

Bestäm koncentrationen av ett ämne med spektrofotometri

Niklas Dahrén



Spektrofotometri

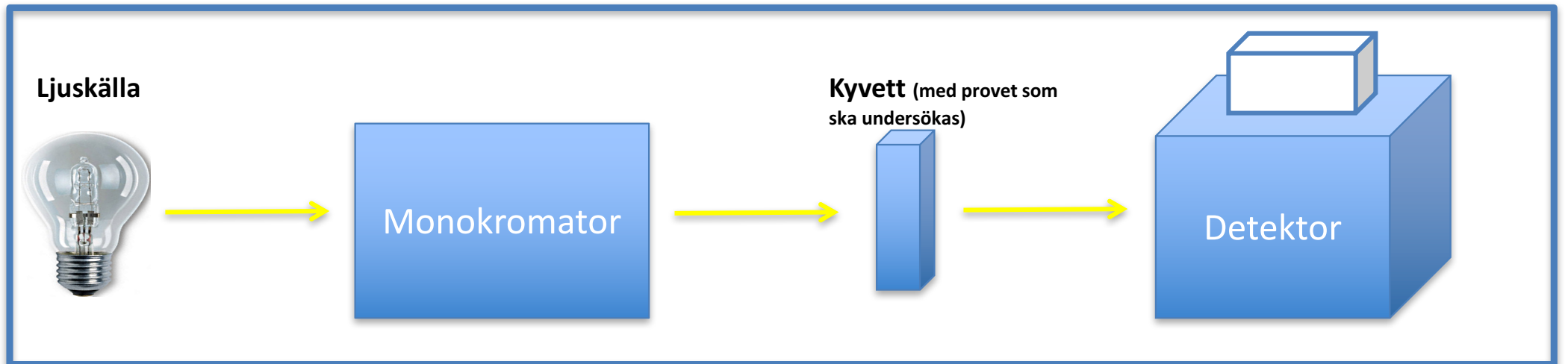
- ✓ **Syftet med spektrofotometri** är att mäta koncentrationen av ett ämne i en lösning. Det sker genom att vi bestrålar lösningen med ultraviolett eller visuellt ljus (beroende på ämnet vi undersöker och dess egenskaper) och får ut ett "absorbansvärde". Desto mer ljus som absorberas av lösningen desto högre koncentration finns det av ämnet.
- ✓ **Spektrofotometri utförs** med en spektrofotometer.
- ✓ **UV-spektrofotometri:** UV står för "ultraviolett ljus" och innebär korta våglängder som det mänskliga ögat ej kan uppfatta. Vissa ämnen kan absorbera UV-ljus men inte vanligt visuellt ljus och därför använder vi en "UV-spektrofotometer" när vi ska bestämma koncentrationen av dessa ämnen.
- ✓ **Vis-spektrofotometri:** Vis står för "visuellt ljus" och innebär medellånga våglängder som det mänskliga ögat kan uppfatta. För ämnen som kan absorbera visuellt ljus använder vi en "Vis-spektrofotometer".

Spektrofotometer



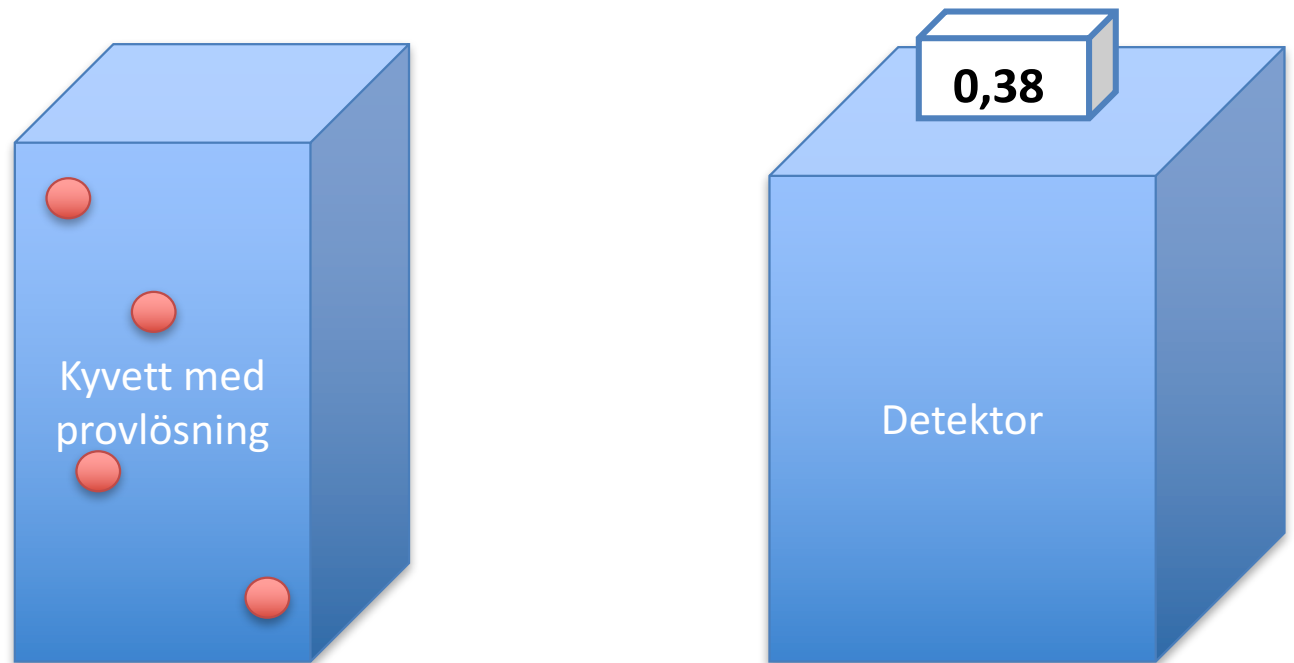
Bildkälla: By Nikoleta Kraifová (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], via Wikimedia Commons

Spektrofotometerns uppbyggnad



Principen bakom spektrofotometri

- ✓ **En ljuskälla skickar ut ljus mot kyvetten där provlösningen med ämnet finns.** Ämnets molekyler absorberar en stor del av det ljus som åker in i kyvetten. Desto fler molekyler (högre koncentration av ämnet) desto mer ljus absorberas.



- ✓ **Detektorn registrerar transmittansen** vilket är den andel ljus som tar sig igenom och träffar detektorn. Detektorn kan sedan utifrån transmittansen beräkna absorbansen.

Från detektorn får vi ett absorptionsvärde

1. **Detektorn registrerar det ljus** som träffar detektorn och räknar sedan ut transmittansen med följande formel:

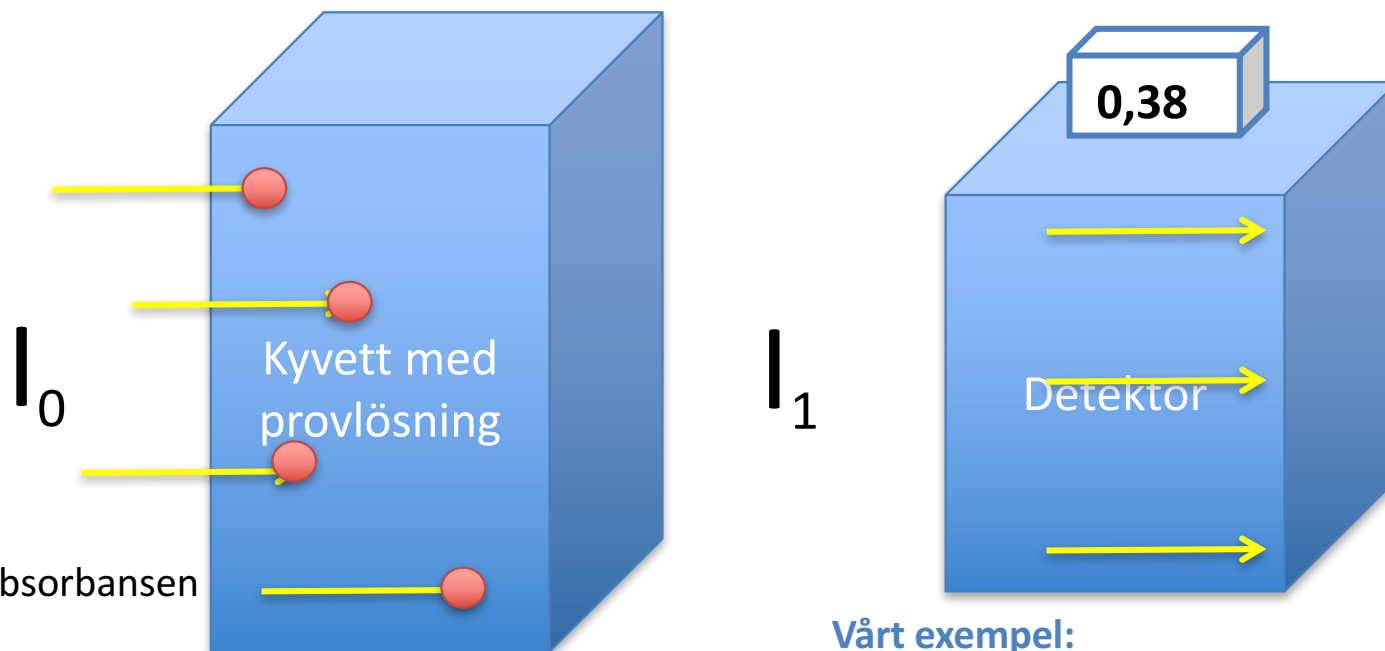
$$T = \frac{I_1}{I_0}$$

I_1 : Den mängd ljus som tar sig igenom kyvetten och träffar detektorn.

I_0 : Den mängd ljus som skickades in i kyvetten.

2. **Detektorn** räknar sedan ut absorptionsen med följande formel:

$$A = -\log_{10} T$$



Vårt exempel:

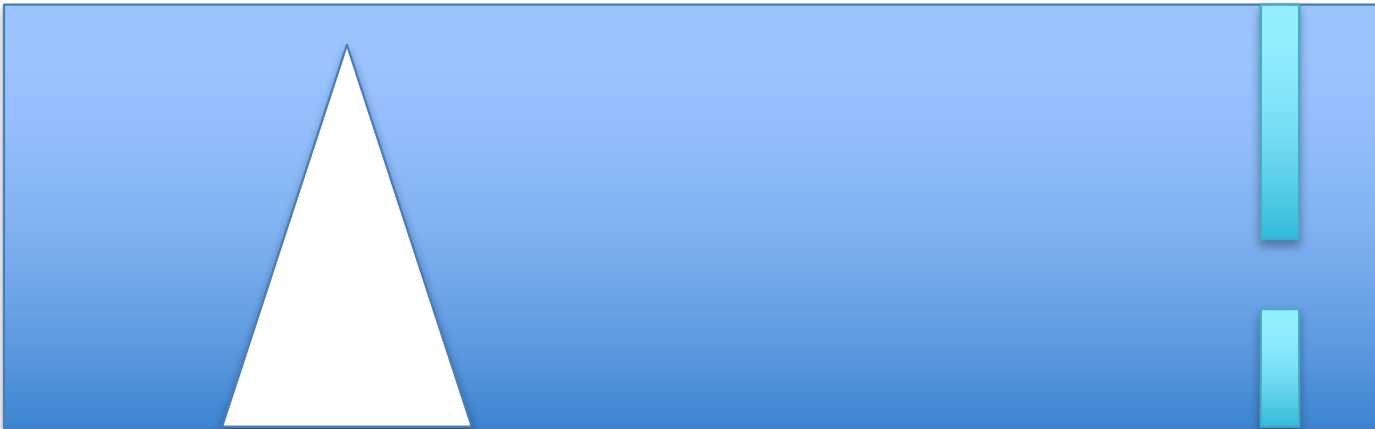
$$T: 3/7 = 0,42 = 42 \%$$

$$-\log(0,42) = 0,38$$

$$T = 0,42 \quad T = 42 \% \quad A = 0,38$$

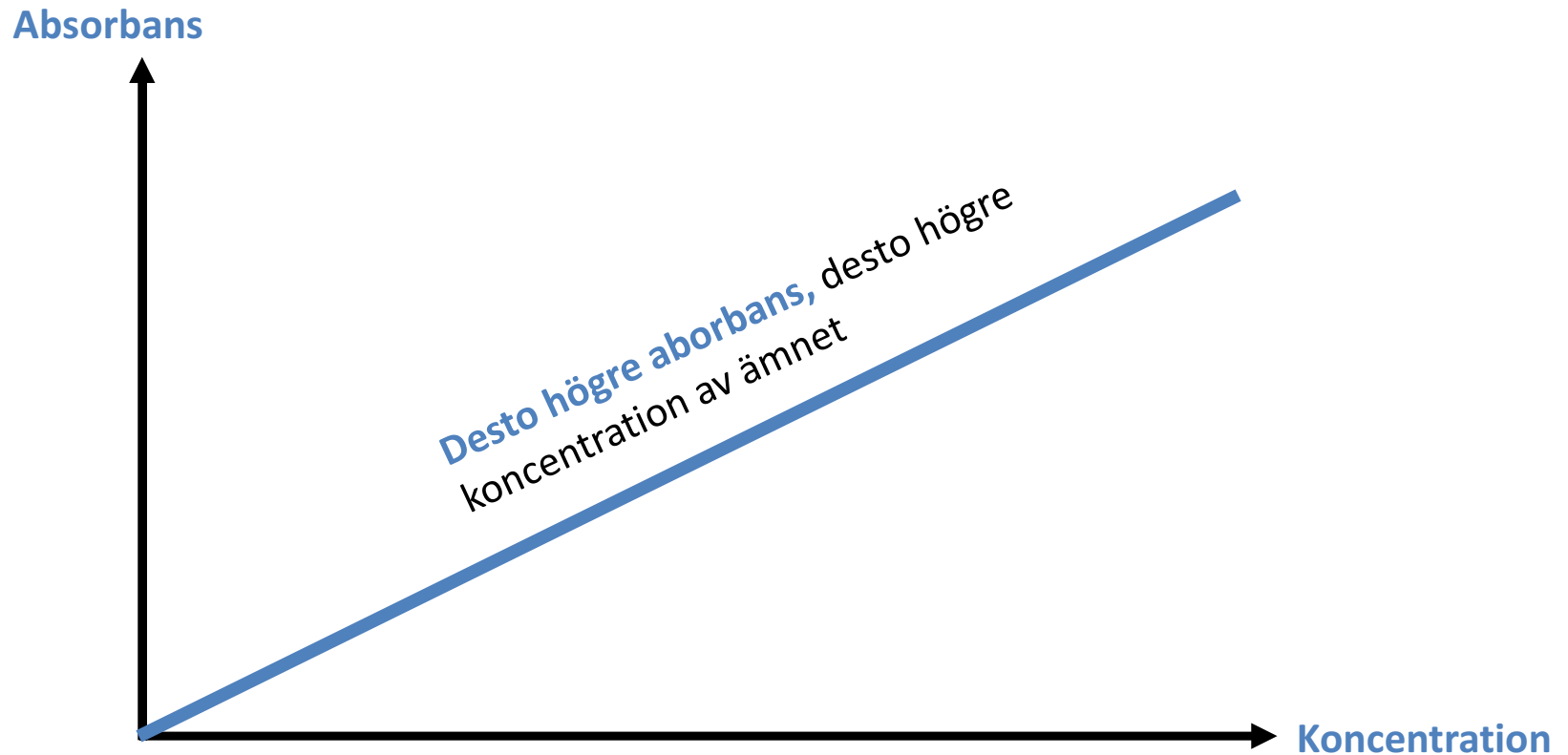
Monokromatorns funktion

- ✓ **En monokromator innehåller ett vridbart prisma och en spalt:** Prismat delar upp det vita ljuset, som kommer från ljuskällan, i alla dess våglängder. Spalten gör att bara en enda våglängd passerar ut ur monokromatorn. När vi ställer in spektrofotometern på en viss våglängd så vrider vi prismat så att rätt våglängd "slinker" ut genom spalten!

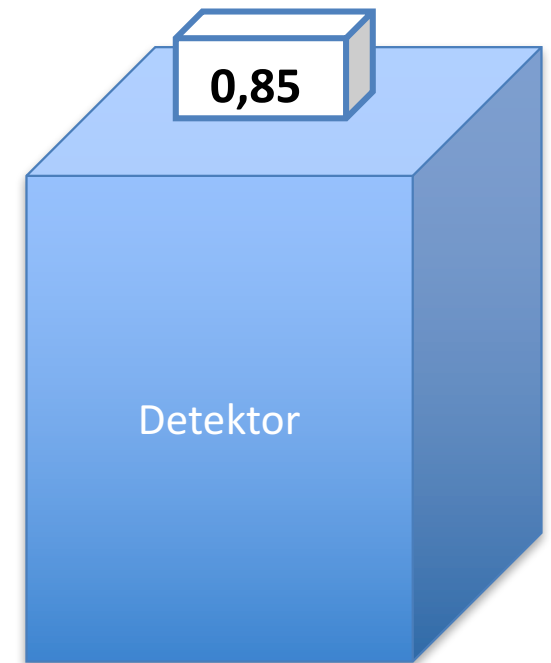
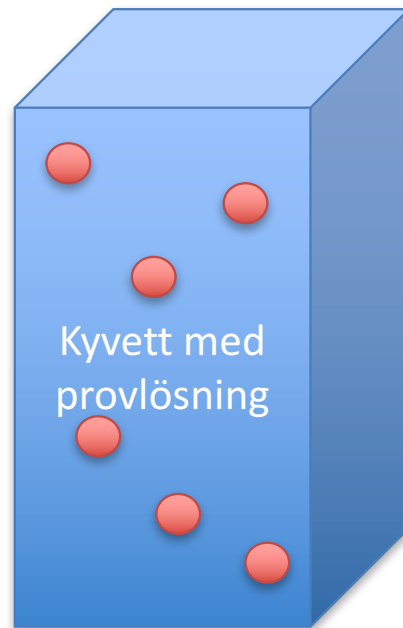


- ✓ **Vi ställer in monokromatorn** på den våglängd av ljuset som ämnet är bäst på att absorbera. Varje ämne har en specifik våglängd som ämnet absorberar bäst.
- ✓ **Monokromatorn filtrerar alltså bort de** oönskade våglängderna och släpper enbart igenom den våglängd vi har ställt in den på.

Absorbansvärdet är proportionerligt mot koncentrationen



En högre koncentration av ämnet ger ett högre absorptionsvärde



Uträkning av absorptionsvärdet: $T: 1/7 = 0,14 = 14\%$
 $-\log(0,14) = 0,85$

$T = 0,14\%$ $T = 14\%$ $A = 0,85$

Men hur vet vi den exakta koncentrationen?

- ✓ **När vi mätte vårt ämne i det första exemplet** fick vi absorbansvärdet 0,38. Men vad innebär ett absorbansvärde på 0,38 i koncentration? Vi vet bara att ett högt absorbansvärde innebär en hög koncentration och tvärtom. Vi vet däremot inte den exakta koncentrationen. För att ta reda på det måste vi jämföra med absorbansen från prover med kända koncentrationer.
- ✓ **Vi blandar därför till ett antal, ca 4-6 st, "standardlösningar"** (eller kalibreringslösningar) med kända koncentrationer av ämnet (kallas ofta för en "standardserie" eller "kalibreringsserie"). Koncentrationerna av dessa bör ligga inom ett rimligt intervall.
- ✓ **Vi mäter sedan absorbansen** av dessa kända prover. Om en standardlösning med känd koncentration också har absorbansvärdet 0,38 så borde vårt prov ha samma koncentration som denna standardlösning!

Standard-lösningar:	Koncentration (mol/dm ³):
Standard 1	0,5
Standard 2	0,25
Standard 3	0,125
Standard 4	0,0625

Vi jämför vårt erhållna absorptionsvärde med absorptionsvärdet från standardlösningarna

- ✓ **Nedanstående tabell visar de absorptionsvärdena** vi fick när vi mätte våra standardlösningar med kända koncentrationer (vår standardserie).

Standard-lösningar:	Koncentration (mol/dm ³):	Lösningarnas uppmätta absorptionsvärden:
Standard 1	0,5	0,79
Standard 2	0,25	0,38
Standard 3	0,125	0,21
Standard 4	0,0625	0,11

- ✓ **Fråga:** Vilken är koncentrationen av vårt okända prov om absorptionen av provet var 0,38?
- ✓ **Lösning:** Genom att jämföra vårt prov med dessa värden kan vi lista ut den okända koncentrationen. Tabellen visar att absorptionsvärdet 0,38 motsvarar koncentrationen 0,25 mol/dm³.

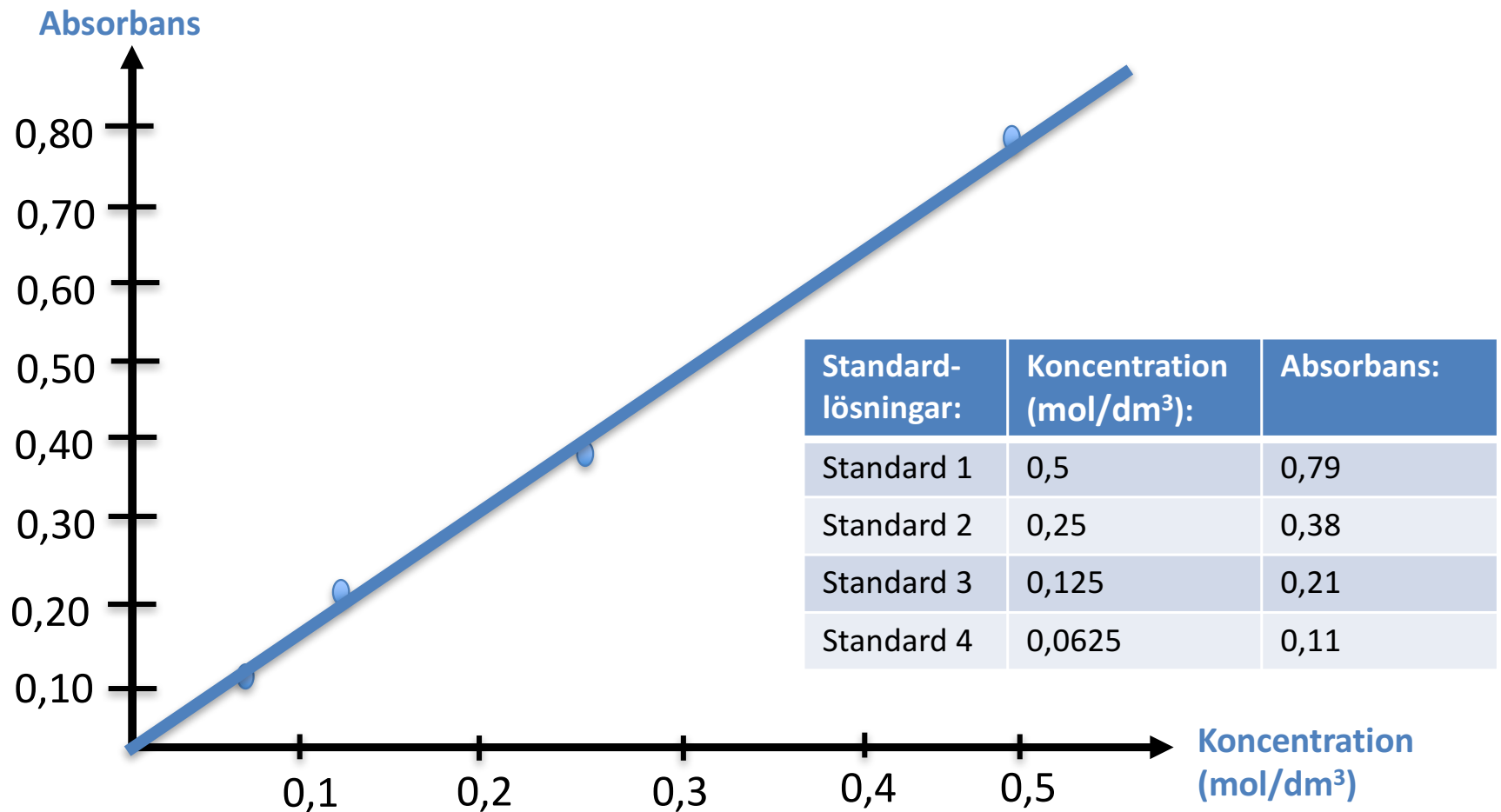
Men vad gör vi om absorbansvärdet istället är 0,30 och alltså inte exakt matchar?

- ✓ **Med största sannolikhet kommer inte det uppmätta absorbansvärdet** av provet med okänd koncentration att exakt matcha absorbansvärdet från något av de kända proverna.
- ✓ **Lösning:**
 1. Vi gör en standardkurva som baseras på våra standardlösningar med kända koncentrationer.
 2. Vi använder sedan standardkurvan för att ta reda på koncentrationen av vårt prov.

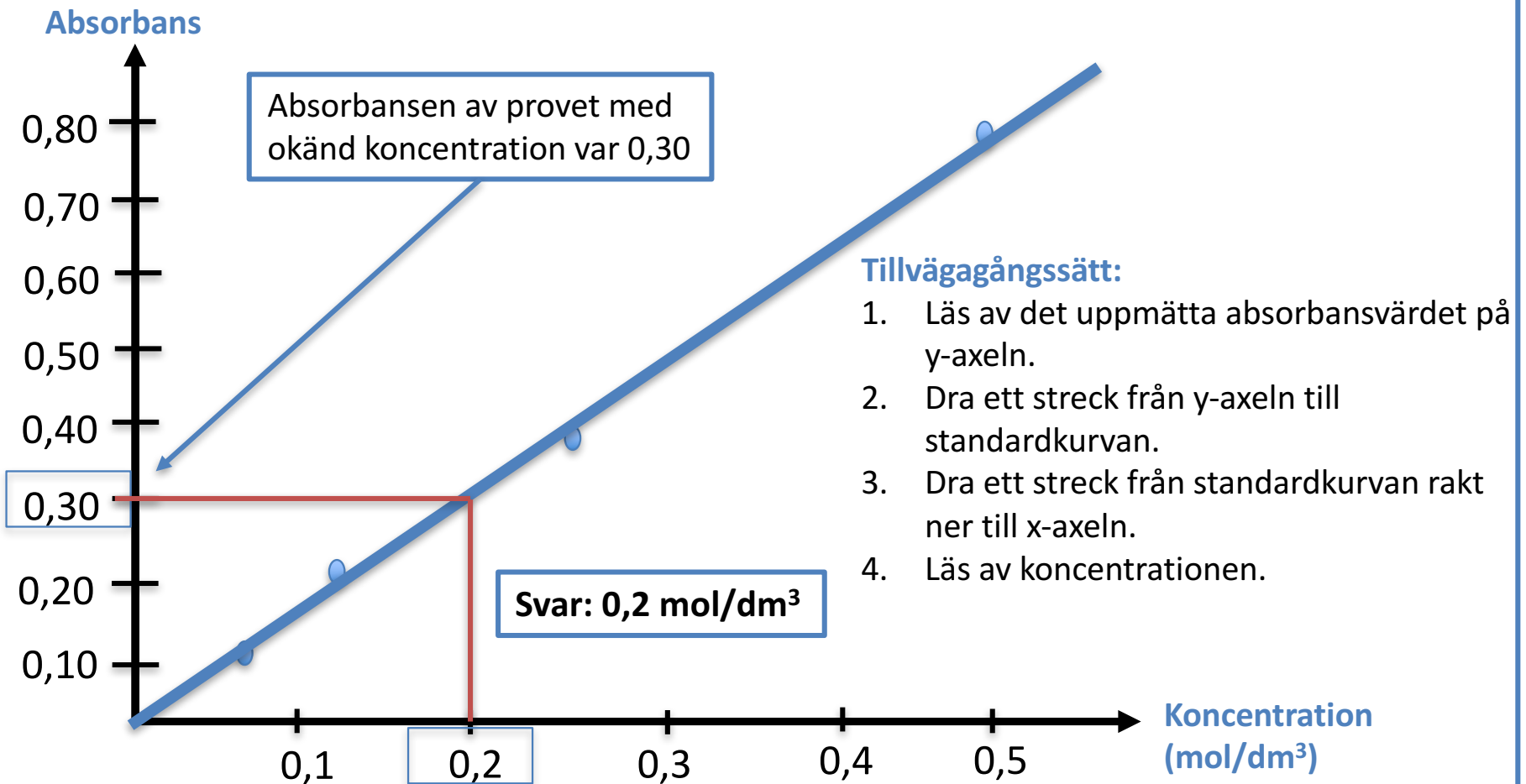
- ✓ **Det är väldigt sällan som absorbansvärdet exakt matchar** någon av de kända proverna, så i praktiken får man nästan alltid göra en standardkurva.

Standard-lösningar:	Koncentration (mol/dm ³):	Lösningarnas uppmätta absorbansvärden:
Standard 1	0,5	0,79
Standard 2	0,25	0,38
Standard 3	0,125	0,21
Standard 4	0,0625	0,11

Vi gör en "standardkurva" (kalibreringskurva) med värdena från standardlösningarna



Vi använder standardkurvan för att ta reda på den okända koncentrationen



”Lambert-Beers lag” visar sambandet mellan absorbans och koncentration

$$A = \varepsilon_{\lambda} cl$$

Om extinktionskoefficienten är känd för det ämne som undersöks kan ”Lambert-Beers lag” användas för att beräkna koncentrationen, vi behöver då inte göra en standardkurva.

A = Absorbansen.

ε = ”Molära extinktionskoefficienten”, den är specifik för det ämne som undersöks och är ett värde på hur bra ämnet är på att absorbera ljus vid en viss specifik våglängd.

c = Koncentrationen av ämnet i kyvetten.

l = Kyvettens längd, oftast 1 cm (den sträcka ljusets färdas genom kyvetten).

Se gärna fler filmer av Niklas Dahrén:

<http://www.youtube.com/Kemilektioner>

<http://www.youtube.com/Medicinlektioner>

