Lambert - Beerov zakon

Bajt, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:178747

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Petra Bajt

Lambert-Beerov zakon

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović

Osijek,2018.

SAŽETAK:

UV/VIS spektroskopija je eksperimentalna metoda određivanja koncentracije materijala u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao. Metoda se temelji na Lambert–Beerovom zakonu koji daje funkcijski odnos između eksperimentalno određene fizikalne veličine, apsorbancije (A) i fizikalne veličine koja se određuje računski, koncentracije (c). Koncentraciju je moguće odrediti i grafički iz baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje jest smanjenje intenziteta snopa s I_o na I. Zakon se može prikazati kao:

$$A = \log (I_o/I) = \varepsilon b c$$

gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti, ε je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent izražen u L $mol^{-1}cm^{-1}$, svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak izražena u cm, a c je koncentracija tvari u otopini izražena u mol L^{-1}. Ovo je granični zakon pošto vrijedi samo za otopine s niskim koncentracijama i za izvore monokromatske svjetlosti. Lambert – Beerov zakon i UV/VIS spektroskopija su vrlo korisni jer omogućavaju kvantifikaciju i određivanje čistoće DNA iz bioloških uzoraka, praćenje kemijskih reakcija, identifikaciju tvari, određivanja različitih tvari i slično.

Ključne riječi: Lambert-Beerov zakon, UV/VIS spektroskopija, spektrofotometar, apsorbancija

ABSTRACT:

UV/VIS spectroscopy is the experimental method used for determination of the concentration of a material in the sample by measuring the amount of light absorbed by a sample. The method is based on the Lambert-Beer's law that provides the function ratio between experimentally determined physical quantity, absorbance (*A*) and the physical quantity determined by calculation, concentration (*c*). Concentration can be determined graphically from the calibration curve of dependence of absorbance on concentration. The interaction between photons and particles that absorb electromagnetic radiation is the reduction of beam intensity from I_o to *I*. The law can be represented as:

$$A = \log (I_o/I) = \varepsilon bc$$

where *A* is the absorbance at a given wavelength of light, ε is the molar absorption (extinction) coefficient expressed in L $mol^{-1}cm^{-1}$, that is characteristic for each molecule and dependent on the wavelength of light, *b* is the length of the light path through the sample expressed in cm and *c* is the concentration of the substance in the solution expressed in mol L^{-1}. This is the limiting law because it is only valid for low concentrations and for monochromatic light sources. Lambert-Beer's law and UV/Vis spectrophotometry are very useful because they provide quantification and determination of DNA purity of biological samples, chemical reaction monitoring, substance identification, determination of different substances and the like.

Key words: Lambert-Beer's law, UV/VIS spectroscopy, spectrophotometer, absorbance

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. UV/VIS SPEKTROSKOPIJA 1

2.1. Spektrofotometrijsko određivanje tvari 4

2.2. UV/VIS spektrofotometar 5

3. Lambert-Beerov zakon 7

3.1. Kako je nastao Lambert-Beer-ov zakon? 9

3.2. Lambert-Beerov zakon za dvije ili više komponenti i izozbestna točka 13

3.3. Ograničenje zakona 15

4. Uporaba Lambert-Beerovog zakona u svakodnevnom životu 16

5. Zaključak 21

6. Literatura 22

1.UVOD

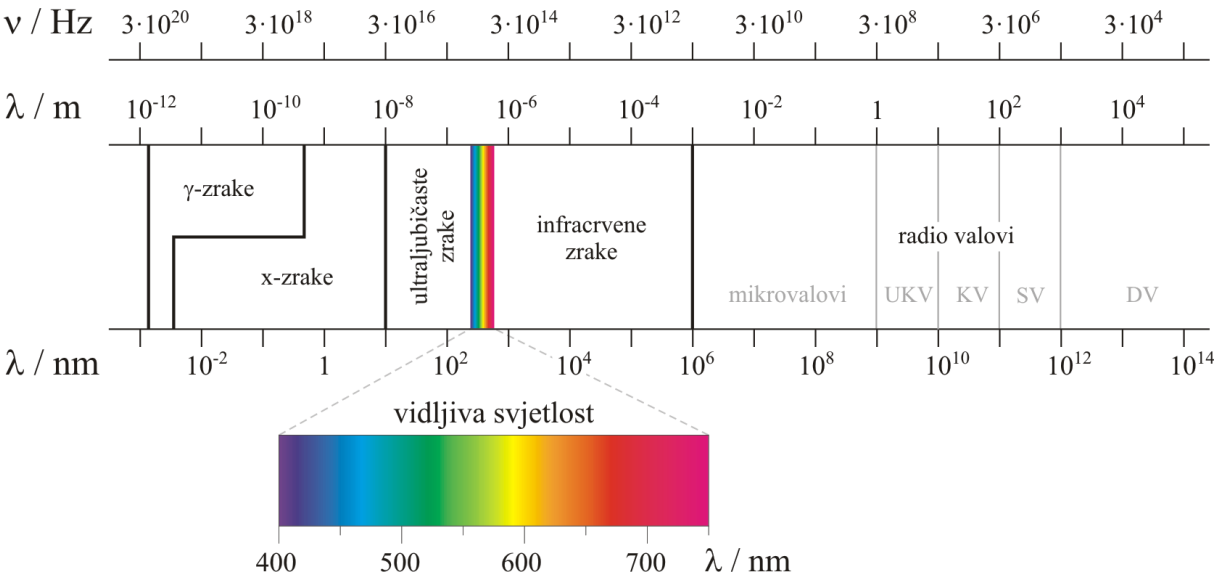
Prolaskom svjetlosti kroz neku otopinu, može doći do pojava uzrokovanih međusobnim interakcijama molekula u otopini i zračenja: loma svjetlosti, apsorpcije zračenja, polarizacije svjetlosti itd. Sve te pojave omogućavaju kvalitativnu i kvantitativnu analizu tvari, odnosno korisne su za određivanje strukture određenih spojeva [1]. Apsorpcija zračenja uzrokuje energijske promjene u strukturi ispitivane tvari (atomima, molekulama, ionima), dok apsorpcija vidljivog i ultaljubičastog zračenja potiče elektronske prijelaze, kombinirane sa rotacijskim i vibracijskim prijelazima, u atomima odnosno ionima ispitivanog uzorka. Apsorpcijske metode temelje se na analizi tvari odnosno na mjerenju smanjenja intenziteta elektromagnetnog zračenja uslijed apsorpcije zračenja prilikom prolasku kroz ispitivanu tvar. Apsorpcijske optičke metode mogu se podijeliti na: kolorimetriju, apsorpcijsku spektrofotometriju te atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju.

Apsorpcijska spektrofotometrija bazira se na praćenju apsorbancije u ovisnosti o valnoj duljini zračenja koje je prošlo kroz ispitivani uzorak. Apsorpcija zračenja može se pratiti u ultraljubičastom (UV), vidljivom (VIS), infracrvenom (IR), mikrovalnom te radiovalnom području spektra elektromagnetskog zračenja. UV/VIS spektroskopija, prati apsorpciju zračenja u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra te se temelji na Lambert–Beerovom zakonu, koji opisuje odnos između intenziteta propuštenog (transmitiranog) zračenja koje prolazi nekim poluprozirnim uzorkom te koncentracije uzorka. Važnost UV/VIS spektroskopije, a ujedno i Lambert-Beerovog zakona je činjenica da služe za određivanje koncentracije ispitivane tvari, proučavanje kemijskih reakcija, identifikaciju tvari, ispitivanje strukture molekula i određivanja različitih tvari [2].

2.UV/VIS SPEKTROSKOPIJA

Praćenje apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja u ispitivanom uzorku (UV/VIS spektroskopija), najčešće je korištena spektrofotometrijska tehnika za određivanje koncentracije otopljenih tvari koje uzrokuju obojenje otopina. Ovom metodom se, mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao, određuje koncentracija uzorka te se identificiraju određenih spojevi u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao [3]. Zapravo ovdje se govori o energijama koje pobuđuju molekulu iz osnovnog u pobuđeno stanje, odnosno

koje izazivaju elektronske prijelaze koje ovise o vrsti veza u molekuli. Te energije su zapravo vidljivo ili ultraljubičasto zračenja koje uzorak apsorbira i ona uzrokuju prelazak elektrona iz popunjene orbitale manje energije u nepopunjenu orbitalu više energije. Osnovno načelo spektrofotometrije je da svaki spoj apsorbira ili propušta svjetlost u određenom rasponu valnih duljina. Područja mjerenja UV/VIS spektrofotometara su obično oko 200 nm-380 nm za ultraljubičasti (UV) i 380 nm-780 nm za vidljivi (VIS) dio spektra (Slika1). Bitna karakteristika za UV/VIS spektar su blage krivulje karakteristične za svaki određeni spoj. Apsorpcijski spektar pokazuje te blage krivulje i broj apsorpcijskih vrpci, odnosno broj visokih širokih pikova, koje postoje zbog strukturnih skupina u molekuli (npr. apsorpcija dobivena u UV području za karbonilnu skupinu u acetonu jednaka je valnoj duljini za apsorpciju za karbonilnu skupinu u dietilketonu). Jedinica u molekuli koja je odgovorna za apsorpciju zove se kromofor (najčešće su to C=C i C=O).



Slika 1.Spektar elektromagnetskog zračenja [4].

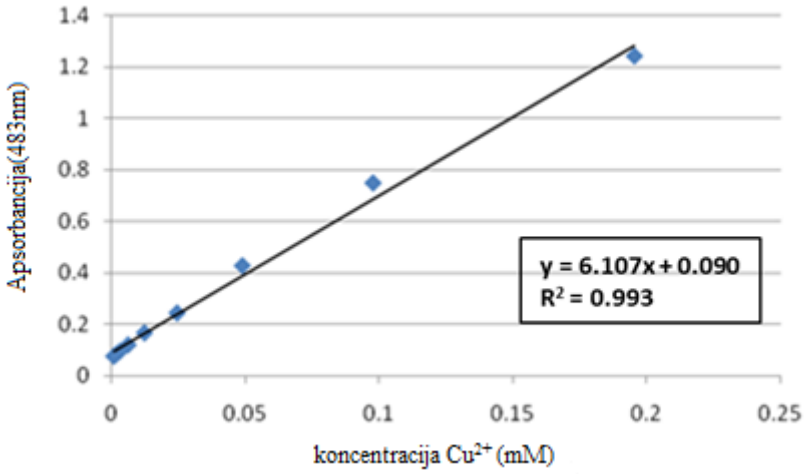
Da bi se energija svjetlosti apsorbirala, ona mora odgovarati dostupnoj energiji stanja u atomima ili molekulama, ili se svjetlost može raspršiti od molekule, atoma ili elektrona. Svjetlo može apsorbirati uzorak jedino ako se energija pobuđivanja podudara s energijom fotona, $\Delta E = h\nu$. Kako bi dobili ukupnu energiju molekule (E_{uk}), elektronskoj energiji moramo pridodati i kinetičku energiju jezgara tj. energiju vibracije i rotacije u molekulama:

$$E_{uk} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (2.1.)$$

Elektronska energija (E_{el}) se odnosi na promjene u raspodjeli elektrona, vibracijska energija (E_{vib}) se odnosi na gibanja jezgri koja uzrokuju promjenu duljine kemijskih veza i kuta između njih., a rotacijska energija (E_{rot}) se odnosi na molekulske rotacije oko centra gravitacije. Ove energijske komponente razmatraju se neovisno na temelju pretpostavke da se puno sporija gibanja jezgri mogu izostaviti dok se lagani elektroni gibaju oko njih, tj. gibanja jezgri i gibanja elektrona razmatramo odvojeno i opisujemo ih neovisnim valnim funkcijama. Svaka određena vibracijska razina ima pripadajuću valnu funkciju čiji kvadrat odgovara najvjerojatnijoj udaljenosti između jezgara za dani vibracijski kvantni broj. Odavde proizlazi Franck Condonovo načelo koje kaže da su prijelazi elektrona toliko brzi (~ 10^{-15} s) da za to vrijeme ne može doći do promjene u položaju jezgri koje su mnogo teže od elektrona. Tijekom elektronskih prijelaza dovoljno je razmatrati elektronska i vibracijska stanja, pošto su razlike u rotacijskim energijskim razinama mnogo manje od vibracijskih koje su pak mnogo manje od elektronskih. Svako elektronsko stanje sadrži niz vibracijskih razina, a na sobnoj temperaturi većina molekula nalazi se u najnižoj vibracijskoj razini osnovnog elektronskog stanja. Apsorpcijom UV/VIS zračenja dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog elektronskog stanja u pobuđeno elektronsko stanje koje također sadrži više vibracijskih razina. To znači da dolazi i do promjene vibracijskih stanja tijekom elektronskih prijelaza. Potrebno je najmanje energije za prijelaz iz nultog vibracijskog stanja u nulto vibracijsko stanje. Može se zaključiti da je pobuđenje elektrona praćeno promjenama u rotacijskim i vibracijskim kvantnim brojevima. Nadalje apsorpcijske linije postaju široki pikovi koji sadrže vibracijsku i rotacijsku finu strukturu, a u interakciji s molekulama otapala vide se glatki maksimumi. Otapalo u kojem je otopljen uzorak obično utječe na spektar i ono može utjecati na pomak apsorpcijskih maksimuma prema većim ili manjim valnim duljinama. Kako do toga ne bi došlo,bitno je da otapalo ne apsorbira ultraljubičasto zračenje u istom području kao i uzorak čiji se spektar snima kako ne bi došlo do krivih rezultata i zbog toga se najčešće koriste otapala kao što su polarni etanol (96%), a od nepolarnih otapala cikloheksan. Izbor otapala također ovisi i o topljivosti spojeva kojima želimo snimiti apsorpcijski spektar [5]. Zbog svega navedenog, UV/VIS spektroskopija je jedna od najkorisnijih metoda kvantitativne i kvalitativne analize u različitim područjima poput kemije, fizike, biomehanike, analize namirnica, kemijskog inženjerstva te u medicini. Na primjer, u biokemiji se koristi za praćenje enzimski kataliziranih reakcija, dok se u medicini koristi za ispitivanje krvi ili tkiva za kliničku dijagnozu [3].

2.1. Spektrofotometrijsko određivanje tvari

Način spektrofotometrijskog određivanja koncentracije analita u otopini svodi se na dva koraka: u prvom koraku mjere se spektri otopina poznatih koncentracija te se na temelju određenih apsorbancija konstruira baždarni pravac (Slika 2), a u drugom se izmjeri spektar otopine analita nepoznate koncentracije. Od svih spektara izmjerenih za otopine, oduzima se apsorpcijski spektar odgovarajućeg otapala (referentni uzorak) odnosno takozvana bazna linija. Najlogičnije je prvo izmjeriti upravo spektar referetnog uzorka, jer softver većine suvremenih spektrofotometara korisniku omogućava automatsko oduzimanje bazne linije od spektra mjerenog uzorka. Zatim se izmjere spektri za otopine analita poznatih koncentracija iz kojih se izradi baždarni dijagram, tako da se odredi valna duljina pri kojoj apsorbanicja pokazuje najvišu vrijednost (λ_{maks}) (Slika 5), te se očitava apsorbancija pri λ_{maks} za uzorke čije su koncentracije poznate.

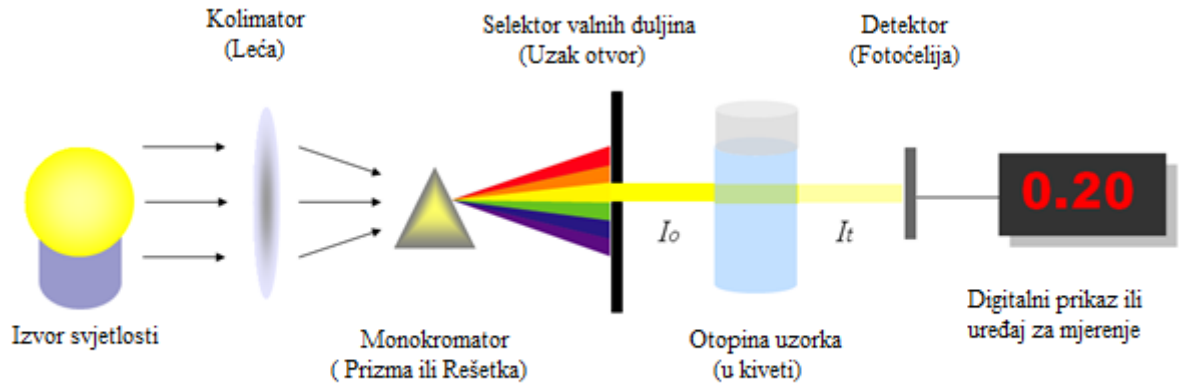


Slika 2. Baždarni dijagram za Cu^{2+} [6].

Dobije se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji analita pri λ_{maks}, te se iz tih podataka metodom linearne regresije odredi jednadžba pravca koji je opisan Lambert-Beerovim zakonom. Iz baždarnog dijagrama, moguće je odrediti koncentraciju nepoznatog uzorka pomoću očitanja apsorbancije pri maksimalnoj valnoj duljini. Ako se radi o smjesi koja sadrži više od jednog analita, potrebno je odrediti baždarni dijagram za svaki analit zasebno. Očitavaju se apsorbancije pri λ_{maks} za svaki pojedini analit te se iz apsorpcijskog spektra izmjerenog za smjesu i iz baždarnog dijagrama odrede koncentracije svakog analita u ispitivanoj smjesi. Postupak je valjan uz uvjet neovisnosti interakcije spojeva u smjesi s elektromagnetskim zračenjem [7].

2.2. UV/VIS spektrofotometar

Analiziranje spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji mjeri apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Kada svjetlo prolazi kroz otopinu ispitivane molekule, dio se apsorbira od strane molekule, a dio se propušta. Spektrofotometar mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje odnosno mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak i uspoređuje ga sa intenzitetom ulaznog svjetla. Instrument stoga omogućava mjerenja apsorbancije, transmitancije (izražene u %) te određivanje koncentracije analita u ispitivanim otopinama pomoću Lambert-Beerovog zakona. Spektrofotometar sadrži izvor zračenja koji daje različite valne duljine bitne za uzorke jer različiti spojevi apsorbiraju najbolje na različitim valnim duljinama. Na primjer, p-nitrofenol (kiseli oblik) ima maksimalnu apsorpciju pri približno 320 nm i p-nitrofenolat (osnovni oblik) apsorbira najbolje pri 400 nm. Mjerenja se mogu vršiti samo na sobnoj temperaturi, a uzorak treba biti pripremljen u obliku otopine. Uzorak se u uređaj stavlja u staklenoj ili plastičnoj kiveti, za mjerenje u vidljivom dijelu spektra, ili u kvarcnoj kiveti za mjerenje u UV dijelu spektra [8]. UV/VIS spektrofotometar koristi svjetlost u ultraljubičastom dijelu (185 nm - 400 nm) i vidljivom dijelu (400 nm - 700 nm) spektra elektromagnetskog zračenja.
Osnovni dijelovi spektrofotometra prikazani su na slici 3.



Slika 3.Osnovni dijelovi UV/VIS sprektrofotometra [3].

1.izvor zračenja

Žarulja koja daje bijelu svjetlost podjednakih intenziteta za cijelo područje valnih duljina. Kao izvor zračenja služe halogena i deuterijeva žarulja za UV/VIS spektrofotometriju .

2.disperzni element (monokromator)

Svjetlost izvora razdvaja se prema valnim duljinama pomoću prizme ili optičke rešetke. Raspon valnih duljina koji se propušta na uzorak ovisi o širini izlazne pukotine, a moć razlučivanja ovisi o širini pukotine između izvora i prizme.

3.Spremnik za uzorke

Uzorci se stavljaju u specijalne posudice paralelnih stijenki koje se zovu kivete i čija udaljenost određuje duljinu puta svjetlosti kroz uzorak. Najčešće duljina tog puta iznosi 1 cm. Na dva načina je moguće izmjeriti intenzitet zrake prije i nakon prolaska kroz uzorak. U slučaju otopina, kao referentni uzorak obično služi čisto otapalo npr.voda, pri čemu kiveta referentnog uzorka mora biti od istog materijala i debljine kao i kiveta za uzorke. Tako su napravljeni jednosnopni spektrofotometri. No, složeniji i pogodniji za mjerenje su zapravo dvosnopni spektrofotometri kod kojih se zraka monokromatske svjetlosti razdvoji na dva snopa od kojih jedan prolazi kroz ispitivani, a drugi kroz referentni uzorak. Intenziteti dobivenih snopova se mjere istodobno ili naizmjenično i uspoređuju [1]. Za kivete se nastoji izabrati materijale za koje je refleksija na granicama faza n2/n3 i n3/n1 (zrak/kiveta, kiveta/otopina) svedena na minimum. Upadni kut zrake je točno 90° zbog čega ne dolazi do loma zrake, pa put prolaska zračenja kroz uzorak odgovara širini kivete, bez obzira na odnos triju indeksa loma. Naprotiv, molekule otapala kao i stijenka kivete, mogu apsorbirati zračenje u određenom dijelu spektra, pa bi i to trebalo uzeti u obzir tijekom izračuna apsorbancije za sam analit. To se nastoji izbjeći izborom pogodnog otapala i kiveta [7].

4.detektor zračenja i pretvornik

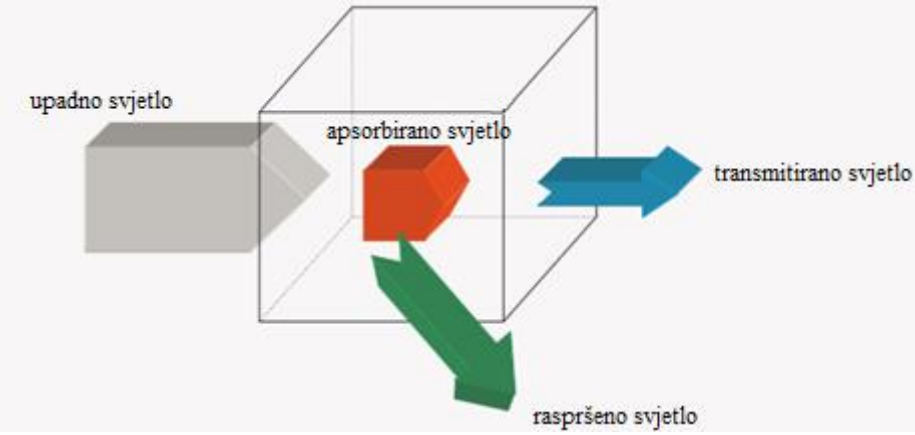
Detektor se sastoji od fotoćelije koja služi kao osjetilo ili senzor. Fotoćelija daje električni signal, proporcionalan intenzitetu svjetlosti, koji se pojačava i pretvara u apsorbanciju.

5.procesor signala i uređaj za njegovo očitavanje

Procesor signala je elektronička naprava koja pojačava električni signal iz detektora, pa je monitor računala s kojim je spektrofotometar povezan, uređaj za očitavanje mjerenog signala [1].

3. LAMBERT-BEEROV ZAKON

Snop svjetlosti koji pada na uzorak, može biti apsorbiran, transmitiran ili raspršen (Slika 4). Kada se svjetlo apsorbira to znači da se energija svjetla apsorbira u volumenu uzorka. Transmitirano svjetlo je ono koje prolazi kroz uzorak u istom smjeru kao i ulazno svjetlo. Raspršeno svjetlo je ono koje ide u drugom smjeru u odnosu na upadni snopa svjetla [9].

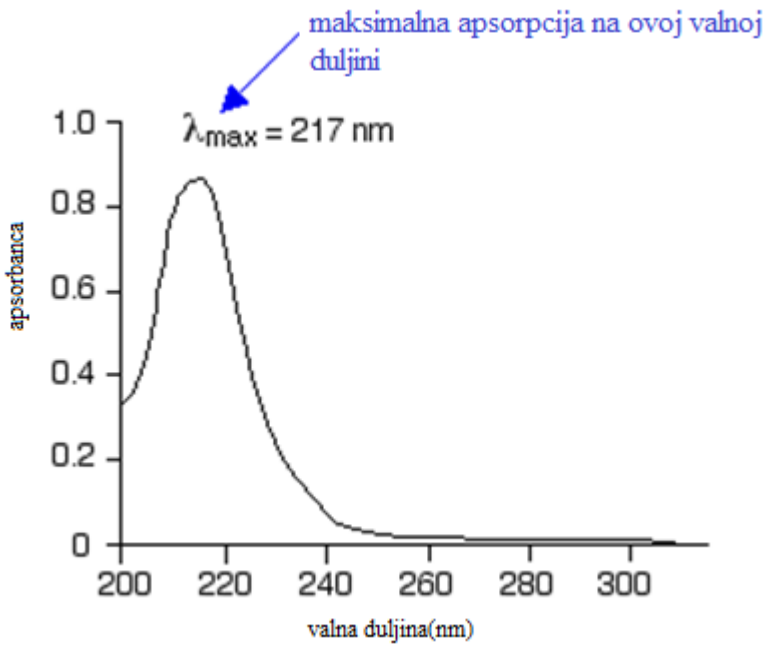


Slika 4. Prikaz raspršenja,apsorpcije i transmisije svjetla [9].

Količina zračenja koju apsorbira molekula može se izraziti na više načina. Transmitancija je omjer intenziteta propuštenog zračenja, I i intenziteta upadnog zračenja, I_o. Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje to je i veća apsorpcija. Veća apsorpcija je i onda ako molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini. Iz ovoga svega proizlazi Lambert-Beerov zakon koji kaže da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste:

$$A = \varepsilon c \ell \qquad (3.1.)$$

gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini, ε je molarni apsorpcijski koeficijent izražen u $dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$, c je molarna koncentracija otopine izražena u mol dm^{-3}, a ℓ je duljina uzorka kroz koju prolazi svjetlost izražena u cm. Vrijednosti molarnog apsorpcijskog koeficijent kreću se od 0 do $10^6\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$, gdje vrijednosti iznad $10^4\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ ukazuju na visoku molarnu apsorptivnost molekule, dok vrijednosti ispod $10^3\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ ukazuju na nizak intenzitet apsorpcije. Valna duljina pri kojoj ispitivana tvar najbolje apsorbira zračenje, može se očitati iz snimljenog spektra, a osim toga može se uz pomoć Lambert-Beerovog zakona analitički odrediti koncentracija otopine ispitivane tvari iz izmjerene apsorbancije. Najpoznatija jednadžba kojom određujemo koncentraciju uzorka pomoću apsorbancije svjetlosti u otopinama zove se Lambert- Beerov zakon [5].



Slika 5. Apsorpcijski spektar buta-1,3-diena [10].

Hoće li molekula apsorbirati UV odnosno vidljivo svjetlo ovisi o energiji fotona i o elektronskoj konfiguraciji molekule, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Svaka molekula apsorbira različito svjetlo s obzirom da ima različitu orbitalnu strukturu. Molarni apsorpcijski koeficijent, ε govori o intenzitetu apsorpcije fotona pri određenoj valnoj duljini, odnosno govori o tome kolika je vjerojatnost apsorpcije pri određenoj valnoj duljini, λ za određenu koncentraciju, c ispitivane otopine. Ovisnost ε o valnoj duljini prikazuje grafički prikaz koji se naziva apsorpcijski spektar (Slika 5). Apsorpcijski spektar karakteriziraju dva parametra: λ_{maks} odnosno valna duljina pri kojoj je intenzitet apsorpcije najveći te vrijednost ε pri toj valnoj duljini. Ako je ℓ=1 cm, a c = 1 mol dm^{-3}, a iz Lambert-Beerovog zakona slijedi da je

$$\varepsilon = A/c\ell \quad (3.2.)$$

onda vrijedi da je $\varepsilon = A$ odnosno da je iznos molarnog apsorpcijskog koeficijenta jednak izmjerenoj apsorbanciji.

3.1. Kako je nastao Lambert-Beerov zakon?

Udio apsorbirane svjetlosti ovisit će o tome s koliko molekula analit ulazi u interakciju. Ako ispitivana otopina ima intenzivnu boju, tj. visoku koncentraciju, analit će imati vrlo veliku apsorpciju jer postoji mnogo molekula za interakciju sa svjetlom. Međutim, u vrlo razrijeđenoj otopini može se jedva primijetiti obojenje i zbog toga će apsorbancija biti vrlo niska. Ako se želi uspoređivati boja otopine jednog analita sa bojom otopine drugog analita, tj, koja od te dvije otopine apsorbira više zračenja, takve usporedbe nisu moguće bez poznatih koncentracija analita. Ako se koristi vrlo razrijeđena otopina slabe boje u spremniku u obliku kocke, tako da put svjetlosti iznosi 1 cm, apsorbancija vjerojatno neće biti veoma visoka. S druge strane, ako svjetlost prolazi kroz cijev od 100 cm koja sadrži istu otopinu, više svjetlosti bi se apsorbiralo jer je put upadnog zračenja duži, pa je više molekula uključeno u interakciju sa upadnim zračenjem. Želi li se napraviti dobra usporedba između otopina, mora se uzeti u obzir duljinu puta svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. Dakle i koncentracija i duljina puta kroz koju prolazi svjetlo u otopini bitna je u Lambert-Beerovom zakonu [11]. Intenzitet upadne svjetlosti, I_u smanjit će se ako se propusti snop svjetlosti kroz neku tekućinu ili staklo, a ako je tvar obojena promijenit će se i boja svjetlosti koja je prošla kroz otopinu. Intenzitet upadne svjetlosti u smanjuje se kontaktu sa staklom kivete uslijed refleksije za iznos I_r tako da u otopinu ulazi samo svjetlost intenziteta I_o (Slika 7).

$$I_u = I_o + I_r \qquad (3.1.1.)$$

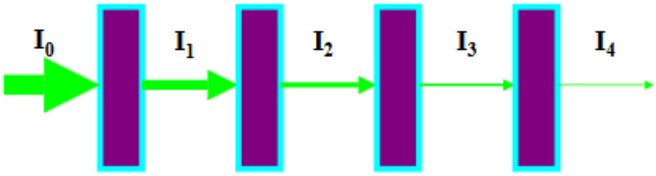
Iz kivete izlazi svjetlost intenziteta I pošto se u otopini jedan dio svjetlosti apsorbira (I_a), pa je:

$$I_o = I_a + I \qquad (3.1.2.)$$

iz čega sljedi da je

$$I_u = I_r + I_a + I \qquad (3.1.3.)$$

Johann Heinrich Lambert je ustanovio da količina svjetlosti koja se apsorbira u obojenom sloju otopine ovisi o debljini tog sloja tj. da slojevi tvari iste debljine,uz jednake ostale uvjete, uvijek apsorbiraju dio ulazne svjetlosti po istoj jednadžbi gdje je $A \sim \ell$ [1]. Primjer toga je kada svjetlost prolazi kroz veliki broj kiveta (Slika 6).



Slika 6. Prolazak svjetlosti kroz četiri kivete [13].

Može se primijetiti da intenzitet svjetlosti opada sa povećanjem duljine puta, dok je omjer ulaznog i izlaznog intenziteta zračenja konstantan (iznosi n).

$$\frac{I_o}{I_1} = \frac{I_1}{I_2} = \frac{I_2}{I_3} = \frac{I_3}{I_4} = n \qquad (3.1.4)$$

Ovaj kvalitativni odnos opisan je sljedećom funkcijom za intenzitet svjetlosti:

$$I_i = I_o n^{-i} \qquad (3.1.5)$$

ili se može napisati kao :

$$I_i = I_o\, 10^{-i \log_n 10} \qquad (3.1.6)$$

gdje i predstavlja broj kiveta. Relacija 3.1.6 zove se Lambertov zakon i može se primijeniti na bilo koju kivetu duljine ℓ:

$$I = I_o \cdot 10^{-\alpha \ell} \qquad (3.1.7)$$

gdje je α apsorpcijski koeficijent (apsorptivnost), a ℓ debljina sloja [11]. Količina svjetlosti koja se apsorbira u obojenom sloju otopine ovisi i o množinskoj koncentraciji otopljene obojene tvari tj. intenzitet izlazne svjetlosti ovisi i o koncentraciji otopine uzorka, c gdje je $A \sim c$. Tu je ovisnost proučio August Beer i dokazao da je:

$$\alpha = \varepsilon \cdot c \qquad (3.1.8)$$

gdje je ε molarni apsorpcisjki koeficijent (alternativni nazivi su: ekstincijski koeficijent, molarna apsorptivnost) koji ovisi o valnoj duljini upadne svjetlosti, prirodi tvari i temperaturi otopine, a neovisan je o debljini sloja i koncentraciji. Najčešće se izražava u $dm^3 mol^{-1}\ cm^{-1}$. Uvrštavanjem jednadžbe 3.1.8 u 3.1.7 dobiva se relacija:

$$I = I_o \cdot 10^{-\varepsilon c \ell} \qquad (3.1.9)$$

Relacija 3.1.9 naziva se Lambert-Beerov zakon te vrijedi samo za apsorpciju monokromatske svjetlosti (svjetlosti koja ima samo jednu boju), u otopini konstantne temperature. Transmitancija , *T,* definira se kao omjer intenziteta izlazne i ulazne svjetlosti :

$$T = \frac{I}{I_o} = 10^{-\varepsilon c \ell} \qquad (3.1.10)$$

Može se izražavati i u postotcima:

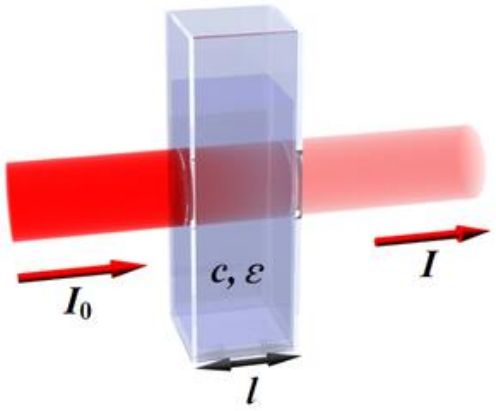
$$T/\,\% = (I / I_o) \times 100\,\% \qquad (3.1.11)$$

Transmitancija eksponencijalno ovisi o koncentraciji, a da bismo ju prikazali kao linearnu funkciju koncentracije, uvodi se pojam apsorbancije, *A,* kao logaritma recipročne vrijednosti transmitancije:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_o}{I} = \varepsilon c \ell \qquad (3.1.12)$$

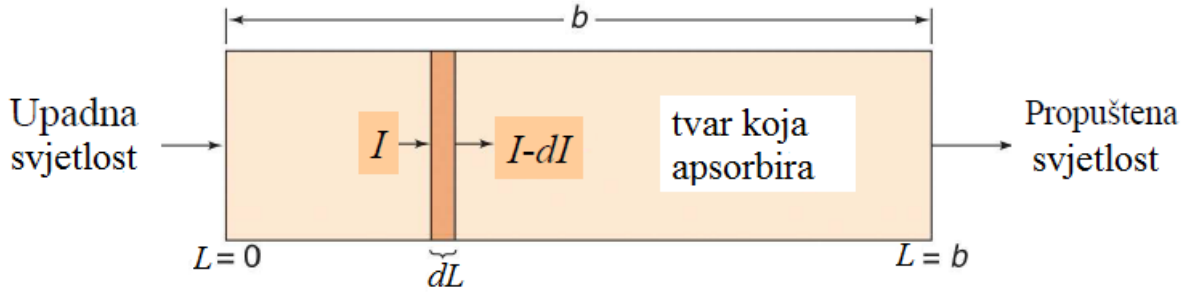
Apsorbancija odnosno transmitancija (kada je izražena kao broj) nemaju jedinicu. Apsorbancija uzorka uglavnom se mjeri pri jednoj valnoj duljini odnosno pri valnoj duljini u kojoj je apsorbancija najveća za dani uzorak. Vrijedi li Lambert-Beerov zakon dobit će se linearna ovisnost apsorbancije pri valnoj duljini maksimalne apsorbancije o koncentraciji uzorka [13]. Na većini dijagrama može se primijetiti da se apsorbancija kreće od 0 do 1, ali može ići i više od toga. Apsorpcija 0 na nekoj valnoj duljini znači da se ne apsorbira nikakva svjetlost na toj određenoj valnoj duljini. To znači da su intenziteti izlaznog zračenja, *I* kod uzorka i referentne otopine jednaki, pa je omjer I_o / I jednak 1, a logaritam od jedan je jednak nuli. Kada apsorbancija iznosi 1, apsorbira se 90 % svjetlosti pri toj valnoj duljini, što znači da je intenzitet izlaznog svjetla samo 10% od maksimalno 100%-tnog intenziteta upadnog svjetla. U tom slučaju je intenziteta upadnog zračenja (I_o) kroz intenzitet izlaznog zračenja (*I),* jednako omjeru 100 % /10 % što iznosi 10 i $\log_{10}$ od 10 je 1 [11]. Vrijednosti apsorbancije iznad 2,0 nisu pouzdane, pa bi mjerenja u tom rasponu predstavljala vrlo grube procjene stanja sustava. Lambert-Beerov zakon se zapravo temelji na činjenici da se izmjena energije između fotona upadnog zračenja i atoma, iona ili molekula analita, odvija prilikom njihovih sudara [1]. Koliko će se svjetla apsorbirati ovisi o valnoj duljini upadnog svjetla $A_\lambda = \varepsilon_\lambda \ell c$. Također je poznato

da svjetlost ima dualnu prirodu odnosno da se pojavljuje u obliku čestice i vala. Iz svega toga dolazi se do osnovne svrhe Lambert-Beerovog zakona, a to je određivanje nepoznate koncentracije ispitivanog uzorka mjerenjem njegove apsorbancije, $c = A/\varepsilon\ell$ [1].



Slika 7. Određivanje nepoznate koncentracije uzorka pomoću Lambert-Beerovog zakona [12].

Drugi način uključuje izvođenje apsorbancije, $A = \varepsilon c\ell$, odnosno koriste se integrali.



Smanjenje intenziteta svjetlosti proporcionalno je intenzitetu zračenja, I, debljini sloja otopine, $d\ell$ i koncentraciji otopine, c:

$$dI = -aIcd\ell \qquad (3.1.13)$$

gdje je a je konstanta proporcionalnosti.

Dijeljenjem obje strane u relaciji 3.1.13 sa I dobije se :

$$\frac{dI}{I} = -\, acd\ell \qquad (3.1.14)$$

Integriranjem jednadžbe 3.1.14 dobiva se relacija :

$$\int_{I_\circ}^{I} \cdot \frac{dI}{I} = -\int_0^l .acd\ell \qquad (3.1.15)$$

a rješavanjem integrala se dobiju relacije [14]:

$$\ln\frac{I}{I_\circ} = 2.303 \log\frac{I}{I_\circ} = -ac\ell \qquad (3.1.16)$$

$$\log\frac{I_\circ}{I} = \frac{a}{2.303} c\ell = \varepsilon c\ell \qquad (3.1.17)$$

$$-\log T = A = \varepsilon c\ell \qquad (3.1.17)$$

3.2. Lambert-Beerov zakon za dvije ili više komponenti i izozbestna točka

Kada se analit sastoji od dviju komponenti koje apsorbiraju zračenje, te imaju maksimum apsorpcije u različitim dijelovima spektra, može se pretpostaviti da dvije komponente neovisno apsorbiraju zračenje. Dakle apsorbancija smjese (A_{sum}) predstavlja zbroj apsorbancija komponenti smjese što je prikazano relacijom :

$$A_{sum} = A_1 + A_{2+....+} A_{n...} = \ell(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_{2+...+}\, \varepsilon_n c_n) \quad (3.2.1)$$

gdje su c_1 i c_2 koncentracije te ε_1 i ε_2 molarni apsorpcijski koeficijenti dviju komponenti smjese. Dakle, ukoliko se mjere spektri za uzorke različitih koncentracija c_1 i c_2, dobiju se grafički prikazi uzoraka, u kojima je zbroj koncentracija dviju glavnih apsorbirajućih komponenti konstantna i tu se može uočiti takozvana izozbestna točka (Slika 8). Kod reakcije

$$A \rightarrow B$$

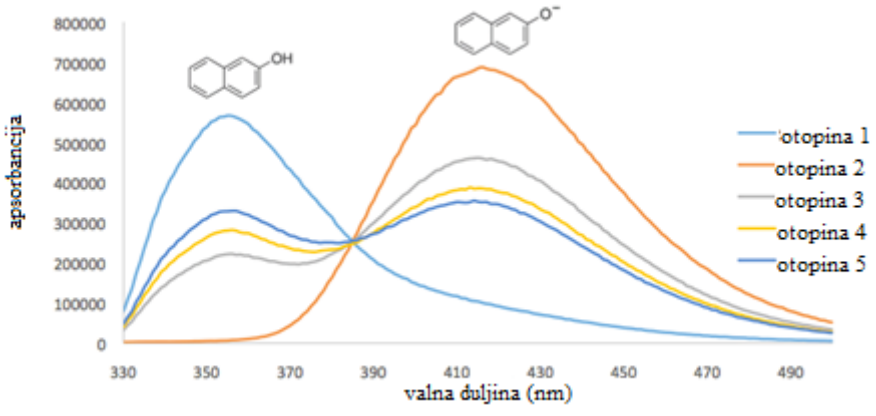
suma koncentracija sudionika reakcije ($c_{sum} = c_A + c_B$) je konstantna dok se omjer njihovih koncentracija (c_A/c_B) mijenja. Točka u kojoj se sijeku svi spektri za različite odnose

koncentracija c_1 i c_2 naziva se izozbestna točka. Izozbestna točka može se definirati i kao točka kod koje su koeficijenti ekstinkcije (apsorbancija) dviju kemijskih tvari jednake na karakterističnoj valnoj duljini tijekom kemijske reakcije, odnosno pri toj valnoj duljini obje komponente jednako apsorbiraju zračenje. Iz toga sljedi da je u izozbestnoj točki $A_A = A_B$ i $\varepsilon_A = \varepsilon_B$. Činjenica da postoji ta točka nam može potvrditi dvije hipoteze:

1) odnos koncentracija dviju komponenti u analitu mijenja se na način da je zbroj tih koncentracija očuvan. To mora vrijediti za sve reakcije reakcija tipa A $\rightarrow$B (gdje je A analit 1, a B analit 2) te za reakcije tipa A+B $\rightarrow$ AB (gdje je A ili B analit 1, a AB je analit 2).

2) analit 1 i analit 2 apsorbiraju zračenje neovisno jedan o drugom, iako ne mora uvijek biti tako. Primjerice, ukoliko dolazi do vezanja analita 1 na analit 2, pri čemu dolazi do nastajanja veze te posljedično promjene spektra u odnosu na čiste komponente, neće vrijediti jednadžba $A_A = A_B$.

Izozbestna točka pokazuje i da je uspostavljena ravnoteža između dvije komponente, da je nastao kompleks, da stehiometrija reakcije ostaje očuvana te odvijaju li se neke druge reakcije. Ona ne ovisi o valnoj duljini, stupnju reakcije, koncentraciji i ravnoteži kemijske reakcije. Koristi se za analizu ravnotežnih reakcija, analizu absorbancija produkata i reaktanata i prisutnost sporednih komponenti u ispitivanom sustavu. Poznati primjeri su stvaranje kompleksa enzim-supstrat ili protonacija slabih kiselina ili baza s promjenom pH. Za otopine indikatora, gdje protonirani i deprotonirani oblik daju različite apsorpcijske spektre, također će se uočiti izozbestna točka za apsorpcijske spektre izmjerene pri različitim pH [7].



Slika 8. Fluorescencijski spektri pet otopina 2-naftola različitih koncentracija. Izozbestna točka je na 385 nm [15].

3.3. Ograničenje zakona

Ako se promjenom koncentracije promijeni molekulsko stanje otopljene tvari, tj.ako dođe do disocijacije, asocijacije, stvaranja kompleksa i sl, apsorpcija svjetlosti će odstupati od Lambert-Beerovog zakona, jer te veličine utječu na promjenu molarnog apsorpcijskog koeficijenta [1]. Zapravo zakon vrijedi samo za otopine s niskim koncentracijama i za monokromatska svjetla. Visoke koncentracije (c > 0.01 mol dm^{-3}) uzrokuju promjenu molarnog apsorpcijskog koeficijenta. Ta odstupanja zbog visoke koncentracije otopine posljedica su interakcije između vrsta koje apsorbiraju u smjesi i promjene indeksa loma medija [16]. Uzrok odstupanja može biti i prisustvo drugih nepoželjnih zračenja i polikromatsko zračenje. Nepoželjna dodatna zračenja dolaze do detektora i imaju veliki utjecaj kada je $I << I_o$ jer uzrokuju odstupanje pri višim koncentracijama. Smanjenje intenziteta nepoželjnog zračenja moguće je postići smanjenjem pukotine ulaznog svjetla koja onemogućava da nepoželjno zračenje dođe do detektora, pa se na taj način povećava linearnost A i c te smanjuje odstupanje od zakona [17]. Poznato je da se monokromatori koriste za izoliranje dijelova upadnog zračenja , stoga pravo monokromatsko zračenje koje sadrži samo jednu valnu duljinu nikada ne postoji i može se aproksimirati pomoću vrlo uskog izlaznog proreza na monokromatoru. Može se pretpostaviti da se upadno zračenje sastoji samo od dvije valne duljine λ 'i λ ", s intenzitetima I_o' i I_o". S obzirom da je A =log (I_o/I)= -log (I / I_o) = $\varepsilon \ell c$ tada će intenzitet izlaznog zračenja(I) ćelije za svaku valnu duljinu biti definirano relacijama [16]:

$$-\log\left(\frac{I}{I_\circ}\right) = \varepsilon c \ell / 10^x \qquad (3.3.1)$$

$$I/I_o = -10^{\varepsilon c \ell} / \times I_o \qquad (3.3.2)$$

$$I = I_o\, 10^{-\varepsilon \ell c} \qquad (3.3.3)$$

Odnosno:

$$I' = I_o'\, 10^{-\varepsilon' \ell c} \qquad (3.3.4)$$

$$I'' = I_o''\, 10^{-\varepsilon'' \ell c} \qquad (3.3.5)$$

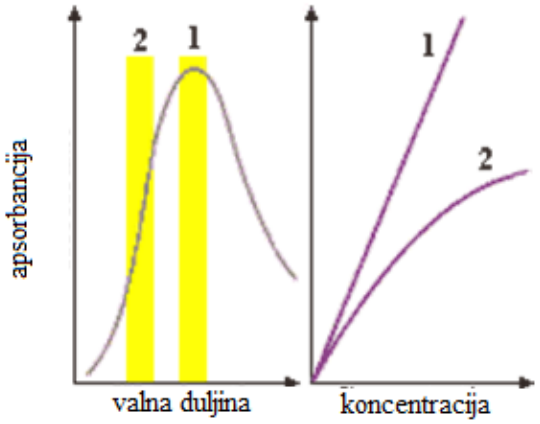
Zbrajanjem jednadžbi 3.3.4 i 3.3.5 dobije se relacija:

$$I' + I'' = (I_o' + I_o'')\, 10^{-\varepsilon' \ell c} \qquad (3.3.6)$$

gdje su ε 'i ε" molarni apsorpcijski koeficijenti za svaku valnu duljinu, pa će izmjerena apsorbancija, A biti definirana jednadžbom:

$$A = -\log\frac{I''+I'}{I_o''+I_o'} = \log\left(I_o'+I_o''\right)/\left(I_o'\,10^{-\varepsilon'\ell c}+I_o''10^{-\varepsilon''\ell c}\right) \quad (3.3.7)$$

Jednadžba 3.3.7 ukazuje na nelinearnu vezu između *A* i *c*. Iste situacije nastaju kada se zračenje sastoji od više valnih duljina. Takva situacija je ilustrirana slikom 9:



Slika 9.Grafičko slaganje(1) i odstupanje(2) od Lambert-Beerovog zakona [16].

Kada se koristi polikromatsko zračenje, njegov preferirani položaj (u smislu središnje valne duljine) nalazi se na vrhu relativno širokog apsorpcijskog vrha (Slika 9, položaj 1). U ovom slučaju održava se proporcionalnost između apsorbancije (*A*) i koncentracije (*c*), jer su molarne apsorpcije praktički jednake za sve valne duljine. S druge strane, očekuje se značajna odstupanja kada se polikromatsko zračenje nalazi u spektralnim područjima koji su udaljeni od apsorpcijskih maksimuma (Slika 9, položaj 2), gdje se očekuje širok raspon molarnih apsorpcijskih vrijednosti i kada se povećava koncentracija. Eksperimentalno je nađeno da su odstupanja od Lambert-Beerovog zakona kod mjerenja apsorpcije na uskim maksimumima beznačajna, ako je širina ulazne zrake manja od 1/10 širine apsorpcijskog vrha na polovici njegove visine [16].

4. UPORABA LAMBERT-BEEROVOG ZAKONA U SVAKODNEVNOM ŽIVOTU

UV/VIS spektroskopija je metoda koja se koristi za kvantifikaciju i određivanje čistoće DNA iz bioloških uzoraka. DNA se mora izolirati iz bioloških uzoraka i prilagoditi daljnjoj analizi, a

nalazi se u svakoj stanici sa jezgrom i uspješno se može izolirati iz brojnih bioloških materijala pa tako i onih ostavljenih na mjestu zločina. Primjerice UV/VIS spektroskopija vrlo je korisna u forenzičkom laboratoriju jer omogućuje obradu uzoraka kriminalističkih slučajeva, može pomoći u utvrđivanju očinstva ili srodstva te identifikaciji nestalih osoba (na primjer u nesrećama, ratu, masovnim katastrofama i slično). Uzorci koji se najčešće koriste u forenzičkim laboratorijima su ejakulat i krv te kosti, kosa s korijenom, zubi, dlaka, slina, urin, nokti, mišićno tkivo, opušak, prhut te otisci prstiju [18]. Kvantifikacija DNA može biti potrebna u mnogim situacijama, osim za forenziku. Kao na primjer za kontrolu količine početnog materijala za neke analitičke metode, za kliničke primjene kao što je određivanje učinkovitosti liječenja odnosno za praćenje smanjenja bakterija ili virusa ili praćenje progresije bolesti kod pacijenata koji imaju rak. Može se koristiti i za određivanje usklađenosti s propisima o proizvodu, kao što je sadržaj genetski modificiranog organizma hrane ili sadržaj zaostale DNA u biološkim lijekovima te za određivanje količine DNA dobivene iz metoda ekstrakcije DNA za komparativne svrhe ili u svrhu određivanja valjanosti uzorka.

Kod navedenih ispitivanja, ključna je točnost kvantitativne analize za primjene poput određivanja sadržaja GMO u hrani, gdje se moraju poštovati zakonom propisana pravila. Kvantifikacija DNA je važna primjena spektrofotometrijskih metoda kojima se mjeri apsorpcija zračenja u UV/VIS području. Sve nukleinske kiseline jako apsorbiraju u UV/VIS području zbog heterocikličkih prstenastih struktura povezanih sa jednom od četiri moguće baze. Tipična maksimalna apsorpcija odvija se pri valnoj duljini od oko 260 nm (A_{260}), i ovisi o pH. Mjerenje koncentracije DNA pomoću UV/VIS spektroskopije relativno je jednostavni proces, koji uključuje sljedeće korake :

1.Razrjeđivanje otopine DNA u puferu ili destilirano vodi do koncentracije koja daje A_{260} ili manje.

2.Određivanje vrijednosti apsorbancije otopine, uzimajući u obzir apsorbanciju otapala i bilo koji faktor razrjeđivanja koji se primjenjuje.

3. Prevođenje vrijednosti apsorbancije u koncentracijsku vrijednost za ispitivanu otopinu.

Određene vrijednosti apsorbancije pretvaraju se u koncentraciju uporabom već spomenutog Lambert –Beerovog zakona ($A = \varepsilon c\ell$) koji navodi da je izmjerena apsorbancija otopine DNA određena koncentracijom DNA, duljinom puta svjetlosti i molarnim apsorpcijskim koeficijentom. Taj zakon predviđa linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji, iako ta linearnost ne vrijedi pri visokim koncentracijama DNA. Duljina puta svjetlosti obično je fiksirana na 1 cm u spektrofotometru, iako je jedan od novijih instrumenata na tržištu dizajniran za rad s vrlo malim volumenima uzorka i ima duljinu puta između 0,2 mm i 1,0 mm [19]. Sve

što je potrebno za navedenu metodu je spektrofotometar opremljen UV lampom, kivete i otopina pročišćene DNA. Čitanja apsorbancije obavljaju se pri 260 nm gdje DNA najviše apsorbira svjetlost, a izmjerene apsorbancije omogućavaju procjenu koncentracije ispitivane otopine. Kako bi bili sigurni da su brojevi korisni, očitanje A_{260} treba biti unutar linearnog raspona instrumenta (obično između 0,1-1,0).

Pomoću Lambert-Beerovog zakona može se izračunati nepoznata koncentracija: $c = A/\varepsilon \ell$.

Koncentracija DNA se zapravo procjenjuje modificiranjem Lambert –Beerovog zakona i to mjerenjem apsorbancije na 260 nm, podešavanjem A_{260} mjerenja za zamućenost (mjerenje apsorbancije na 320 nm, A_{320}), množenjem s faktorom razrjeđivanja i korištenjem standardnog ekstincijskog koeficijenta. Za DNA bi to bilo [20]:

c (μg / mL) = (A_{260} - A_{320}) × faktor razrjeđivanja × 50 μg/ml (4.1)

Općeniti oblik jednadžbe 4.1 glasi :

c (μg / mL) = (A_{max} - $A_{zamućenje}$) × faktor razrjeđivanja × $\varepsilon_{standardni}$ μg/ml (4.2)

Zamućenje je zamagljenost ili maglovitost tekućine uzrokovano velikim brojem pojedinačnih čestica koje su općenito nevidljive golim okom, slično dimu u zraku. Mjerenje zamućenosti ključni je test kakvoće otopine. Nadalje, poznati su koeficijenti ekstinkcije za specifične nukleotidne skupine (Tablica 1). Koeficijenti ekstinkcije (ε) mogu se modificirati u standardne koeficijenti ε za dužinu puta od 1 cm. Općenito, ti standardni koeficijenti koriste se umjesto koeficijenta ekstinkcije za dvolančanu DNA (dsDNA), jednolančanu RNA (ssRNA) i jednolančanu DNA (ssDNA) [21]. Primjerice za dvolančanu DNA uzeli bi da $\varepsilon_{standardni}$ iznosi 50 μg / mL.

Tablica 1. Prikaz iznosa standardnog ekstincijskog koeficijenta za dsDNA,ssRNA i ssDNA [21].

Molekula	Ekstincijski koeficijent (µg / mL)cm-1	Standardni koeficijenti za dužinu puta od 1 cm(µg / mL)
Dvolančana DNA	0.020	50
Jednolančana RNA	0.025	40
Jednolančana DNA	0.027	33

Kako bi objasnili faktor razrjeđenja potrebno je odabrati neki početni volumen DNA. Uzme li se 10 mL otopine DNA i razrijedi do konačnog volumena od 2 L (2000 mL) tada otopina ima faktor razrijeđenja 0,005 koji smo dobili dijeljenjem 10 mL otopine DNA koju smo izolirali sa 2000 mL otopine koja nam je potrebna, primjerice neki pufer. Pošto je izmjerena otopina DNA razrijeđena od izvornog uzorka potrebno je odrediti vrijednost nerazrijeđene DNA. Kako se želi očuvati DNA ona se razrjeđuje odabranom otopinom. DNA se razrjeđuje jer izoliranje i pročišćavanje traje dugi vremenski period, i budući da kivete nisu sterilne, ne želi se potrošiti 2 mL DNA na određivanje koncentracije. Dakle, koriste se male količine (5 mL - 20 mL), a s obzirom na ograničenja opreme, to znači da se nema mnogo izbora nego da se razrijedi DNA [21]. Dakle, ukupni prinos DNA (m_{prinos}) dobiven je množenjem koncentracije DNA s konačnim ukupnim pročišćenim volumenom uzorka izoliranim na početku [20].

$$m_{prinos}\ (\mu g) = c\ (\mu g/mL) \times V_{ukupno\ čistog\ uzorka}\ (mL) \quad (4.3)$$

Primjer određivanja koncentracije DNA:

1. Dvije kivete za uzorke označe se s A (oznaka za praznu kivetu) i s B (kiveta u koju je dodana otopina DNA).

2. Doda se 2 mL TE (Tris –EDTA) pufera u A kivetu i 2 mL TE pufera u B kivetu. (Da bi se mogao snimiti korektan apsorpcijski spektar, svjetlost mora prolaziti kroz tekućinu. Međutim, s obzirom na dizajn instrumenta i kivete, svjetlost neće moći proći kroz tekućinu ako je ukupan volumen otopine manji od 2 mL)

3. Doda se 10 mL razrijeđene otopine DNA u kivetu B i promiješa se.

4. Prebaci se cijeli sadržaj kivete A u staklenu kivetu u odgovarajući utor spektrofotometra (kroz kivetu prolazi monokromatsko zračenje pri 260 nm i mjeri se A_{260}). Budući da u ovoj

epruveti nema DNA, očitanje apsorbancije treba biti blizu 0. Ako nije, spektrofotometar se kalibrira tako da apsorbancija pufera iznosi 0.

5. Kiveta A se zamijeni kivetom B. Pričeka se nekoliko sekundi i očita se A_{260}. Zatim se izračuna apsorbancija na 320nm i oduzme od apsorbancije očitane na 260 nm. Dobivena vrijednost se uvrsti u relaciju 4.1 da se izračuna koncentracija DNA u ispitivanom uzorku [22].

Međutim, DNA nije jedina molekula koja može apsorbirati UV svjetlo pri 260 nm. Budući da RNA također ima veliku apsorpciju pri 260 nm, a aromatske aminokiseline prisutne u proteinu apsorbiraju pri 280 nm, oba onečišćenja, ukoliko su prisutna u otopini DNA pridonose ukupnom mjerenju apsorbancije pri 260 nm. Prisutnost gvanidina će također dovesti do povećane apsorbancije pri 260 nm. To znači da ako se A_{260} koristi za izračun prinosa, dobivena količina DNA može biti precijenjena. Da bi se procijenila čistoća DNA, izmjeri se apsorbancija od 230 nm do 320 nm za otkrivanje drugih mogućih onečišćenja. Najčešći izračun čistoće je omjer apsorbancije na 260 nm podijeljen s očitanjem apsorbancije na 280 nm. DNA dobre kvalitete će imati omjer A_{260} / A_{280} od 1,7-2,0. Ako omjer izmjerenih apsorbancija iznosi 1,6; takav DNA nije prikladan za bilo koju metodu jer niži omjeri apsorbancija ukazuju da je prisutno više onečišćenja. Omjer apsorbancija se može izračunati nakon ispravljanja zamućenosti (vrijednost apsorbancije određene na 320 nm) prema relaciji:

$$\text{dsDNA}_{\text{čistoća}}\,(A_{260} / A_{280}) = (A_{260} - A_{320}) : (A_{280} - A_{320}) \quad (4.4)$$

Jaka apsorbancija oko 230 nm može ukazivati da su organski spojevi ili kaotropne soli prisutni u pročišćenom DNA. Omjer A_{260} nm i A_{230} nm može pomoći u procjeni razine prisutnih soli u pročišćenoj DNA. Što je manji omjer, to je veća količina soli tiocijanata, na primjer. Kao smjernica, omjer A_{260}/A_{230} je najbolji ako je veći od 1,5. Očitanje apsorbancije pri 320 nm će ukazati postoji li zamućenje u otopini, što je još jedan pokazatelj mogućeg onečišćenja. Stoga je spektar očitanja apsorbancija od 230 nm do 320 nm najsigurniji pokazatelj čistoće uzorka [20].

5. ZAKLJUČAK

UV/VIS spektroskopija jedna je od najznačajnih metoda u kojoj se koristi poznati Lambert-Beerov zakon. Metoda je vrlo korisna pošto se primjenjuje za određivanje nepoznate koncentracije uzorka, strukture određenih tvari, određivanje čistoće DNA i slično. Metoda se temelji na činjenici da energije, odnosno zračenja pobuđuju molekulu iz osnovnog u pobuđeno stanje, odnosno da izazivaju elektronske prijelaze. Molekula se pobuđuje kada apsorbira UV/VIS zračenje koje pada na nju i tako dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog elektronskog stanja u pobuđeno elektronsko stanje. Kada zračenje prolazi kroz otopinu ispitivane tvari dio zračenja apsorbira uzorak, a dio se propušta. To neapsorbirano ili propušteno zračenje mjeri spektrofotometar odnosno mjeri intenzitet zračenja koje je prošlo kroz analizirani uzorak i uspoređuje ga sa intenzitetom ulaznog zračenja. Ovaj uređaj omogućuje prikaz apsorbancije kao funkciju valne duljine svjetlosti odnosno daje apsorpcijski spektar koji je karakterističan za svaku molekulu. Također omogućuje određivanje maksimalne valne duljine potrebne za određivanje apsorbancije uzoraka različitih koncentracija i crtanje baždarnog dijagrama. Kada se uzorak sastoji od dviju komponenti koje apsorbiraju zračenje, te imaju maksimum apsorpcije u različitim dijelovima spektra, može se pretpostaviti da dvije komponente neovisno apsorbiraju zračenje. Dakle Lambert –Beerov zakon se modificira tako da je apsorbancija smjese zbroj apsorbancija komponenti koji ju čine. Ovaj zakon ne vrijedi uvijek odnosno može se reći da se radi o graničnom zakonu pošto ne vrijedi za visoke koncentracije (c > 0.01 mol dm^{-3}) koje uzrokuju promjenu molarnog apsorpcijskog koeficijenta i ne vrijedi za polikromatska svjetla te prisustvo drugih nepoželjnih zračenja. No, kada se minimizira utjecaj navedenih odstupanja, Lambert-Beerov zakon je vrlo koristan i široko primjenjiv.

6. LITERATURA

1. P.W. Atkins & M.J. Clugston, Načela fizikalne kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1989. (01.03.2018)
2. https://www.scribd.com/document/360855013/Hemija-Spektrofotometrija-i-Kolorimetrija_(02.03.2018)
3. https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry (01.03.2018)
4. https://www.google.hr/search?q=spektar+elektromagnetskog+zracenja&rlz=1C1WHCN_enHR705HR705&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiRm6bXyJbaAhWhNpoKHZJICv8Q_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=i-DG8HryqcufKM: (04.03.2018.)
5. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf (04.03.2018)
6. https://www.google.hr/search?rlz=1C1WHCN_enHR705HR705&biw=1366&bih=613&tbm=isch&sa=1&ei=f4O_WuvnB6WLmwXgmZKoBg&q=standard+curve+copper&oq=standard+curve+copper&gs_l=psy-(ab.3...26768.30103.0.30238.21.12.1.0.0.0.216.1449.0j8j1.9.0....0...1c.1.64.psy-ab..13.2.389...0i7i30k1j0i8i30k1j0i8i7i30k1.0.j6k-v7cHXJM#imgrc=8a7J6smN8N0AFM: (05.03.2018)
7. https://www.scribd.com/document/368683718/skripta2017-18 (07.03.2018)
8. www.pbf.unizg.hr/content/download/4908/32188/.../3/.../spektrofotometar_biok.pdf https://www.google.hr/search?q=isosbestic+point&client=firefox-b-ab&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwis-YOBs7zZAhWLL1AKHfbvBCYQ_AUICigB&biw=1600&bih=786#imgrc=VdjyuKBO2ozcoM: (09.03.2018)
9. https://www.physics.uoguelph.ca/~garrettp/teaching/PHY-1070/lecture-21.pdf (12.03.2018)
10. https://www.google.hr/search?q=maximum+absorbance&rlz=1C1WHCN_enHR705HR705&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj71M_u0pbaAhWkQpoKHcylDcoQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=-RXTPBME0wLrLM: (15.03.2018)
11. https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html (15.03.2018)
12. https://www.google.hr/search?q=lamber+beer&client=firefox-b-ab&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjN0PaVxMHZAhUDLFAKHZl4BOMQ_AUICigB&biw=1600&bih=786#imgdii=RmQI_T_PSu46uM:&imgrc=i2MO2jRETpX-aM: (20.03.2018)

13. http://www.yorku.ca/skrylov/teaching/chem4050/Part_3_Using_Light_for_detection.pdf (20.03.2018)
14. http://www.ffh.bg.ac.rs/OKFH/download/IIIpredIIsem-10.pdf (21.03.2018)
15. https://www.google.hr/search?rlz=1C1WHCN_enHR705HR705&biw=1366&bih=613&tbm=isch&sa=1&ei=D4-_WqHmKqzA6ASEtrPoAQ&q=flourescence+naftol&oq=flourescence+naftol&gs_l=psy-ab.3...973.4832.0.5008.19.18.0.0.0.0.253.2503.0j12j2.14.0....0...1c.1.64.psy-ab..5.11.2064...0j0i67k1j0i30k1j0i10i30k1j0i13k1j0i13i30k1j0i10i19k1j0i19k1j0i8i13i30i19k1.0.HBbDV3t7kOE#imgrc=VdjyuKBO2ozcoM: (22.03.2018)
16. http://195.134.76.37/applets/AppletBeerLaw/Appl_Beer2.html (24.03.2018)
17. http://blamp.sites.truman.edu/files/2012/11/322-UV-Vis-Techniques.pdf (24.03.2018)
18. https://dr.nsk.hr/islandora/object/mef%3A891/datastream/PDF/view (25.03.2018)
19. https://books.google.hr/books?id=wAEkJiAE1yUC&pg=PA84&lpg=PA84&dq=dna%20concentration%20lambert%20beer&source=bl&ots=cTW8tQaF56&sig=tWuB_aqrwE5voCX5va-LJWKL-mw&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwjXxZmGtcvZAhVFDywKHcYXAa4Q6AEIaDAI#v=onepage&q=dna%20concentration%20lambert%20beer&f=false (25.03.2018)
20. https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/(26.03.2018)
21. https://www.promega.com/-/media/files/resources/application-notes/pathlength/calculating-nucleic-acid-or-protein-concentration-using-the-glomax-multi-microplate-instrument.pdf?la=en (29.03.2018)
22. http://homepages.bw.edu/~mbumbuli/molbio/labs/dna/index.html (31.03.2018.)