

UV – Vis spectrometer

강민기

Korea University at Sejong

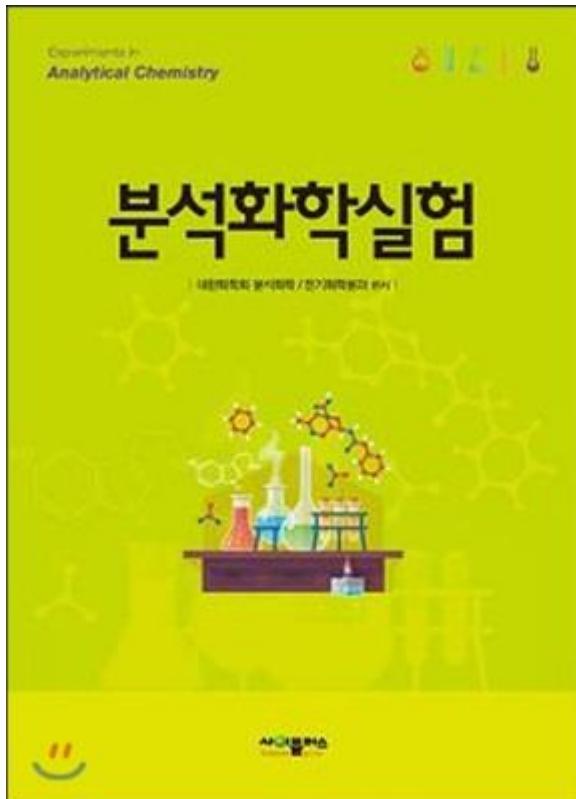
Department of Advanced Materials Chemistry

kangmg@korea.ac.kr

분석화학실험 세미나

2020 . 11 . 09

0. 들어가기 전



실험 23 UV-VIS 분광광도법: 표준물 첨가법과 분광법을 이용한 강철 속 망가니즈(Mn) 함량 분석 223

실험 24 UV-VIS 분광광도법을 이용한 평형 상수 결정 235

실험 25 UV-VIS 분광광도법을 이용한 1,10-phenanthroline에 의한 Fe의 정량 243

실험 26 UV-VIS 분광광도법을 이용한 비타민 정에 함유된 철분의 정량 분석 256

실험 27 UV-VIS 분광광도법을 이용한 과망간산포타슘 수용액의 흡광곡선 작성 및 미지 시료의 농도 결정 268

중요한 결론들은 영상 뒷부분에 요약했습니다 !

Overview

① UV-Vis spectrometer의 간단한 소개

② 정량 분석의 이론

③ 정성 분석의 이론

④ 요약

⑤ 참고문헌

Content Details

① UV-Vis spectroscopy의 간단한 소개

1. UV-Vis spectrometer

UV-Vis spectrometer의 역사

Ultraviolet – Visible Light의 에너지 크기

무엇을 할 수 있을까? : 정량 분석 / 정성 분석

1. UV-Vis spectrometer의 역사



Fig. 상업적으로 판매된 첫 UV-Vis spectrophotometer, Beckman spectrophotometer (1941)

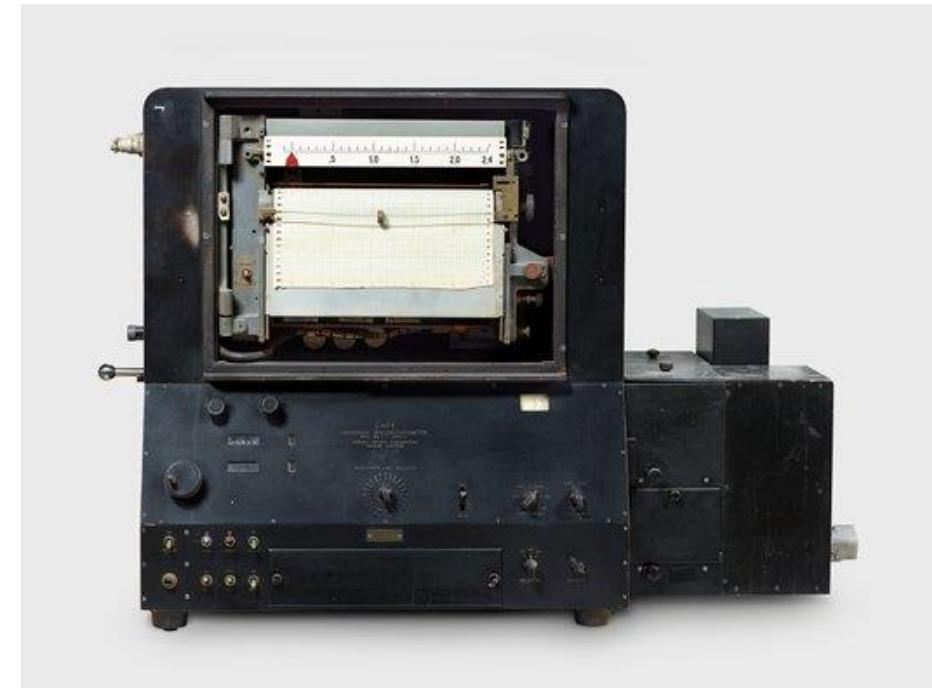


Fig. 상업적으로 판매된 첫 기록 가능한 UV-Vis spectrophotometer, Cary 11MS (1947)

Source : (right) <https://digital.sciencehistory.org/works/8623hz29n>

(left) <https://www.the-scientist.com/foundations-old/the-first-commercial-uv-vis-spectrometer-47756>

1. Ultraviolet – Visible Light의 에너지 크기

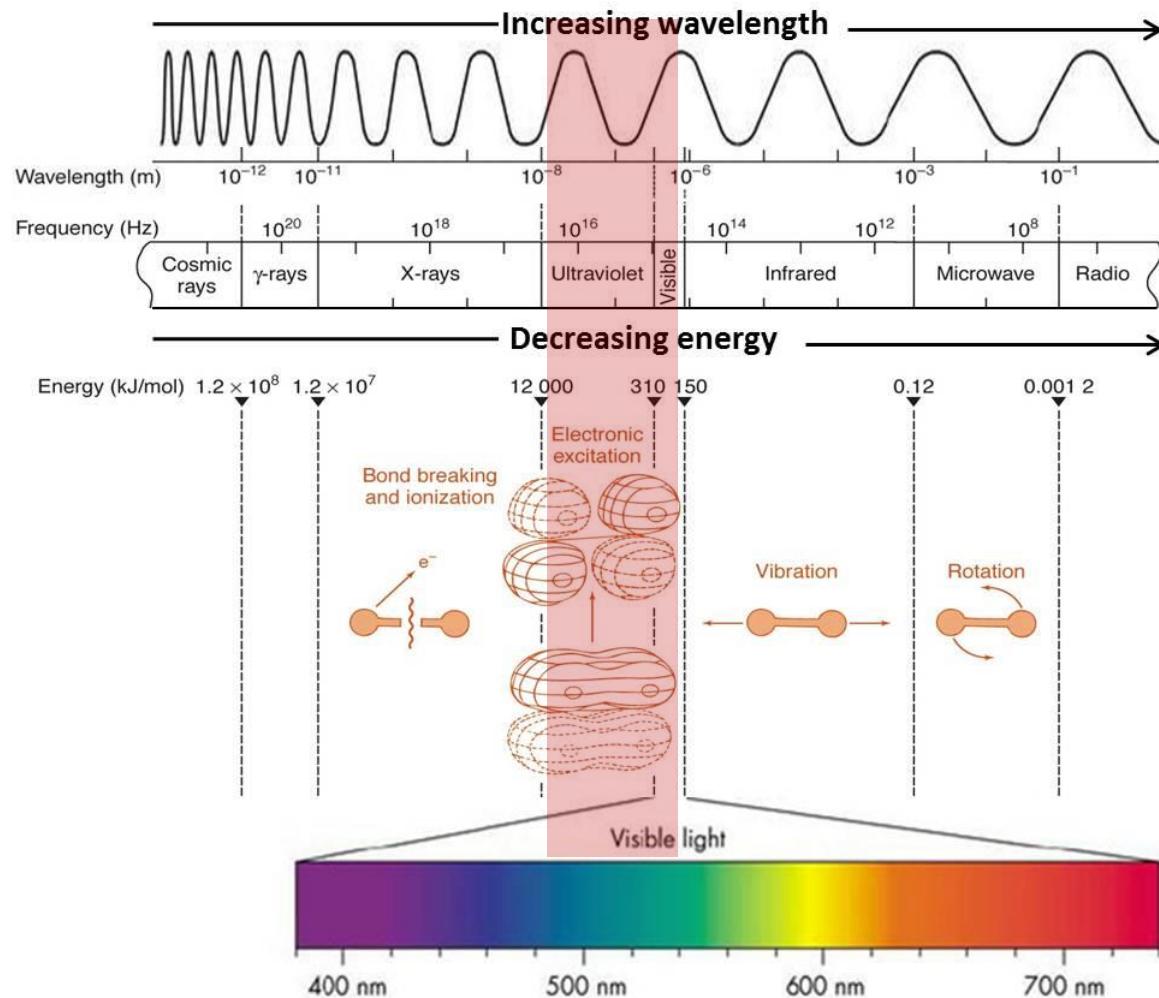


Fig. 파장에 따른 물질과의 상호작용 차이

- 기본적으로 분광학(spectroscopy)은 빛과 물질의 상호작용을 연구하는 분야
- Near-UV ~ Vis는 약 200 – 770 nm 부근
- 파장에 따라서,
 - UV-vis 계열 : 전자 전이 확인
 - Far-UV – X ray : 전자구조 확인
 - IR : 분자의 진동 확인

1. 무엇을 할 수 있을까? : 정성 분석(left) / 정량 분석(right)

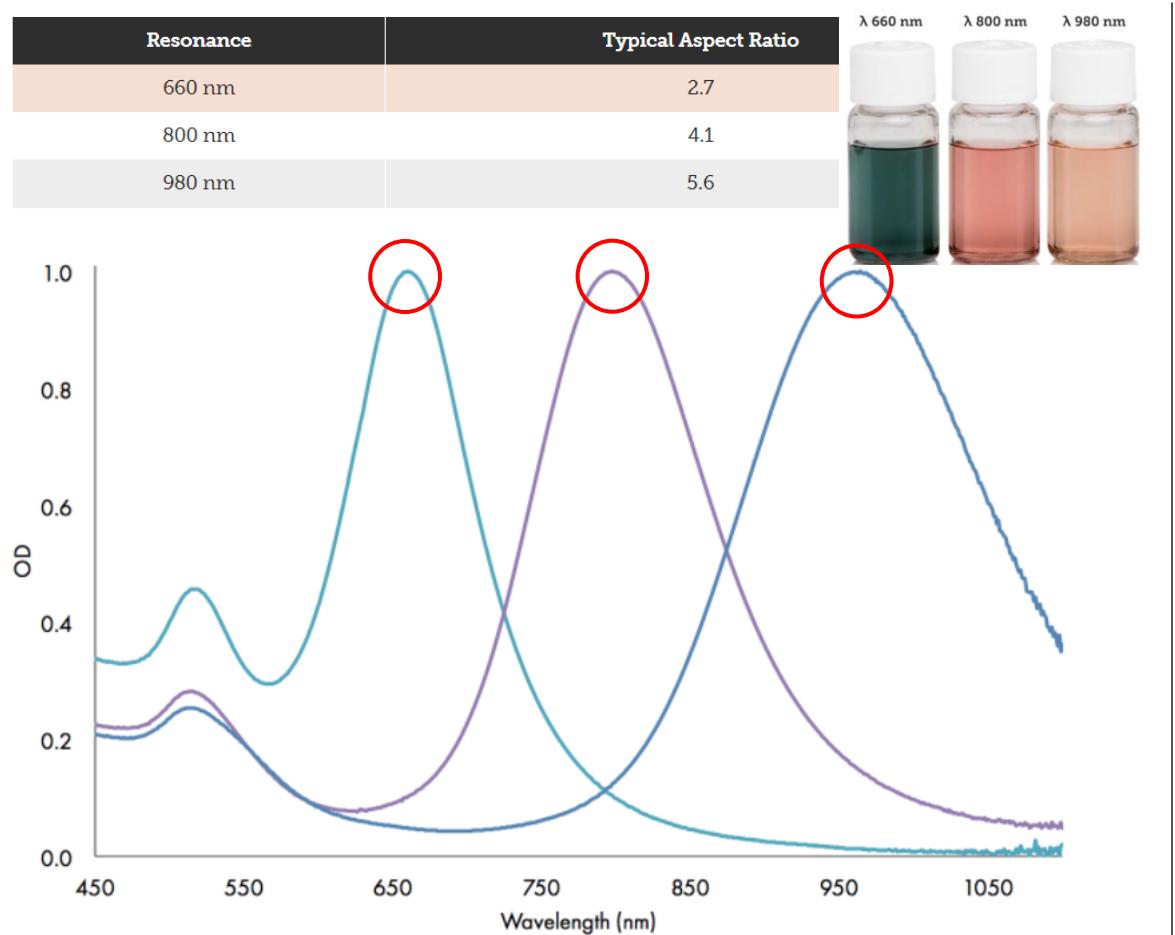


Fig. Gold NPs의 aspect ratio에 따른 흡광도

정성 분석(left)

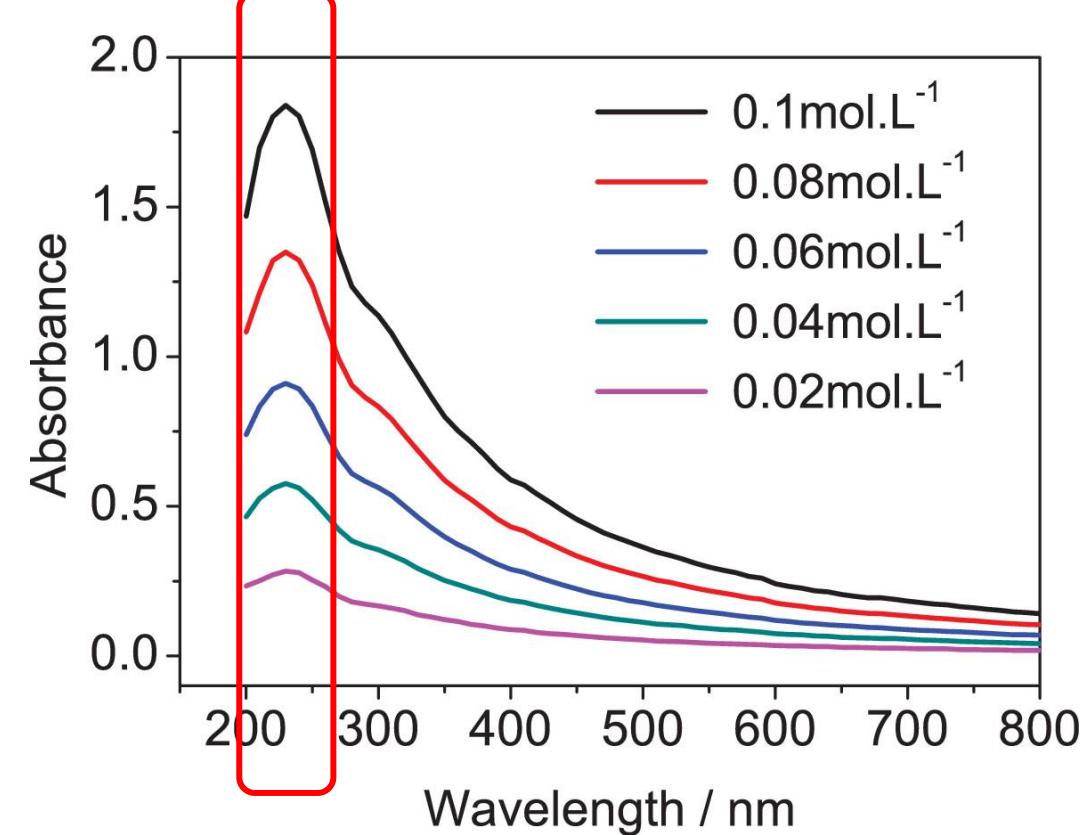


Fig. Graphene oxide의 농도에 따른 흡광도

정량 분석(right)

Content Details

② 정량 분석의 이론

2.1 Beer–Lambert Law의 기원

Bouguer's discovery and Lambert's Law

Beer's Law

2.2 현대의 Beer–Lambert Law ##(\epsilon의 의미? 각각 파장, 온도에 의존) 혼합물에서의 적용

2.3 Beer–Lambert Law의 한계와 편차 : 기본 가정과 화학오차, 기기오차

기본 가정

화학 편차

흡광도의 크기

기기 편차

2.1 Bouguer's discovery and Lambert's Law

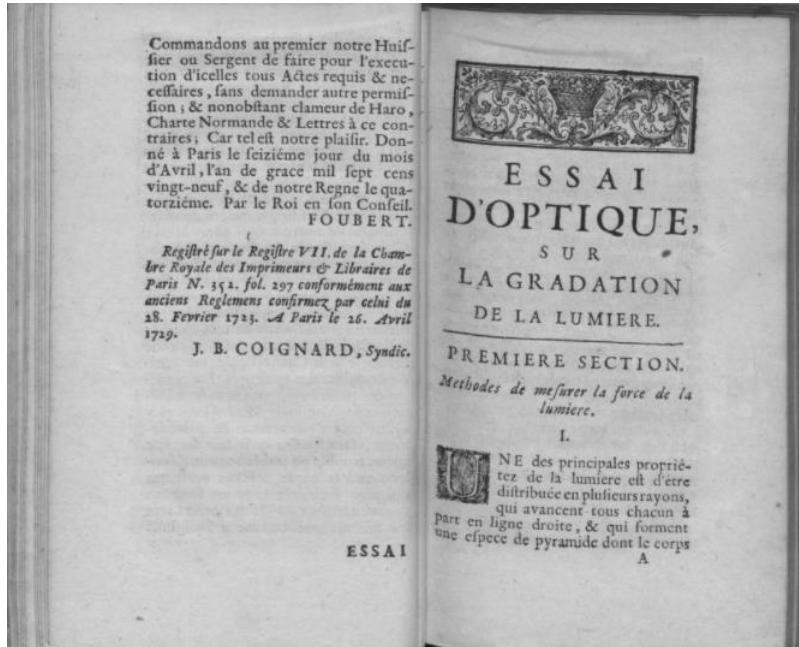


Fig. Bouguer, Pierre(1729)의 저서
Essai d'optique sur de la lumiere

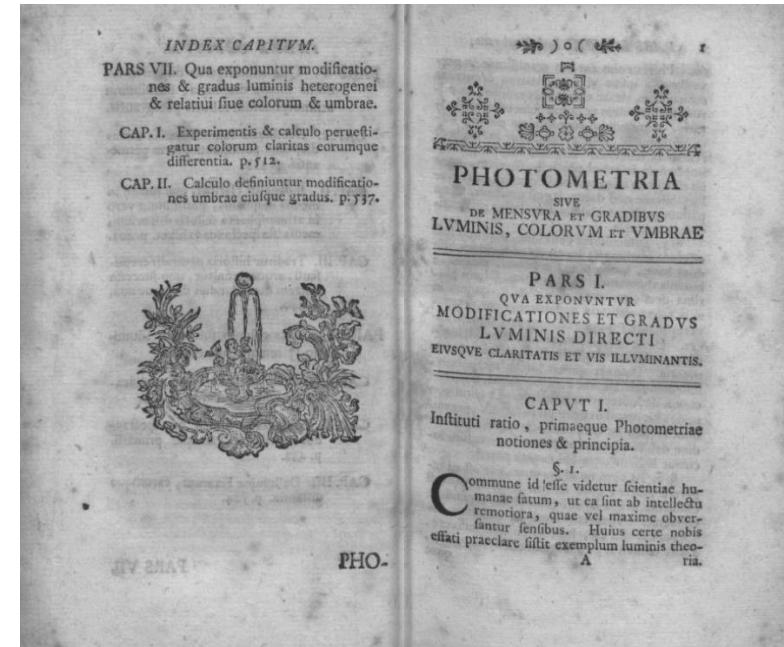


Fig. Lambert, J.H. (1760)의 저서
Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae

- Bouguer는 물질이 빛을 흡수하는 정도가 시료관의 거리에 비례한다는 것을 발견
- Lambert는 별다른 발견 없이, Bouguer의 발견을 그의 저서에 인용함[1]

2.1 길이 효과

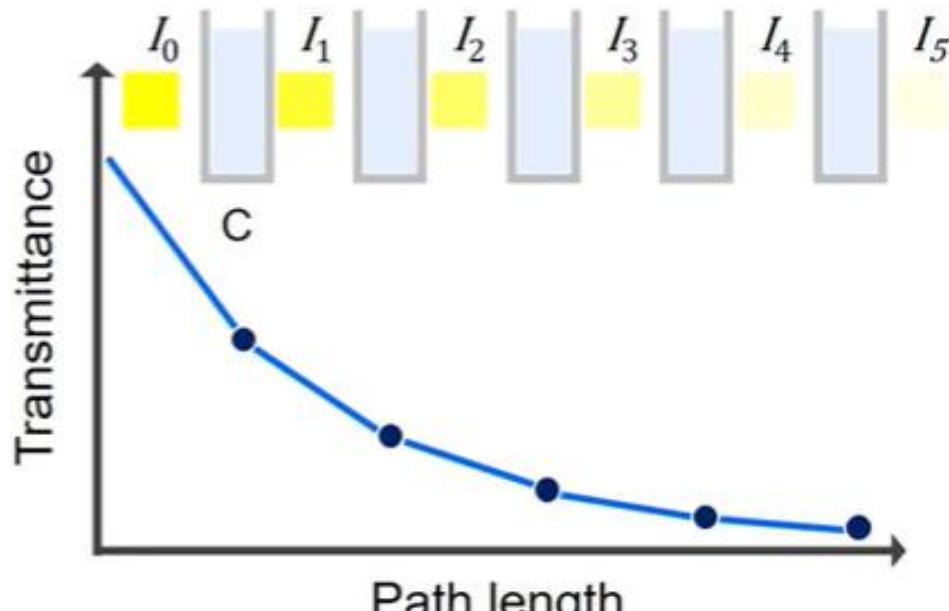


Fig. 길이에 따른 빛의 감쇠

- 길이가 긴 시료관을 지나면 빛의 감쇠가 심함

2.1 Lambert's Law

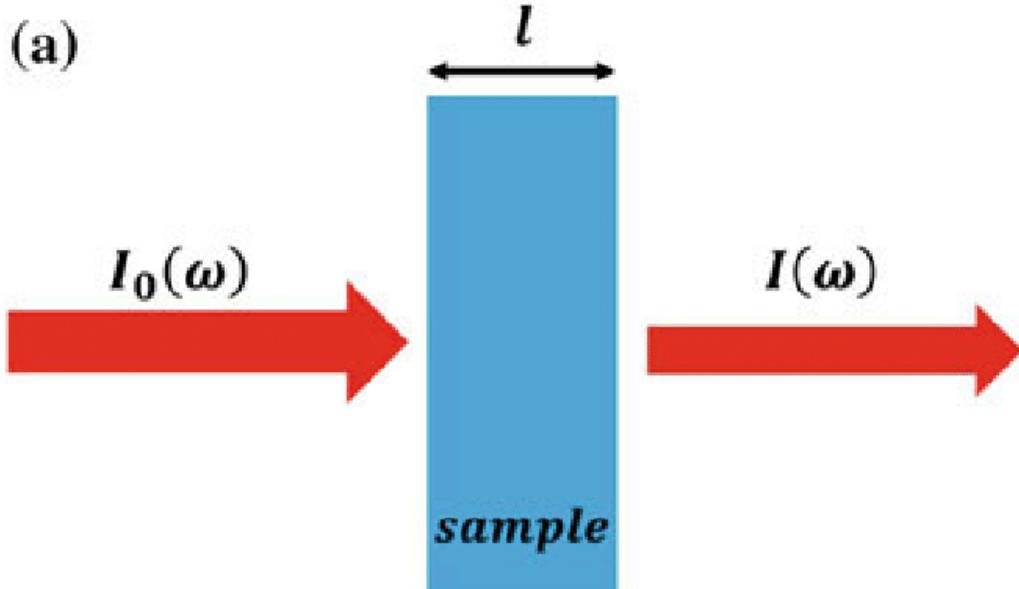


Fig. 길이가 l 인 시료관을 통과하는 빛
처음 빛의 세기 : I_0

통과 후 빛의 세기 : I

식 정리

$$\frac{dI}{I} = -Kl \quad (1)$$

$$\int \frac{dI}{I} = \int -Kdl \quad (2)$$

$$\log I = -Kl + C \quad (3)$$

If $I = I_0$ at $l = 0$,

$$C = \log I_0 \quad (4)$$

$$I = I_0 e^{-Kl} \quad (5)$$

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = Kl \quad (6)$$

- 빛의 감쇠는 빛의 세기에 대한 비율에 의존 equ (1)
- 빛의 감쇠는 시료관의 거리에 의존

e.g)

$$100 \rightarrow 3 \quad \text{Abs. log}(100/3)$$

$$1000 \rightarrow 30 \quad \text{Abs. log}(100/3) \quad (\text{O})$$

$$1000 \rightarrow 3 \quad \text{Abs. log}(1000/3) \quad (\text{X})$$

2.1 Beer's Law

78

III. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten; von Beer in Bonn.

Oftmals schon ist die Absorption des Lichtes beim Durchstrahlen gefärbter Substanzen zum Gegenstande des Versuchs gemacht worden; man richtete hiebei jedoch immer nur das Augenmerk auf die relative Schwächung der verschiedenen Farben oder, bei krystallisierten Körpern, auf die Beziehung zwischen der Absorption und der Polarisations-Richtung. Ueber die absolute Gröfse der Absorption, welche irgend ein bestimmter Lichtstrahl bei der Fortpflanzung in einem adiaphanen Mittel erleidet, liegt meines Wissens Nichts vor. Nur mit Rücksicht hierauf theile ich in diesem Aufsatze eine Reihe von Maafsbestimmungen der absorbirenden Kraft mit. Andererseits nämlich entgeht mir die Unvollständigkeit meiner Bestimmungen keineswegs. Sie beziehen sich nur auf rothes Licht, wie es von einem dunkelrothen Glase geliefert wird. Wünscheuswerth aber wäre es, jedesmal die Absorption von wenigstens allen Hauptfarben des Spectrums zu erhalten. Diels kann jedoch nur mit viel complicirteren Einrichtungen erreicht werden, als mir zu Gebote stehen. Ein Gleiches ist zu bemerken in Betreff des Umstandes, dass ich nicht mit Sonnenlichte, sondern mit Lampenlichte operirte. Ich sah mich deshalb genöthigt, meist nur geringe Dicken oder verdünnte Lösungen der färbenden Salze (denn auf solche habe ich mich beschränkt) dem Versuche zu unterwerfen; hierdurch wird aber der Werth der numerischen Ergebnisse in sofern vermindert, als aus ihnen nicht mit Sicherheit aufwärts auf die Absorption in concentrirteren Lösungen oder bei gröfseren Dicken, sondern nur abwärts gefolgt werden darf.

Fig. Beer (1852). *Bestimmung der Absorption
des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \alpha(C * l)$$

- 농도와 길이의 곱이 일정하면, 흡광도가 항상 같음
 α 는 상수, C는 농도

C	l
4	1
2	2
1	4

Content Details

② 정량 분석의 이론

2.1 Beer–Lambert Law의 기원

Bouguer's discovery and Lambert's Law

Beer's Law

2.2 현대의 Beer–Lambert Law

2.3 Beer–Lambert Law의 한계와 편차 : 기본 가정과 화학오차, 기기오차

기본 가정

화학 편차

흡광도의 크기

기기 편차

2.2 현대의 Beer–Lambert–Bouguer Law

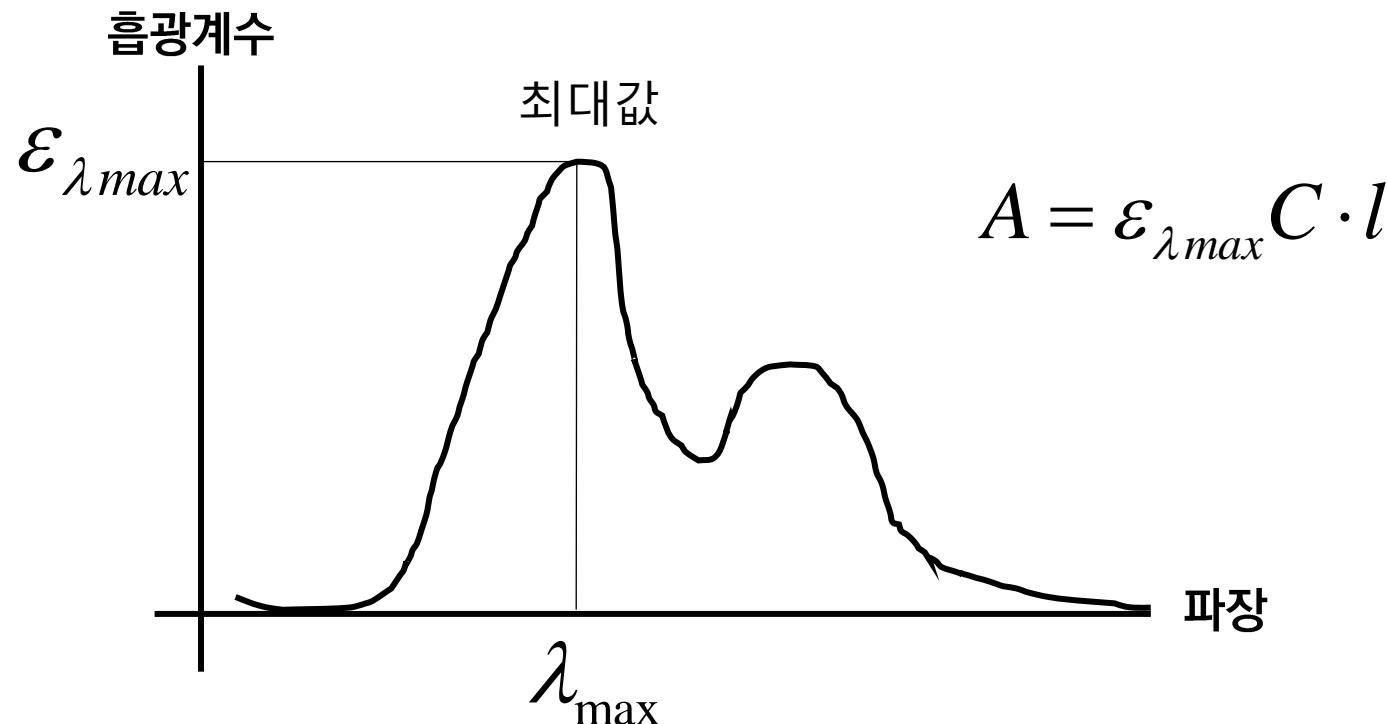
가장 간단한 Beer–Lambert law

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \varepsilon * C * l$$

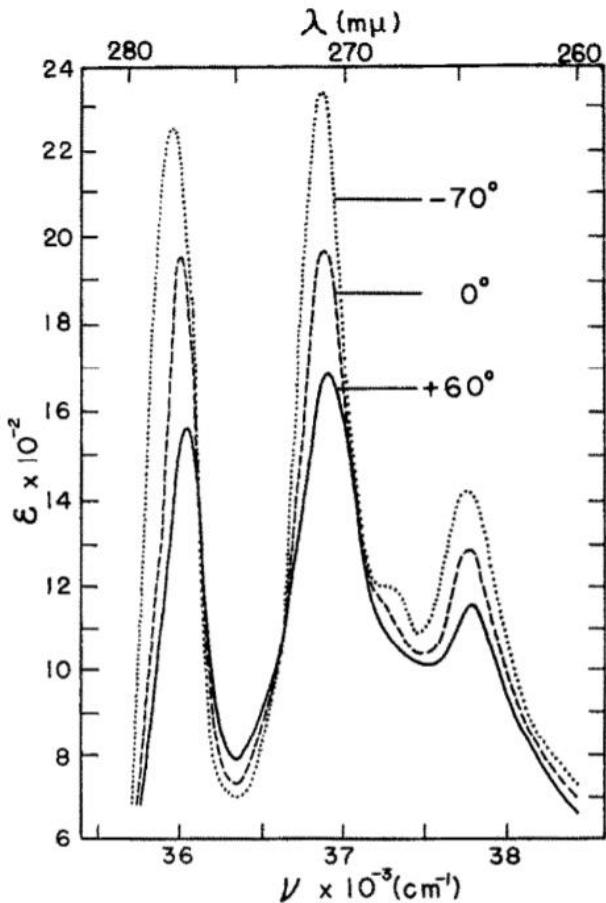
- 현대에는 ε 을 몰 흡광계수로 정의
- 몰 흡광계수는 온도와 파장 등의 영향을 받음

2.2 현대의 Beer–Lambert–Bouguer Law

몰 흡광계수? ε 는 단일 파장에 대한 값, 보통 λ_{max} 에 대한 값 사용



2.2 현대의 Beer–Lambert–Bouguer Law



- 몰 흡광계수(molar absorption coefficient)는 온도의 함수임
- 크게 온도가 달라지면, ε_0 사용에 주의 필요(extreme condition)
- 용액의 온도/실험실 온도를 알맞게 조절해야함
(water bath 등을 이용하여 온도 조절)

Fig. 폐놀(sol : n-Hx)의 온도에 따른 흡광계수 변화

2.2 현대의 Beer–Lambert–Bouguer Law

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_a c_a l + \varepsilon_b c_b l + \varepsilon_c c_c l$$

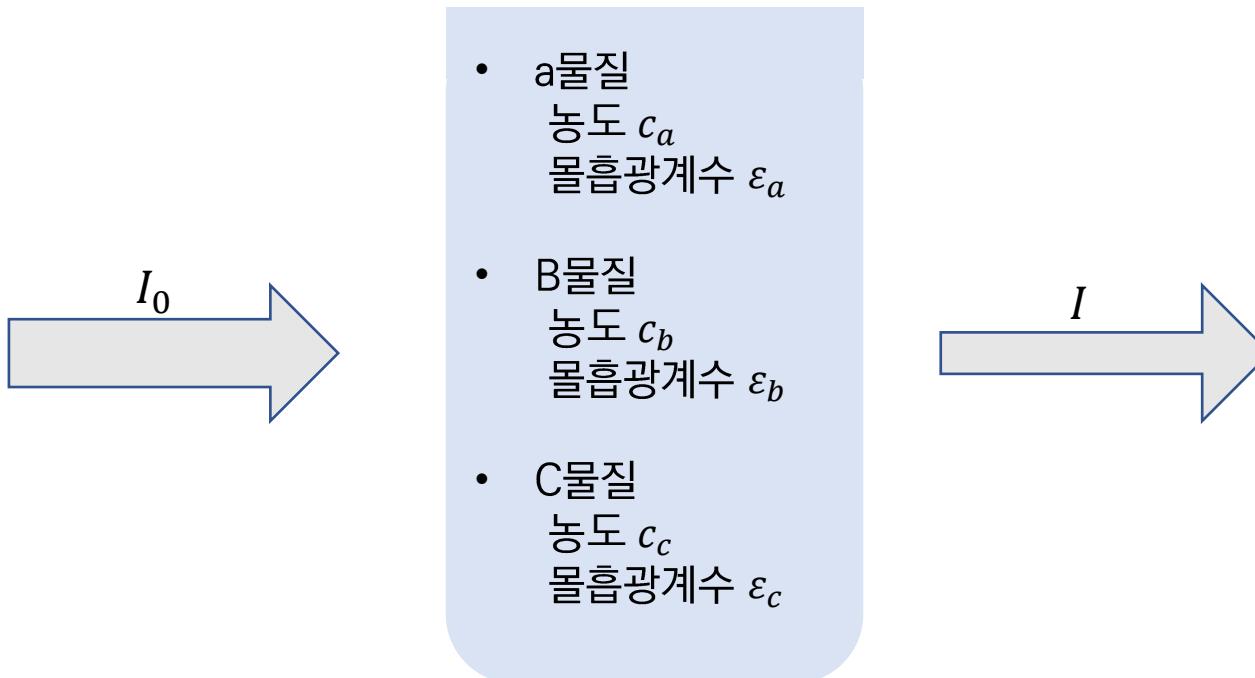


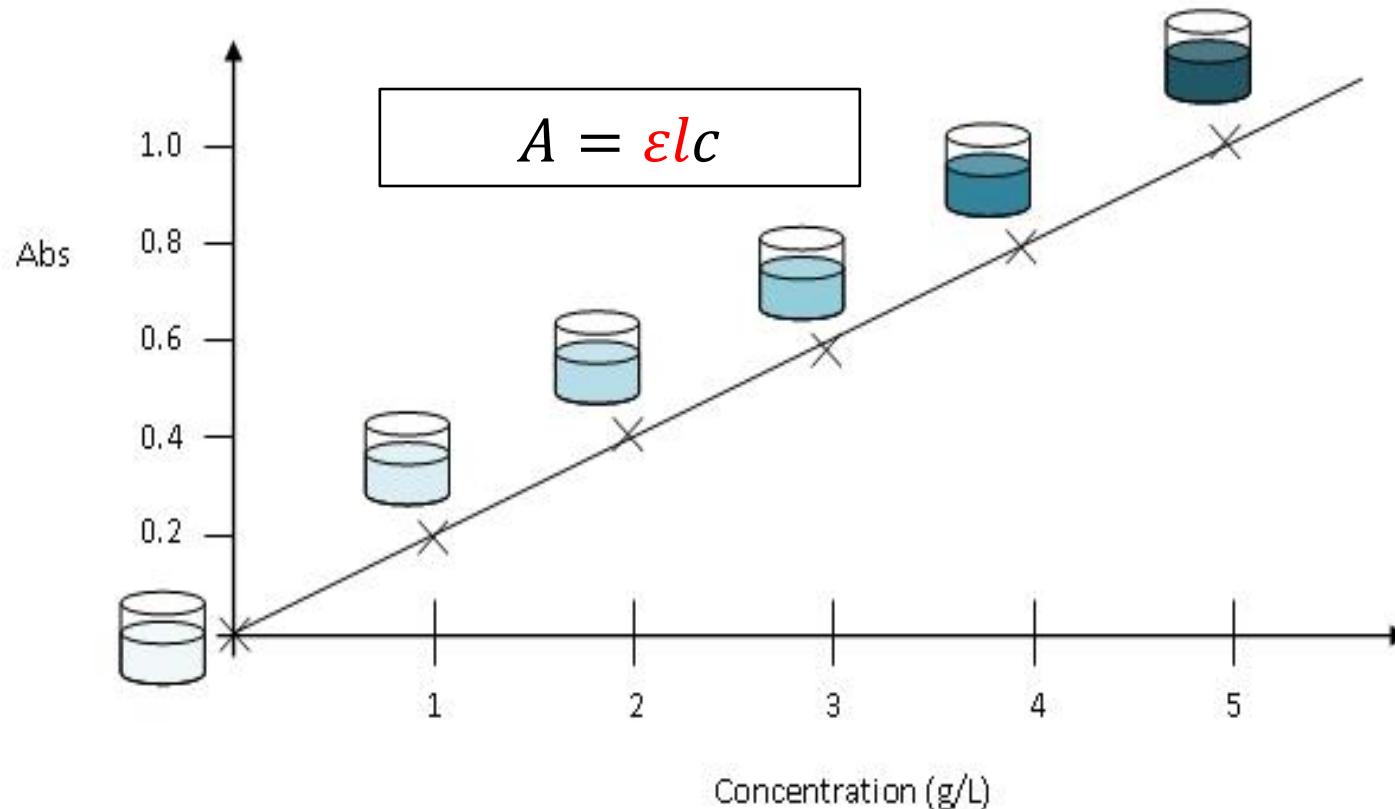
Fig. 혼합물에서 Beer-Lambert-Bouguer Law의 적용

2.2 정량분석의 목적??

미지 시료의 농도를 알아내는 것 !

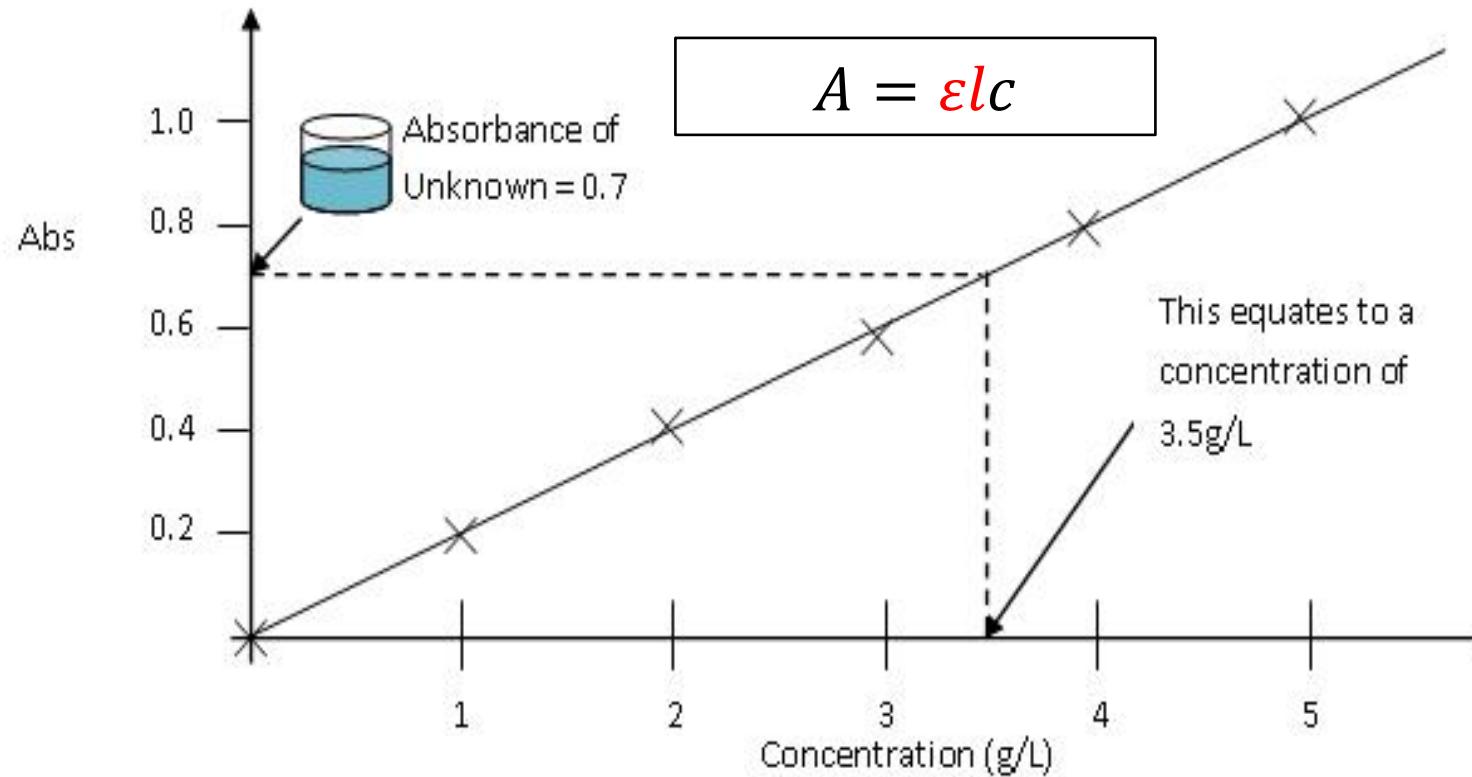
2.2 미지 시료의 농도 알아내기

1. 표준용액으로 흡광도-농도 관계 확인

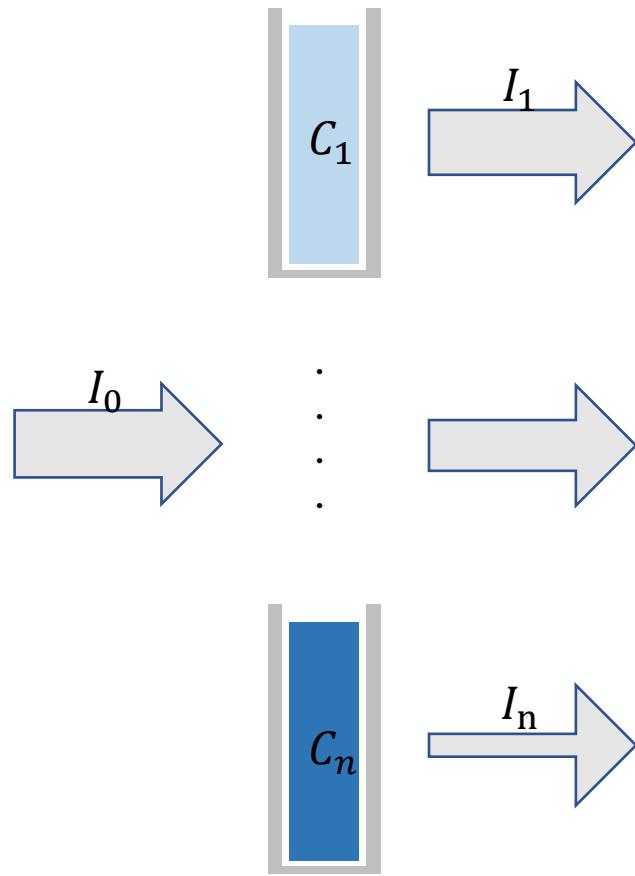


2.2 미지 시료의 농도 알아내기

2. 미지시료의 흡광도를 식에 넣으면 농도를 구할 수 있음

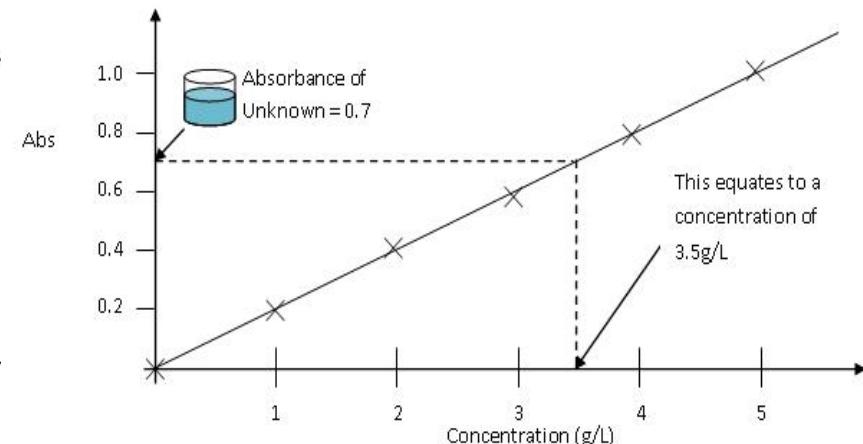
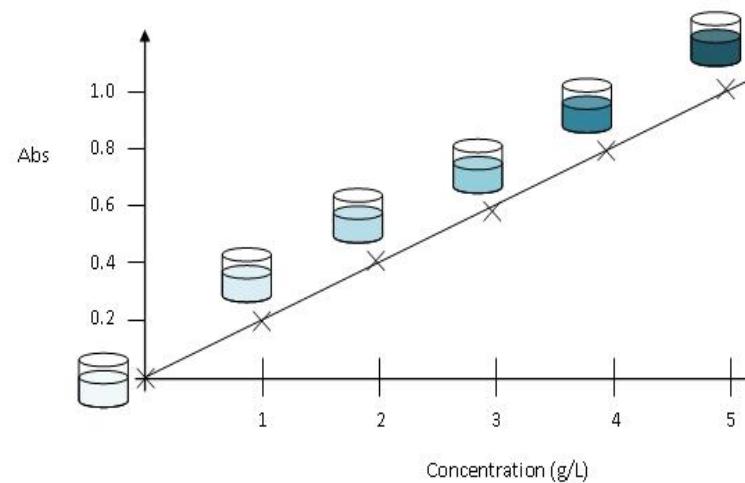


2.2 현대의 Beer–Lambert–Bouguer Law



정량분석 방법 : 미지시료 농도 예측

- 선형을 가정하고
- $Ax + b$ 형태의 검량선(calibration curve)를 그림
- Least square method 사용 (사실 컴퓨터가 다 해줍니다)
- 미지시료 흡광도에 해당하는 농도 구함



Content Details

② 정량 분석의 이론

2.1 Beer–Lambert Law의 기원

Bouguer's discovery and Lambert's Law

Beer's Law

2.2 현대의 Beer–Lambert Law ##(\epsilon의 의미? 각각 파장, 온도에 의존) 혼합물에서의 적용

2.3 Beer–Lambert Law의 한계와 편차 : 기본 가정과 화학오차, 기기오차

기본 가정

화학 편차

흡광도의 크기

기기 편차

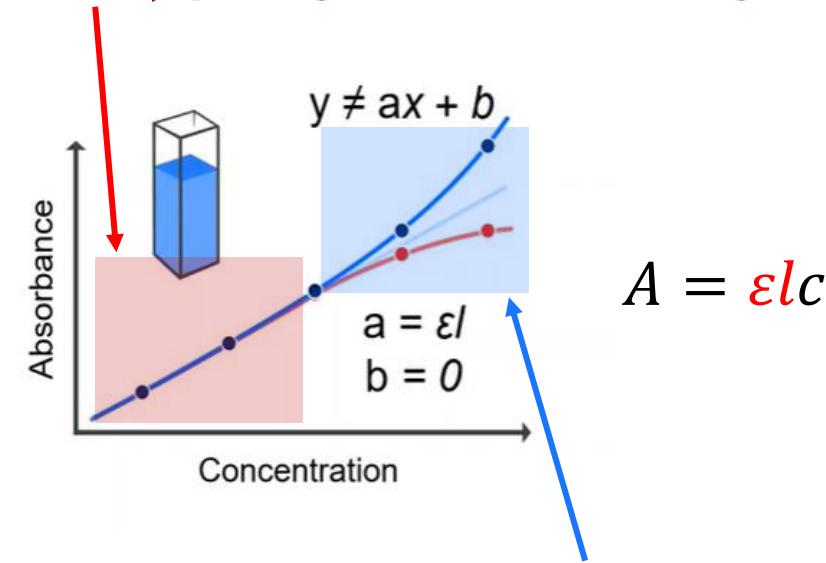
2.3 한계와 편차 : 기본 가정

기본 가정

- 물질 사이에 상호작용이 없다.
- 즉, 물질의 굴절률 등의 변화가 없다.

농도와 흡광도의 **선형적 관계가** 매우 중요함
→문제를 단순화시킴

At low concentration, 상호작용이 미미하고 무시 가능!

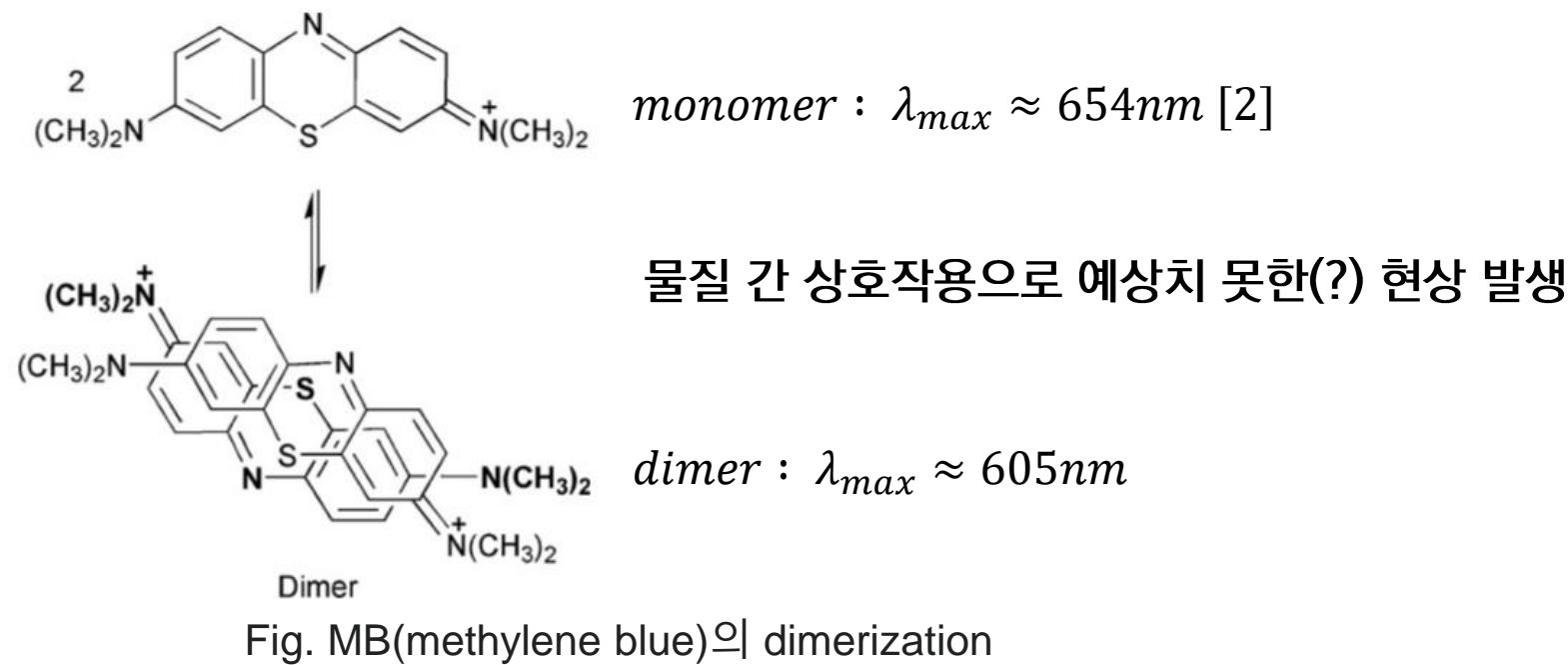


At high concentration, 상호작용이 크고 무시 불가능!

Fig. 농도에 따른 흡광도의 선형성/비선형성

2.3 한계와 편차 : 화학 편차

Methylene Blue dimerization occur at high concentration



2.3 한계와 편차 : 화학 편차

Calculated absorption spectra

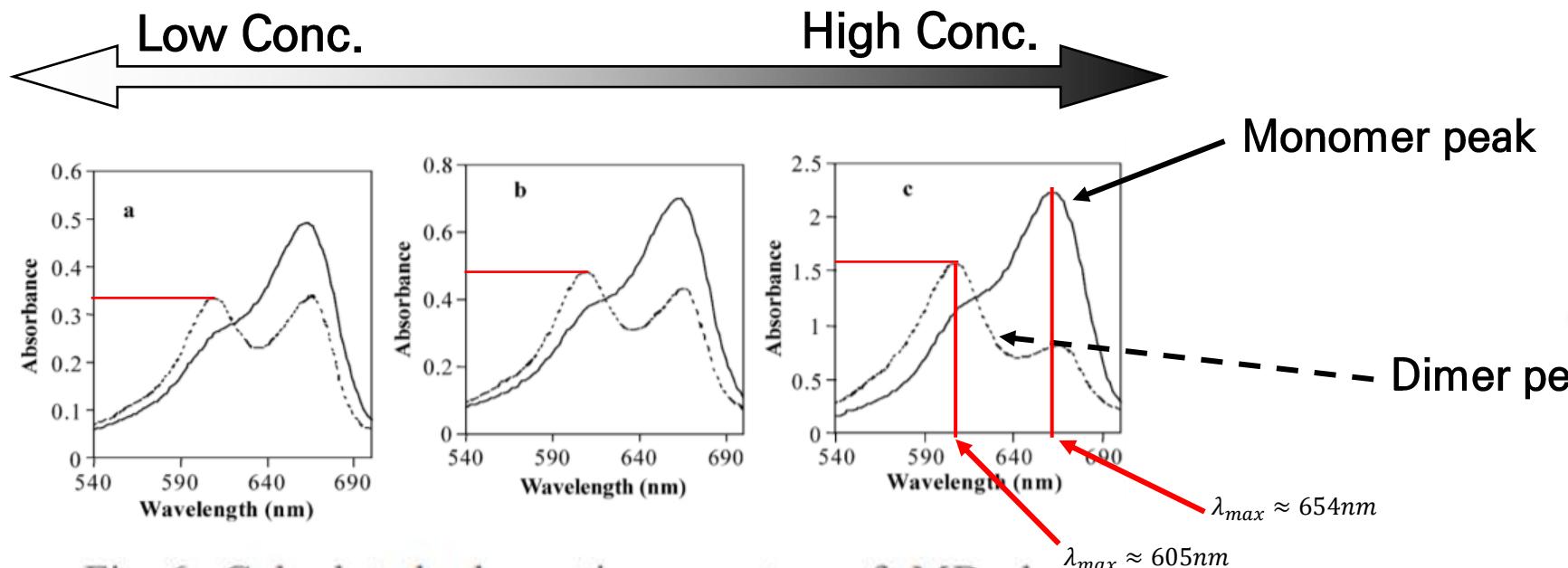
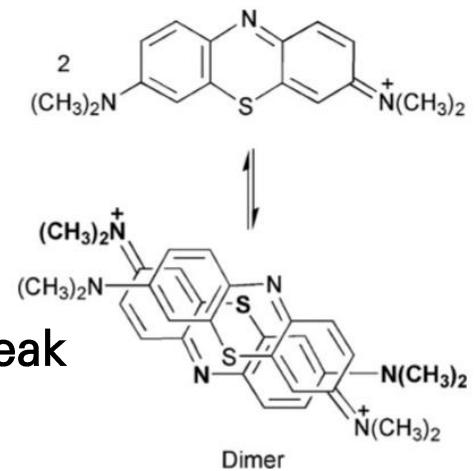


Fig. 6. Calculated absorption spectra of MB dye monomer (—) and dimer (---) at different concentrations in water (**a**: 6.00×10^{-5} , **b**: 9.00×10^{-5} , **c**: 3.00×10^{-4} M).

Fig. dimer monomer의 흡광도 계산 결과



2.3 한계와 편차 : 화학 편차

Experimental absorption spectra

Not distinguishable....

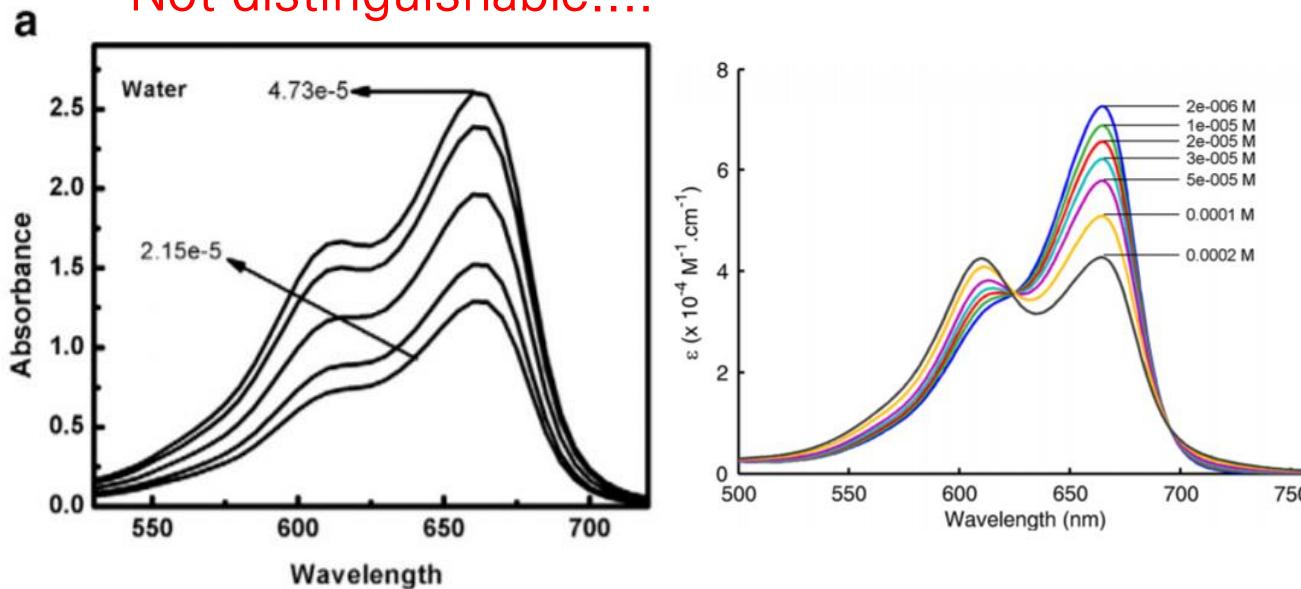
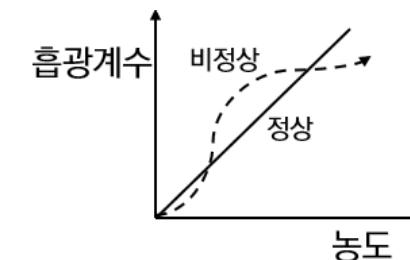


Fig. y-axis값이 (왼쪽)Abs. (오른쪽) ε

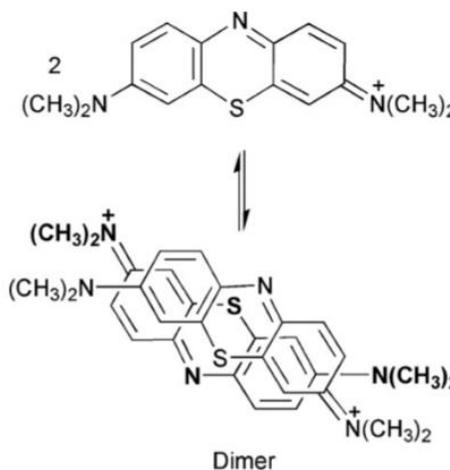
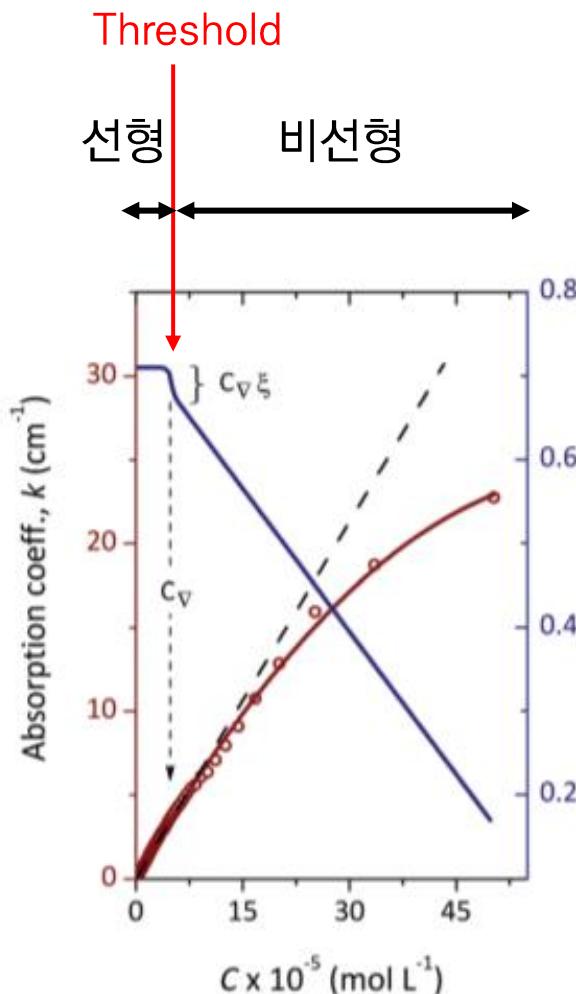
- 우리가 원하는 데이터는 monomer의 농도와 흡광도의 관계인데, dimer와 데이터가 겹쳐서 알 수 없음
- 농도에 따라 몰 흡광계수는 변하지 않을 수록 좋은데, 매우 크게 변함 (선형성이 깨짐)



$$A \neq \varepsilon cl$$

- 비선형 항이 필요, 미분 방정식(?) 과유불급!
- 단순한 Beer law로는 접근이 어려움

2.3 한계와 편차 : 화학 편차 – TMI편



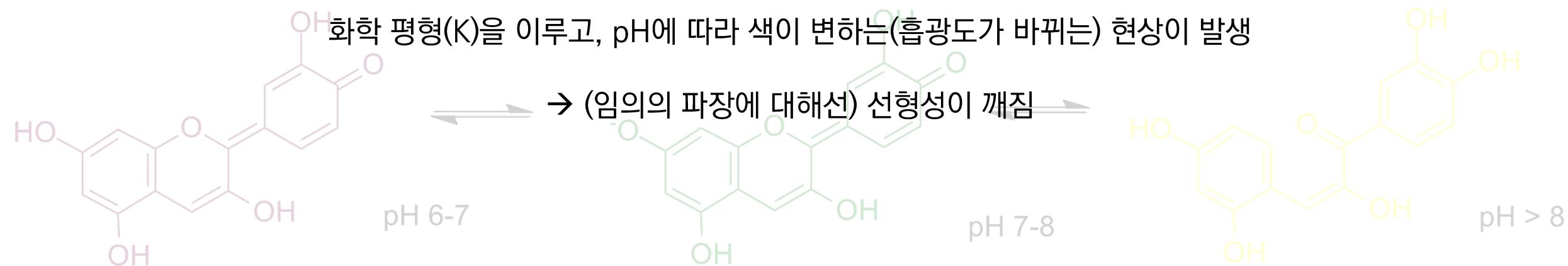
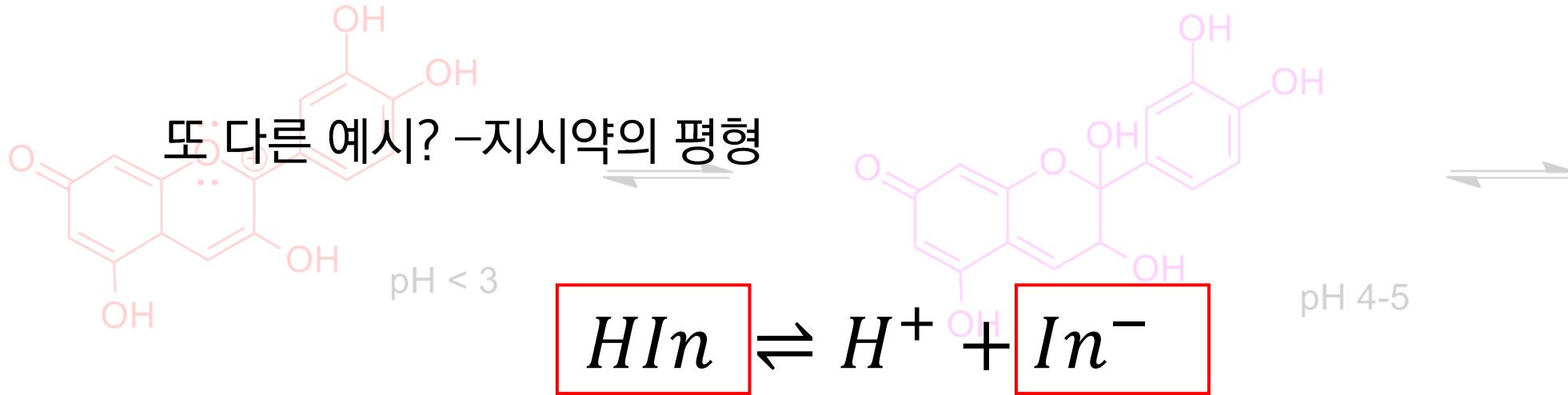
- 앞선 dimerization의 경우는 Threshold 값을 구해서 선형/비선형 Beer lambert 규칙을 만들기도 함[3]
- 그러나 연구자가 자신의 화합물에 대해서 복잡한 수식을 풀고, 문헌도 검색하고 직접 값을 구해야 함

$$\left\{ \begin{array}{l} k(C) = C \left(\varepsilon - \frac{\xi(C - C_\nabla)}{1 + e^{-p(C - C_\nabla)}} \right) \\ k_C'(C) = \varepsilon - \frac{\xi(2C - C_\nabla)}{1 + e^{-p(C - C_\nabla)}} \\ k_C''(C) = -\xi \left(\frac{2}{1 + e^{-p(C - C_\nabla)}} + \frac{Ce^{-p(C - C_\nabla)}}{(1 + e^{-p(C - C_\nabla)})^2} \right) \end{array} \right.$$

Fig. (왼)비선형 관계, (오)흡광계수 구하는 식

$$k(C) = \begin{cases} \varepsilon C, & C < C_\nabla \\ (\varepsilon + \xi C_\nabla)C - \xi C^2, & C \geq C_\nabla \end{cases}$$

2.3 한계와 편차 : 화학 편차



2.3 한계와 편차 : 화학 편차

그러나 아래와 같은 반응은 전체 농도를 아주 정확하게 구할 수 있습니다.

(특정 파장에 대해선) 선형성이 유지

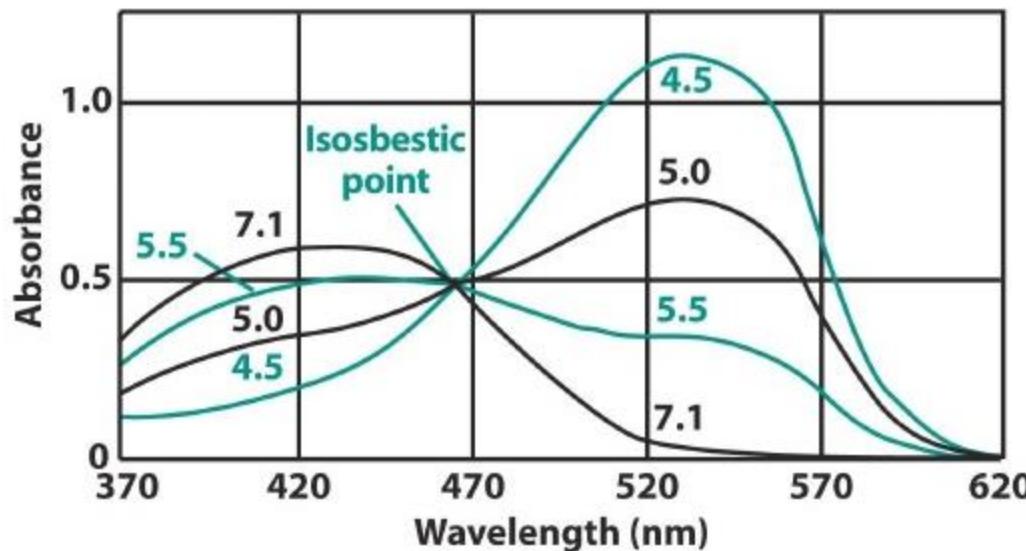


Fig. isosbestic point

- 반응이 1 대 1로 진행되기 때문에 전체 몰농도는 항상 일정
 $HIn \rightleftharpoons H^+ + In^-$
- 470nm 부근에 항상 ε 가 겹치는 부분이 있어서 $\varepsilon_a = \varepsilon_b$
$$A = \varepsilon_{465} l (c_a + c_b)$$
$$A = \varepsilon_{465} l (C_{total})$$
- $A \rightleftharpoons B$ 꼴의 반응에 유용

2.3 한계와 편차 : 화학 편차

Isosbestic point는 “때때로” 유용

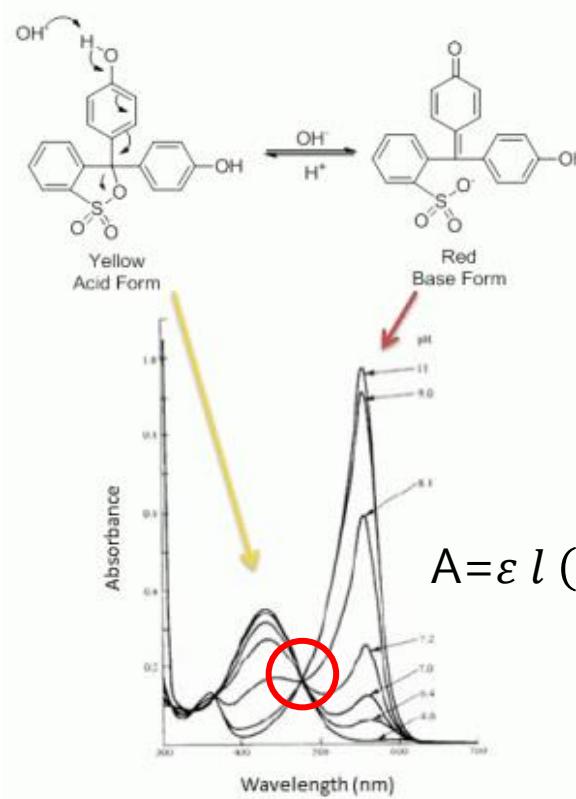


Fig. 어떤 지시약의 isosbestic point

비유하자면, (왼쪽)100원이 5개일 때 전체 얼마? / 100원과 500원이 총 5개일 때 전체 얼마?

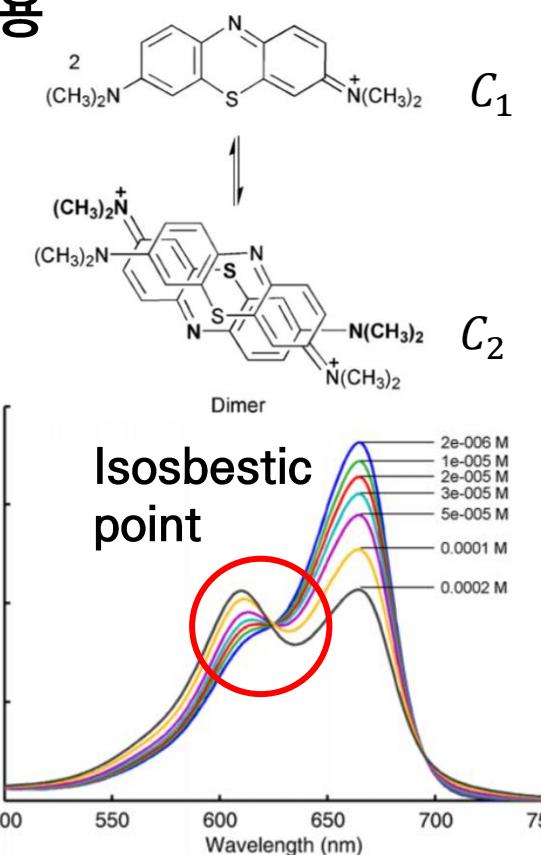
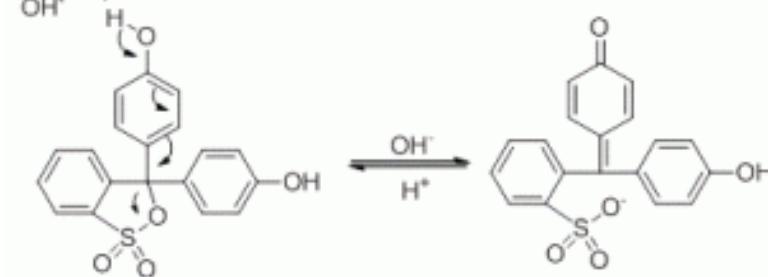
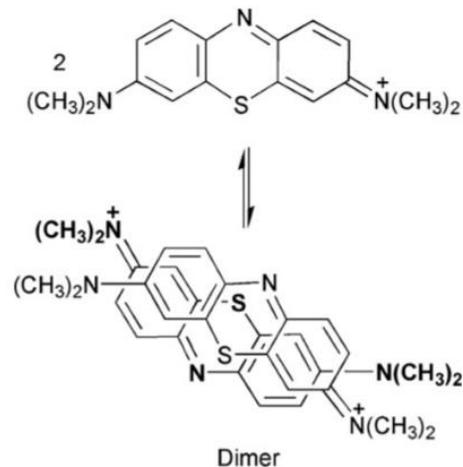


Fig. MB의 isosbestic point

2.3 한계와 편차 : 화학 편차

요약하자면, 다양한 화학편차가 존재한다!

저농도에서 비교적 잘 성립한다



고농도에선 beer lambert가 잘 성립하지 않을 수도 있다.
왜냐면, 농도가 변하기 때문!

허나, 물질의 농도가 변해도 1대 1로 변할 땐
beer lambert 법칙 적용이 가능하다

2.3 한계와 편차 : 화학 편차

Solvent effect

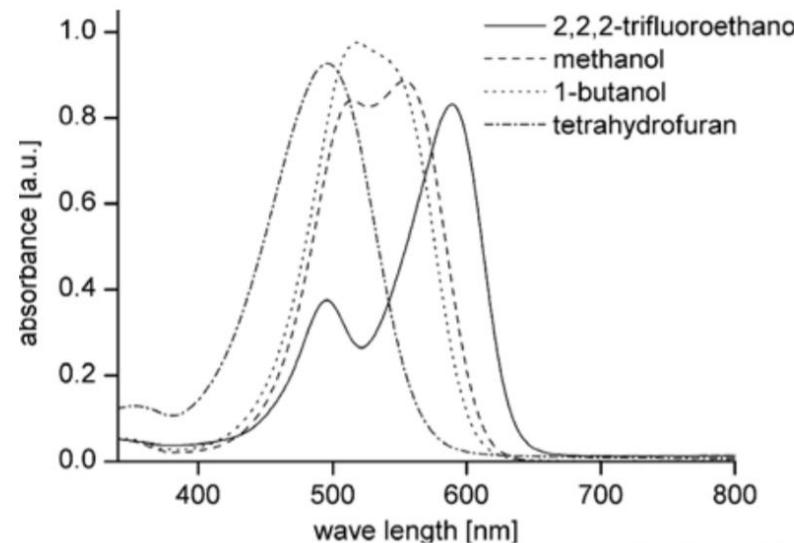
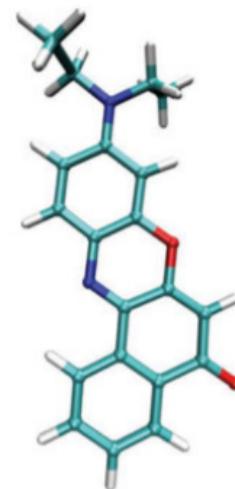
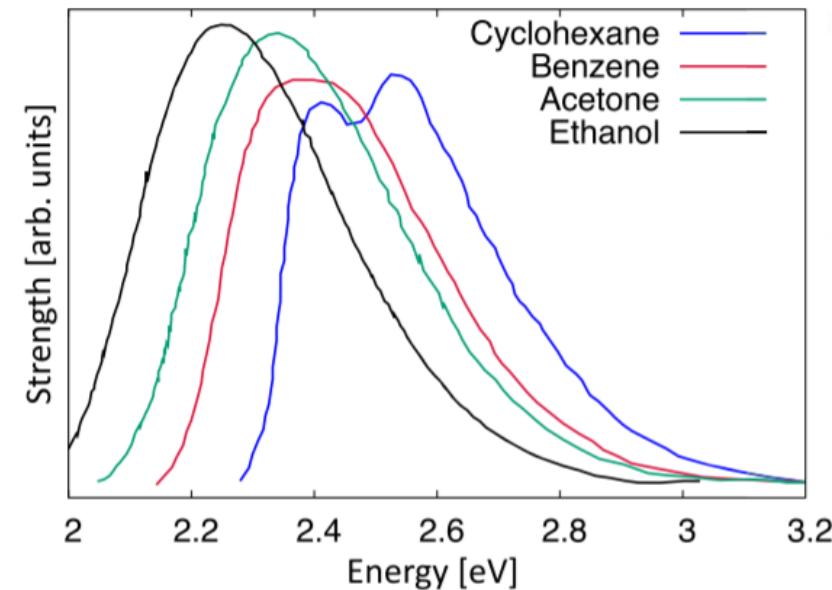


Fig. 1. UV-Vis absorption spectra of barbiturate dye [48, 49] in different solvents.

$\epsilon_0 = 2.0, 2.3, 20.7, 24.5$ for cyclohexane, benzene, acetone, and ethanol, respectively



H-bonds, π -stacking, polarizability, molecular shape, dipolarity etc.

2.3 한계와 편차 : 기기 편차

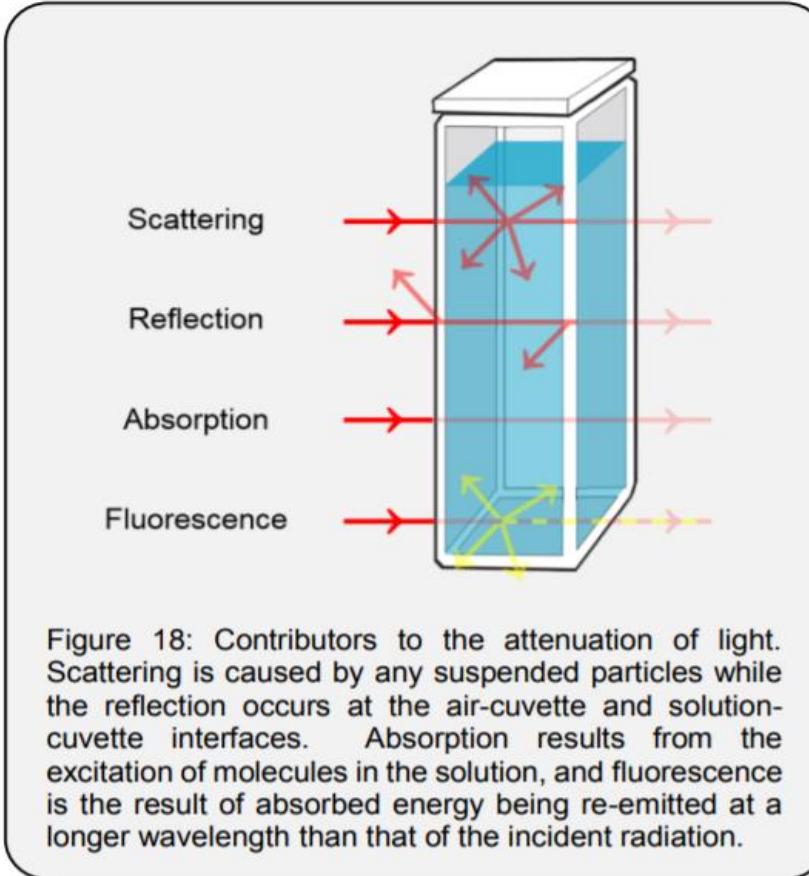


Fig. 기기 내부의 빛 손실

2.3 한계와 편차 : 기기 편차

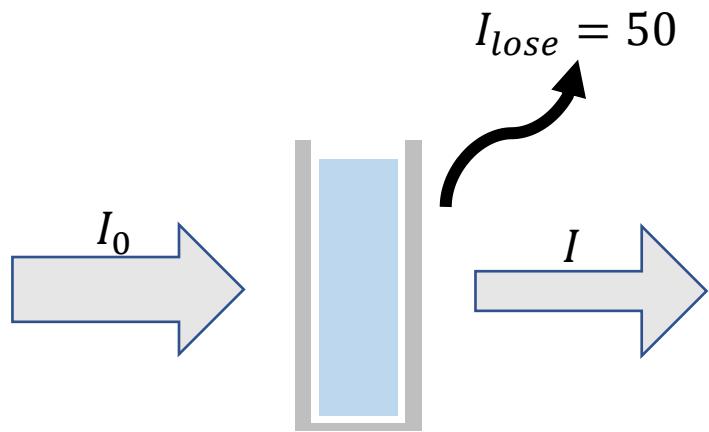


Fig. 산란 등에 의한 빛의 손실

흡광도가 클 수록, 산란 등에 의한 오차값이 커짐

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I - I_s}\right)$$

예를 들어,

$I_0 = 1000$ $I_{lose} = 50$	$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$	$A = \log\left(\frac{I_0}{I - I_s}\right)$
$I = 900$	0.0458	0.0706
$I = 500$	0.301	0.347
$I = 70$	1.15	1.70

보통, “ 흡광도 ≤ 1 ” 권장 !

Content Details

③ 정성 분석의 이론

3.1 발색단 효과

3.2 문자 스펙트럼과 원자 스펙트럼

3.3 보색관계 ; (직관)가시광의 흡수와 우리가 보는 색

3.1 정성 분석 (발색단 효과)

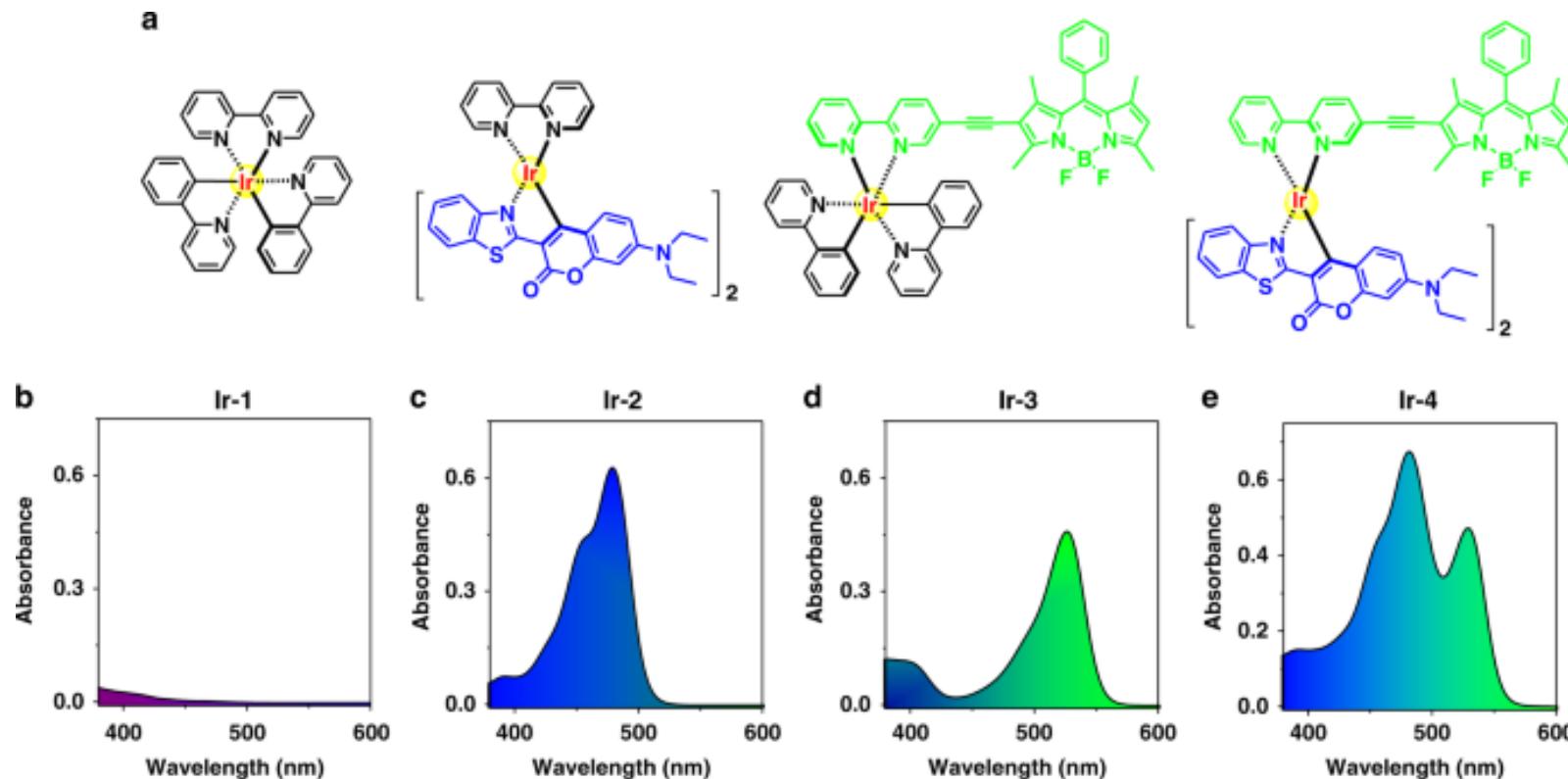
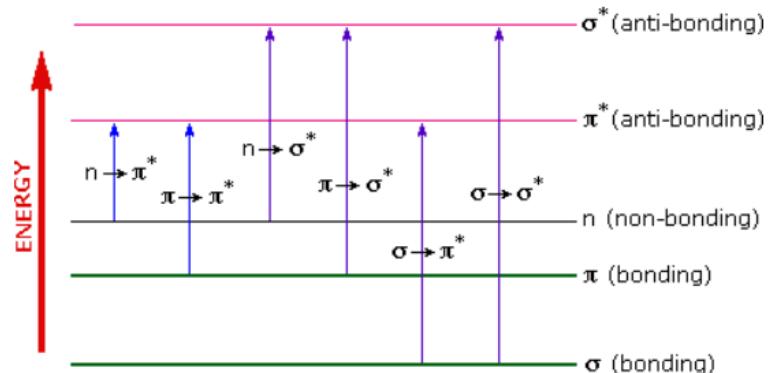


Fig. 발색단에 따른 흡광도

흡광도 peak들을 보면 그 분자의 발색단을 알 수 있음

3.1 정성 분석 (발색단 효과)



Chromophore	Example	Excitation	λ_{max} , nm	ϵ	Solvent
C=C	Ethene	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	15,000	hexane
C≡C	1-Hexyne	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10,000	hexane
C=O	Ethanal	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	290 180	15 10,000	hexane hexane
N=O	Nitromethane	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	275 200	17 5,000	ethanol ethanol
C-X X=Br X=I	Methyl bromide Methyl iodide	$n \rightarrow \sigma^*$ $n \rightarrow \sigma^*$	205 255	200 360	hexane hexane

Fig. 흔한 발색단에 대한 흡광도

ID	Compound	CAS	Synonym	$\epsilon (\lambda \text{ nm})$ solvent (reference)
Aromatic hydrocarbons				
A-1	Benzene	71-43-2		210 (255 nm) cyclohexane (11)
A-2	Toluene	108-88-3		280 (265 nm) cyclohexane (11)
A-3	<i>o</i> -Xylene	95-47-6		254 (262 nm) ethanol (54)
A-4	<i>m</i> -Xylene	108-38-3		284 (266 nm) cyclohexane (11)
A-5	<i>p</i> -Xylene	106-42-3		770 (274 nm) cyclohexane (11)
A-6	Mesitylene	108-67-8	1,3,5-Trimethylbenzene	180 (274 nm) ethyl acetate (56)
A-7	Durene	95-93-2	1,2,4,5-Tetramethylbenzene	214 (279 nm) ethyl acetate (56)
A-8	Pentamethylbenzene	700-12-9		629 (280 nm) ethyl acetate (56)
A-9	Hexamethylbenzene	87-85-4		214 (273 nm) ethyl acetate (56)
A-10	Phenol	108-95-2		2340 (271 nm) cyclohexane (11)
A-11	Anisole	100-66-3	Methoxybenzene	620 (270 nm) cyclohexane (64)
A-12	Benzonitrile	100-47-0	Phenyl cyanide	11 650 (230 nm) <i>n</i> -heptane (66)
A-13	Benzaldehyde	100-52-7		1350 (282 nm) ethanol (67)
A-14	Benzoic acid	65-85-0		1010 (272 nm) methanol (70)
A-15	Acetophenone	98-86-2		1050 (280 nm) ethanol (67)
A-16	Aniline	62-53-3	Methyl phenyl ketone	1760 (287.5 nm) cyclohexane (76)
A-17	<i>N,N</i> -Dimethylaniline	121-69-7		14 900 (251 nm) cyclohexane (64)
A-18	Phenylhydrazine hydrochloride	59-88-1		490 (275 nm) phosphate buffer (pH 7) (84)
A-19	Chlorobenzene	108-90-7		222 (272 nm) cyclohexane

Fig. 흔한 분자들에 대한 흡광도

Content Details

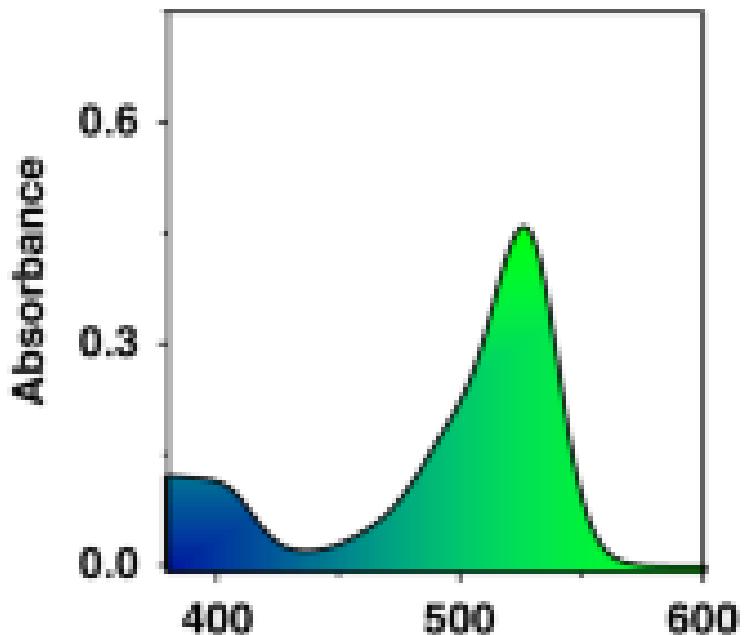
③ 정성 분석의 이론

3.1 발색단 효과

3.2 문자 스펙트럼과 원자 스펙트럼

3.3 보색관계 ; (직관)가시광의 흡수와 우리가 보는 색

3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼 이산성



왜 연속적일까?

양자역학에서 배우길, “에너지는 **양자화**되어있다”

근데 왜 연속적일까?

3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼 이산성

분명 원자들은 **이산적인 스펙트럼을 보임**

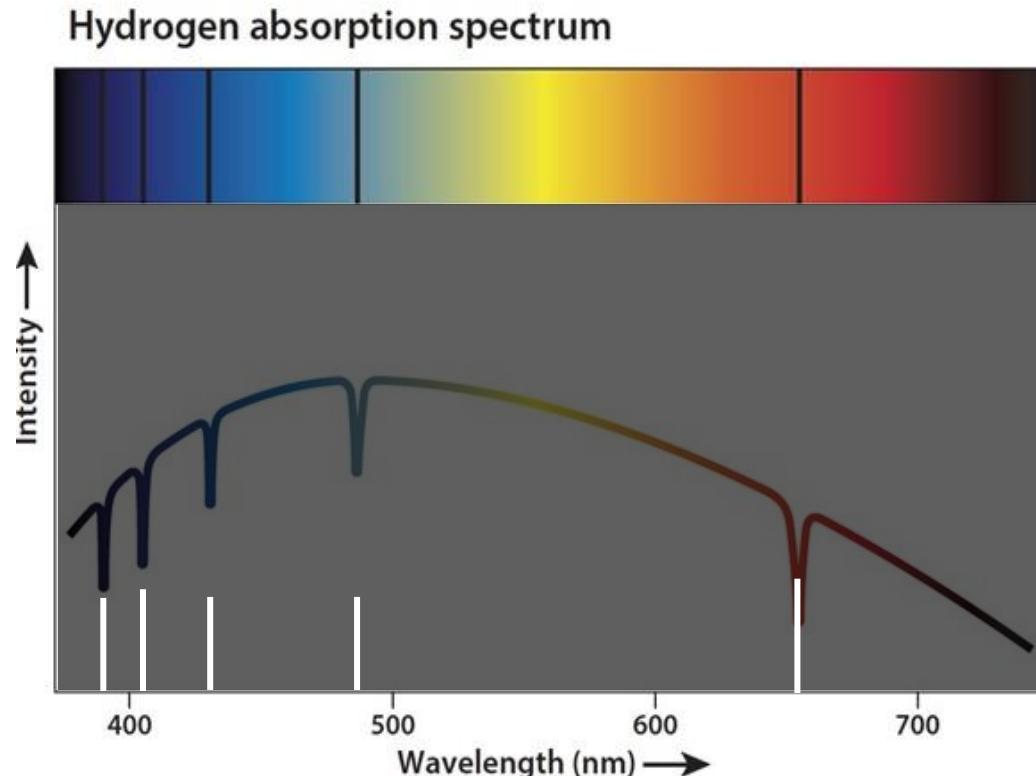


Fig. 수소원자의 흡수 스펙트럼

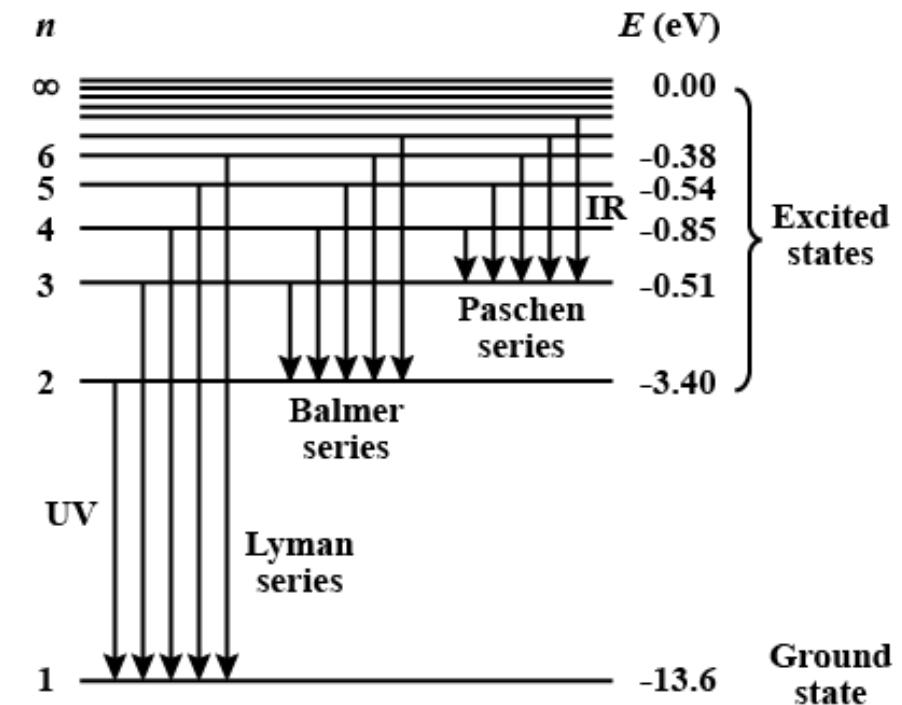
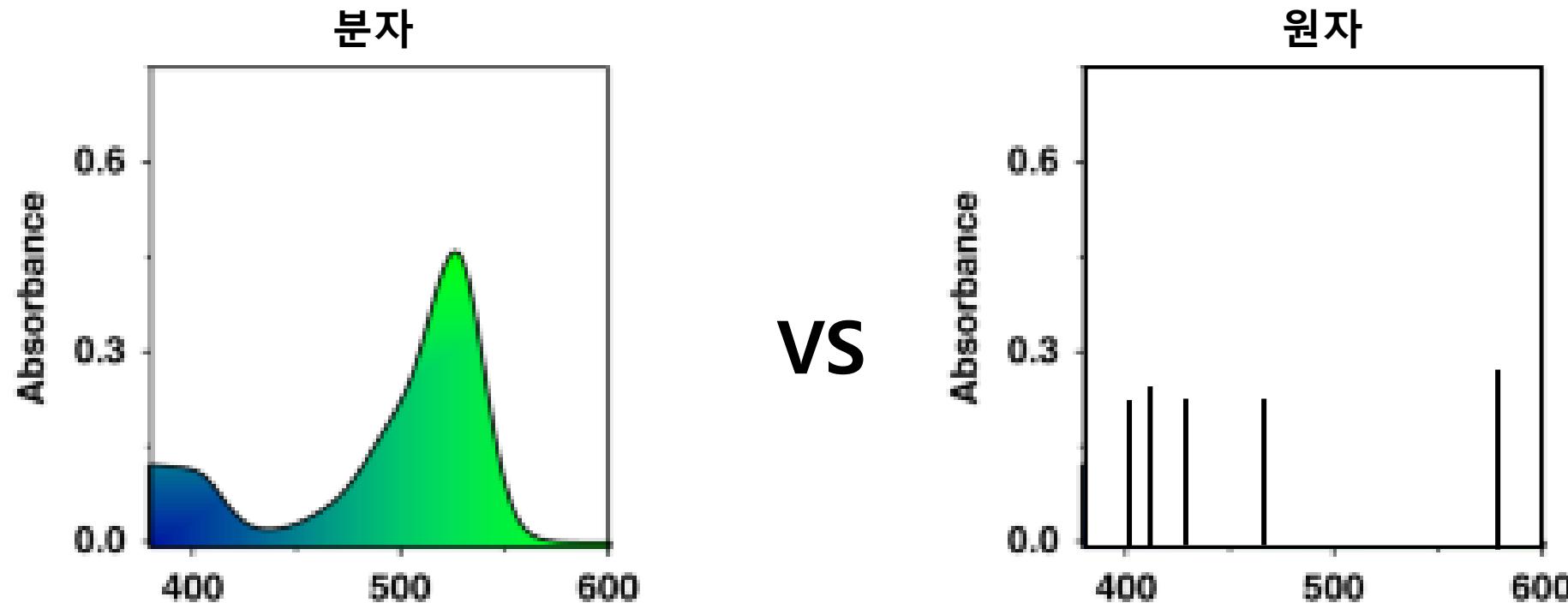


Fig. 수소원자의 전이도표

(right) <https://www.toppr.com/ask/question/draw-a-neat-labelled-energy-level-diagram-of-the-hydrogen/>

(left) <https://astronomy.com/magazine/ask-astro/2019/06/how-do-scientists-determine-the-chemical-compositions-of-the-planets-and-stars>

3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼 이산성



3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼

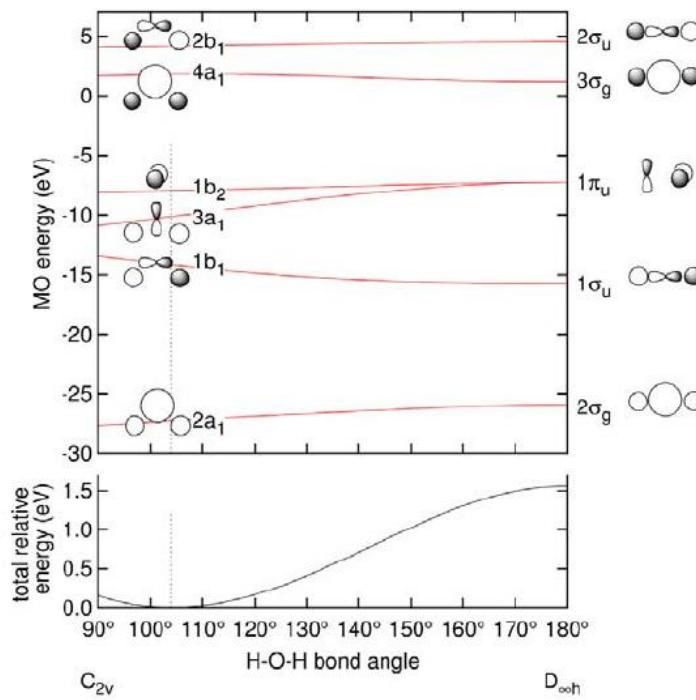


Fig. 각도에 따른 분자 오비탈 에너지 변화

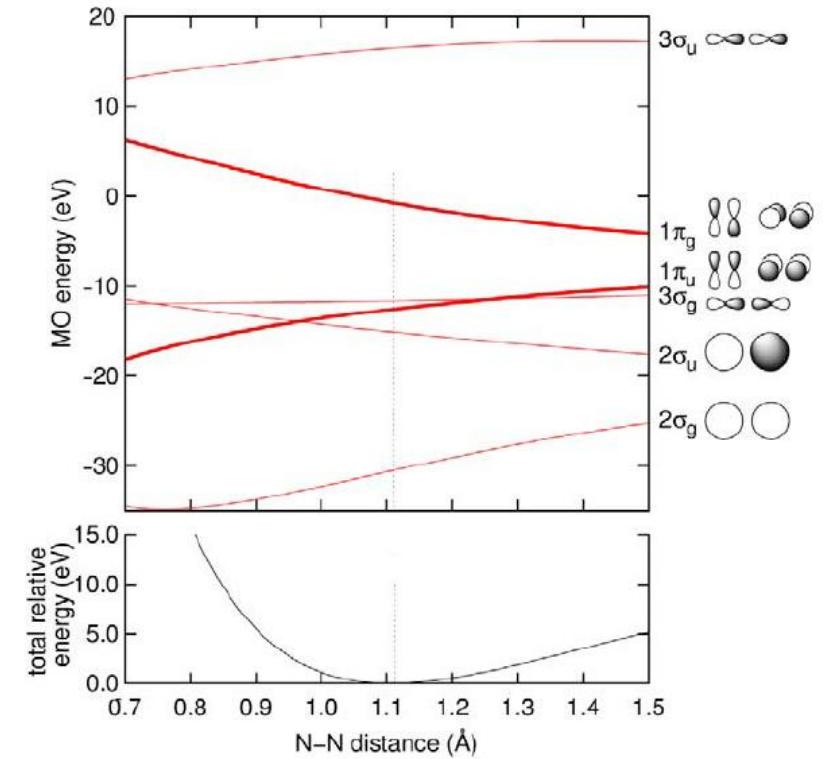
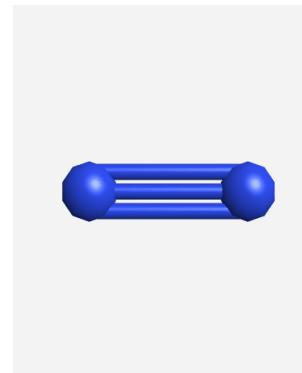
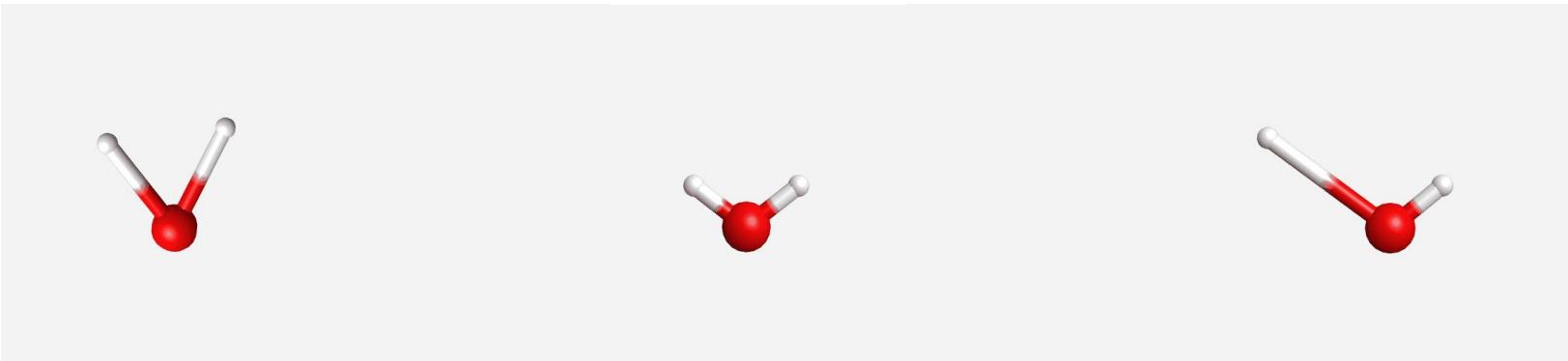


Fig. 결합 길이에 따른 분자 오비탈 에너지 변화

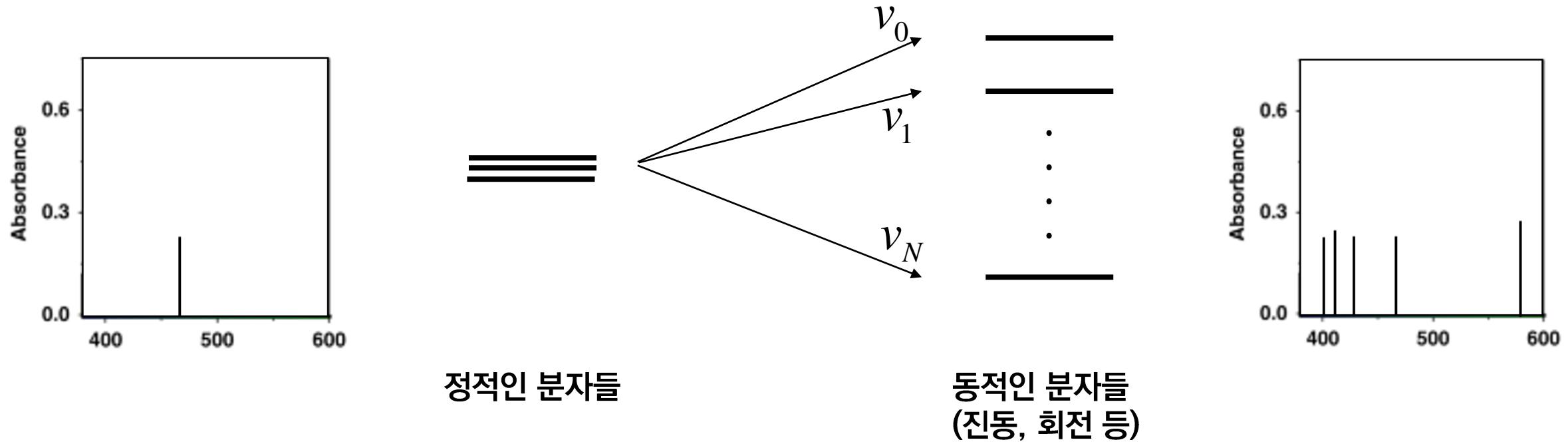
3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼



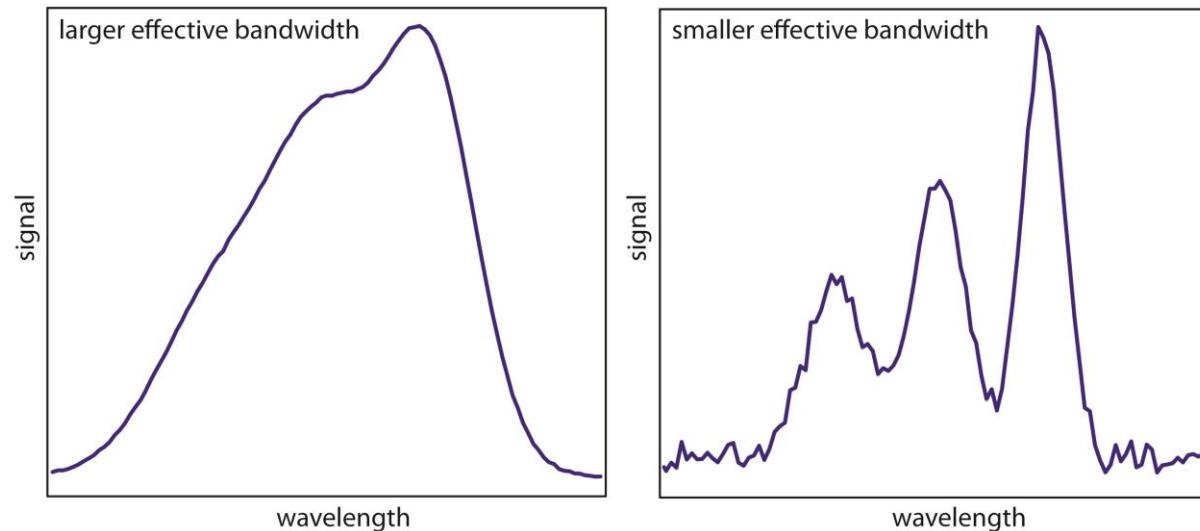
다양한 진동모드가 생기면서 전이 에너지도 달라짐

더욱 많은 에너지 준위로 갈라짐

3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼



3.2 분자 스펙트럼의 연속성 vs 원자 스펙트럼



측정상의 한계로 해상도(Resolution)가 낮거나, 기기 내 장비 차이로 실제 스펙트럼이 아닌 블러 처리된 이미지를 얻게 됨

Content Details

③ 정성 분석의 이론

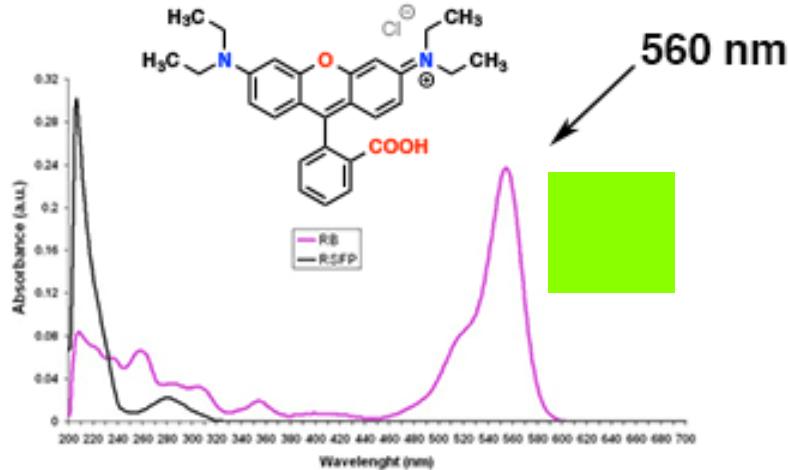
3.1 발색단 효과

3.2 문자 스펙트럼과 원자 스펙트럼

3.3 보색관계 ; 가시광선의 흡수와 우리가 보는 색

3.3 빛의 보색 관계

Rhodamine B: absorbs at 560 nm (green)



We perceive the complimentary color of green (red)

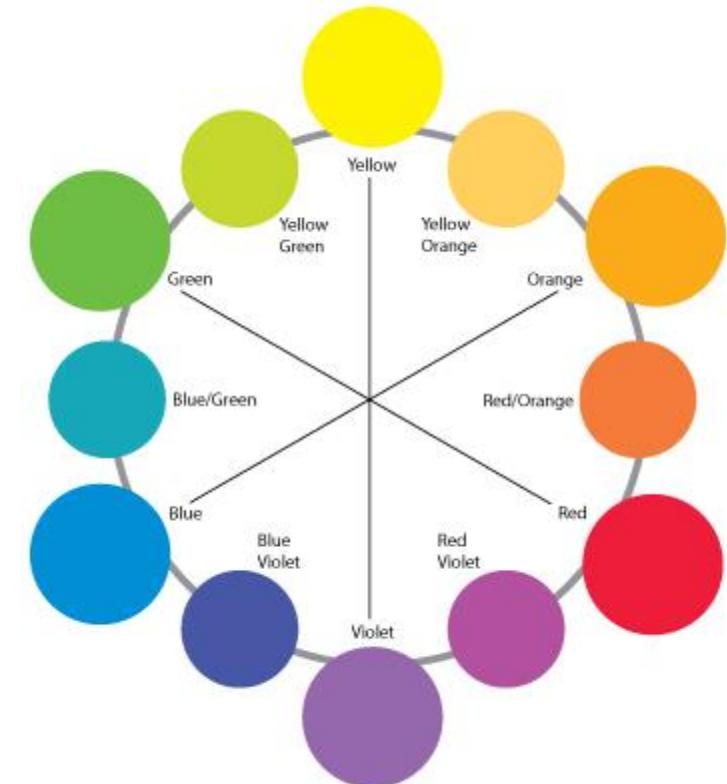


Fig. 보색관계

④ 요약

1. 비어 람베르트 법칙 (A 흡광도, C농도, l 길이, E 최대파장의 흡광계수) $A = \epsilon_{\lambda max} C \cdot l$
2. 정량분석법은 미지 시료의 농도를 구하는 방법이며, 표준용액으로부터 식을 구하고 미지시료의 흡광도를 대입함하여 농도를 결정할 수 있음
3. 오차 원인으로는 화학편차 (고농도에로 갈 수록 오차 발생, 그 외 dimerization 등), 기기편차 (빛의 산란, 반사, 굴절 등) 등이 있음. 근본적으로 농도와 흡광도의 관계가 선형적이라고 가정하면서 오차가 발생함
4. 결과적으로 흡광도는 1 이하로 찍어야 함 (제일 중요)
5. 용매 선택에 주의를 기울어야 함
6. 용질이 균일하지 않은 고분자 등은 정량분석이 불가능함

⑤ 참고문헌

- Reference
 - [1] <https://chemdictionary.org/beer-lambert-law/>
 - [2] Photochemistry and Photobiology, 2018, 94: 290–327
 - [3] Phys. Chem. Chem. Phys., 2017, 19, 12953
 - [4] <https://doi.org/10.1002/3527600418.amuvvise0010>
- Source는 각각 페이지 하단에 기재
- Bibliography
 - https://en.wikipedia.org/wiki/Beer%E2%80%93Lambert_law
 - <https://www.labmanager.com/laboratory-technology/evolution-of-uv-vis-spectrophotometers-18481>
 - https://www.researchgate.net/post/Why_is_Beer_Lamberts_law_not_obeyed_for_high_and_low_concentrated_solutions2
 - https://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet%E2%80%93visible_spectroscopy