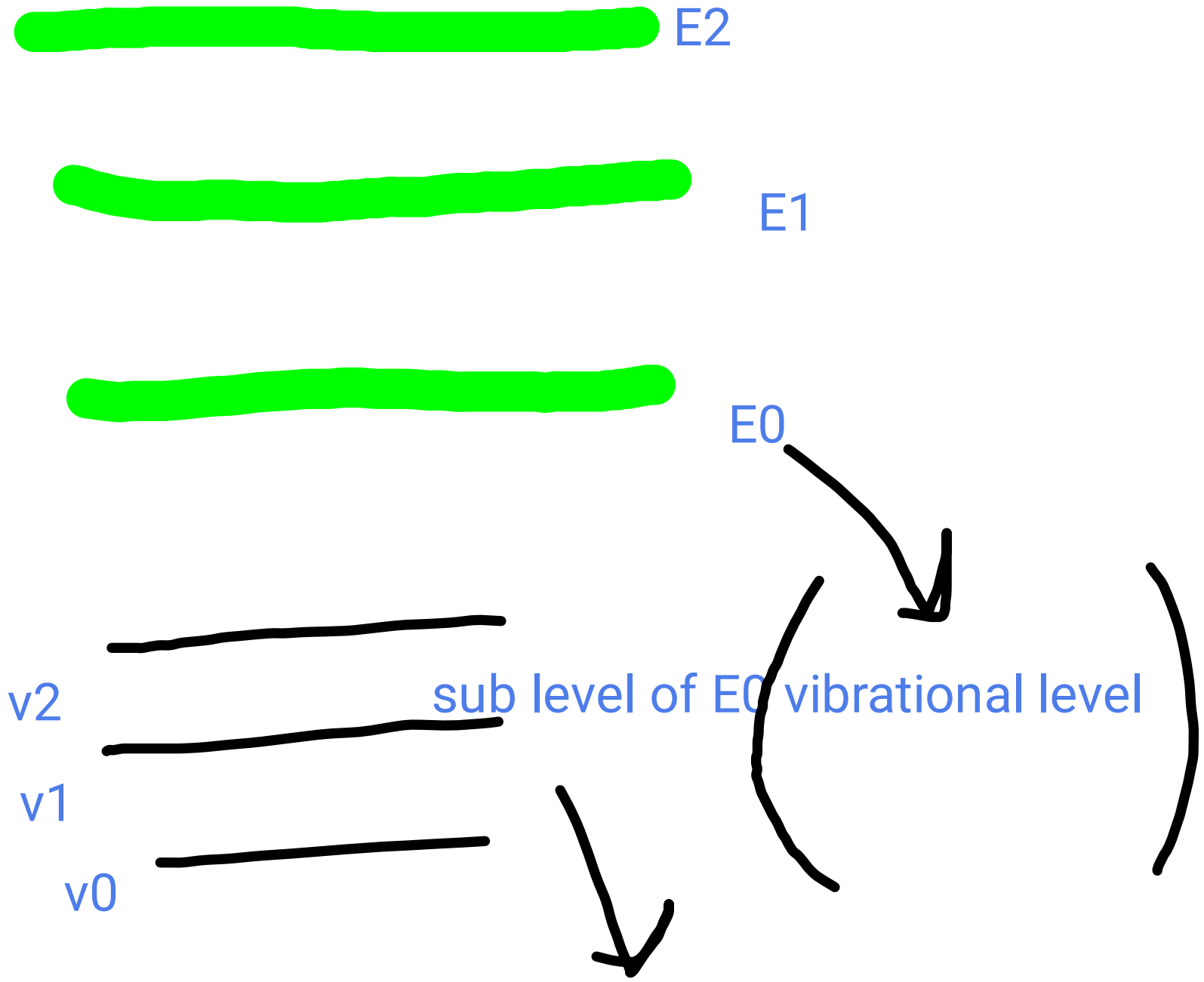
Instrumental Analysis

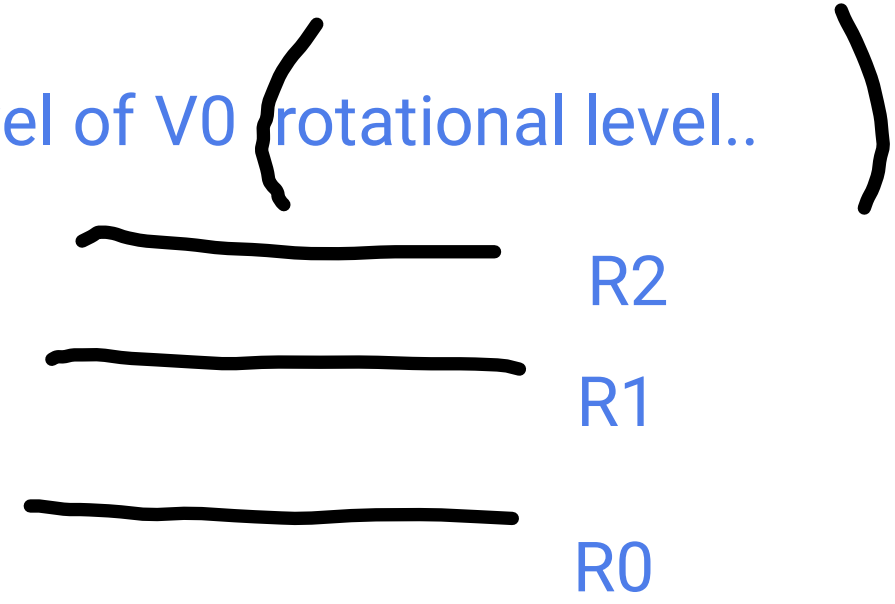
Fundamentals of Spectrophotometry

بمختبر التحليل الالي هاد الاسبوع إحنا مسكنا KMNo4 وعملنا منو stock solution وبعديها عملنا dilution إلو وأخدنا من هاد ال diluent وحطيناه ب cuvettes وكانت معهمتنا نحسب ال maximum wavelength إلو هيك أنا عرفتو quality ... اليوم بالمادة النظرية رح نتعرف كيف نحددو quantity ..... بالبداية بدنا نعرف شو رح يصير بال molecule اذا سقطت عليه هاي الأشعة ... xrays إذا سقطت على ال molecules بتسبب تأين يعني النواة بتصير موجبة الشحنة والإلكترونات بتنفك عن النواة وبتصير شحنتها سالبة إلكترونات ال core وال valence ....

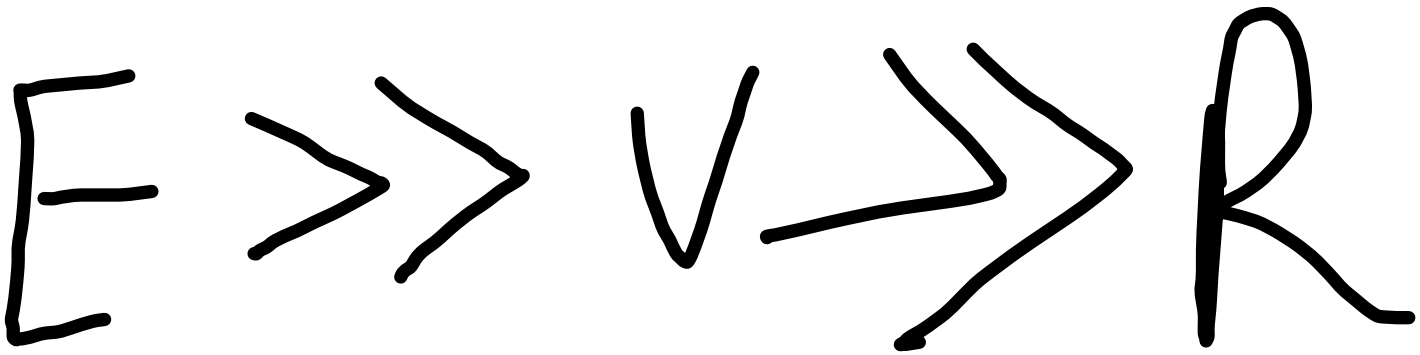
اذا سقط ال uv من (200-780) .. رح ينقلي الإلكترون من level ل level حسب range الطاقة اللي أعطيتو إياها ... قبل ما نبدأ بتأثير الأشعة التانية بدنا نشرح شغلة صغيرة .. هسا الإلكترونات موجودات ب level محددة بداية E0, E1, E2 وهكذا هسا بنسميهم electronic level كل واحد من هدول ال level إلهم sublevel وإسمهم vibrational level وكل vibrational level في إلهم sublevel إسمهم rotational level... هسا ال uv بتغير ال electronic level وبتغير ال Vibrational level وبتغير ال rotational level وبتعطي الطاقة على شكل ضوء ... هسا أشعة ال infrared بتغير ال vibrational level وال rotational level بس ما بتغير ال electronic level لأنو طاقتها ما بتكفي حتى تغير ال electronic level. وبتعطيني هاي الطاقة على شكل حرارة.. ال microwave ما بتقدر تغير لا ال electronic level ولا ال vibrational level لكن بتغير بس ال rotational level وبتعطيني هاي الطاقة على شكل حرارة ...


E2
E1
E0
v2
v1
v0
sub level of E0 vibrational level

sublevel of V0 (rotational level..)

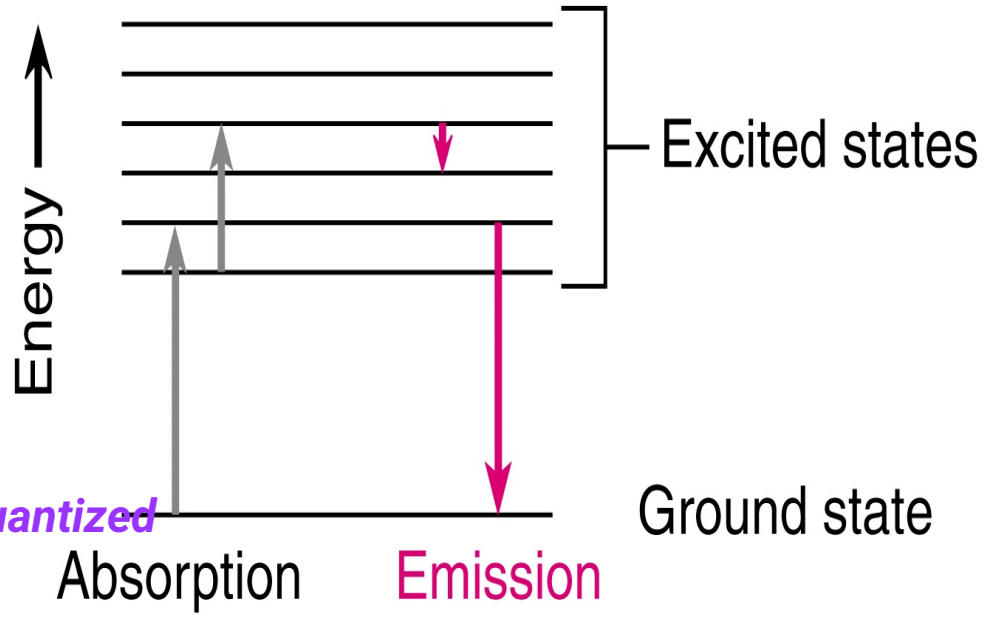


المقارنة بين الطاقة



Absorption of light

A **molecule** that absorbs light photons will end up with increased energy. The molecule will be promoted to an **excited** state. Microwave energy will cause rotation of compounds. IR energy is high enough to promote bond stretching. UV/Vis energy promotes electrons into higher orbitals. Short-λ UV and X-rays can ionize molecules or even break bonds.

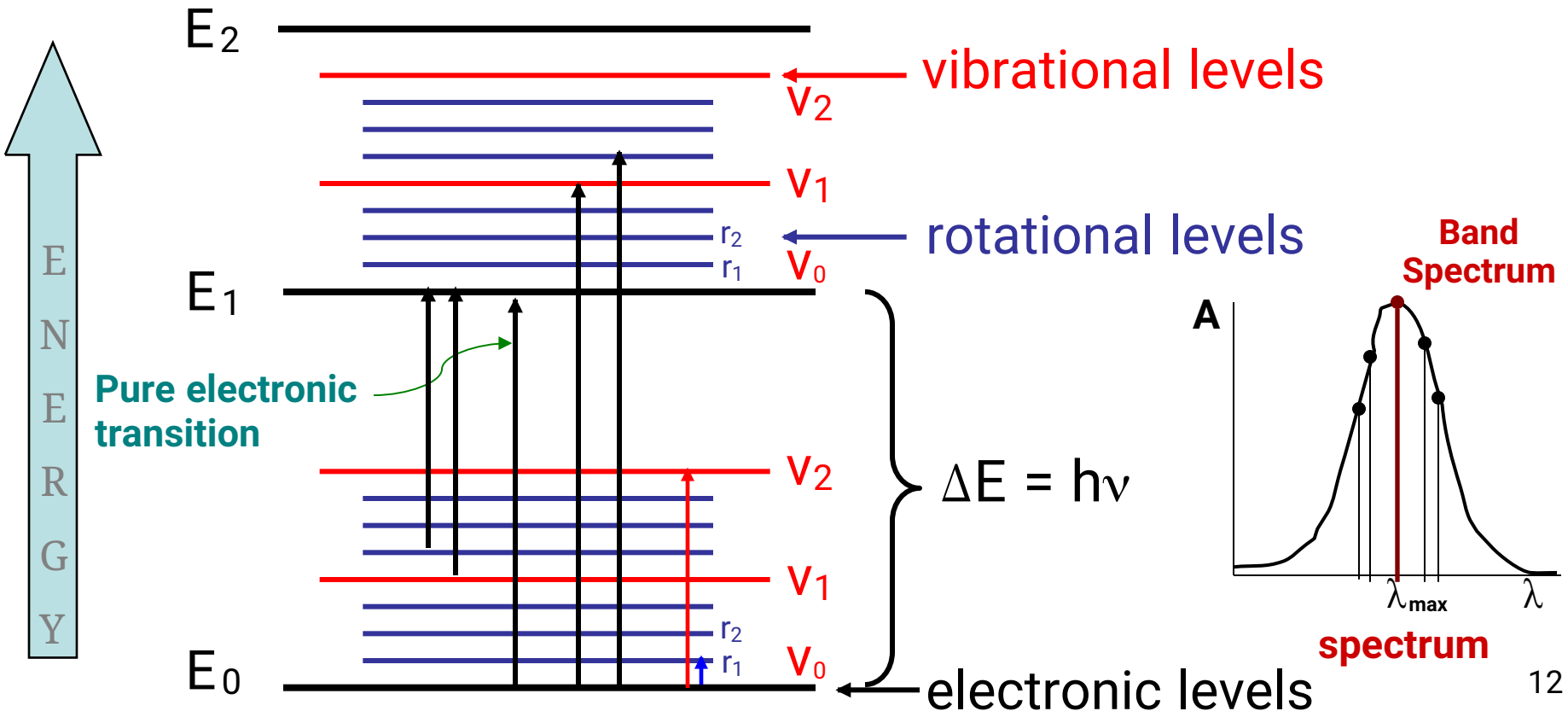


ΔE *molecule* E
photon
absorbed light is quantized

Most excited molecules relax again to the ground state emitting the excess energy in the form of heat.

What happens when a molecule absorbs UV-Visible radiations?

- When a molecule absorbs light having sufficient energy (e.g. UV-Vis radiation) to cause an electronic transitions, (additional vibration and rotation transitions also occur)
- Molecule can absorb one photon of just the right energy to cause the following simultaneous changes:

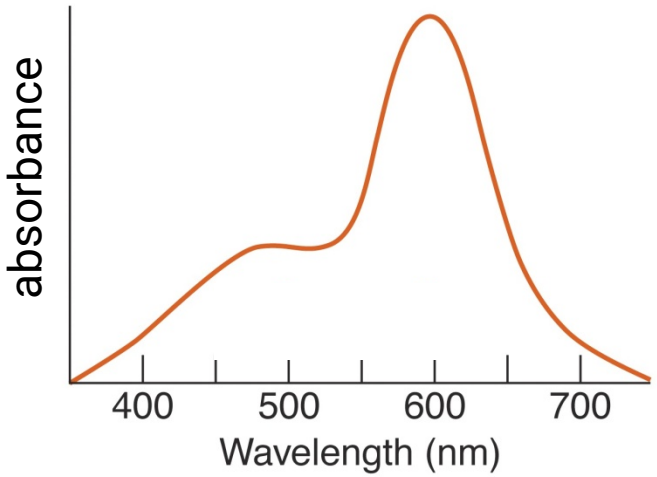


بال qualitative a analysis بهاد الجهاز زي ما عملنا بالمختبر حددنا ال maximum wavelength اللي بكون عندها ال absorbance أعلى ما يمكن وبتكون هاي زي ال fingerprint لكل مادة ....إحنا لما عملنا التجربة حطينا ال range تبع الضوء من 200-780 وبعدها طلعنا ال maximum wavelength هاد بال quality لكن بال quantity أنا بكون عارف ال maximum wavelength ونفرض انها طلعت مثلا 500 بأمر الجهاز إنو يسقطلي اياها على العينة بطلعلي كم حزمة ضوء من اللي إلها wavelength تساوي 500 دخلت وكم wave length طلعت هدول شو بستفيد منهم في قانون بربطلي عدد هدول الحزم بال absorbance ومن خلال ال absorbance بحسب التركيز شو هاد القان هو قانون إسمو ال transmittance ويساوي p اللي هي عدد الإلكترونات اللي خرجت من العينة على عدد الإلكترونات اللي سقطت على العينة لازم تكون هاي النسبة بين ال صفر وال 1 معنا الرقم واحد إنو اللي سقطت نفس اللي خرجت وبالتالي ما صار absorption

1. **A transition from the ground electronic state E_0 to the E_1 excited electronic state**
2. **A change in the vibrational energy from the ground vibrational state of E_0 to an excited vibrational state of E_1**
3. **A transition from one rotational state of E_0 to a different rotational state of E_1**
4. **All the above transitions are quantized which means that they required certain exact amount of energy**
5. **Thus, total energy absorbed = E_{elec} + E_{vib} + E_{rot}**

$$\Delta E_{elec} >> \Delta E_{vib} \quad \Delta E_{rot}$$

As a result, a large numbers of photons of certain wavelengths are absorbed by a molecule. These individual wavelengths are too numerous and too close to each other and a spectrum of broad bands of absorbed wavelengths are obtained



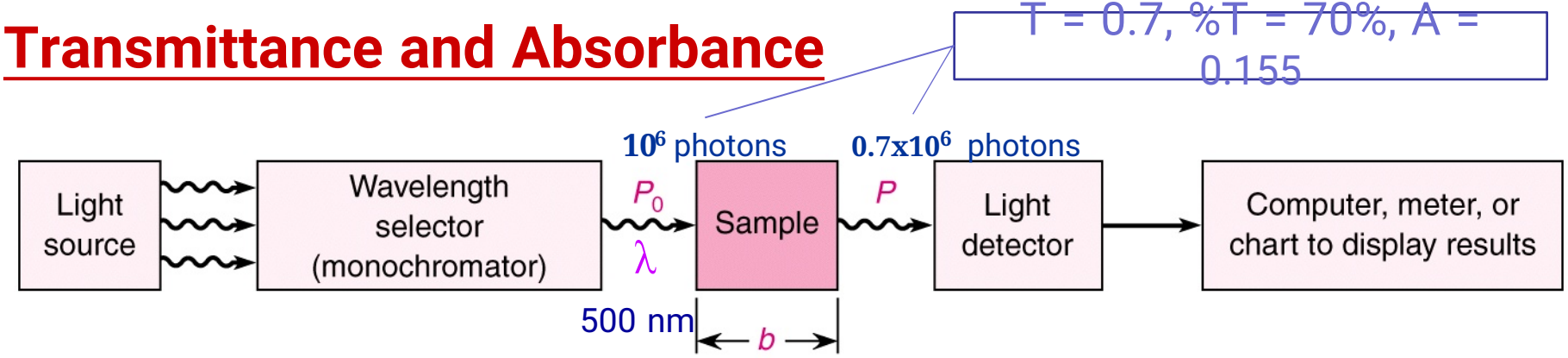
Spectrum (a graph that shows how absorbance varies with wavelength)

هاد القانون يستخدم لقياس ال quality لزجاج الطيارات كل ما كانت ال transmittance قريبة لل 1 كل ما كان الزجاج أغلى.. هسا هاي ال transmittance إلها علاقة مع ال absorbance وهي log t_ يساوي ال absorbance وهاد ال absorbance بمثلي ال response للجهاز على التركيز الفلاني ... لنفرض إنو اللي دخل 10 قوة 6 واللي خرج هو 0.7 *10 قوة 6 كم رح يطلع ال transmittance وال absorbance....

$$T = \frac{0.7 \times 10^{6}}{10^{6}} = 0.7$$

$$A = -\log(0.7)$$

Transmittance and Absorbance



There are two quantities that relate the change in the intensity or radiant power of EMR before, P_0 , and after, P, interaction with matter.

1. **Transmittance, T, is simply defined as "the fraction of light that reaches a detector after passing through a sample"**

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad 0 \leq T \leq 1$$

The percent transmittance, %T, is simply 100 T

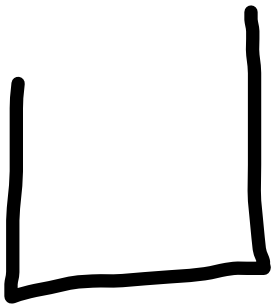
$$\%\,T = \frac{P}{P_O} \times 100 \qquad 0 < \%T < 100$$

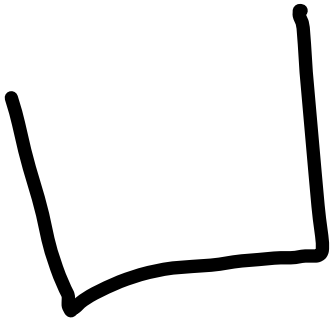
2. **Absorbance, defined as:**

$$A = -\log T \longrightarrow A = -\log \frac{P}{P_o} \longrightarrow A = \log \left(\frac{P_o}{P}\right)$$

القانون التاني اللي بربط ال absorbance مع ال concentration
هو قانون beer وبحكيلي إنو ال a=£bc شو معنى كل رمز هسا رح
نيجي لكل واحد a هي ال absorbance وال £ هي ال molar
absorptivity وهي ال absorption لواحد مولار من ال
solution ووحدتها هي m-1. cm-1 طبعا الدكتور هون بتلاعب
بالوحدة كيف يعني بجيب بدل مولا ppm أو أي وحدة تركيز فاحنا
لازم نعرف إنو هي وحدة تركيز بوحدة طول مهما اختلفت وحدة
التركيز ....من خلال 'beers law بنستنتج إنو علاقة ال
absorbance مع ال concentration علاقة طردية ولازم يكون
ال curve خطي بينما علاقة ال concentration مع ال
transmittance هي علاقة عكسية ...

$\uparrow A = \varepsilon b c \uparrow$





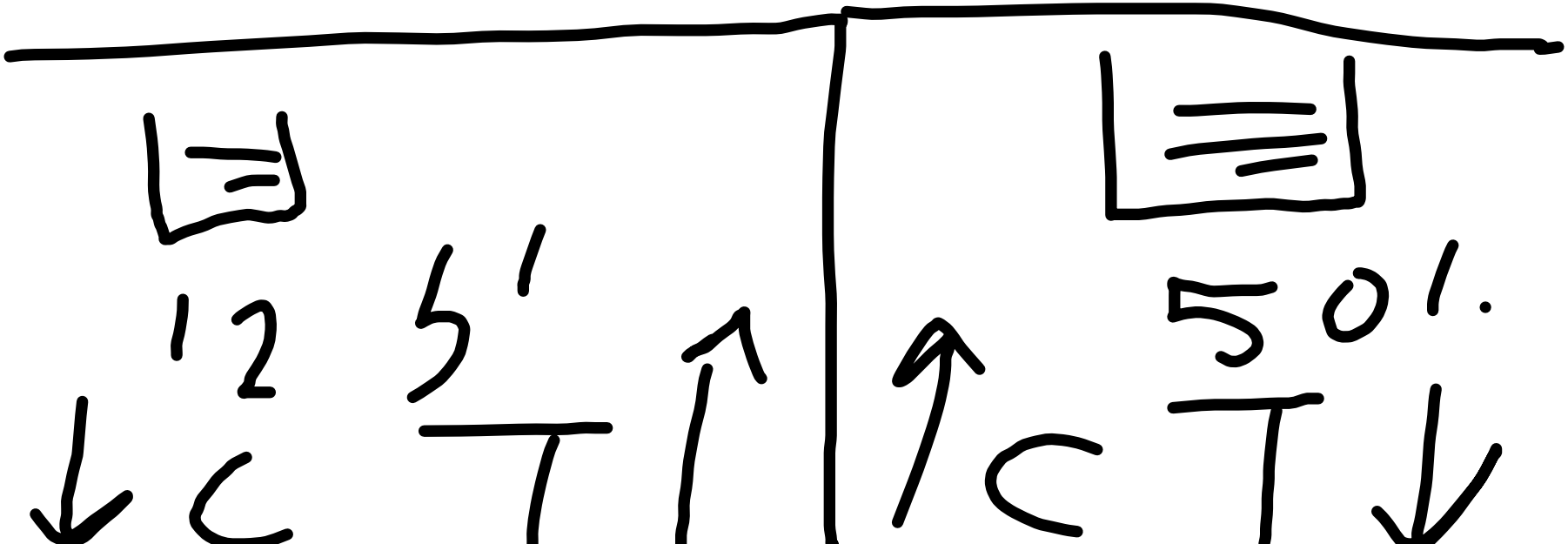
C = 75%. C = 25%

الأعلى concentration هو الأعلى absorbance

علاقة ال transmittance بال concentration

$$-\log T = A = \varepsilon b c$$

$$T = 10^{-A}$$



بدي أربط ال beer's law ب ال calibration equation من خلال
إني لو صفرت ال intercept هناك رح تصير المعادلة y=mx لو نيجي
نقارنها ب beer's law اللي قانونو هو A=£bx حيث x هي ال
concentration ولو ثبتنا ال b اللي هي ال thickness بواحد سم
رح ألاقي إنو ال £= slope مقابل ال y رح تساوي ال A .....

For purpose of chemical analysis

Absorbance is directly proportional to:

1. **concentration, c, of absorbing species in the sample (A $\propto$ c)**
2. **path length of light, b, through the sample (A $\propto$ b)**

Beer's law

$$A = \varepsilon bc$$

The previous equation is the heart of spectrophotometry as applied to analytical chemistry, it is called Beer-Lambert law or simply Beer's law

1- Concentration of the analyte is given in unit mol/L (M)

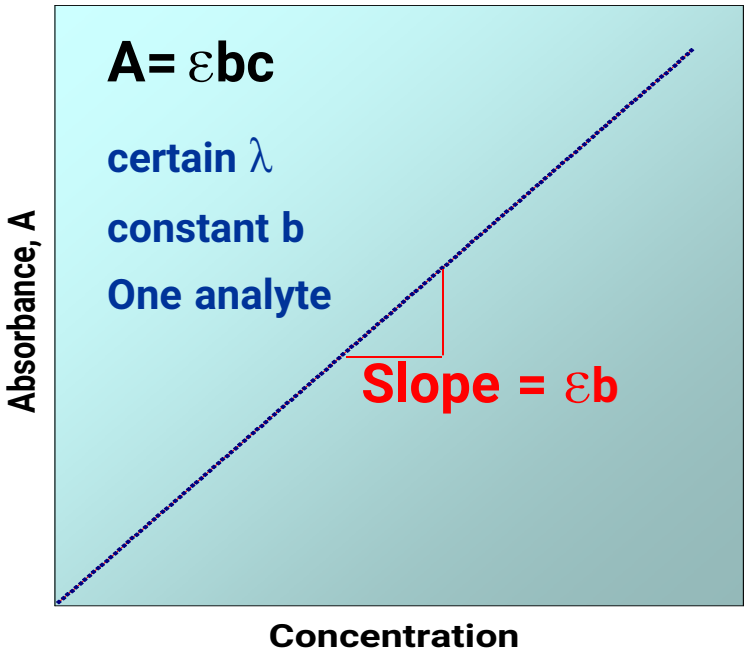
2-The path length, b, in cm

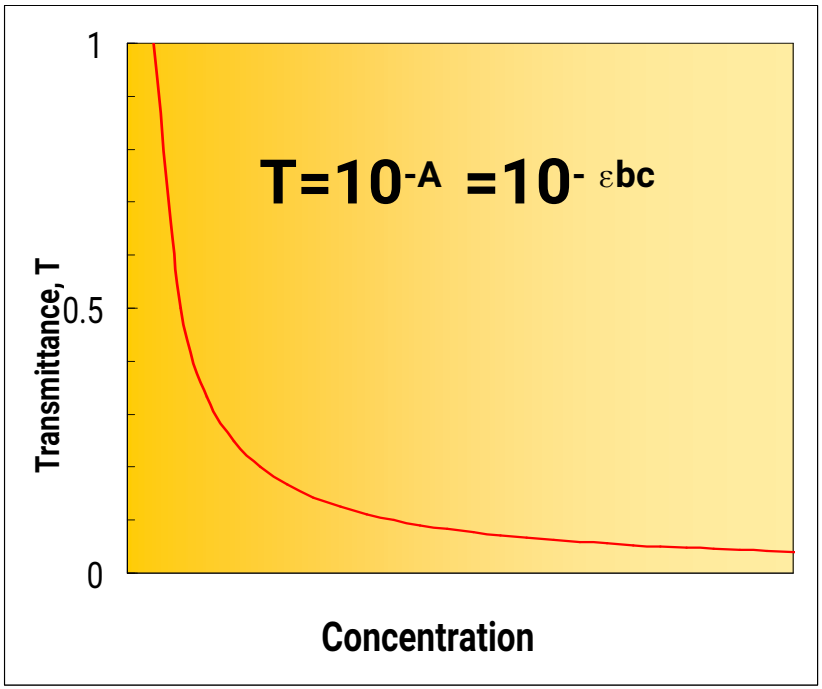
3-ε, is called the molar absorptivity or molar absorption coefficient

"Absorbance of 1 M solution measured in a cell of 1 cm path length"

$$\frac{A}{bc} \quad \frac{1}{\frac{mol}{L}\,cm} \quad L\,mol^{-1}cm^{-1} \quad M^{-1}cm^{-1}$$

ε, is characteristic for <u>each substance</u> at a <u>particular wavelength</u> λ

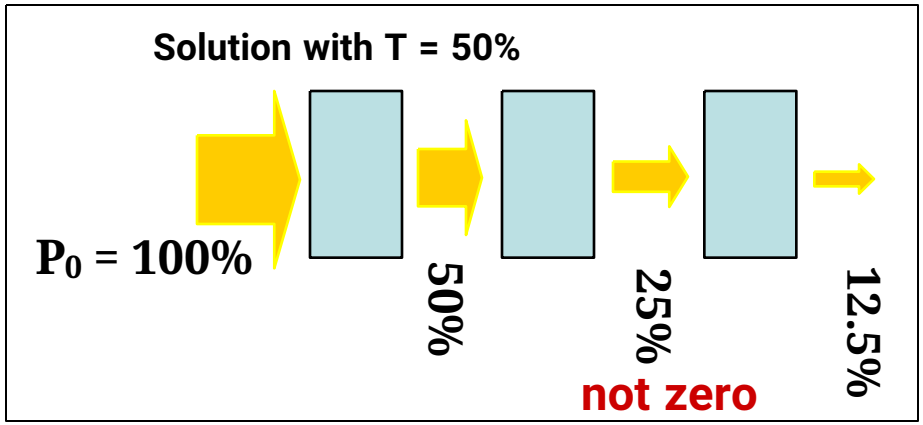




Beer's law is a relation between absorbance and concentration which is a straight line passes by origin at constant pathlength, b, and at certain wavelength, λ.

Beer's law is obeyed for monochromatic light

Transmittance decreases exponentially as concentration increases

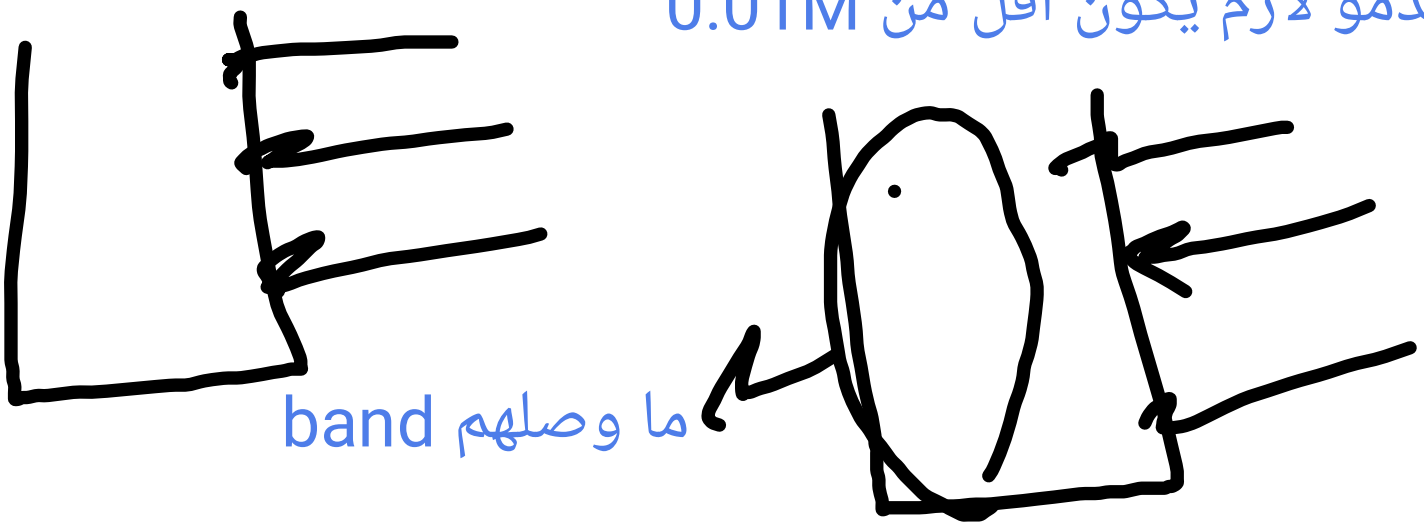


بدنا نحكي عن الجهاز اللي رح نستخدمو واللي هو
spectrophotometer هسا إحنا أول ما نشتغل عليه ما بنحط العينة
بنحط ال solvent اللي المذاب فيه ال analyte وبحط ب 2
cuvettes ال solvent واحد مكان العينة وواحد مكان ال reference
هسا بعدها هيك بتصفر الجهاز برجع بحط مكان ال sample العينة اللي
عندي ....

temperature control
sample compartment

blank
sample
shutter
source
chopper
λ_1 λ_2 λ_3
monochromator
sample
P_T
mirror
signal processor
blank
P_0
mirror
semitransparent mirror
detector

هسا بقانون beer's law بكون في عندي limitations هاي ال limitations بتسبب إنحراف العينة وبتبطل ال R تساوي واحد وبفقد ال linearity.... وهما أنواع كتيرة رح نبلش بأول وحدة وهي ال real deviations هاد الخطأ بصير بسبب زيادة التركيز كيف يعني ؟ يعني بالوضع الطبيعي لازم كل molecule تتمتص حزمة من الضوء هاي بالحالة الطبيعية لكن لما يزيد التركيز بصير في molecule عاملة زي حاجز فال molecules اللي وراها ما بصلهم band الضوء عدد الأطوال لا يساوي عدد ال molecules طبعا حلينا هاي المسكلة من خلال إنو التركيز اللي لازم أستخدمو لازم يكون أقل من 0.01M



ما وصلهم band

Beer-Lambert's law proves a direct correlation between the absorbance (A) of a molecule to the concentration (c) and the path length (b).

Derivation of Beer Lambert Law.

This relationship is a linear for the most part. However, under certain circumstances the Beer relationship gives a non-linear relationship.

These deviations from the Beer Lambert law can be classified into three categories:

Real Deviations - These are fundamental deviations due to the limitations of the law itself.

Chemical Deviations- These are deviations observed due to specific chemical species of the sample which is being analyzed.

Instrument Deviations - These are deviations which occur due to how the absorbance measurements are made.

1- Real Deviation

Beer law and Lambert law is capable of describing absorption behavior of solutions containing relatively low amounts of solutes dissolved in it (<0.01 M or 10 mM).

When the concentration of the analyte in the solution is high (> 0.01 M or 10 mM), the analyte begins to behave differently due to interactions with the solvent and other solute molecules and at times even due to hydrogen bonding interactions.

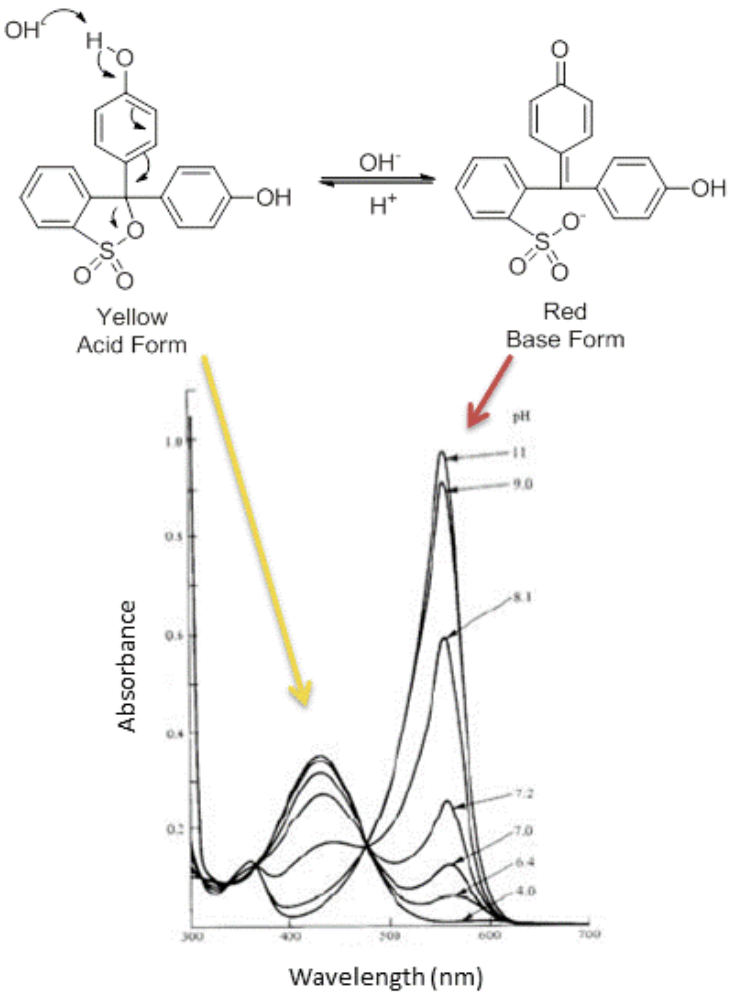
It is also possible that the concentration is so high, that the molecules create a screen for other molecules thereby shadowing them from the incident light.

المشكلة phenol red بشكل تاني متل ال base وبال acid
إذا حطيناه بوسط neutral مثل الماء بكون موجود عندي الشكلين
فبالتالي ما بقدر أحسب تركيز واحد منهم لانو جزء من هاد المركب
تحولي للشكل التاني فانا هاد بحللو يا ب acid or base...ثالث نوع
هو هو ال instrumental deviation وهو خطأ بالاجهز القديمة هسا
إحنا حكينا لما بدي أحسب ال quantity بحدد ال maximum
wavelength اللي فرضنا انو هو 500 لكن بالاجهزة القديمة المشتت
اللي بشتت باقي الأطوال ما بكون دقيق فما بعديني بس ال bands
اللي طولها الموجي 500 لا بعطيني كمان اللي طولها 501, 499,495
وهكذا هسا ال sample بس رح تمتص ال 500 والباقي ما رح
تمتصو P0رح تكون أعلى بكتير من الحقيقي والتركيز أعلى بكتير من
الحقيقي هسا الاجهزة تطوت وبطل فيعا هاي المشكلة ... آخر نوع
وهو سببو ال cuvettes لكن حلينا هاد الأمر من خلال إنو ثبتنا ال
.. thickness

2- Chemical Deviations

Chemical deviations occur due to chemical phenomenon involving the analyte molecules due to association, dissociation and interaction with the solvent to produce a product with different absorption characteristics.

For example, phenol red undergoes a resonance transformation when moving from the acidic form (yellow) to the basic form (red). Due to this resonance, the electron distribution of the bonds of molecule changes with the pH of the solvent in which it is dissolved.



3- Instrumental Deviations

A] Due to Polychromatic Radiation

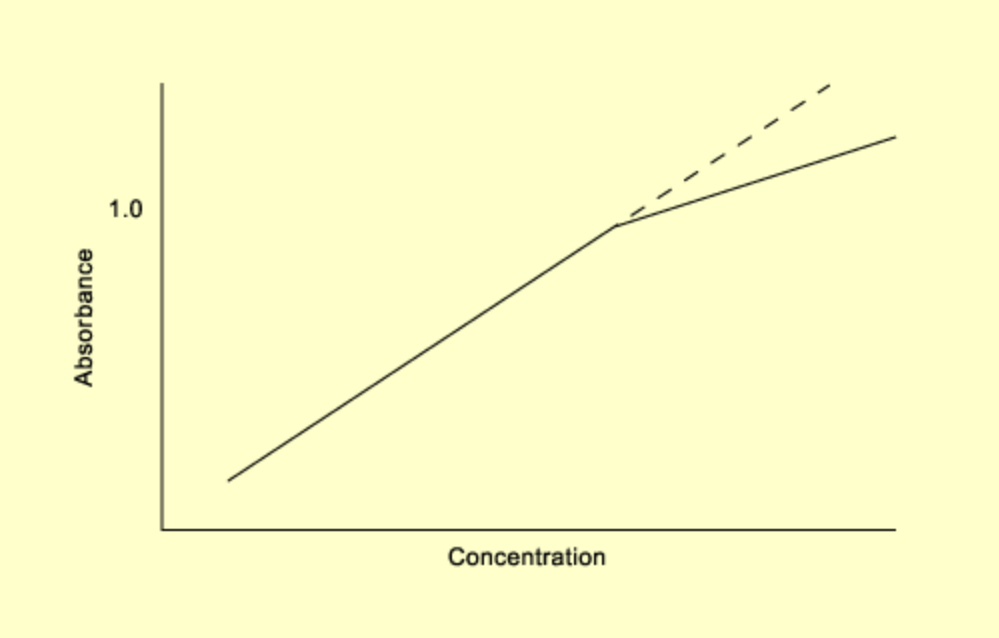
Beer-Lambert law is strictly followed when a monochromatic source of radiation exists. In practice, however, it is common to use a polychromatic source of radiation with continuous distribution of wavelengths along with a monochromators to create a monochromatic beam from this source.

B] Due to Presence of Stray Radiation

Stray radiation or scattered radiation is defined as radiation from the instrument that is outside the selected wavelength band selected. Usually, this radiation is due to reflection and scattering by the surfaces of lenses, mirrors, gratings, filters and windows. If the analyte absorbs at the wavelength of the stray radiation, a deviation from Beer-Lambert law is observed similar to the deviation due to polychromatic radiation.

C] Due to Mismatched Cells or Cuvettes

If the cells holding the analyte and the blank solutions are having different path-lengths, or unequal optical characteristics, it is obvious that there would be a deviation observed in Beer-Lambert law.



Deviations from Beer's Law

done by amarat faraj