



ĆWICZENIE NR 3

POMIARY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Cel ćwiczenia

Poznanie podstawowej metody określania biochemicznych parametrów płynów ustrojowych oraz wymagań technicznych stawianych urządzeniu pomiarowemu na przykładzie wskazanego spektrofotometru.

Część 3.1.

Ocena właściwości optycznych płynów za pomocą spektrofotometru

- 3.1.1. Skalibrować urządzenie Spekol 221 jednorazowo dla wody destylowanej, dla długości fali $\lambda = 350$ nm i szerokości widma $\Delta\lambda = 5$ nm.
- 3.1.2. Sprawdzić wskazania urządzenia (T – transmitancja) przy długości fali $\lambda = 350$ nm i dla dwóch szerokości widma $\Delta\lambda = 3$ nm oraz $\Delta\lambda = 15$ nm.
- 3.1.3. Sprawdzić wskazania urządzenia (T – transmitancja) przy szerokości widma $\Delta\lambda = 5$ nm i przy różnych długościach fali λ .
- 3.1.4. Z badać właściwości płynu X (T – transmitancja) o różnym stężeniu przy szerokości widma $\Delta\lambda = 5$ nm i przy różnych długościach fali λ .
- 3.1.5. Z badać właściwości różnych płynów (T – transmitancja) (o różnych barwach) przy szerokości widma $\Delta\lambda = 5$ nm i przy różnych długościach fali λ .



Rys. 3.1. Barwy płynów używanych w ćwiczeniu

Część 3.2.

Badanie wpływu wybranych cech spektrofotometru na jakość oceny parametrów optycznych próbki

- 3.2.1. Na podstawie oględzin ocenić konstrukcję elektroniczną urządzenia Spekol 221. Wskazać charakterystyczne bloki.
- 3.2.2. Na podstawie oględzin opisać budowę toru: od źródła światła do fotodetektora. Wskazać elementy decydujące o warunkach pomiaru oraz te, mogące wpływać na dokładność pomiaru.
- 3.2.3. Zaobserwować zmiany pasma strumienia świetlnego urządzenia przy różnej szerokości wiązki.
- 3.2.4. Z badać własności optyczne kuwety. Dobrać odpowiednie warunki pomiaru. Wybór uzasadnić.
- 3.2.5. Określić własności optyczne wybranego płynu. Wskazać źródła błędów pomiaru.

- 3.2.6. Określić własności optyczne różnych płynów. Zwrócić uwagę na warunki pomiaru. Porównać wyniki.
- 3.2.7. Określić własności optyczne płynu o różnych stężeniach. Zwrócić uwagę na warunki pomiaru. Porównać wyniki.

Część 3.3.

Badanie cech fotoodbiornika i ocena ich wpływu na dokładność pomiarów spektrofotometrycznych

- 3.3.1. Zbadać odpowiedź wskazanego fotodetektora (fotorezystora, fotodiody) na oświetlenie wiązką światła w zakresie 300 nm do 800 nm. Pomiar przeprowadzić dla różnych szerokości widma $\Delta\lambda$. We wszystkich badaniach wykorzystać urządzenie Spekol 221.
- 3.3.2. Porównać uzyskaną charakterystykę z katalogową charakterystyką fotoelementu.
- 3.3.3. Spośród detektorów zbadanych w punkcie 3.3.1 wybrać jeden do dalszych badań. Wybór uzasadnić. Przy jego wykorzystaniu wyznaczyć charakterystykę widmową natężenia źródła światła. Porównać charakterystyki dla różnych szerokości widma $\Delta\lambda$.
- 3.3.4. Zinterpretować charakterystykę widmową drugiego z fotoelementów z punktu 3.3.1 przy uwzględnieniu charakterystyki widmowej źródła światła (wykorzystać dane uzyskane w punkcie 3.3.3). Porównać wyniki uzyskane dla różnych szerokości widma $\Delta\lambda$.

Aparatura

- spektrofotometr Spekol 221,
- multimetr Metex,
- fotorezystory, fotodiody.

Zagadnienia do rozważenia

1. Algorytm pracy spektrofotometru, algorytm pracy procesora.
2. Celowość stosowania mikroprocesora w konstrukcji spektrofotometru.
3. Charakterystyka fotonadajnika i fotoodbiornika stosowanego w pomiarach spektrofotometrycznych; wpływ jego parametrów na dokładność oceny właściwości optycznych próbki biologicznej.
4. Ocena własności materiału biologicznego w świetle o widmie szerokim i w świetle monochromatycznym.
5. Warunek konieczności bardzo dobrej stabilizacji napięcia zasilania.
6. Zasada pomiarów kolorymetrycznych. Schemat blokowy urządzenia.
7. Źródła błędów w pomiarach spektrofotometrycznych.

Literatura

- [1]. Baranowska I. (red.), Wybrane działy analizy instrumentalnej. Wyd. Pol. Śl., Gliwice 2003.
- [2]. Bronzino J.D., The biomedical engineering. CRC Press, Boca Raton 1995.
- [3]. Kaeley D., Haines P.J., Chemia analityczna. PWN, Warszawa 2005.
- [4]. Kocjan R., Chemia analityczna: podręcznik dla studentów. Cz. 2, Analiza instrumentalna. PZWL, Warszawa 2013.

- [5]. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wyd. IV, PWN, Warszawa 2002.
- [6]. Szmal Z., Lipiec T., Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej. PZWL, Warszawa 1997.
- [7]. Szyszko E., Instrumentalne metody analityczne. PZWL, Warszawa 1982.

Metody spektroskopowe

Metody spektroskopowe dotyczą kontroli wymiany energii między promieniowaniem a materią. Ich celem jest określenie stężenia substancji, głównie substratów reakcji biochemicznych przebiegających w organizmie, a także do wyznaczenia aktywności enzymów.

Obejmują one obszerną grupę analiz chemicznych opartą na wykorzystaniu widm emisyjnych lub absorpcyjnych wywołanych przejściami energetycznymi w jądrach atomowych lub w powłokach elektronowych atomów i cząsteczek badanych substancji. W związku z tym wyróżnia się w szczególności:

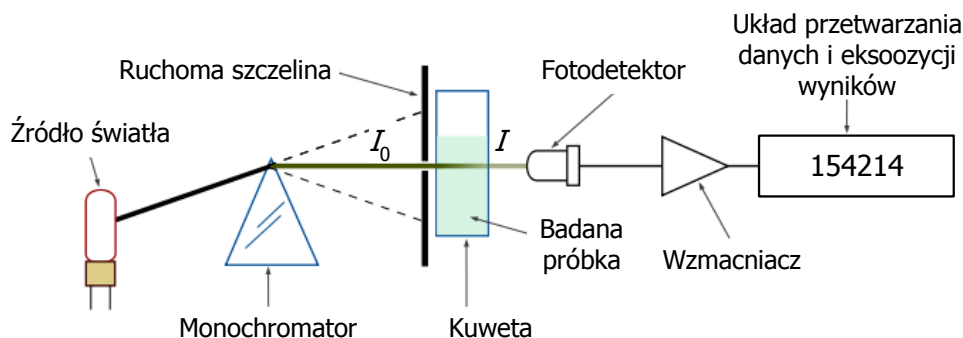
- spektroskopię absorpcyjną, gdy następuje zwiększenie energii badanej substancji w wyniku pochłaniania,
- spektroskopię emisyjną, gdy następuje zmniejszenie energii badanej substancji.

Wykorzystywane są różne techniki pomiarowe, które zależą od zakresu użytego promieniowania: nadfioletu, światła widzialnego, podczerwieni. W medycznych laboratoriach analitycznych najpowszechniej są stosowane spektrofotometry absorpcyjne pracujące w zakresie światła widzialnego. Ich celem jest określenie stężenia substancji znajdujących się w badanym płynie ustrojowym.

Istota takiego pomiaru polega na zrealizowaniu kilku kroków. Pierwszy – to krok „chemiczny”, którego zadaniem jest zainicjowanie reakcji chemicznej, umożliwiającej identyfikację interesującego składnika. Toteż badany płyn ustrojowy, wcześniej odpowiednio przygotowany, łączy się ze specjalnym odczynnikiem. W wyniku tego dochodzi do reakcji chemicznej, manifestującej się zmianą barwy takiej „mieszanki”. Jej intensywność zależy od stężenia kontrolowanego czynnika zawartego w badanym płynie. Drugi krok – „optyczny” polega na porównaniu zmiany natężenia światła, które przeszło przez kontrolowany „kolorowy” płyn. Łączy się z nim trzeci krok – „elektroniczny”, w którym mierzone jest natężenie promieniowania po przejściu przez badany płyn. W rzeczywistości dochodzi do wyznaczenia stopnia stłumienia promieniowania przez próbkę, czyli do pomiaru absorpcji. Ostatni – czwarty krok „obliczeniowy” sprowadza się do nadania zmierzonej wartości absorpcji miary „chemicznej”, jaką jest stężenie badanego składnika. Następuje to po przez pomnożenie wyniku pomiaru elektronicznego przez tzw. faktor F . Tak uzyskuje się finalną miarę stężenia np. w gramach na litr).

Jest to jednak możliwe dzięki zastosowaniu specjalnego wzorca odniesienia, jakim jest najczęściej czysty odczynnik, w którym nie zaszła jeszcze żadna reakcja. Porównanie to realizowane jest na bieżąco. Dlatego można spotkać dwie odmiany spektrofotometrów: jednowiązkowy oraz dwuwiązkowy.

W pierwszym przypadku pomiar następuje dwukrotnie: najpierw kontroluje się absorpcję promieniowania przez czysty odczynnik, a potem bada się płyn ustrojowy po zajściu reakcji chemicznej z odczynnikiem. Schemat blokowy spektrofotometru jednowiązkowego przedstawiono na rys. 3.2.



Rys. 3.2. Struktura spektrofotometru (wg. [wiki])

W drugim – promień świetlny przechodzi równocześnie przez oba płyny. W obu sposobach wyniki cząstkowe są zapamiętywane, a następnie przeliczane dzięki zastosowaniu mikroprocesora, który równocześnie nadzoruje cały proces pomiaru spektrofotometrycznego.

Pomiar taki może być przeprowadzany przy jednej lub kilku długościach fali. Ze względu na fakt, iż w istocie pomiar stężenia substancji sprowadza się do identyfikacji kolorów toteż można spotkać się z innym określeniem spektrofotometru jako kolorymetru.

Opis konstrukcji spektrofotometru

Przedstawiony na rys. 3.2 ogólny schemat spektrofotometru jednowiązkowego zawiera wiele istotnych elementów. Źródło światła – generuje promieniowanie ciągłe, najczęściej białe. Monochromator ma za zadanie rozszczepienie światła w taki sposób, aby otrzymać najczęściej potrzebny zakres promieniowania ok. 300 nm do 800 nm (promieniowanie widzialne). Efekt ten można uzyskać dzięki zastosowaniu m.in. siatki dyfrakcyjnej. Zaletą zastosowania siatki dyfrakcyjnej jest to, że dyspersja jest równomierna w całym zakresie widma i przez to szerokość pasma przy ustalonej szerokości szczeliny nie zależy od długości fali. Ruchoma szczelina umożliwia wycięcie ustalonej szerokości widma (np. 5 nm, 10 nm lub 15 nm) obejmującego taką potrzebną długość fali, która umożliwi jak najlepsze zidentyfikowanie różnic stężeń badanego czynnika. Kuweta pomiarowa najczęściej wykonana jest ze szkła kwarcowego, wykazującego odporność na działanie chemikaliów. Jej wymiary, a w szczególności grubość ścianek (tj. grubość warstwy absorbującej) oraz współczynnik transmisji promieniowania muszą być dokładnie znane (dobra przepuszczalność promieniowania w paśmie roboczym). Fotodetektor służy do identyfikacji i zamiany światła na sygnał elektryczny. Takim elementem jest np. fotorezystor, fotodioda. Sygnał z fotodetektora jest wzmacniany, przetwarzany na postać cyfrową. Ta z kolei zostaje odpowiednio skorygowana i przeliczona, a w końcu rezultat jest eksponowany na polu odczytowym.

Ważnymi zagadnieniami technicznymi związanymi z konstrukcją spektrofotometru jest zatem:

- odpowiednia stabilność i charakterystyka spektralna źródła światła, które pada na badaną próbkę,
- parametry detektora światła, które przeszło przez próbkę: duża czułość przy równoczesnym niskim poziomie szumów własnych, szeroki zakres liniowości, stabilność w czasie, dobra powtarzalność charakterystyki,
- własności toru optycznego znajdującego się pomiędzy źródłem światła i detektorem.

Inna technika pomiarowa stężenia substancji zawartych w próbce biologicznej polega na wykorzystaniu kinetyki zmian stężenia substratu lub produktu reakcji chemicznej, w tym z udziałem enzymów. Szybkość reakcji zależy od stężenia mierzonego substratu i od stałości szybkości reakcji, w tym od aktywności enzymów.

Spektrofotometria jest stosowana do badania płynów ustrojowych (np. krwi i moczu) i do określania zawartości różnych produktów (np. glukozy, enzymów, hormonów itd.). Z badanego płynu ustrojowego zostają oddzielone wszystkie stałe składniki (np. krwinki). Niektóre próbki bada się po określonym czasie od momentu połączenia próbki z odczynnikiem (gdy reakcja barwna dobiegła końca), inne próbki (np. badania enzymatyczne) w trakcie trwania reakcji, określając szybkość przebiegu reakcji barwnej.

W przyrządach do spektrofotometrii wykorzystuje się prawo Lamberta-Beera. Najczęściej możliwy jest pomiar następujących wielkości podstawowych: transmitancji (zwanej czasem transmisją lub przepuszczalnością):

$$T = \frac{I_C}{I_0} = 10^{-a_\lambda bC} \quad (3.1)$$

absorbancji (zwanej czasem ekstynkcją E):

$$A = -\log T = a_\lambda bC \quad (3.2)$$

koncentracji (stężenia):

$$C = F \cdot A \quad (3.3)$$

gdzie:

a_λ – współczynnik absorpcji,

b – grubość warstwy absorbującej,

C – badane stężenie,

I_C – natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący o stężeniu C , współczynnika absorpcji a_λ i grubości b ,

I_0 – natężenie promieniowania o długości fali λ przed przejściem przez próbkę,

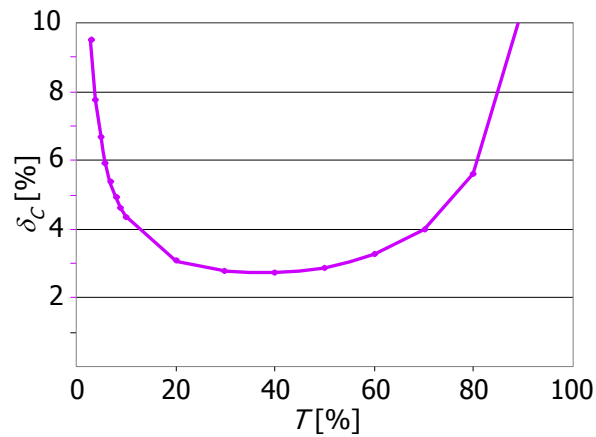
F – współczynnik (tzw. faktor) umożliwiający określenie stężenia, gdy wcześniej zmierzono absorbancję roztworu wzorcowego (o znanym stężeniu C_0).

Na podstawie wyrażenia (3.1) można wyznaczyć względny błąd pomiaru stężenia C , wynikający z dokładności pomiaru natężenia promieniowania, który wyraża się następującą zależnością:

$$\delta_C = \frac{\Delta C}{C} = \frac{0,4343 \cdot \frac{\Delta I}{I_0}}{T \cdot \log T} \quad (3.4)$$

Wynika stąd, że wartość wyznaczonej transmitancji T ma decydujący wpływ na dokładność δ_C wyznaczenia stężenia C (rys. 3.3).

Przedstawiony wykres wskazuje, że dla uzyskania minimalnego błędu pomiaru istotny jest dobór zakresu przepuszczalności, w którym wykonywany jest pomiar. Pozostaje to w ścisłym związku ze współczynnikiem absorpcji a_λ badanej substancji, a pośrednio z długością fali λ . Należy zwrócić uwagę, że długość fali nadawanej oraz odebranej przez detektor jest silnie uzależniona od parametrów technicznych obu elementów: fotonadajnika i fotoodbiornika. Jakość elementów optycznych toru pomiarowego może mieć mniejsze znaczenie.



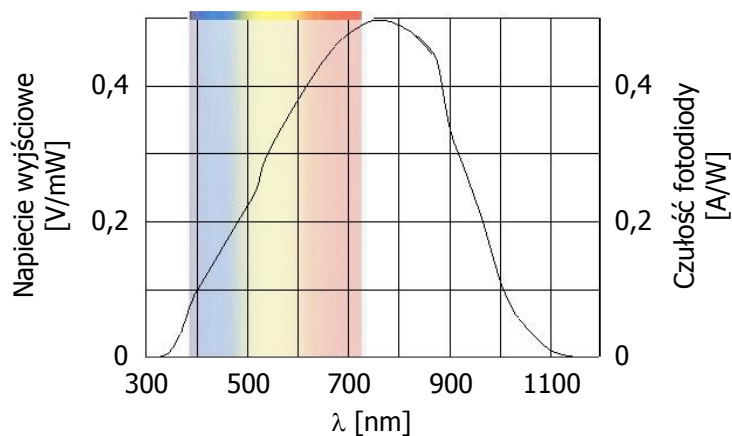
Rys. 3.3. Zależność błędu pomiaru stężenia δ_c od wartości transmitancji T . Symulację przeprowadzono dla błęd pomiaru transmitancji $\delta_T = 1 \%$

Znaczenie parametrów źródła światła i fotoodbiornika

Prawa absorpcji, które stosowne są w spektrofotometrii są słuszne wtedy, gdy do pomiarów stosuje się monochromatyczną wiązkę światła. Z tego powodu stosowane są pryzmaty i siatki dyfrakcyjne oraz odpowiednie szczeliny po to, aby z widma ciągłego wyciąć jak najwęższe pasmo. To wymaga też stosowania bardziej czułego detektora.

Wprawdzie przy odpowiednich założeniach przyjmuje się słuszność zależności opisanej formułą (3.2) to jednak w rzeczywistości należy uwzględnić nie tylko fakt istnienia niemonochromatyczności wiązki światła testującego, ale także niedokładność pomiaru przepuszczalności za pomocą fotodetektora, którego charakterystyka zawsze jest nieliniowa (por. rys. 3.4).

Ze względu na to, że próbka badana jest wiązką światła o pewnej szerokości spektralnej, toteż, że względu na nieliniową charakterystykę fotodetektora, wyniki pomiarów będą różnić się w zależności od szerokości wiązki światła $\Delta\lambda$. Także z powodu nieliniowości detektora niezbędne jest skalibrowanie urządzenia przy każdej zmianie długości fali λ , przy której przeprowadzane są pomiary próbki. Kalibracja ta ma jeszcze jedną zaletę: pozwala uniezależnić się od zmian natężenia źródła światła nie tylko ze względu na jego charakterystykę spektralną, ale także ze względu na zależność natężenia od zmian napięcia zasilającego.



Rys. 3.4. Przykładowa charakterystyka fotodetektora (fotodiody)

Spektrofotometr Spekol 221

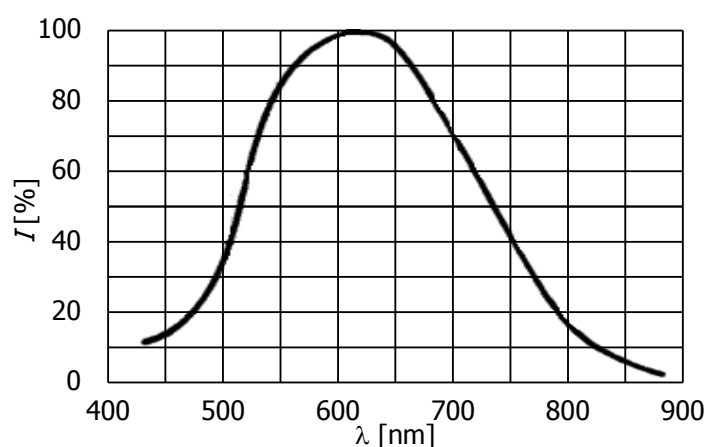
Spekol 221 składa się z typowego toru spektrofotometrycznego jednowiązkowego, układu hydrauliki (dzięki której następuje wymiana płynu), termostatu (zapewniającego właściwą temperaturę płynu) oraz bloku kontrolno-pomiarowego zbudowanego w oparciu o mikrokontroler. Blok spektrofotometryczny składa się ze źródła promieniowania, filtrów, monochromatora, pojemnika na kuetę, fotokomórki oraz wzmacniacza sygnałowego. Parametrami bloku są: długości fali, monochromatyczność wiązki, stałość wzmocnienia w czasie.

W celu wyeliminowania sygnału zakłócającego strumień światła wysyłany jest w kierunku próbki w sposób cykliczny (modulacja światła) i to pozwala na uśrednianie wyniku pomiaru. Blok ten jest tradycyjnym i podstawowym elementem spektroskopii.

Zastosowanie spektrofotometru polega na pomiarze natężenia promieniowania przechodzącego przez preparat, którego absorpcję uważa się za zerową (w niniejszym przypadku jest to woda destylowana). Zmierzona wartość zostaje zapamiętana, a następnie uwzględniana przy późniejszych pomiarach. W drugim etapie badana jest absorpcja promieniowania przez testowaną próbkę.

Fotodetektor

W badaniach doświadczalnych przeprowadzanych w niniejszym ćwiczeniu zaproponowano dwa fotodetektory. Pierwszym z nich jest fotorezystor RPP 130, którego charakterystykę spektralną przedstawiono na rys. 3.5. Drugim elementem jest fotodioda BPYP30 – element o nieznanym (w ćwiczeniu) charakterystyce spektralnej.



Rys. 3.5. Charakterystyka spektralna fotorezystora RPP 130

Tabela 3.1. Charakterystyka spektralna fotorezystora RPP 130 (dane katalogowe)

Lp.	λ [nm]	I [%]	λ [nm]	I [%]	λ [nm]	I [%]
1.	400	10	575	94	750	42
2.	425	12	600	98	775	28
3.	450	15	625	100	800	17
4.	475	22	650	95	825	11
5.	500	35	675	84	850	6
6.	525	63	700	70	875	3
7.	550	85	725	56	900	2

POMIARY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Wyposażenie stanowiska I

Lp.	Aparatura	Dokumentacje	Osprzęt
1.	-	Instrukcja do ćwiczenia	Zestaw kompaktowy (kuweta + zestaw płynów)
2.	Spekol 221	Spekol 221 instrukcja obsługi i parametry techniczne	Komora termiczna
3.		Spekol 221 skrócona instrukcja obsługi	Strzykawka dozująca
4.	Metex	Instrukcja obsługi	Zlewki duże i małe
5.		Elementy optoelektroniczne – karty katalogowe	Płyny barwne o różnych stężeniach