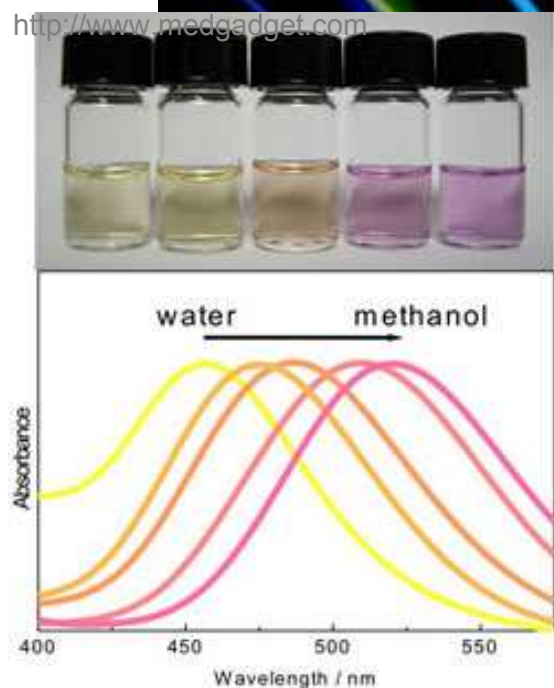


Optická spektrometrie



Vladan Bernard
Biofyzikální ústav, Lékařská fakulta MU

Optické metody

Obecně fyzikální laboratorní metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením, či vyzařování elektromagnetického záření vzorkem

Nespektrální metody – bez výměny energie mezi látkou a zářením, sledovány změny vlastností záření – (rychlost záření, polarizační rovina, rozptyl, ...)

Spektrální metody – výměna energie mezi látkou a zářením

- *emisní interakce*: detekce záření emitovaného vzorkem (dodáním tepla, elektrické energie, elementárních částic ► nestabilní energeticky bohaté stavy ► emise energie)
- *absorpční interakce*: detekce absorpce záření vzorkem

Optická absorpční spektrometrie

- Absorpce elektromagnetického záření vzorkem
- Závislost odezvy vzorku na spektrálním složení dopadajícího elektromagnetického záření
- Odezva podmíněna strukturou energetických hladin molekul vzorku, vnějším molekulárním pohybem a mezimolekulárními interakcemi
- Kvalitativní analýza vzorku dle vyhodnocení průběhu absorpčních spekter a polohy jednotlivých absorpčních maxim (λ)
- Kvantitativní analýza vzorku dle „výšky signálu“ absorpčních maxim, hodnoty absorbance

Elementární znalosti středoškolské optiky

Pole elektromagnetického záření:

- superpozice rovinných harmonických vln vektorů pole (složka elektrická a magnetická)
- soubor elementárních částic pole – fotony

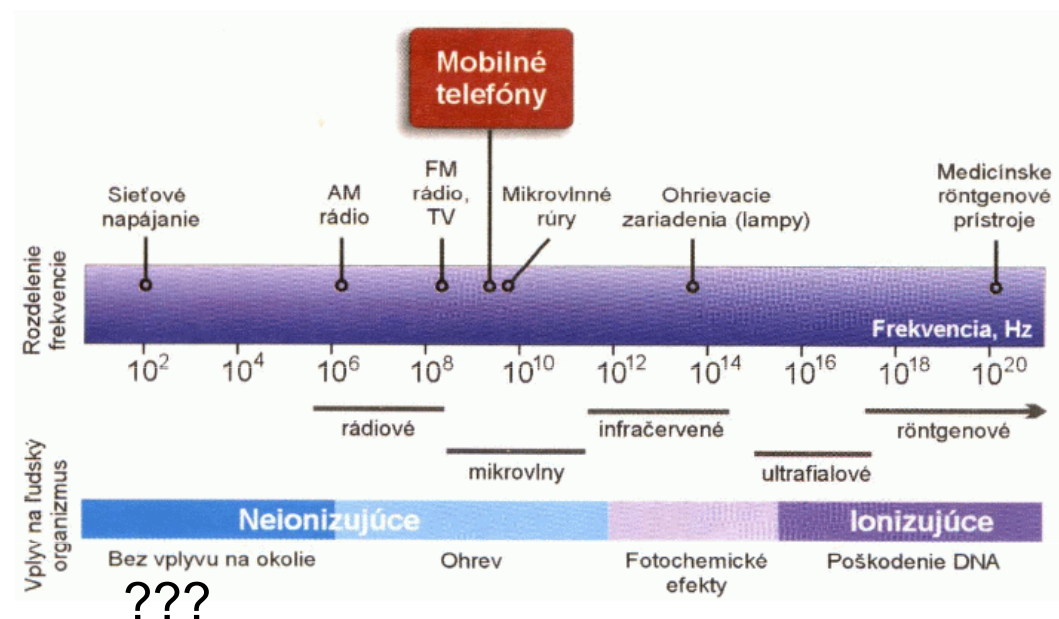
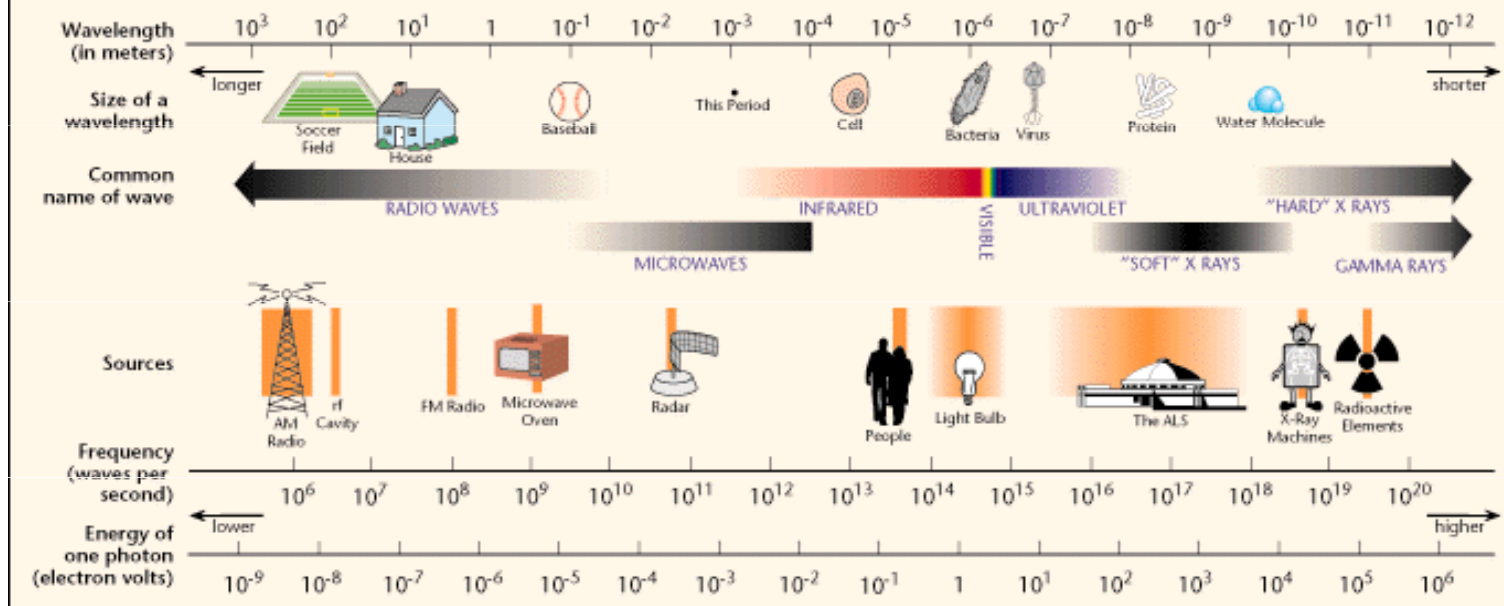
Charakteristika elektromagnetického záření:

- frekvence f
- vlnová délka λ
- fázová rychlost $\mathbf{v}$ ($\mathbf{v} = \lambda \cdot f$)
- energie fotonu E_p ($E_p = h \cdot f$), h - Planckova konstanta

Elektromagnetická vlna
$$u = U_m \cdot \sin 2\pi \left(\frac{t}{T} - \frac{x}{\lambda} \right)$$

u - okamžitá hodnota velikosti vektoru, U_m - amplituda vektoru, t - čas šíření,
 T - perioda, x - vzdálenost od zdroje, λ - vlnová délka

THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



Elementární znalosti středoškolské optiky

Fázová rychlost elektromagnetické vlny v , $v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}$

ϵ - permitivita prostředí, μ - permeabilita prostředí

- Index lomu n , $n = \frac{c}{v}$

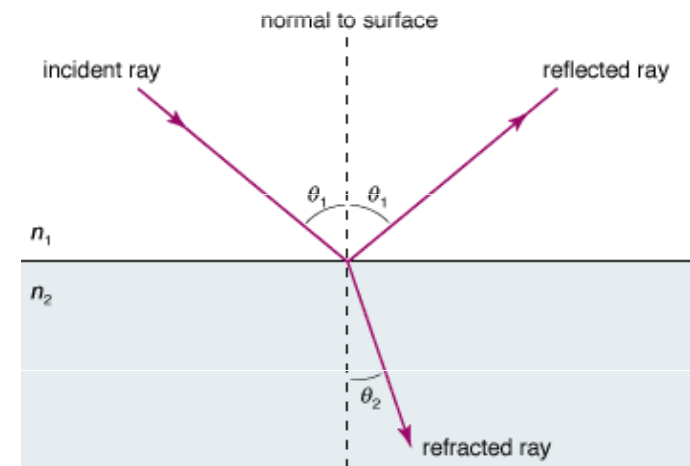
v - rychlost světla v daném prostředí

- Zákon odrazu $\alpha = \alpha'$
- Snellův zákon lomu $n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta$
- Rychlost světla ve vakuu c , $c = 299\,792\,458 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

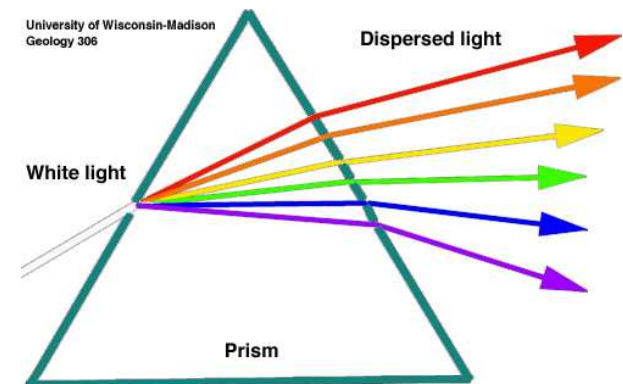
- Disperze - index lomu n klesá u normální disperze s vlnovou délkou dle Cauchyova disperzního vzorce:

$$n = A + \frac{B}{\lambda^2} \quad \text{A, B materiálové konstanty}$$

- Polarizace



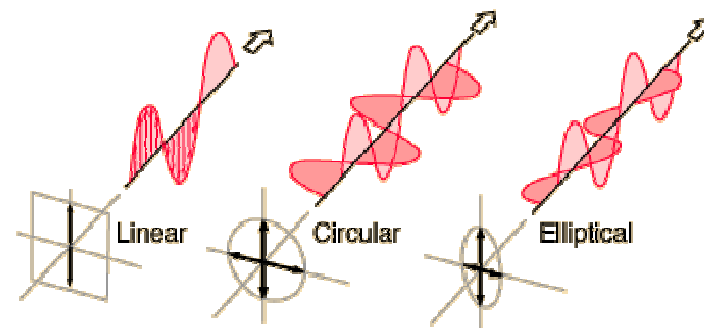
© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.



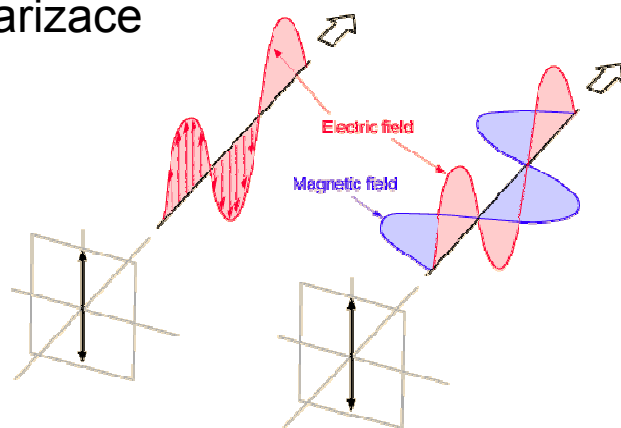
<http://seismo.berkeley.edu>

Polarizace elektromagnetické vlny

Polarizace elektromagnetického záření –
geometrie kmitů vektorů elektromagnetického
pole

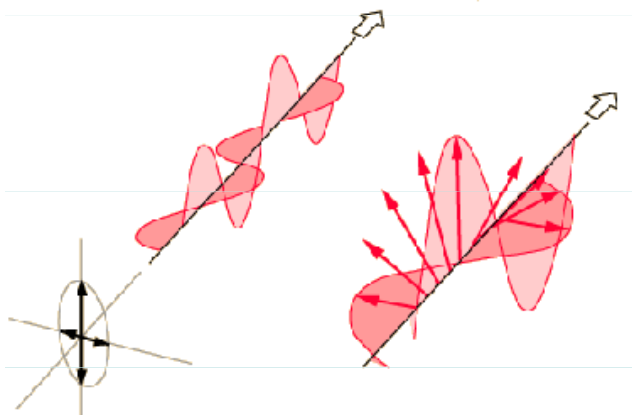


- lineární polarizace

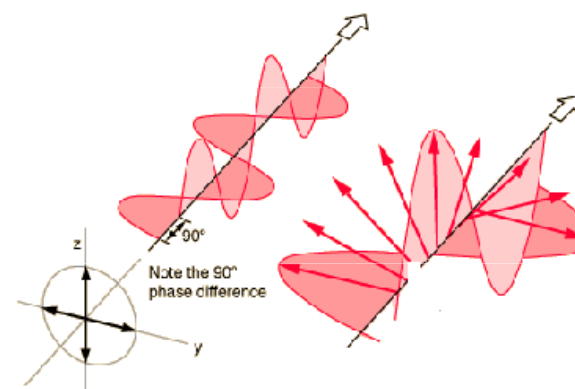


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/waveform3d/index.html>

- eliptická polarizace



- cirkulární polarizace



Rotace vektoru elektrického pole
a jeho komponenty v ose x a y

Absorpční spektrometrie

Dělení: *elektronová* (VIS, UV) absorpční spektrometrie – $\lambda < 1 \mu\text{m}$
vibrační (IF) absorpční spektrometrie – nejčastěji λ od $3 \mu\text{m}$ do $25 \mu\text{m}$ (celé spektrum $1 \mu\text{m}$ až $1000 \mu\text{m}$)

Průchodem elektromagnetické vlny prostředím dochází k snižování její intenzity.

Velikost útlumu monochromatické vlny charakterizuje **absorbance A**.

I_{λ_0} je počáteční hodnota intenzity elmag. vlny, I_{λ} je velikost intenzity elmag. vlny po průchodu látkou

$$A_{\lambda} = \log \frac{I_{\lambda_0}}{I_{\lambda}}$$

Závislost absorbance A_{λ} na uražené dráze x elmag. vlny v prostředí popisuje LAMBERTŮV zákon: $A_{\lambda} = b_{\lambda} \cdot x$, kde b_{λ} je absorpční (extinkční) koeficient

Lambertův zákon (LZ) platí pro jednofotonovou absorpci v látkách, u nichž procházející záření nenarušuje původní termodynamickou rovnováhu. Možné odchylky od LZ u biologických materiálů způsobeny např. fotochemickými reakcemi, zvýšením teploty, aktivací chemických reakcí a pod.

Koncentrační závislost absorpčního koeficientu b popisuje BEERŮV zákon (BZ): $b = \varepsilon \cdot c$, kde ε je molární absorpční (extinkční) koeficient, charakterizující absorbující látku. Symbol c zastupuje molární koncentraci roztoku.

Spojením LZ a BZ: **LAMBERT-BEERŮV zákon** $A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot x \cdot c$

Měření absorpčních spekter – měření propustnosti

- Transmittance (propustnost elektromagnetického vlnění vzorkem)

$$T: \quad T_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda 0}}$$

- Úpravou vztahu pro absorbanci, dostáváme vztah pro T: $T_{\lambda} = 10^{-\varepsilon_{\lambda} \cdot x \cdot c}$

- Relativní transmittance T_{rel} : $T_{\text{rel}\lambda} = \frac{I_{v\lambda}}{I_{\text{ref}\lambda}}$

Kde $I_{v\lambda}$ je intenzita elmag. vlny vystupující ze vzorku a $I_{\text{ref}\lambda}$ je intenzita elmag. vlny vystupující z čistého rozpouštědla.

Interakce elektromagnetické vlny s prostředím

- Energie fotonů se může při interakci s molekulou látky transformovat na energii **přechodu elektronu** na vyšší energetickou hladinu, na energii přechodu mezi dvěma **vibračními stavy** či energii přechodu mezi **stavy rotačními**.
- Absorbující atomy v molekule organické látky se nazývají **chromofory**
- Oblast IF – dochází při interakci molekul s fotony ke zvýšení jejich vibrační a rotační energie – rotačně vibrační spektra
- Oblast UV, VIS – silná absorpce, v biol. mat. zejména bílkovinami a NK, interakce fotonů elektromagnetického záření s konjugovanými dvojnými vazbami látky
- Oblast mikrovlnného záření - interakce elektromagnetického záření s rotačními přechody molekul vykazujících permanentní dipólový moment

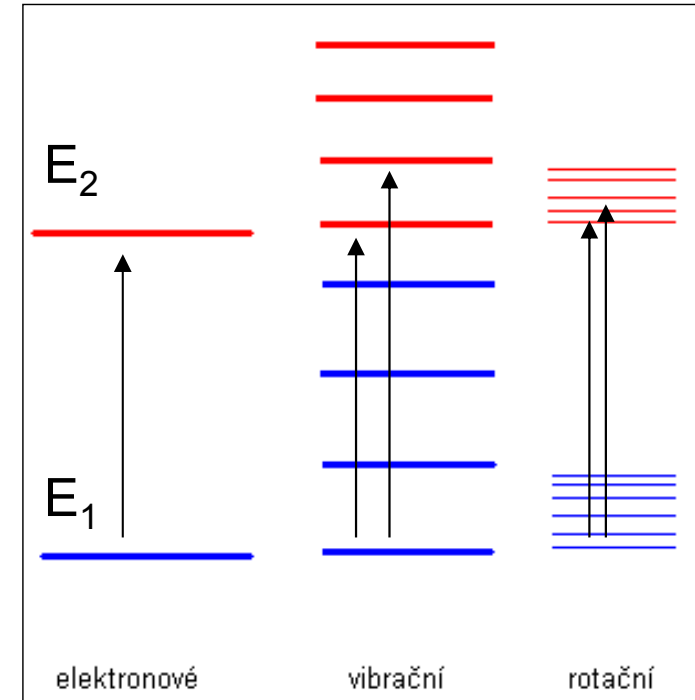
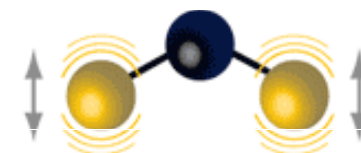


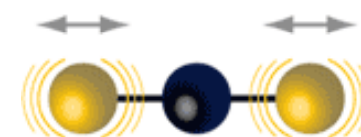
schéma přechodu elektronu při absorpci UV nebo VIS záření molekulou

Infračervená spektrometrie

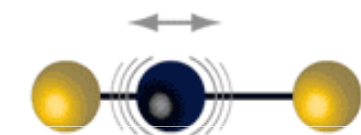
- energie elektromagnetického záření pro tyto vlnové délky ($E = h \cdot f$) natolik malá, že nepostačuje při její absorpci na změny elektronových stavů molekul, dostatečná ale na změny rotačních a vibračních stavů molekul
- pásové absorpční spektrum
- rotační pohyb – rotace molekuly kolem svého těžiště, detekce u kapalin a tuhých látek obtížná
- vibrační pohyb – změna délky vazby a změna vazebného úhlu



vibrace deformační



vibrace valenční



Absorpční spektrometr

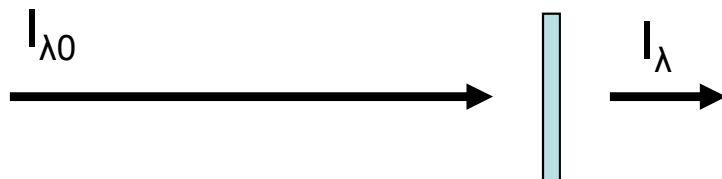
Přístroj pro měření spekter propustnosti – **absorpční spektrometr**

Část optická: zdroj záření, monochromátor, detektor, vzorková část, optické prvky

Část elektromechanická: pohyb monochromátoru, měřič signálu detektoru, výstupní a záznamová zařízení

Spektofotometr

- jednopaprskový (spektrokolorimetr) a dvoupaprskový
- statický vzorek (kyveta) X průtočný systém
- UV, VIS, IF spektrum



Absorpční spektrometr

Zdroj elmag. záření

- tělesa rozžhavená el. proudem (wolframová či uhlíková vlákna žárovek – IR a VIS spektrum, halogenové žárovky – VIS spektrum, Nernstův hořák – žhavená keramická tyčinka světlo o 2-50 μm , deutériová lampa – UV oblast)
- výbojky (čárové i spojité spektrum)

Speciální spektroskopické metody využívají také elmag. synchrotronové záření (vznik při pohybu nabitě částice, spojité spektrum v UV oblasti)

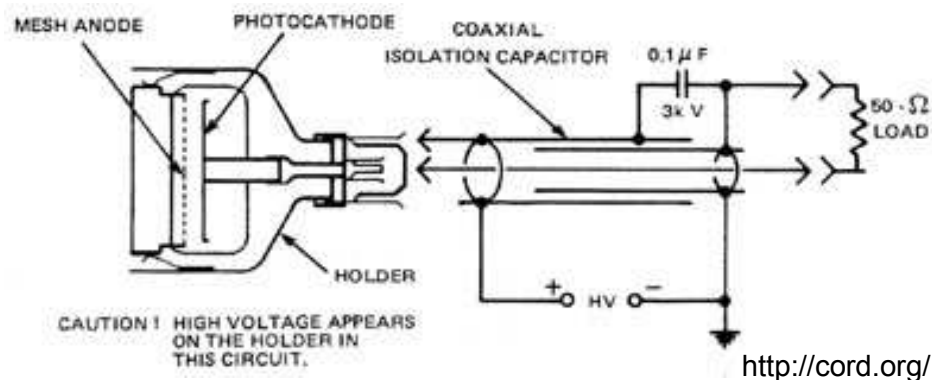
Monochromátor

- vstupní štěrbina
- disperzní prvek (hranol, mřížka), rozptyl záření dle λ , natáčecí element
- výstupní štěrbina (výstup záření o konkrétní λ)

Detektor záření (podmínky: spektrální citlivost, poměr mezi signálem a šumem, linearita odezvy, časová odezva, ...)

- termální detektory (široká spektrální citlivost, dopadající energie elmag. záření způsobuje teplotní změnu detektoru – termočlánek, termistor, bolometr, Golayova cela – změna objemu plynu, pyroelektrický jev – změna rozložení náboje)
- polovodičové detektory (fotovoltaický článek, polovodičová fotodioda)
- fotoemisní detektory (založeny na vnějším fotoelektrickém jevu, vakuová fotodioda, fotonásobiče)

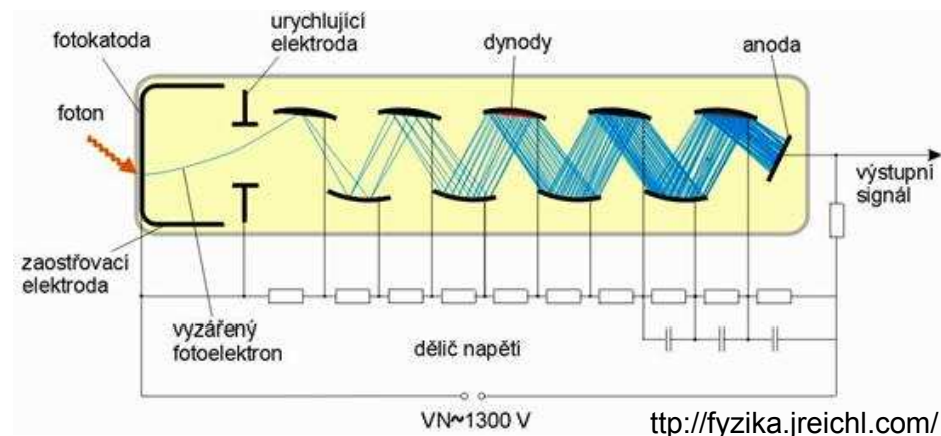
Vakuová fotodioda



Dopadající fotony způsobují uvolňování elektronů z katody do vakua a jejich dopad na anodu – vznik přepětí

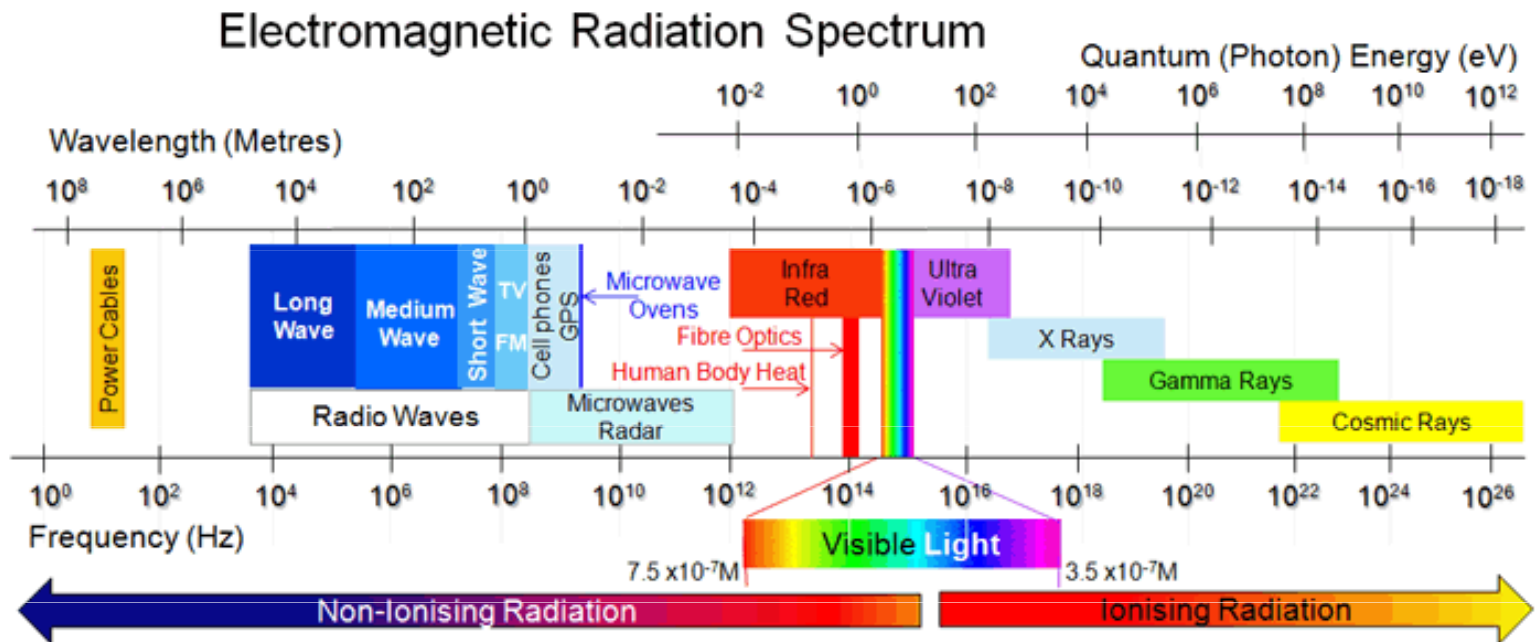
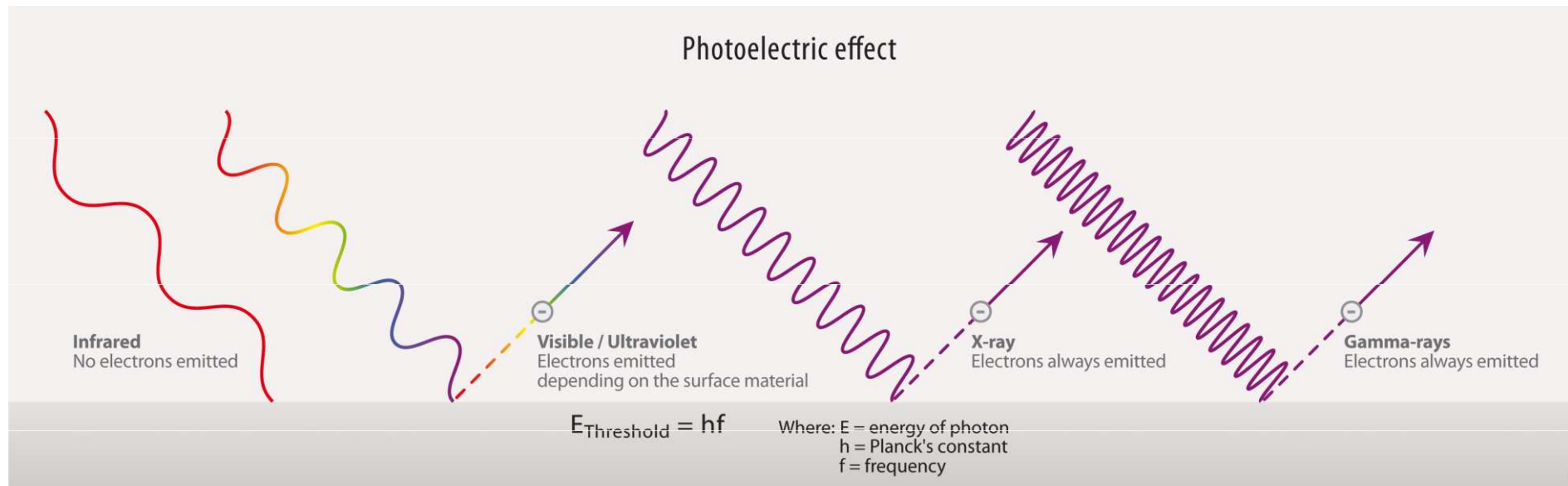


Fotonásobič



Emise elektronů na fotokatodě po dopadu fotonu díky fotoelektrickému jevu, urychlení elektronu elektrickým polem a jeho dopad na dynodu o vysokém kladném potenciálu, sekundární emise elektronů z dynody, ..., dopad elektronů na anodu





Absorpční spektrometr

Kyvety

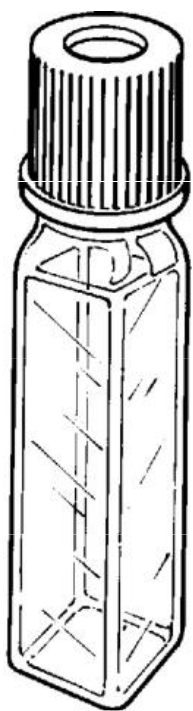
- dle objemu a „tloušťky“ obsaženého vzorku ($V > 3\text{ml}$, $V < 3\text{ml}$, mikrokyvety)
- dle použitého materiálu (sklo VIS, křemenné sklo UV, chlorid sodný IF, polystyren, ...)
- dle spektrální propustnosti
- dle typu vzorků

Příslušenství

- držáky kyvet (cilindrické, mikrokyvety, průtočné kyvety ...)
- termostatované kyvety
- měniče a podavače kyvet
- „Sippery“ - ze software spektrometru řízený systém peristaltické pumpy pro průtočnou kyvetu
- modul integrační koule - umožňuje měření sypkých, pastových a zakalených vzorků
- kalibrační zdroje
- software
- záznamová paměť, vstupy a výstupy



220-900 nm spektrální
rozsah, 70 μ L, analýza
DNA, proteiny



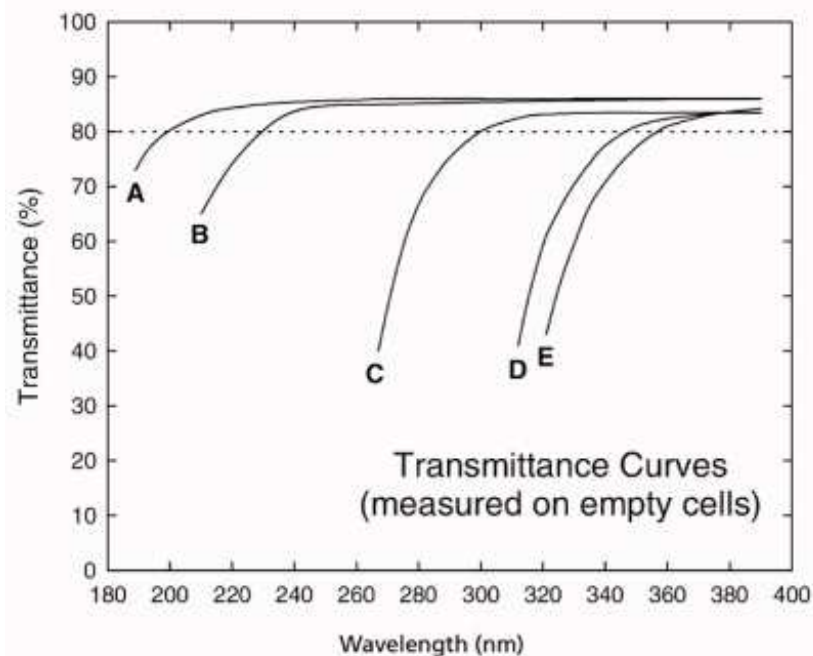
3,5 ml, těkavé materiály



Cuvets

Cuvets are generally considered useful at wavelengths where their transmittance is 80% or greater using an empty cell. Cells filled with distilled water theoretically give transmittance values up to 8% higher because reflective losses are minimized.

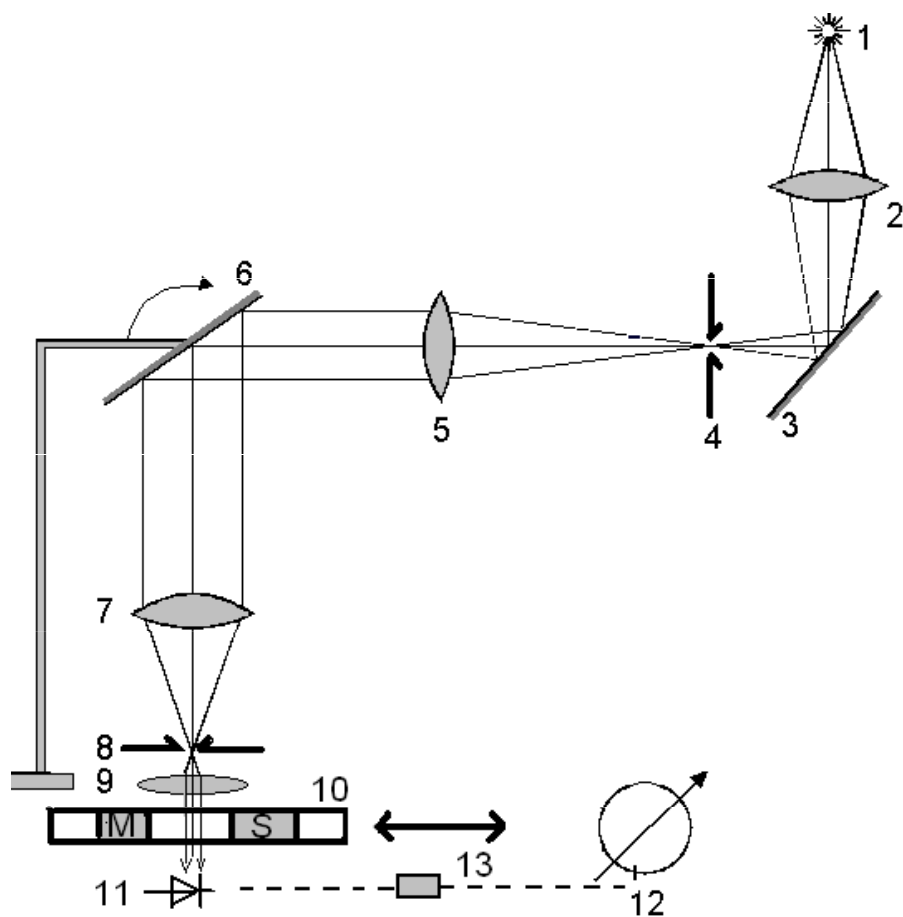
Unless otherwise indicated, outside dimensions are 12.5 x 12.5 x 45 mm, and path length is 10 mm. Cuvets are sold singly, not in pairs. Modern precision manufacturing methods make pre-matching unnecessary.



Spektrální transmittance

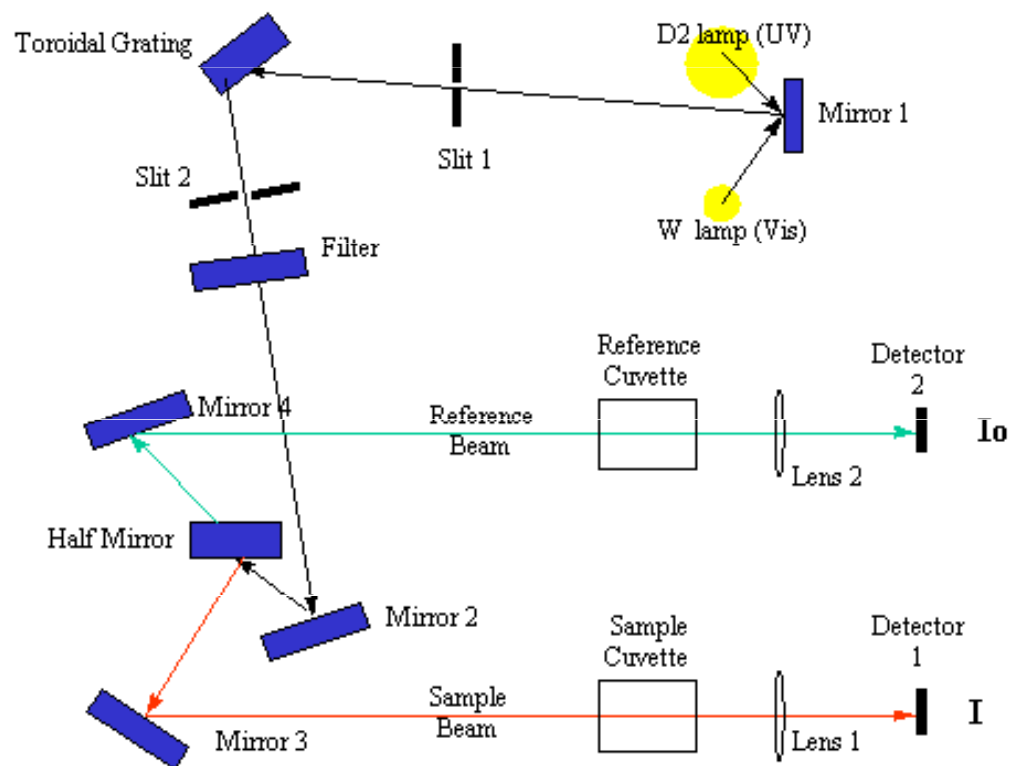
0,75 ml, mikrokyveta

Spektrofotometr jednopaprskový- SPEKOL 11



- 1- zdroj elmag. Záření
- 2- kondenzátor
- 3- zrcadlo
- 4- vstupní štěrba
- 5- kolimátor
- 6- mřížka monochromátoru (změna λ)
- 7- kolimátor
- 8- výstupní štěrba
- 9- kolimátor
- 10- pohyblivý držák kyvet
- M- měřený vzorek
- S- srovnávací vzorek
- 11- vakuová fotonka (detektor)
- 12- měřič signálu, display
- 13- zesilovač signálu

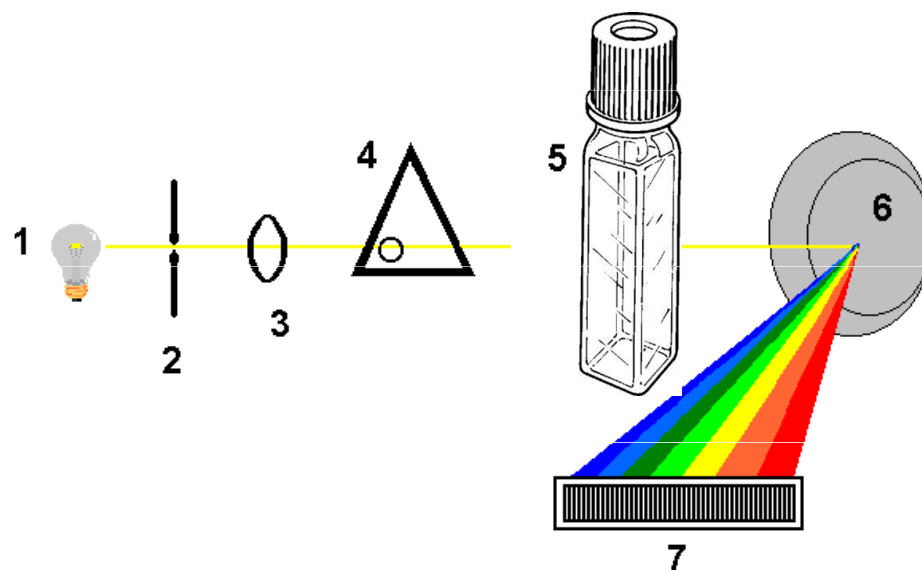




Dvoupaprskový spektrometr,
deuteriový a wolframový zdroj

Průchod elektromagnetického záření přes kyvetu s měřeným vzorkem i kyvetu s referenčním vzorkem

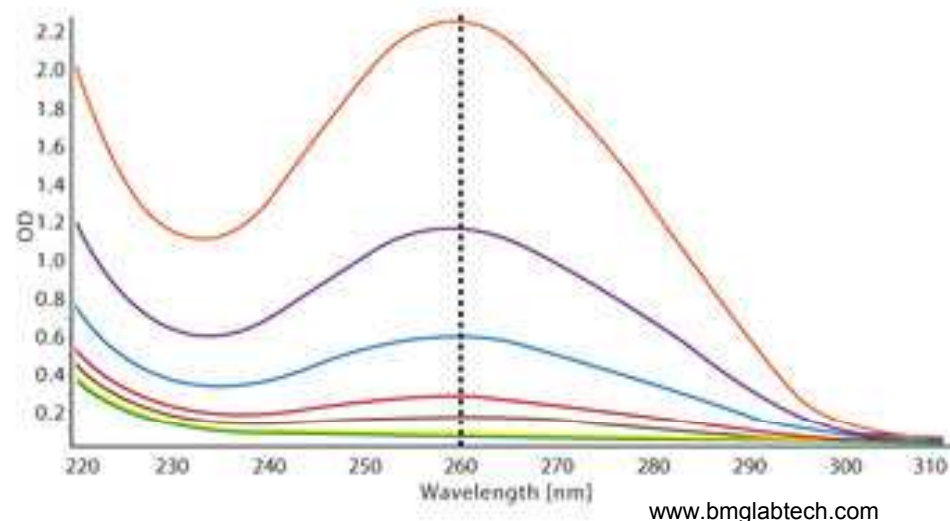
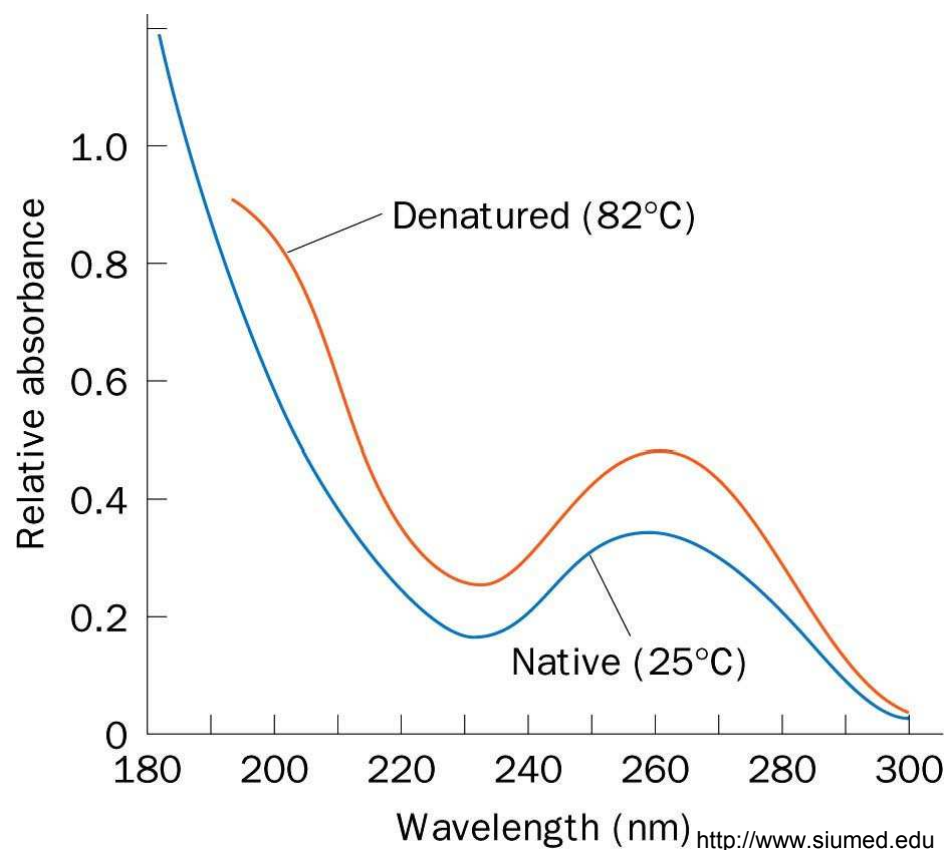
Přístroj s diodovým polem



Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD) snímají celé spektrum v reálném čase. Záření ze zdroje (1) po průchodu štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a kyvetou přístroje (5) se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (6), takže na každou z fotodiod (7) dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu pak vybije kondenzátor, který je úměrný intenzitě dopadajícího záření. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, který je potřebný na dobití příslušných kondenzátorů. Velikost tohoto proudu se ukládá do paměti řídicí jednotky. Tato sekvence vybíjení a nabíjení se velmi rychle opakuje (řádově milisekundy – 10 ms na rozsah 190 až 600 nm) a takto se zaznamenávají údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diod, pak pro spektrální rozsah od 190 do 800 nm je při počtu diod 512 spektrální rozlišení 1,2 nm.

Praktická laboratorní aplikace

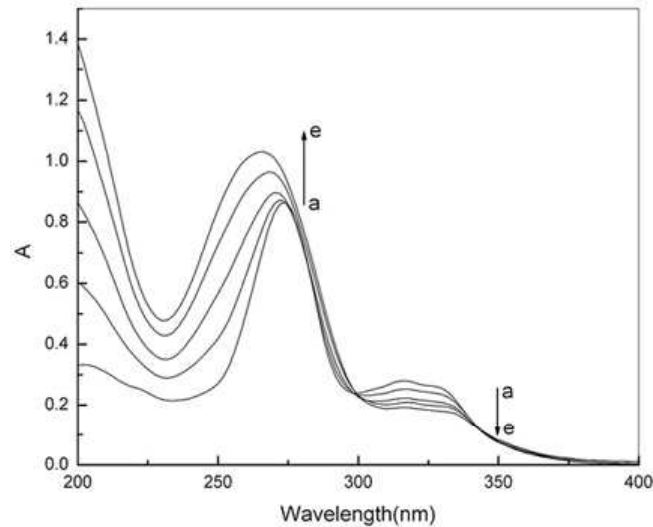
Stanovení koncentrací analyzovaných látek a jejich fyziologického stavu



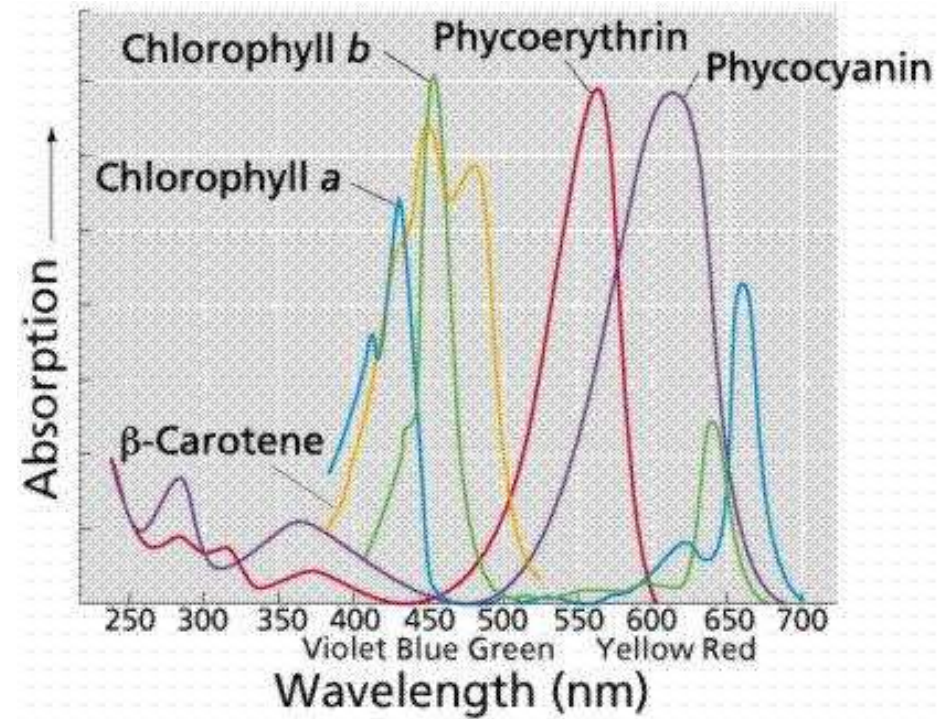
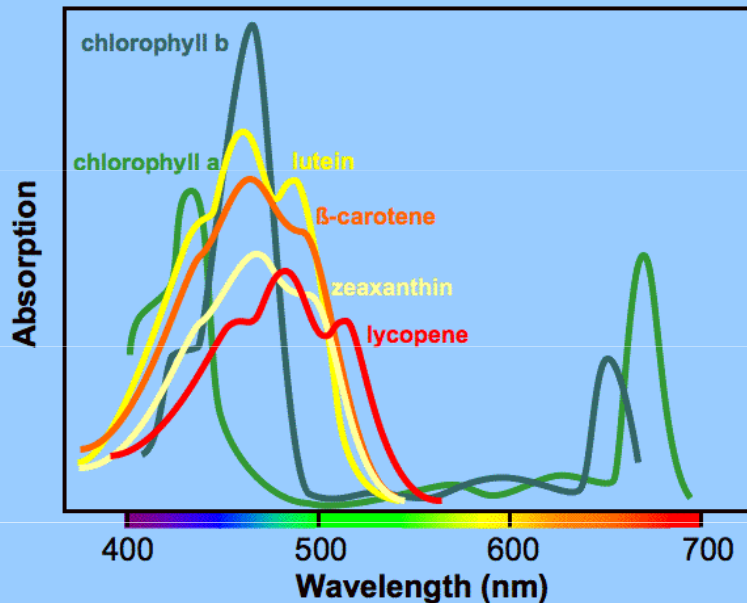
Absorpční křivky telecí thymové DNA o různé koncentraci

Absorpční křivky DNA v závislosti na fyziologickém stavu

UV/Vis absorption spectra of 1.5×10^{-5} M CFX and different concentrations of DNA (a) 0 M (b) 1.0×10^{-5} M (c) 2.0×10^{-5} M (d) 3.0×10^{-5} M (e) 4.0×10^{-5} M . Yuejuan Cai et al. ,Frontiers in Bioscience 12, January 1, 2007

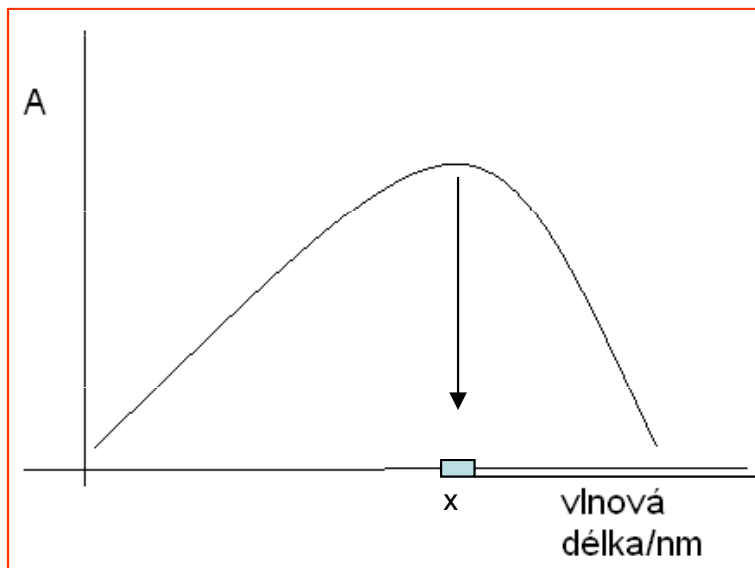


The photosynthetic pigments absorb much of the spectrum

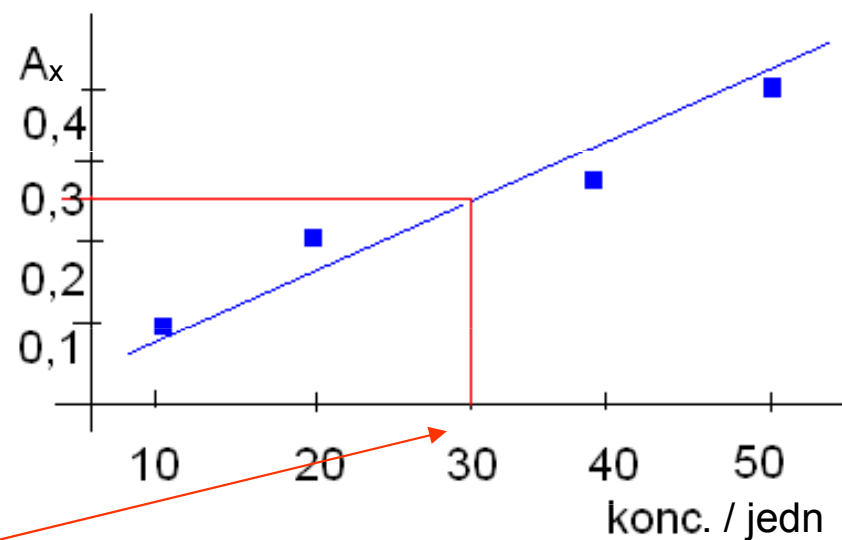


Absorpční spektra pigmentů

Stanovení neznámé koncentrace roztoku pomocí kalibrační křivky a absorpční spektrometrie



1) Stanovení vlnové délky pro absorpční maximum

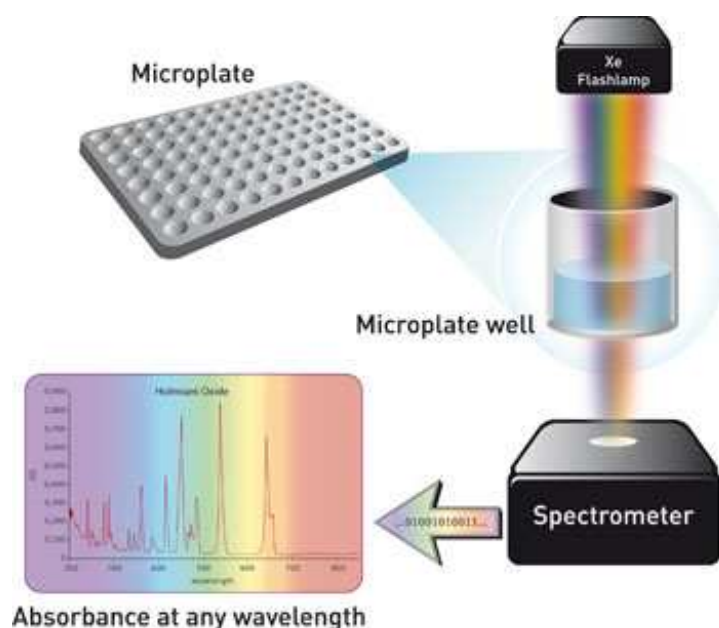


2) Vytvoření kalibrační křivky- závislost hodnoty absorpce na koncentraci roztoku

Neznámá koncentrace

3) Odečtení hodnoty neznámé koncentrace vzorku

Další využití absorpční spektrometrie



testy
buněčných
kultur,
reakčních
směsí,
roztoků, ...

oximetrie

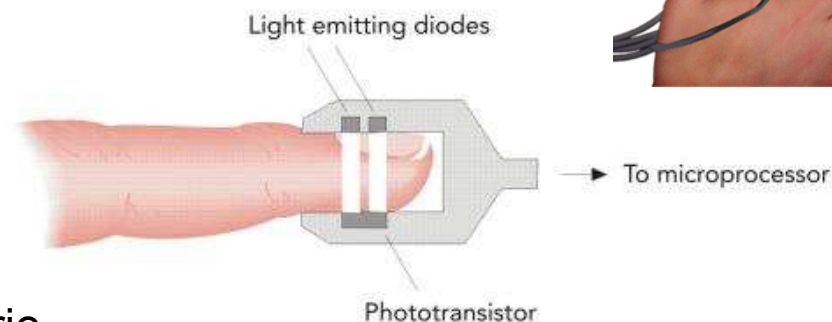


Figure 8-11 Pulse oximeter sensor

www.medtek.ki.se

Testy buněčných kultur, ... - měření absorpce světla ve vzorcích umístěných v jednotlivých jamkách kultivačních destiček (spektrální analýza, koncentrační analýza, ...)

Oximetrie - využívá principu rozdílné absorpce světla molekulou oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu (max. 660 nm a 920 nm). Pulzní oxymetr měří změny v intenzitě světla dvou vlnových délek během arteriální systoly a diastoly. Hodnoty jsou uváděny v procentech saturace kyslíkem ($SpO_2 = 100 \times \text{oxyhemoglobin} / (\text{oxyhemoglobin} + \text{deoxyhemoglobin})$). Pozor na lakování o rozličné ozdoby nehtů, falešné hodnoty!

Další využití absorpční spektrometrie

Indikátorová diluční metoda

metoda pro zjištění průtoku tekutin (zejména krve) pomocí nástřiku barviva a stanovení jeho přítomnosti v čase v průtokové kyvetě – hodnocení minutového srdečního výdeje

Pletysmografická Peňázova metoda

metoda pro nepřímé měření krevního tlaku. Podstatou metody je průchod elektromagnetického záření prstem vyšetřované osoby. Při tlakové pulsaci krve se mění i objem tkáně a tím i hodnota absorpce. Vhodným tlakem v manžetě jsme schopni kompenzovat systolický a diastolický tlak krve – nulová změna hodnoty absorpce

Stanovení bilirubinu v krvi

metoda stanovení bilirubinu v krvi založena na absorpci elektromagnetické vlny o vhodné vlnové délce krví, v případě např. sloučeniny azobilirubinu při 570 nm

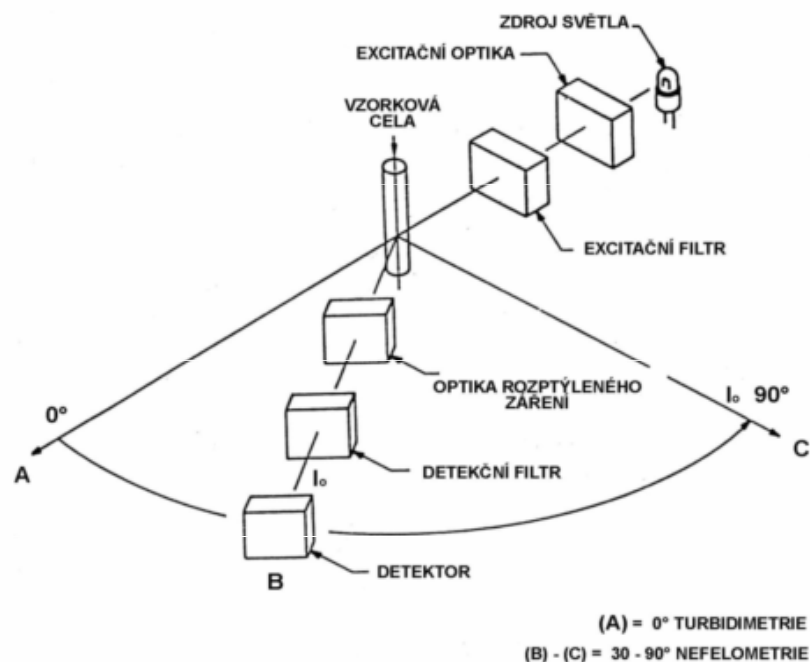
Venózně okluzní objemová pletysmografie

metoda sloužící k vyšetření změn prokrvení prstů končetin v závislosti na teplotě prostředí. Provádí se obdobně jako oximetrie, změna toku krve je provázena změnou hodnoty absorpce procházejícího elektromagnetického záření

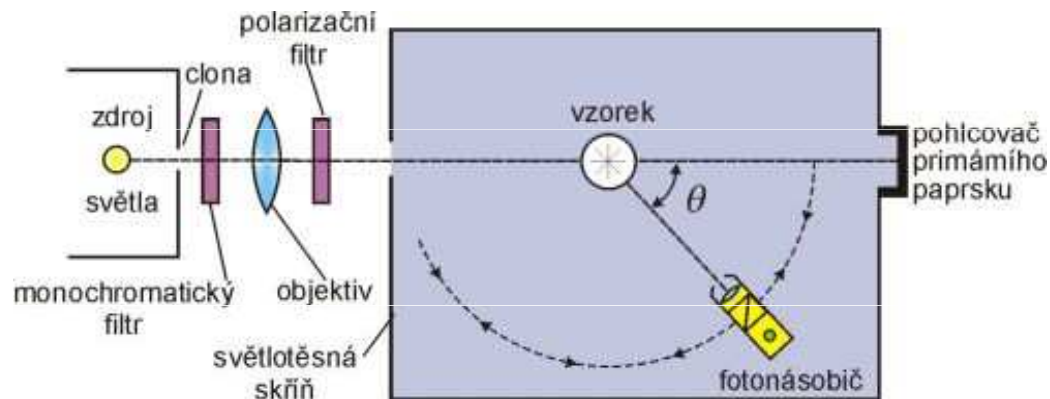
Nefelometrie a turbidimetrie

- optické metody využívající rozptylu světla heterogenními částicemi v suspenzích a koloidních roztocích
- **nefelometrie** je nejčastěji využívána pro nižší koncentrace rozptýlených částic, detekce intenzity rozptýleného záření nejčastěji ve směru kolmém na vstupující paprsek, využívá Tyndallův jev
- **turbidimetrie** je vhodná pro vyšší koncentrace rozptýlených částic, detektor umístěn v ose paprsku, detekce intenzity záření prošlého disperzním vzorkem a ochuzeného o rozptýlenou složku, stanovení tzv. Turbidity – A_T – stupeň zákalu
- vhodné metody ke stanovení např. proteinů v séru, znečištění vzduchu a kapalin pevnými částicemi a pod.
- Tyndallův jev – při částicích disperzního podílu větších než 5 nm, lze pozorovat rozptyl světla – např. světelný kužel při průchodu světelného paprsku roztokem

Nefelometrie a turbidimetrie



pracovní schéma turbidimetrie a nefelometrie



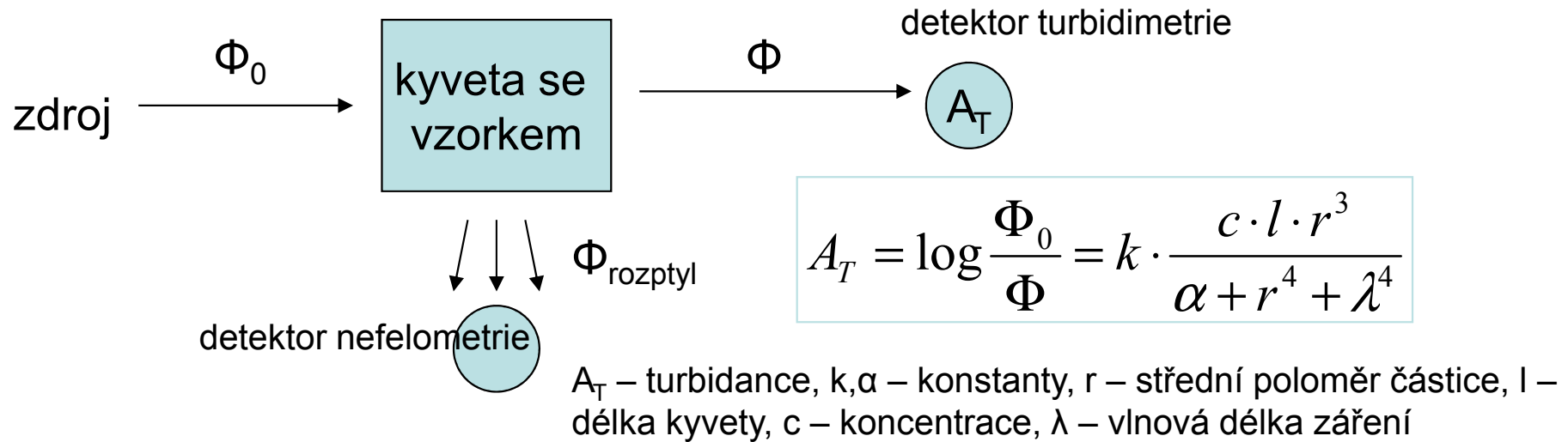
Elektronická publikace „Co je co v povrchové a koloidní chemii“, verze 1.0, 2005

Jednotky kalnosti:

NTU – nefelometrická jednotka kalnosti, FTU – formazinová jednotka kalnosti (standard),

NFU – nefelometrická formazinová jednotka

Turbidimetrie



- citlivost turbidimetrie je nepřímo úměrná zvolené vlnové délce, proto je vhodné zvolit co nejkratší vlnové délky zdroje záření – nutnost monochromatickosti
- ve zředěných disperzích (roztocích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu A_T , již odpovídá v absorpční fotometru A u klasické absorpční fotometrie (absorbance), vyjádřit vztahem

$$A_T = (e + T) \cdot c \cdot l,$$

kde: e - absorpční koeficient, T - turbiditní koeficient, c - koncentrace, l - světelná dráha (tloušťka) měřicí kyvety

Nefelometrie

- měření intenzity rozptýleného „Tyndallova“ světla na dispergovaných částicích



- zdrojem světla je nejčastěji halogenová a xenonová výbojka či laser
- k měření využívám nefelometrický nástavec fotometru či nefelometr
- vlnová délka difúzně rozptýleného záření a záření zdroje je stejná, i když v malém rozsahu dochází na částicích k emisi záření o delší vlnové délce
- optimální poměr mezi vlnovou délkou záření monochromatického zdroje a poloměrem částic je 10:1
- příkladem aplikace nefelometrie v přírodních vědách je stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin či komplexů antigen-protilátka, čistota ovzduší ...
- závislost odezvy nefelometru na koncentraci stanovované bílkoviny je obecně nelineární. Jde většinou o polynom druhého či třetího řádu. V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Obecně platí, že linearita měření je tím lepší, čím je koloidní disperze více naředěna nebo je menší velikost částic

Einstein-Debyeova rovnice pro rozptyl světla ... *pro zvědavé...*

$$I_{\alpha} = I_0 \cdot \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2 \cdot F(\alpha) \cdot w}{N_A \cdot \lambda^4 \cdot r^2 \cdot \left(\frac{1}{M} + 2B \cdot w + \dots\right)} \cdot \left(\frac{dn}{dw}\right)^2$$

I_{α} je intenzita světla rozptýleného objemovou jednotkou disperzní soustavy pod úhlem θ ,

I_0 celková intenzita dopadajícího (primárního) záření,

n index lomu disperzní soustavy,

n_0 index lomu čistého disperzního prostředí,

w hmotnostní koncentrace,

M molární hmotnost disperzního podílu,

λ vlnová délka primárního i rozptýleného světla,

r vzdálenost detektoru, měřícího intenzitu, od zdroje rozptýleného světla

α úhel pozorování, tj. úhel sevřený primárním paprskem a paprskem rozptýleného světla, který dopadá do detektoru,

$F(\alpha)$ je funkce úhlu pozorování, jejíž tvar závisí na charakteru primárního paprsku (pro vertikálně polarizované primární světlo $F(\alpha)=1$, při horizontální polarizaci $F(\alpha)=\cos^2\alpha$, pro nepolarizované světlo $F(\alpha)=0,5(1+\cos^2\alpha)$),

B druhý viriální koeficient - stejný jako u viriálního rozvoje pro vyjádření koncentrační závislosti osmotického tlaku

Nefelometrie a turbidimetrie

Přenosný turbidimetr (nefelometr) 2100P (Hach)



„Přesný dvoudetektorový mikroprocesorem řízený turbidimetr umožňuje skutečnou eliminaci barvy a hodí se i k měření komplikovaných barevných vzorků v terénu. Jeden detektor je umístěn pod úhlem 90° na LED zdroj světla – 860 nm, druhý detektor je přímý... Přístroj měří v automatickém modu v rozsahu 0-1000 FNU ...Kalibrace se provádí na primární formazínové standardy.“

<http://www.ekotechnika.com>



Nefelometrie a turbidimetrie



Nefelometr
hodnotící kvalitu
ovzduší - řídicí
jednotka, optické
prostředí,
venkovní sběrná
trubice

<http://badc.nerc.ac.uk>



Ruční nefelometr pro analýzu obsahu prachových částic v ovzduší. Výrobce deklarovaná citlivost měření je 1-10,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ s rozlišením až 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

<http://www.zefon.com>

MUNI

