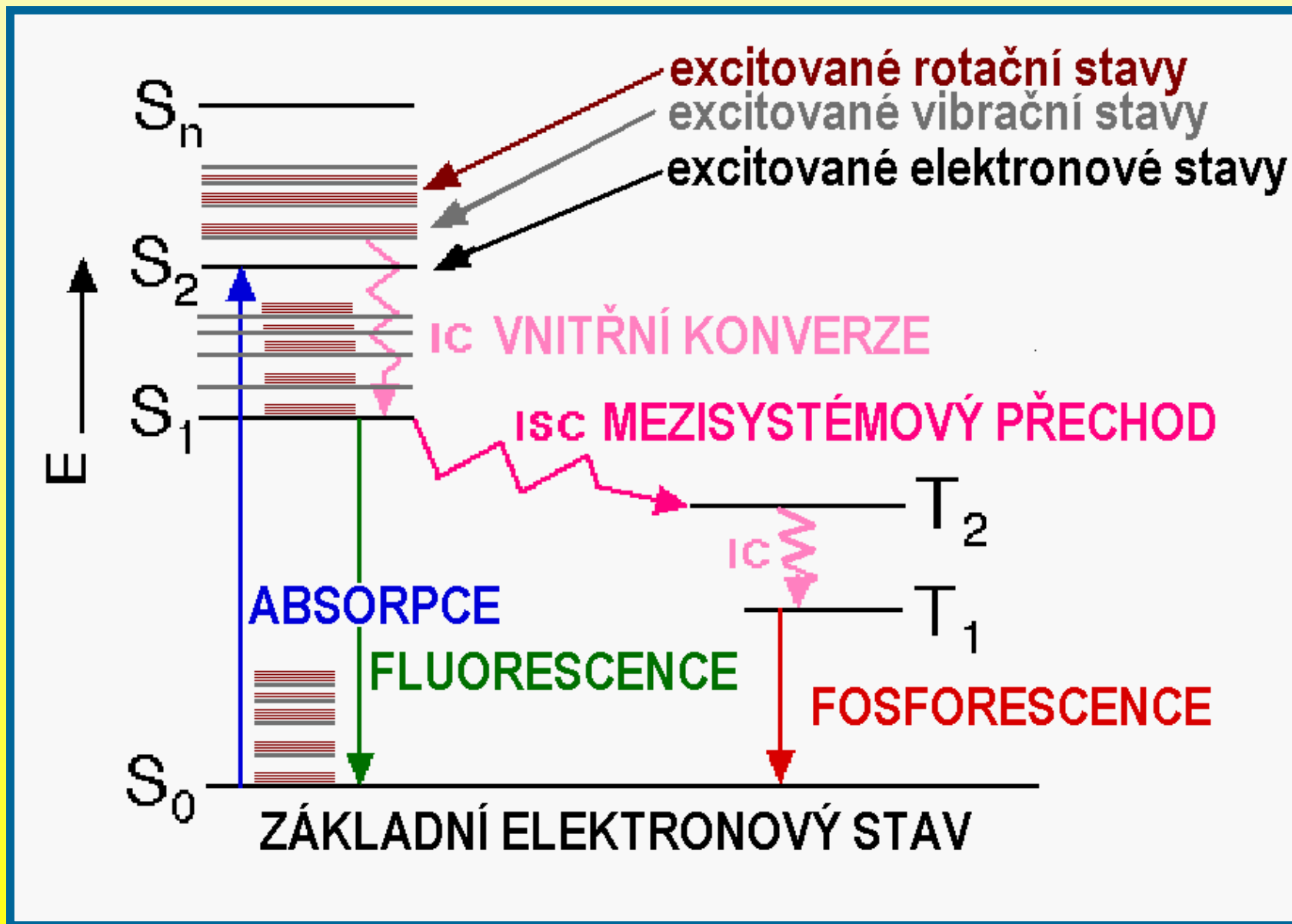
ANALÝZA ANORGANICKÝCH SOLÍ - UV oblast

ANALÝZA ORGANICKÝCH LÁTEK

ANALÝZA KOORDINAČNÍCH SLOUČENIN

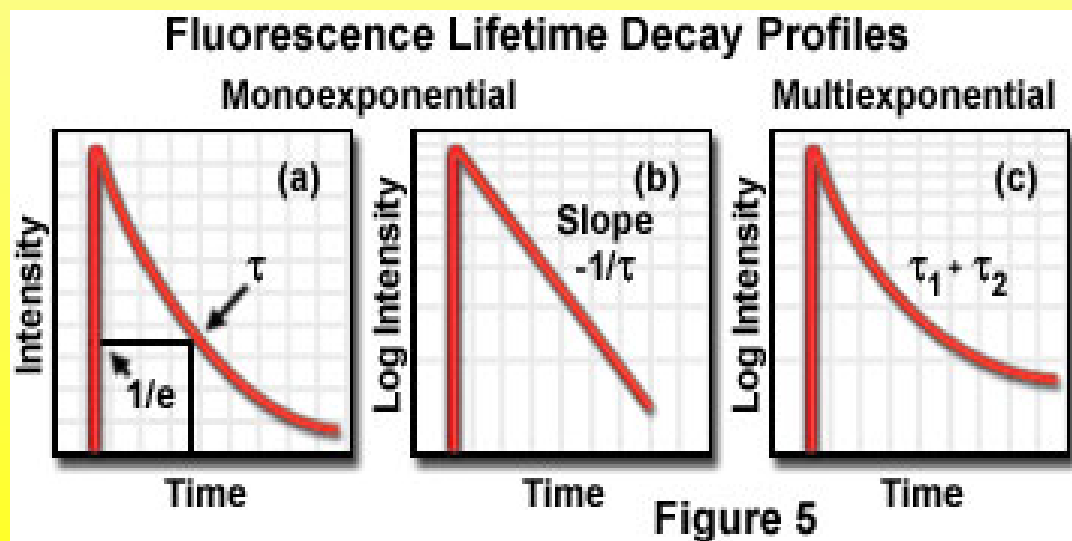
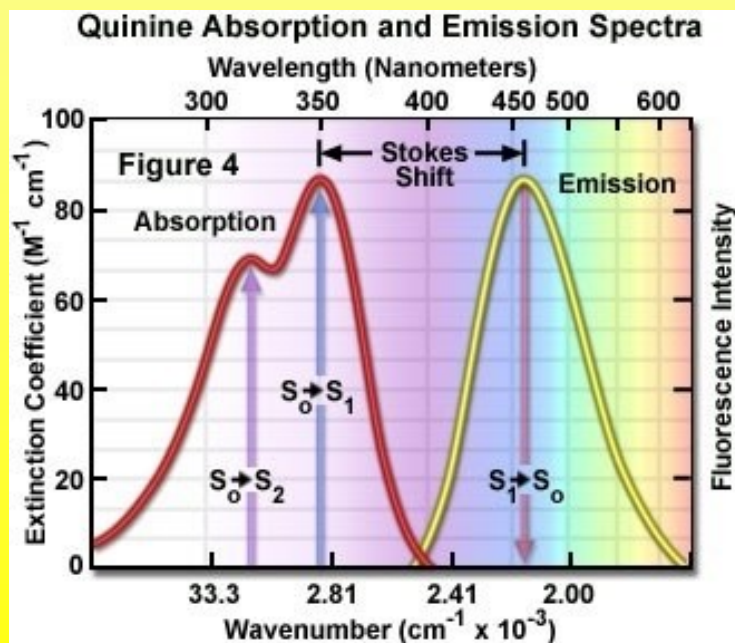
ANALÝZA PRODUKTŮ ENZYMATICKÝCH REAKCÍ

Fluorescence a fosforescence



Fluorescence a fosforescence

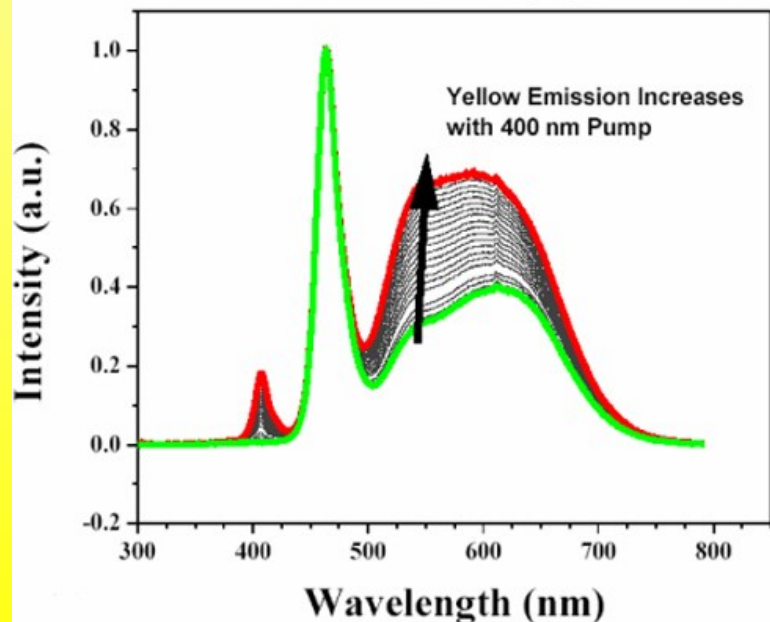
- **FLUORESCENCE**
- luminiscence s krátkým dosvitem
 - spinově dovolený přechod - bez změny orientace elektronového spinu



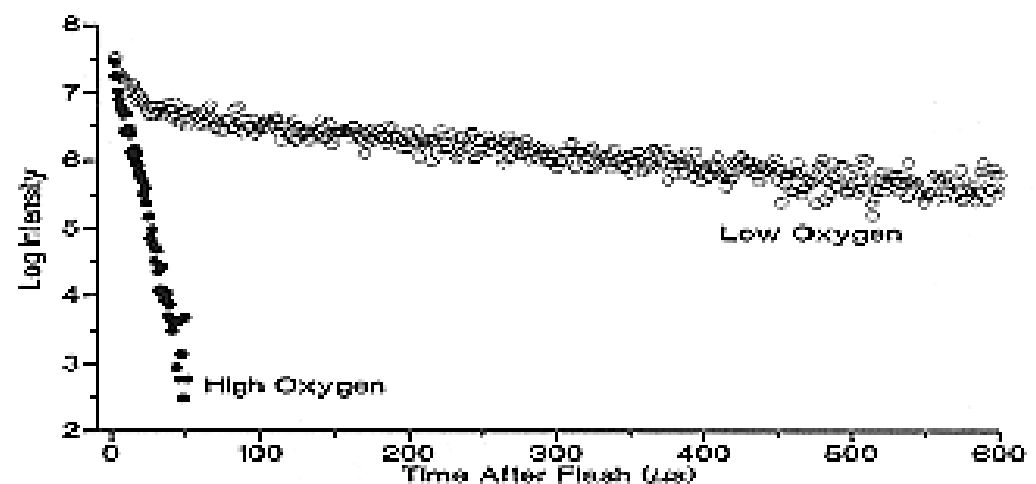
Fluorescence a fosforescence

- **FOSFORESCENCE**
- luminiscence s dlouhým dosvitem
 - spinově zakázaný přechod - změna orientace elektronového spinu
 - možný díky spin-orbitální interakci

Constant 460 nm Emission and Varying 400 nm Emission



Phosphorescent Intensity Decay Profiles



Fluorescence a fosforescence

- DOBA ŽIVOTA EXCITOVANÉHO STAVU
 - kinetika „zániku“ excitovaného stavu
- INTENZITA fluorescence a fosforescence
 - KVANTOVÝ VÝTĚŽEK

$$\varphi = N_F / N_{\text{ABS}}$$

- počet vyzářených fotonů vůči počtu absorbovaných
 - VLIV NEZÁŘIVÝCH PROCESŮ - intra- a inter-molekulárních

Fluorescence a fosforescence

- **STRUKTURA MOLEKULY**

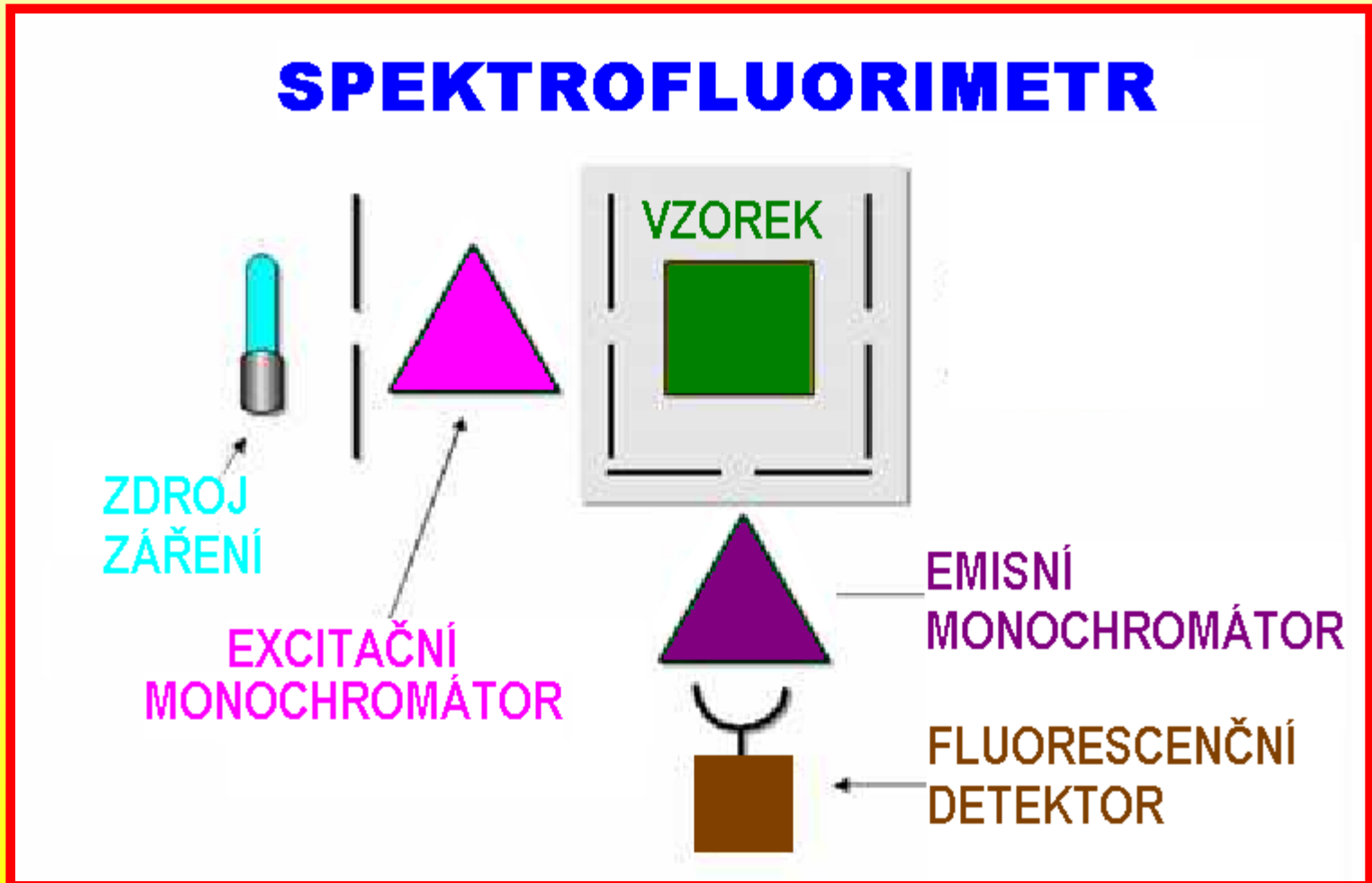
- dvojn  vazby - aromáty, konjugované C=C
- heteroatomy - C=O, dus kat  heterocykly
- VLIV SUBSTITUENTŮ - -OH, -NO, -NO₂ ...
- RIGIDITA struktury π -elektronového systému
- CHELÁTY

- **MEZIMOLEKULOV  INTERAKCE**

- p edev m zhášení luminiscence
- vliv pH, teploty, viskozity, polarita rozpouštědla

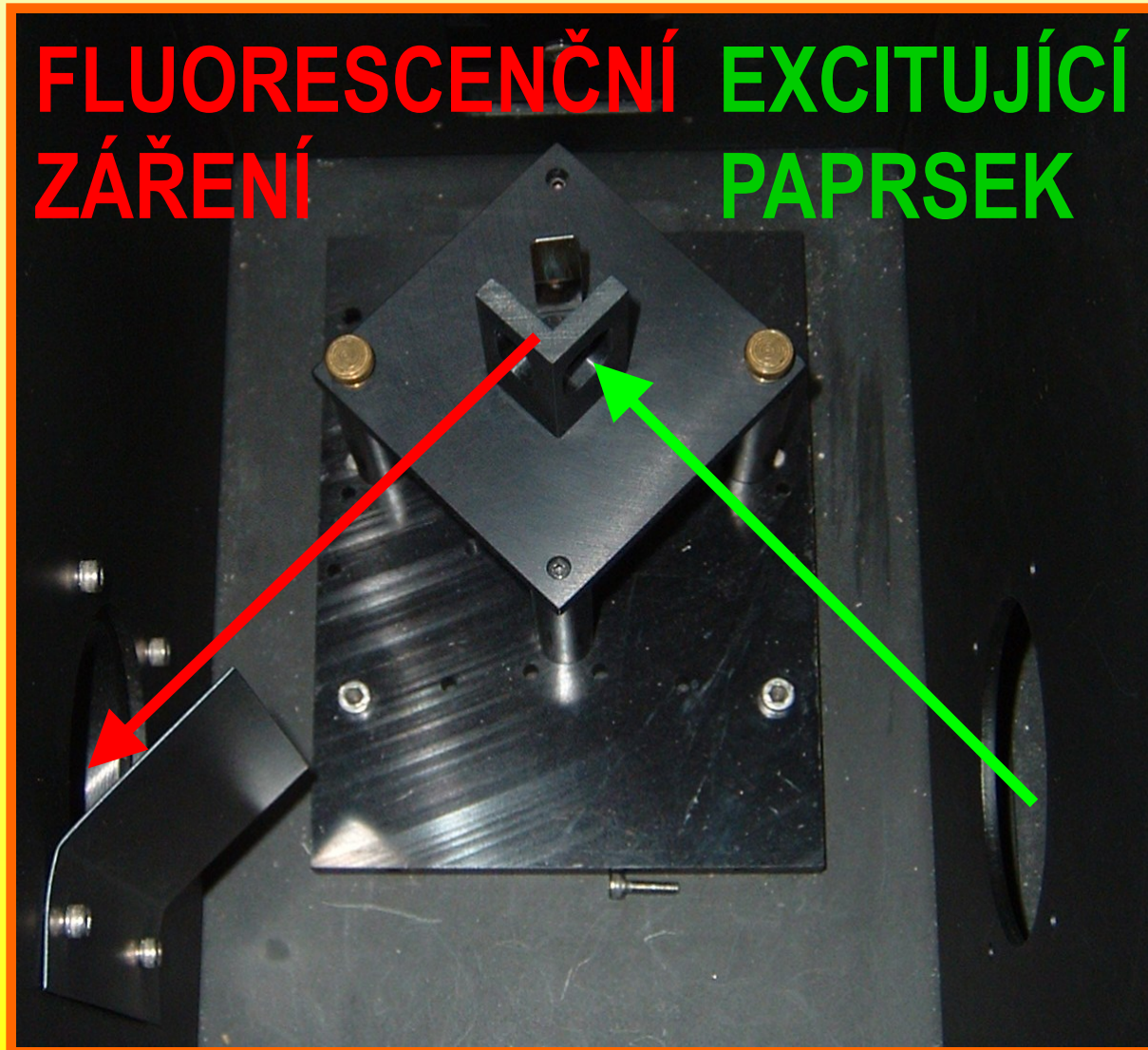
Fluorescence a fosforescence

- MĚŘENÍ STACIONÁRNÍCH SPEKTER
– spektrofluorimetr



MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- VIS a UV oblast - fluorescence a fosforescence



Fluorescence a fosforescence

• MĚŘENÍ STACIONÁRNÍCH SPEKTER

– spektrofluorimetr

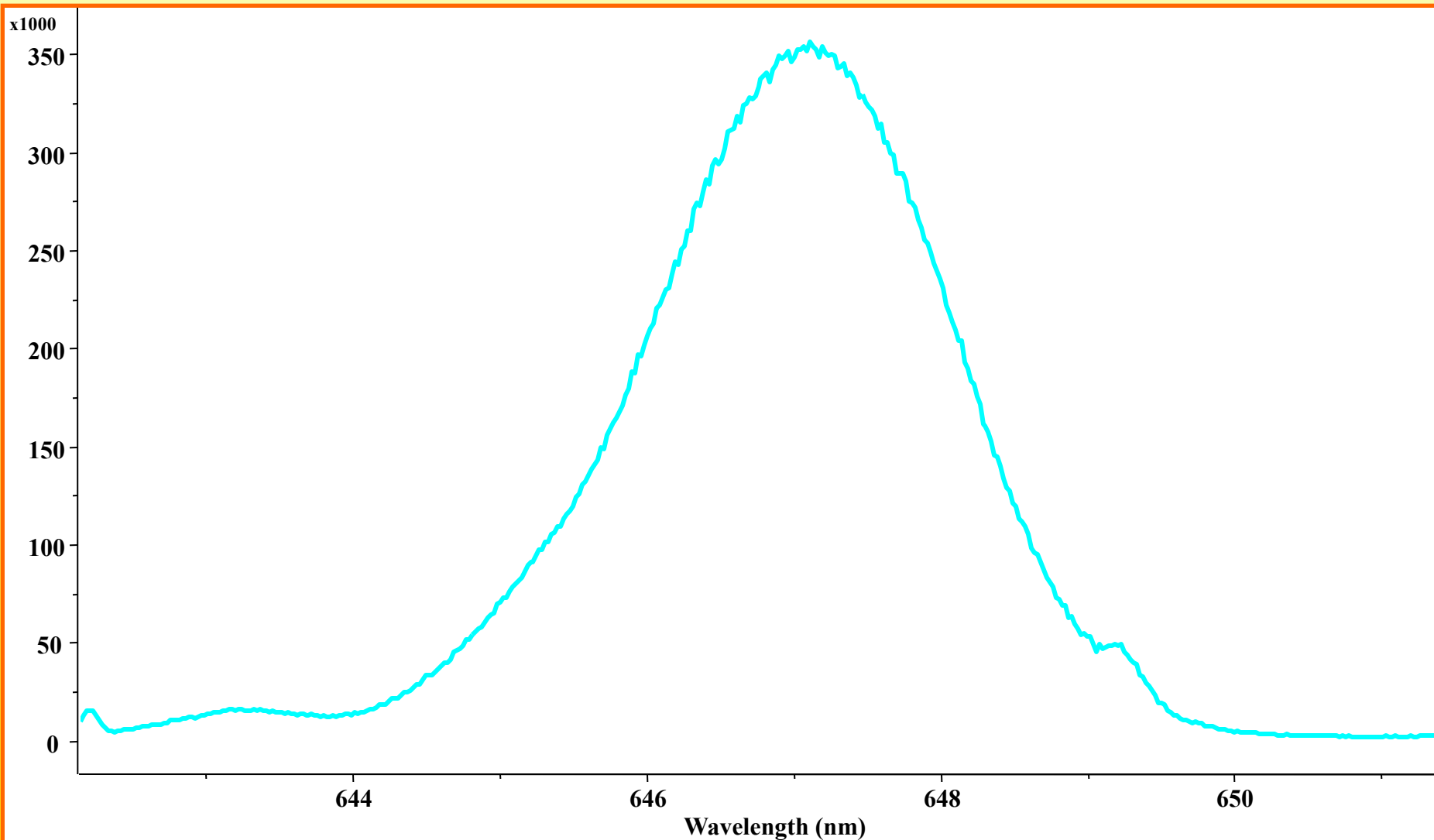
- zdroj záření - xenonová výbojka
- rtuťová výbojka
- křemenné kyvety
- mřížkové monochromátory
- detektor - fotonásobič

– excitační a emisní spektra

- **excitační** - změna vlnové délky excitujícího záření
konstantní λ emisního toku
- **emisní** - fixovaná λ excitujícího záření
proměnná λ emisního toku

MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- VIS a UV oblast - fluorescence a fosforescence



Fluorescence a fosforescence

- **STACIONÁRNÍ SPEKTRA**

- knihovny spekter

- charakteristická spektra polyaromatických uhlovodíků
- charakteristická spektra fluorescenčních indikátorů

- **ČASOVĚ ROZLIŠENÁ SPEKTRA**

- měření doby života excitovaných stavů

- snazší u fosforescence
- obtížnější u fluorescence - studium přenosu energie
 - studium dynamiky molekul v roztocích
 - využívání fluorescenčních „sond“

Fluorescence a fosforescence

MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- **VIDITELNÁ a UV oblast** - fluorescence a fosforescence
 - stacionární spektra
 - pásové spektrum - malý počet širokých pásů
 - kvantový výtěžek fluorescence
 - samoabsorpce
 - zhášení rozpouštědlem či „zhášedly“ - quenching

STANOVENÍ NÍZKÝCH OBSAHŮ PŘEDEVŠÍM ORGANICKÝCH LÁTEK

$$\Phi_F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-\varepsilon b c})$$

Fluorescence a fosforescence

MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- **VIDITELNÁ a UV oblast** - fluorescence a fosforescence
- stacionární spektra

PŘÍMÉ METODY - stanovení PAH

- stanovení hemoproteinů
- stanovení vitamínů
- stanovení steroidů

Fluorescence a fosforescence

MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- **VIDITELNÁ a UV oblast** - fluorescence a fosforescence
 - stacionární spektra

NEPŘÍMÉ METODY - tvorba chelátů - např. s morinem

- stanovení hliníku
- stanovení aniontů na principu zhášení fluorescence
- stanovení na základě reakce provázené vznikem fluoreskujícího produktu