

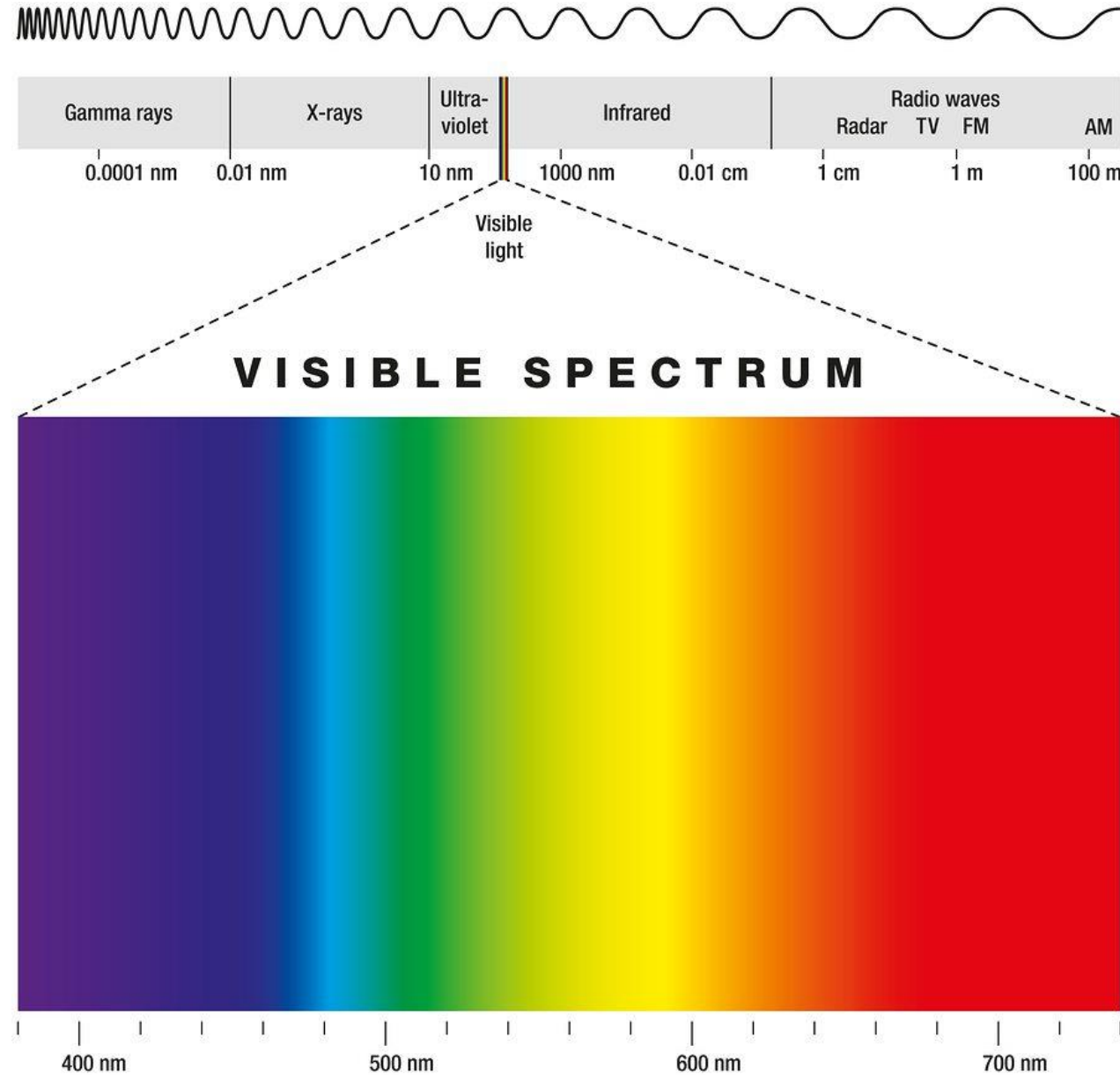


Spektrofotometrie (UV/VIS)

Speciální analytická chemie

Luboš Paznocht

- **absorpce** ultrafialového (UV) a viditelného záření (VIS) zředěnými roztoky molekul
- UV (10-380 nm)
- VIS (380-780 nm)



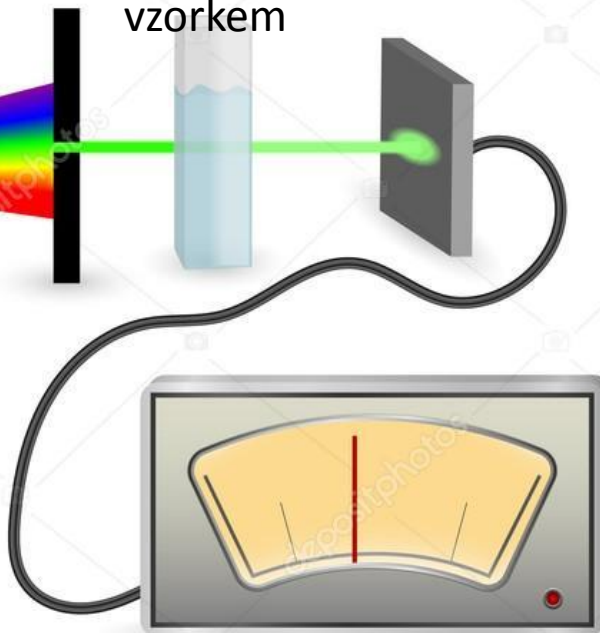


zdroj elektromag.
záření

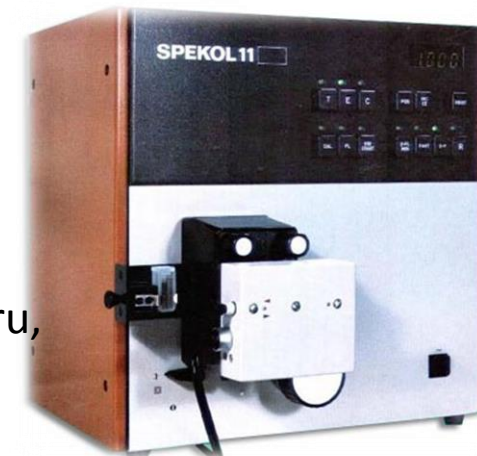
monochromátor

kyveta se
vzorkem

detektor



displej
spektrofotometru,
PC



- **princip: měření transmittance** (neabsorbované záření)
- viditelně barevné vzorky – VIS vlnové délky
- některé bezbarvé – UV vlnové délky
- **Lambert-Beerův zákon**

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

ϵ_{λ} molární ($c=1\text{mol/l}$) extinkční koeficient daného analytu při dané vlnové délce

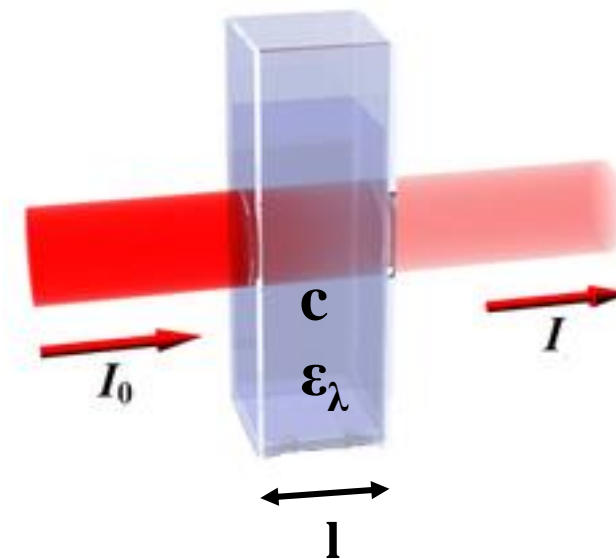
c koncentrace analytu ve vzorku (konst.)

l šířka absorbujícího prostředí (konst.)

$$A = c$$

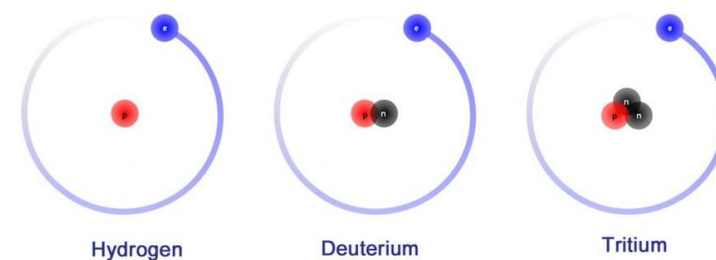
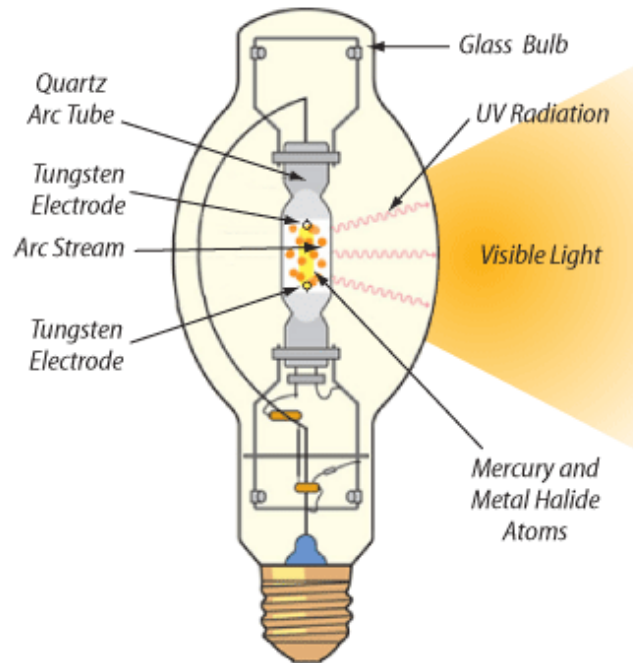
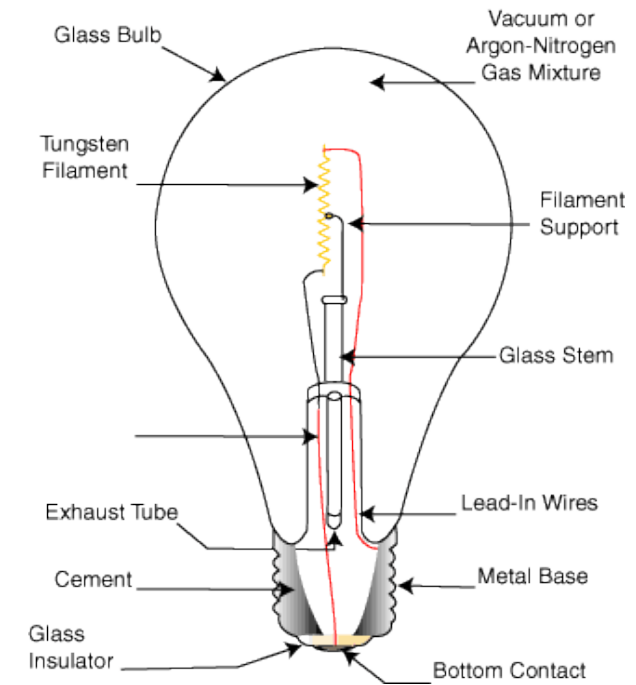
! absorbance je bezrozměrná veličina !

$$\text{záření ze zdroje primární světlo} = \text{vzorek absorpce} + \text{propuštěné záření sekundární světlo}$$



ZDROJE ZÁŘENÍ

- wolframová žárovka (vlnové délky 350 -3000 nm) měřené ve VIS oblasti
- halogenová zářivka (spektrum zasahuje až do UV oblasti)
- deuteriová lampa měření v UV oblasti



VÝBĚR VLNOVÉ DÉLKY

MONOCHROMÁTORY

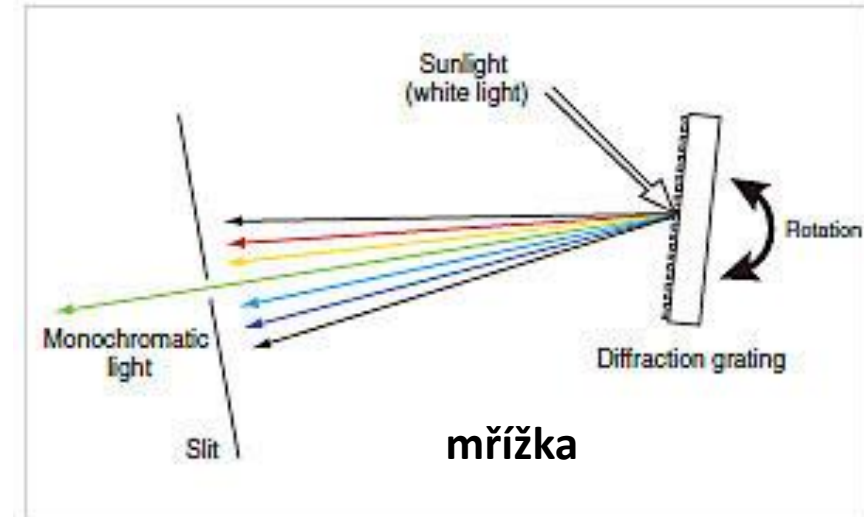
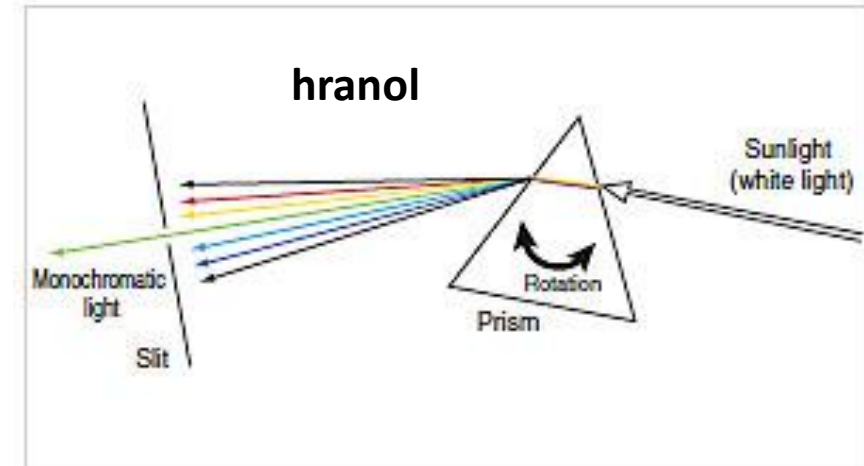
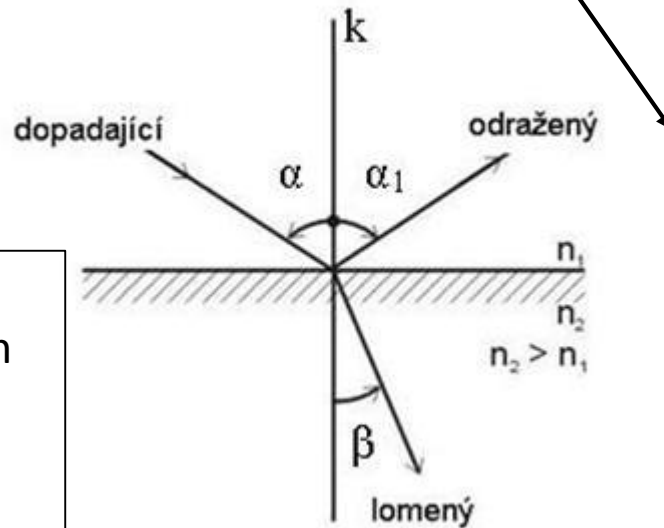
filtr

monochromátor

- vstupující polychromatické záření rozdělí na množství monochromatických paprsků a vybere 1 požadovanou λ
- menší $\lambda \Rightarrow$ větší lom

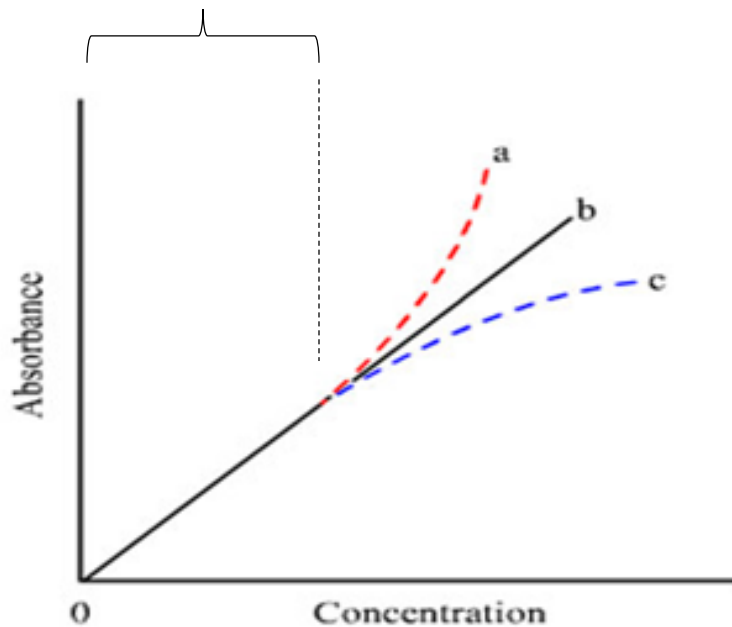
mřížka

- hustota vrypů dle požadovaných vlnových délek
- IČ oblast . . . 30 – 300 vrypů/mm
- VIS a UV . . . 600 – 2 400 vrypů/mm
- rentgenová . 10 000 – 100 000 vrypů/mm



Úskalí a pravidla fotometrie

- omezená použitelnost
 - analyty schopné absorpce elektromag. záření
 - zředěné roztoky analytů
- VIS oblast – skleněné, plastové kyvety
- UV oblast – křemenné sklo



„normální sklo“

K_2O , CaO , SiO_2

absorpce $\lambda < 350$ nm

křemenné sklo

SiO_2



- dokonalá čistota kyvet

disperze světla



- polarita rozpouštědel – ! jednorázové **plastové** kyvety!

voda

methanol

ethanol

aceton

hexan

polární

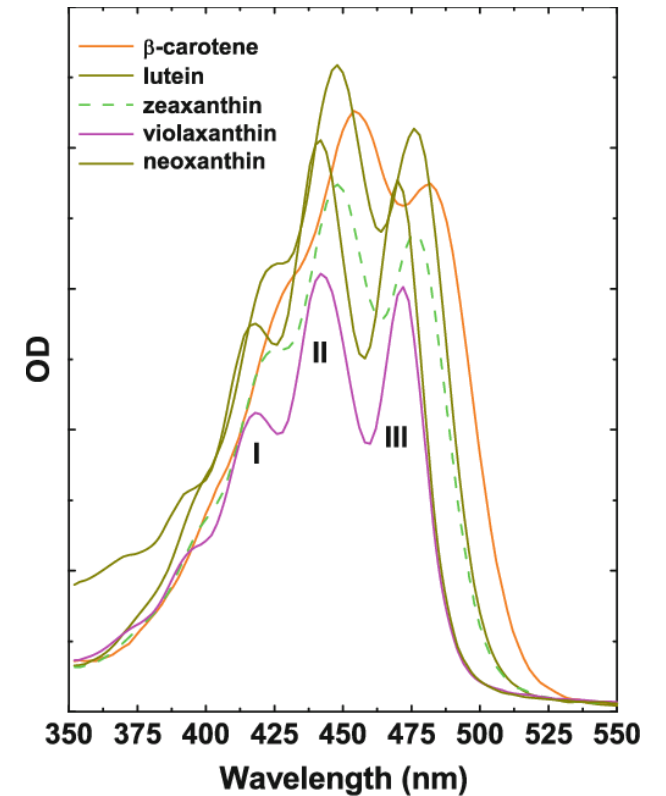
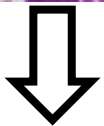
nepolární

Volba vlnové délky

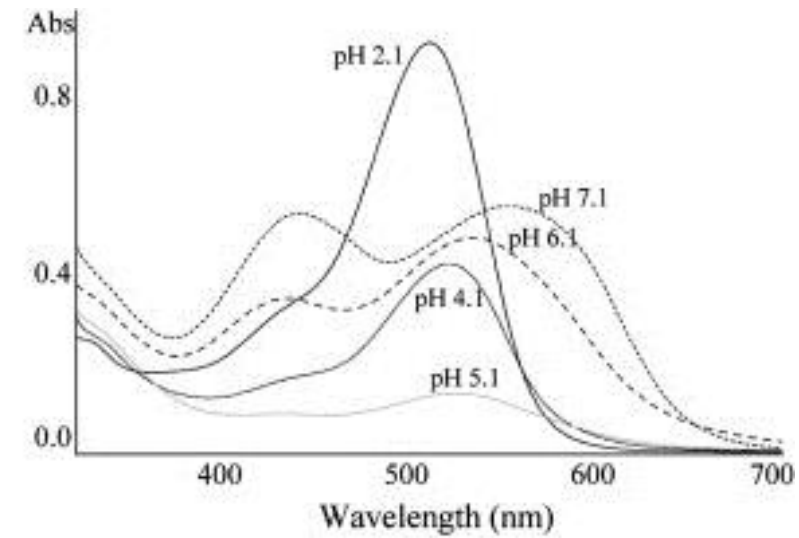
- proměření celého spektra vlnových délek \Rightarrow absorpční spektrum
- určení vlnových délek absorpčních maxim
- měření absorpce elektromagn. záření jehož vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu daného analytu -> **nejvyšší citlivost**
barva **doplňková** k „té kterou vidíme“

DPPH radikál

měření AOx při 515 nm

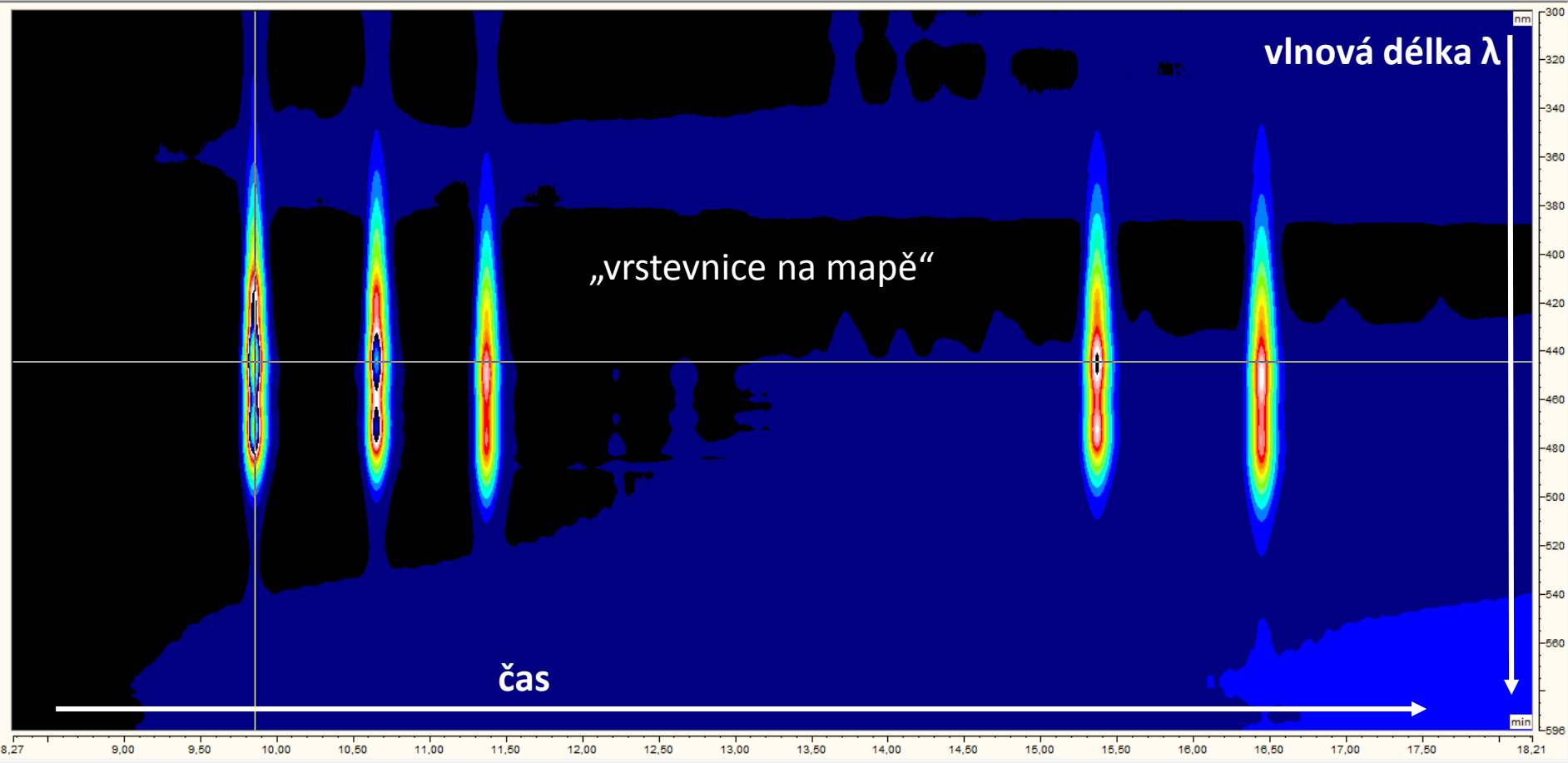
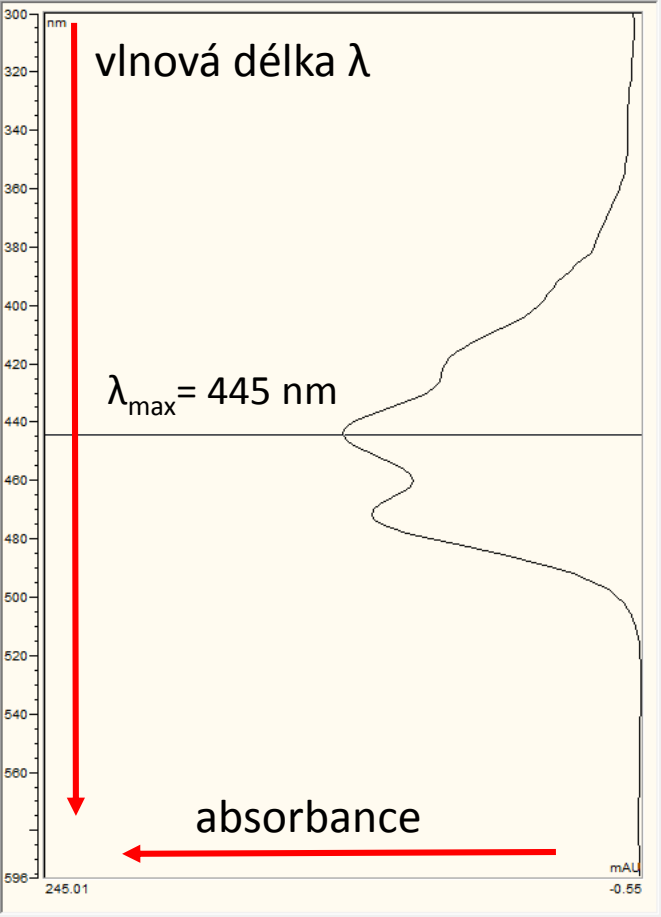
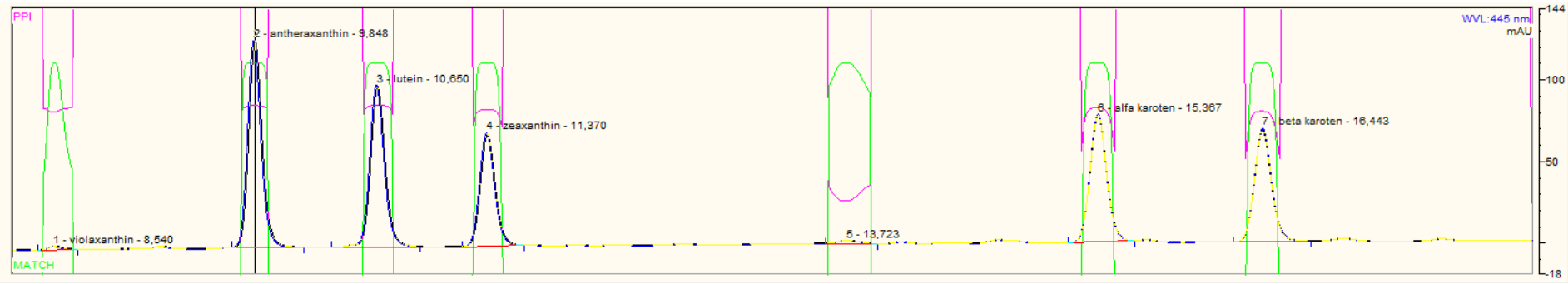


kyanidin 3-O-glukosid

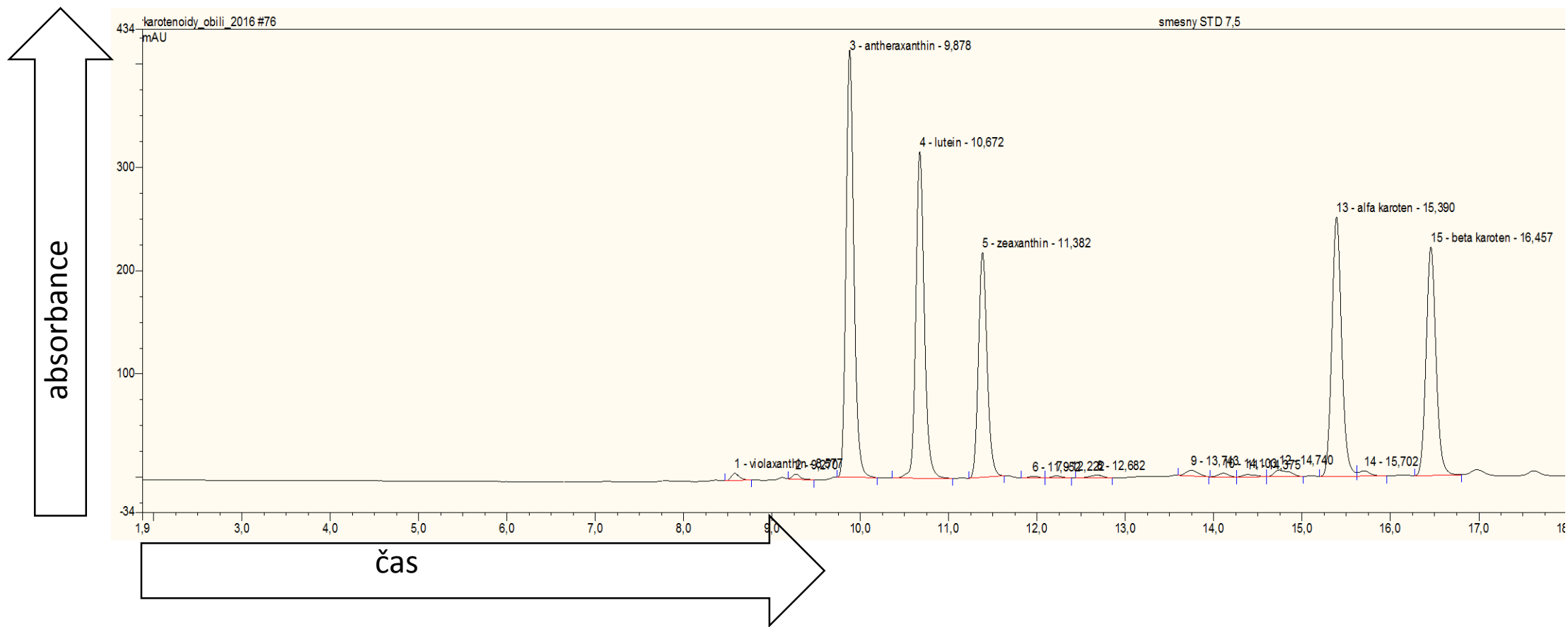


- měření
 - fixní vlnová délka: výsledek je jediná číselná hodnota, odpovídající koncentraci daného analytu ve vzorku
 - „1D“ – absorbance při jedné λ v jednom okamžiku
 - sken = proměření celého spektra vlnových délek (př.: 300-600nm)
výsledek: absorpční spektrum
 - „2D“ – absorbance ve spektru vlnových délek v jednom okamžiku
 - DAD (PDA) detektor v kapalinové chromatografii
 - „3D“ – absorbance ve spektru vlnových délek v průběhu času

Ref.Chl.: UV_VIS_1
 Name: 74:smesny STD 2,5
 Type: standard
 Status: finished
 Date: 8.12.2016 19:18:48
 Pos/Vol: RA7/10.00
 DilFac: 1.00
 Amount: 1.00
 Weight: 1.00
 Comment:



chromatogram kalibračního roztoku
standardu směsi karotenoidů
metoda: HPLC-DAD

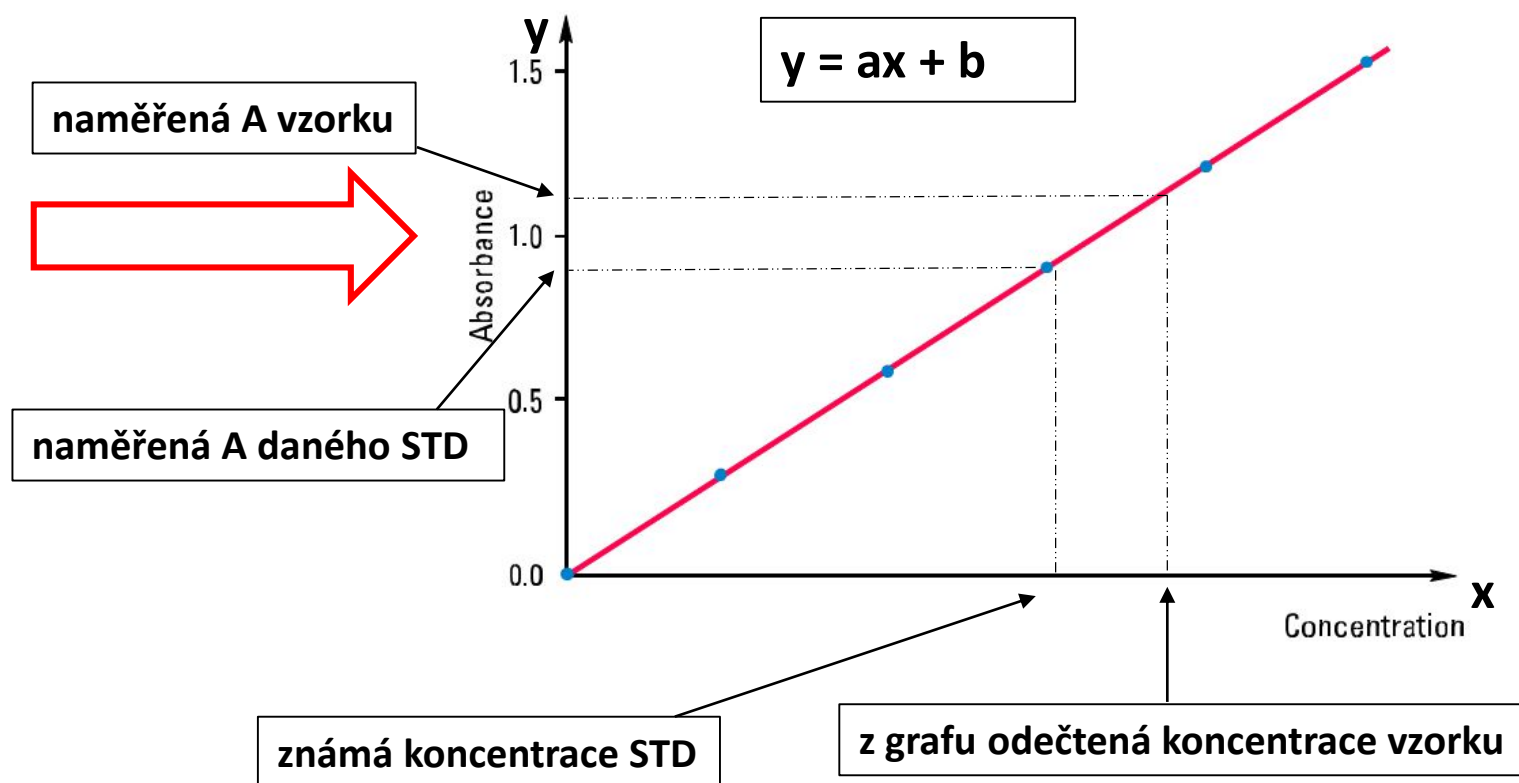


Příprava kalibrační křivky

Bouguert-Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log T = -\log(I / I_0) = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

koncentrace STD _{GLU} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A (660 nm)
slepý vzorek (blank) 0	0
0,1	0,07
1	0,19
2,5	0,38
5	0,75
10	1,35



- nejedná se o separační metodu
 - ideálně pokud je výsledná barva (absorbance) dána přítomností jediné látky
př.: určení přesné koncentrace roztoků analytických standardů
 - v případě směsých extraktů kvantifikace např. jako ekvivalent jednoho urč. analytu
luteinu (karotenoidy)
kya 3-O-Glu (anthokyany)
gallové k. (polyfenoly)
trolox = syntetický ve vodě rozpustný analog vit. E (antioxidační aktivita)
- pro stanovení jednotlivých látek ve směsi je nutno použít některou ze separačních analytických metod (LC, GC, ...)



Anthokyanidiny

- hojně rozšířená rostlinná barviva (borůvky, ostružiny, červené zelí, černý rybíz, víno, brambory, pšenice, rýže, kukuřice ...)
- výskyt v podobě glykosidů (tzv. anthokyanů)
- antioxidanty
- barva je dána: druhem anthokyanidinu (kyanidin, delphinidin, malvidin, ...)

typem sacharidu (glukosid, rutinosid, galaktosid, ..)
pH prostředí

