
Spectrofotometer

Louis Servaes
Tweede Bachelor Fysica en Sterrenkunde
6 december 2023

Groep 8
Opstelling 7

Abstract

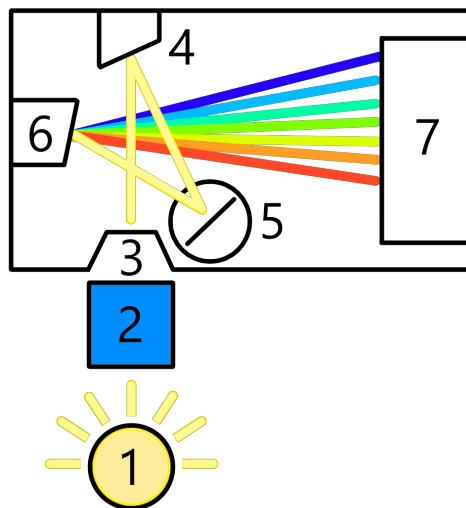
In deze proef werden transmissiespectra van oplossingen met verschillende concentraties onderzocht. Met behulp van de transmissie \mathcal{T} [1] van oplossingen met gekende concentraties werd de extinctiecoëfficiënt $\varepsilon_\lambda = (1,77 \pm 0,61) \text{ l / gram} \cdot \text{cm}$ [2] berekend bij een golflengte $\lambda = 442 \text{ nm}$. Hieruit werden 2 onbekende concentraties bepaald: $c_X = (19,1 \pm 8,7) \text{ mg / 100 ml}$ en $c_Y = (14,0 \pm 6,5) \text{ mg / 100 ml}$. Ten slotte werden de emissiespectra van 4 lampen gemeten en werd a.d.h.v. de spectraallijnen [3] bepaald dat de gassen Hg, Cd, Zn en He aanwezig waren.

1 Inleiding

Spectrofotometrie is het onderzoeksgebied dat zich bezighoudt met het **analyseren van reflectieve en doorlatende eigenschappen van materialen in functie van de golflengte** [4]. In dit experiment werden spectrofotometers gebruikt om **transmissiespectra** van verschillende **oplossingen** te meten, met als doel de **concentratie** van die oplossingen te bepalen. Daarnaast werden **emissiespectra** van **lampen** onderzocht om te achterhalen welk **gas** zich in deze lampen bevindt.

2 Methode

Om de transmissie- en emissiespectra te meten werd gebruik gemaakt van de *Ocean Optics Red Tide USB650* spectrofotometer in combinatie met *SpectraSuite* software [5]. Een schematische voorstelling van de werking van de spectrofotometer is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1: Schematische voorstelling van de opstelling [6]. Bij het meten van de emissiespectra van de lampen werden (1) en (2) vervangen door de respectievelijke lamp. Componenten: (1) lichtbron, (2) cuvet, (3) spleet, (4) collimerende spiegel, (5) diffractierooster, (6) focusserende spiegel, (7) Sony ILX511 CCD.

In het eerste deel werden de transmissiespectra van oplossingen in cuvetten (2) gemeten, waarbij (1) fungeerde als lichtbron. Het tweede deel bestond uit het meten van emissiespectra van lampen. Hierbij werden (1) en (2) vervangen door de lamp. De gebruikte apparatuur is opgelijst in Tabel 1. Als relatieve fout op de concentraties van de oplossingen wordt telkens 10 % genomen¹.

Tabel 1: Oplijsting van de gebruikte apparatuur / componenten. De cuvetten hebben een (gemeten) dikte $d = 1,0 \pm 0,1$ cm. De relatieve fout op concentraties bedraagt steeds 10 %.

component	specificaties
spectrofotometer	Ocean Optics Red Tide USB650 (range: 350 nm - 1000 nm, nauwkeurigheid: 1 nm, signal-to-noise ratio: 250/1) [6] incl. USB A kabel
software	SpectraSuite [5]
zwart balkje	
referentiecuvet (R) met gedestilleerd water	
3 cuvetten met gedestilleerd water + kleurstof (rood, groen en geel)	
4 cuvetten met gedestilleerd water + methyleenblauw	concentraties: (1) 2,5 mg / 100 ml, (2) 5 mg / 100 ml, (3) 10 mg / 100 ml en (4) 25 mg / 100ml
2 cuvetten met gedestilleerd water + methyleenblauw	onbekende concentraties (X en Y)
onbekende lampen	nummers: L1 (rechts), L2 (rechts), L3 (rechts) en L6 (links)

Eerst werd gecorrigeerd voor de donkerstroom [7] door een zwart balkje in de spectrofotometer te plaatsen². De gemeten intensiteiten werden door de software automatisch van de volgende metingen afgetrokken. De **integration time** T in *SpectraSuite* werd ingesteld op 15 ms. *SpectraSuite* meet spectra S in counts [8] en aangezien er geen kalibratie³ gebeurd is, kan de intensiteit $\mathcal{I} = S/T$ niet in standaardeenheden [9] omgezet worden. Vandaar dat steeds in eenheden counts / s gewerkt zal worden. De data van de gemeten transmissie- en emissiespectra zijn samengevoegd in een *Microsoft Excel* bestand [10]. In dit verslag zullen bovendien enkel grafische voorstellingen en geen rauwe data weergegeven worden.

De transmissiespectra van de referentiecuvet R en de cuvetten met rode, groene en gele kleurstof werden gemeten. Metingen van transmissiespectra zullen telkens gerefereerd worden t.o.v. de referentiecuvet R. Vervolgens werden ook de spectra van 1, 2, 3, 4, X en Y gemeten. De onbekende concentraties van X en Y kunnen als volgt bepaald worden. De wet van Lambert-Beer [11, 12] stelt dat de intensiteit \mathcal{I} van een lichtbundel die een cuvet met dikte d doorloopt, exponentieel daalt:

$$\mathcal{I} = \mathcal{I}_0 \times 10^{-\varepsilon_\lambda c d} \quad (1)$$

waarbij \mathcal{I}_0 de intensiteit van de invallende golf, ε_λ de extinctiecoëfficiënt⁴ en c de concentratie van de opgeloste stof voorstelt. Aan de hand van cuvetten 1, 2, 3 en 4 met gekende concentraties kan ε_λ bepaald worden, waarna de concentratie c van X en Y eenvoudig berekend kunnen worden. Ook de extinctie E [2, 11] van cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y kan achterhaald worden:

$$E = -\log \mathcal{T} = -\log \frac{\mathcal{I}}{\mathcal{I}_0} = \varepsilon_\lambda c d \quad (2)$$

met $\mathcal{T} = \mathcal{I}/\mathcal{I}_0$ de transmissie [1]. Vervolgens werden ook de emissiespectra van lampen L1, L2, L3 en L6 gemeten. Aan de hand van de geobserveerde spectraallijnen kan vervolgens bepaald worden welk gas in de lampen aanwezig is [3].

¹Deze werd niet meegegeven, vandaar de (willekeurige) keuze om met een grote fout van 10 % te werken.

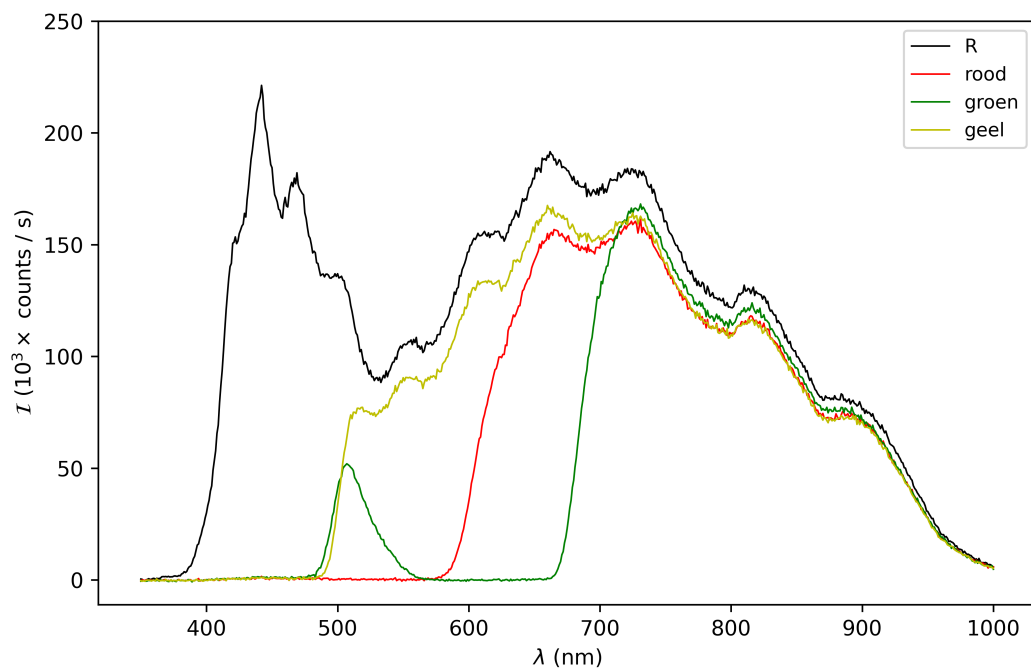
²Zonder dat de lichtbron brandde, uiteraard.

³De kalibratie slaat op de energie / count.

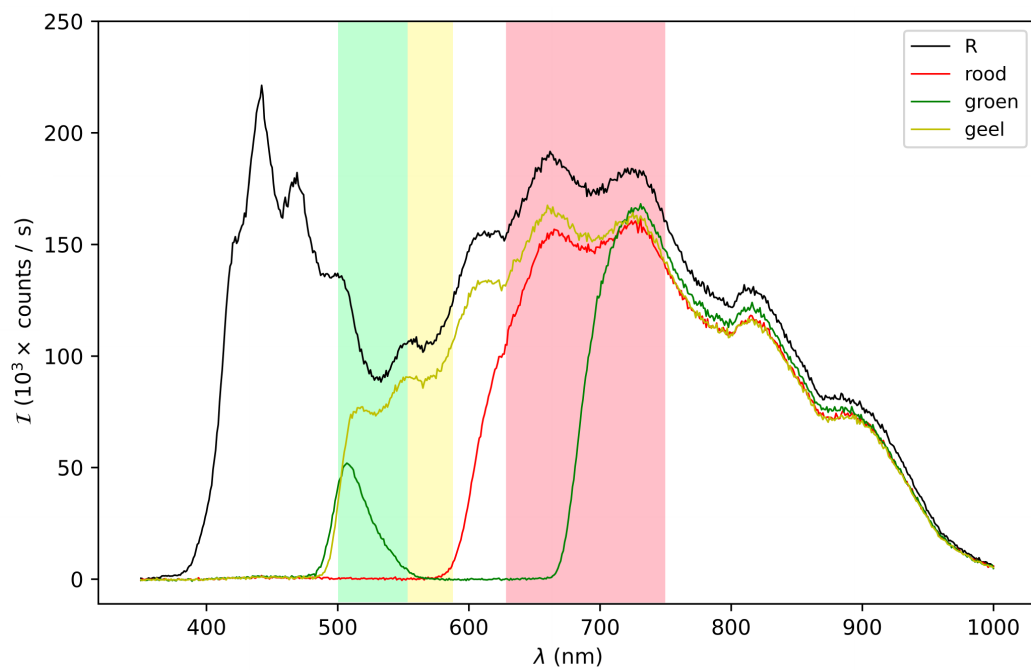
⁴Deze hangt af van de golflengte λ .

3 Resultaten

De transmissiespectra van de cuvetten met de rode, groene en gele kleurstof zijn weergegeven in Figuur 2 en 3.



Figuur 2: Transmissiespectra van de cuvetten met de rode, groene en gele kleurstof. Ook de referentie-cuvet R is weergegeven.



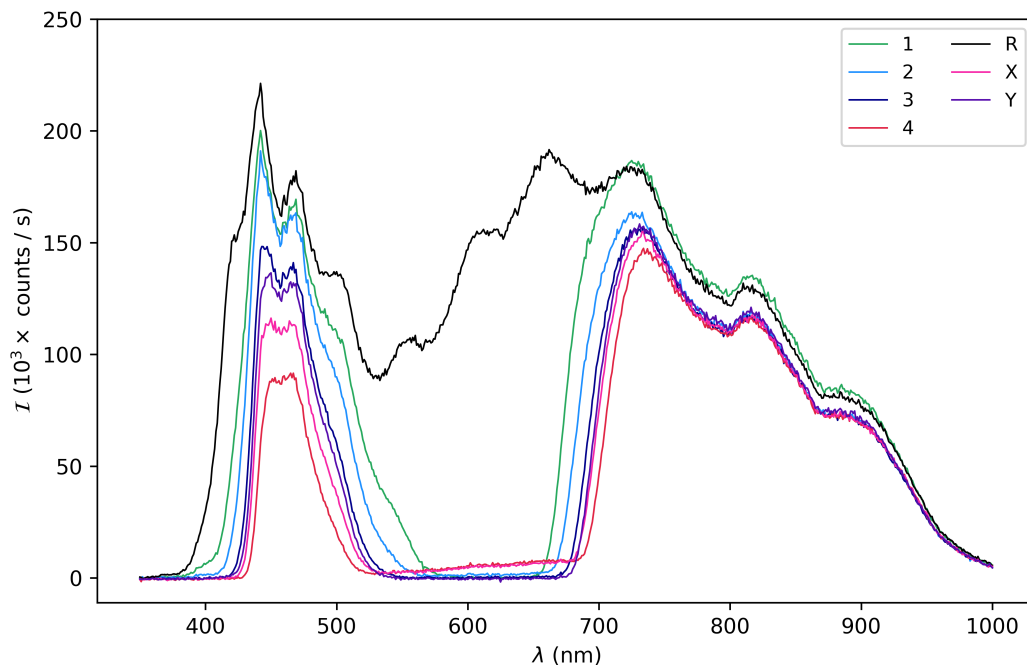
Figuur 3: Transmissiespectra van de cuvetten met de rode, groene en gele kleurstof. Ook de referentie-cuvet R is weergegeven. De banden van de spectrale kleuren rood, groen en geel zijn ingekleurd [13].

Merk eerst op dat de intensiteit \mathcal{I}_0 bij de referentiecuvet R niet constant is. Het transmissiespectrum van de referentiecuvet R komt namelijk zo goed als overeen met het spectrum van de lichtbron⁵ (vloeibaar water absorbeert vooral in het microgolfgebied [14]). Hier lijkt⁶ het spectrum van de lichtbron het meest op dat van een broadband LED [15, 16].

Daarnaast valt ook op dat de intensiteit \mathcal{I} soms negatief is. Dit komt door het feit dat de donkerstroom niet constant is, maar fluctueert. Eigenlijk is de intensiteit die weergegeven wordt $\mathcal{I} = S/T = (S' - D)/T$, waarbij S' het spectrum van de cuvet (in counts) en D het spectrum van de donkerstroom voorstelt. Dit kan in eventuele berekeningen opgelost worden door negatieve intensiteiten gelijk aan 0 te stellen.

Om in te zien dat de spectra van de cuvetten met de rode, groene en gele kleurstof inderdaad overeenkomen met hun namen, is in Figuur 3 de banden van de spectrale kleuren rood, groen en geel ingekleurd [13]. De regio rechts van de rode band ($\gtrsim 750$ nm) is het NIR-gebied [17], waar geen aandacht aan besteed moet worden voor het onderzoeken van de kleuren. Het is duidelijk dat de spectra van de cuvetten met de rode en groene kleurstof overeenkomen met hun respectievelijke gebieden, hoewel die met de groene kleurstof ook deels in de rode band aanwezig is. Het spectrum van de cuvet met de gele kleurstof verschilt echter duidelijk van de vorige twee: deze komt in alle aangeduide banden voor. Dit is logisch, aangezien de mens geel waarneemt als de afwezigheid van blauw licht⁷ [13].

De transmissiespectra van cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y zijn weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4: Transmissiespectra van cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y. Ook de referentiecuvet R is weergegeven.

Wat opvalt is dat de intensiteit bij cuvet 1 boven die van de referentiecuvet R ligt in het rode tot NIR-gebied. Dit is wellicht opnieuw te wijten aan fluctuaties in het spectrum van de donkerstroom.

Aangezien ε_λ in vergelijking 1 en 2 afhangt van de golflengte λ , wordt de extinctie E berekend bij een enkele golflengte $\lambda_0 = 442$ nm. Dit is de golflengte waarbij de intensiteit \mathcal{I}_0 van de referentiecuvet R een maximale waarde bereikt (bovendien vertonen de spectra van de andere cuvetten ook een relatief hoge waarde voor $\lambda_0 = 442$ nm). Daarnaast zijn de spectra bij deze golflengte mooi verticaal geordend⁸ en

⁵Indien reflectie aan het glas van de cuvet verwaarloosd wordt. Aangezien elke cuvet identiek is, maakt dit weinig verschil. Het heeft bovendien weinig praktisch nut om een homogeen spectrum te ontwikkelen, laat staan dat dit zelfs mogelijk is.

⁶Op het zicht, door spectra van verschillende lichtbronnen te vergelijken.

⁷Wanneer de mens zowel rood als groen licht waarneemt, wordt dit door de hersenen geïnterpreteerd als geel.

⁸Eigenlijk zou de verticale ordening van de spectra steeds dezelfde moeten blijven (zie vergelijking 1). Dit is echter niet altijd het geval door ruis, donkerstroom etc. (cf. cuvet 4 in het gebied 500 nm - 700 nm).

liggen deze niet te dicht bij elkaar. De transmissie \mathcal{T} en extinctie E voor cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y is terug te vinden in Tabel 2, waarbij de intensiteit van de referentiecuvet R de intensiteit \mathcal{I}_0 voorstelt. De relatieve fout op de gemeten intensiteiten bedraagt telkens 0,40 % (signal-to-noise ratio in Tabel 1).

Tabel 2: Transmissie $\mathcal{T} = \mathcal{I}/\mathcal{I}_0$ en extinctie $E = -\log \mathcal{T}$ voor cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y. De relatieve fout op \mathcal{T} bedraagt telkens 0,80 %. De absolute fout op E bedraagt telkens 0,0035.

cuvet	\mathcal{T} (%)	AF(\mathcal{T}) (%)	E
1	90,46	0,73	0,0435
2	86,34	0,70	0,0638
3	66,31	0,54	0,1784
4	27,30	0,23	0,5638
X	45,94	0,37	0,3378
Y	56,43	0,46	0,2485

De absolute fout op E werd als volgt berekend:

$$\text{AF}(E) = \text{AF}(\mathcal{T}) \times (\log \mathcal{T})' = \text{RF}(\mathcal{T}) / \ln(10) = 0,0035$$

Aangezien de concentraties van cuvetten 1, 2, 3 en 4 gekend zijn, kan a.d.h.v. deze waarden voor E de extinctiecoëfficiënt ε_λ uit vergelijking 2 bepaald worden, met $\lambda = \lambda_0$. Dit is weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Extinctiecoëfficiënt ε_λ voor cuvetten 1, 2, 3 en 4, met $\lambda = \lambda_0$. Ook het gemiddelde $\overline{\varepsilon_\lambda}$ is berekend.

cuvet	ε_λ (l / gram · cm)	AF(ε_λ) (l / gram · cm)
1	1,74	0,49
2	1,28	0,33
3	1,78	0,40
4	2,26	0,47
	$\overline{\varepsilon_\lambda} = (1,77 \pm 0,61) \text{ l / gram} \cdot \text{cm}$	

Er wordt verder gewerkt met de gemiddelde waarde $\varepsilon_\lambda \equiv \overline{\varepsilon_\lambda} = (1,77 \pm 0,61) \text{ l / gram} \cdot \text{cm}$. Mits de metingen in Tabel 3 niet in elkaars foutenmarge liggen, zijn de metingen niet-reproduceerbaar. Daarom is als absolute fout op het gemiddelde $3 \times \sigma$ genomen, met σ de (geschatte) standaardafwijking van $\overline{\varepsilon_\lambda}$ [18, 19].

Met behulp van vergelijking 2 en ε_λ kan nu de concentratie c van cuvetten X en Y bepaald worden. Dit is weergegeven in Tabel 4

Tabel 4: Concentratie c van cuvetten X en Y, met absolute fout.

cuvet	c (mg / 100 ml)	AF(c) (mg / 100 ml)
X	19,1	8,7
Y	14,0	6,5

Merk op dat de fout op c (≈ 50 %) redelijk groot is. Dit is vooral te wijten aan het feit dat de metingen niet-reproduceerbaar zijn en er weinig data is, waardoor de fout op ε_λ zo groot is.

De emissiespectra van lampen L1, L2, L3 en L6 zijn samen weergegeven in Figuur 5, 6, 7 en 8 op pagina's 7 en 8. Via de spectraallijnen [3] kan het gas in de lampen bepaald worden. Dit is terug te vinden in Tabel 5.

Tabel 5: Het gas in lampen L1 (rechts), L2 (rechts), L3 (rechts) en L6 (links).

lamp	L1	L2	L3	L6
gas	Hg	Cd	Zn	He

4 Besluit

De transmissiespectra van de cuvetten met rode, groene en gele kleurstof hebben pieken in de correcte banden van spectrale kleuren en komen overeen met verwachtingen.

Ook de spectra van cuvetten 1, 2, 3, 4, X en Y hebben over het algemeen⁹ de correcte vorm: hoe groter de concentratie c , hoe lager de intensiteit \mathcal{I} . Bij $\lambda = 442$ nm is voor alle cuvetten de extinctie E berekend, en de extinctiecoëfficiënt ε_λ voor cuvetten 1, 2, 3 en 4. Dit leidde tot een gemiddelde waarde:

$$\varepsilon_\lambda = (1,77 \pm 0,61) \text{ l / gram} \cdot \text{cm}$$

De grote fout is een gevolg van de niet-reproduceerbaarheid en een tekort aan metingen. Met behulp van deze waarde zijn vervolgens de concentraties c_X en c_Y van cuvetten X en Y berekend:

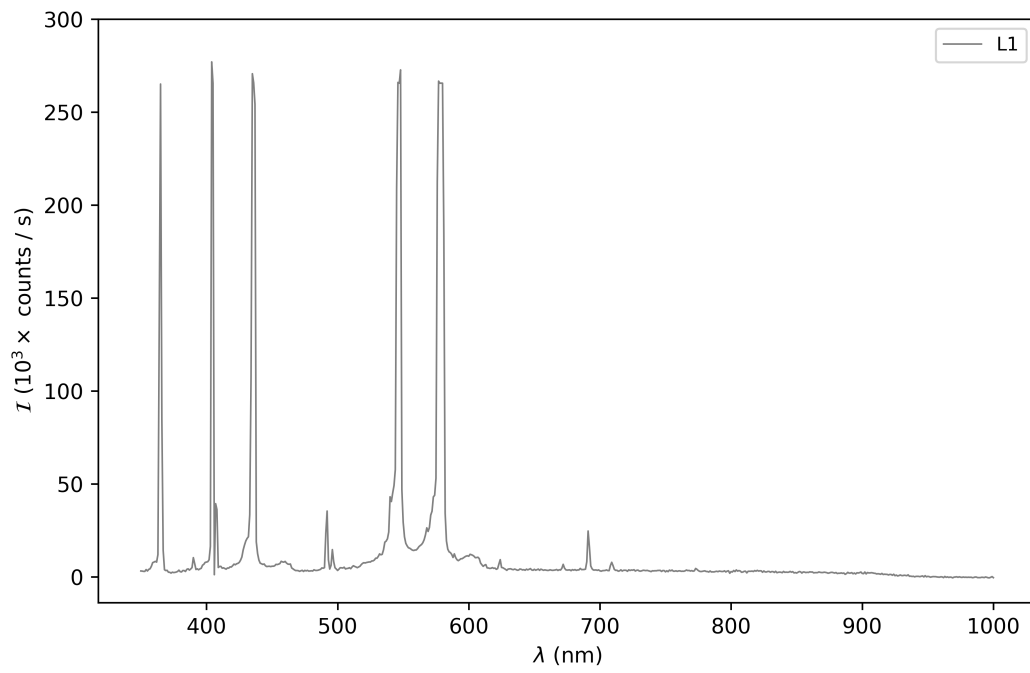
$$c_X = (19,1 \pm 8,7) \text{ mg / 100 ml} \quad c_Y = (14,0 \pm 6,5) \text{ mg / 100 ml}$$

Aan de hand van de spectraallijnen [3] werden de volgende elementen in de lampen bepaald.

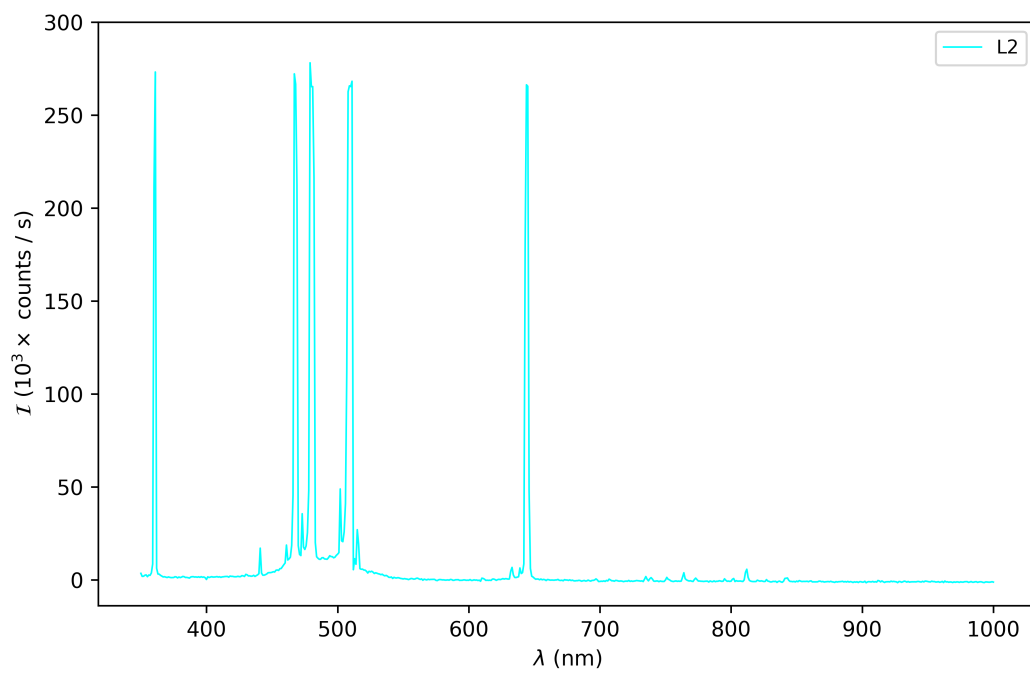
$$\text{L1: Hg} \text{ — L2: Cd} \text{ — L3: Zn} \text{ — L6: He}$$

Over het algemeen is de proef geslaagd.

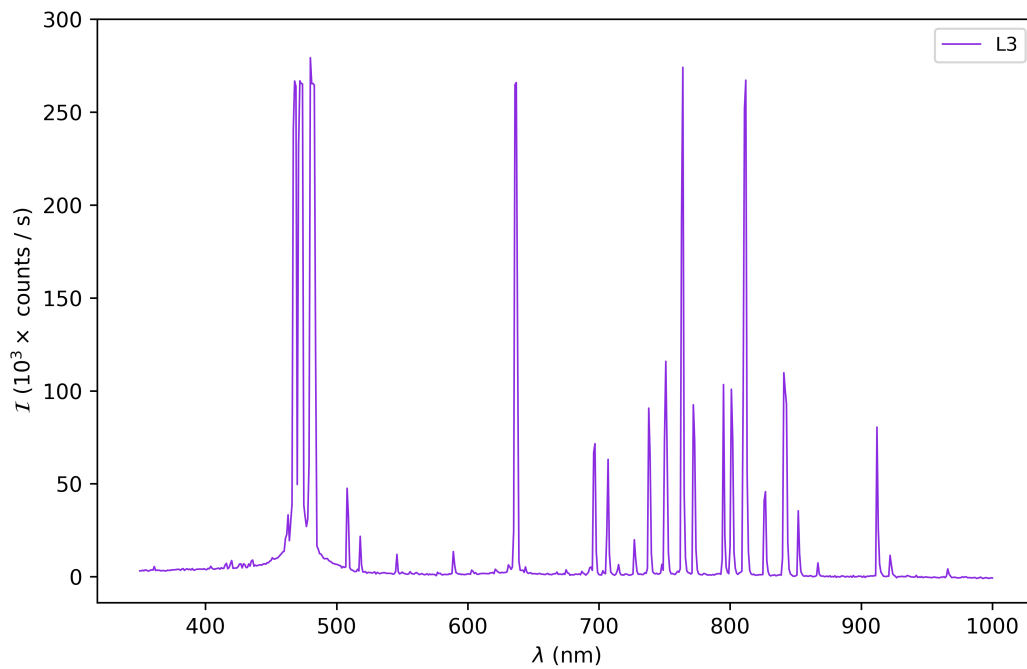
⁹Op enkele uitzonderingen na, zoals het feit dat spectra van verschillende cuvetten elkaar soms snijden, en dat het spectrum van cuvet 1 zelfs boven dat van de referentiecuvet R komt te liggen in het rode tot NIR-gebied.



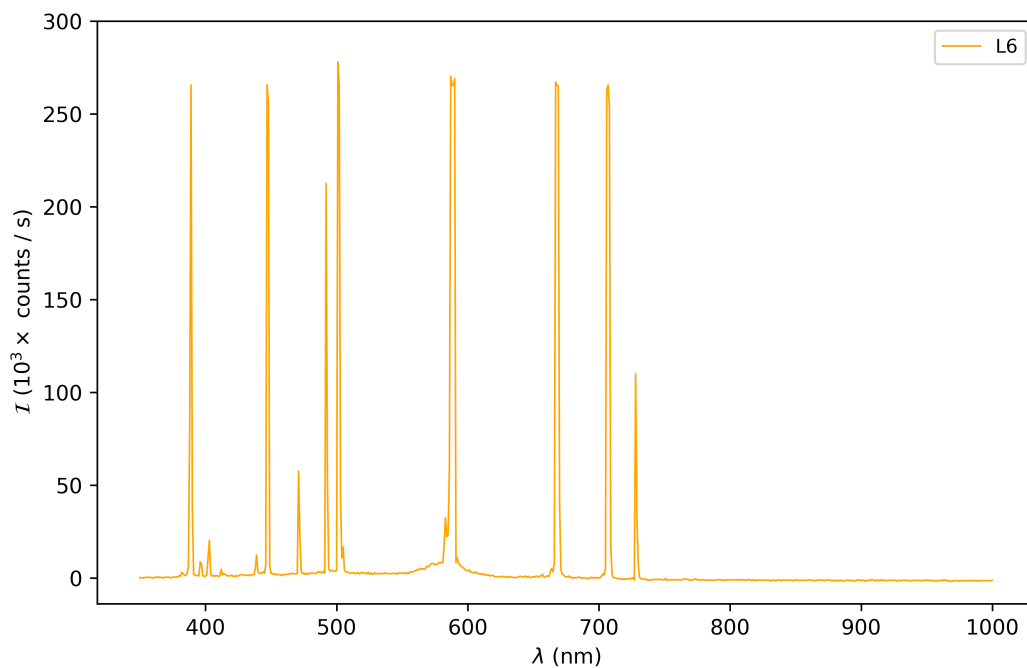
Figuur 5: Emissiespectrum van lamp L1 (rechts).



Figuur 6: Emissiespectrum van lamp L2 (rechts).



Figuur 7: Emissiespectrum van lamp L3 (rechts).



Figuur 8: Emissiespectrum van lamp L6 (links).

Bronvermelding

- [1] Wikipedia contributors. *Transmittance* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. 2023. URL: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Transmittance&oldid=1180856942>.
- [2] Wikipedia contributors. *Absorbance* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. 2023. URL: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Absorbance&oldid=1187652191>.

- [3] Ufora. *Experimenteren in de fysica en sterrenkunde 2 - Lijst van spectraallijnen*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. URL: https://ufora.ugent.be/content/enforced/854712-C004218A_2023/Lijst%20van%20spectraallijnen.PNG.
- [4] Wikipedia contributors. *Spectrophotometry* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. 2023. URL: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Spectrophotometry&oldid=1185804443>.
- [5] Ocean Optics. *SpectraSuite Spectrometer Operating Software*. [Online; geraadpleegd op 28 november 2023]. URL: <https://spectrasuite.software.informer.com/download/>.
- [6] Ocean Optics. *Red Tide USB650 Fiber Optic Spectrometer - Installation and Operation Manual*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. URL: <https://www.oceaninsight.com/globalassets/catalog-blocks-and-images/manuals--instruction-ocean-optics/spectrometer/usb-650-red-tide-installation-and-operation-instructions.pdf>.
- [7] Wikipedia contributors. *Dark current (physics)* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. 2023. URL: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dark_current_\(physics\)&oldid=1168345577](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dark_current_(physics)&oldid=1168345577).
- [8] Ocean Optics. *SpectraSuite Spectrometer Operating Software - Installation and Operation Manual*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. URL: <https://mmrc.caltech.edu/Biologic%20Stopped%20Flow/Manuals/Ocean%20Optics/SpectraSuite.pdf>.
- [9] Wikipedia contributors. *International System of Units* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=International_System_of_Units&oldid=1188322745.
- [10] Microsoft. *Excel*. URL: <https://www.microsoft.com/nl-be/microsoft-365/excel>.
- [11] Ufora. *Experimenteren in de fysica en sterrenkunde 2 - Theorie Spectrofotometer*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. URL: <https://ufora.ugent.be/d21/1e/content/854712/viewContent/1949708/View>.
- [12] Wikipedia contributors. *Beer-Lambert law* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 5 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Beer%E2%80%93Lambert_law&oldid=1181360014.
- [13] Wikipedia contributors. *Color vision* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 4 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Color_vision&oldid=1187246038.
- [14] Wikipedia contributors. *Electromagnetic absorption by water* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; accessed 6-December-2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Electromagnetic_absorption_by_water&oldid=1150410262.
- [15] Ocean Insight. *Spectroscopy - Light Sources*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. URL: <https://www.oceaninsight.com/products/light-sources/>.
- [16] Wikipedia contributors. *Light-emitting diode* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Light-emitting_diode&oldid=1188491329.
- [17] Wikipedia contributors. *Infrared* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. 2023. URL: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Infrared&oldid=1186603657>.
- [18] Wikipedia contributors. *Standard deviation* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Standard_deviation&oldid=1186646812.
- [19] Wikipedia contributors. *Central limit theorem* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online; geraadpleegd op 6 december 2023]. 2023. URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Central_limit_theorem&oldid=1188038646.