ĆWICZENIE NR 3

POMIARY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Cel ćwiczenia

Poznanie podstawowej metody określania biochemicznych parametrów płynów ustrojowych oraz wymagań technicznych stawianych urządzeniu pomiarowemu.

Część 3.1.

Ocena właściwości optycznych płynów za pomocą spektrofotometru

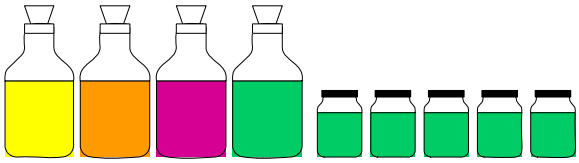
3.1.1. Skalibrować urządzenie Spekol jednorazowo dla wody destylowanej, dla długości fali λ = 350 nm i szerokości widma $\Delta\lambda = 5$ nm.

3.1.2. Sprawdzić wskazania urządzenia (T – transmisja) przy długości fali λ = 350 nm i różnej szerokości widma $\Delta\lambda$ = 3 nm oraz $\Delta\lambda$ = 15 nm.

3.1.3. Sprawdzić wskazania urządzenia (T – transmisja) przy szerokości widma $\Delta\lambda$ = 5 nm i przy różnych długościach fali λ.

3.1.4. Zbadać właściwości płynu X (T – transmisja) o różnym stężeniu przy szerokości widma $\Delta\lambda$ = 5 nm i przy różnych długościach fali λ.

3.1.5. Zbadać właściwości różnych płynów (T – transmisja) (o różnych barwach) przy szerokości widma $\Delta\lambda$ = 5 nm i przy różnych długościach fali λ.



Rys. 1. Barwy płynów używanych w ćwiczeniu

Część 3.2.

Badanie wpływu cechu urządzenia na jakość oceny parametrów optycznych próbki

3.2.1. Na podstawie *Wytycznych* dotyczących badań biochemicznych ustalić warunki badań płynów ustrojowych za pomocą różnych urządzeń. Porównać wyniki analizy.

3.2.2. Na podstawie oględzin ocenić konstrukcję elektroniczną urządzenia. Wskazać charakterystyczne bloki.

3.2.3. Na podstawie oględzin opisać budowę toru: od źródła światła do fotodetektora. Wskazać elementy decydujące o warunkach pomiaru oraz mogące wpływać na dokładność pomiaru.

3.2.4. Zaobserwować zmiany pasma strumienia świetlnego przy różnej szerokości wiązki.

3.2.5. Zbadać własności optyczne kuwety. Dobrać odpowiednie warunki pomiaru.

3.2.6. Określić własności optyczne wybranego płynu. Wskazać źródła błędów pomiarowych.

3.2.7. Określić własności optyczne różnych płynów. Porównać wyniki.
3.2.8. Określić własności optyczne płynu o różnych stężeniach. Porównać wyniki.

Część 3.3.

Badanie cech fotoodbiornika i ocena ich wpływu na dokładność pomiarów spektrofotometrycznych

3.3.1. Zbadać odpowiedź wskazanego fotodetektora (fotorezystora i fotodiody) na oświetlenie wiązką światła w zakresie 300 nm do 800 nm. Pomiary przeprowadzić dla różnych szerokości widma $\Delta\lambda$.
3.3.2. Porównać uzyskaną charakterystykę z katalogową charakterystyką fotorezystora.
3.3.3. Wyznaczyć charakterystykę widmową natężenia źródła światła. Wyróżnić charakterystyki dla różnych szerokości widma $\Delta\lambda$.
3.3.4. Wyznaczyć charakterystykę widmową fotodiody 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,
- fotorezystor, fotodioda.

Problemy

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

Literatura

1. Bronzino J.D.: The biomedical engineering. CRC Press, Boca Raton 1995.
2. Szmal Z., Lipiec T.: Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej. PZWL Warszawa 1997.
3. Szyszko E.: Instrumentalne metody analityczne. PZWL Warszawa 1982.

Metody spektroskopowe

Metody spektroskopowe obejmują 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 laboratoriach analitycznych najpowszechniej są stosowane spektrofotometry pracujące w zakresie światła widzialnego. Wykorzystywane jest przy tym wiele technik pomiarowych, które zależą od zakresu użytego promieniowania (nadfiolet, światło widzialne, podczerwień) czy też rodzaju widma (emisyjne, absorpcyjne). Istotnymi zagadnieniami technicznymi związanymi z konstrukcją spektrofotometrów są: odpowiednia stabilność i charakterystyka spektralna źródła światła, parametry detektorów światła oraz własności toru optycznego znajdującego się pomiędzy źródłem światła i detektorem.

Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa w zakresie światła widzialnego i nadfioletowego to analiza wykorzystywana do pomiaru stężeń substancji, głównie substratów reakcji biochemicznych przebiegających w organizmie i do pomiaru aktywności enzymów.

Analiza jest przeprowadzana przy jednej lub kilku długościach fali. W czasie pomiaru absorpcję próbki mierzonej porównuje się z absorpcją wzorcowych substancji.

Inna technika pomiarowa stężenia substancji zawartych w próbce biologicznej polega na wykorzystaniu kinetyki zmian stężenia substratu lub produktu reakcji chemicznych, w tym z udziałem enzymów. Szybkość reakcji zależy od stężenia mierzonego substratu i stałości szybkości reakcji, w tym 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). Połączenie badanej próbki z odpowiednim dla niej odczynnikiem chemicznym powoduje reakcję barwną (zmianę natężenia barwy). 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.

Przyrządy do spektrofotometrii umożliwiają najczęściej pomiar następujących wielkości podstawowych:
transmisji:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-a_\lambda bC} \tag{1}$$

ekstynkcji (jest to wielkość fotometryczna opisująca osłabienie strumienia promieniowania monochromatycznego przechodzącego przez ośrodek):

$$E = -\log T = a_\lambda bC \tag{2}$$

koncentracji:

$$C = F \cdot E \tag{3}$$

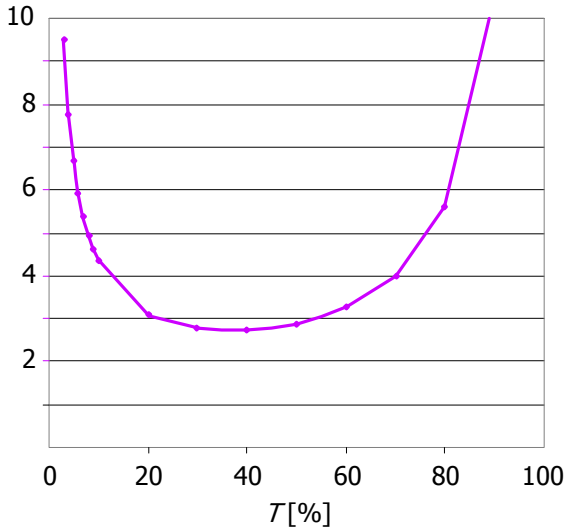
gdzie:
a_λ – współczynnik absorpcji,
b – grubość warstwy absorbującej,
C – stężenie próbki,

I – natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący o stężeniu C, współczynniku absorpcji a_λ i grubości b,
I_0 – natężenie promieniowania o długości fali λ przed przejściem przez próbkę,
F – współczynnik umożliwiający określenie stężenia, gdy wcześniej zmierzono ekstynkcję roztworu wzorcowego (o znanym stężeniu C_0).

Na podstawie wyrażenia (1) można wyznaczyć względny błąd pomiaru stężenia C, który wyraża się następującą zależnością:

$$\delta_C = \frac{0{,}4343 \cdot \frac{\Delta I}{I_0}}{T \cdot \log T} \tag{4}$$

Z powyższego wzoru wynika, że wartość wyznaczanej transmisji T ma decydujący wpływ na dokładność δ_C wyznaczenia stężenia C (rys. 2).



Rys. 2. Zależność błędu pomiaru stężenia δ_C od wartości transmisji T. Symulacje przeprowadzono dla błędu pomiaru transmisji δ_T = 1 %

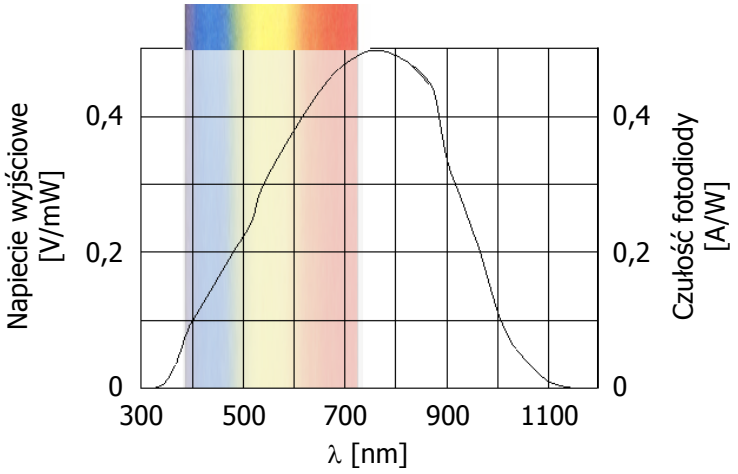
Przedstawiony wykres wskazuje, że dla uzyskania minimalnego błędu pomiaru istotny jest dobór zakresu przepuszczalności, w którym wykonywany jest pomiar. Pozostaje to w ścisłym związku ze współczynnikiem absorpcji a_λ badanej substancji a pośrednio z długością fali λ.

Znaczenie parametrów źródła światła i fotoodbiornika

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

Wprawdzie przy odpowiednich założeniach przyjmuje się słuszność zależności opisanej formułą (2) to 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).



Rys. 3. Przykładowa charakterystyka fotodetektora (fotodiody)

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 $\Delta\lambda$. 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.

Spekol

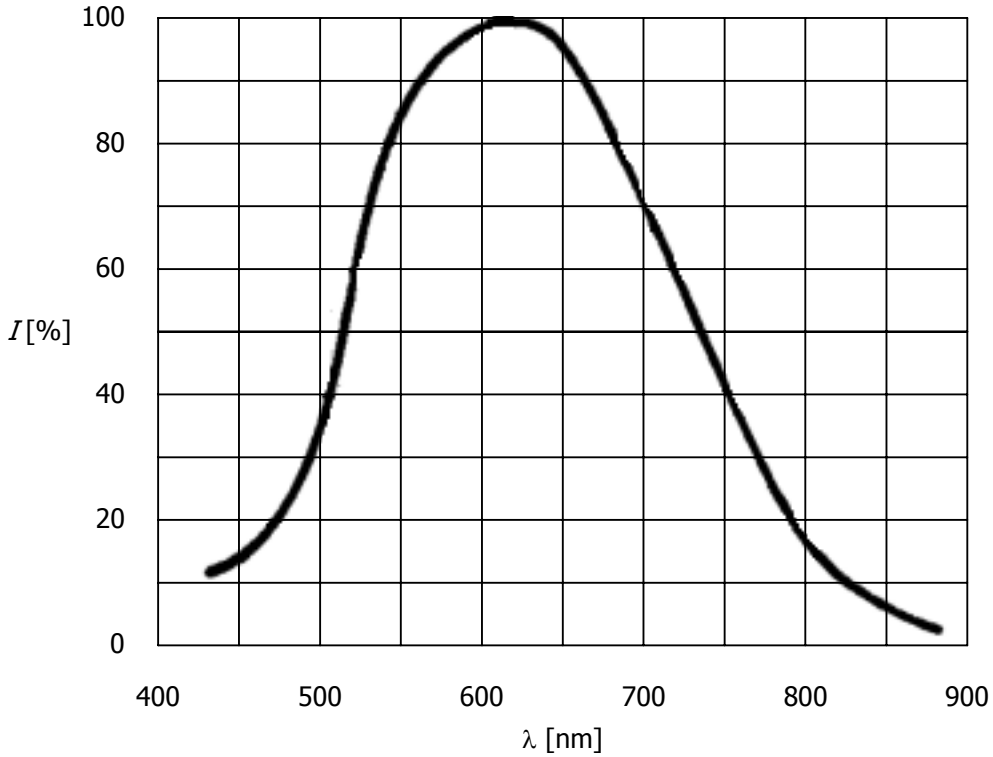
Spekol składa się z typowego toru spektrofotometrycznego (jednowiązkowego), układu hydrauliki (wymiana próbki), termostatu oraz bloku kontrolno-pomiarowego zbudowanego w oparciu o mikrokontroler. Blok spektrofotometryczny składa się ze źródła promieniowania, filtrów, monochromatora, pojemnika na kuwetę, fotokomórki oraz wzmacniacza sygnałowego. Parametrami bloku są: długości fali, monochromatyczność wiązki, stałość wzmocnienia w czasie. Modulację światła przeprowadza się w celu wyeliminowania sygnału zakłóceń. Blok ten jest tradycyjnym i podstawowym elementem spektroskopii.

Obecnie ogólną tendencją przy konstruowaniu aparatury chemicznej jest wykorzystanie mikrokontrolerów. Różnorodność aplikacji sprawia, że mikroprocesory stosuje się w celu automatyzacji pomiarów, obróbki wyniku, sterowania urządzeniem oraz zapamiętywania danych do późniejszych analiz statystycznych. Spekol posiada wbudowany mikroprocesor, którego celowość stosowania pojawia się już przy kalibracji (spektroskopia różnicowa).

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. 4. Drugim elementem jest fotodioda BPYP30 – element o nieznanej (w ćwiczeniu) charakterystyce spektralnej.



Rys. 4. Charakterystyka spektralna fotorezystora RPP 130

Tabela 1. Charakterystyka spektralna fotorezystora RPP 130 (dane liczbowe)

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