



- **SPEKTROFOTOMETRIJA**

ANALITIČKE PROCEDURE

Za određivanje koncentracije rastvorenih supstanci:

- **tehnike koje se baziraju na intenzitetu apsorbovane ili reflektovane svetlosti**
- **tehnike koje se baziraju na razdvajanju frakcija određenih molekula sa mogućnošću kvalifikovanja i kvantifikovanja supstance od interesa**

Intenzitet apsorbovane svetlosti: fotometrija i spektrofotometrija

Intenzitet reflektovane svetlosti: nefelometrija i turbidimetrija

Razdvajanje frakcija: elektroforeza i hromatografija

FOTOMETRIJA- merenje intenziteta svetlosti koji pada na neku površinu

Najčešće korišćena metoda

Omogućava da se kvantitativno odredi sadržaj velikog broja jedinjenja u telesnim tečnostima i drugim rastvorima

Uslovi:

- 1. da je rastvor obojen**
- 2. da je rastvor bistar (pravi rastvori- veličina čestice $< 1\text{nm}$, zbog rasipanja svetlosti)**
- 3. da molekul apsorbuje svetlost**

TALASNA DUŽINA:

Fizička definicija- rastojanje između dva uzastopna pika periodičnog talasa u jednoj periodi

Analitička definicija- opisuje poziciju unutar spektra

Svetlost (290-800nm):

- Vidljivi deo spektra 380- 750 nm
 - Ultraljubičasti (UV) deo spektra < 380 nm (blizak 200-380nm; dalek < 220nm)
 - Infracrveni (IC) deo spektra > 750 nm
- } Kivete od silikatnog stakla

Svetlost čine diskretni paketi energije- fotoni.

Veza između energije fotona i njihove frekvence $E=h\nu$

h -Planckova konstanta 6.62×10^{-27} Erg/sec

Frekvencija svetlosti (ν) i talasna dužina su povezane kao:

$$\nu = c/\lambda$$

Kombinacijom odgovarajućih jednačina se dobija da je:

$$E=hc/\lambda$$

Energija svetlosti je obrnuto proporcionalna talasnoj dužini

Sunčeva svetlost kao i svetlost koju emituje volframova lampa predstavlja mešavinu zračenja različitih talasnih dužina koju oko prepoznaje kao “belu” svetlost

Tabela: Približni odnosi između talasnih dužina i karakterističnih boja

Talaska dužina (nm)	Region	Boja
< 380	UV	Nevidljiva
380-440	Vidljivi	Ljubičasta
440-500	Vidljivi	Plava
500-580	Vidljivi	Zelena
580-600	Vidljivi	Žuta
600-620	Vidljivi	Narandžasta
620-750	Vidljivi	Crvena
800-2500	Blizak IC	Nevidljiva
2500-15000	Srednji IC	Nevidljiva
15000-1000000	Daleko IC	Nevidljiva

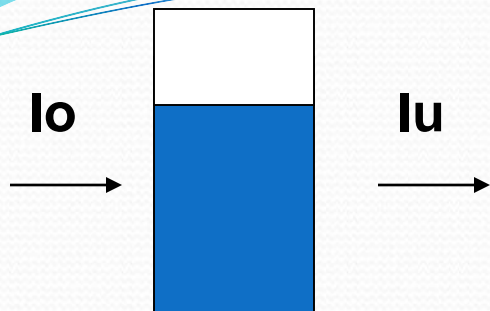
Sposobnost obojenih rastvora da u većoj ili manjoj meri propuštaju svetlost se naziva **transparenca**

Spektrofotometrija se zasniva na **Lamber-Berovom zakonu**

Intenzitet monohromatske svetlosti, prilikom prolaska kroz određeni rastvor, opada eksponencijalno sa dužinom pređenog puta kroz rastvor i porastom koncentracije molekula koji apsorbuju svetlost u rastvoru.

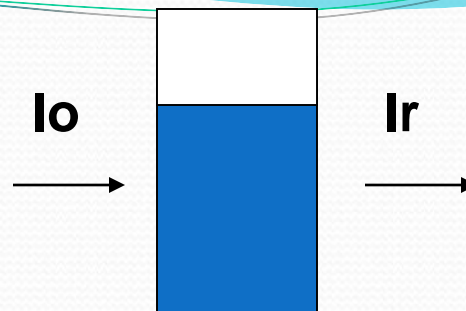
Lamber Berov zakon važi samo za monohromatsku svetlost

Uzorak



$$I_0 - I_u = I_{\text{apsor}} \quad T = I_u / I_0$$

Referentni rastvor



$$I_0 - I_r = I_{\text{apsor}} \quad T = I_r / I_0$$

Da bi se eliminisao uticaj zida kivete ili samog rastvarača, paralelno se vrši i merenje referentne kivete (voda, vazduh).

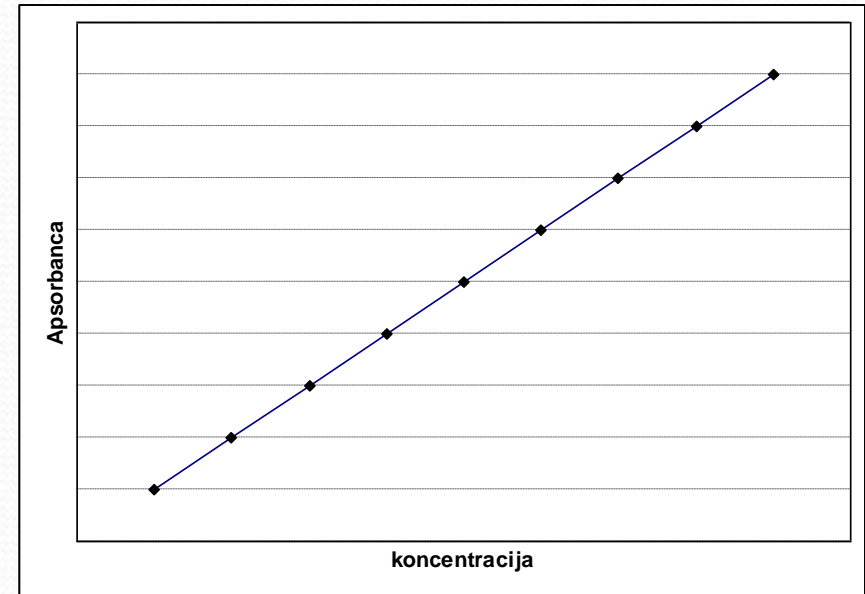
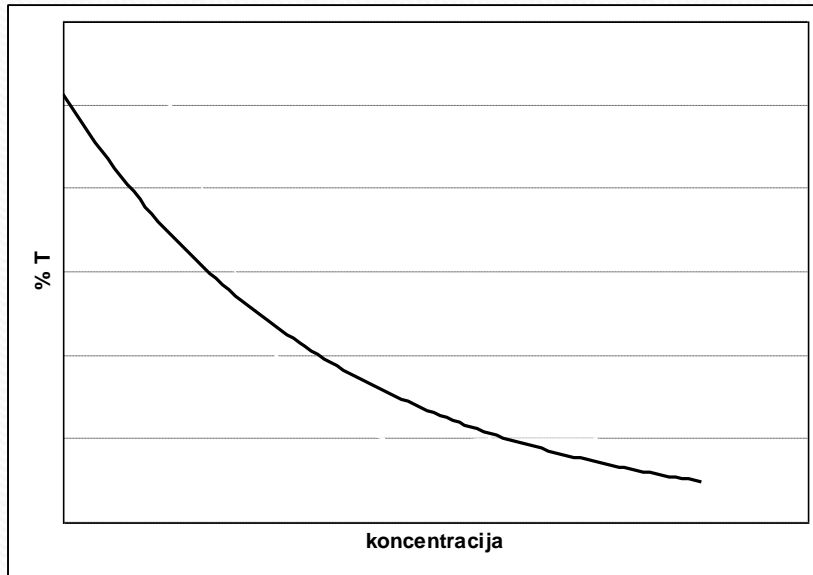
U praksi se koristi za baždarenje instrumenta na 100% transparencije

Količina apsorbovane svetlosti $A = -\log I_u / I_r = -\log T$

LAMBER-OV ZAKON

Transparenca zavisi od:

- dužine pređenog puta
- koncentracije ispitivanog jedinjenja u rastvoru



$$T = I / I_0 = e^{-kcl}$$

$$\ln I / I_0 = -kcl$$

$$\log I_0 / I = kcl$$

$$A = \epsilon c l \text{ –linearna zavisnost}$$

BEROV ZAKON

Koncentracija supstance je direktno proporcionalna količini apsorbovane svetlosti tj obrnuto proporcionalna logaritmu propuštene svetlosti. Matematički, to je

$$A = a b c$$

a- konst apsorptivnost; b- dužina pređenog puta (cm) c-konc (g-L)

Ukoliko je $b=1\text{cm}$ a $c=1\text{g/l}$, definiše se **molarni apsorpcioni koeficijent** ϵ (L/mol x cm)

Vrednosti (ϵ) su pogodne za karakterizaciju supstance, njene čistoće, i za poređenje osetljivosti merenja sprovedenog na različitim derivatima iste supstance.

U praksi, linearna zavisnost apsorbanca i koncentracije se mora potvrditi i eksperimentalno za svaki instrument pod određenim okolnostima.

Aplikacija Berovog zakona

U praksi je potrebno eksperimentalno potvrditi direktnu zavisnost između apsorbance i koncentracije za dati merni instrument i pod specifičnim uslovima.

Nekada može postojati linearna zavisnost do određene koncentracije, pri čemu se za te vrednosti može primeniti Berov zakon i izračunati kalibraciona konstanta (K). Ona se može iskoristiti za izračunavanje nepoznate koncentracije, upoređivanjem sa kalibracionim rastvorom.

Ograničenja:

- Ne ako očitavanja prelaze linearan deo krive**
- Standard uključiti u svaku seriju merenja**
- Nelinearna kalibraciona kriva-samo ako postoji dovoljan broj standarda različitih konc.**

$$A = a b c$$

$$c = A/ab$$

$$A_1/b_1 c_1 = A_2/b_2 c_2$$

$$b_1 = b_2$$

$$A_1/c_1 = A_2/c_2 \text{ odnosno } A_k/c_k = A_u/c_u$$

$$C_u = A_u/A_k \times c_k \quad \text{tj} \quad C_u = A_u \times c_k/A_k \quad K = c/A$$

$$C_u = A_u \times K$$

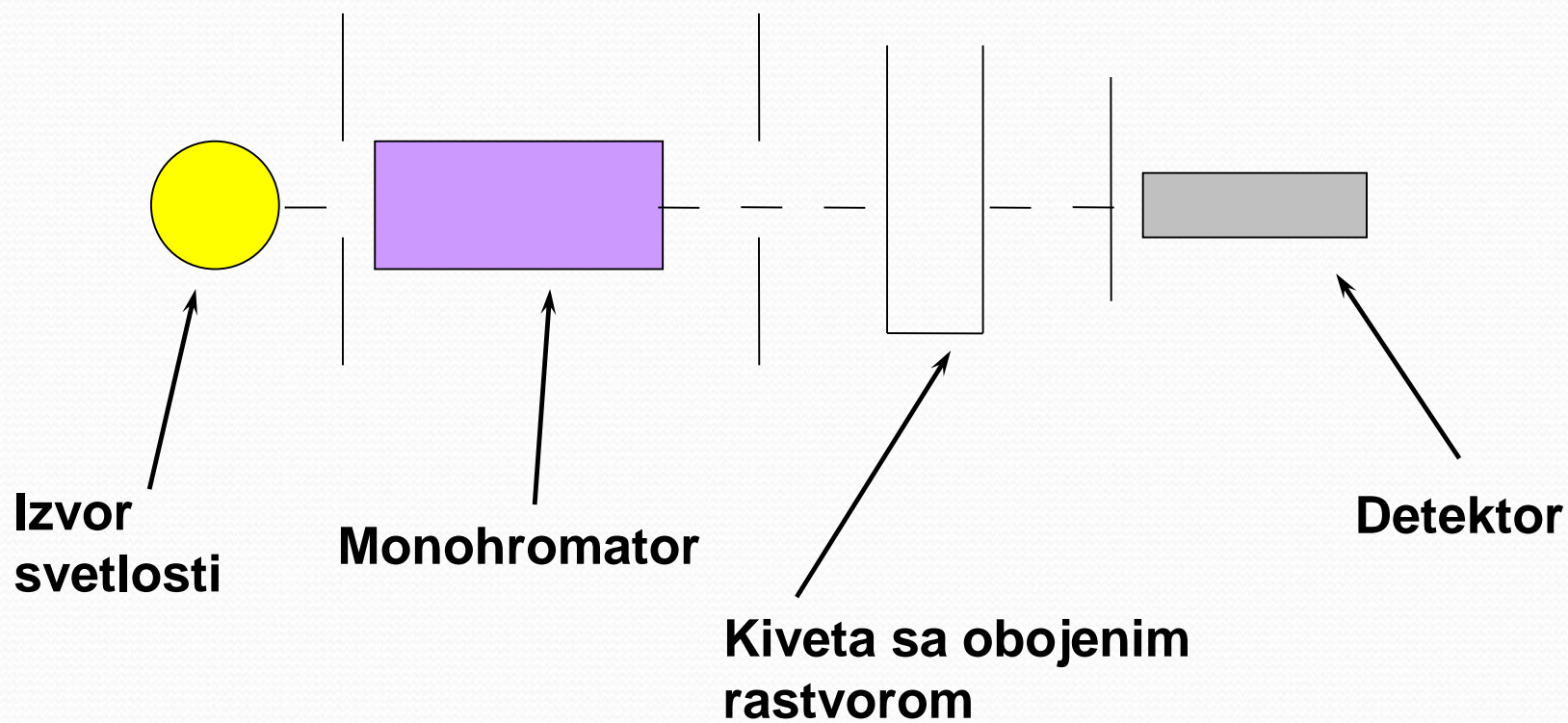
K-dobija se merenjem A kalibracionog rastvora poznate koncentracije C

**Nelinearna kalibraciona kriva se može koristiti ukoliko je upotrebljen veći broj različitih kalibratora koji svojim koncentracijama pokrivaju onaj deo krive u kome se nalazi koncentracija nepoznatog rastvora
Korišćenje unapred publikovanih vrednosti K-npr NADH**

Berov zakon se može primeniti samo pod sledećim okolnostima:

- **Svetlost koja se koristi na supstancu od interesa je monohromatska**
- **Apsorbanca rastvarača je beznačajna u odnosu na apsorbancu rastvorene supstance**
- **Koncentracija rastvorene supstance je u datim granicama (vrednost apsorbance do 1)**
- **Nije prisutna optički interferirajuća supstanca**
- **Ne dolazi do hemijske reakcije između molekula od interesa i ostalih molekula rastvarača ili drugih rastvorenih molekula**

ŠEMA KOLORIMETRA



Dva osnovna tipa fotometrije su kolorimetrija i spektrofotometrija

KOLORIMETRIJA

- **vidljivi deo spektra**
- **filteri**
- **jedinjenja bliskih apsorpcionih talasnih dužina ne mogu da se razlikuju**

SPEKTROFOTOMETRIJA

- **monohromatska svetlost**
- **UV deo spektra**
- **prizme, kristalne rešetke**

Princip je uvek merenje intenziteta svetlosti posle prolaska kroz rastvor koji apsorbuje svetlost.

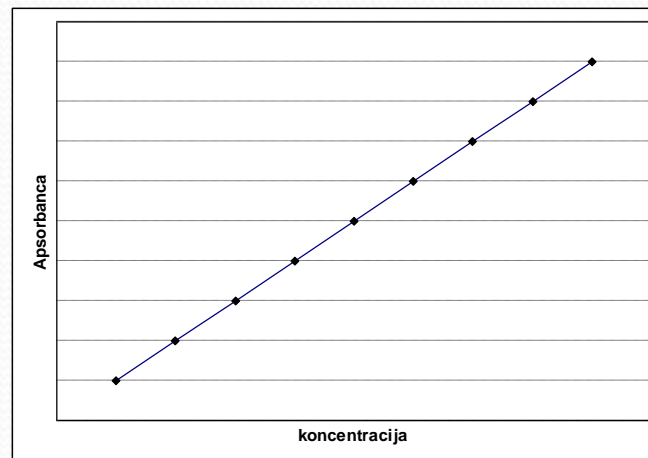
Slepa proba- rastvor koji sadrži sve kao i uzorak osim jedinjenja čiju koncentraciju određujemo ($\Delta A = A_{uz} - A_{sp}$)

Fotometrijsko određivanje koncentracije nepoznatog jedinjenja:

- Standardni rastvor
- Molarni apsorpcioni koeficijent
- Standardna kriva

$$A_u / A_{st} = C_u / C_{st}$$

(L/mol x cm)



Standardni rastvor

- Za izražavanje koncentracije nekog jedinjenja u rastvoru na osnovu izmerene apsorbancije potrebno je napraviti standardni rastvor
- To je **rastvor istog jedinjenja poznate koncentracije**
- Apsorbanciju ovog rastvora odredićemo pod istim uslovima kao i apsorbanciju uzorka
- Po Lamber-Berovom zakonu, vrednosti apsorbancije rastvora poznate koncentracije (standard) i rastvora nepoznate koncentracije (uzorak) međusobno se odnose isto kao i koncentracije dva rastvora

$$A_u / A_{st} = C_u z / C_{st}$$

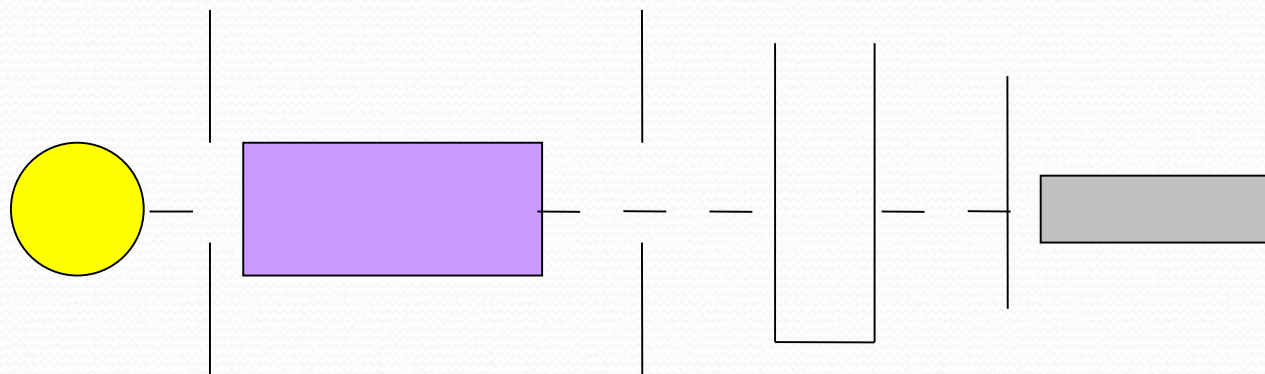
Standardna kriva

- Osnovni nedostatak korišćenja standardnog rastvora samo jedne koncentracije je što ne znamo da li je zavisnost koncentracije i apsorbancije linearna.
- Ovakva greška se može izbeći ako se koristi nekoliko rastvora različitih poznatih koncentracija ispitivanog jedinjenja u kojima se odredi apsorbancija.
- Na ovaj način se konstruiše standardna (kalibraciona) kriva
- Obično se odredi apsorbancija 5-10 rastvora poznatih koncentracija
- Izmerene vrednosti apsorbancije svakog od ovih rastvora se unesu u koordinatni sistem
- X osa – koncentracija
- Y osa - apsorbancija

TIPOVI SPEKTROFOTOMETRA

Spektrofotometar sa jednim svetlosnim zrakom- klasičan

Spektrofotometar sa dvostrukim svetlosnim zrakom



Kalibracija

0%T- kada svetlost ne dolazi do fotoćelije

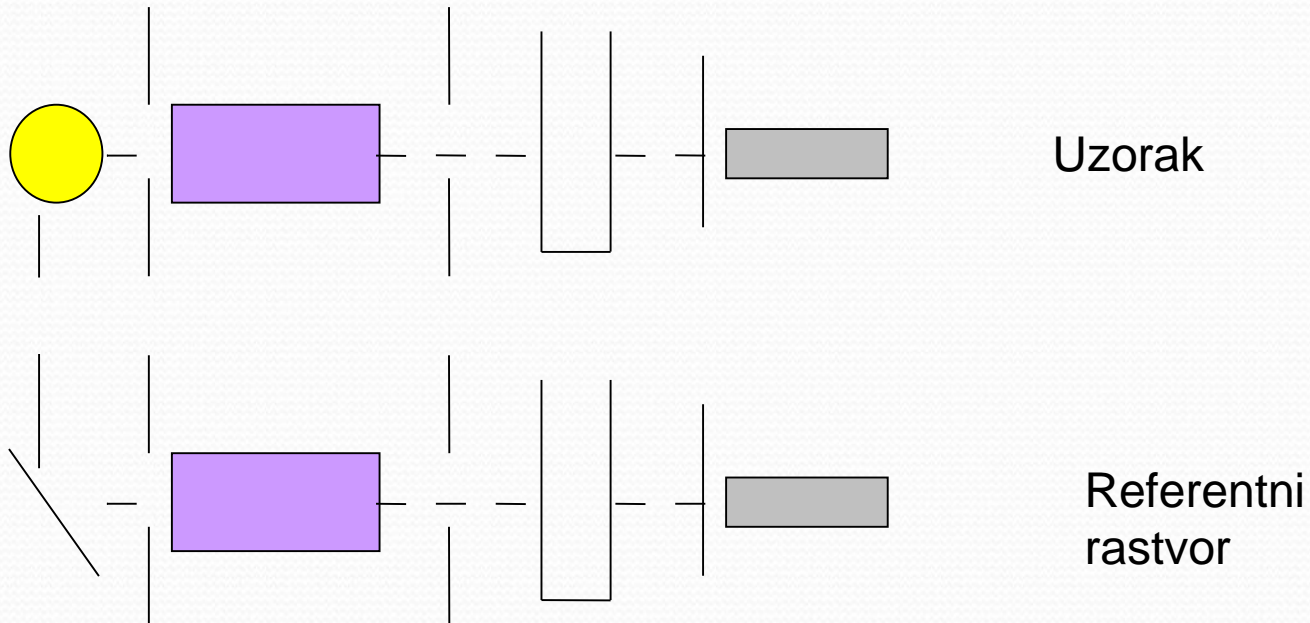
100%T (nula A) - sa slepom probom reagensa

Kalibracioni rastvori = standardni rastvori

Rastvor nepoznate koncentracije

Spektrofotometar sa dvostrukim svetlosnim zrakom

Automatska kompenzacija sa apsorbancom referentnog rastvora, kroz koji svetlost prolazi istovremeno/ paralelno sa ispitivanim rastvorom.



DELOVI SPEKTROFOTOMETRA

- 1. Izvor svetlosti**
- 2. Monohromatori**
- 3. Optička vlakna**
- 4. Kiveta**
- 5. Fotodetektor**
- 6. Registracija spektra-snimanje**
- 7. Mikroprocesor**

IZVOR SVETLOSTI: lampa i laser

Volfram lampa- izvor vidljive svetlosti.

Pogodna za merenje razblaženih rastvora u kojima promena apsorbanca varira značajno sa malim promenama koncentracije. Ova lampa ne pruža dovoljno radiacione energije za merenje ispod 320nm.

Živina lampa sa niskim pritiskom- za merenje u UV spektru- emituje diskontinuirani ili linijski spektar.

Vodonične i deuterijumske lampe - predstavljaju izvor kontinuiranog spektra u UV delu- koriste se za UV apsorpciona merenja. Deuterijumska je stabilnija i dugotrajnija.

Kvarc halogena lampa - ima duži životni vek i jači intenzitet od ostalih lampi (2000-5000 sati pre neophodne zamene lampe) Nepovoljnost starih spektrofotometara je zagrevanje izvora svetlosti- promena geometrije optičkog sistema ili senzitivnosti fotoćelije.

Minijaturne katodne lampe- mogućnost emitovanja intenzivnog ali uzanog spektra talasnih dužina (za potrebe HPLC)

LASER- za spektrofotometriju

Pretvaranje svetlosti različitih talasnih dužina u veoma intenzivan, fokusiran i nedivergentan snop monohromatske svetlosti. Izborom odgovarajućih materijala, dobijaju se različite talasne dužine koje laser emituje.

<i>Laser</i>	<i>Talasna dužina (nm)</i>
Aluminijum oksid	690
Argon	488- 586
Ugljen dioksid	337
Azotni	9200- 10800
Helijum-neon	633
Organske boje	400- 800

Laseri koji odgovaraju bliskom IC spektru (0.8-2.5 μ m talasne dužine) su dostupni. Izgrađeni su od galijum-arsenika, a napajaju se niskim potencijalom od oko 1,5V

IZDVAJANJE ŽELJENOG SPEKTRA

Uz eliminisanje ostalih talasnih dužina- monohromator. To su filteri, prizme, difrakcione rešetke...

FILTERI

Boja filtera je komplementarna boji rastvora, da bi se dobila ona talasna dužina svetlosti koju rastvor najviše apsorbuje

<i>Boja rastvora</i>	<i>Boja filtera</i>	<i>Talasna dužina maksimalne apsorbanse filtera (nm)</i>
Crvena	Plavi	470- 490
Plava	Crveni	680
Zelena	Crveni	680
Žuta	Ljubičasti	430
Tamno crvena	Zeleni	520- 540

Staklo, metalni kompleksi ili soli rastvoreni u staklu- stvaranje boje koja odgovara boji predominantne propuštene svetlosti.

Spektralna čistoća filtera- prolaz u trakama (definiše se širinom u nm)

Stakleni filteri- širina trake 50nm, spadaju u široke linijske filtere

Uskolinijski filteri- 5-15nm; od dielektričnog materijala

Oštro-odsečeni filteri

PRIZME I DIFRAKCIONE REŠETKE

Prizme- deli belu svetlost na kontinuirani spektar kroz odbijanje kraćih talasnih dužina koje se zadržavaju dok se duže talasne dužine propuštaju. Dolazi do stvaranja nelinearnog spektra sa gusto zbijenim dužim talasnim dužinama i više rasutim kraćim.

Difrakcione rešetke- širina spektra 20nm...neke imaju rezoluciju 0.5nm ili manje- uniformni linearan spektar

Može da koristi i različite uglove upadne svetlosti postavljajući se sama pod određenim uglom u odnosu na upadni svetlosni zrak.

Izbor monohromatora- Zavisi od vrste analize i željenog eseja. Uzana širina trake je neophodna kod spektrofotometra.

Izabrana talasna dužina je uglavnom na maksimumu apsorbance kako bi se dobila maksimalna senzitivnost.

KIVETE

Različitih oblika, različitih materijala

Najčešći prečnik 1cm

Borosilikatne staklene kivete- za merenje u vidljivom delu spektra

Kvarcne kivete- za merenje ispod 340nm. Posebna pažnja za sva golim okom nevidljiva oštećenja

Plastične- Primena u vidljivom i UV spektru. Jednokratna primena (problem tolerancije, čistoće, vezivanja boje rastvarača, temperaturne deformacije)

Kiveta- čista, fizički i optički

Za vidljivi deo spektra- ispiranje sa destilovanom vodom

Bazni rastvori dužim stajanjem oštećuju kivetu, rastvaraju staklo

Pranje u blagim deterdžentima ili mešavini konc HCl, vode i etanola u odnosu 1:3:4

Provera-rastvor cijan methemoglobina

FOTODETEKTOR

Pretvaraju svetlost u električni signal koji je proporcionalan broju fotona koji je udario o fotosenzitivnu površinu. Srebro i selen na osnovi od gvožđa...Najčešće se koristi fotomultiplikatorska cev za merenja intenziteta svetlosti u vidljivom i UV delu spektra.

Fotomultiplikator- za merenje u vidljivom i UV spektru

Koristi se za pojačavanje izlaznog signala. Za svaki elektron koji prođe se proizvede još 4-6 dodatnih elektrona..... 10-15 dinoda ...milion puta pojačan signal.

Daju brz odgovor, osetljive su.

Ne sme se izlagati sobnoj svetlosti dok je pod naponom- eksplozija cevi

DETEKTORI

Fotodiode

Detektori opremljeni punjenjem

SNIMANJE PODATAKA

Apsorbanca kao funkcija vremena ili talasne dužine (jedna ili dve)

Ako supstanca apsorbuje svetlost nastaju različiti pikovi.

Merenje apsorpcionog spektra nepoznatog uzorka i njegovo upoređivanje sa spektrom poznate supstance je veoma korisno u kvalitativnoj analizi (npr identifikacija lekova koji apsorbuju svetlost UV spektra).

MIKROPROCESOR

Deo je spektrofotometra. Omogućava čuvanje i memorisanje signala kalibratora, slepe probe što omogućava direktno izračunavanje koncentracije nepoznatog ispitivanog rastvora.

ISPITIVANJE ISPRAVNOSTI RADA SPEKTROFOTOMETRA

1. Ispravnost odabrane talasne dužine
2. Širina spektralne trake
3. Zalutala svetlost
4. Linearnost- izvori greške: pri standardizaciji, razblaženje rastvora, nestabilnost rastvora, promena pH, T
5. Reproducibilnost rada spektrofotometra- preporučene vrednosti apsorbance kiselog rastvora kalijum bihromata

A = 0.2-0.7

A = 0.4-1.4

Talasna dužina (nm)	Rastvor A	Rastvor B
235 (min)	0.626 ± 0.009	1.251 ± 0.019
257 (max)	0.727 ± 0.007	1.454 ± 0.015
313 (min)	0.244 ± 0.004	0.488 ± 0.007
350 (max)	0.536 ± 0.005	1.071 ± 0.011