

UV-VIS spektrofotometri

Interpretacija i primjena UV-VIS spektara

Elektronska spektroskopija

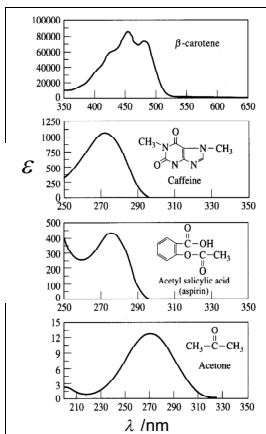
Elektromagnetsko zračenje valne duljine u rasponu od 200 - 800 nm može potaknuti prijelaze elektrona vanjskih ljuski:

- Kod atoma su to elektroni u valentnim orbitalama.
- Kod molekula su to elektroni u veznim orbitalama.

Energija molekule u različitim elektronskim stanjima ne može se opisati jednostavnim modelima.

Razmatramo kvalitativne aspekte elektronskih prijelaza.

UV-VIS spektri

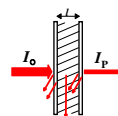


Mjerenje UV-VIS spektra

UV-VIS spektar:

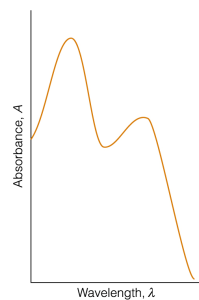
Izmjerena apsorbancija A prema valnoj duljini λ .

Izmjereni molarni koeficijent apsorpcije ϵ prema valnoj duljini λ .



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

$$A = -\log T = -\log \frac{I_p}{I_0} = \log \frac{I_0}{I_p}$$

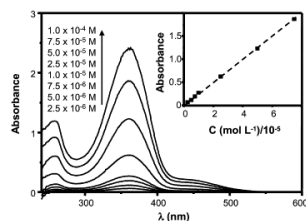


Beer-Lambertov zakon

Pokazuje odnos između apsorbancije i koncentracije tvari u otopini.
Od koristi za kvantitativno određivanje tvari u kemiji, farmaciji i biokemiji.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

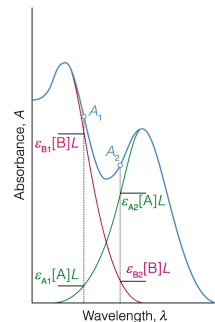
ϵ = molarni koeficijent apsorpcije.
 l = debljina sloja uzorka.
 c = koncentracija tvari u otopini.



Beer-Lambertov zakon

Izmjerenoj apsorbanciji na određenoj valnoj duljini doprinosi svaka tvar koja apsorbira na toj valnoj duljini.

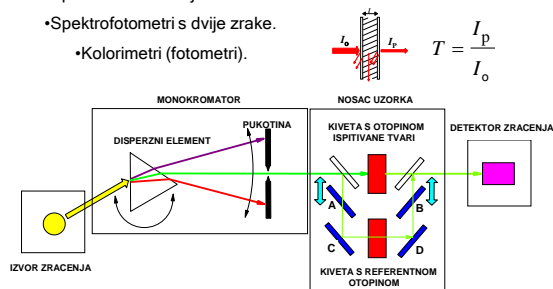
$$A = l \cdot \sum_i \epsilon_i \cdot c_i$$



Mjerenje UV-VIS spektra

Instrumenti za mjerenje UV-VIS spektra:

- Spektrofotometri s jednom zrakom.
- Spektrofotometri s dvije zrake.
- Kolorimetri (fotometri).



Izvori zračenja

Halogena ili Volframova žarulja (VIS):

- Jaki intenzitet u vidljivom području i vrlo slabi u UV području.
- Vrlo mala promjena intenziteta s vremenom.

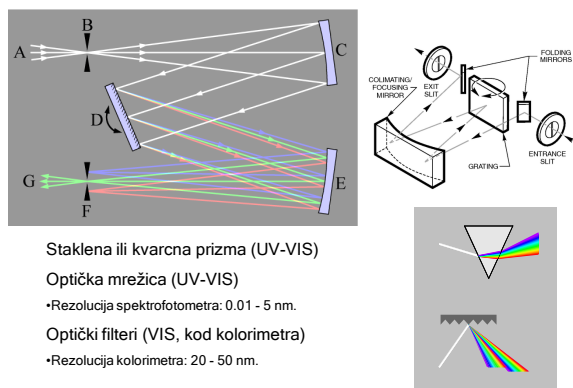
Deuterijska lampa (UV):

- Uporabljeni intenzitet u UV području slabi u vidljivom području.
- Vrlo mala promjena intenziteta s vremenom.
- Intenzitet s vremenom slabi (kratko vrijeme trajanja ~1000 sati).

Xenon lampa (UV-VIS):

- Jaki intenzitet u vidljivom i UV području.

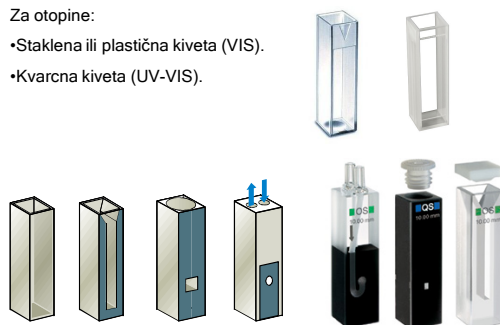
Monokromator



Nosači uzorka (kivete)

Za otopine:

- Staklena ili plastična kiveta (VIS).
- Kvarcna kiveta (UV-VIS).



Detektori

Fotomultiplikator (UV-VIS).

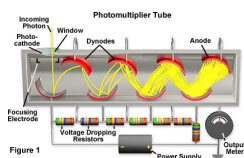
- Vrlo velika osjetljivost i mali šum.
- Brzi odziv.

Fotodioda (UV-VIS).

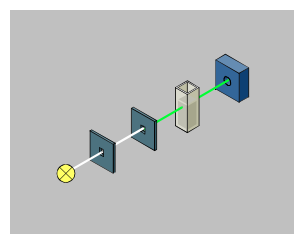
- Velika osjetljivost i široki raspon mjerenja.
- Dobar odnos signal/šum.
- Zahtjeva manje složene elektronske sklopove.

Fotodiodni niz (UV-VIS).

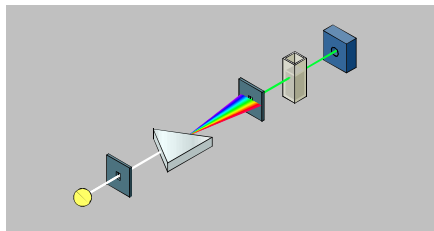
- Sastoji se od niza fotodioda.
- Vrlo brzo izmjeri cijelo područje spektra.



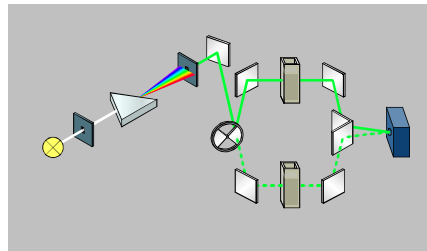
Kolorimetar



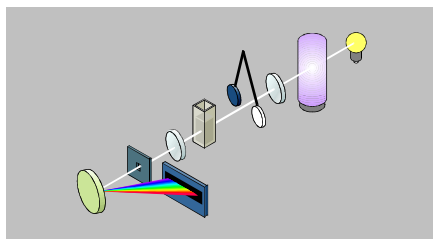
Spektrofotometar s jednom zrakom



Spektrofotometar s dvije zrake



UV-VIS Spektrofotometar s jednom zrakom i fotodiodnim nizom



UV-VIS Spektrofotometar s fotodiodnim nizom



IMERZIJSKA PROBA UV-VIS SPEKTROFOTOMETRA

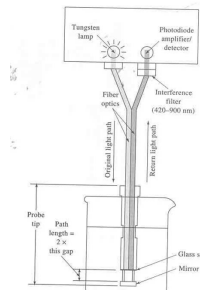
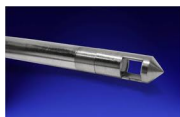


Figure 13-16 Schematic of a probe-type photometer. (Courtesy of Biotek Instrument Company, Division of Syntex Corp., Foster, Waltham, NY.)

Primjena UV-VIS spektroskopije

U svakodnevnoj uporabi u kemiji, farmaciji i biokemiji u analitici, kontroli kvalitete i razvoju lijekova.

Kvalitativna primjena UV-VIS spektroskopije, uz određivanje strukture molekula, je identifikacija nepoznatih spojeva i detekcija poznatih spojeva (molekula).

Kvantitativna primjena spektroskopije je mjerenje koncentracije poznatih spojeva u uzorcima. Tako se brojne analitičke metode u kemiji, biokemiji i farmaciji temelje na uporabi UV-VIS spektroskopije.

- Primjenjiva za veliki broj organskih i anorganskih spojeva.
- Osjetljiva i selektivna metoda.

Primjena UV-VIS spektroskopije

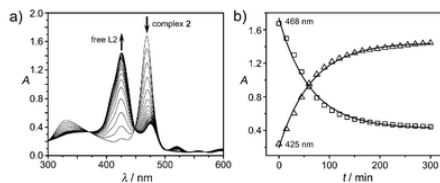
Mogućnosti mjerenja UV-VIS spektrofotometrom

Mjerenje UV-Vis spektra (A prema λ):

- za pojedinu valnu duljinu mjeri se apsorbancija.

Mjerenje UV-Vis spektra u vremenu (A prema t i prema λ):

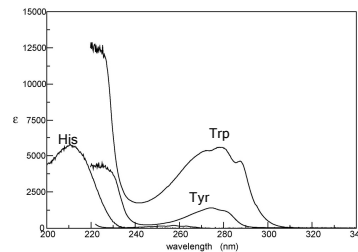
- Može se pratiti odvijanje procesa tijekom vremena.
- Od koristi u kinetici, kromatografiji, itd.



UV apsorpcija proteina

Kromofori proteina mogu se podijeliti na:

- peptidna veza: ~ 190 nm ($\epsilon \sim 7000$ M⁻¹cm⁻¹) i ~ 210 – 220 nm ($\epsilon \sim 100$ M⁻¹cm⁻¹).
- aminokiseline: (Trp, Phe, Tyr, His) ~ 230 – 300 nm ($\epsilon \sim 1300$ – 5700 M⁻¹cm⁻¹).
- prostetičke skupine, (npr. Hem).

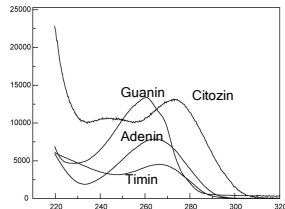


UV apsorpcija nukleinskih kiselina

- UV apsorpcija nukleinskih kiselina dolazi od purinskih i pirimidinskih baza.

- DNA i RNA fragmenti imaju maksimum apsorpcije na ~ 260 nm i $\epsilon \sim 10000$ M⁻¹cm⁻¹.

- Iz ovih podataka može se procijeniti približna koncentracija čistih uzoraka DNA i RNA vrlo male koncentracije.



UV-Vis apsorpcija biomolekula

