Instrumental Analysis

Fundamentals of Spectrophotometry

Objectives

- **Fundamentals of Spectrophotometry**
  - **Properties of light**
  - **Regions of the electromagnetic spectrum**
  - **Absorption of light**
- **What happens when molecules absorb light?**
  - **Electronic energy states**
  - **Vibrational and rotational energy states**
- **Beer's Law**
- **Limitations and Deviations from Beer's Law.**

التحليل الطيفي هو أي إجراء يستخدم تفاعل الإشعاع الكهرومغناطيسي مع المادة لتحديد و/أو تقدير المادة المراد تحليلها.

Spectroscopy is any procedure that uses the interaction of Electromagnetic Radiation (EMR) with matter to *identify* and/or to *estimate* an analyte.

Quantitative Analysis

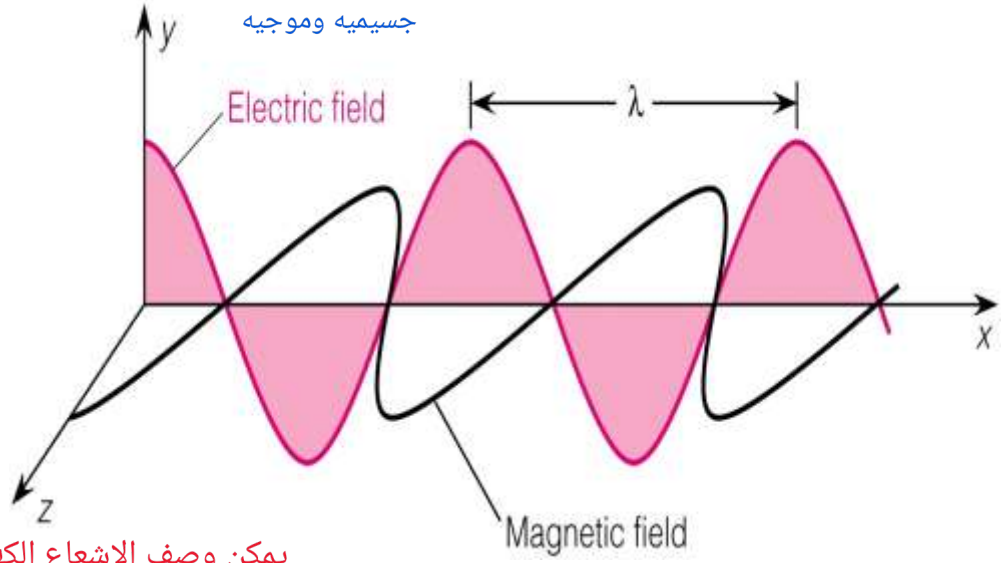
molecules	solid
ions	liquid
atoms	gas
Mixtures	solutions

Qualitative Analysis

Electromagnetic radiation (light)

انه الضوء له طبيعتين جسيميه وموجيه

- **EMR can be described in terms of both particles and waves (Dual nature of light)**
- **Light waves consist of perpendicular and oscillating electric and magnetic fields**



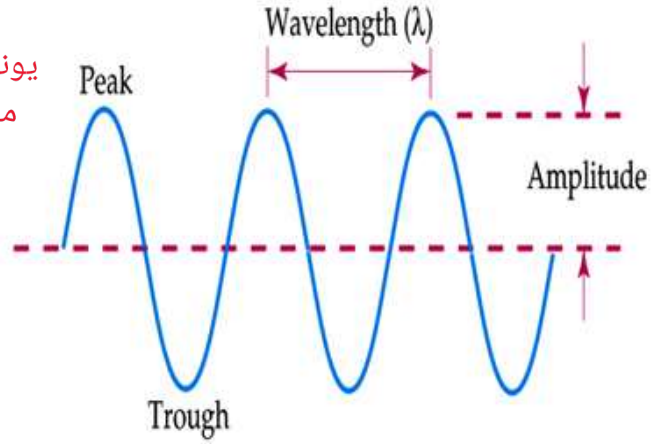
يمكن وصف الإشعاع الكهرومغناطيسي من حيث الجسيمات والموجات (الطبيعة المزدوجة للضوء). تتكون موجات الضوء من مجالات كهربائية ومغناطيسية متعامدة ومتذبذبة

Light waves can be characterized By:

Wavelength (λ, ***Greek lambda***): Distance from one wave peak to the next.

Units: m, cm, μm, nm or Å

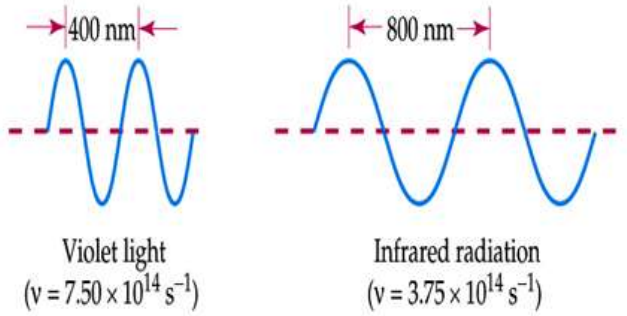
الطول الموجي (λ، يوناني): المسافة من قمة موجة إلى القمة التالية.



Frequency (υ, ***Greek nu***): Number of peaks that pass a given point per second.

Units: Cycles/second or s^{-1} or Hertz (Hz)

التردد : عدد الذروات التي تمر بنقطة معينة في الثانية. الوحدات: دورة/ثانية أو س' أو هيرتز (Hz)



Wavenumber

Number of waves per cm.

العدد الموجي :عدد الموجات لكل سم.

$$\bar{\upsilon} = \frac{1}{\lambda}$$ cm^{-1}

يمكن تفسير ظواهر مثل الانعكاس والانكسار والحيود من خلال الطبيعة الموجية للضوء.

Wave nature of light can explain phenomena such as reflection, refraction and diffraction.

Wave Calculation

The wavelength of a laser pointer is reported to be 663 nm. What is the frequency of this light?

$$\upsilon = \frac{c}{\lambda}$$

وهون زبطنا الوحدات لانه سرعه الضوء بوحده ال m/s و الطول الموجه اللي معطينا اياه بوحدهnm فبحوله ل m

$$\lambda = 663\,\text{nm} \times \frac{10^{-9}\,\text{m}}{\text{nm}} = 6.63 \times 10^{-7}\,\text{m}$$

سؤال سهل قانون وطبق

طبعا سرعة الضوء ثابته ومطلوب حفظها

$$\upsilon = \frac{3.00 \times 10^{8}\,\text{m/s}}{6.63 \times 10^{-7}\,\text{m}} = 4.52 \times 10^{14}\,\text{s}^{-1}$$

Calculate the wavelength of light, in nm, of light with a frequency of $3.52 \times 10^{14}\ s^{-1}$.

$$\lambda = \frac{c}{\upsilon}$$

$$\lambda = \frac{3.00 \times 10^{8}\ \text{m/s}}{3.52 \times 10^{14}\ \text{s}^{-1}} = 8.52 \times 10^{-7}\ \text{m}$$

$$\lambda = 8.52 \times 10^{-7}\ \text{m} \times \frac{10^{9}\ \text{nm}}{\text{m}} = 852\ \text{nm}$$

هون بعد ما طلعت الجواب على طول حولت
لوحدهnm لانه هو هيك طالب في السؤال

اهم اشي يكونوا مفصولين كل طول موجي لحال

- Electromagnetic radiation consists of discrete packets of energy, which we call photons.

يتكون الإشعاع الكهرومغناطيسي من حزم منفصلة من قبل الطاقة، والتي نسميها الفوتونات.

- Photons are the particles of light or the quanta of light.

الفوتونات هي جسيمات الضوء أو كمات الضوء.

- Each photon carries the energy, E (Joule).

يحمل كل فوتون طاقه

$$E = h\upsilon$$

where h is the Planck's constant (=6.626x10^{-34} J.s)

- The all characteristics of light can be related as follows:

يمكن ربط جميع خصائص الضوء على النحو التالي: <

$$E = h\upsilon = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\upsilon}$$

كلما زادت الطاقة، زاد التردد والعدد الموجي، وقصر الطول الموجي

هاي الجمله الدكتور ركز عليها كثير فهي مهمه

The greater the energy, the higher the frequency and wavenumber and the shorter the wavelength

The particle nature can explain phenomena like absorption and emission of light.

يمكن لطبيعة الجسيمات أن تفسر ظواهر مثل امتصاص وانبعاث الضوء.

سلايد للثوابت وكلها حفظ ولازم نحفظ ثابت بلانك بالوحدتين المختلفتين

Planck's Equation: The relationship between frequency ν of light and energy E,

$$E = h\nu$$

حفظ

h = Planck's constant = 6.6×10^{-27} $cm^2.g.\ s^{-1}$ = 6.6×10^{-34} joule.sec

In vacuum, velocity of light = $c = \nu\lambda = 3 \times 10^{10}$cm/s which gives, $\nu = c/\lambda$

$E = h(c/\lambda) = hc\bar{\nu}$ (where, $\bar{\nu} = 1/\lambda$ = wavenumber)

Energy directly proportional to wavenumber

الطاقة تتناسب طرديًا مع العدد الموجي

Calculate the energy (in joules) of a photon with a wavelength of 700.0 nm

$$\lambda = 700.0\,\text{nm} \times \frac{10^{-9}\,\text{m}}{\text{nm}} = 7.00 \times 10^{-7}\,\text{m}$$

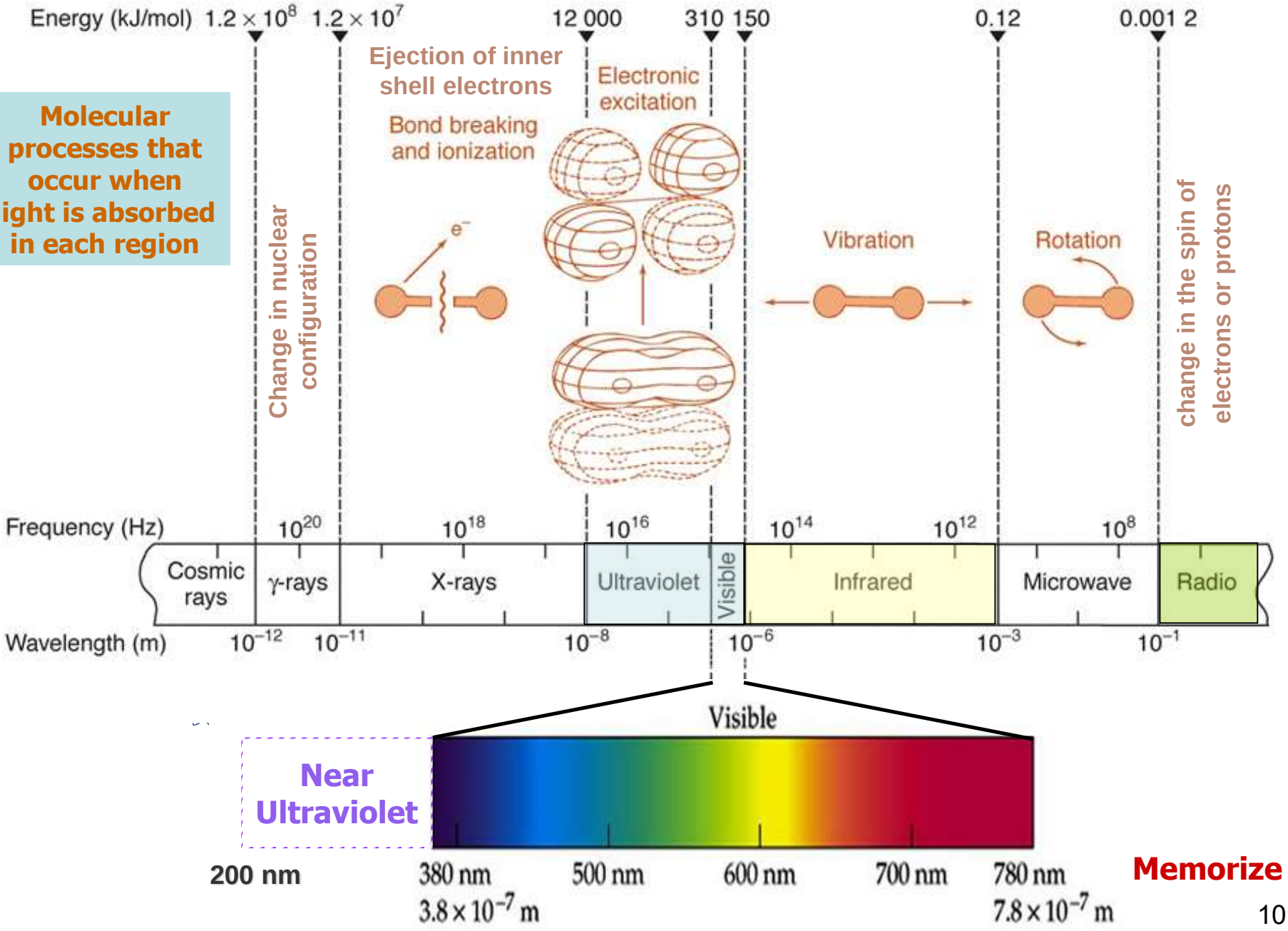
$$\upsilon = \frac{3.00 \times 10^{8}\,\text{m/s}}{7.00 \times 10^{-7}\,\text{m}} = 4.29 \times 10^{14}\,\text{s}^{-1}$$

$$E = (6.63 \times 10^{-34}\,\text{J} \cdot \text{s})(4.29 \times 10^{14}\,\text{s}^{-1})$$

$$E = 2.84 \times 10^{-19}\,\text{J}$$

Regions of electromagnetic radiation

Molecular processes that occur when light is absorbed in each region

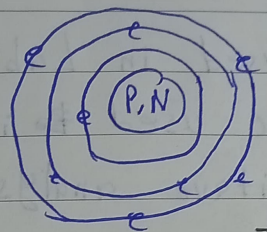


Memorize

(1) Cosmic rays : $\lambda = 10^{-4}$ nm

low $\lambda \Longrightarrow$ high Energy

* رح يتفكك كل شي من P, N, e والنواة



* have no use in Instruments.

(2) : γ rays : $\lambda = 10^{-4} - 10^{-3}$ nm

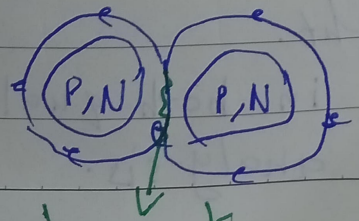
* رح تتفكك النواة لحال وال e^- لحال

* Have no use in Instruments.

(3) : X rays : $10^{-3} - 10$ nm

* ionize molecules or break bonds

بكسر الروابط بال Valance ويفقد ال e^- وله تطبيقات



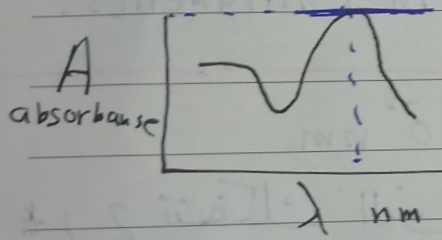
(4) : Ultraviolet → UV_a (near) 200 - 380 nm

→ UV_b (far) 10 - 200 nm

→ short $\lambda \Rightarrow$ high Energy

* UV_a is used in Lab exp

* It can be used in qualitative and quantitave analysis.



λ at which the absorbance is at it's highest value called λ_{max}.

↳ تختلف من مادة إلى أخرى.

* ~~The molecule~~ promotes e^- into higher orbital. (Emission)

(5) Visible : 380 - 780 nm.

* Act as Uv light.

* It can be used in both qualitative and quantitave analysis.

(6): Infrared:

* Bend and stretch the bond (Vibration).

* It can be used in qualitative analysis only.

(7) Microwaves:

* Rotate the bond (rotation)

* [illegible]

(8) Radio: [illegible] like sound waves.

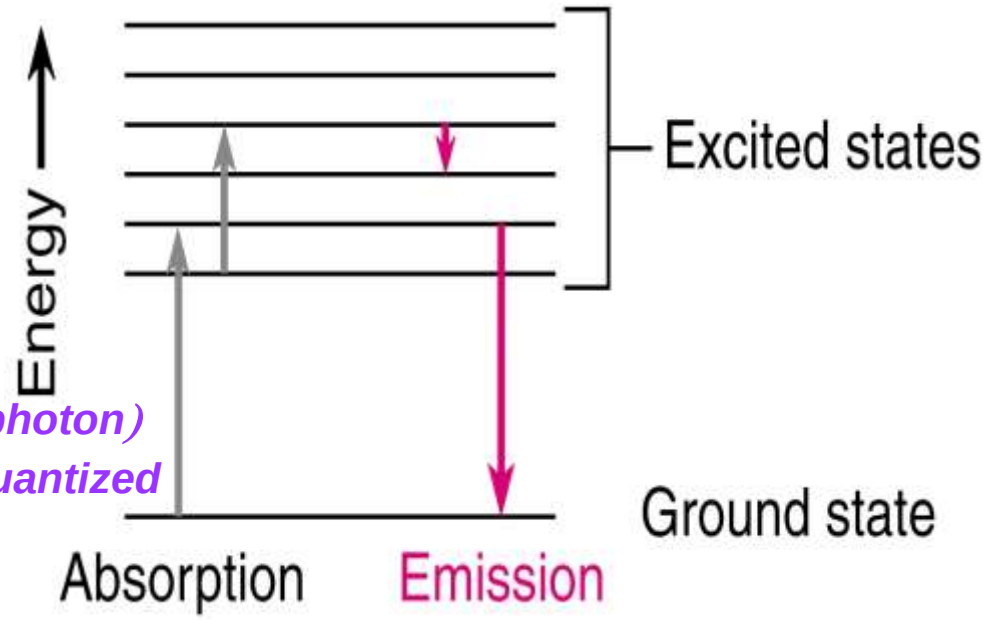
* [illegible]

* UV - Visible lights are the only lights that can be used in both qualitative and quantitative analysis.

Absorption of light

الجزيء الذي يمتص فوتونات الضوء سيكتسب طاقة متزايدة. سينتقل الجزيء إلى حالة مثارة. طاقة الموجات الدقيقة ستسبب دوران المركبات. طاقة الأشعة تحت الحمراء عالية بما يكفي لتعزيز تمدد الروابط. طاقة الأشعة فوق البنفسجية والمرئية تُعزز الإلكترونات إلى مدارات أعلى. يمكن للأشعة فوق البنفسجية القصيرة والأشعة السينية أن تُؤسّس روابط بين الجزيئات أو حتى تكسرها.

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.



$\Delta E\,(molecule) = E\,(photon)$

absorbed light is quantized

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

تعود معظم الجزيئات المثارة إلى الحالة الأرضية، مطلقةً الطاقة الزائدة على شكل حرارة.

Ultraviolet-Visible Spectrophotometry

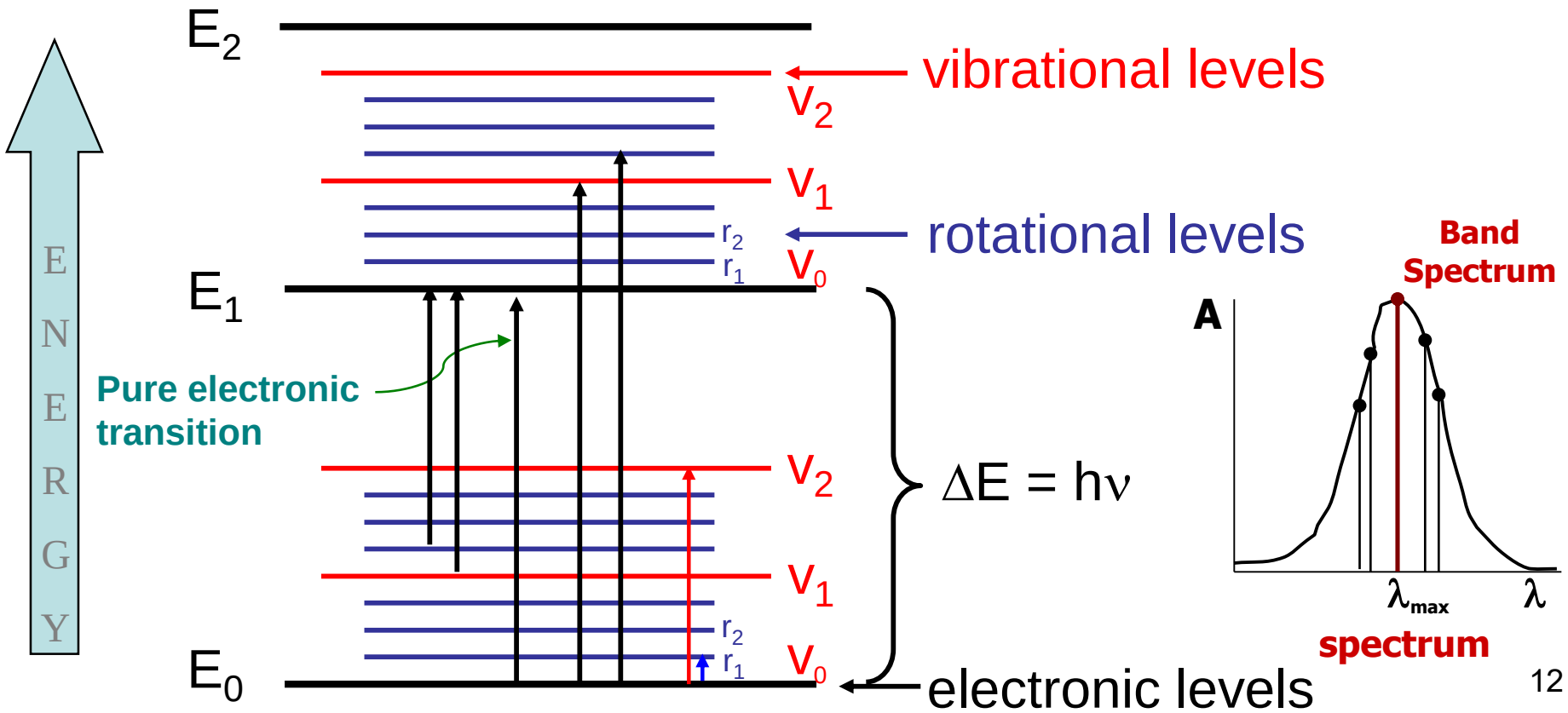
What happens when a molecule absorbs UV-Visible radiations?

- 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)

ماذا يحدث عندما يمتص جزيء إشعاعات فوق بنفسجية ومرئية؟ • عندما يمتص جزيء ضوءًا ذا طاقة كافية (مثل الأشعة فوق البنفسجية والمرئية) لإحداث انتقالات إلكترونية، (تحدث أيضًا انتقالات اهتزازية ودورانية إضافية)

- Molecule can absorb one photon of just the right energy to cause the following simultaneous changes:

• يمكن للجزيء امتصاص فوتون واحد ذي طاقة مناسبة تمامًا لإحداث التغييرات المتزامنة التالية:



1. انتقال من الحالة الإلكترونية الأرضية E إلى الحالة الإلكترونية المثارة E

1. **A transition from the ground electronic state E_0 to the E_1 excited electronic state**

2. تغير في الطاقة الاهتزازية من الحالة الاهتزازية الأرضية E1 إلى حالة اهتزازية مثارة E2

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**

3. انتقال من حالة دورانية E0 إلى حالة دورانية مختلفة E1.

4. **All the above transitions are quantized which means that they required certain exact amount of energy**

4. جميع الانتقالات المذكورة أعلاه مُكمّمة، مما يعني أنها تتطلب مقدارًا محددًا من الطاقة.

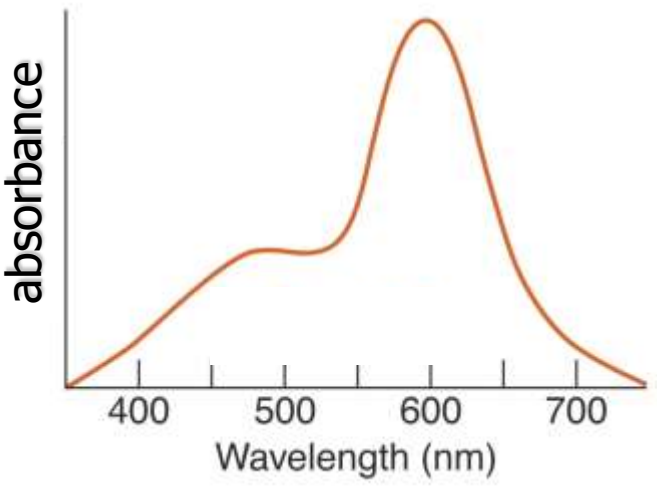
5. **Thus, total energy absorbed = $E_{elec} + E_{vib} + E_{rot}$**

5. وبالتالي، فإن إجمالي الطاقة الممتصة =

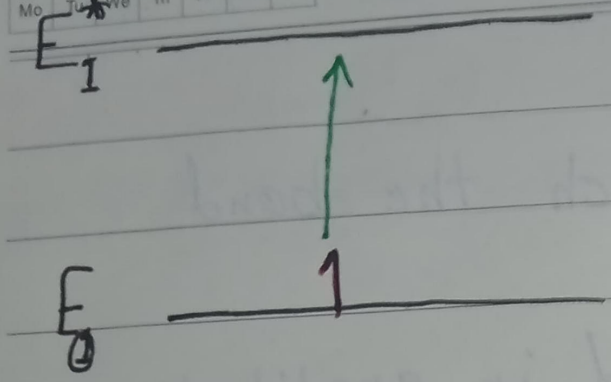
$$\Delta E_{elec} >> \Delta E_{vib} >> \Delta E_{rot}$$

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

ونتيجة لذلك، يمتص الجزيء عددًا كبيرًا من الفوتونات ذات أطوال موجية معينة. هذه الأطوال الموجية الفردية كثيرة جدًا ومتقاربة جدًا، ويتم الحصول على طيف من نطاقات واسعة من الأطوال الموجية الممتصة



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



UV–Visible
من e⁻ ينتقل 2/
ground state
to the next
excited level
لازم change يحدث
Vibration + rotation

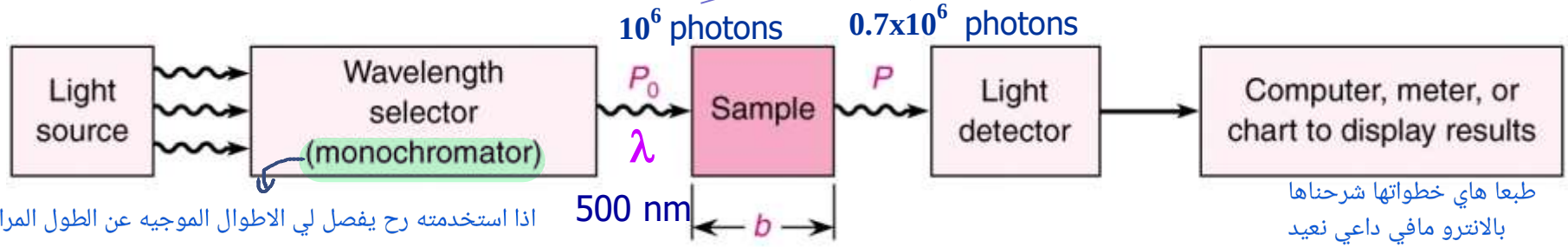
IR
change in
Vibration
+
rotation
only

Microwave
change in
rotation
only

* $E_{absorbed\ tatal} = E_{e^-} + E_{vibration} + E_{rotation}$

Transmittance and Absorbance

T = 0.7, %T = 70%, A = 0.155



اذا استخدمته رح يفصل لي الاطوال الموجيه عن الطول المراد

طبعا هاي خطواتها شرحناها بالانترو مافي داعي نعيد

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.

هناك كميتان تربطان التغير في شدة أو قدرة الإشعاع الكهرومغناطيسي قبل، Po، وبعد، P، التفاعل مع المادة.

1. النفاذية، T، تُعرَّف ببساطة على أنها "جزء الضوء الذي يصل إلى الكاشف بعد مروره عبر العينة"

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

الخارج على الداخل

$$T = \frac{P}{P_\circ}$$

0 ⩽ T ⩽ 1 unitless

كل ما كانت القيمه اقرب للواحد معناته الشفافيه عاليه والامتصاص قليل والعكس كل ما كانت القيمه اقرب للصفر معناته الشفافيه قليله والامتصاص عالي

The percent transmittance, %T, is simply 100 T

$$\%T = \frac{P}{P_\circ} x\,100$$

0 < %T < 100

2. **Absorbance, defined as:**

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

For purpose of chemical analysis

Absorbance is directly proportional to:

يتناسب الامتصاص طرديًا مع:
1. تركيز، c، الأنواع الممتصة في العينة (A a c)
2. طول مسار الضوء، b، عبر العينة (A a b)

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

المعادلة السابقة هي جوهر قياس الطيف الضوئي كما هو مطبق على الكيمياء التحليلية، وتسمى قانون بير-لامبرت أو ببساطة قانون بير

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

2-The path length, b, in cm

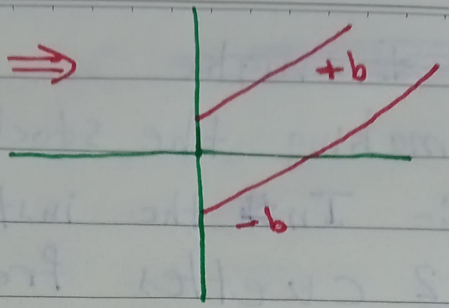
3-ε, is called the molar absorptivity or molar absorption coefficient

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

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

ε, is characteristic for each substance at a particular wavelength, λ.

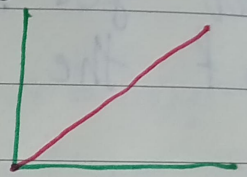
$y = mx \pm b \Rightarrow$



but if the intercept = 0

$A = (\varepsilon b)c$

$y = m x$



* b here is not intercept, it is the Path length of Cuvettes, which is 1 cm.

Deviations of bears law :-

↳ $R^2 < 0.88$

(A) Real :-

يجب أن يكون التركيز أقل من 0.01 M ليش !!

1) More interactions, hydrogen bonds.
2) Molecules create a screen (حجب الضوء)

B) chemical :-

* تختلف من وسط حمضي لقاعدي

يعني مادة مثل ال Phenol red بتضل تتحول من

2 Phases, 2 Peaks — base (red) ← acid (yellow) form

acid or base الحل: أضيف NaOH or Hcl وبجول كلا

1 Phase → 1 Peak

C) Instrumental :-

1 - Polychromatic :- عدم تفكك الأطوال الموجية بشكل كامل ودقيق باستخدام المنشور لتحليل الضوء

الحل: مهاروا يستخدموا شريحة بتحلل 100%.

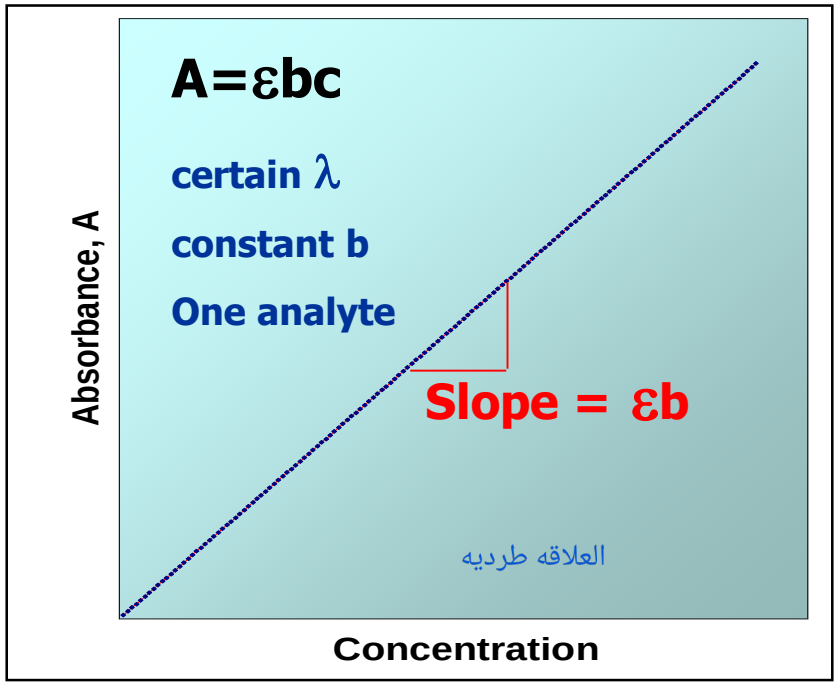
2 - Stray radiation :- الضوء يرجع يتداخل بسبب ال mirror او أنها تمتص هذا الضوء الحال.

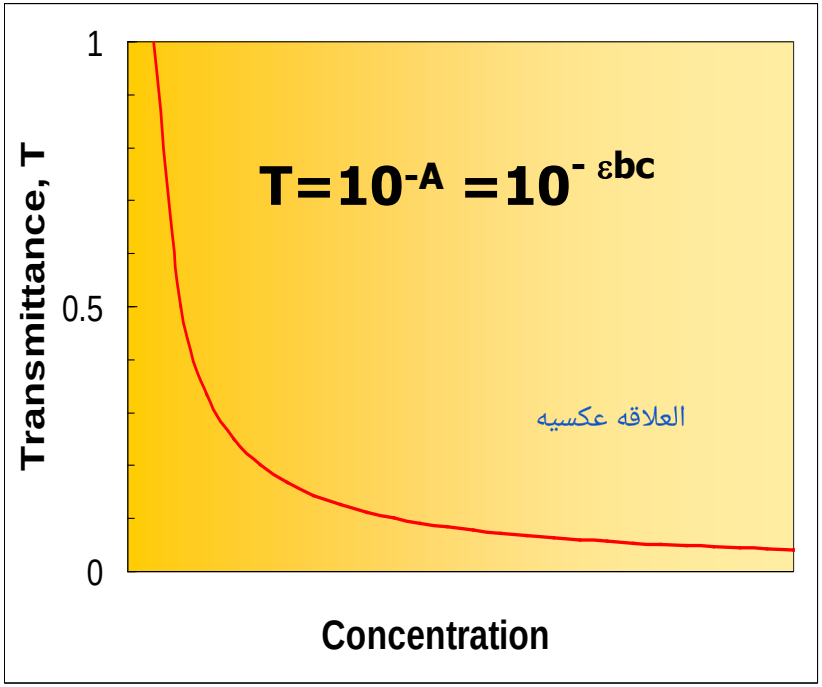
3 - Mismatched cuvettes :-

* Different Path length (b) 1 cm ✓ — 1.5 cm ✗

* العينة ملونة ← Visible ← 400-780 ← Plastic

* العينة غير ملونة ← Uv-Vis ← 200-780 ← Quartz





قانون بير هو علاقة بين الامتصاصية والتركيز، وهو خط مستقيم يمر بنقطة الأصل عند طول مسار ثابت، b، وعند طول موجي معين، λ.

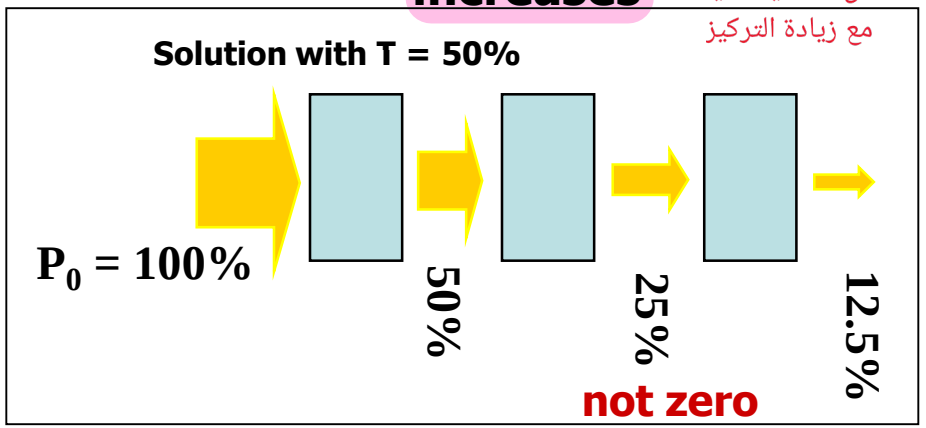
Beer's law is a relation between absorbance and concentration which is a straight line passes by origin at constant pathlength, b, and at certain wavelength, λ.

Beer's law is obeyed for monochromatic light

ينطبق قانون بير على الضوء أحادي اللون

Transmittance decreases exponentially as concentration increases

تنخفض النفاذية أسّيًا مع زيادة التركيز



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

يثبت قانون بير-لامبرت وجود علاقة طردية بين امتصاص (A) الجزيء وتركيزه (c) وطول مساره (b)

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.

هذه العلاقة خطية في معظمها. ومع ذلك، في ظل ظروف معينة، تعطي علاقة بير علاقة غير خطية.

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:

يمكن تصنيف هذه الانحرافات عن قانون بير-لامبرت إلى ثلاث فئات:

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

الانحرافات الحقيقية - هذه انحرافات جوهرية ناتجة عن قيود القانون نفسه.

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

الانحرافات الكيميائية - هذه انحرافات تُلاحظ بسبب أنواع كيميائية محددة للعينه التي يتم تحليلها

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

انحرافات الجهاز - هي انحرافات تحدث نتيجة لطريقة قياس الامتصاص.

1- Real Deviation

يمكن لقانون بير وقانون لامبرت وصف سلوك امتصاص المحاليل التي تحتوي على كميات منخفضة نسبيًا من المواد المذابة فيها (<0.01 مولار أو 10 ملي مولار).

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).

عندما يكون تركيز المادة المراد تحليلها في المحلول مرتفعًا (> 0.01 مولار أو 10 ملي مولار)، تبدأ المادة في التصرف بشكل مختلف نتيجةً لتفاعلاتها مع المذيب وجزيئات المذاب الأخرى، وأحيانًا حتى بسبب تفاعلات الرابطه الهيدروجينيه

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.

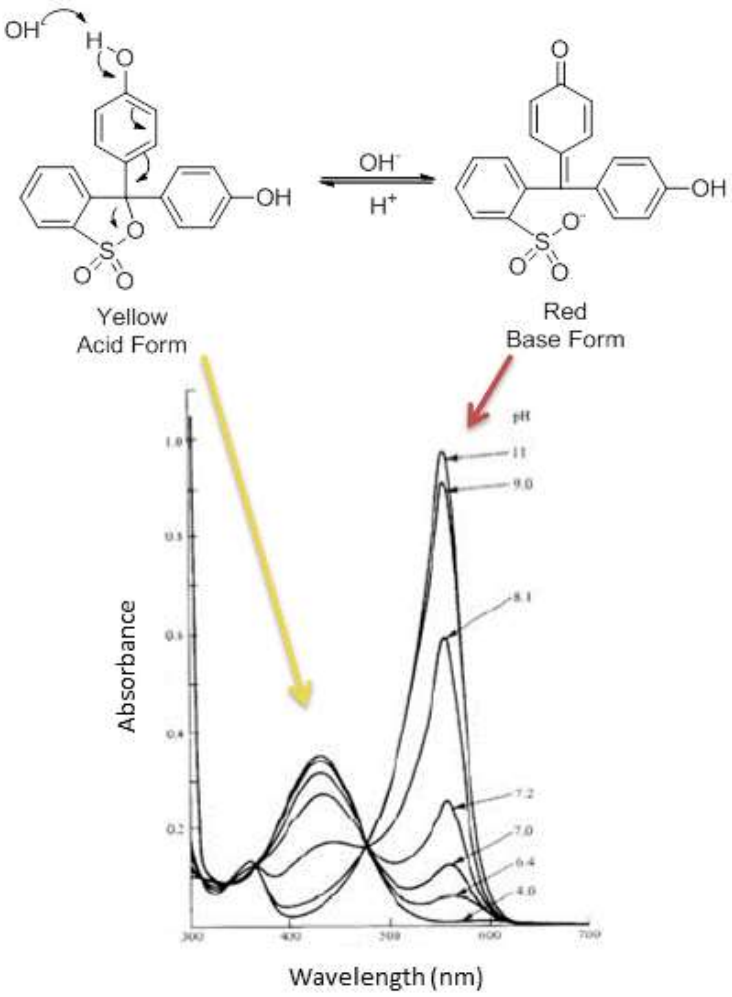
It is also possible that the concentration is so high, that the molecules create a screen for other molecules thereby shadowing them from the incident light.

من الممكن أيضًا أن يكون التركيز مرتفعًا جدًا لدرجة أن تُشكّل الجزيئات حاجزًا للجزيئات الأخرى، وبالتالي تحجبها عن الضوء الساقط.

2- Chemical Deviations

تحدث الانحرافات الكيميائية بسبب ظواهر كيميائية تشمل جزيئات المادة المراد تحليلها نتيجة للارتباط والتفكك والتفاعل مع المذيب لإنتاج منتج ذي خصائص امتصاص مختلفة.

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.

على سبيل المثال، يخضع الفينول الأحمر لتحول رنيني عند الانتقال من الشكل الحمضي (الأصفر) إلى الشكل القاعدي (الأحمر). بسبب هذا الرنين، يتغير توزيع الإلكترونات في روابط الجزيء مع درجة حموضة المذيب الذي يذوب فيه.

3- Instrumental Deviations

أ) بسبب الإشعاع متعدد الألوان

يُتبع قانون بير-لامبرت بدقة عند وجود مصدر إشعاع أحادي اللون. ومع ذلك، من الشائع عمليًا استخدام مصدر إشعاع متعدد الألوان ذي توزيع مستمر للأطوال الموجية مع أحادي اللون لإنشاء حزمة أحادية اللون من هذا المصدر.

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

ب) بسبب وجود إشعاع شارد

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.

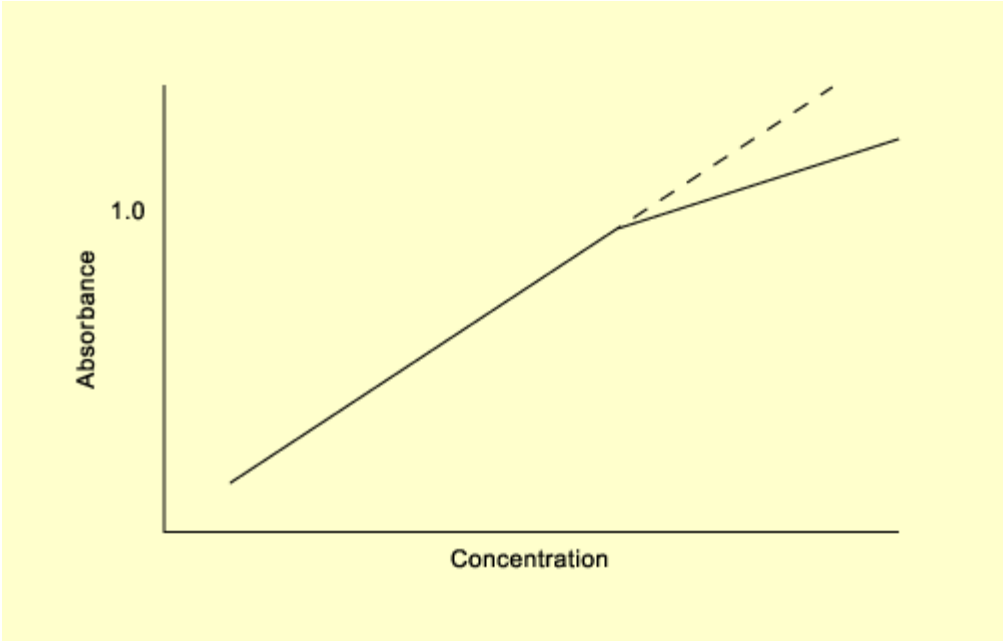
يُعرَّف الإشعاع الشارد أو الإشعاع المتناثر بأنه الإشعاع الصادر من الجهاز والذي يقع خارج نطاق الطول الموجي المحدد. عادةً ما يكون هذا الإشعاع ناتجًا عن الانعكاس والتشتت بواسطة أسطح العدسات والمرايا والمحززات والمرشحات والنوافذ. إذا امتصت المادة المراد تحليلها عند طول موجة الإشعاع الشارد، يُلاحظ انحراف عن قانون بير-لامبرت مشابه للانحراف الناتج عن الإشعاع متعدد الألوان.

ج) بسبب عدم تطابق الخلايا أو الكوفيتات

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.

إذا كانت الخلايا التي تحتوي على المادة المراد تحليلها والمحاليل الفارغة لها أطوال مسار مختلفة، أو خصائص بصرية غير متساوية، فمن الواضح أنه سيتم ملاحظة انحراف في قانون بير-لامبرت.



Deviations from Beer's Law