



# **Optické metody**

**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 základě pohlcování světla určité vlnové délky se označuje jako **fotometrie**.



# 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



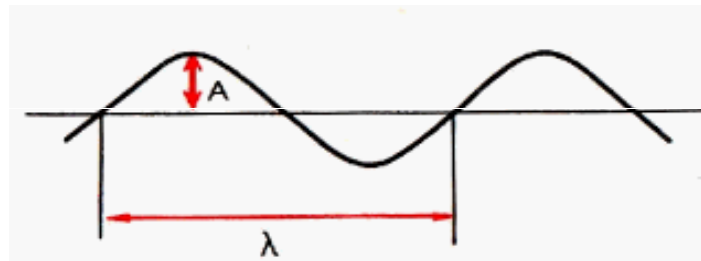
# Spektrofotometrie-rozdělení

**Podle typu interakce  
elektromagnetického záření:**

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

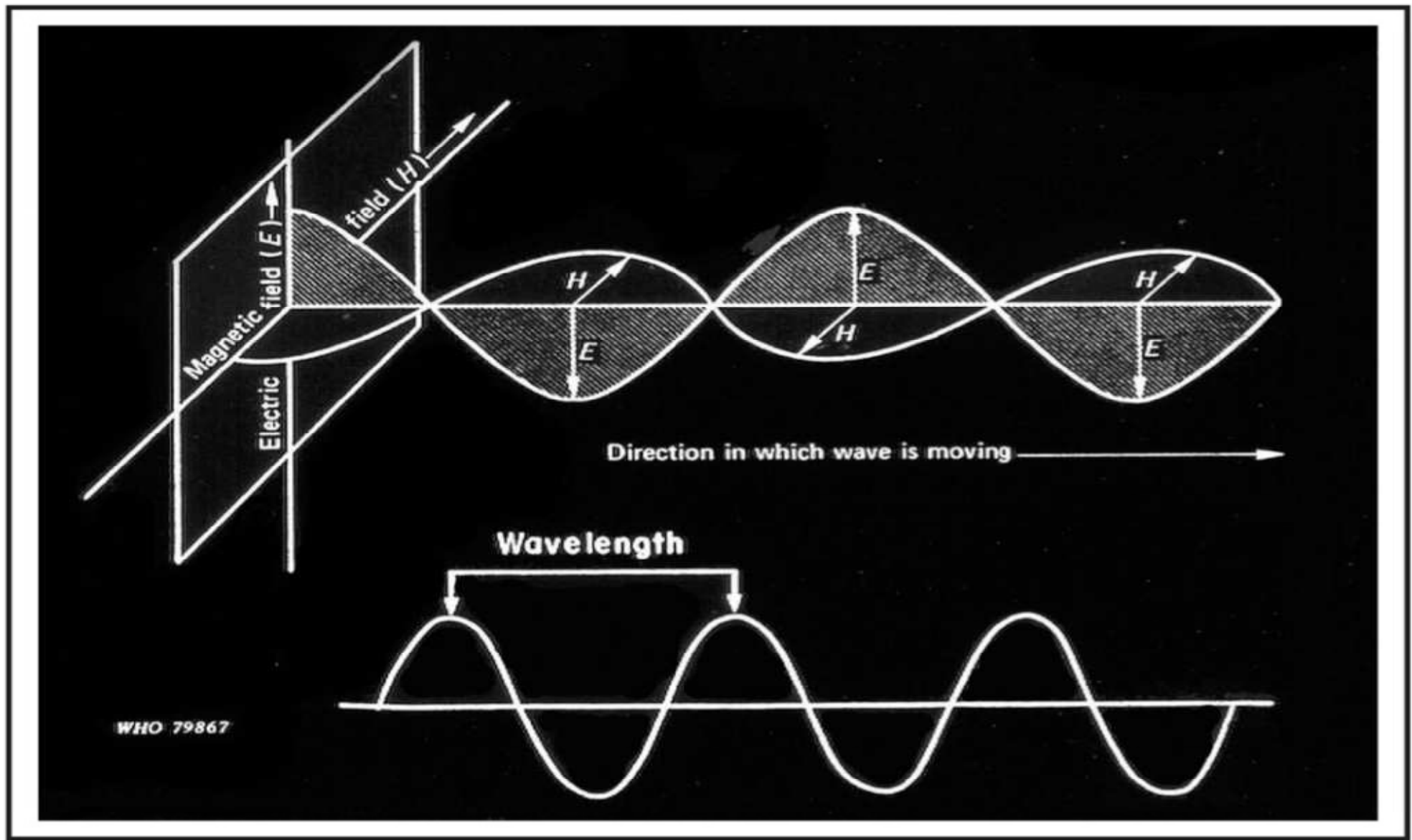
# Optické metody

- 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- $\lambda$ , udává se v nm

# Elektromagnetické záření



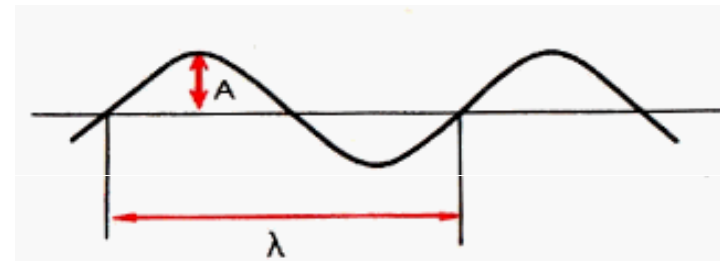
# Popisující veličiny elektromagnetického záření

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

- vlnová délka -  $\lambda$  (nm)

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

- Frekvence světelných vln (=počet vln za sekundu) -  $\nu$  (Hz, s<sup>-1</sup>)





# Popisující veličiny elektromagnetického záření

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

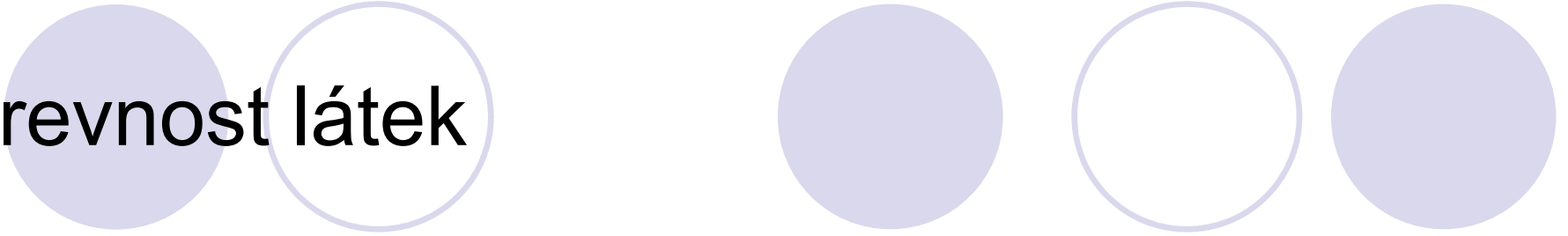
$$\varepsilon = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

- 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

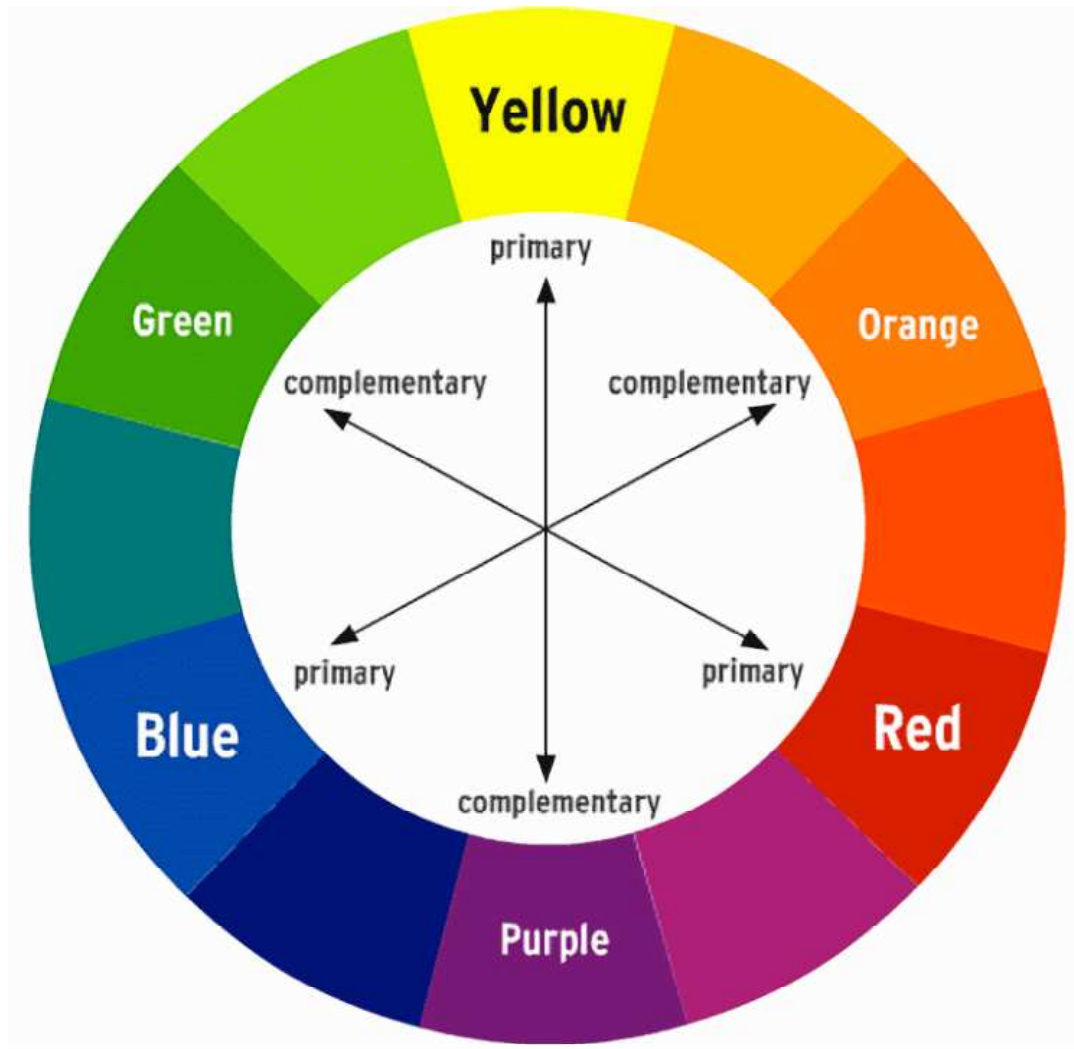


- Pokud absorbované záření má  $\lambda$  ležící v oblasti viditelné části spektra, látka se jeví lidskému oku jako **barevná**
- Má vždy barvu doplňkovou k barvě absorbovaného světla

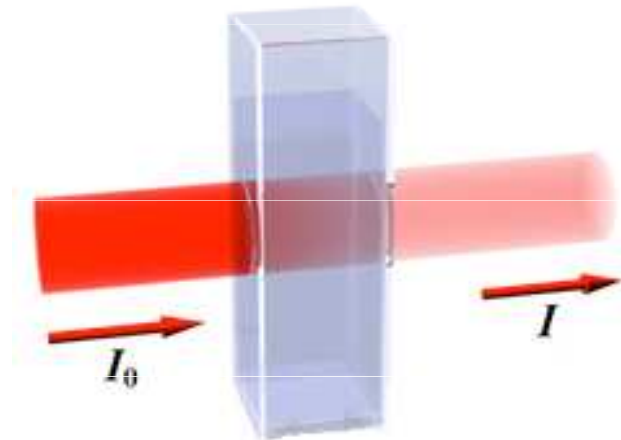
# Barevnost látek

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



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

**Propustnost (transmittance):**

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

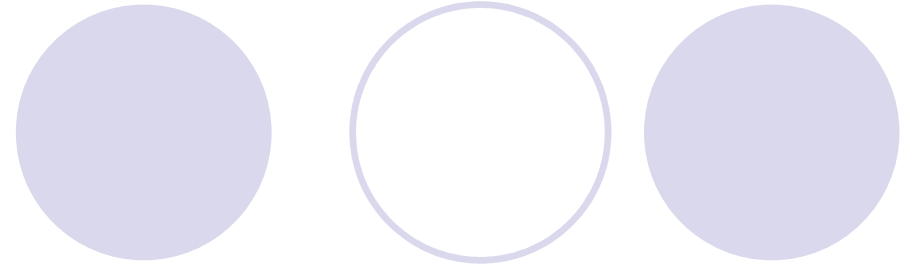
$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

- 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  $\varepsilon_{\lambda}$

# Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

- molární absorpční koeficient  $\epsilon_{\lambda}$ : 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 ( absorbancí) a koncentrací se určuje **kalibrace**

# Kalibrační závislost



Praktické využití Lambertova-Beerova zákona

## Provedení:

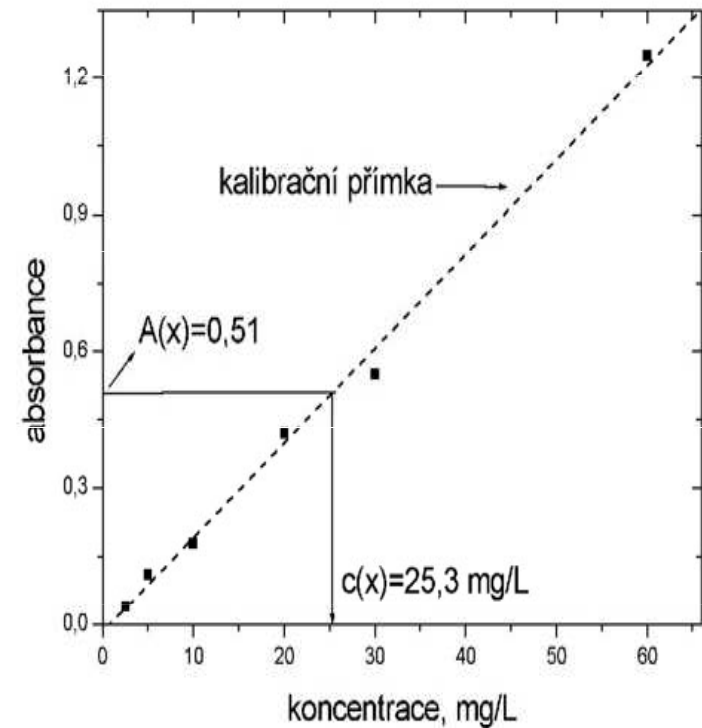
- změříme obvykle 5 standardních roztoků o známé vrůstající koncentraci při určité vlnové délce
- všechny roztoky se měří za stejných experimentálních podmínek (spektrometr, kyveta, pipety, doba inkubace..)
- blank = slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky

# 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

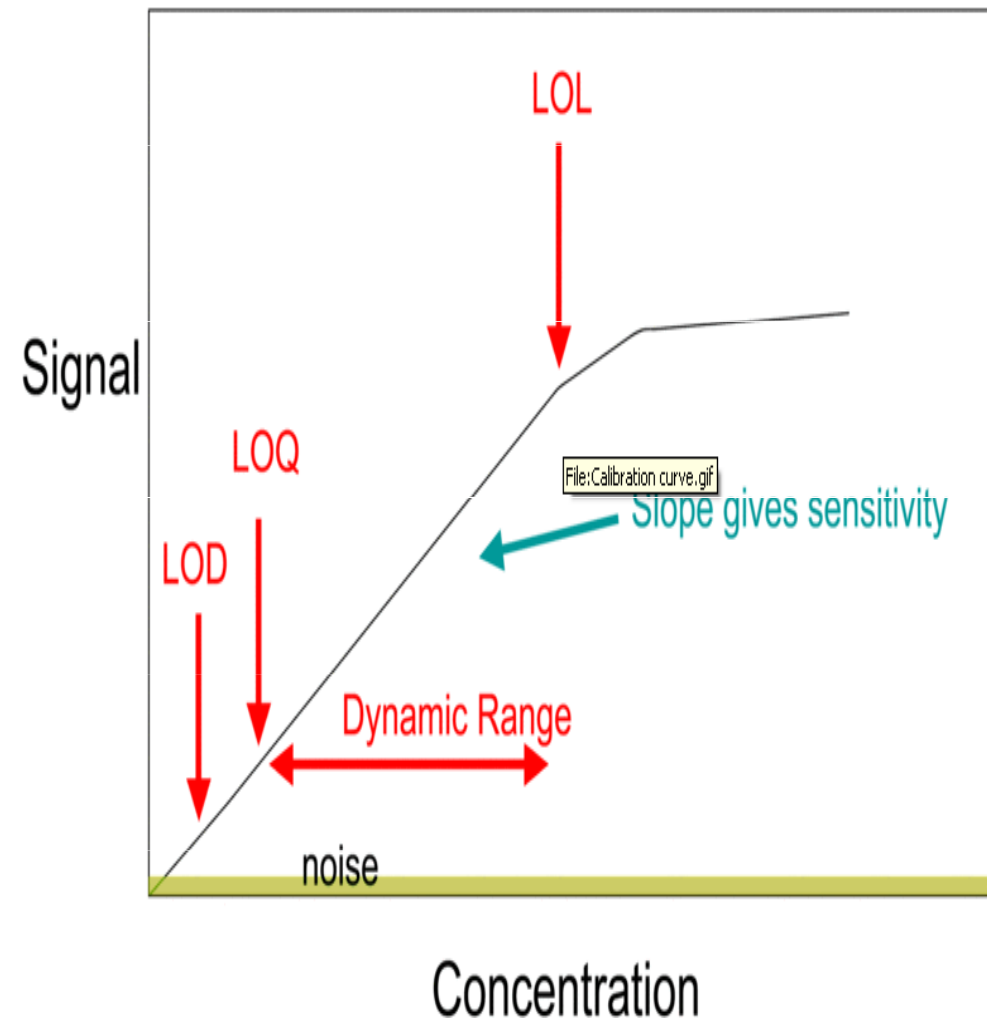


Obr.4 Kalibrační křivka ( $x$  = neznámý vzorek,  $A$  = absorbance,  $c$  = koncentrace)

# 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  $\epsilon_\lambda$  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 absorpance  $>$  výrazně narůstá chyba měření

# 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

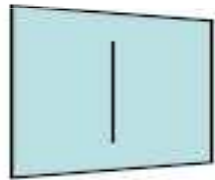


# Uspořádání spektrofotometru

- **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



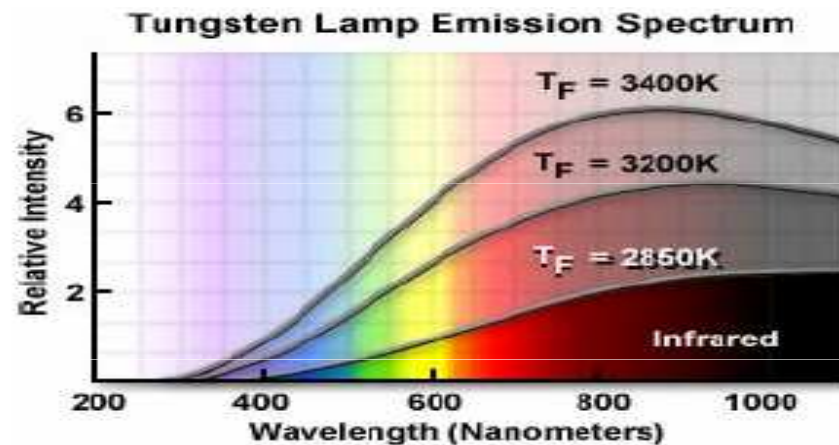
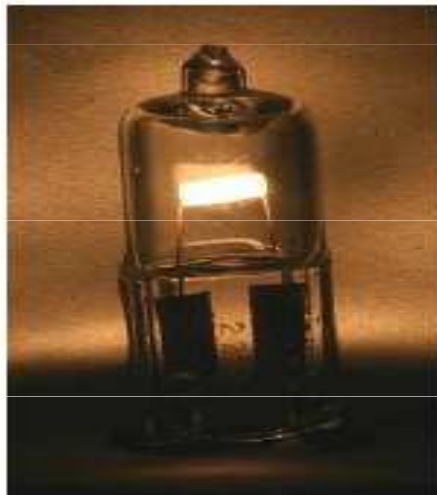
# Zdroje záření a jejich použití



- **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

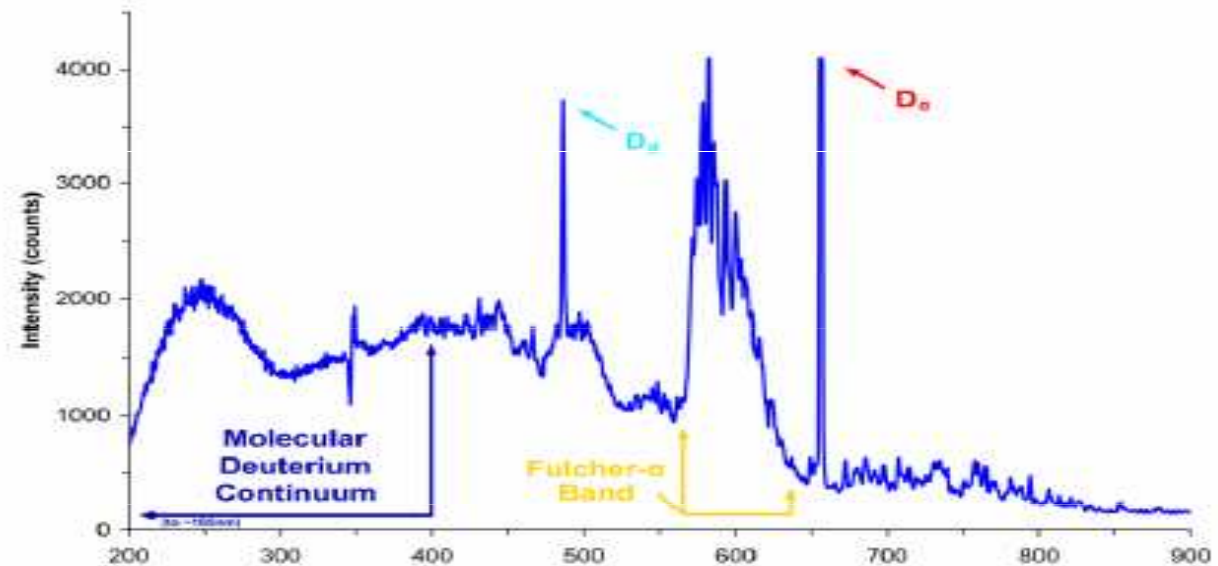
# Wolframová žárovka – VIS oblast spektra

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



# Deuteriová výbojka – UV oblast spektra

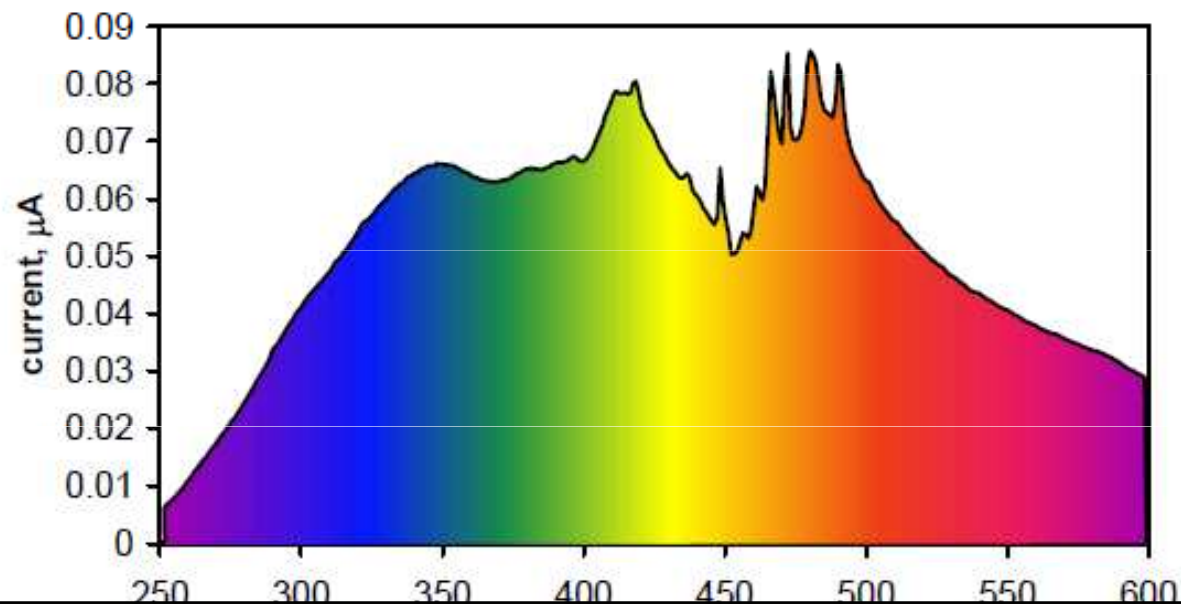
- Nízkotlaké, produkují světlo o vlnové délce 160-360 nm



# Xenonová výbojka – blízká UV oblast nebo IČ oblast spektra

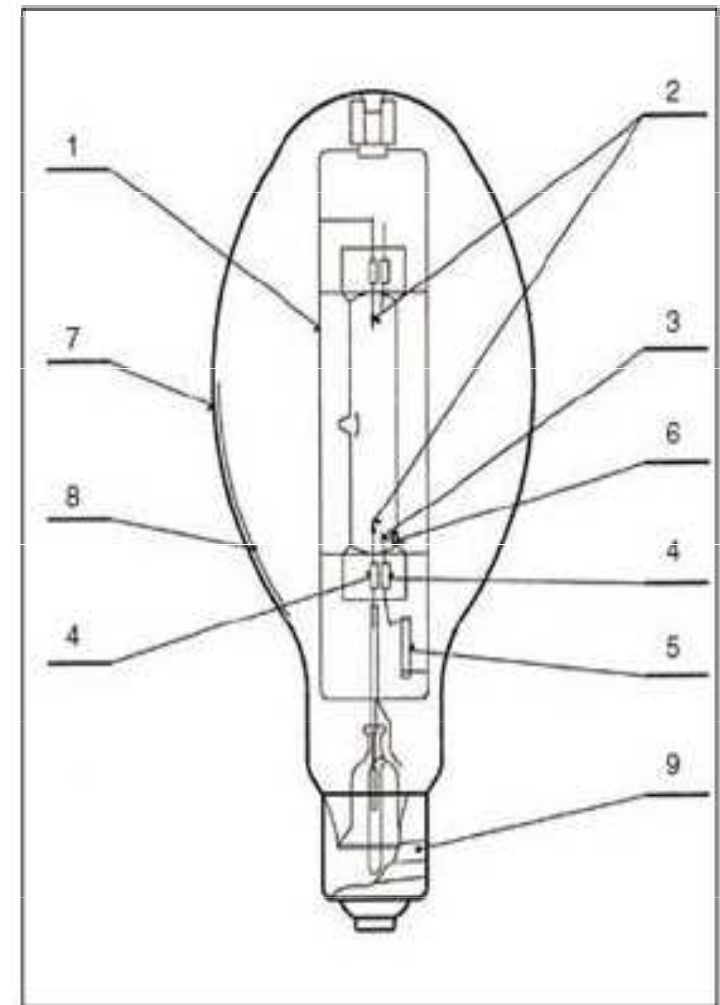
- Vysokotlaká (pevnější plášť), výboj vzniká mezi dvěma wolframovými vlákny, potřebuje intenzivní chlazení

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

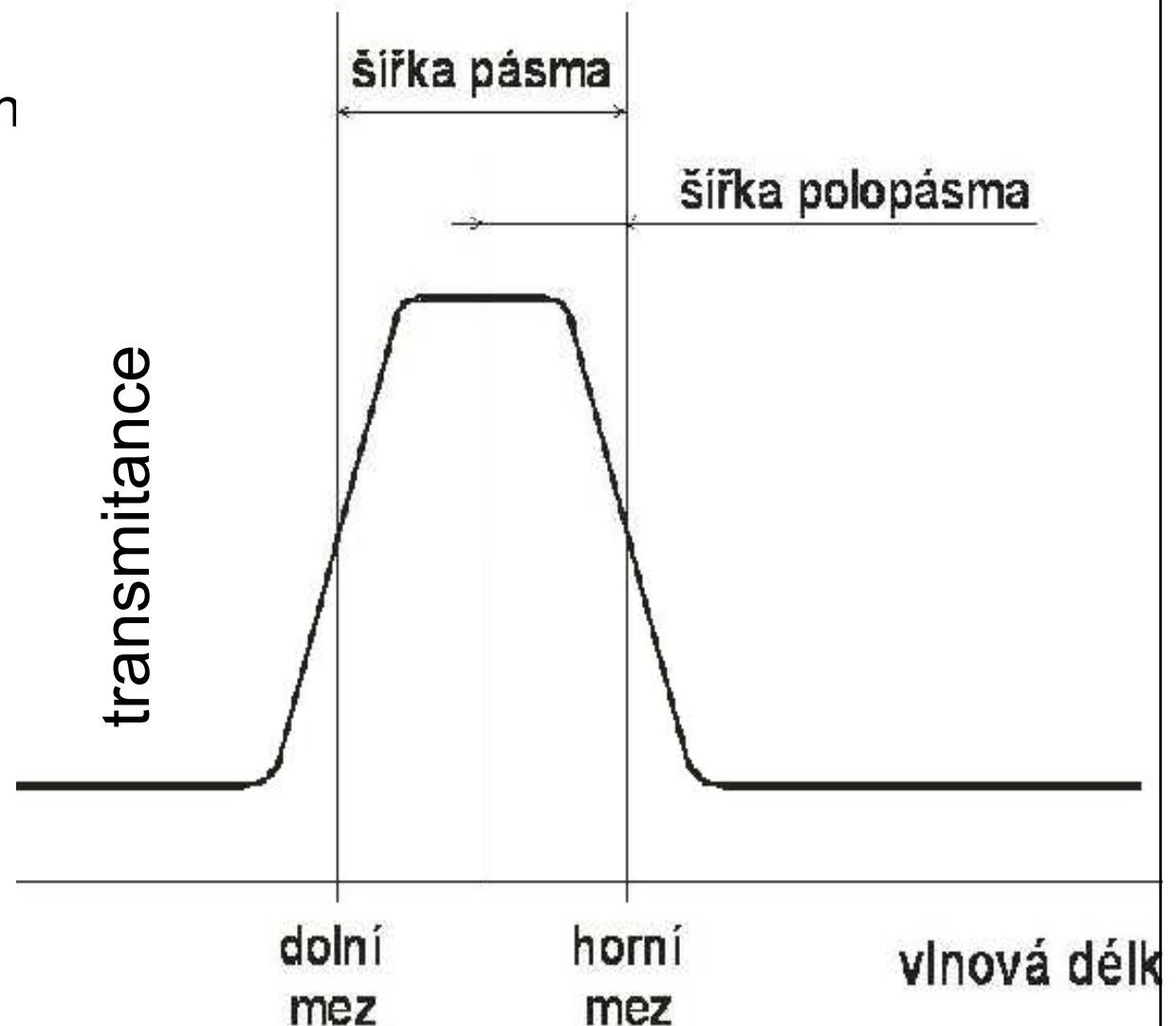
- Slouží k vymezení určitého (co nejužšího) pásu monochromatického světla ze spojitého záření.
- Charakteristikou filtru je tzv. **spektrální pološířka filtru ( $h$ , nm)** - odpovídá intervalu vlnových délek záření v polovině maximální propustnosti filtru (je odvozena z křivky propustnosti). Čím je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

# Spektrofotometr - fotometrické filtry

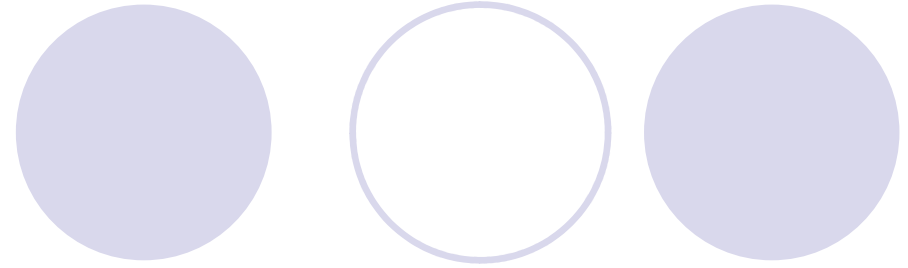
## Spektrální pološířka

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



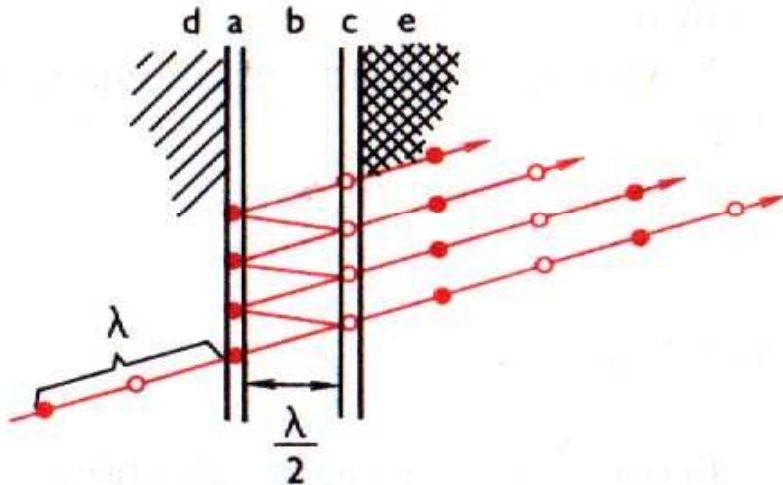
**Barevné absorpční filtry** - mají nižší spektrální čistotu filtrovaného záření, jejich pološířka je 30-80 nm

- ***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

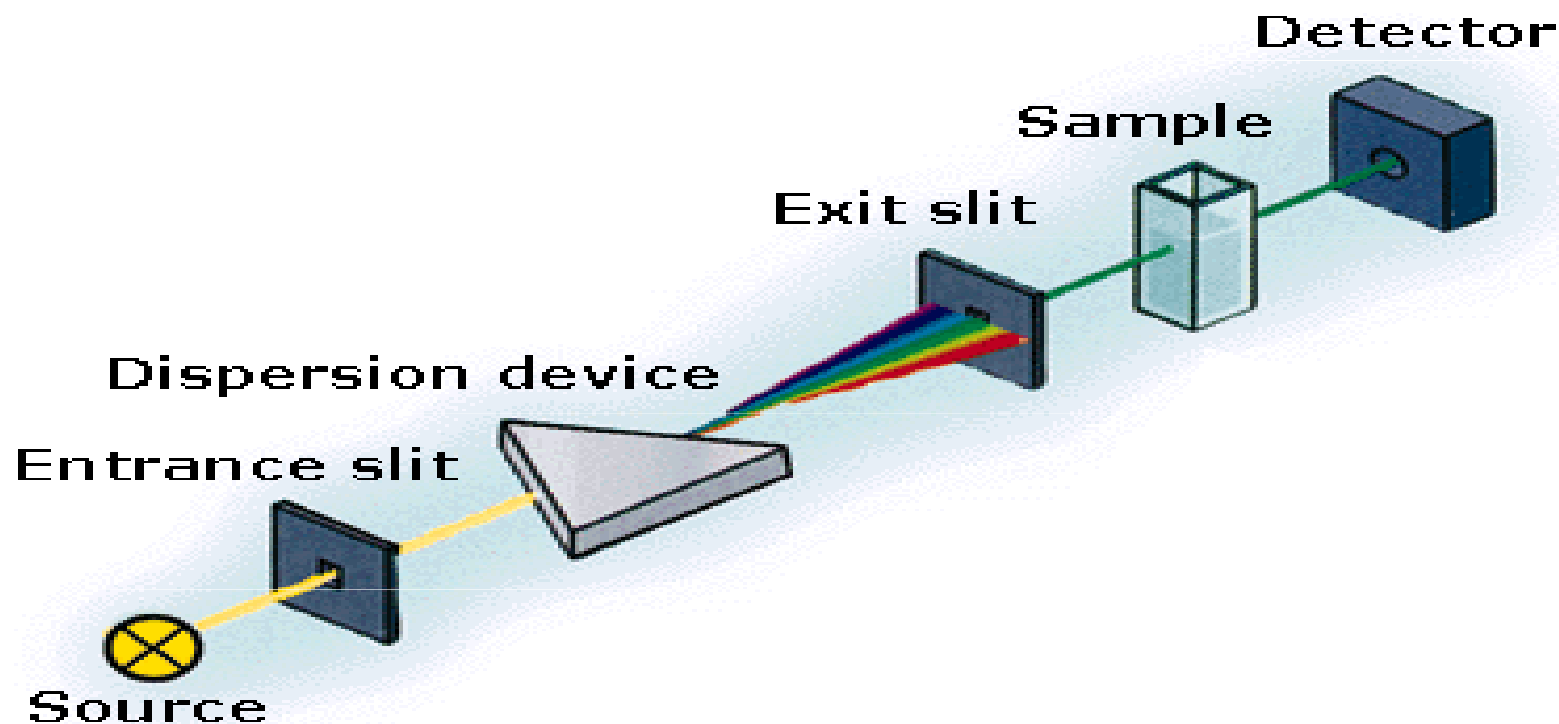
b – vrstva dielektrika o tloušťce  $\lambda/2$

d, e – krycí vrstvy

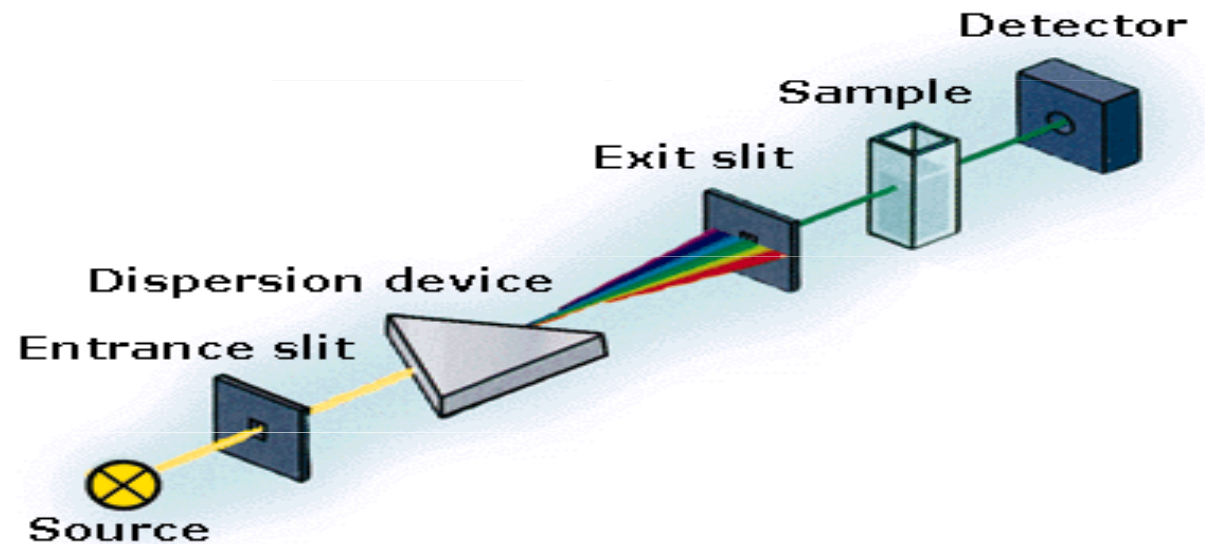
# Spektrofotometr - monochromátory

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

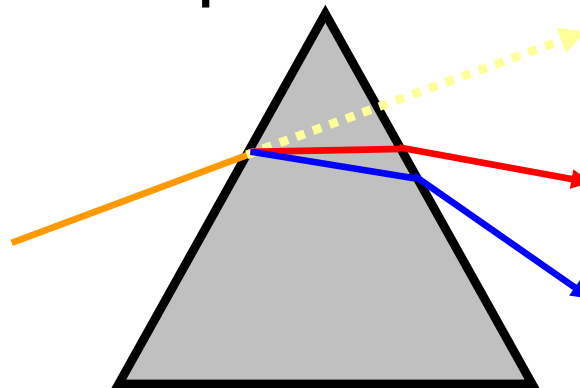
**Čočky** – optický zaostřovací systém

**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

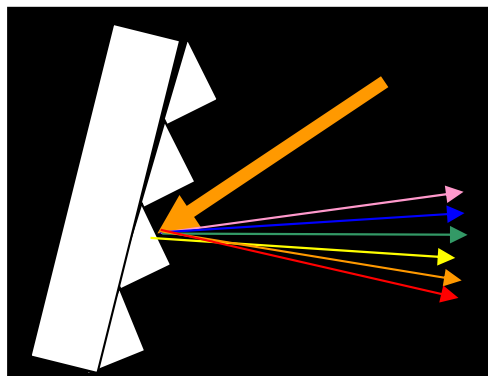
# Disperzní prvek - optický hranol

- 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

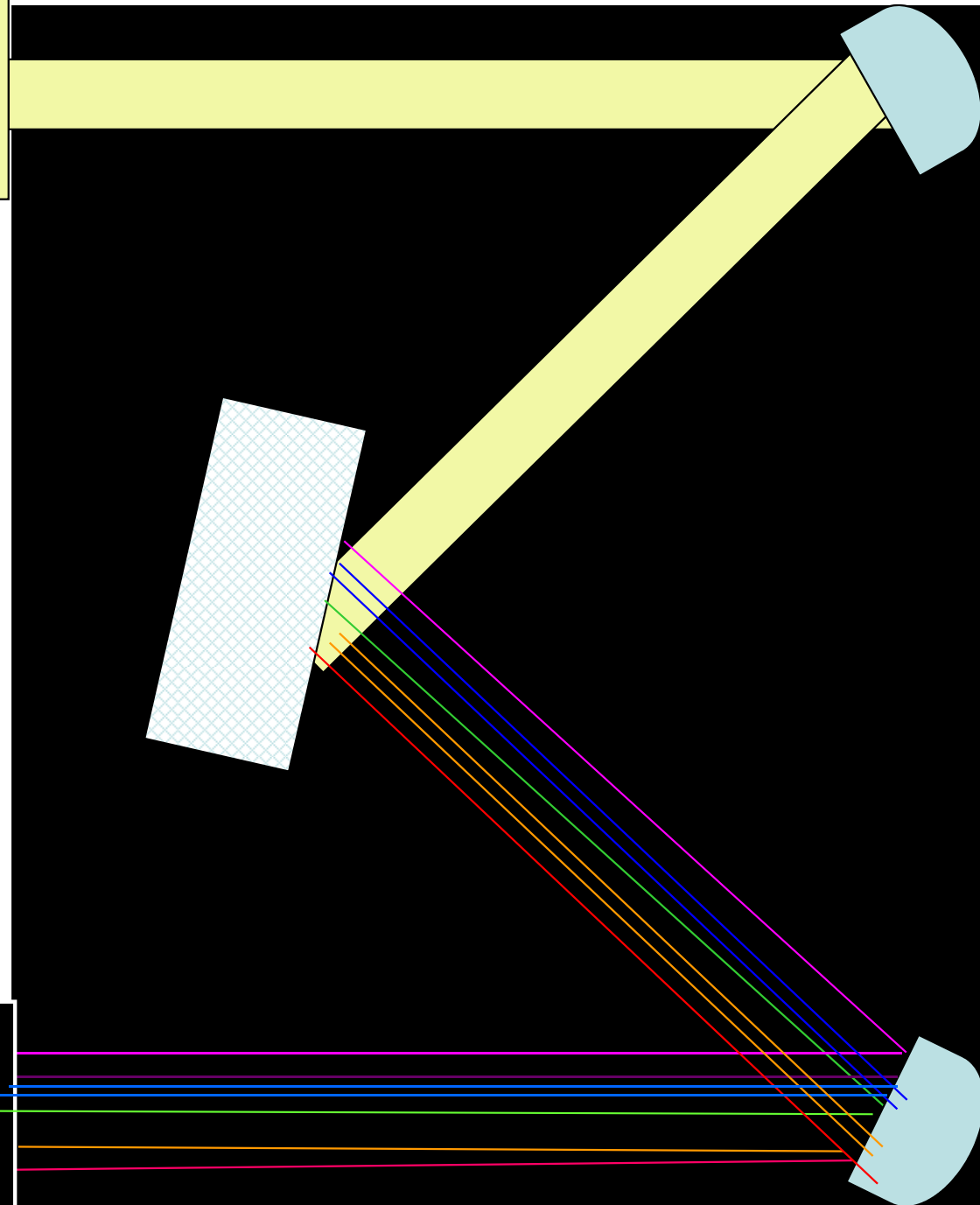
- pracuje na principu odrazu světla
- Je tvořena soustavou jemných rovnoběžných vrypů na skleněné destičce (nejkvalitnější až 1700 /1 mm)
- Na vybroušených ploškách mřížky dochází k složitým optickým procesům-odraz, interference světla, které vedou k tomu, že z mřížky vychází jednotlivé vlnové délky 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

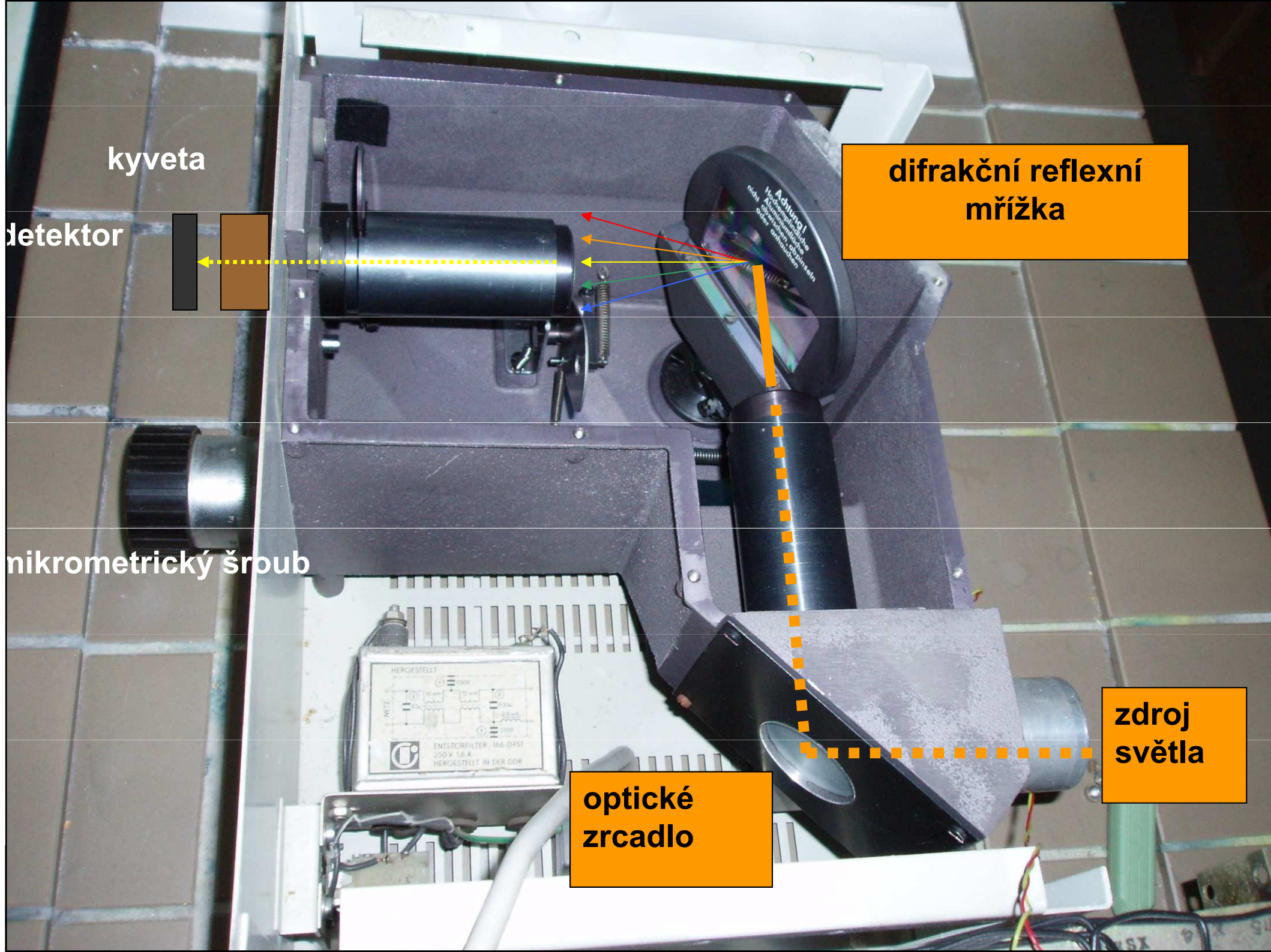


difrakční reflexní  
mřížka

mikrometrický šroub

zdroj  
světla

optické  
zrcadlo



# Spektrofotometr - Absorpční prostředí

## Kyveta s měřeným vzorkem

Rozdělení:

- dle velikosti: Makro- (1-2 ml), semimikro- (<0,5 ml), mikro-(<100  $\mu$ 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



postup miniaturizace kyvet

# Spektrofotometr - detekční systém

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

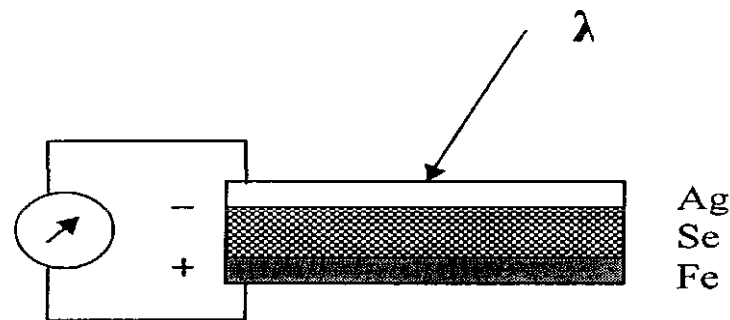
## Detektory

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  $\lambda$  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)

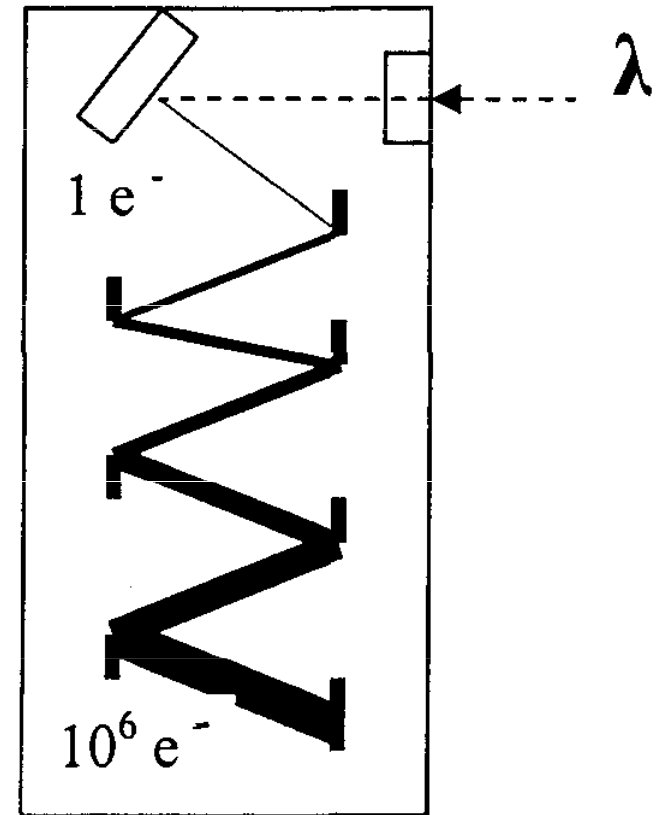


Pracuje na principu fotoelektrického efektu

- 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

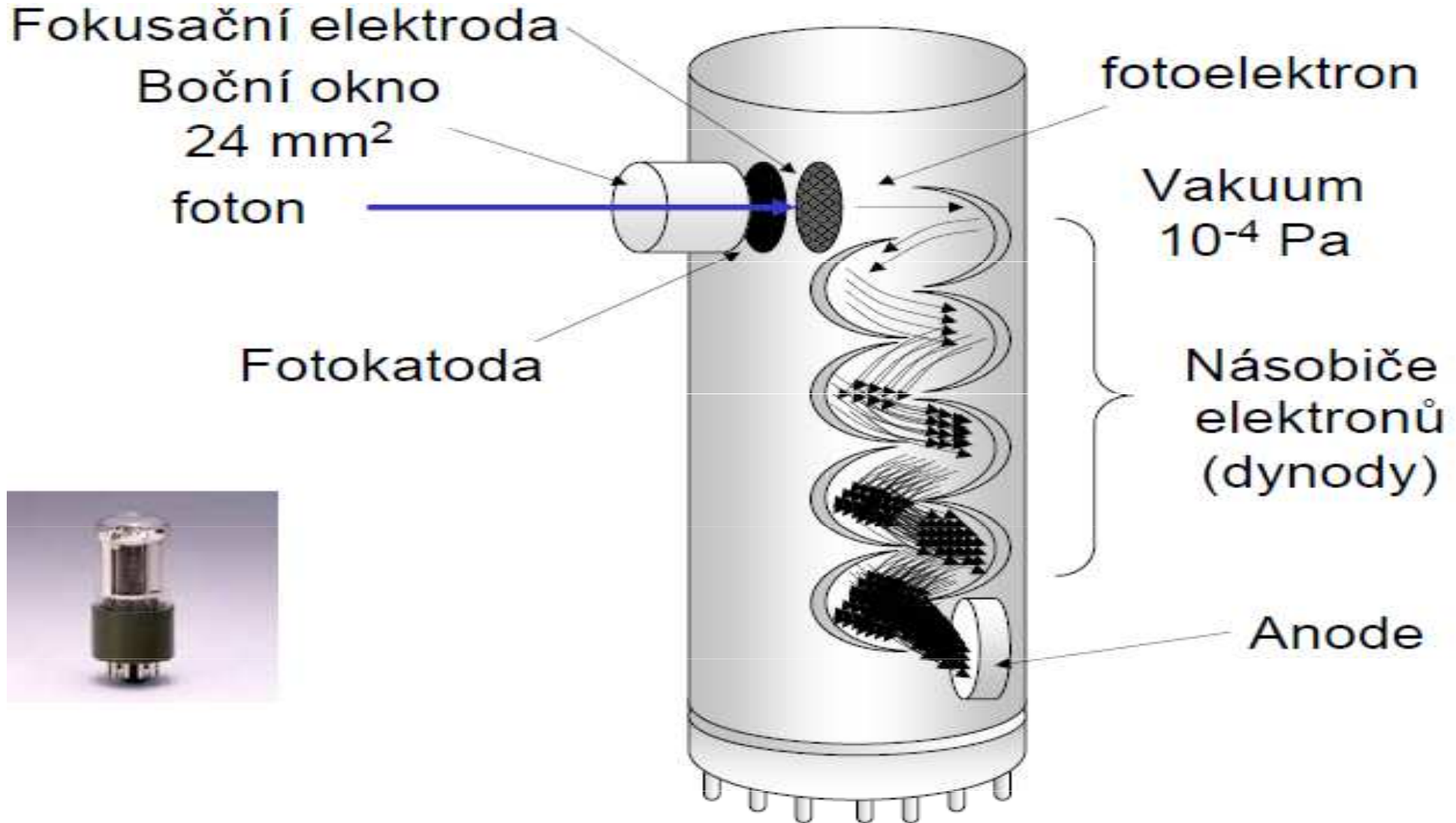
# Detektor - fotonásobič

- 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.

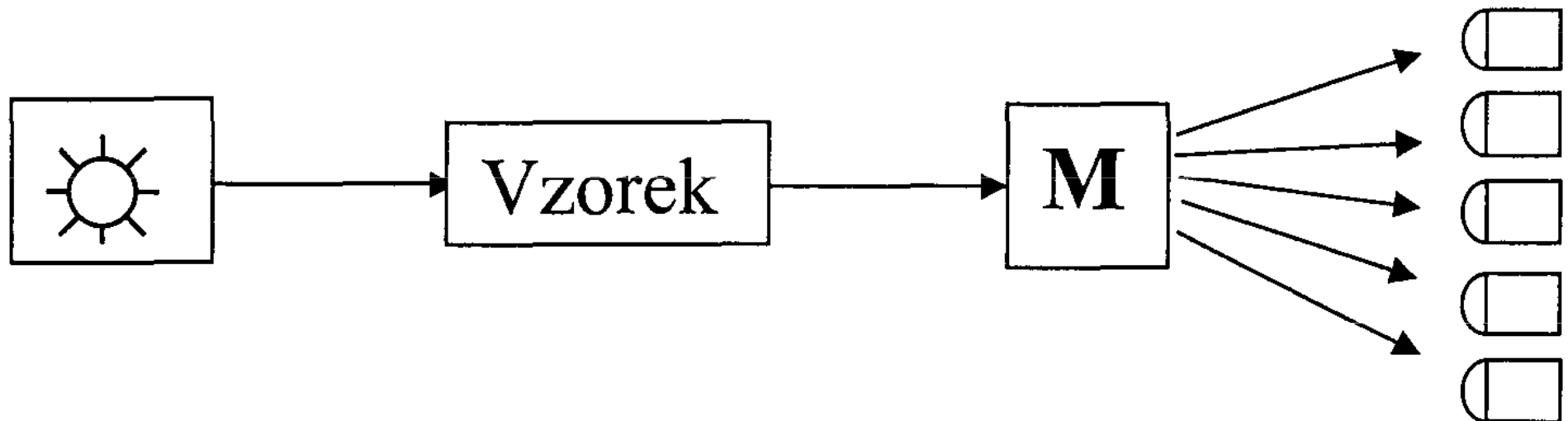
# Detektor - fotonásobič





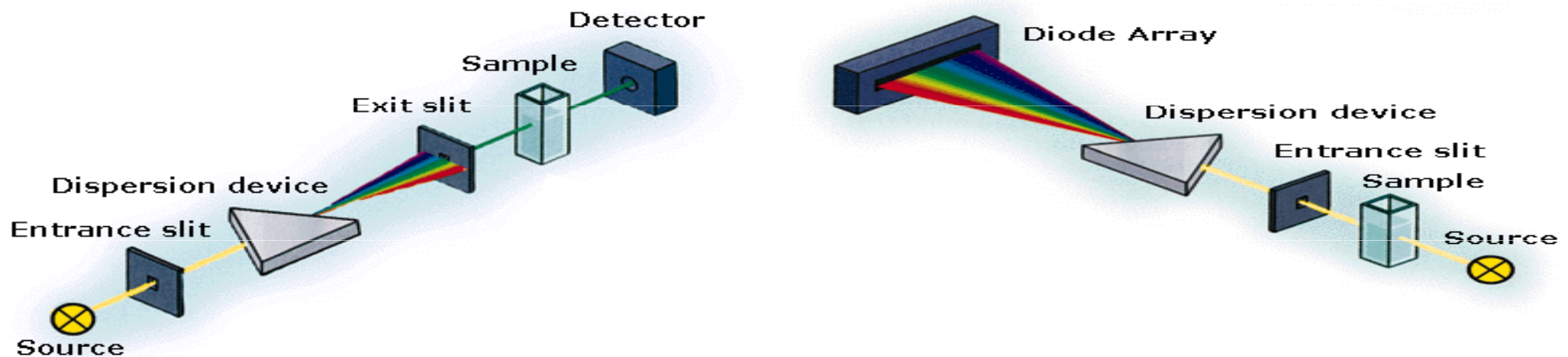
# Detektor s diodovým polem

- Je tvořen velkým množstvím miniaturních fotodiod na malé ploše destičky, na kterou dopadá světelné záření po průchodu absorpčním prostředím a následně je 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

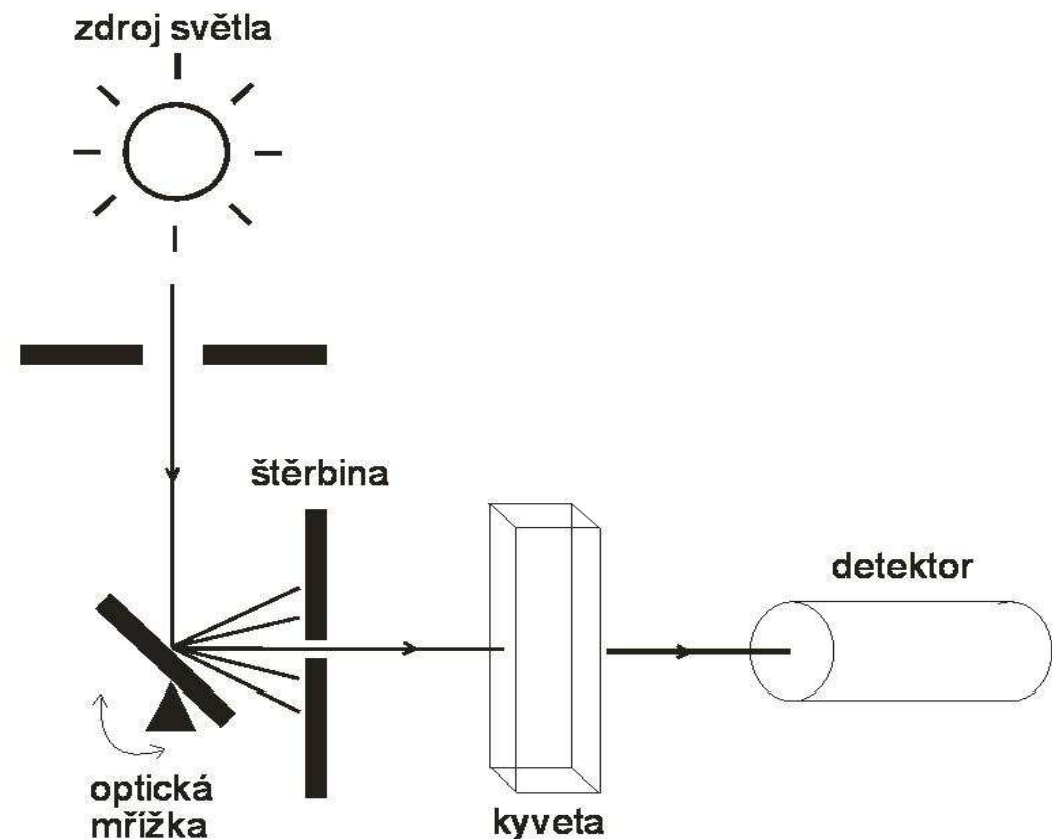


# Konstrukce spektrofotometru

## Jednopaprskové

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

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

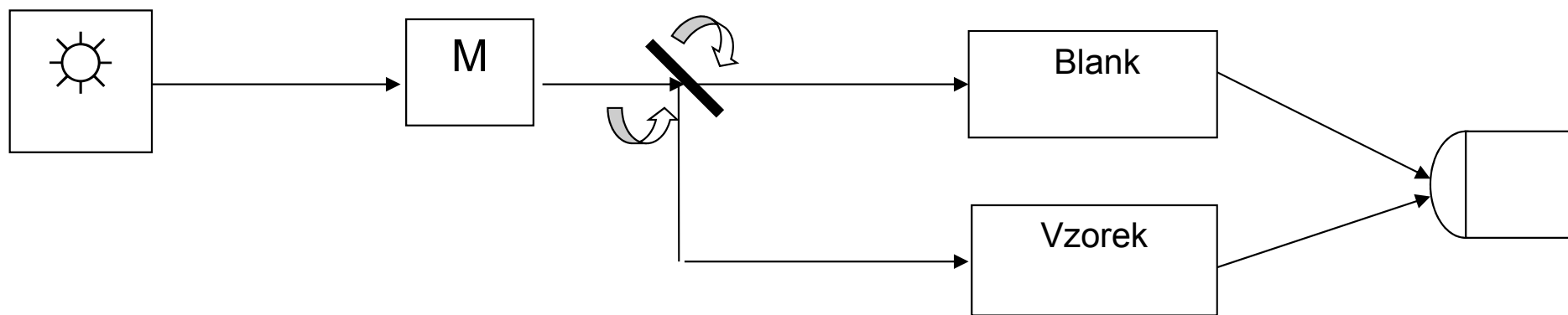
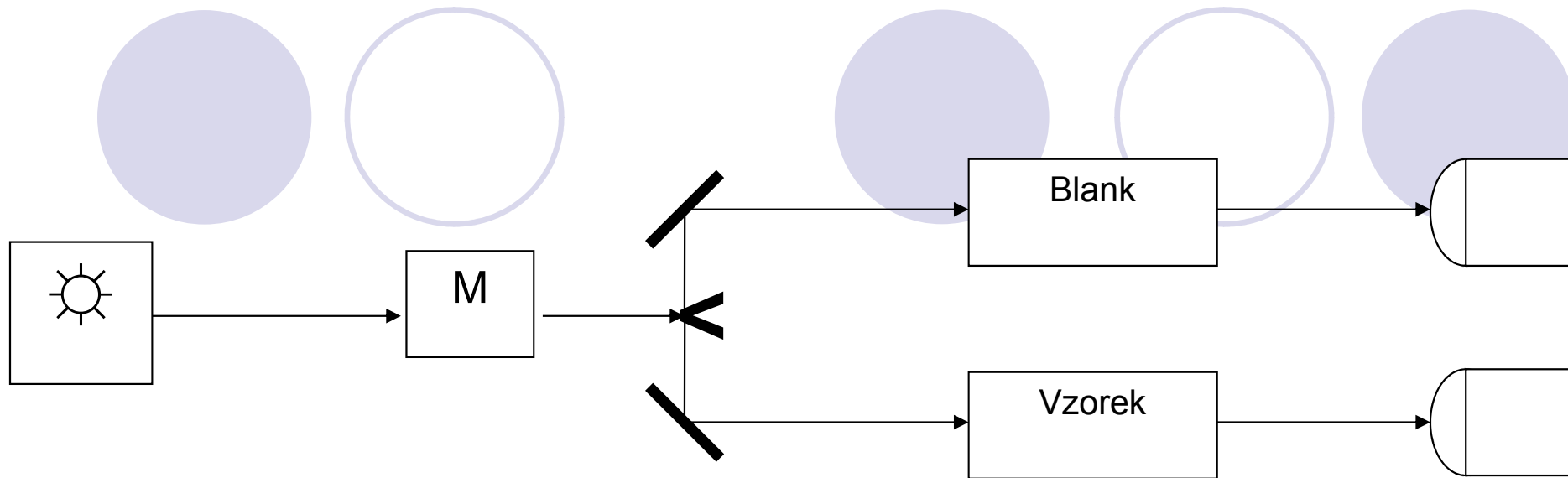


# Konstrukce spektrofotometru

## 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 procházející 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. Povolena tolerance je  $\pm 1-2$  nm.



# Kontrola kvality spektrofotometru

## Rozptýlené světlo

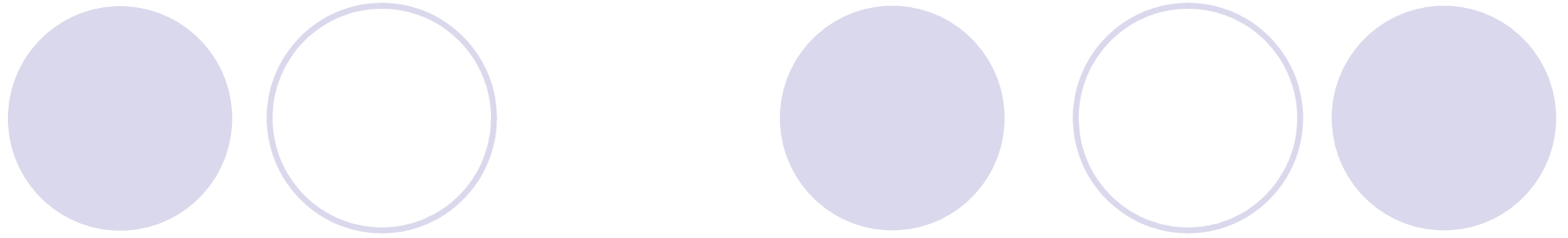
Světlo, které může dopadnout na detektor aniž by prošlo měřeným vzorkem (př. nedokonalé odstínění optického systému spektrofotometru)

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

## Drift signálu

Schopnost detektoru udržovat konstantní hodnotu

- Sledování nulové linie



# Vertikální fotometrie



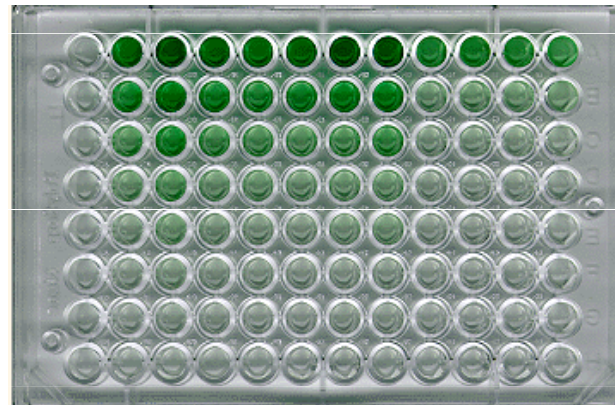
# Vertikální fotometrie

- Spektrofotometrická metoda, s uspořádáním kdy světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru

**Využití :** proměření absorbance v jamkách mikrotitračních destiček, které se používají hlavně pro imunochemická stanovení na principu ELISA (analýzy s navázaným enzymem za využití imunosorbce)

# ELISA - Technická instrumentace

Provádí se ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. **mikrotitračních destiček**.



Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.



# ELISA - Technická instrumentace

Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají **speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček**: je uspořádán tak, že světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru.

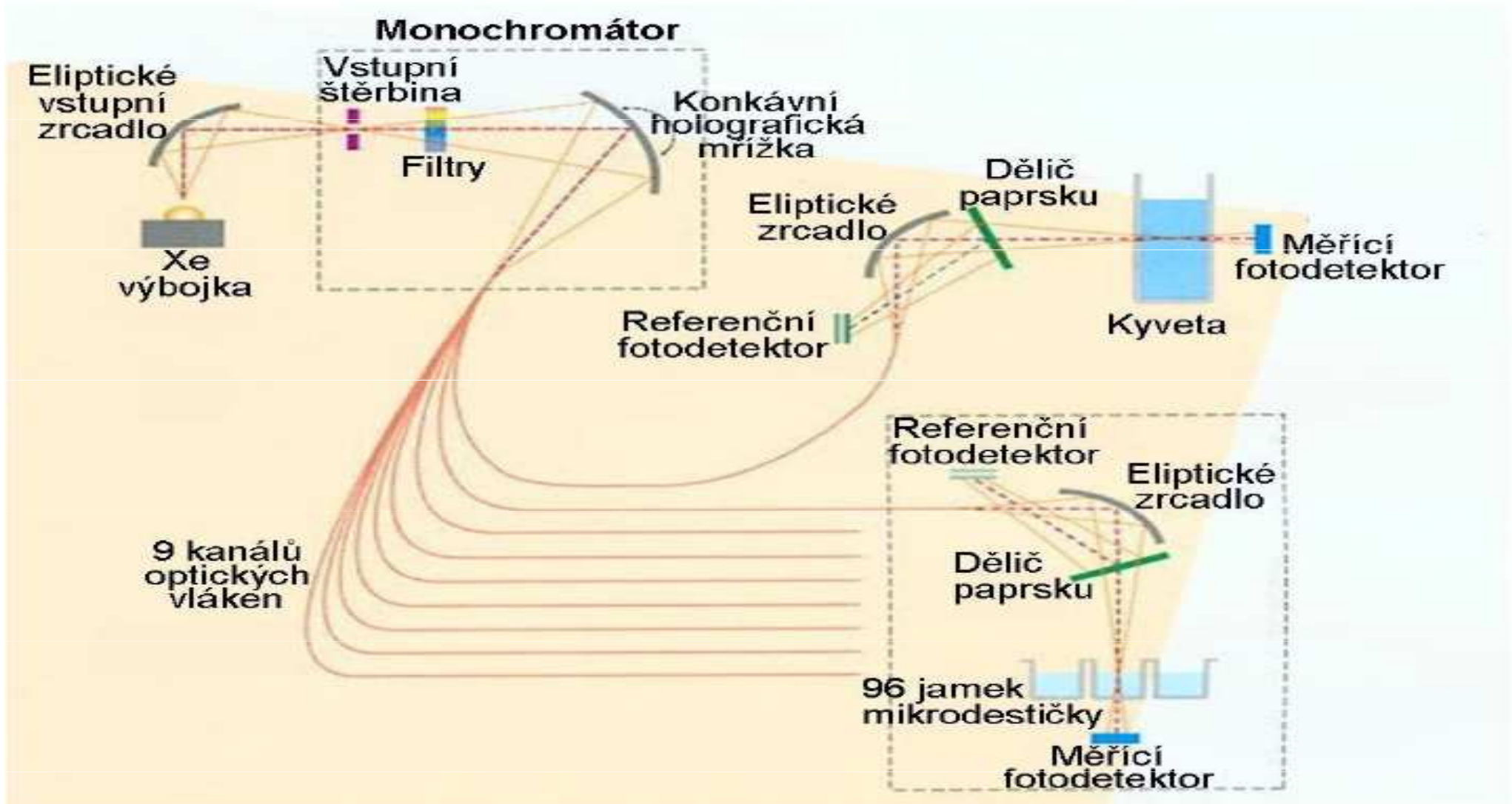


## ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

**Princip:** světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr (podle požadované vlnové délky) do optických kabelů,

- které zabezpečují distribuci do 9 oddělených kanálů: 8 z nich vedou přes jamky mikrotitrační destičky a dopadají na pole fotodiod, které detekují intenzitu světla.
- Devátý optický kabel je použit na kontrolu intenzity záření vycházejícího ze zdroje (obrázek č.8).
- Ve zlomku vteřiny se změří celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující.

# ELISA reader (vertikální spektrofotometr)







## ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

### Součásti vertikálního fotometru:

- **zdroj záření:** nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka.
- **Interferenční filtry:** jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro  $\lambda$  400-800 nm).
- **Optický systém:** se skládá 9 optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky).
- **Detektor:** používají se fotodiody.

Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička - 96 jamek).



# Vertikální fotometrie

- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje **kalibrací**. Obvykle se změří absorbance **6-ti standardních roztoků** o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce.



# Vertikální fotometrie



- Při ELISA metodě se vyžaduje měření všech vzorků v duplikátech.
- Poté software přístroje sestrojí kalibrační křivku (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x), ze které odečte hodnoty koncentrací neznámých vzorků
- Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků.

# ELISA automatická linka

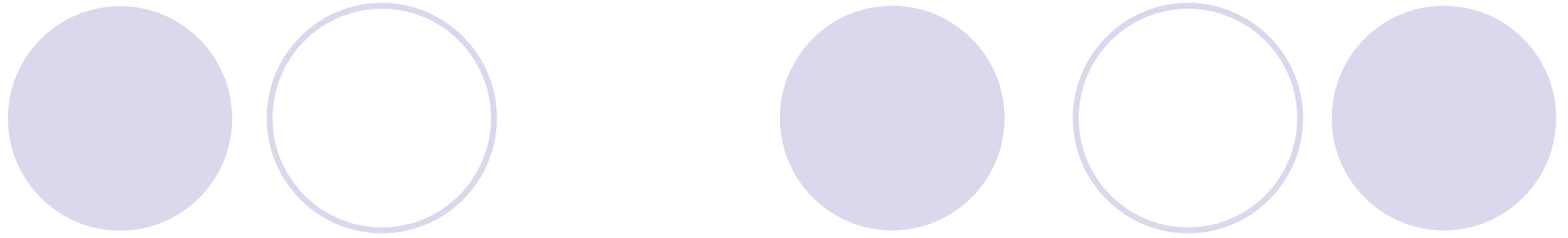


- Automatická linka provádí:
- automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému (2, 4, 8 jehel).
- Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje pozitivní identifikaci patientských vzorků.
- Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček.
- Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků),
- promývačky a readeru mikrotitračních destiček.
- Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene. S
- systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.

# ELISA automatická linka

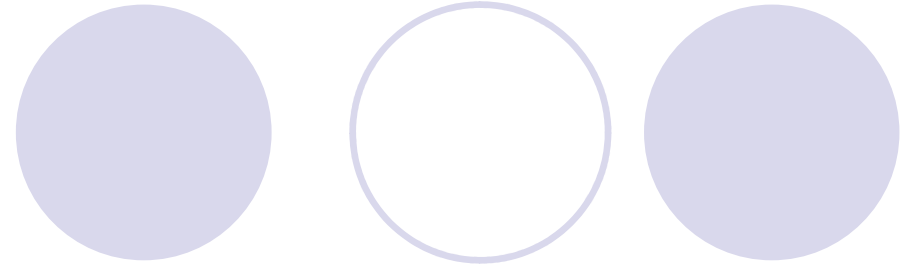


- Velkou výhodou automatické linky je použití čárových kódů, a tím zabránění záměny mezi vzorky. Dále je to přesnost pipetování vzorků a reagenscií, vysoká kapacita přístroje.
- Nevýhodou je vyšší spotřeba používaných reagenscií.



# Reflexní fotometrie

# Reflexní fotometrie



## Princip

- měření intenzity záření odraženého od neprůhledné (homogenně zbarvené) podložky. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy
- Použití: suchá chemie, močová analýza, denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatografů

# Reflexní fotometr

- Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi. Pevná fáze slouží jako nosič obsahující činidla aktivovaná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném biologickém materiálu (krev, moč).
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.(matrice)

# Reflexní fotometr - pevná fáze (matrice)

- Činidla jsou v reagenční zóně proužku impregnována vlákna proužku (fy Roche, Reflektion)
- Činidla jsou nanášena v reagenční zóně proužku jako vícevrstevný film (fy Kodak)

# Reflexní fotometr

Odraz světla od reagenční zóny:

- zrcadlový – na reflexní ploše zrcadla
- difuzní - je výsledkem interakce dopadajícího světla s molekulami reakční zóny (zahrnuje i absorpci a rozptyl)



# Hlavní komponenty reflexního fotometru

Zdroj záření:

- halogenová lampa
- xenonová výbojka
- světloemitující dioda

# Hlavní komponenty reflexního fotometru

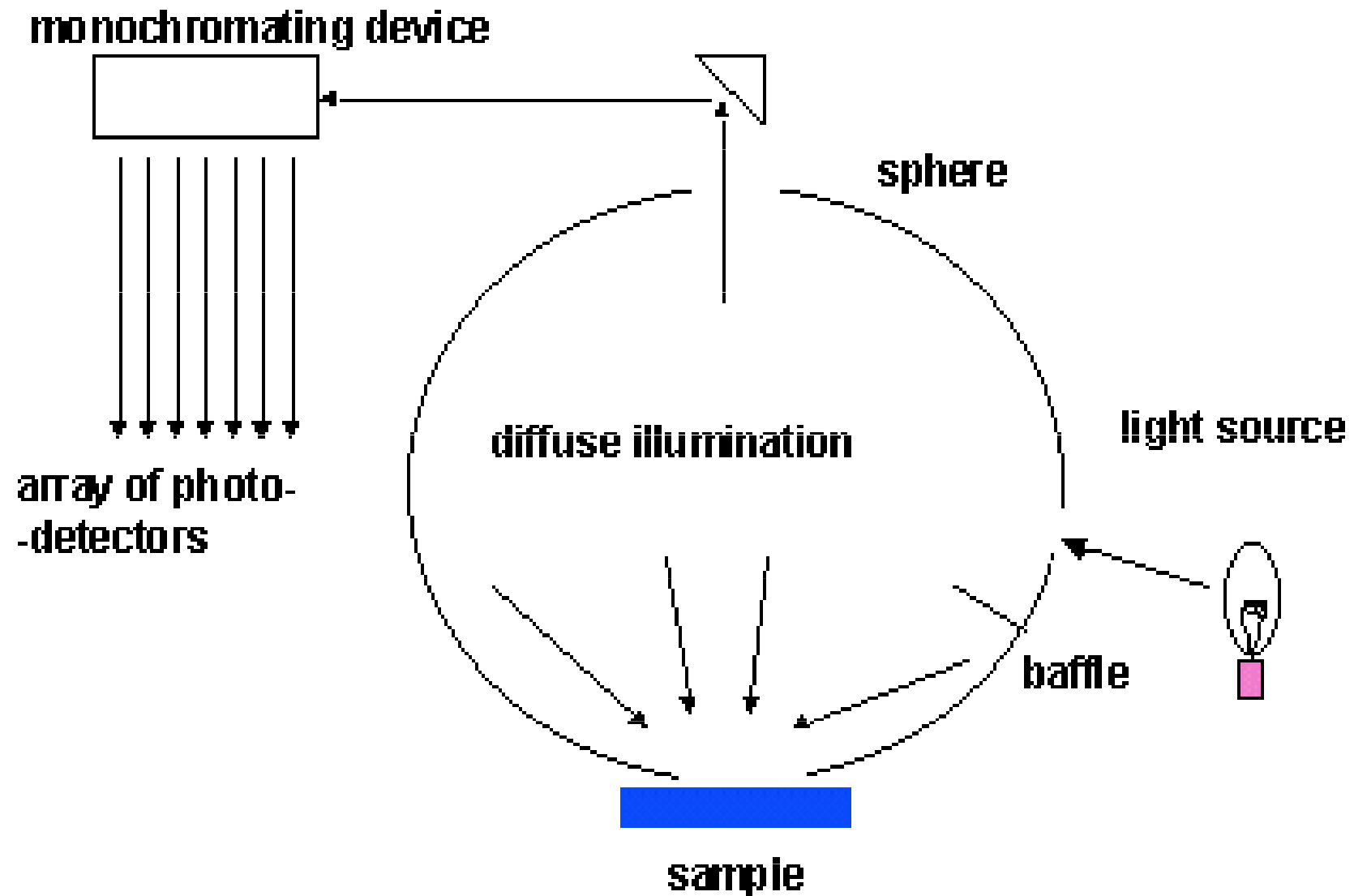
## Ulbrichtova koule (jako zdroj difuzního světla):

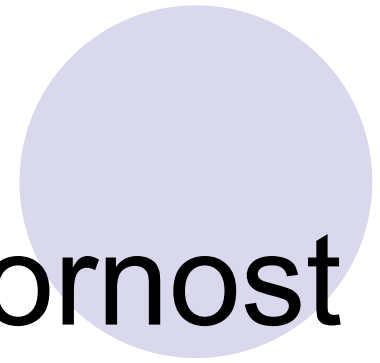
- dutá koule jejíž vnitřní povrch je potažen vysoce reflexním materiálem (síran barnatý).
- Světlo ze zdroje se po vstupu do koule mnohonásobně odráží od stěn a jako dokonale difuzní dopadá na reagenční plošku

# Hlavní komponenty reflexního fotometru

- **Detektor záření:**
- uvnitř koule jsou umístěny dva detektory.
- Jeden měří světlo difuzně odražené od reagenční plošky a druhý je referenční

# reflectance spectrophotometer





**Děkuji za pozornost**

