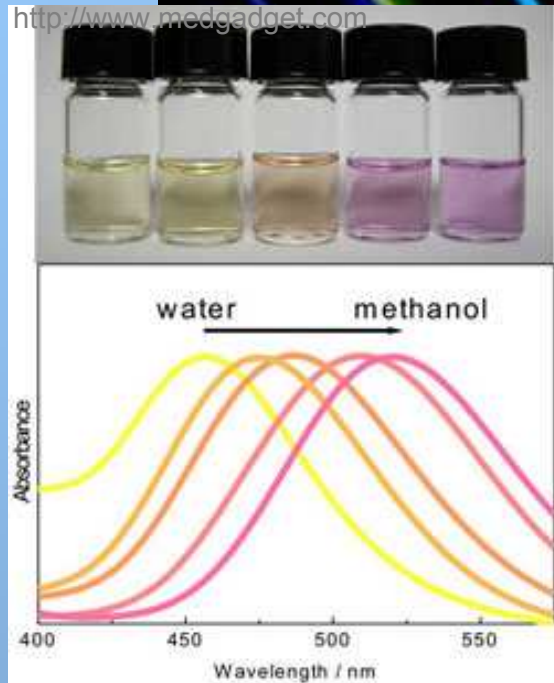


# Optická spektrometrie



**rev. 2020**

**Vladan Bernard**

**Biofyzikální ústav, Lékařská fakulta MU**

<http://www.pangolin.com>



## 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

## 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 ( $\lambda$ )
- 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

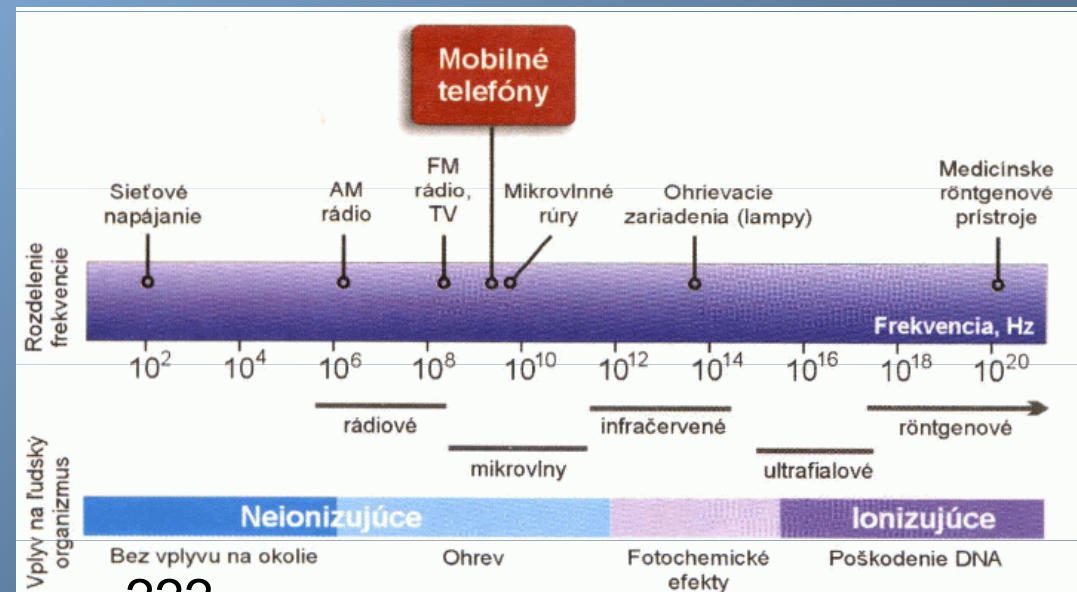
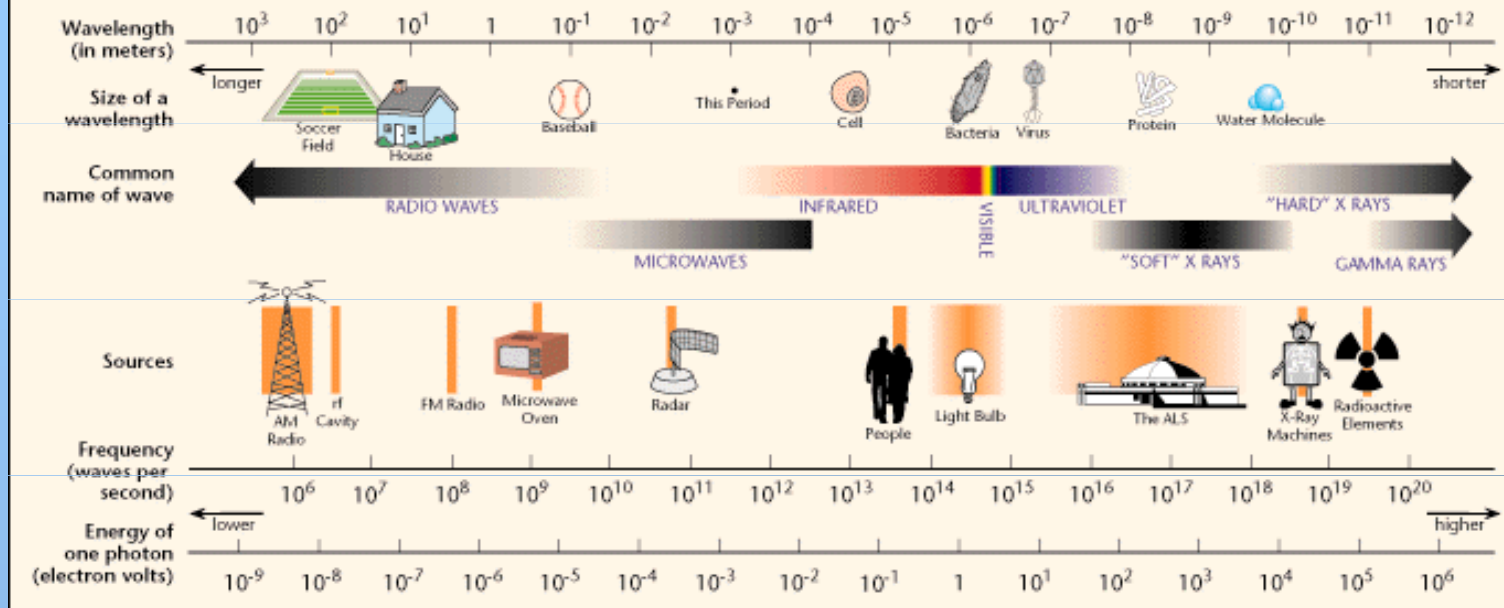
Charakteristika elektromagnetického záření:

- frekvence  $f$
- vlnová délka  $\lambda$
- 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,  $\lambda$ - vlnová délka

# THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



???



## Elementární znalosti středoškolské optiky

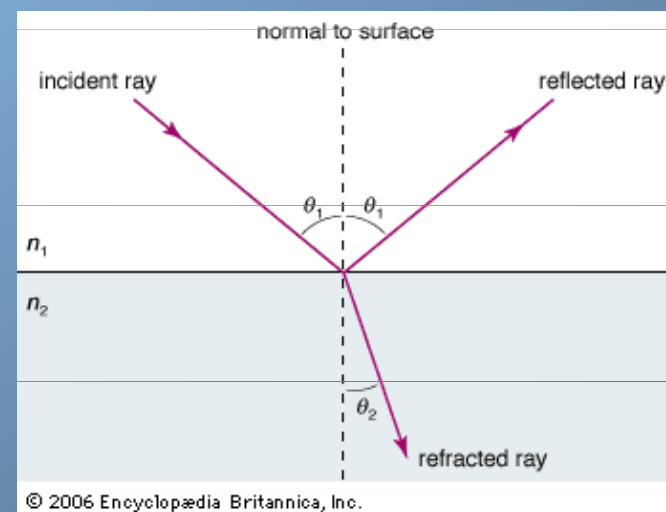
Fázová rychlost elektromagnetické vlny  $v$ , 
$$v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}$$

$\epsilon$ - permitivita prostředí,  $\mu$ - permeabilita prostředí

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

$v$ - rychlost světla v daném prostředí

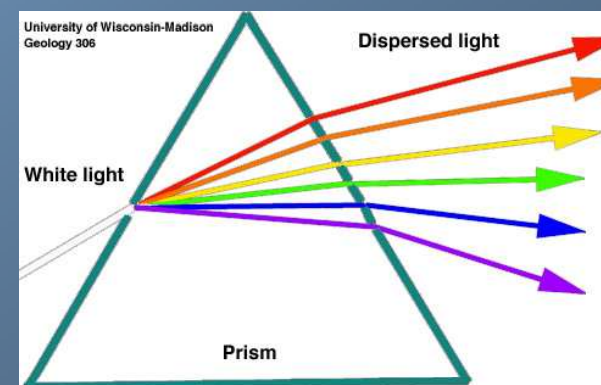
- Zákon odrazu  $\alpha = \alpha'$
- Snellův zákon lomu  $n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta$
- Rychlost světla ve vakuu  $c = 299\,792\,458 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$



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

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

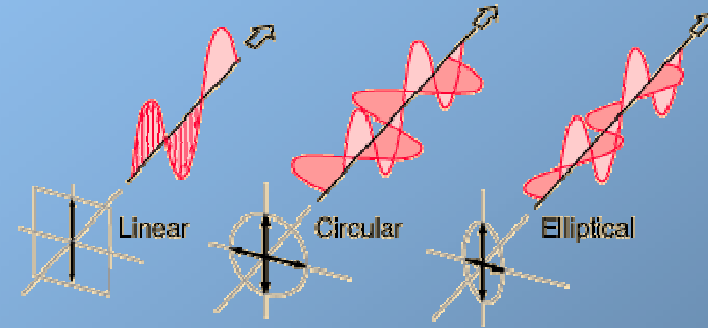
- Polarizace



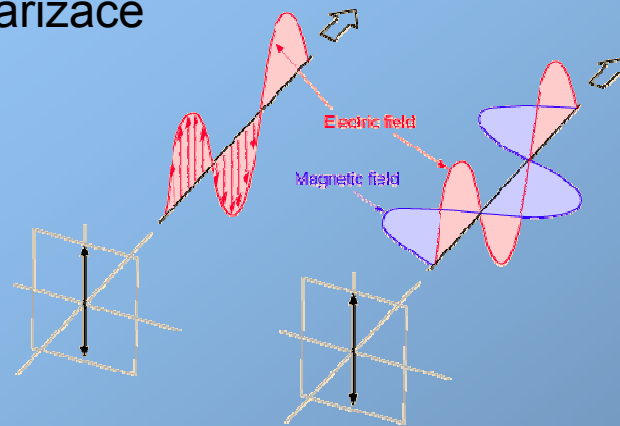
<http://seismo.berkeley.edu>

# Polarizace elektromagnetické vlny

Polarizace elektromagnetického záření – geometrie kmitů vektorů elektromagnetického pole

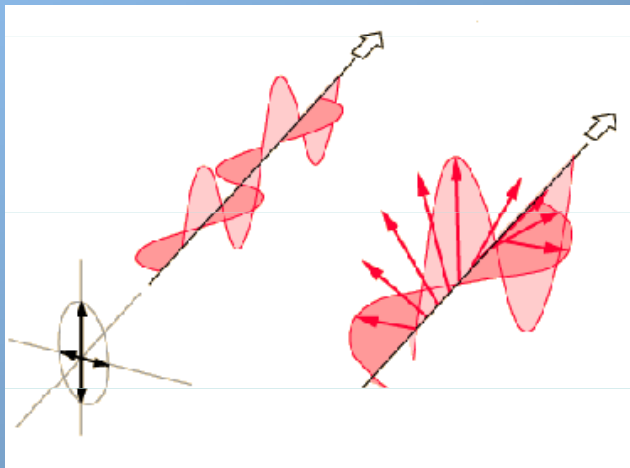


- lineární polarizace

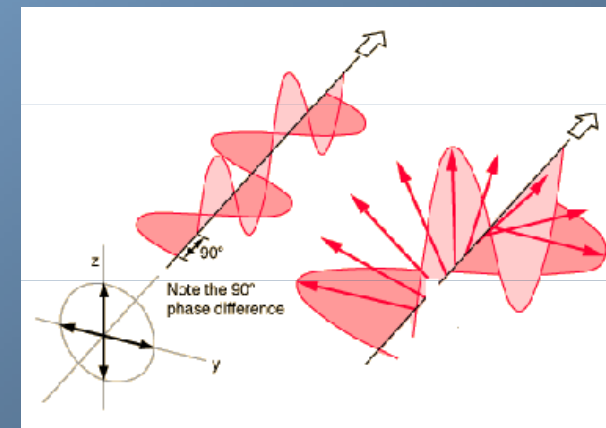


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/waveform3d/index.html>

- 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  $\lambda$  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**.

$I_{\lambda_0}$  je počáteční hodnota intenzity elmag. vlny,  $I_{\lambda}$  je velikost intenzity elmag. vlny po průchodu látkou

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

Závislost absorbance  $A_{\lambda}$  na uražené dráze  $x$  elmag. vlny v prostředí popisuje LAMBERTŮV zákon:  $A_{\lambda} = b_{\lambda} \cdot x$ , kde  $b_{\lambda}$  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  $\varepsilon$  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)

$$T: T_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_0}}$$

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

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

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

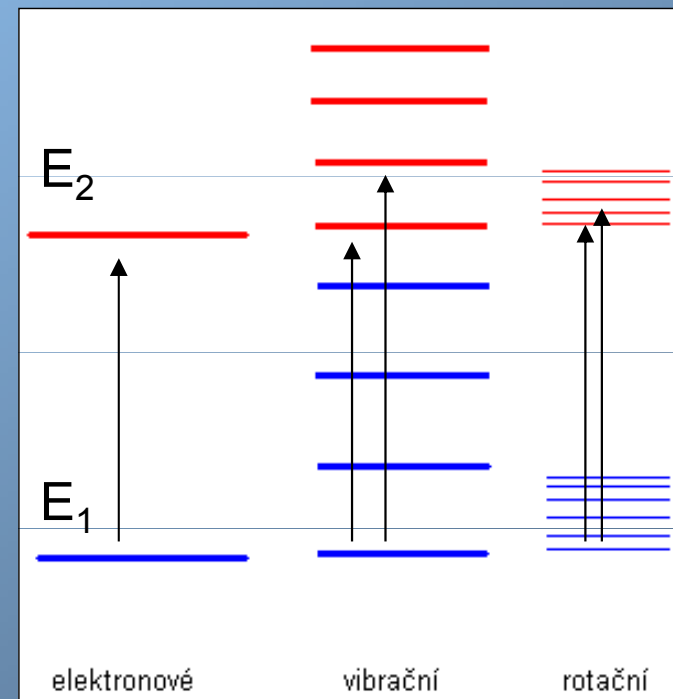
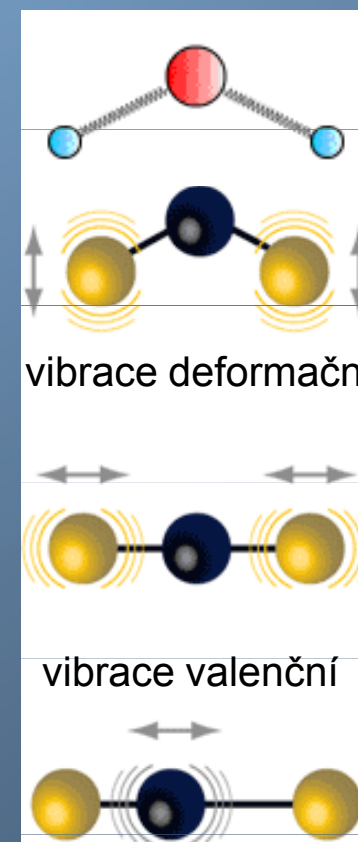


schéma přechodu elektronu při absorpci UV nebo VIS záření molekulou

# Interakce elektromagnetické vlny s prostředím

## 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





# 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  $\mu\text{m}$ , 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

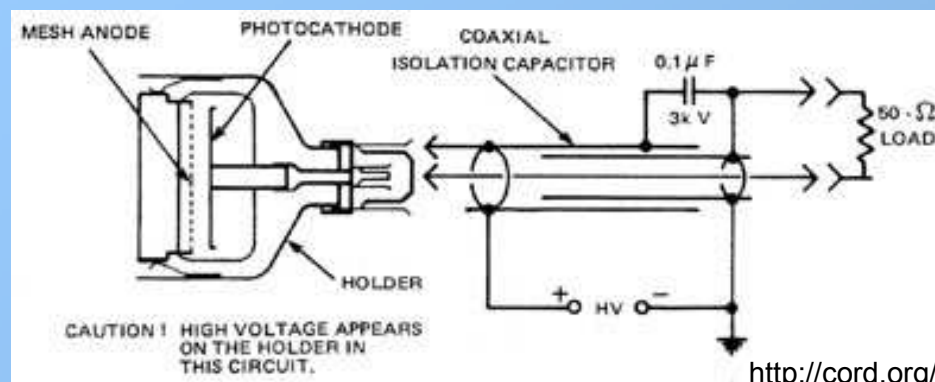
- vstupní štěrbina
- disperzní prvek (hranol, mřížka), rozptyl záření dle  $\lambda$ , natáčecí element
- výstupní štěrbina (výstup záření o konkrétní  $\lambda$ )

**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)



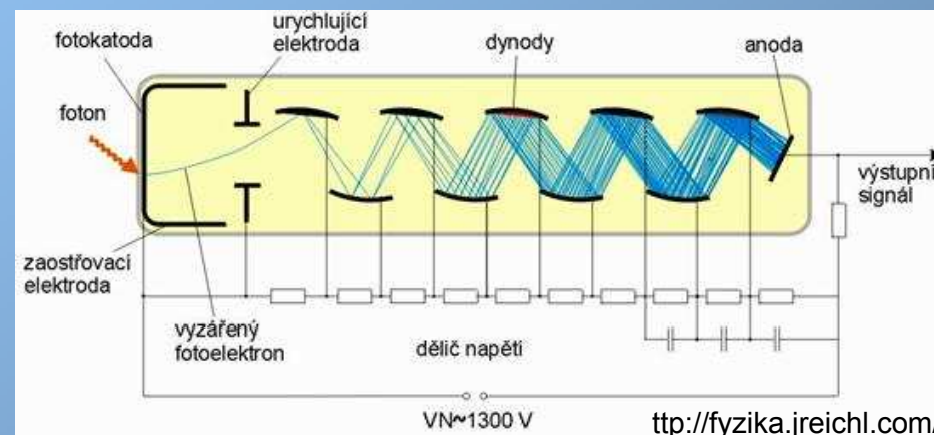
## Vakuová fotodioda



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



## Fotonásobič

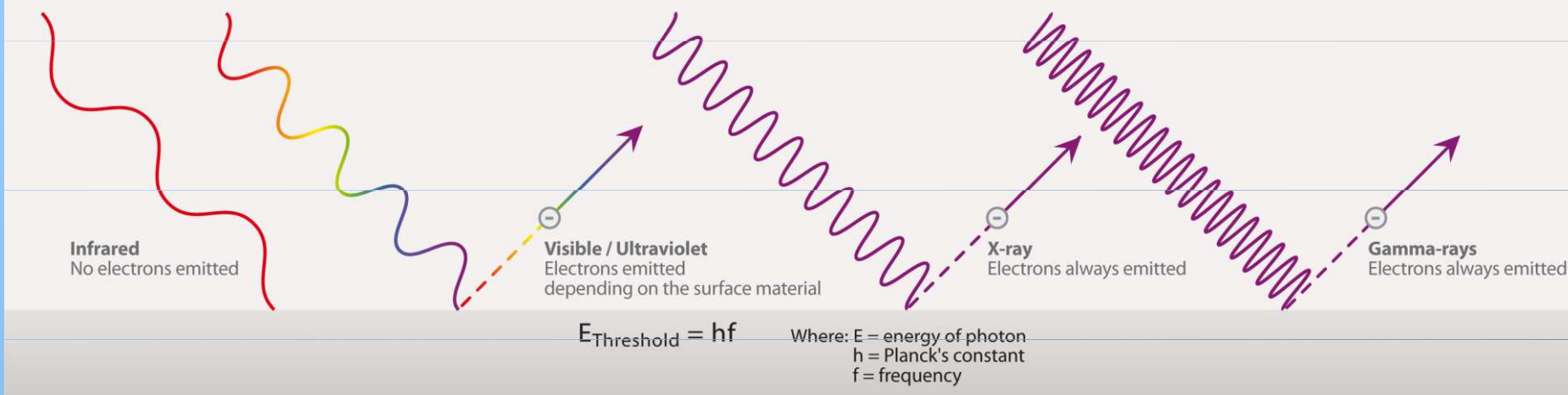


Emise elektronů na fotokatodě po dopadu fotonu díky fotoelektrickému jevu, urychlení elektronu elektrickým polem a jeho dopad na dynodu o vysokém kladném potenciálu, sekundární emise elektronů z dynody, ..., dopad elektronů na anodu

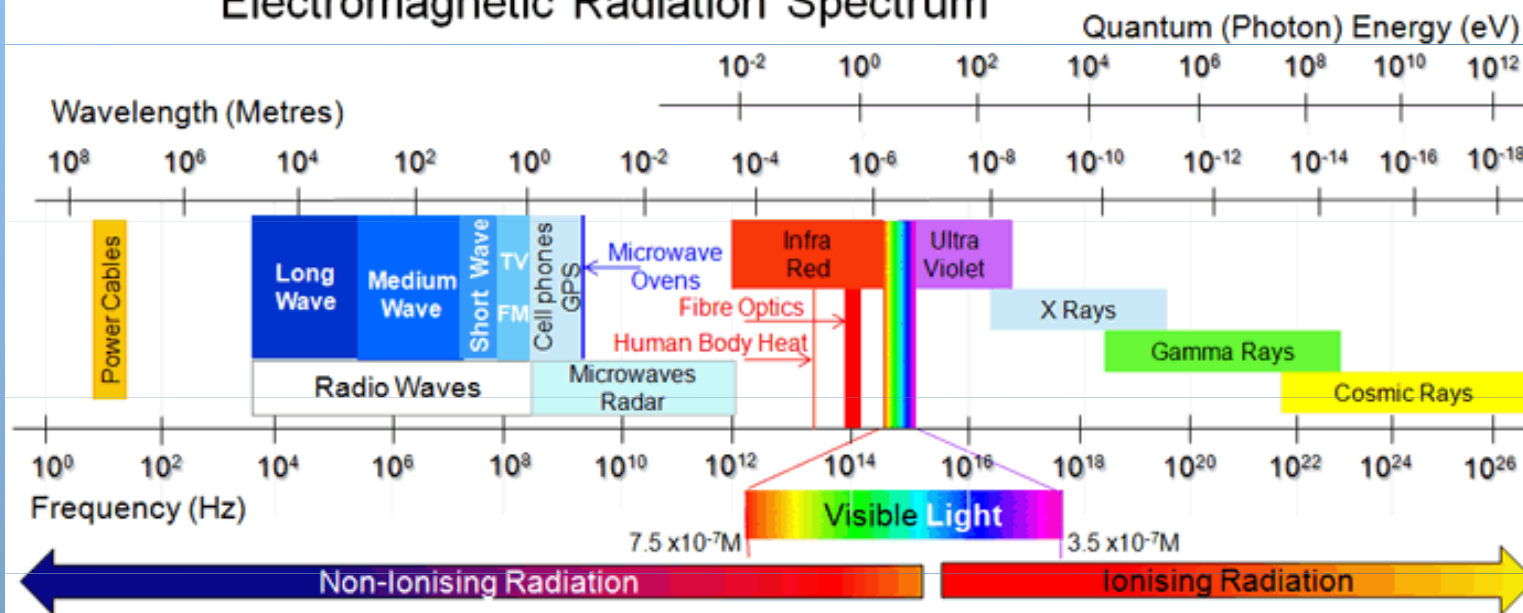




### Photoelectric effect



### Electromagnetic Radiation Spectrum



# 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  $\mu$ L, analýza DNA, proteiny



3,5 ml, těkavé materiály

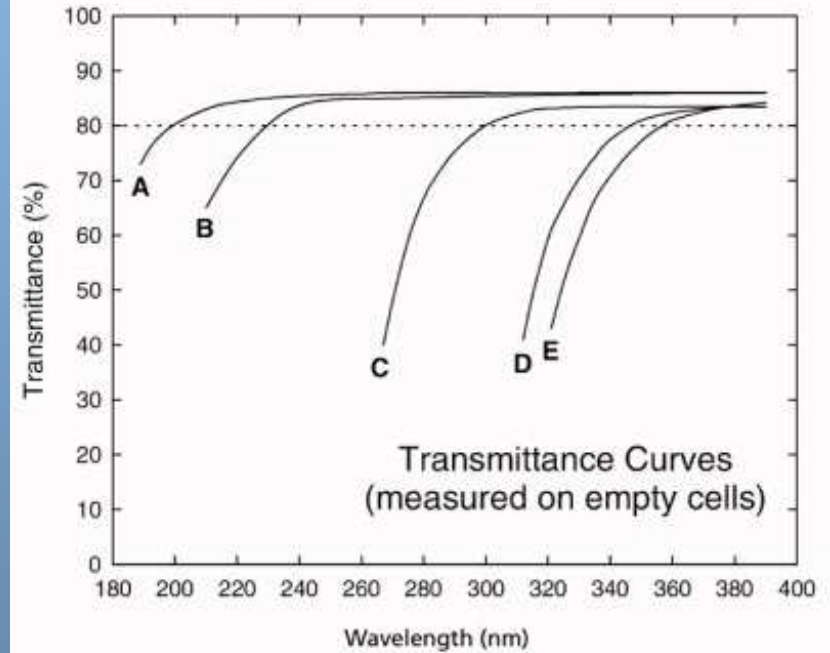


0,75 ml, mikrokveta

### 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.

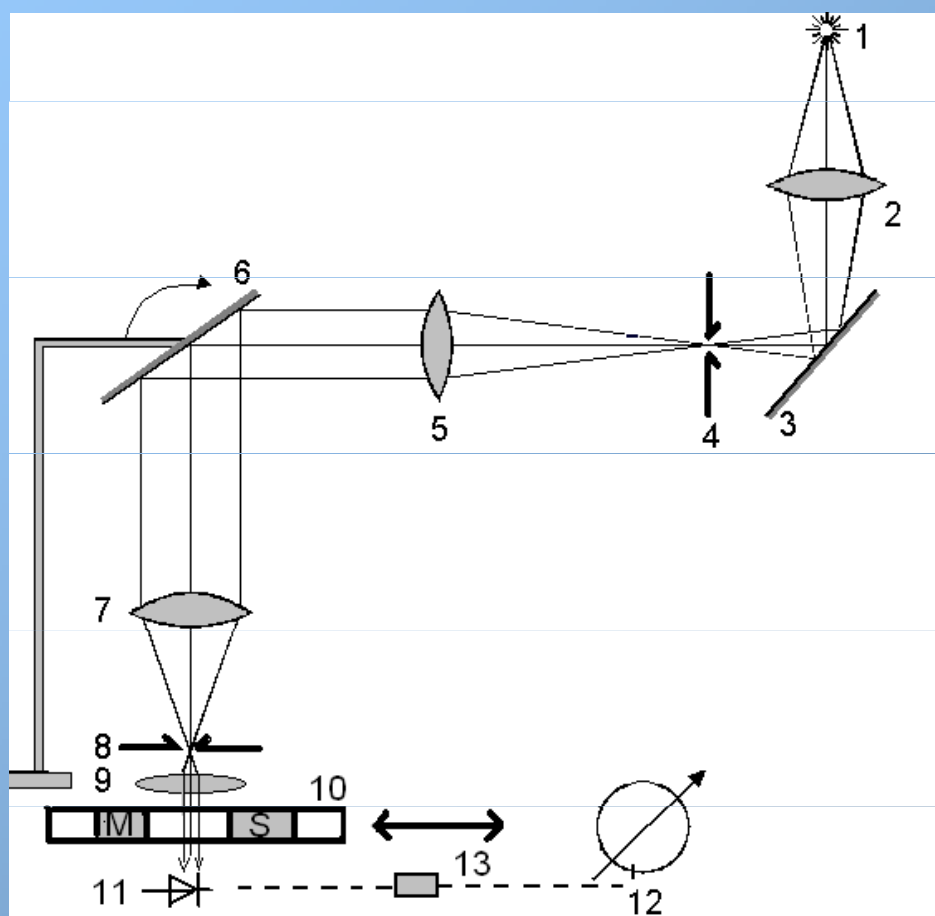
Unless otherwise indicated, outside dimensions are 12.5 x 12.5 x 45 mm, and path length is 10 mm. Cuvets are sold singly, not in pairs. Modern precision manufacturing methods make pre-matching unnecessary.



Spektrální transmittance



# Spektrofotometr jednopaprskový- SPEKOL 11

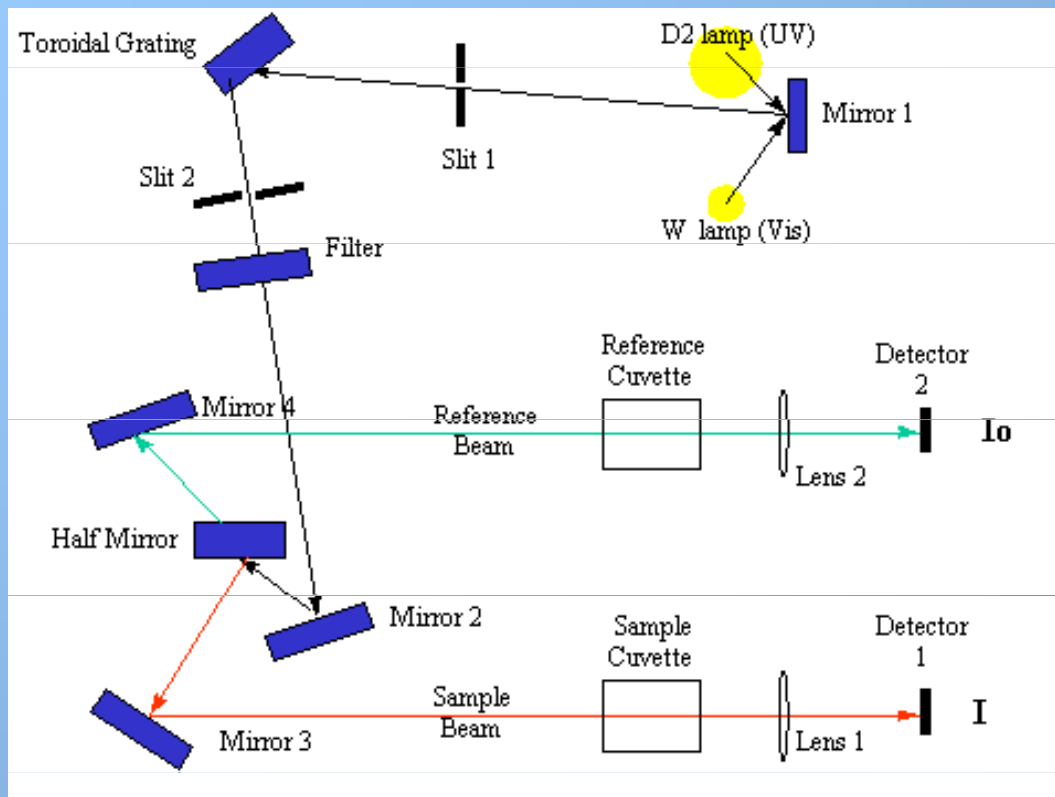


- 1- zdroj elmag. Záření
- 2- kondenzátor
- 3- zrcadlo
- 4- vstupní štěrba
- 5- kolimátor
- 6- mřížka monochromátoru (změna  $\lambda$ )
- 7- kolimátor
- 8- výstupní štěrba
- 9- kolimátor
- 10- pohyblivý držák kyvet
- M- měřený vzorek
- S- srovnávací vzorek
- 11- vakuová fotonka (detektor)
- 12- měřič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





## U-2001 UV/Visible Spectrophotometer



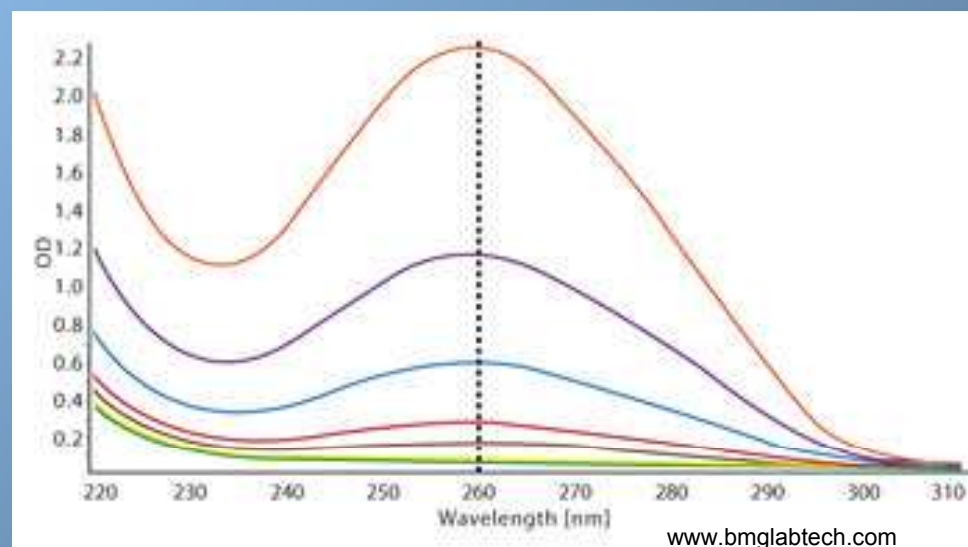
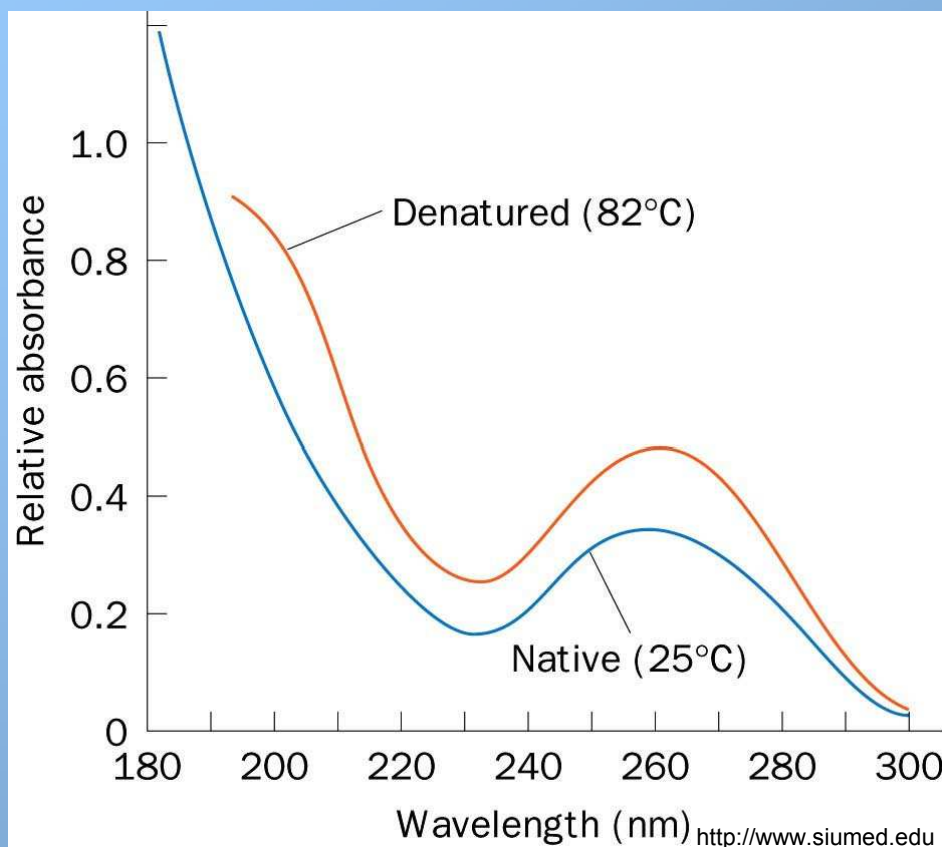
Dvoupaprskový spektrometr,  
deuteriový a wolframový zdroj

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



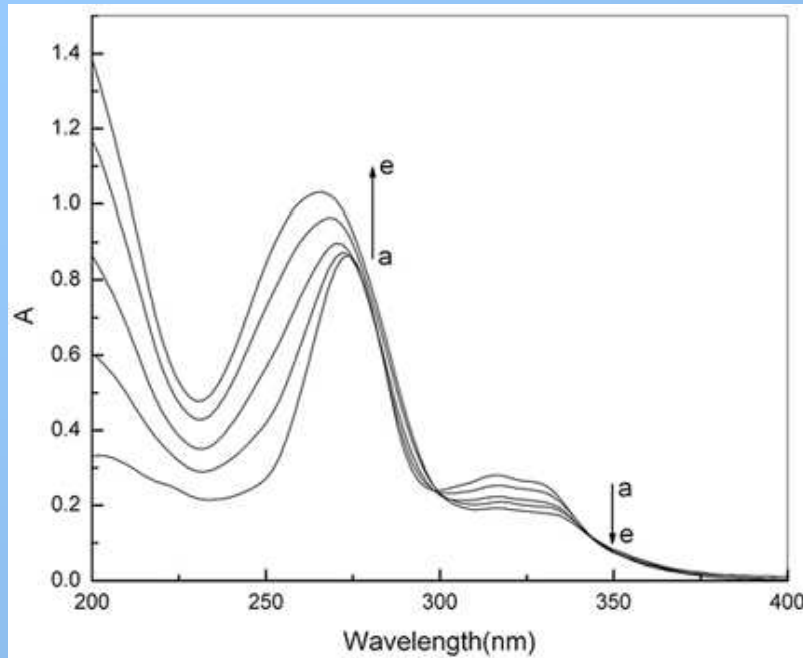
## Praktická laboratorní aplikace

Stanovení koncentrací analyzovaných látek a jejich fyziologického stavu

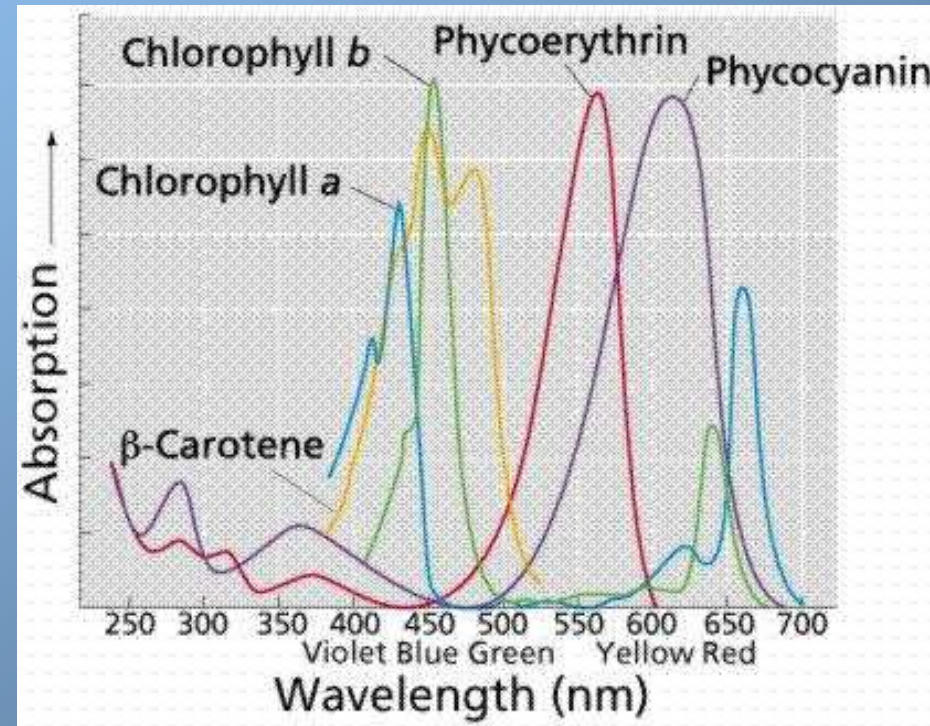


Absorpční křivky telecí thymové DNA o různé koncentraci

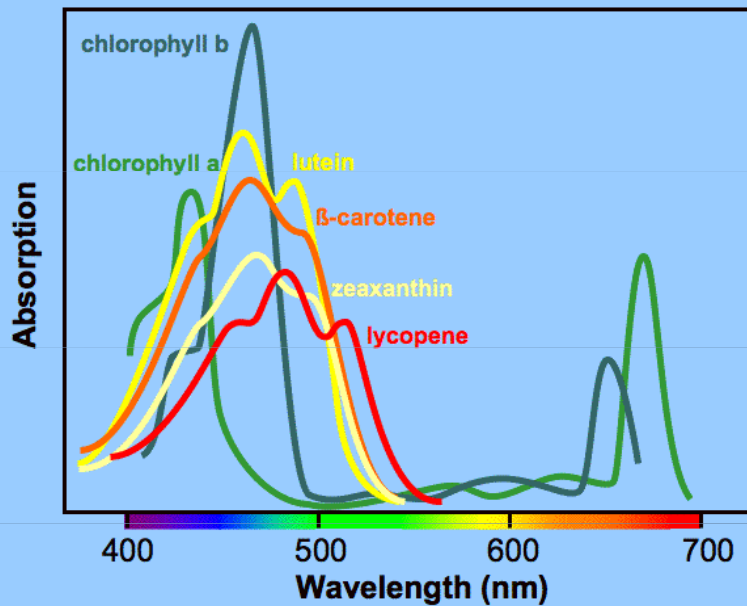
Absorpční křivky DNA v závislosti na fyziologickém stavu



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

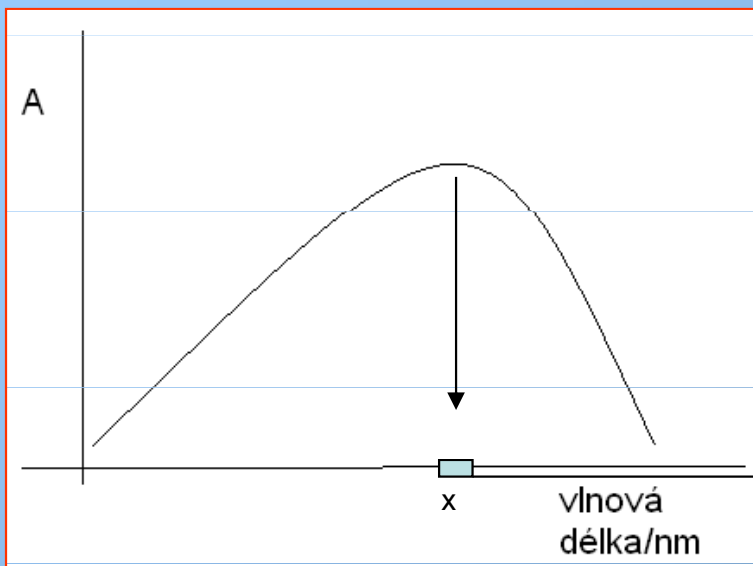


### The photosynthetic pigments absorb much of the spectrum

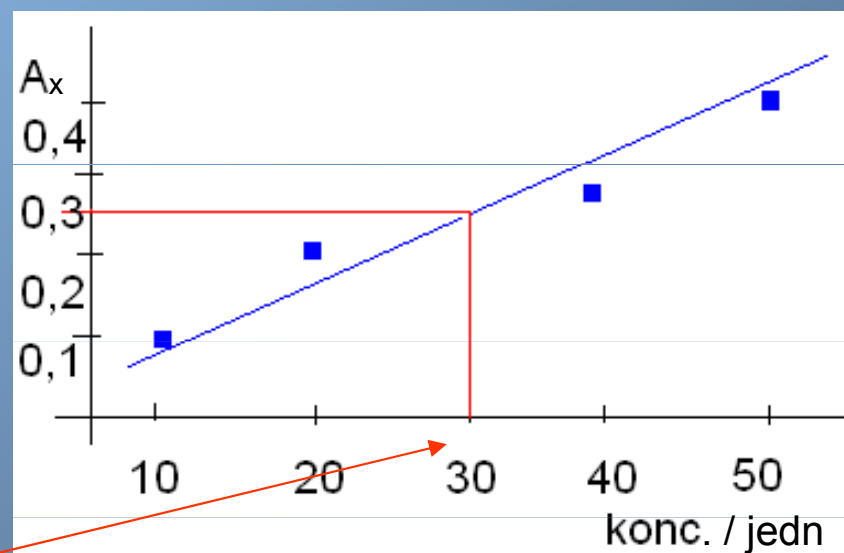


### Absorpční spektra pigmentů

## Stanovení neznámé koncentrace roztoku pomocí kalibrační křivky a absorpční spektrometrie



1) Stanovení vlnové délky pro absorpční maximum



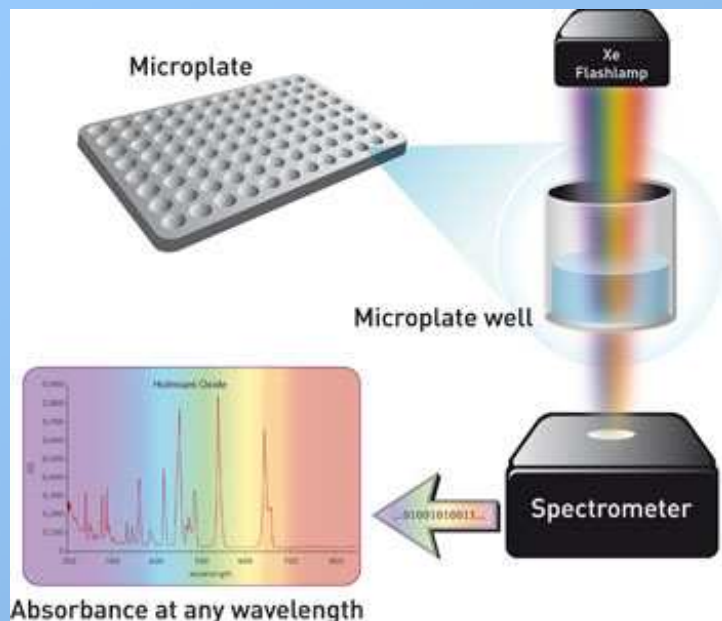
2) Vytvoření kalibrační křivky- závislost hodnoty absorpce na koncentraci roztoku

Neznámá koncentrace

3) Odečtení hodnoty neznámé koncentrace vzorku

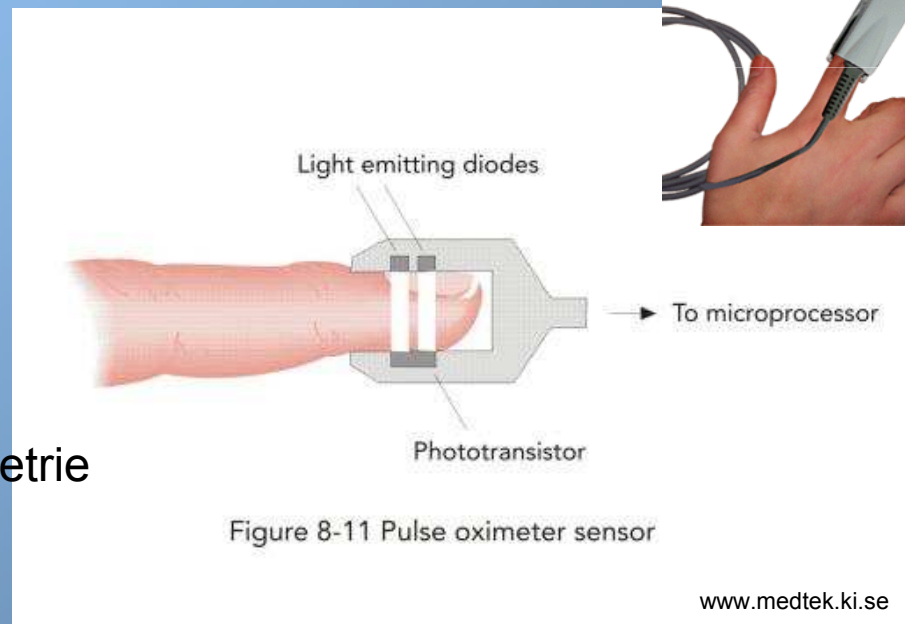


## Další využití absorpční spektrometrie



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

oximetrie



**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 provázána změnou hodnoty absorpce procházejícího elektromagnetického záření

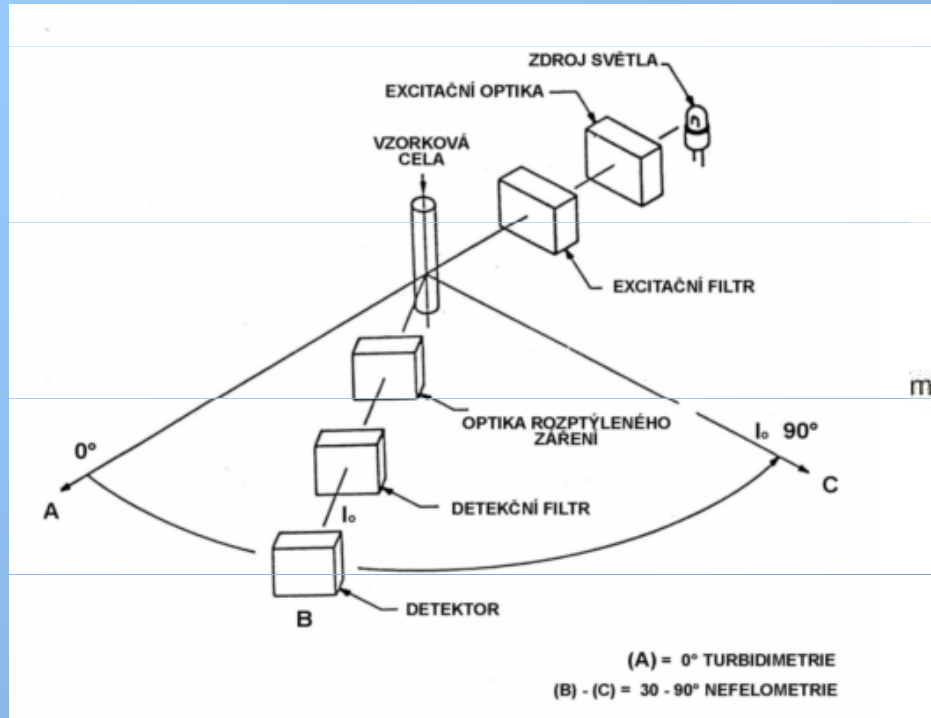




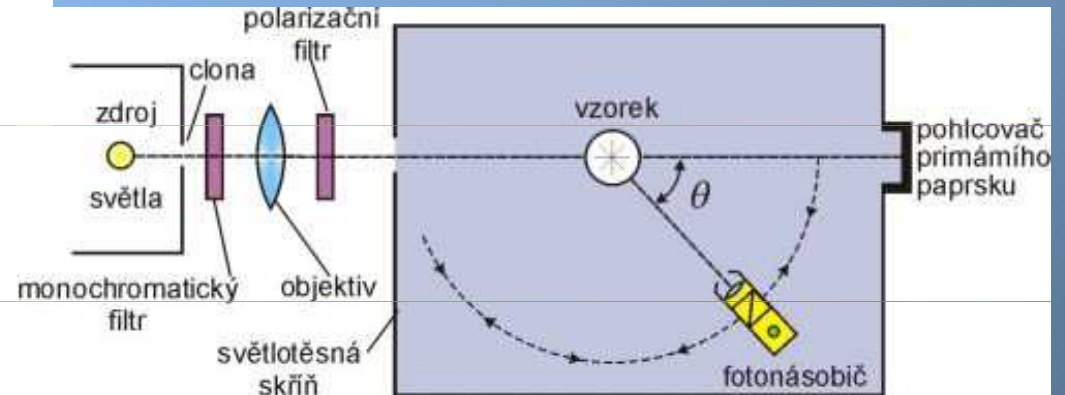
## Nefelometrie a turbidimetrie

- 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. Turbidance –  $A_T$  – 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

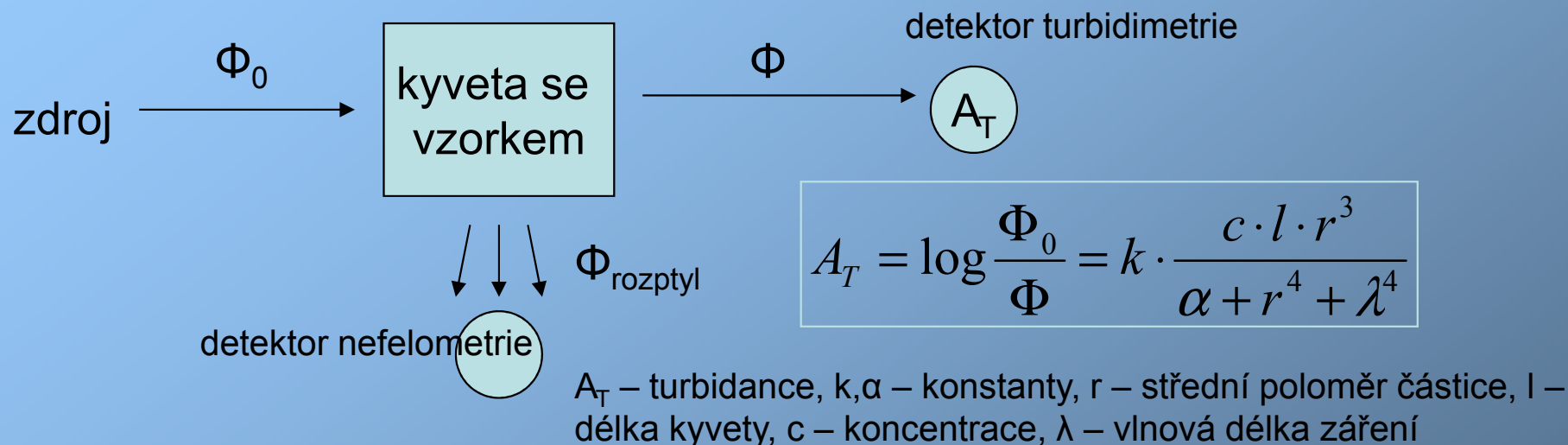
Jednotky kalnosti:

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



## Nefelometrie a turbidimetrie

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

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

$I_{\alpha}$  je intenzita světla rozptýleného objemovou jednotkou disperzní soustavy pod úhlem  $\theta$ ,

$I_0$  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,

$\lambda$  vlnová délka primárního i rozptýleného světla,

$r$  vzdálenost detektoru, měřícího intenzitu, od zdroje rozptýleného světla

$\alpha$  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... Příklad 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>

