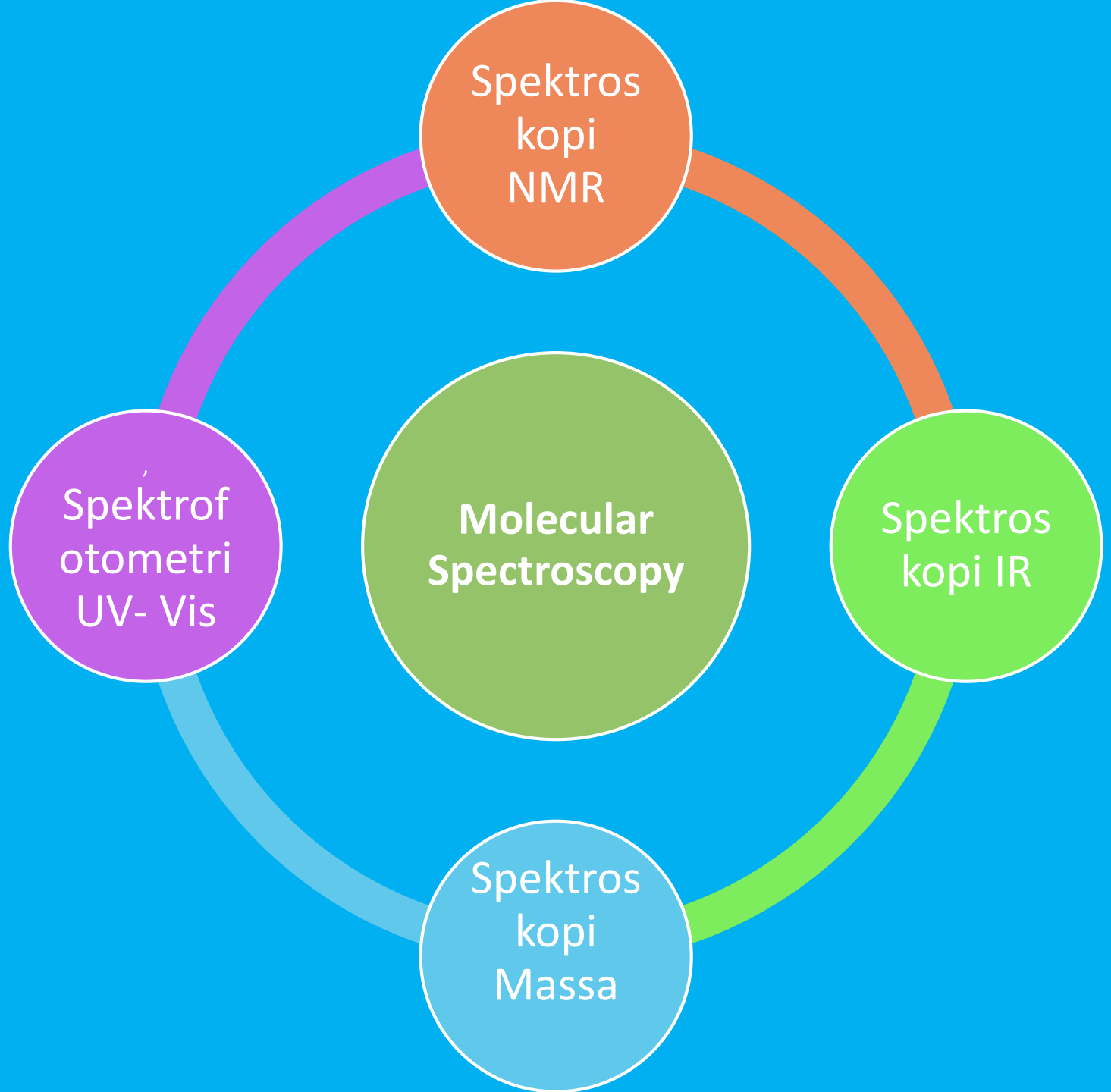
SPEKTROFOTOMETRI UV VIS

ANALISIS FARMASI

- Teknik spektroskopi digunakan untuk mengukur zat kimia dan untuk mempelajari struktur dan reaksinya.
- Melibatkan interaksi cahaya dengan materi.
- Digunakan untuk masalah konsistensi dan struktur konformasi molekul biologis.
- Teknik ini unik karena tidak mendegradasi molekul.
- Spektroskopi : prosedur analitis pertama yang digunakan oleh para ilmuwan biokimia.
- Spektroskopi menggunakan interaksi radiasi dengan materi untuk memperoleh informasi tentang sampel. Beberapa unsur kimia ditemukan dengan spektroskopi.

- Sampel di stimulus dalam beberapa cara dengan menerapkan energi dalam bentuk panas, energi listrik, cahaya, partikel, atau reaksi kimia.
- Sebelum menerapkan stimulus, analit didominasi energi terendah atau keadaan dasar. Stimulus kemudian menyebabkan beberapa spesies analit mengalami transisi ke energi yang lebih tinggi atau keadaan tereksitasi.
- Memperoleh informasi tentang analit dengan mengukur radiasi elektromagnetik yang dipancarkan saat kembali ke keadaan dasar atau dengan mengukur jumlah radiasi elektromagnetik yang diserap sebagai hasil eksitasi.

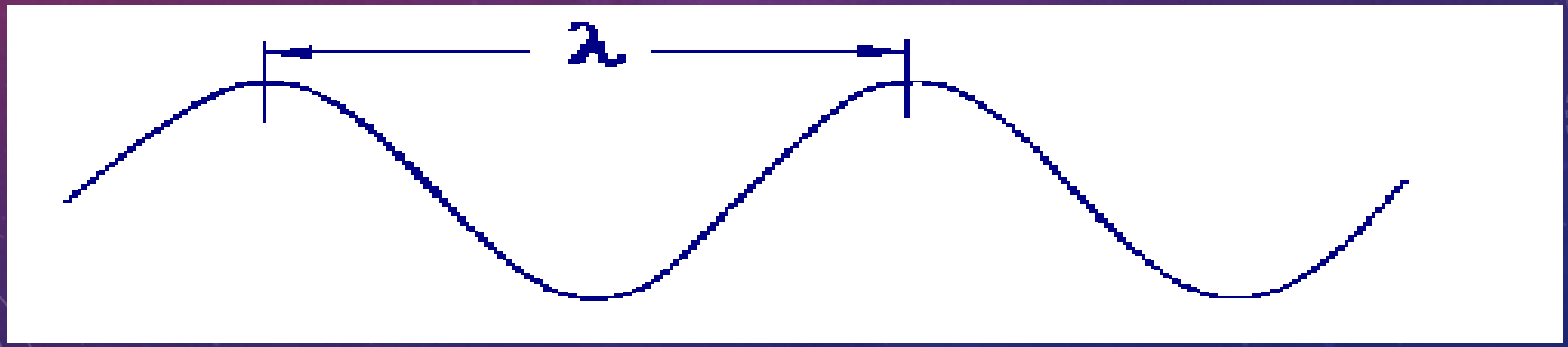

Spektroskopi NMR
Spektrofotometri UV- Vis
Molecular Spectroscopy
Spektroskopi IR
Spektroskopi Massa

- Molekul mengalami tiga jenis transisi terkuantisasi ketika tereksitasi oleh radiasi ultraviolet, sinar tampak, dan inframerah. Untuk radiasi ultraviolet dan sinar tampak, eksitasi terjadi ketika elektron yang berada dalam orbital molekul atau atom berenergi rendah dipromosikan ke orbital berenergi lebih tinggi.
- Bahwa energi hn dari foton harus sama persis dengan perbedaan energi antara dua energi orbital.
- Selain transisi elektronik, molekul menunjukkan dua jenis transisi yang diinduksi radiasi: transisi vibrasi dan transisi rotasi.
- Transisi getaran terjadi karena molekul memiliki banyak tingkat energi terkuantisasi, atau keadaan getaran, yang terkait dengan ikatan yang menyatukan molekul.

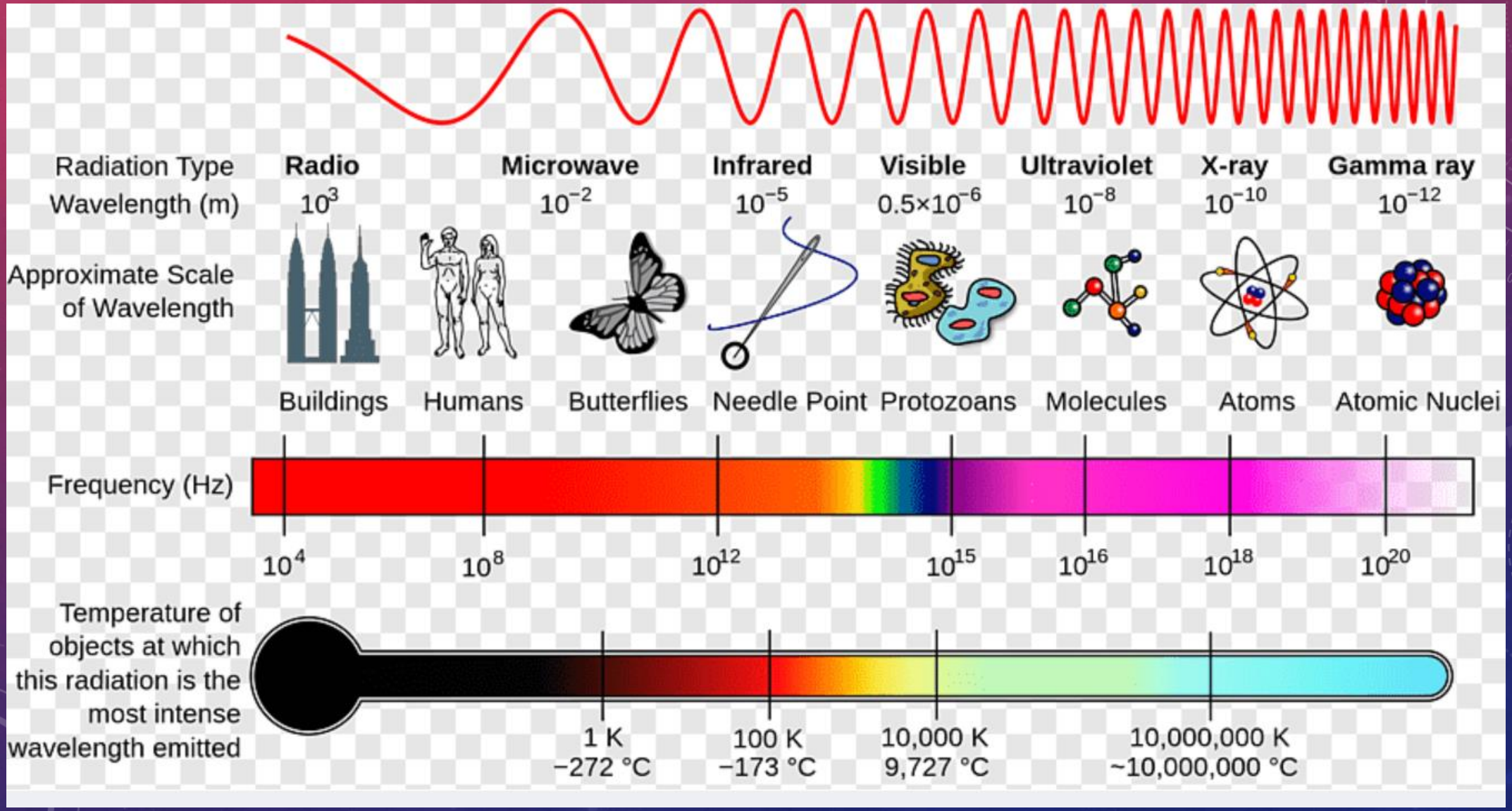
- Radiasi adalah suatu bentuk energi dan kita terus-menerus diingatkan akan kehadirannya melalui indera penglihatan dan kemampuan kita untuk merasakan pancaran panas. gerakan gelombang di mana panjang gelombang, adalah jarak antara dua puncak yang berurutan. Frekuensi, , adalah jumlah puncak yang melewati suatu titik tertentu per detik.
- sehingga: $c = \nu\lambda$
- where c is the velocity of light in a vacuum
- V : Kecepatan dalam medium

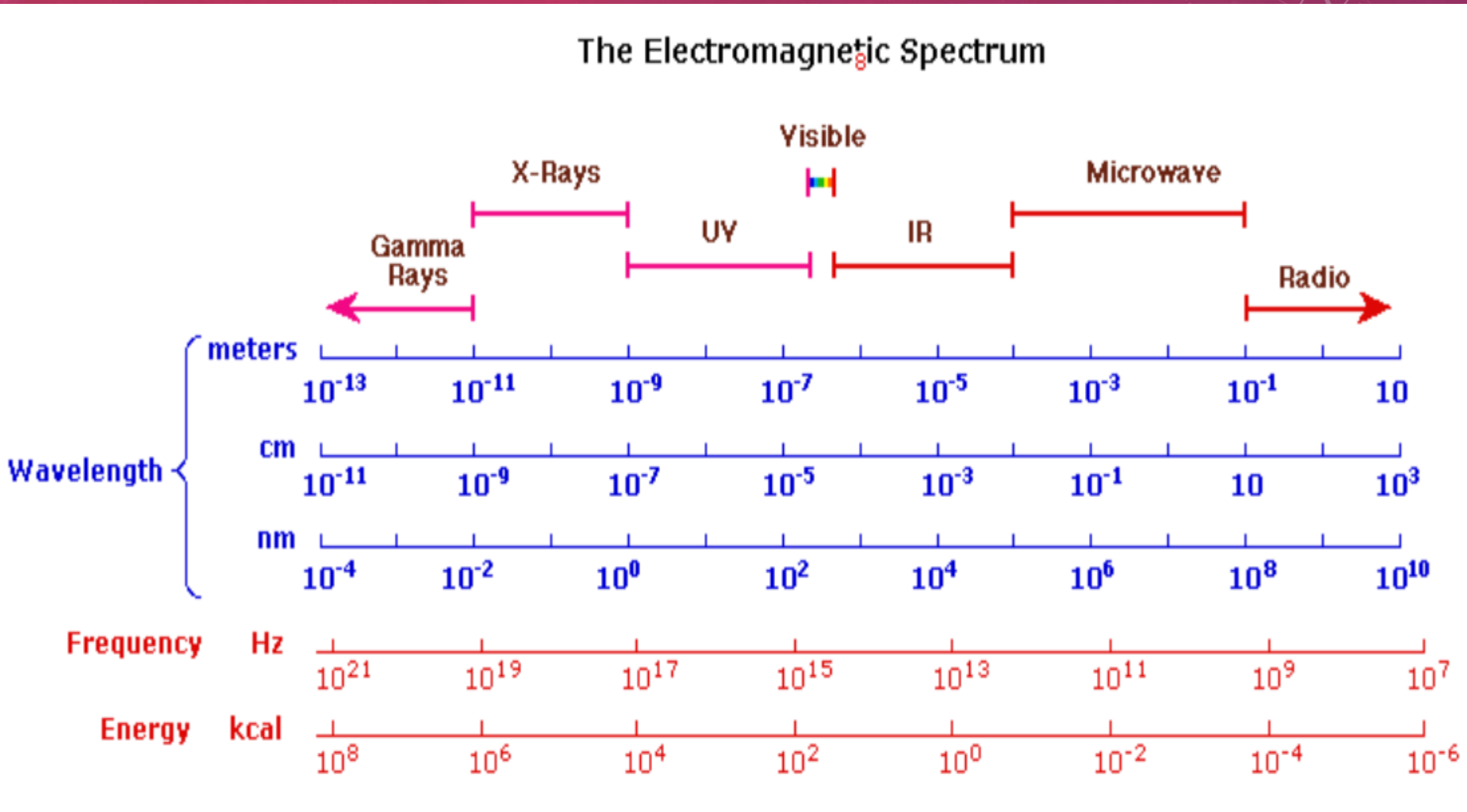
$\upsilon = c/\lambda$ υ=frequency, λ=wavelength, c=velocity of light ($c = 3 \cdot 10^{10}$ cm/sec)

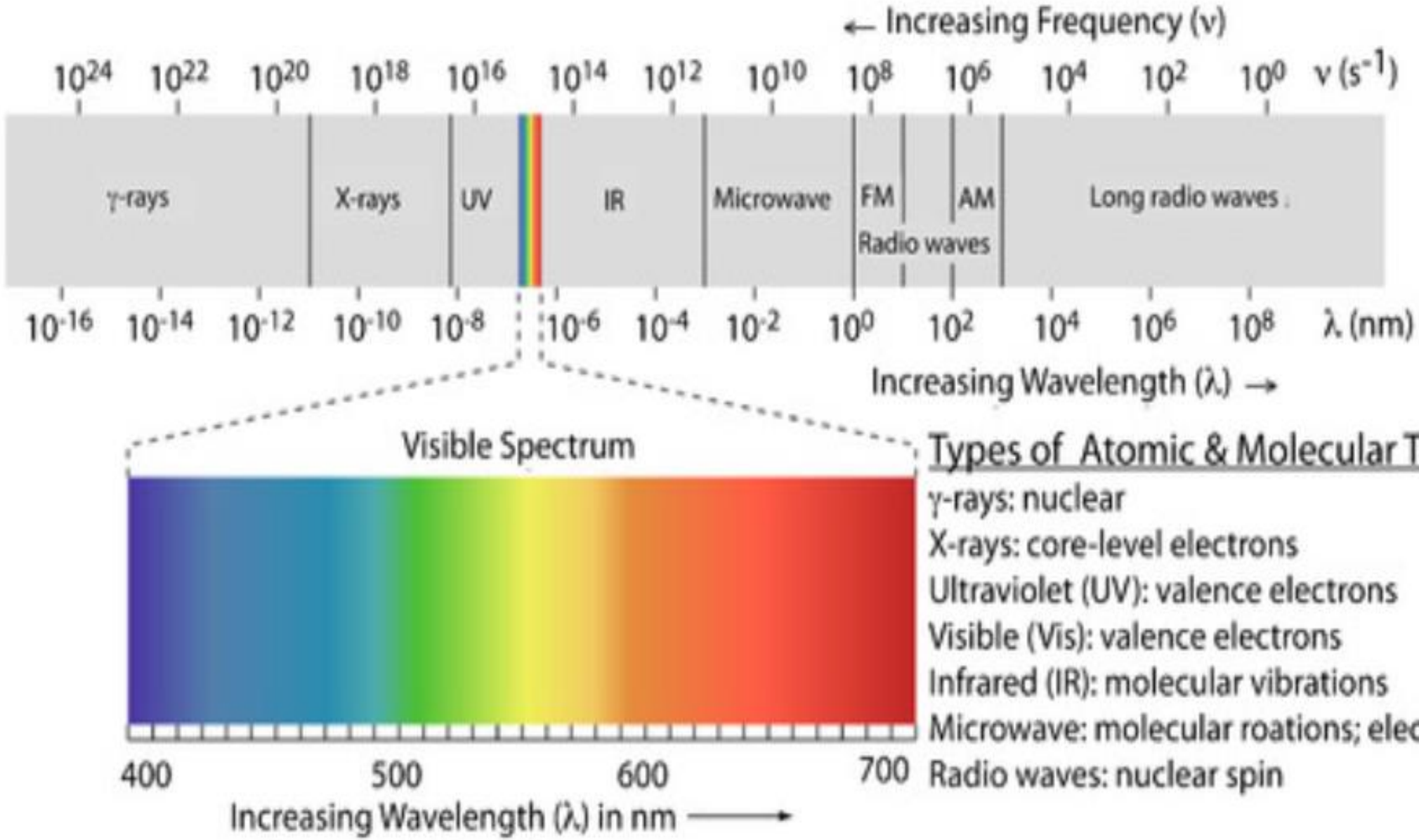
$\Delta E = h\upsilon$ E=energy, υ=frequency, h=Planck's constant ($h = 6.6 \cdot 10^{-27}$ erg sec)



LIGHT ELECTROMAGNETIC SPECTRUM ELECTROMAGNETIC RADIATION, LIGHT, ANGLE




The Electromagnetic Spectrum
Visible
X-Rays
Microwave
UV
IR
Gamma Rays
Radio
Wavelength
meters
10^{-13} 10^{-11} 10^{-9} 10^{-7} 10^{-5} 10^{-3} 10^{-1} 10
cm
10^{-11} 10^{-9} 10^{-7} 10^{-5} 10^{-3} 10^{-1} 10 10^{3}
nm
10^{-4} 10^{-2} 10^{0} 10^{2} 10^{4} 10^{6} 10^{8} 10^{10}
Frequency Hz
10^{21} 10^{19} 10^{17} 10^{15} 10^{13} 10^{11} 10^{9} 10^{7}
Energy kcal
10^{8} 10^{6} 10^{4} 10^{2} 10^{0} 10^{-2} 10^{-4} 10^{-6}


← Increasing Frequency (ν)
10^{24} 10^{22} 10^{20} 10^{18} 10^{16} 10^{14} 10^{12} 10^{10} 10^{8} 10^{6} 10^{4} 10^{2} 10^{0} ν (s^{-1})
γ-rays
X-rays
UV
IR
Microwave
FM
AM
Radio waves
Long radio waves
10^{-16} 10^{-14} 10^{-12} 10^{-10} 10^{-8} 10^{-6} 10^{-4} 10^{-2} 10^{0} 10^{2} 10^{4} 10^{6} 10^{8} λ (nm)
Increasing Wavelength (λ) →
Visible Spectrum
400
500
600
700
Increasing Wavelength (λ) in nm ⟶
Types of Atomic & Molecular Transitions
γ-rays: nuclear
X-rays: core-level electrons
Ultraviolet (UV): valence electrons
Visible (Vis): valence electrons
Infrared (IR): molecular vibrations
Microwave: molecular roations; electron spin
Radio waves: nuclear spin

- Spektrum radiasi elektromagnetik penuh terus menerus dan setiap wilayah bergabung perlahan ke wilayah berikutnya. Untuk tujuan spektroskopi, kami memilih untuk mengkarakterisasi cahaya di daerah ultraviolet dan tampak dalam bentuk panjang gelombang yang dinyatakan dalam nanometer. Satuan lain yang mungkin ditemui, tetapi penggunaannya sekarang tidak disarankan, adalah Angstrom (Å) dan milimikron (mμ).
- 1nm = 1mμ = 10Å = 10-9 meters
- Sifat lain juga berguna untuk mengkarakterisasi perilaku gelombang radiasi elektromagnetik. Panjang gelombang, , didefinisikan sebagai jarak antara maksima yang berurutan. Untuk ultraviolet dan radiasi elektromagnetik tampak panjang gelombang biasanya dinyatakan dalam nanometer (1 nm = 10-9 m), dan untuk radiasi inframerah diberikan dalam mikron (1 m = 10-6 m). Hubungan antara panjang gelombang dan frekuensi
- beberapa sifat karakteristik radiasi elektromagnetik, termasuk energi, kecepatan, amplitudo, frekuensi, sudut fasa, polarisasi, dan arah propagasi. Pengukuran spektroskopi hanya dimungkinkan jika interaksi foton dengan sampel menyebabkan perubahan pada satu atau lebih sifat karakteristik ini.

ELECTRONIC TRANSITIONS

- Menurut teori orbital molekul, eksitasi molekul dengan penyerapan radiasi di daerah UV-tampak melibatkan promosi elektronnya dari orbital ikatan, atau nonikatan (n) ke orbital antiikatan.
- . Ada empat kemungkinan transisi: n → π*, π → π*, n → σ*, σ → σ*
- Ada orbital ikatan dan yang berasosiasi dengan σ* and π * orbital anti ikatan, masing-masing.
- Orbital non-ikatan (n atau p) tidak berasosiasi dengan orbital anti ikatan karena elektron non-ikatan atau pasangan elektron bebas yang ada di dalamnya tidak terbentuk obligasi.
- Transisi elektronik berikut terlibat di wilayah UV-terlihat

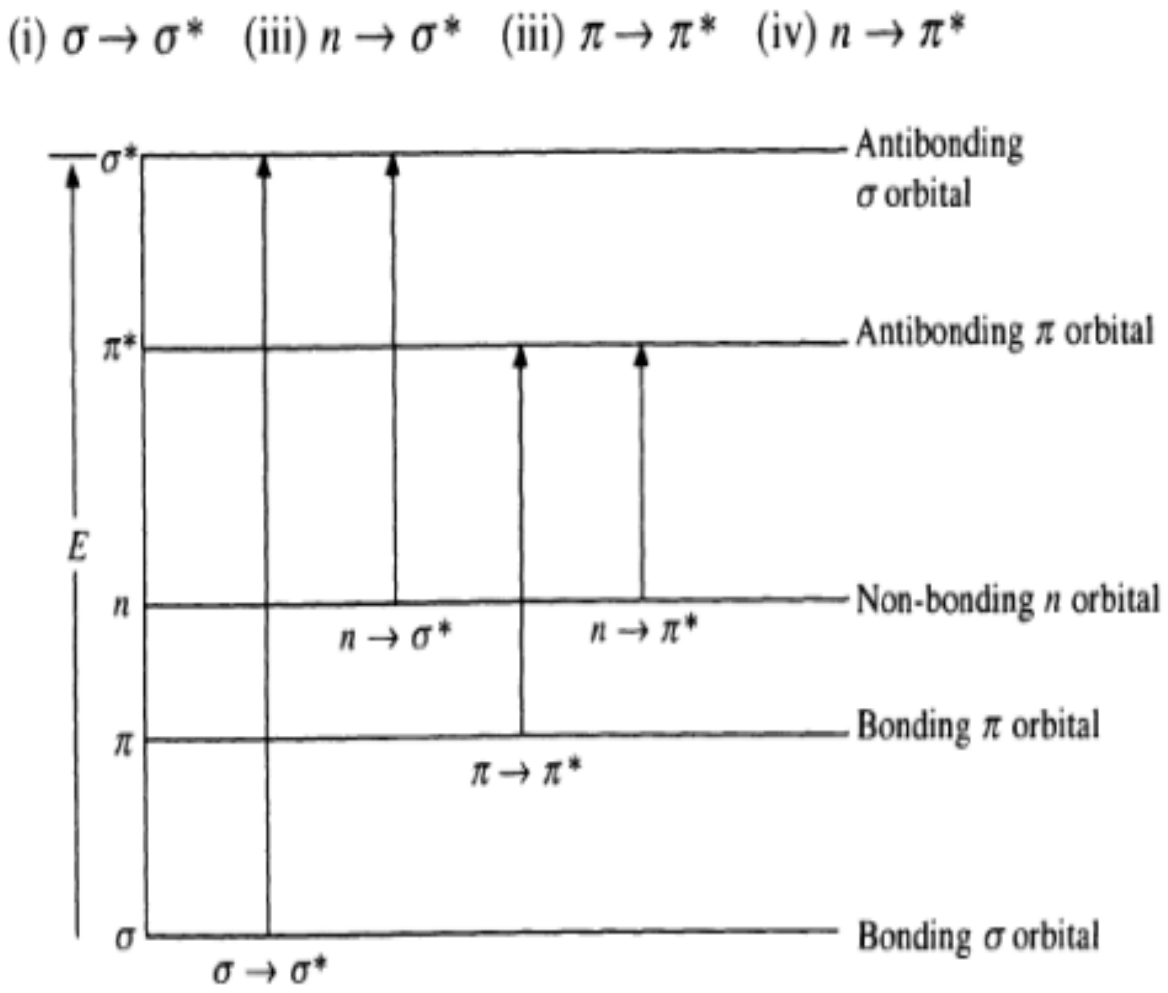


Fig. 2.2 Relative energies of electronic transitions

SPEKTROSKOPI UV-VIS

- Spektroskopi UV-Vis adalah teknik analisis yang mengukur jumlah panjang gelombang untuk mendapatkan spektrum absorbansi suatu senyawa diskrit dari UV atau cahaya tampak yang diserap oleh atau ditransmisikan melalui sampel dalam larutan atau sebagai padatan dibandingkan dengan referensi atau sampel kosong
- Teknik spektroskopi ini bergantung pada penggunaan cahaya
- spektroskopi adalah serapan energi cahaya atau radiasi elektromagnetik, yang mengeksitasi elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi singlet pertama dari senyawa atau bahan
- Cahaya memiliki sejumlah energi yang berbanding terbalik dengan panjang gelombangnya, panjang gelombang cahaya yang lebih pendek membawa lebih banyak energi dan panjang gelombang yang lebih panjang membawa lebih sedikit energi.
- Manusia dapat melihat spektrum cahaya tampak, dari kira-kira 380 nm, yang kita lihat sebagai ungu, hingga 780 nm, yang kita lihat sebagai merah.
- Sinar UV memiliki panjang gelombang lebih pendek dari cahaya tampak hingga sekitar 100 nm.

- Spektrometer ultraviolet dan terlihat telah digunakan secara umum selama 35 tahun terakhir dan selama periode ini telah menjadi instrumen analisis yang paling penting di laboratorium modern.
- Dalam banyak aplikasi, teknik lain dapat digunakan tetapi tidak ada yang menandingi spektrometri UV-Visible karena kesederhanaan, keserbagunaan, kecepatan, akurasi, dan efektivitas biayanya.
- Spektrum tampak hanya merupakan bagian kecil dari spektrum radiasi total.
- Sebagian besar radiasi yang mengelilingi kita tidak dapat dilihat, tetapi dapat dideteksi oleh instrumen penginderaan khusus.
- Spektrum elektromagnetik ini berkisar dari panjang gelombang yang sangat pendek (termasuk gamma dan sinar-x) hingga panjang gelombang yang sangat panjang (termasuk gelombang mikro dan gelombang radio siaran).

SPEKTROFOTOMETER UV-VIS PADA UMUMNYA DIGUNAKAN UNTUK :

1. Menentukan jenis kromofor, ikatan rangkap yang terkonyugasi dan auksokrom dari suatu senyawa organik
2. Menjelaskan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa
3. Mampu menganalisis senyawa organik secara kuantitatif dengan menggunakan hukum Lambert-Beer.

TRANSMITTANCE AND ABSORBANCE

$$T = \frac{I}{I_0} = A = -\log(T)$$

- Detektor dalam spektrofotometer UV/VIS mengukur intensitas cahaya setelah melewati larutan sampel.
- I : intensitas cahaya setelah melewati sampel
- I0 : intensitas cahaya awal

CONTOH SOAL

Suatu senyawa mempunyai serapan maksimum pada 235 nm dengan 20% cahaya yang dapat dilewatkan atau ditransmisikan oleh senyawa ini. Diketahui bahwa senyawa ini mempunyai konsentrasi 2.0 x10-4 molar dengan ketebalan sel 1 cm. Berapa koefisien ekstingsi molar senyawa ini pada λ 235?

- Jawab
- Dik T = 20% = 0.2 A = -log T = -log 0.20 = 0.7

  b = 1

  c = 2.0 x10-4 molar

A = -log T = ε . b . c

0.7 = ε. 1. 2.0 x10-4

ε = 0.7 /(2.0 x10-4)

ε = 3.5 x 103

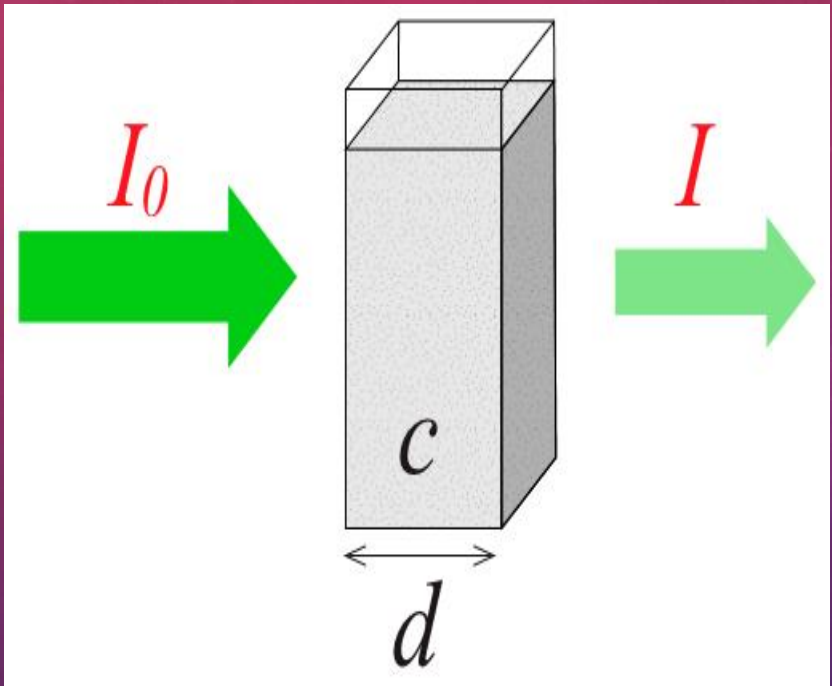
CONTOH SOAL 2

Nilai εmaks anilin pada λmaks 280 nm adalah 1430. Suatu larutan anilin di dalam air memberikan transmitan 30% dengan ketebalan sel 1 cm. Berapa milligram anilin yang dibutuhkan untuk menyiapkan 100 ml larutan ini?

- T = 30% = 0.3 A = -log T = -log 0.3 = 0.52
- b = 1
- ε = 1430 B
- M aniline = 93
- A = -log T = ε . b . c
- 0.52 = 1430. 1. c
- c = 0.52 / 1430 c = 3.6 x 10 -4mol//liter

- Jumlah anilin yang dibutuhkan untuk 1 liter pelarut adalah 3.6 x 10 –4 x 93 = 0.034 gram
- untuk 100 ml dibutuhkan
- 0.1 x 0.034 gram = 0.0034 gram = 3.4 mg

LAMBERT-BEER LAW



- Daerah energi UV-vis untuk spektrum elektromagnetik mencakup 1,5 - 6,2 eV yang berhubungan dengan rentang panjang gelombang 800 - 200 nm.
- Hukum Beer-Lambert, adalah prinsip di balik spektroskopi absorbansi.
- $A = \varepsilon bc$
- Untuk panjang gelombang tunggal,
- A : adalah absorbansi
- ε : absorptivitas molar senyawa atau molekul dalam larutan (M-1cm-1),
- b : panjang lintasan kuvet atau pemegang sampel (biasanya 1 cm),
- c adalah konsentrasi larutan (M).

SKEMA KERJA SPEKTROFOTOMETER UV VIS

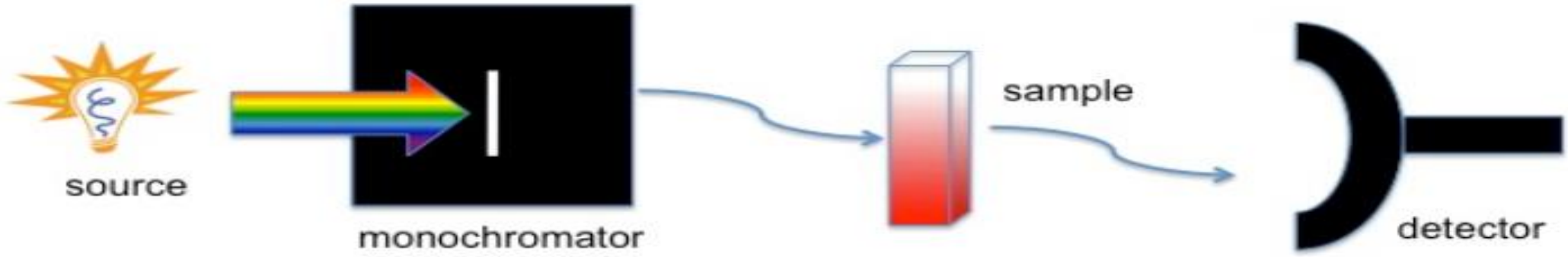
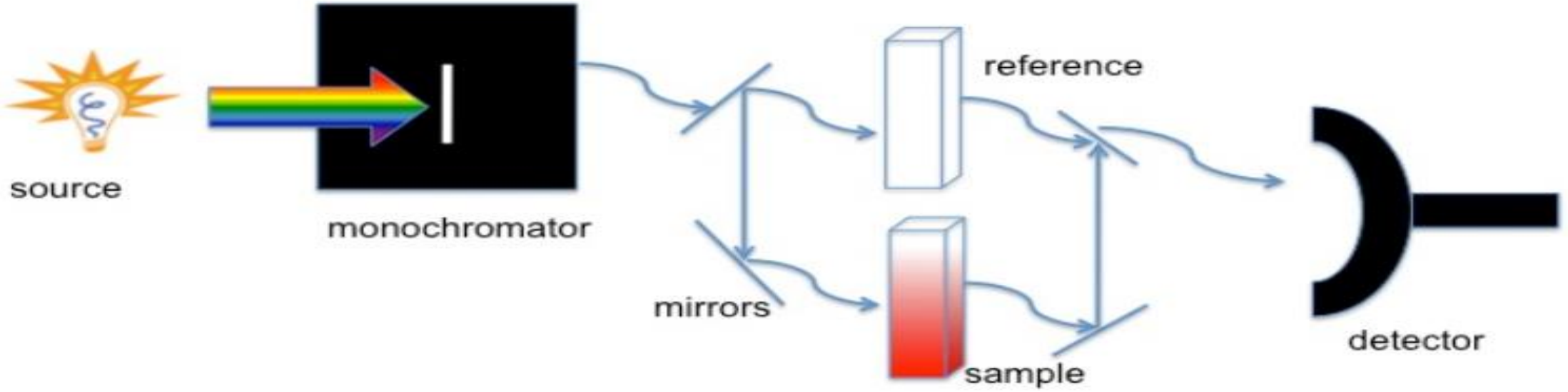


Figure 4.4.1 Illustration of a single beam UV-vis instrument.



BEBERAPA ISTILAH PENTING

- Kromofor; merupakan gugus tak jenuh (pada ikatan kovalen) yang bertanggung jawab terhadap terjadinya absorbsi elektronik (misalnya C=C, C=O, dan NO2).
- Auksokrom; merupakan gugus jenuh dengan adanya elektron bebas (tidak terikat), dimana jika gugus ini bergabung dengan kromofor, akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas absorban.
- Pergeseran Batokromik; merupakan pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih panjang karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- Pergeseran Hipsokromik; merupakan pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih pendek karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- Efek Hiperkromik; merupakan peningkatan intensitas absorban.
- Efek Hipokromik; merupakan penurunan intensitas absorban

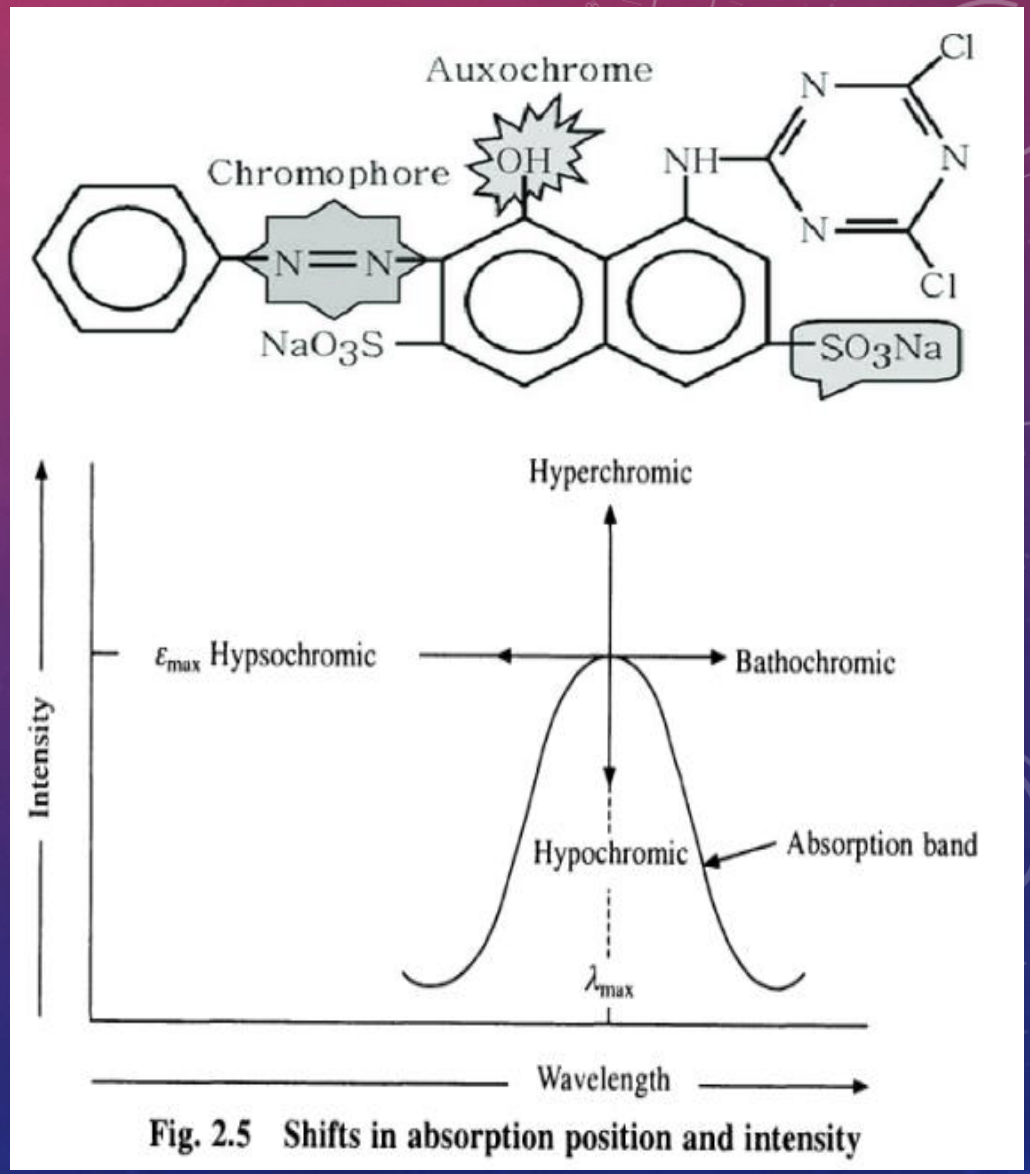


Fig. 2.5 Shifts in absorption position and intensity

LIMITASI DARI HUKUM LAMBERT-BEER

- Deviasi koefisien ekstingsi pada konsentrasi tinggi (>0.01M), yang disebabkan oleh interaksi elektrostatik antara molekul karena jaraknya yang terlalu dekat
- Hamburan cahaya karena adanya partikel dalam sampel
- Fluoresensi atau fosforesensi sampel
- Berubahnya indeks bias pada konsentrasi yang tinggi
- Pergeseran kesetimbangan kimia sebagai fungsi dari konsentrasi
- Radiasi non-monokromatik; deviasi bisa dikurangi dengan menggunakan bagian yang datar pada absorban yaitu pada panjang gelombang maksimum.
- Kehilangan cahaya

- Absorbansi tergantung pada:

a. panjang gelombang

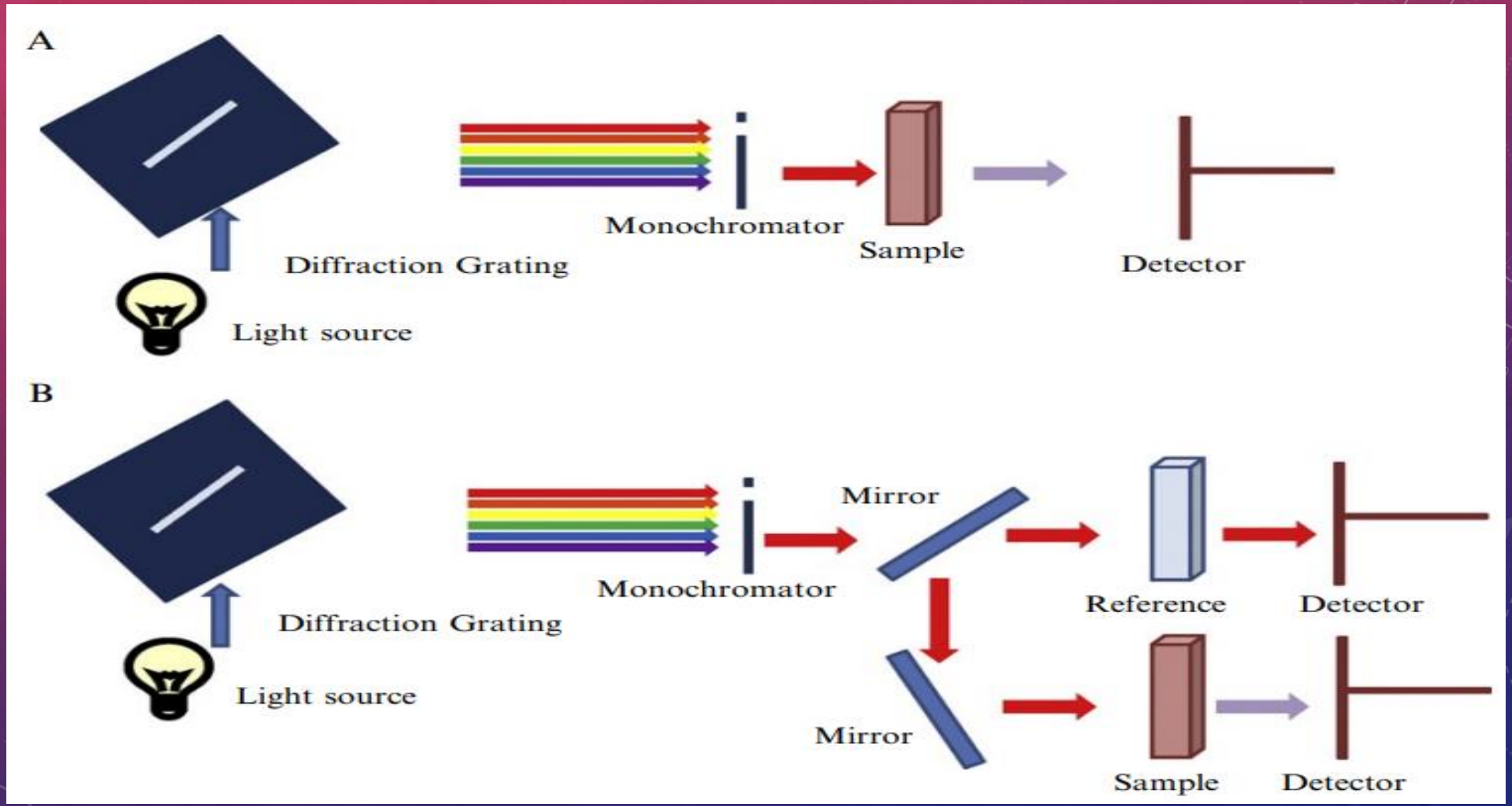
b. Pelarut

c. pH bila zat tersebut bersifat asam atau basa

d. Suhu (dalam batas yang relatif kecil).

JENIS SPEKTROFOTOMETER UV-VIS

- Spektrofotometer sinar tunggal: Sinar ganda membandingkan intensitas cahaya antara dua jalur cahaya, jalur pertama berisi sampel dan jalur kedua memegang kendali. Mereka dikendalikan komputer dengan koreksi dasar, sehingga lebih mudah dan lebih stabil.
- Spektrofotometer berkas ganda: Sinar tunggal mengukur intensitas cahaya relatif berkas sebelum dan setelah sampel dimasukkan. Mereka memiliki rentang dinamis yang lebih besar, optik lebih sederhana dan lebih kompak.

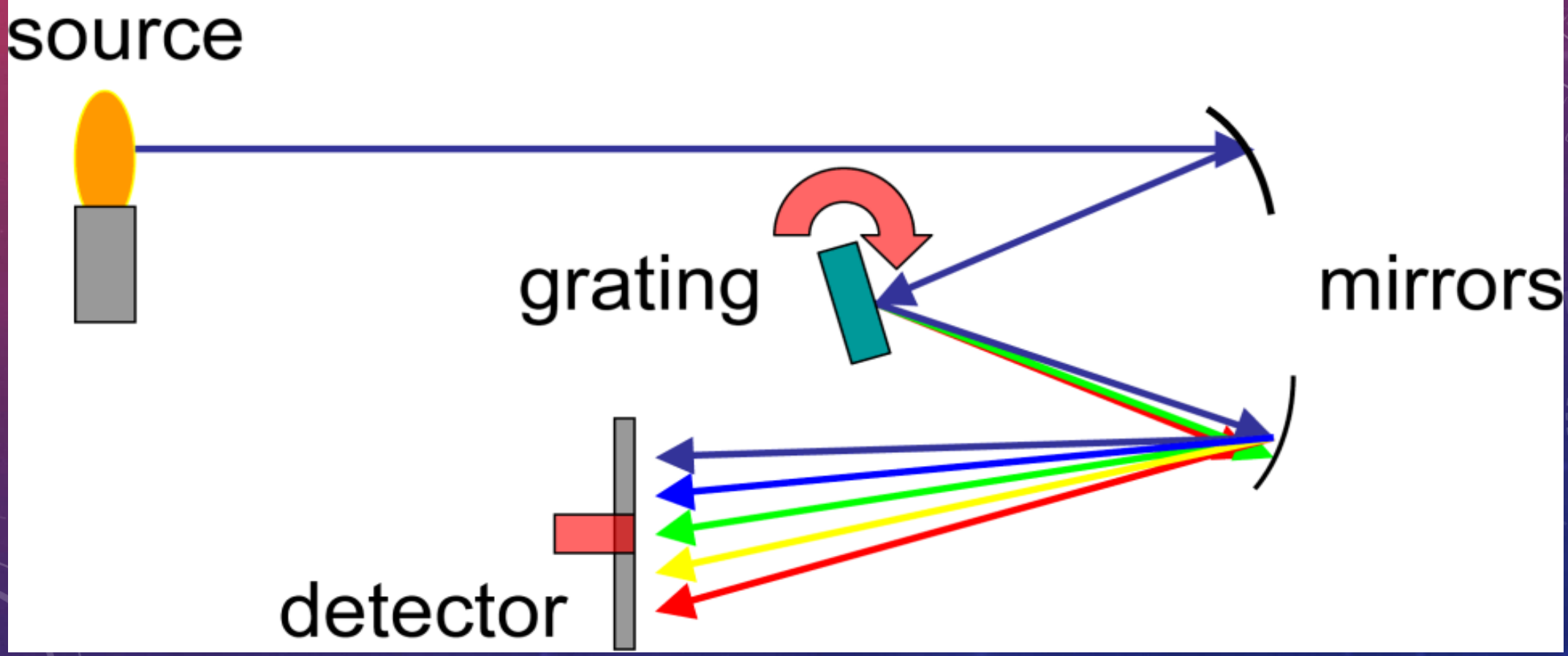

A
Diffraction Grating
Light source
Monochromator
Sample
Detector
B
Diffraction Grating
Light source
Monochromator
Mirror
Reference
Detector
Mirror
Sample
Detector

Wavelength range (nm)[a]	Apparent color	Absorbed color
400–465	Violet	Yellow–green
465–482	Blue	Yellow
482–487	Greenish-blue	Orange
487–493	Blue–green	Red–orange
493–498	Bluish-green	Red
498–530	Green	Red–purple
530–559	Yellowish-green	Reddish-purple
559–571	Yellow–green	Purple
571–576	Greenish-yellow	Violet
576–580	Yellow	Blue
580–587	Yellowish-orange	Blue
587–597	Orange	Greenish-blue
597–617	Reddish-orange	Blue–green
617–780	Red	Blue–green

INSTRUMEN

1. Sumber cahaya adalah bohlam filamen tungsten untuk bagian spektrum yang terlihat dan bohlam deuterium untuk bagian spektrum UV.
2. monokromator ditempatkan di antara sumber cahaya dan sampel. Ini adalah sistem optik yang menghasilkan radiasi dengan panjang gelombang tunggal.
3. Sampel yang dilarutkan dalam larutan yang sesuai diambil dalam sel sampel transparan yang disebut kuvet. Kaca borosilikat dan kuvet plastik biasa digunakan dalam rentang spektrum tampak (hingga 350 nm) karena mereka menyerap sinar UV.
4. Detektor yang digunakan dalam spektrofotometer adalah fotosel atau sel fotomultiplier. Fotosel mengubah kuanta radiasi menjadi energi listrik, yang kemudian diperkuat, dideteksi, dan direkam.

Monochromator



LIMITATIONS OF UV-VISIBLE SPECTROSCOPY

1. Sampel

Spektroskopi uV-vis bekerja dengan baik pada cairan dan larutan, tetapi jika sampel lebih merupakan suspensi partikel padat dalam cairan, sampel akan menyebarkan cahaya lebih banyak daripada menyerap cahaya dan data akan sangat miring.

2. Kalibrasi dan referensi

awal analisis pelarut yang akan digunakan (air, heksana, dll), dan jika analisis konsentrasi perlu dilakukan, larutan kalibrasi perlu dibuat secara akurat. larutan tidak dibuat dengan cukup akurat, konsentrasi sebenarnya dari sampel yang bersangkutan tidak akan ditentukan secara akurat.

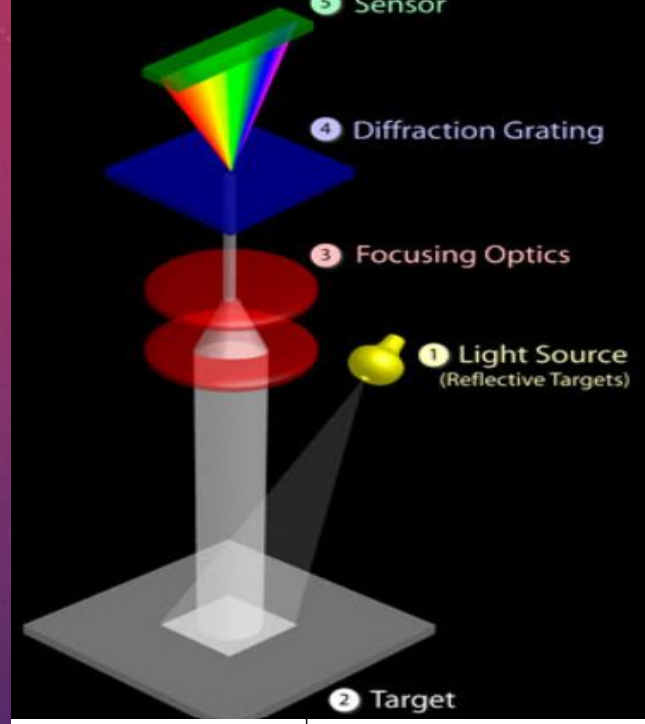
3. Bahan dari kuvet (tempat sampel) juga akan memiliki batas

absorbansi UV-vis.

Material	Wavelength range (nm)
Glass	380 - 780
Plastic	380 - 780
Fused quartz	below 380

4. Konsentrasi larutan

untuk mendapatkan data yang andal, puncak absorbansi senyawa tertentu harus setidaknya tiga kali lebih tinggi intensitasnya daripada kebisingan latar instrumen.



Solvent	UV absorbance cutoff (nm)
Acetone	329
Benzene	278
Dimethylformamide (DMF)	267
Ethanol	205
Toluene	285
Water	180

Element to Detect	Reagent Used	Color Formed at λ nm
Al	8-Hydroxyquinoline	Yellow—295
Bi	Thiourea	Yellow—295
Ca	Calcein	Yellow/green—520
Cl as Cl_2	*o*-Tolidine	Yellow—295
Co	Ammonium thiocyanate	Blue—620
Cr	Diphenylcarbazide	Red/violet—540
Cu	FerroZine	Brown—470
F as F^-	Cerous alizarin complexone	Wine red—512
Fe	1,10-Phenanthroline	Red—512
Fe	FerroZine	Red—562
Mg	*o*,*o*′-Dihydroxyazobenzene	Orange—485
Mn	Periodate	Purple—520
Mn	Thiothenoyltrifluoroacetone	Purple—450
Mo	Thiolactic acid	Yellow/brown—450
P as PO_4^{3-}	Molybdate, hydrazine	Blue—830
Pb	Dithiozone	Pink
S as SO_3^{2-}	Iodine	I_3
Ti	Hydrogen peroxide	Yellow—295
U	Arsenazo I or III	Violet/blue—640
Zn	Dithizone	Pink

APLIKASI

- Analisis kualitatif dilakukan di wilayah UV/Vis untuk mengidentifikasi kelas senyawa tertentu dalam keadaan murni maupun dalam campuran biologis.
- Kuantifikasi sampel biologis baik secara langsung atau melalui uji kolorimetri adalah yang paling umum. Protein dikuantifikasi secara langsung menggunakan kromofor intrinsik, tirosin, dan triptofannya.
- Spektroskopi perbedaan mendeteksi perubahan absorbansi kecil dalam sistem dengan absorbansi latar belakang yang tinggi. Perbedaan spektrum diperoleh dengan mengurangkan satu spektrum serapan dari yang lain. Aplikasi umum adalah penentuan jumlah asam amino aromatik yang terpapar pelarut, deteksi perubahan konformasi yang terjadi pada protein, deteksi asam amino aromatik di situs aktif enzim dan pemantauan reaksi yang melibatkan kromofor katalitik.
- Spektroskopi derivatif membedakan spektrum serapan absolut dari sampel dan memplot secara berbeda terhadap panjang gelombang. Aplikasi yang berhasil termasuk pengikatan antibodi monoklonal ke antigennya dengan turunan orde kedua dan kuantifikasi residu triptofan dan tirosin dalam protein dengan turunan orde keempat.
- Gangguan pelarut disebabkan oleh perubahan polaritas pelarut yang menyebabkan perubahan spektrum UV protein tanpa mengubah konformasinya. Ini digunakan untuk menyelidiki permukaan molekul protein.
- Tes biokimia dilakukan berdasarkan pemantauan terus menerus dari absorbansi sistem pada panjang gelombang tertentu selama percobaan. Ini digunakan untuk pengujian enzim dan analisis kinetik

TERIMA KASIH