



Optické metody

Katedra laboratorních metod LF MU

Mgr. Jana Gottwaldová

Optické analytické metody



- **Fyzikální metody**, které získávají potřebné informace z měření optických vlastností a spekter zkoumaných látek.
- využívá interakce analytu se světlem - **optických vlastností** molekul a atomů měřené soustavy
- může jít o změnu barvy či její intenzity, luminiscenci, fluorescenci, změnu optické otáčivosti nebo o změnu rozptylu světla při průchodu vzorkem



Spektrofotometrie x fotometrie

- Patří mezi nejpoužívanější optické metody v biochemii
- Stanovení vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky, na základe pohlcování světla určité vlnové délky se označuje jako **fotometrie**.
- Pokud se neměří jen při jedné vlnové délce, ale hodnotí se určitý úsek spektra, mluvíme o **spektrofotometrii**.



Spektrofotometrie-rozdělení

Podle frekvence elektromagnetického záření:

UV spektr. – zahrnuje oblast záření $\lambda=190-400$ nm

VIS spektr. – oblast viditelného záření $\lambda=400-800$ nm

IČ spektr. – oblast IČ spekter se dělí na blízkou IČ $\lambda=800-2000$ nm, dalekou IČ $\lambda=10^5$ nm

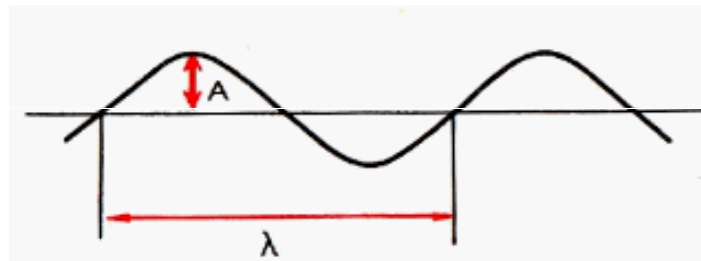
Spektrofotometrie-rozdělení

**Podle typu interakce
elektromagnetického záření:**

- absorpční spektrofotometrii
- emisní spektrofotometrii
- Turbidimetrii, nefelometrii
- Luminiscenční metody:
fluorimetrie, fosforescence, chemiluminiscence

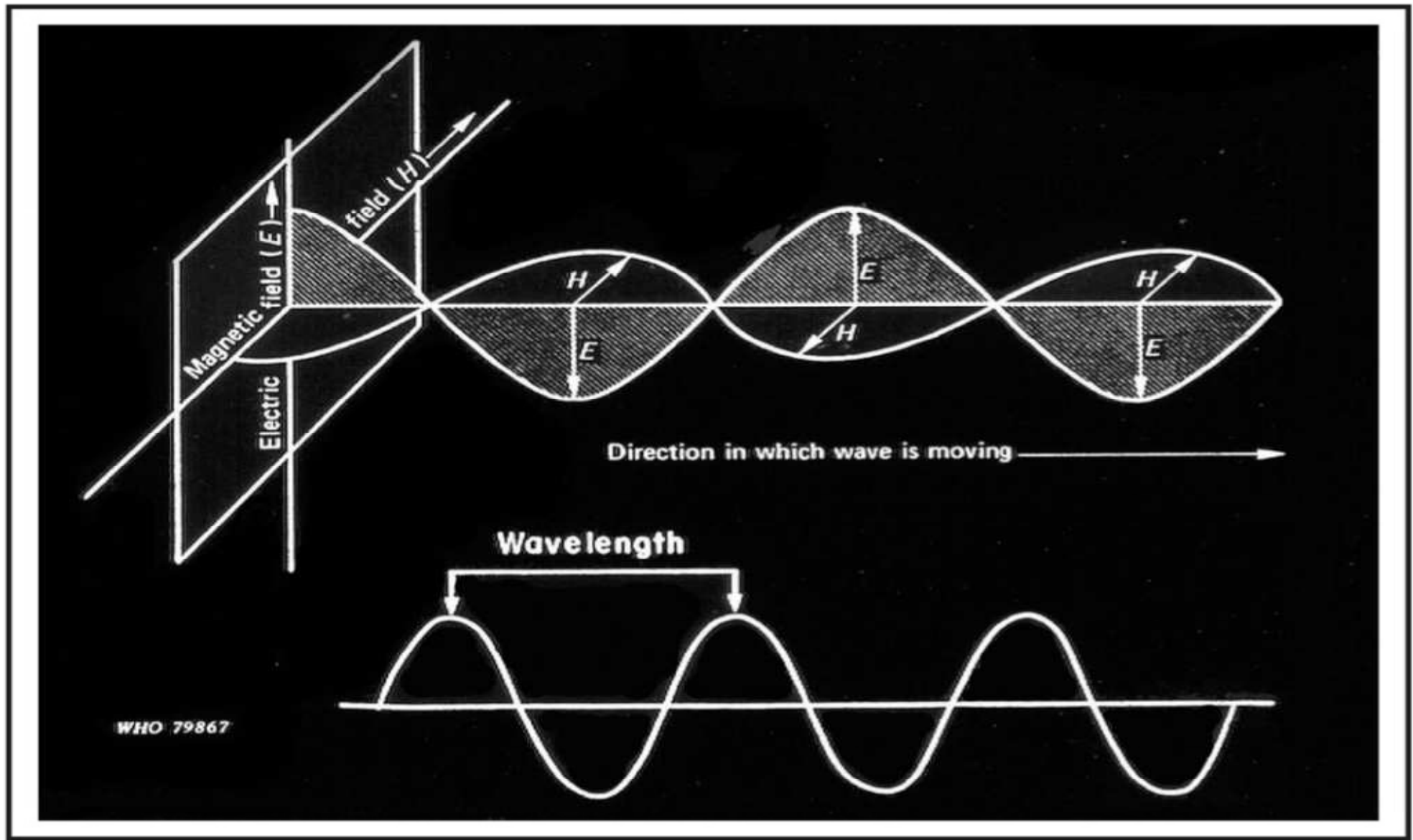
Optické metody

- jsou založeny na výměně energie mezi látkou a zářením
- Světlo je druhem elektromagnetického záření
- **Vlastnosti elektromagnetického záření** - má duální charakter



- Složku magnetickou a elektrickou
- Vzdálenost mezi dvěma vrcholy vln se nazývá vlnová délka- λ , udává se v nm

Elektromagnetické záření



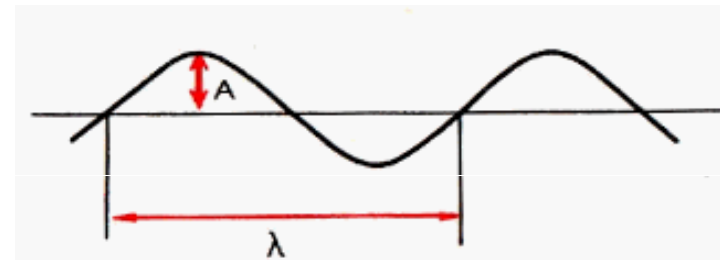
Popisující veličiny elektromagnetického záření

- rychlost – c (m/s), ve vakuu 3×10^8 m/s

- vlnová délka - λ (nm)

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

- Frekvence světelných vln (=počet vln za sekundu) - ν (Hz, s⁻¹)



Popisující veličiny elektromagnetického záření

- energie fotonu světelného záření ε
- Energie fotonu je přímo úměrná jeho kmitočtu, h je Planckova konstanta ($6,625 \times 10^{-34}$ J/s)

$$\varepsilon = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

- Energie fotonu je nepřímo úměrná vlnové délce tzn. že světelné záření o kratší vlnové délce má vyšší energii, než světlo s delší vlnovou délkou

Elektromagnetické záření

- Světlo v UV a VIS oblasti má kmitočet (počet vln za s) 10^{14} - 10^{15} Hz
- **Monochromatické** - světlo, které se skládá pouze z jedné vlnové délky
- **Polychromatické** – skládá se z mnoha vlnových délek (sluneční světlo, světlo wolframové žárovky)

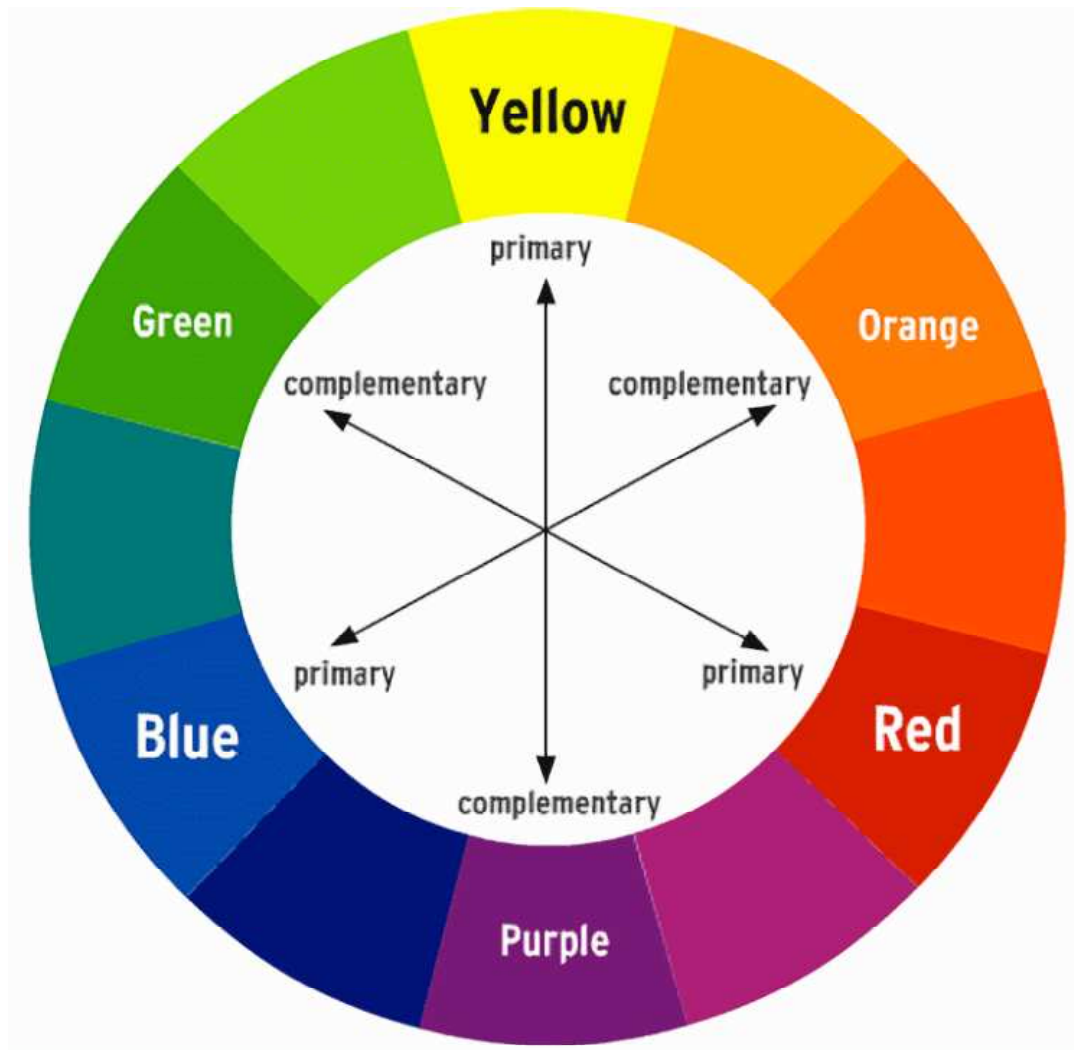
Barevnost látek

- Pokud absorbované záření má λ ležící v oblasti viditelné části spektra, látka se jeví lidskému oku jako **barevná**
- Má vždy barvu doplňkovou k barvě absorbovaného světla

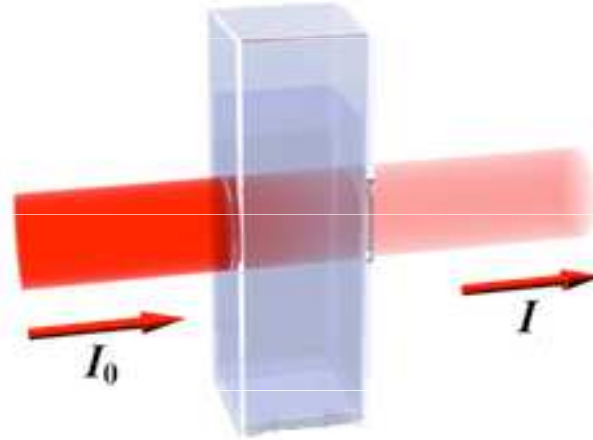
Barevnost látek

Absorbovaná vlnová délka (nm)	Barva absorbovaného světla	Barva látky
400–435	fialová	žlutozelená
435–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červená
500–560	zelená	purpurová
560–580	žlutozelená	fialová
580–595	žlutá	modrá
595–605	oranžová	zelenomodrá
605–670	červená	modrozelená

Barevnost látek



Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii



Propustnost (transmittance):

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

Množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem

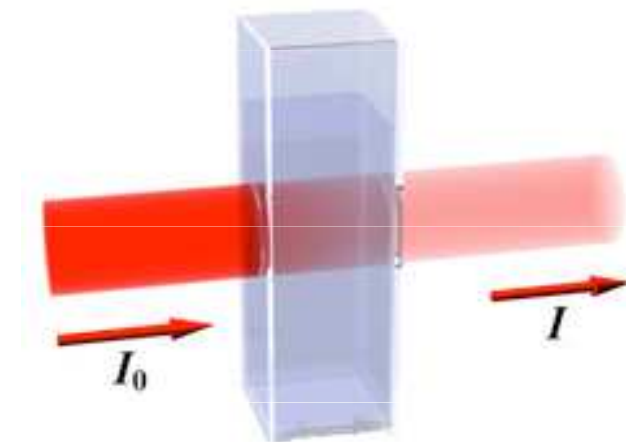
Kde I_0 je intenzita světla vstupujícího do vzorku a I je intenzita světla ze vzorku vystupujícího

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

- **Absorbance:**

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

Bezrozměrná veličina, definovaná na základě transmittance, udává jaké množství světla bylo pohlceno vzorkem.



Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

Zákon Lambertův-Beerův:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon l c}$$

Intenzita světelného záření procházející absorbujičím prostředím klesá exponenciálně v závislosti na délce absorbujičící vrstvy a koncentraci absorbujičící látky

(Johan Heinrich Lambert, 1728-1777)

Zákon Lambertův-Beerův

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

- absorbance při dané vlnové délce přímo úměrná tloušťce absorbující vrstvy l
- koncentraci absorbujících částic ve vrstvě c
- Konstanta úměrnosti pro danou látku a danou vlnovou délku absorbovaného záření je molární absorpční koeficient ε_{λ}

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

- molární absorpční koeficient ϵ_{λ} : fyzikální konstanta, která udává jak daná látka při určité koncentraci absorbuje monochromatické záření určité vlnové délky
- Takto lze zjistit koncentraci látek barevných, nebo látek absorbujících světlo v UV oblasti
- Pokud látka v těchto oblastech neabsorbuje, je třeba ji převést na látku, která absorbuje více
- Vztah mezi signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje **kalibrací**

Kalibrační závislost

Praktické využití Lambertova-Beerova zákona

Provedení:

- změříme obvykle 5 standardních roztoků o známé vrůstající koncentraci při určité vlnové délce
- všechny roztoky se měří za stejných experimentálních podmínek (spektrometr, kyveta, pipety, doba inkubace..)
- blank = slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky

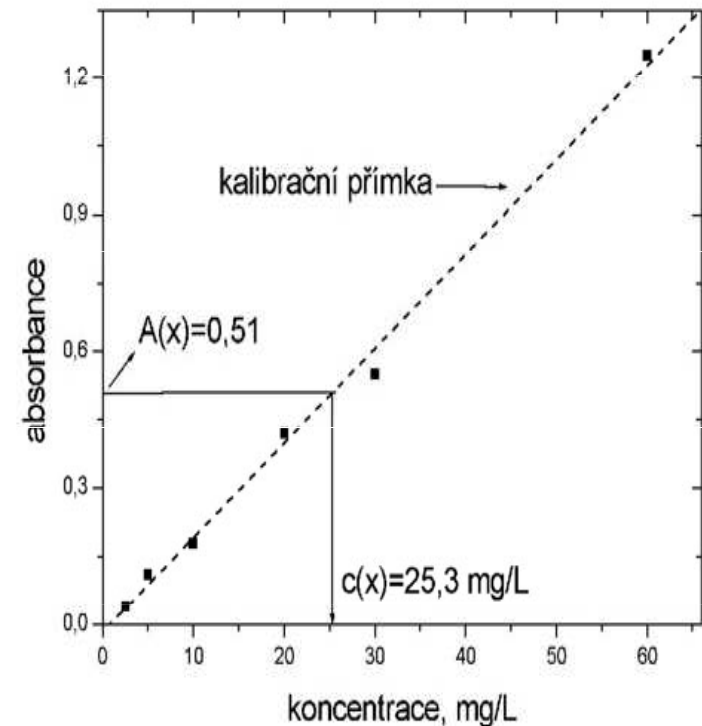
Kalibrační závislost

Sestrojení kalibrační křivky

- naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y
- hodnoty koncentrace na ose x

Pokud je závislost lineární, je možné změřit absorbanci a vypočítat koncentraci neznámého vzorku :

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times C_{st}$$

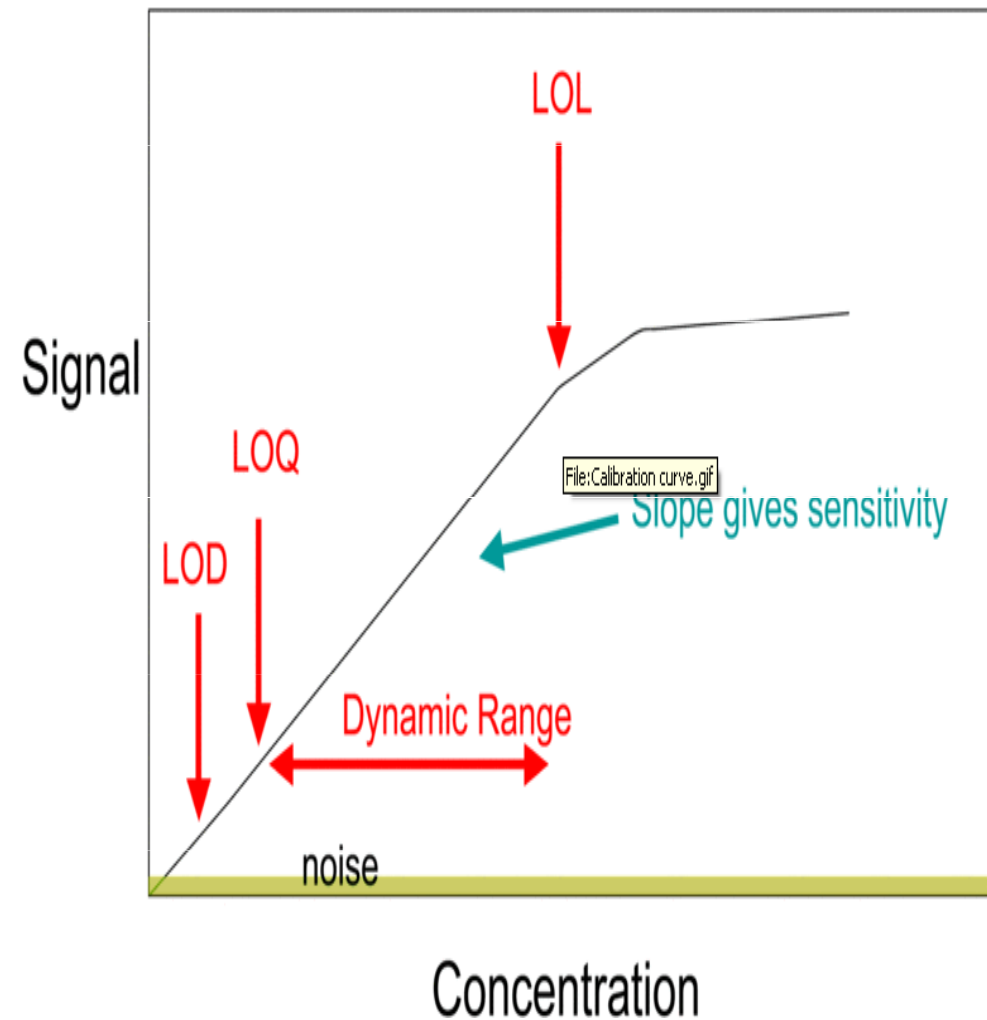


Obr.4 Kalibrační křivka (x = neznámý vzorek, A = absorbance, c = koncentrace)

Kalibrační závislost

Vzhledem k tomu, že poměr c_{st}/A_{st} je pro měřenou sérii konstantní používáme ho pro změřenou sérii jako **kalibrační faktor**, kterým vynásobíme naměřené hodnoty absorbance vzorků o neznáme koncentraci

LOD-dolní mez detekce
LOL- horní mez detekce
LOQ-mez stanovitelnosti



Limitace Lambertova-Beerova zákona

- Odchylka ϵ_λ při vysokých koncentracích ($>0,01$ mol/l) vlivem elektrostatických interakcí
 - Částečný rozptyl světla na částicích přítomných ve vzorku
 - Fluorescence nebo fosforescence vzorku
 - Nedokonale monochromatické záření
 - Nekoherentní světelné záření
- Nejpřesnější výsledky jsou získávány v rozsahu absorbancí 0,2-0,7 . Od hodnot absorbance $>$ výrazně narůstá chyba měření

Spektrofotometrie-rozdělení

Podle typu interakce

elektromagnetického záření:

- absorpční spektrofotometrii
- emisní spektrofotometrii
- Turbidimetrii, nefelometrii
- Luminiscenční metody:
fluorimetrie, fosforescence, chemiluminiscence



Absorpční spektrofotometrie

- zabývá kvantitativním hodnocením změny intenzity záření (obvykle určité vlnové délky) po průchodu analytickým prostředím. Při průchodu elektromagnetického záření z oblasti UV nebo VIS části spektra měřeným roztokem dochází k absorpci záření.
- Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti spektra se nazývají **fotometry** nebo **spektrofotometry**.

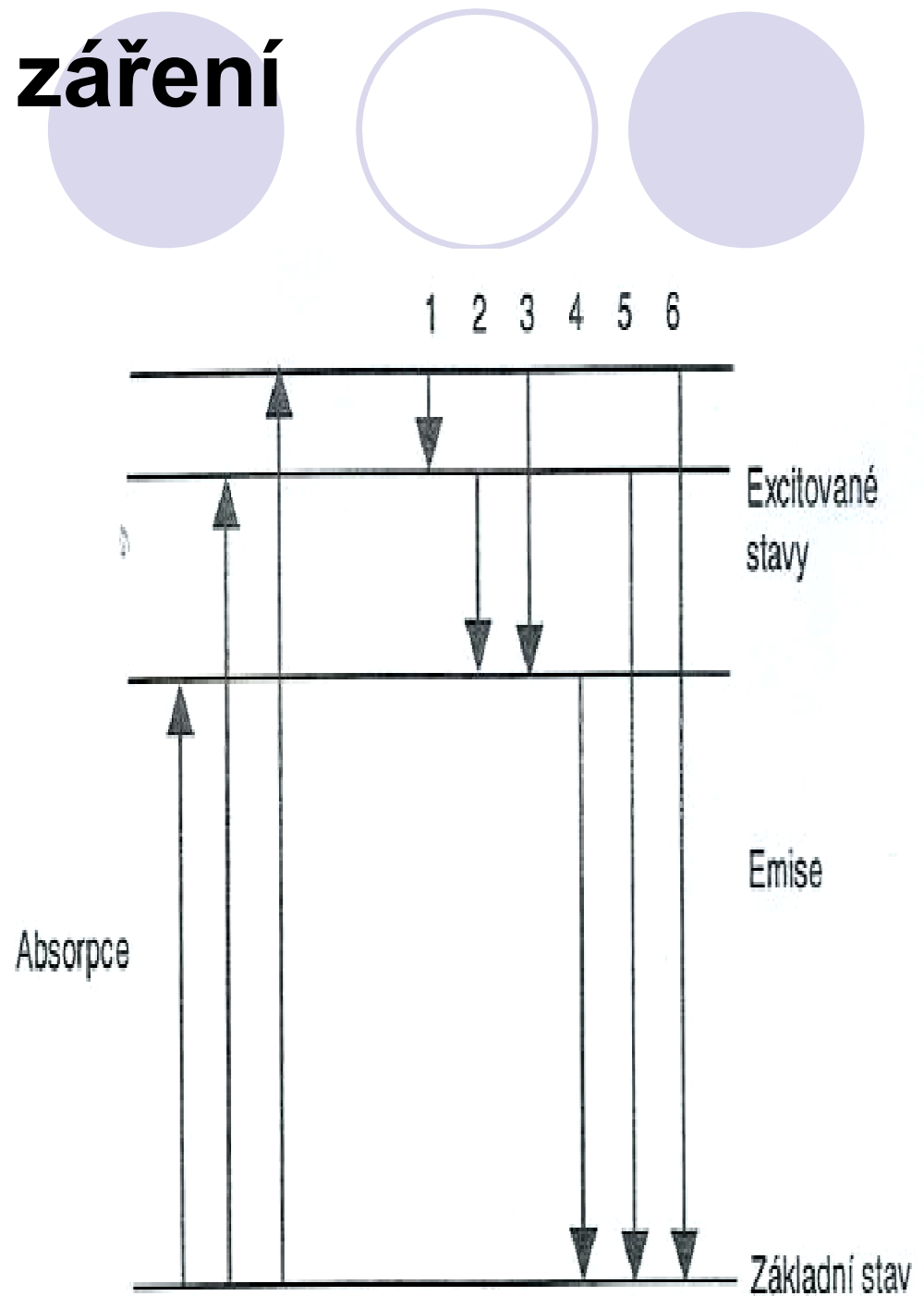
Emisní spektrofotometrie



- Při této technice se měří emise záření. K emisi záření charakteristické vlnové délky dochází při návratu elektronů z excitovaného stavu (vyvolaného plamenem) do základního stavu.
- Přístroje, které se používají k měření intenzity emisního záření, se nazývají emisní spektrofotometry

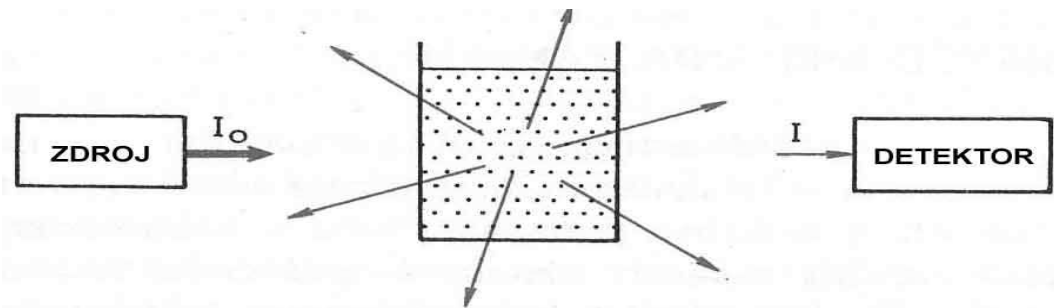
Absorpce vs. emise záření

- Emise záření: Dodáním energie (např. kinetické, tepelné) jsou částice látka (složky studovaného vzorku) převedeny do vyššího energetického stavu. Při zpětném přechodu se energie vyzáří ve formě fotonu.
- Absorpce záření: Částice látky absorbuje foton a přejde přitom do vyššího energetického stavu. (Návrat zpět do energeticky nižšího stavu již není sledován.)



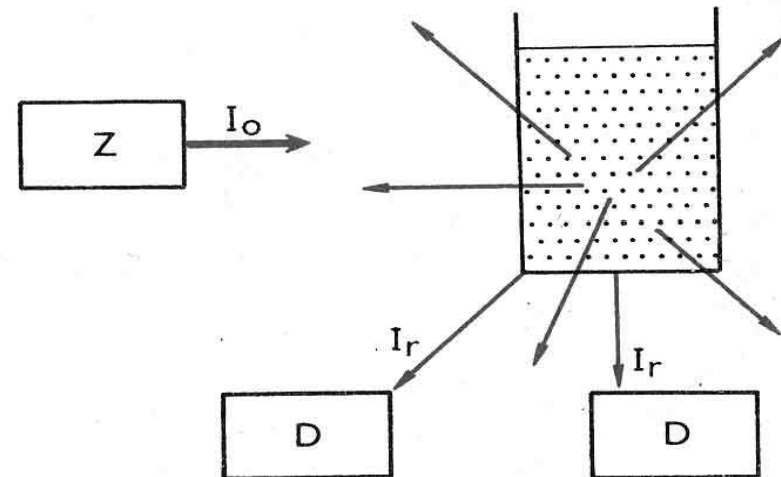
Turbidimetrie

- Optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného **rozptylem na částicích**
- V klinické biochemii je celá řada metod založených na měření stupně zákalu - turbidity - a nejvýznamnější z nich je soubor imunochemických metod, které využívají **precipitační reakce mezi antigenem a protilátkou**
- záření po průchodu nehomogenním prostředím, tj. koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou se měří **absorpčními fotometry a spektrofotometry**



Nefelometrie

- zabývá se měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry a měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření.
- Pro tyto účely slouží buď nefelometrický nástavec k fotometru, u nichž se difúzně rozptýlené světlo sleduje pod úhlem 90° , nebo jsou vyvinuty speciální přístroje - nefelometry



Luminisceční metody: fluorimetrie

- Při fluorimetrických stanoveních se využívá jevu, kdy v některých látkách po ozáření dostatečně energetickým zdrojem světla (excitační záření) vzniká **fotoluminiscence**.
- Přístroje, které se používají k měření intenzity emisního záření se nazývají fluorimetry

Luminisceční metody - chemiluminiscence



- Liší se od ostatních luminiscenčních jevů tím, že excitace fotonů je vyvolána chemickou reakcí. Přitom se však uvolněná energie nesmí uvolnit jako teplo. Některé látky dokáží část energie vyzářit ve formě fotonu přímo, což se projeví krátkým světelným zábleskem, v ostatních případech je nutné přidat do soustavy další látku, na kterou se energie přenese a která pak (zpravidla řadu sekund až minut) emituje světlo.
- Muže jít o syntetické luminofoxy nebo o přírodní enzym luciferázu světlušek – pak se mluví o **bioluminiscenci**.
- Luminimetrické metody bývají poměrně citlivé. Luminimetry jsou principiálně podobné emisní spektrofotometrii

Spektrofotometry

- Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti spektra
- Slouží pro měření absorpce světla vzorkem
- Absorbance je měřena při různých vlnových délkách

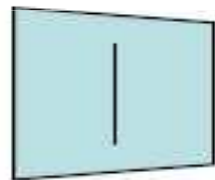


Uspořádání spektrofotometru

- **Zdroj světla**
- **Optický systém:** štěrbinu, zrcadla, čočky
- **Monochromátor nebo filtr:** k výběru určité vlnové délky
- **Absorpční prostředí:** kyveta s měřeným vzorkem
- **Detekční systém:** zařízení k měření světelného záření, které prošlo vzorkem



zdroj



štěrbina



výběr vlnové délky



vzorek



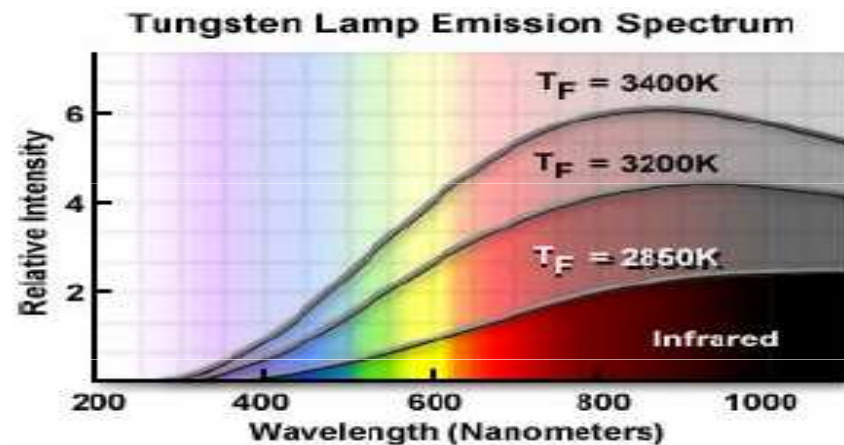
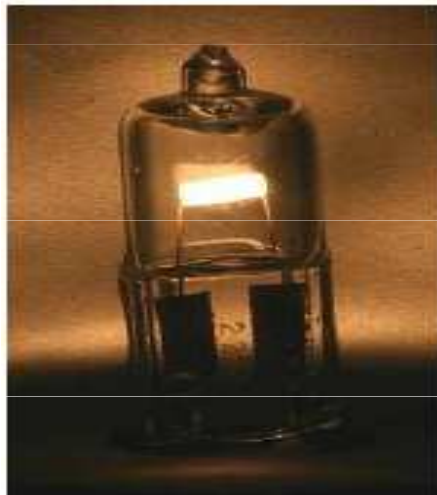
detektor

Zdroje záření a jejich použití

- **Wolframová žárovka** – měření absorpce ve viditelném spektru
- **Deuteriová (vodíková) výbojka** - měření absorpce v UV spektru
- **Xenonová výbojka**- měření absorpce v oblasti VIS UV spektru
- **Rtuťová výbojka** – měření v oblasti spektra 200-400 nm

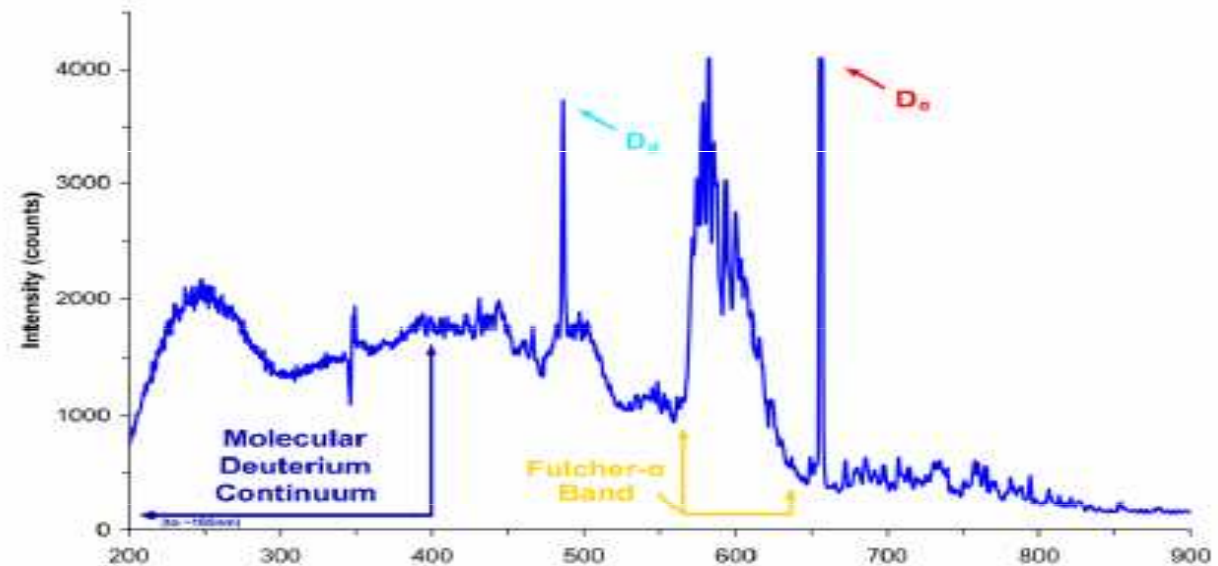
Wolframová žárovka – VIS oblast spektra

- Skleněná baňka naplněná inertním plynem obsahující páry jódu
- Uvnitř je wolframové vlákno, které je zahříváno stejnosměrným proudem



Deuteriová výbojka – UV oblast spektra

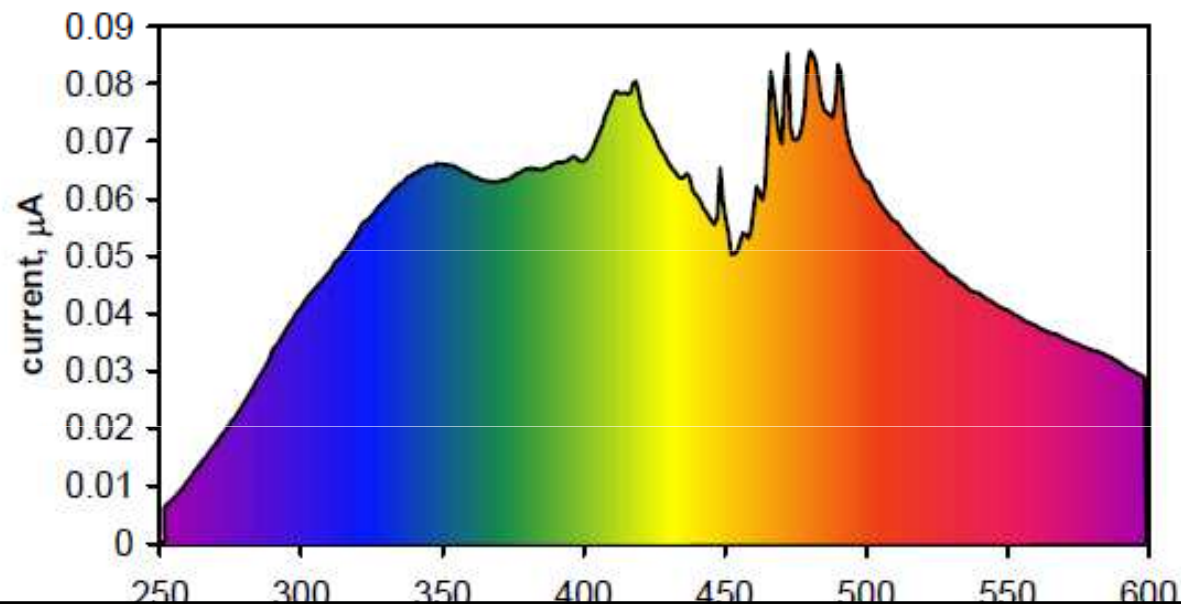
- Nízkotlaké, produkují světlo o vlnové délce 160-360 nm



Xenonová výbojka – blízká UV oblast nebo IČ oblast spektra

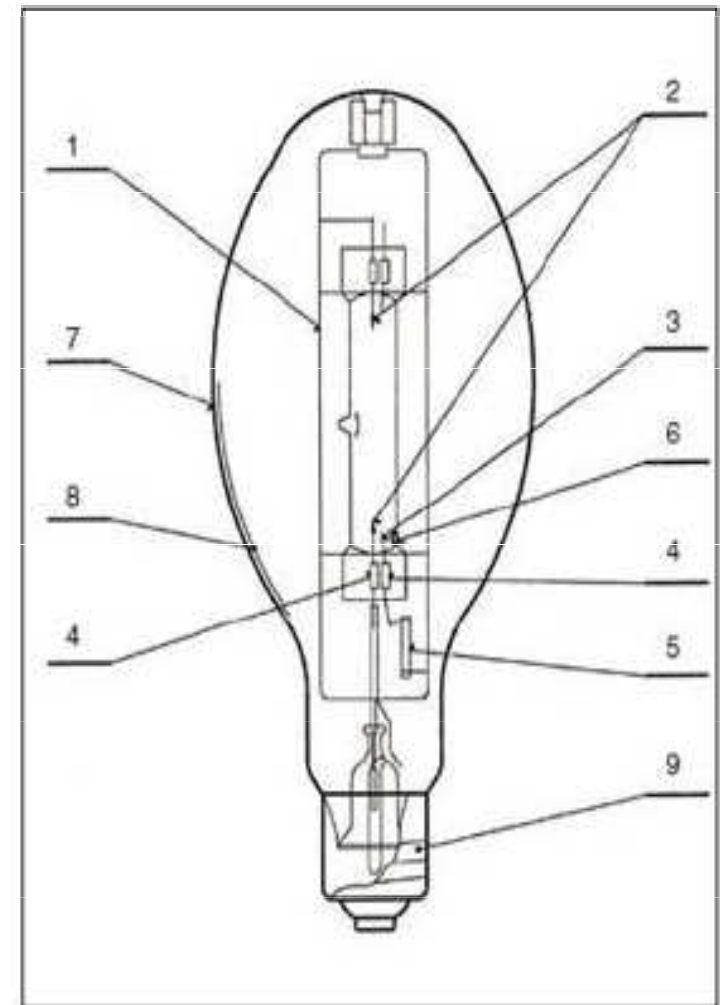
- Vysokotlaká (pevnější plášť), výboj vzniká mezi dvěma wolframovými vlákny, potřebuje intenzivní chlazení

Xenon Arc Lamp (XB0), relativně hladké spektrum
220nm – 1000nm



Rtuťová výbojka – blízká UV a VIS oblast

- Nízkotlaká, poskytuje přesně definované čárové spektrum (200-400 nm)
- Pro klinickou biochemii je významná spektrální čára o vlnové 334 nm – pro měření redukované formy NADP (absorpční maximum 340 nm)



Obr. 2. Konstrukce vysokotlaké rtuťové výbojky
1 - nosný rámeček, 2 - hlavní elektrody, 3 - pomocná elektroda, 4 - molybdenová fólie, 5 - rezistor, 6 - rtuť, 7 - vnější baňka, 8 - vrstva luminoforu, 9 - patice

Spektrofotometr - fotometrické filtry

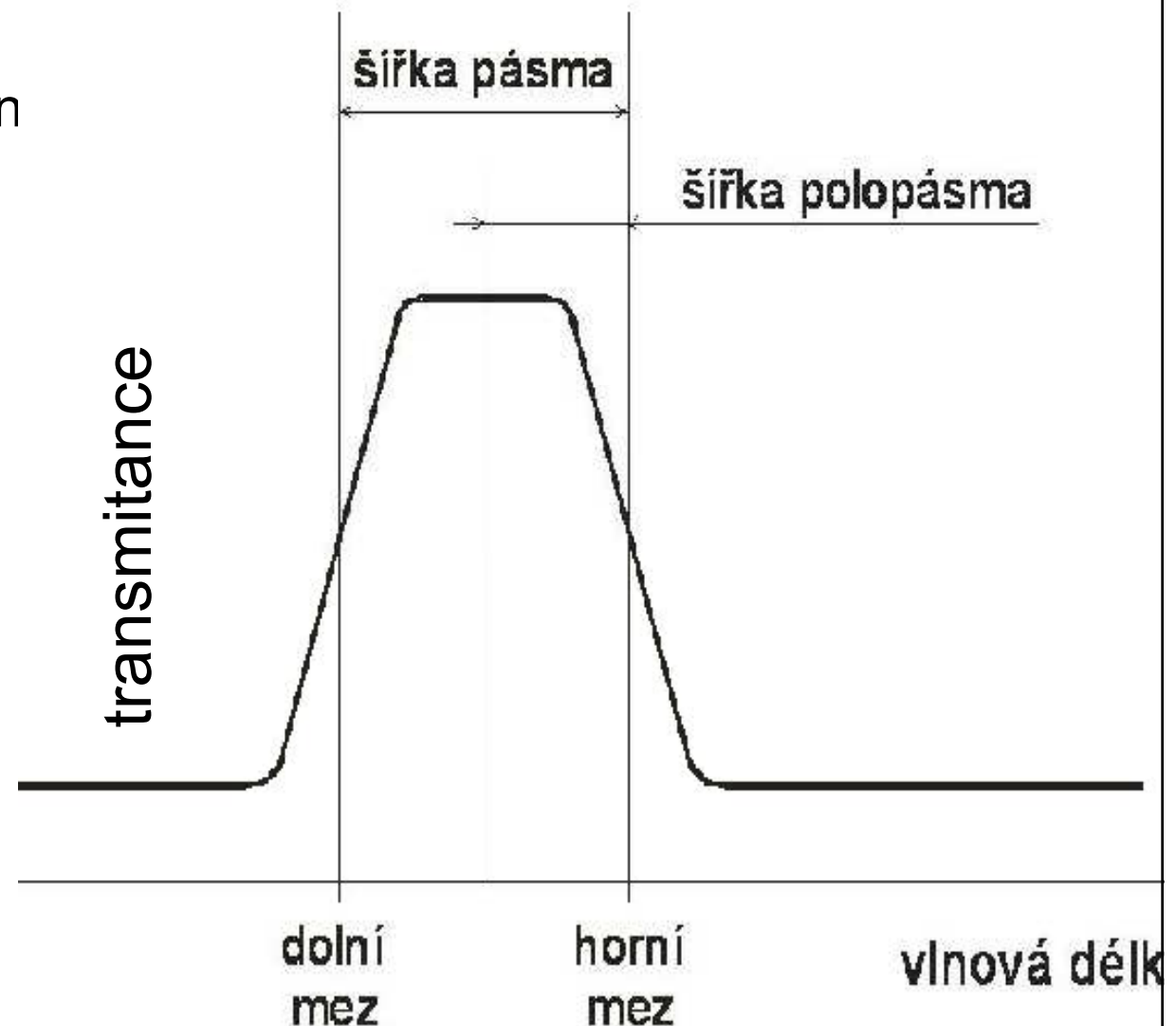
- Slouží k vymezení určitého (co nejužšího) pásu monochromatického světla ze spojitého záření.
- Charakteristikou filtru je tzv. **spektrální pološířka filtru (h , nm)** - odpovídá intervalu vlnových délek záření v polovině maximální propustnosti filtru (je odvozena z křivky propustnosti). Čím je rozsah pološířky filtru užší, tím je filtr lepší.
- Fotometrické filtry dělíme na dvě základní skupiny: **barevné absorpční a interferenční**

Spektrofotometr - fotometrické filtry

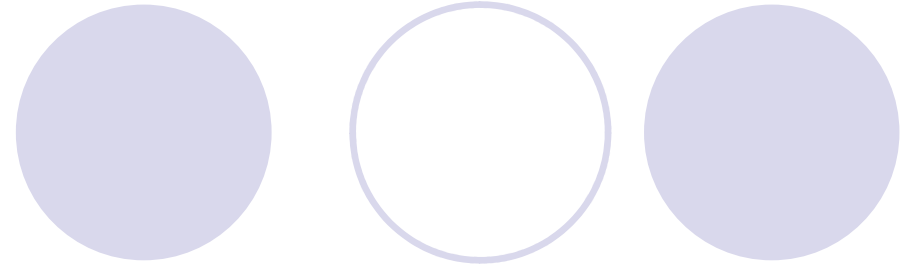
Spektrální pološířka

filtru (h , nm) - odpovídá intervalu vlnových délek záření v polovině maximální propustnosti filtru – transmittance, je odvozena z křivky propustnosti). Čím je rozsah pološířky filtru užší, tím je filtr lepší.

Křivka propustnosti



Fotometrické filtry

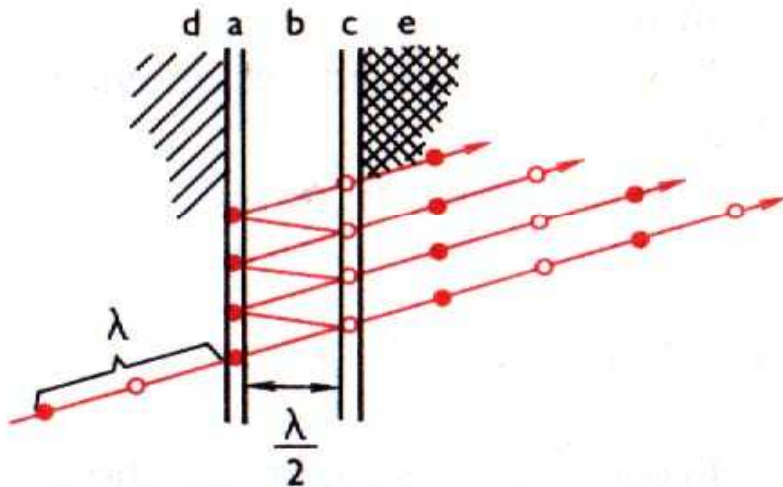


Barevné absorpční filtry - mají nižší spektrální čistotu filtrovaného záření, jejich pološířka je 30-80 nm

- ***Pevné*** - skla vyrobená z oxidy kovů, nebo pokrytá vrstvou želatiny s organickým barvivem
- ***Kapalné*** – obvykle kyvety s roztoky anorganických solí

Fotometrické filtry-interferenční filtry

Interferenční filtry využívají mnohonásobnou interferenci záření mezi hraničními plochami s výbornými odrazovými vlastnostmi, mají užší šířku pásma a vyšší pík transmittance (lepší propustnost) než barevné absorpční filtry. Nejvíce rozšířený je kovový Fabry-Perotův filtr.



a, c – polopropustné vrstvičky

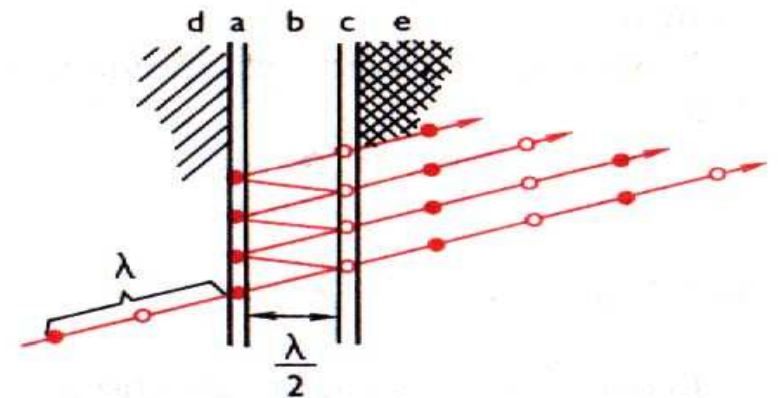
b – vrstva dielektrika o tloušťce $\lambda/2$

d, e – krycí vrstvy

Fotometrické filtry-interferenční filtry

Na základní desce je mezi dvěma stříbrnými polopropustnými vrstvičkami vrstva průhledného dielektrika o tloušťce $\lambda/2$, přičemž λ odpovídá požadované vlnové délce.

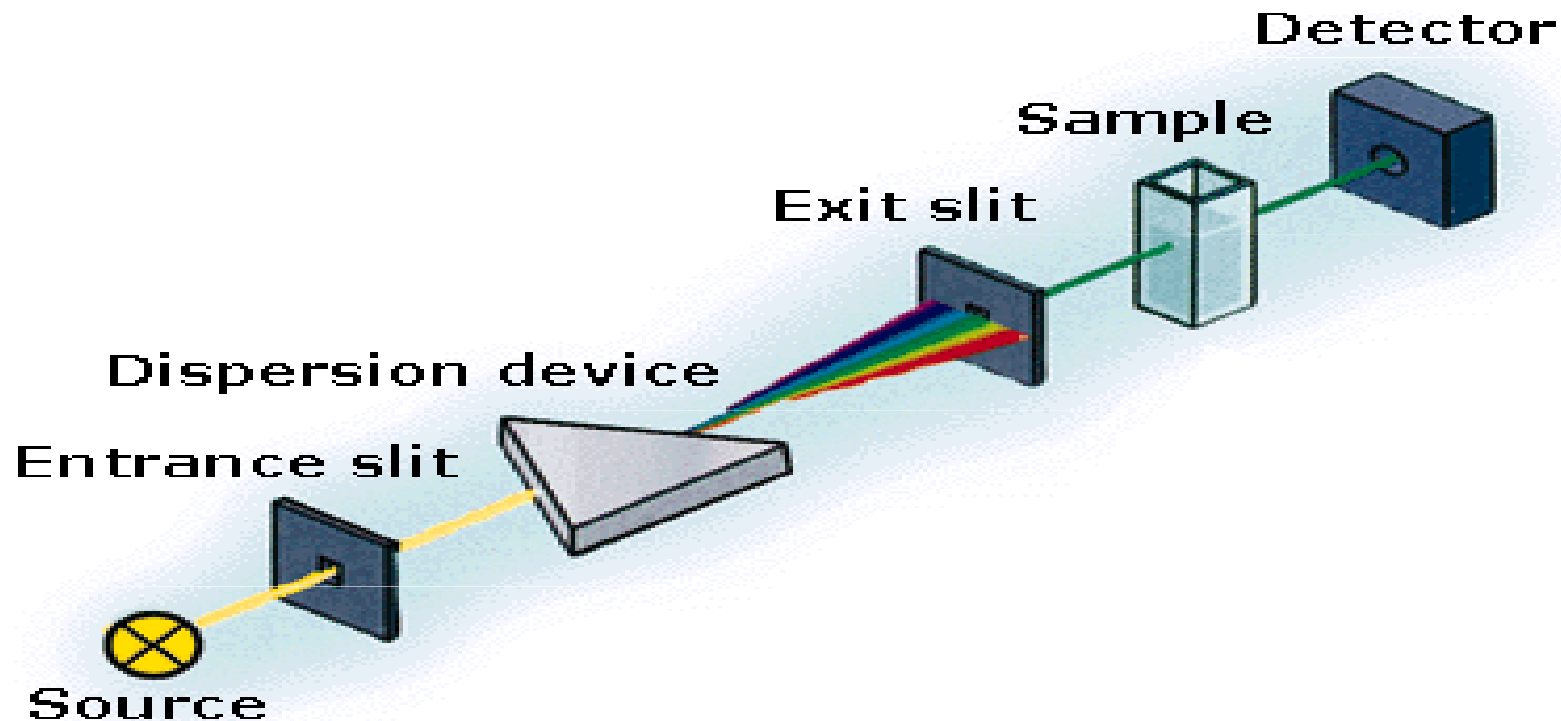
Mnohonásobnými odrazy od zrcadlových ploch filtru a po vícenásobné interferenci dopadajících paprsků různé vlnové délky, vznikají velmi úzká maxima s pološířkou 8 – 10 nm.



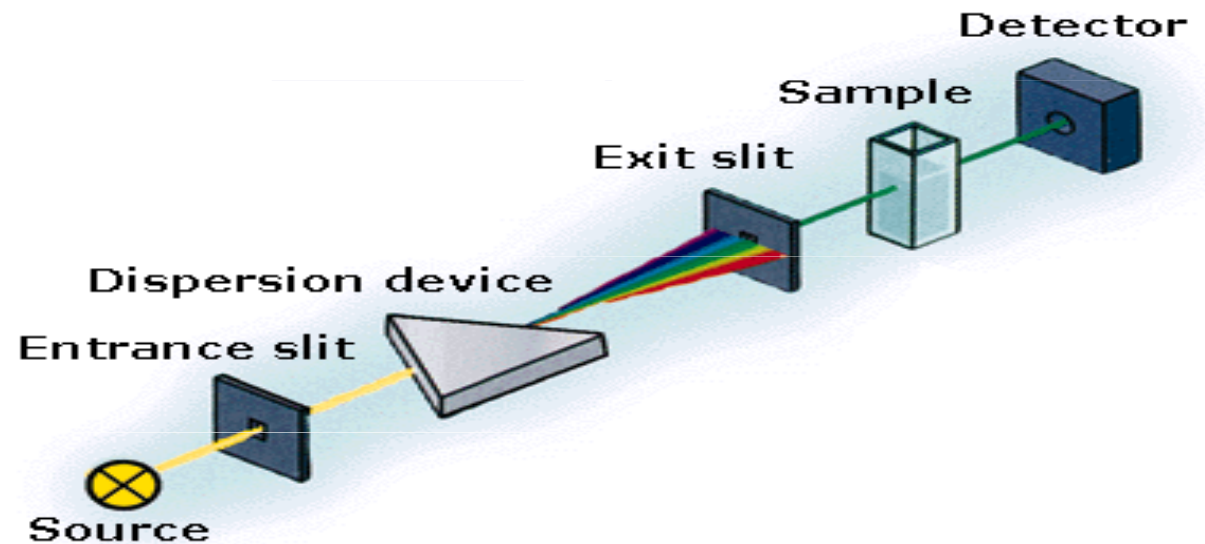
Spektrofotometr - monochromátory

Optická zařízení pomocí kterých se ze spektra polychromatického světla mechanicky vymezí pouze jeho určitá část.

Slouží pro kontinuální výběr různých vlnových délek



Monochromátor



Monochromátor se skládá:

- vstupní štěrby
- pomocné optiky (zrcadla, čočky)
- disperzního prvku - mřížka, hranol
- výstupní štěrby

Monochromátor- vstupní a výstupní štěrbina

Vstupní – vymezuje malou část světelného toku ze zdroje záření

Výstupní štěrbina – slouží k výběru záření určité vlnové délky, čím je užší tím užší je šířka pásma (bandpass) a větší **monochromaticčnost záření**.

Poloha štěrbin je neměnitelná, požadovaná vlnová délka se nastavuje přímým otáčením disperzního prvku.

Monochromátor - pomocná optika

Zrcadla - jsou to plochy odrážející záření, jsou potažena obvykle vrstvou hliníku

- Rovinná – nejvíce používaná
- Dutá, kulová , parabolická

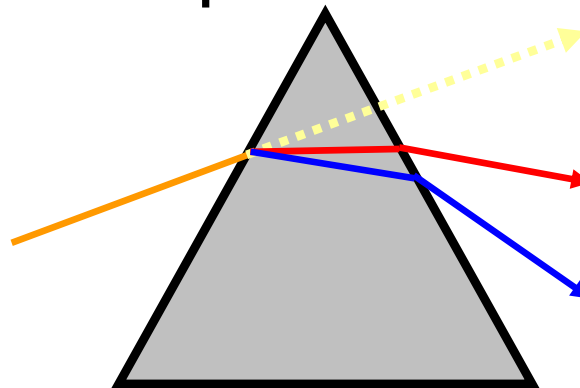
Čočky – optický zaostřovací systém

Optická vlákna – skleněná, křemenná usměrňují transport světla ve stísněných prostorech (vertikální fotometry k měření mikrotitračních destiček), mají větší světelné ztráty než zrcadla

Clony – používají se k omezení průřezu svazku paprsků, k odstínění okrajové oblasti čoček a zrcadel

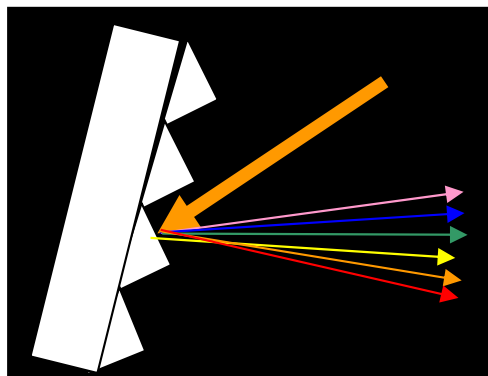
Disperzní prvek - optický hranol

- rozkládá polychromatické světlo na principu **lomu světla**
- světelné paprsky o kratší vlnové délce (modré světlo) se lámou více než paprsky s delší vlnovou délkou
- Skleněný hranol - pro rozklad světla ve VIS oblasti spektra (400-800 nm)
- Křemenný hranol – pro UV oblast (do 200 nm)



Disperzní prvek – difrakční reflexní mřížka

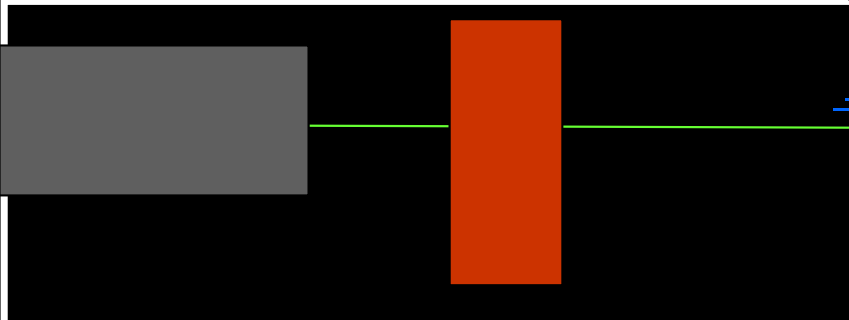
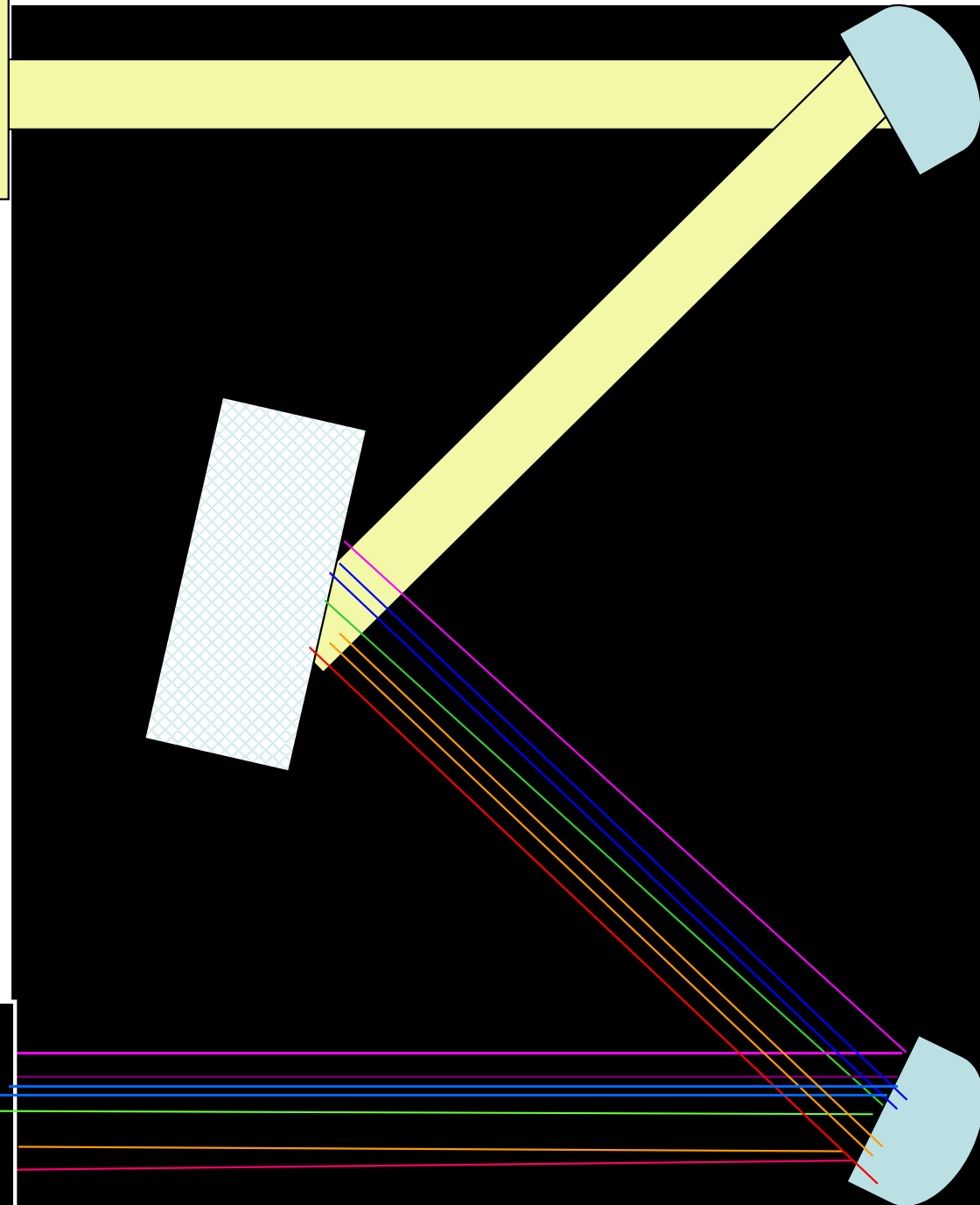
- pracuje na principu odrazu světla
- Je tvořena soustavou jemných rovnoběžných vrypů na skleněné destičce (nejkvalitnější až 1700 /1 mm)
- Na vybroušených ploškách dochází mřížky dochází k složitým optickým procesům-odraz, interference světla, které vedou k tomu, že z mřížky vychází jednotlivé vlnové délky pod rozdílným úhlem, který závisí na vlnové délce záření
- Rozklad záření je lineární u všech vlnových délek
- Má lepší rozlišovací schopnost než hranol



Výběr požadované vlnové délky



Přesným pohybem disperzního prvku monochromátoru je vzniklé světelné spektrum nasměrováno na výstupní štěrbinu tak, aby jím prošlo záření požadované vlnové délky



kyveta

detektor

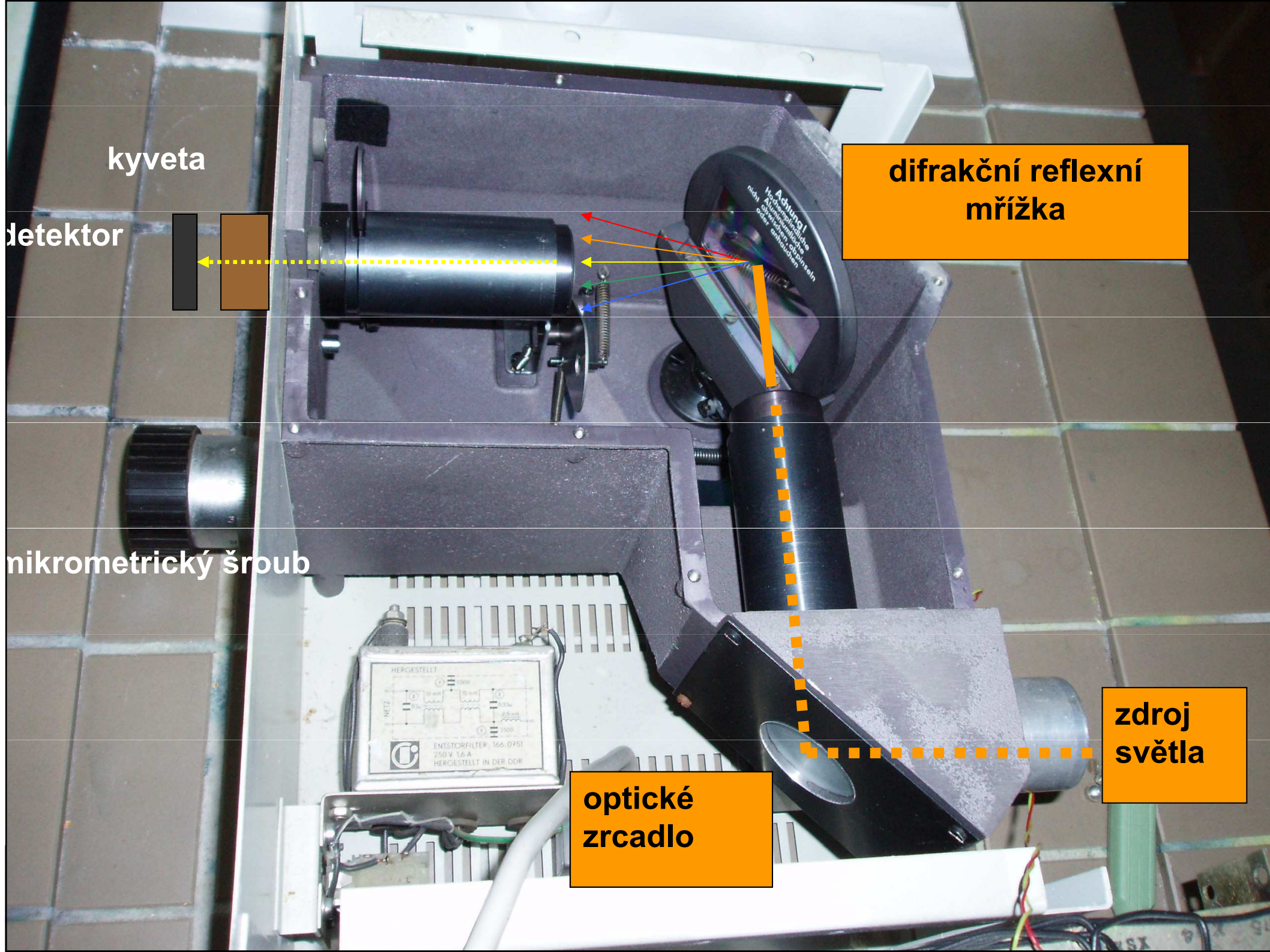


difrakční reflexní
mřížka

mikrometrický šroub

optické
zrcadlo

zdroj
světla



Spektrofotometr - Absorpční prostředí

Kyveta s měřeným vzorkem

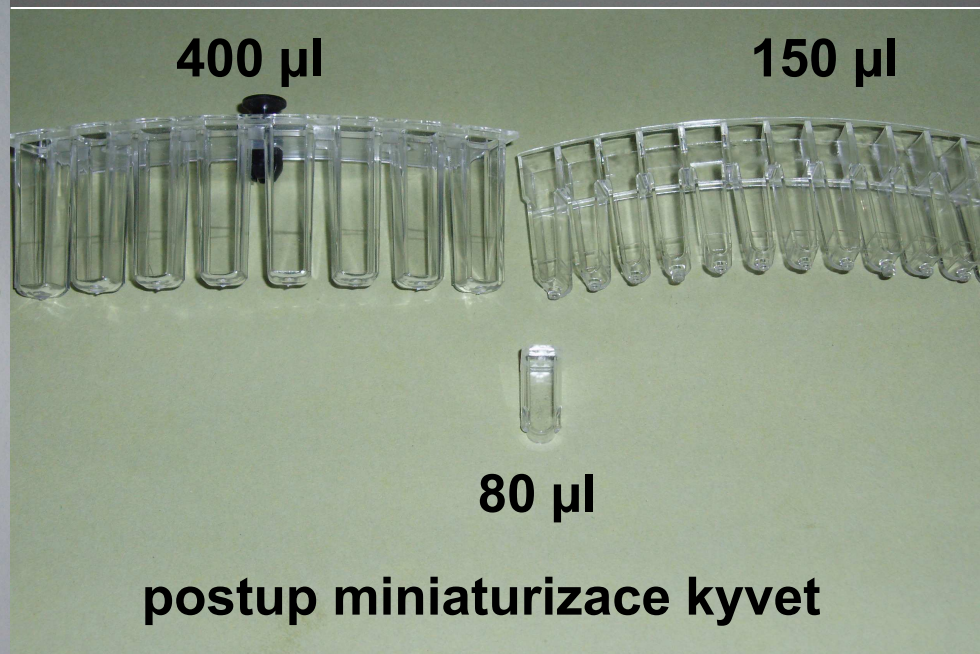
Rozdělení:

- dle velikosti: Makro- (1-2 ml), semimikro- (<0,5 ml), mikro-(<100 μ l)
- dle typu: nalévací, průtokové
- dle materiálu: skleněné, plastové (akrylátové, polystyrenové), křemenné (UV oblast)
- automatických bioch. analyzátorech:
 - kyvety na jedno použití
 - trvalé – po změření se promyjí mycí stanicí

Absorpční prostředí spektrofotometru



zatavené kyvety z plastické fólie



400 µl

150 µl

80 µl

postup miniaturizace kyvet



Spektrofotometr - detekční systém

Je složen z detektoru záření a elektronického zařízení pro zpracování jeho odezvy

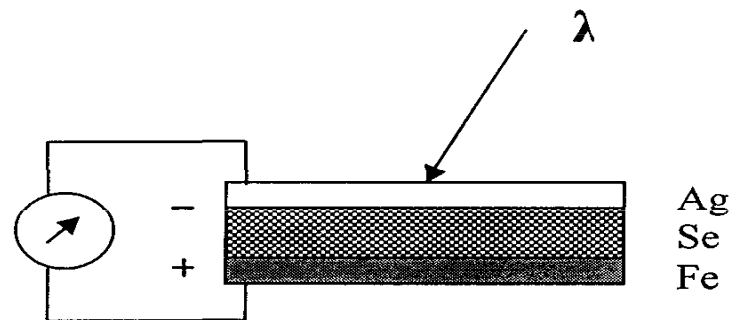
Detektory

Zařízení, které zprostředkovávají přeměnu energie záření na jinou formu – obvykle fotochemickou, elektrickou

- **Hradlový selenový fotočlánek**
- **Fotodioda**
- **Fotonásobič**
- **Detektor diodového pole**

Detektor – hradlový selenový fotočlánek

- Skládá se z polopropustné vrstvy stříbra nanesené na vrstvě selenu (polovodič) na kovovém podkladě
- Světelné záření o vlnové délce λ dopadající na polovodič působí uvolnění elektronů, které přecházejí do vrstvičky stříbra
- Tím vzniká elektrický proud, který je proporcionalní intenzitě světelného záření



Hradlový selenový fotočlánek.

Detektor – fotodioda (fotonka)

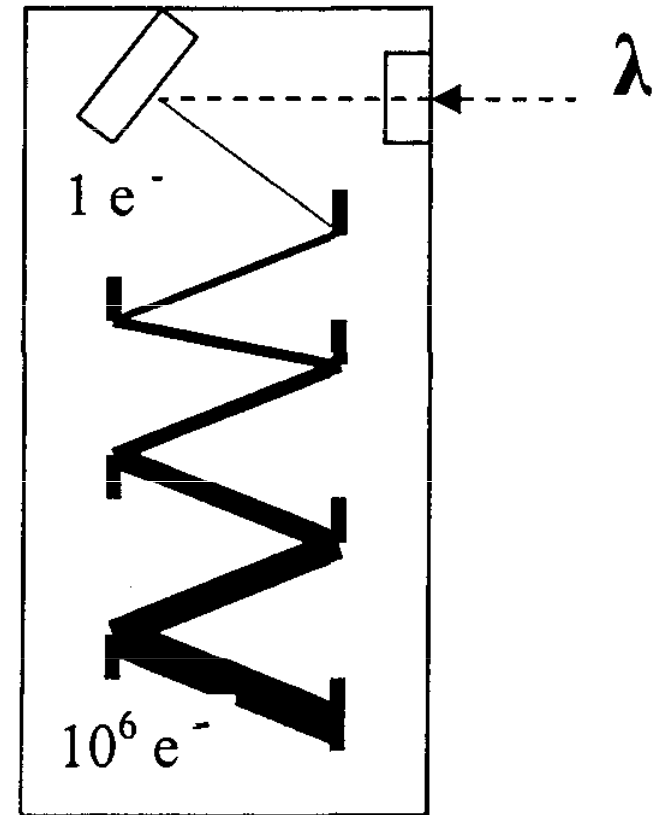


Pracuje na principu fotoelektrického efektu

- Skládá se z fotosenzitivní katody (obsahuje Ag a různé alkalické kovy a jejich oxidy) a anody umístěné ve vakuu
- Fotokatoda uvolňuje při ozáření světlem elektrony, které jsou přitahovány anodou čímž vzniká el. proud, který je proporcionální intenzitě světelného záření

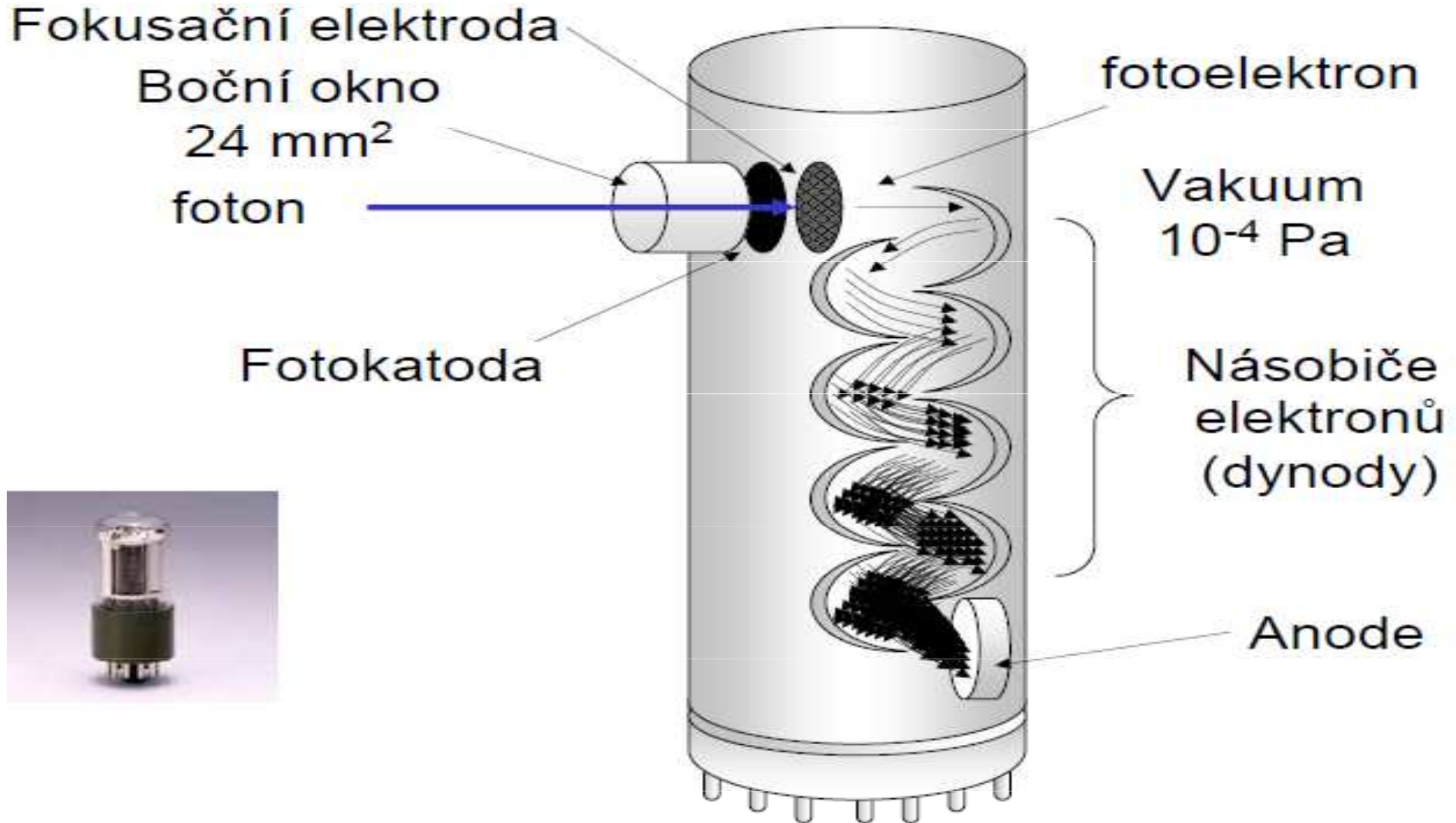
Detektor - fotonásobič

- Elektrony z fotokatody jsou postupně přitahovány k sérii dynod, na které je vloženo postupně se zvyšující napětí
- Když elektron narazí na dynodu uvolní z ní mnohem více elektronů, které jsou přitahovány k další dynodě
- Obsahuje až 10 dynod, z nichž každá následující má až o 50 V vyšší napětí
- Toto *vnitřní zesílení signálu* umožňuje převést i velmi slabé světelné záření na měřitelné hodnoty elektrického proudu



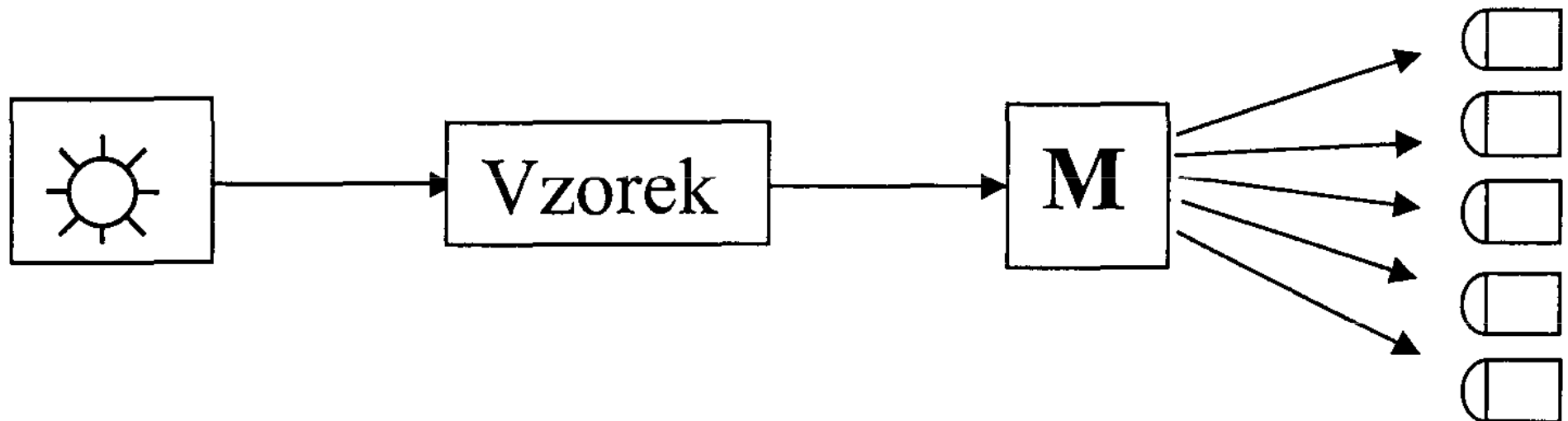
Fotonásobič.

Detektor - fotonásobič



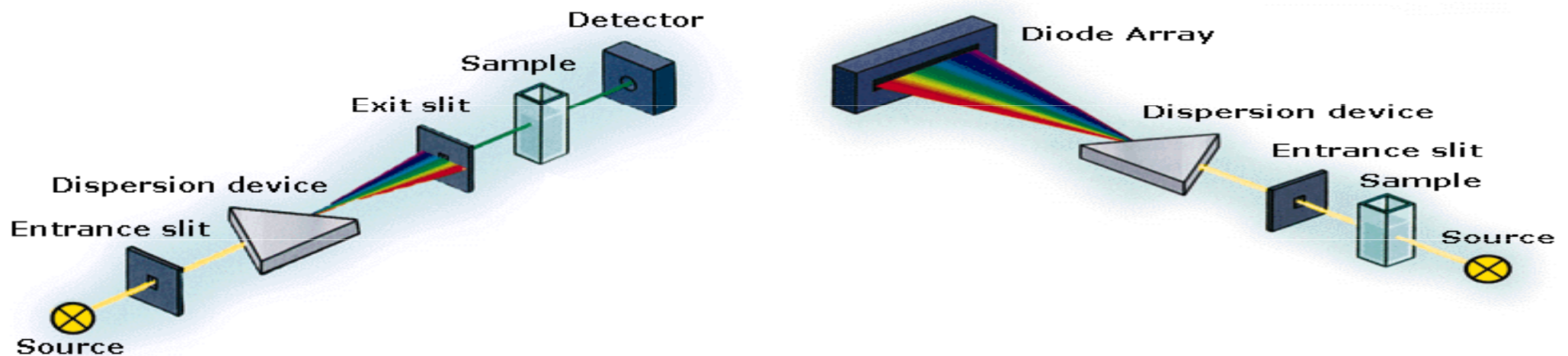
Detektor s diodovým polem

- Je tvořen velkým množstvím miniaturních fotodiod na malé ploše destičky na které dopadá světelné záření po průchodu absorpčním prostředím a následně rozložené monochromátorem na jednotlivé vlnové délky



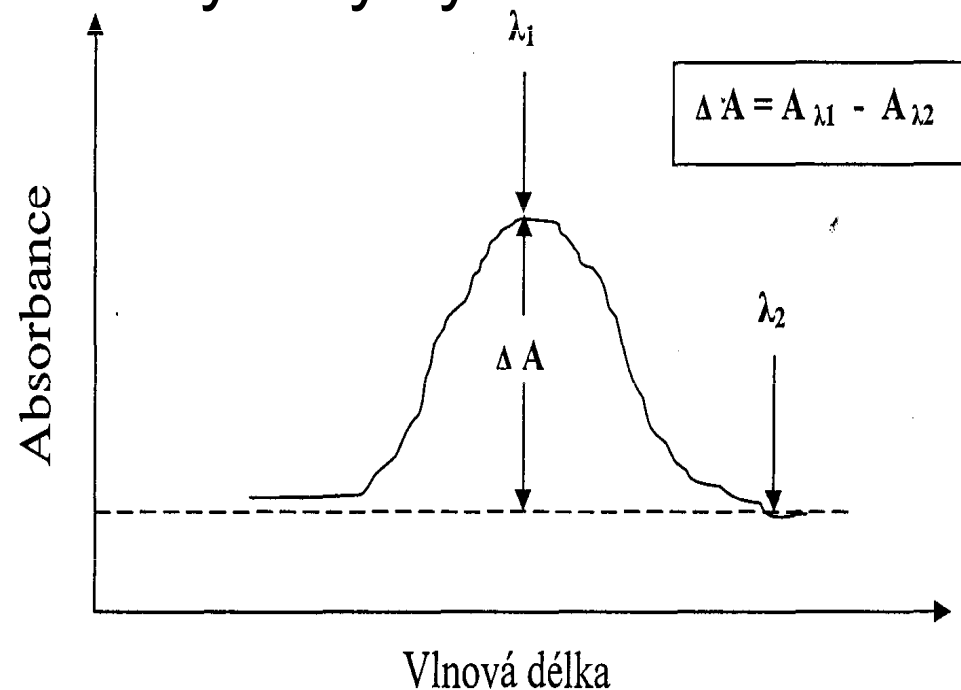
Detektor s diodovým polem

- Rozdíl oproti klasickému spektrofotometru – monochromátor je umístěn až za kyvetou se vzorkem
- Použití : v HPLC (UV/VIS detektor), automatické biochemické analyzátoary
- Usnadňuje tzv. bichromatické měření absorbance



Bichromatické měření absorbance

- měření vzorku při dvou vlnových délkách současně
- použití vlnové délky (λ_2) mimo absorpční maximum (λ_1)
- Používá se za situace, kdy se v reakční směsi vyskytuje látka, která rovněž absorbuje záření použité vlnové délky (interferující látka)
- Omezí se falešně zvýšený výsledek měření

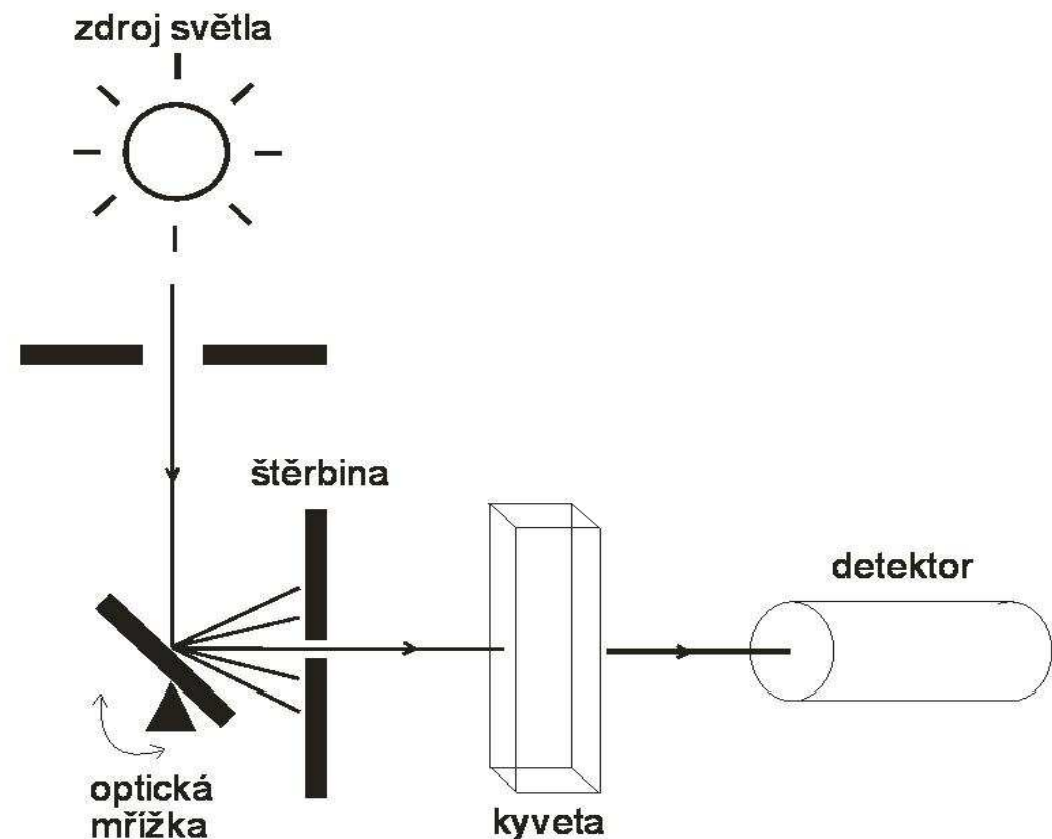


Konstrukce spektrofotometru

Jednopaprskové

Umožňují měřit absorbanci pouze v jednom absorpčním prostředí (tj. v kyvetě s měřeným vzorkem nebo v kyvetě s blankem)

- Zdroj světla
- Vstupní štěrbinu
- Monochromátor
- Výstupní štěrbinu
- Kyveta
- detektor

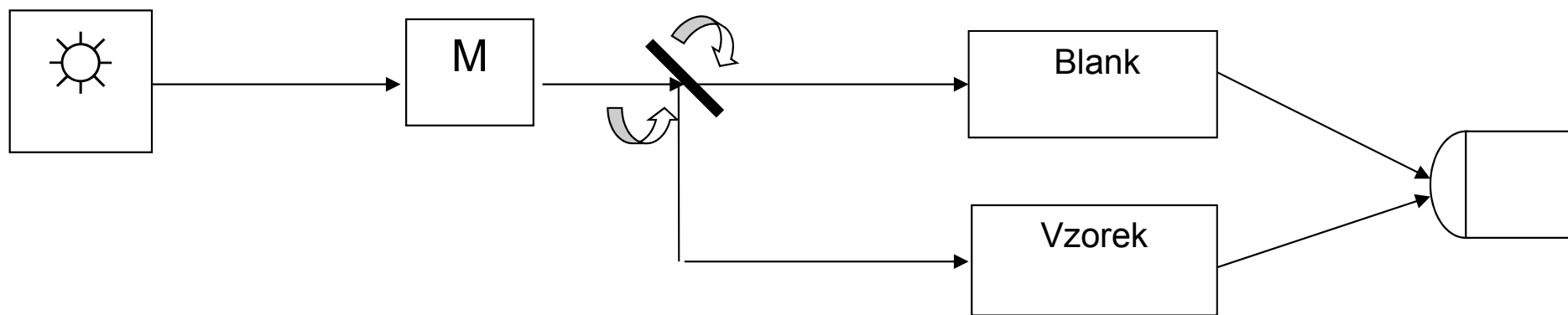
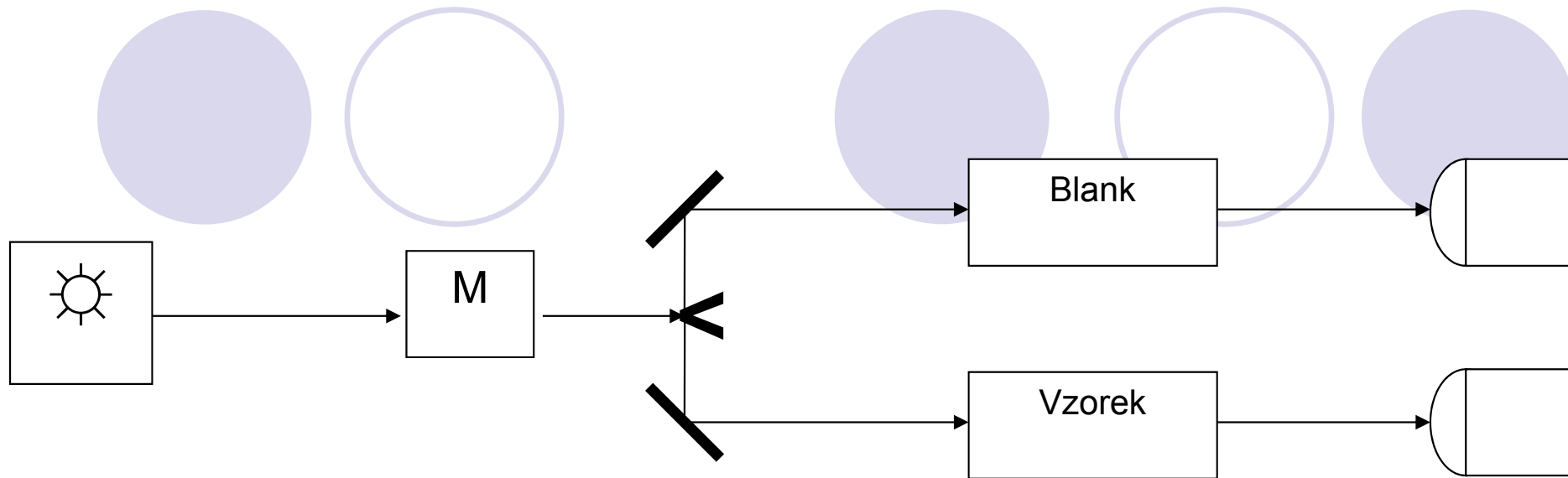


Konstrukce spektrofotometru

Dvoupaprskový

Dvě základní konstrukční řešení:

- Paprsek určité vlnové délky z monochromátoru je rozdělen na dvě části, jedna polovina prochází kyvetou se vzorkem, druhá s kyvetou s blankem – *vyžaduje 2 detektory*
- Paprsek vycházející z monochromátoru je rotujícím zrcadlem střídavě usměrňován na kyvetu se vzorkem a směřován na *jeden společný fotonásobič*



Kontrola kvality spektrofotometru

Přesnost nastavené vlnové délky

Ověřuje, že vlnová délka nastavená na přístroji odpovídá skutečné vlnové délce procházejí měřeným vzorkem.

- Použití rtuťové výbojky (ostré čárové spektrum)
- Použití absorpčních filtrů (z kysličníku holmia) s přesně definovaným absorpčním pruhem – filtr je přístrojem naskenován a zjištěný absorpční pík je srovnán se známým píkem. Povolená tolerance je $\pm 1-2$ nm.



Kontrola kvality spektrofotometru

Přesnost spektrofotometru - schopnost změřit absorbanci přesně.

- K ověření se používají speciální absorpční filtry nebo roztoky o známé koncentraci
- Absorbance se proměřují v celém rozsahu spektra (302, 395, 512, 378 nm)

Kontrola kvality spektrofotometru

Linearita spektrofotometru – schopnost vykazovat lineární odezvu

- měření postupně řaděného roztoku o známé koncentraci
- Výsledkem je přímkový graf závislosti A (osa y) na c (osa x)
- Měření se provádí při λ - 257, 41, a 630 nm



Kontrola kvality spektrofotometru

Rozptýlené světlo

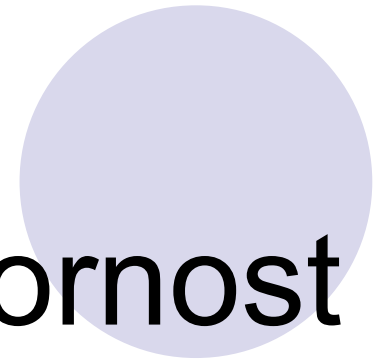
Světlo, které může dopadnout na detektor aniž by prošlo měřeným vzorkem (př. nedokonalé odstínění optického systému spektrofotometru)

- Ověřuje se vložení neprůsvitného bloku do nosiče kyvety a sledováním odezvy detektoru

Drift signálu

Schopnost detektoru udržovat konstantní hodnotu

- Sledování nulové linie



Děkuji za pozornost

