

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



VYUŽITÍ JEDNOPAPRSKOVÉHO SPEKTROFOTOMETRU MOM PRO NĚKTERÁ BIOCHEMICKÁ STANOVENÍ

Bakalářská práce

Martina Kozáková

Školitel: doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Bakalářské studium

Obor: Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při sepisování práce a svým rodičům za podporu v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na katedře biochemie pod vedením svého školitele doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. Všechny použité literární i jiné zdroje jsem řádně citovala.

Martina Kozáková

V Praze dne 30. 8. 2007

Martina Kozáková

Obsah

1. Přehled problematiky	5
1.1 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	5
1.1.1 Princip absorpční spektrofotometrie v UV a VIS oblasti	5
1.1.2. Absorpční spektra v UV-VIS oblasti	7
1.2 Spektrofotometry pro měření absorpce v UV/VIS oblasti.....	7
1.2.1 Zdroj záření	8
1.2.2 Disperzní systém	8
1.2.3 Detektory záření	9
1.2.4 Absorbující prostředí	9
1.2.5 Uspořádání základních přístrojových částí	10
1.3 Validace přístrojů	11
1.3.1 Přesnost nastavení vlnových délek	11
1.3.2 Fotometrická přesnost	13
1.3.3 Limit rozptýleného záření	16
1.3.4 Rozlišovací schopnost.....	16
1.3.5 Šum	18
1.4 Spektrofotometr Spektromom 195D	18
1.4.1. Úvod.....	18
1.4.2. Základní části spektrofotometru.....	18
1.4.3. Optický systém.....	20
1.4.4. Postupy při validaci přístroje	21
2. Cíl bakalářské práce	23
3. Experimentální část.....	24
3.1 Použité laboratorní přístroje, filtry	24
3.2 Zjištění přesnosti nastavení vlnových délek	24
3.3 Kalibrace nastavení vlnové délky	25
3.3.1 Nastavení spektrofotometru	26
3.3.2 Kontrola nastavení vlnové délky.....	26
3.4 Kontrola přepočtu transmitance na absorbanci	29
4. Souhrn	33
5. Přehled použité literatury.....	34

1. Přehled problematiky

1.1 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Podstatou absorpční spektrofotometrie je sledování absorpce záření prostředím. V praxi se nejčastěji měří v oblasti 200 – 800 nm (blízká ultrafialová a viditelná oblast). Měření v oblasti pod 200 nm je experimentálně obtížné, protože zde absorbují i anorganické ionty, molekuly kyseliny a vzduch. [1]

1.1.1 Princip absorpční spektrofotometrie v UV a VIS oblasti [2-5]

Ultrafialové a viditelné záření představuje pouze malou část elektromagnetického spektra a jako další formy záření (radiofrekvenční, mikrovlnné, infračervené, kosmické a rentgenové) má duální, tj. vlnově korpuskulární charakter. Souvislost mezi vlnovými vlastnostmi záření (frekvencí) a vlastnostmi korpuskulárními (energií) popisuje známý vztah odvozený Planckem:

$$E = h \cdot \nu$$

kde E je energie, h Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) a ν je frekvence [Hz].

Každé elektromagnetické vlnění lze charakterizovat frekvencí (ν), která udává počet kmitů za sekundu a vlnovou délkou (λ), což je dráha, o kterou postoupí vlna za dobu jednoho kmitu. Tyto dvě veličiny spolu souvisí vztahem:

$$c = \nu \cdot \lambda$$

kde c je rychlost šíření světla. Ve vzduchu je rychlost šíření světla menší než ve vakuu. Snížení rychlosti světla udává index lomu (n dané frekvenci podíl rychlosti světla ve vakuu k rychlosti v daném prostředí). Pokud záření vstoupí do prostředí s vyšším indexem lomu, jeho vlnová délka je ve srovnání se vzduchem menší. Za normálních atmosférických

podmínek se index lomu vzduchu blíží jedné (přibližně 1,0028 pro VIS oblast) a jeho vliv tak lze obvykle zanedbat.

Při interakci záření s látkou se mohou uplatnit jevy jako je lom, odraz, rozptyl, absorpce, fluorescence/fosforescence a popř. fotochemická reakce. Pro měření UV-VIS spekter se využívá absorpce. Při absorpci látka přednostně absorbuje záření určité vlnové délky, tj. určité energetické kvantum. Množství absorbující látky lze zjistit podle velikosti měřené absorpce.

Pro měření absorpce záření je propustnost T (transmittance) rovna podílu mezi intenzitou prošlého záření (I) a intenzitou vstupujícího záření (I_0):

$$T = I / I_0$$

Hodnoty transmittance se často uvádějí v procentech.

Častěji se využívá absorbance A , která je definována jako logaritmus převrácené hodnoty transmittance:

$$A = - \log T$$

Pro posouzení velikosti absorpce záření vzorkem se měří velikost absorbance (někdy transmittance) v závislosti na vlnových délkách (případně frekvenci nebo vlnočtu) použitého spojitého záření, tzv. absorpční spektrum. Absorpční spektrum molekul je soubor pásů odpovídající jednotlivým energetickým přechodům. Leží tedy v oblasti vlnových délek, které jsou charakteristické pro danou látku a jejich poloha se využívá pro kvalitativní analýzu.

Pro kvantitativní vyhodnocení spektra se využívá Lambertova - Beerova zákona, podle kterého je absorbance přímo úměrná počtu absorbujících molekul v dráze paprsku:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c,$$

kde ϵ je molární absorpční koeficient ($\text{m}^2 \cdot 10^{-2}/\text{g}$), c je koncentrace absorbující látky (g/l , mg/l) a l je tloušťka absorbující vrstvy (cm). Lambertův – Beerův zákon platí jen za určitých podmínek. Záření musí být monochromatické, roztoky musí být velmi zředěné a absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám.

Molární absorpční koeficient je charakterický pro danou látku při přesně definovaných podmínkách, jako je vlnová délka, rozpouštědlo a teplota. Experimentálně zjištěné hodnoty

závisí na vlastnostech použitého přístroje. Z tohoto důvodu není vhodné pro kvantitativní analýzy používat předem určené koeficienty (např. z literatury), ale je lépe stanovit je pomocí standardu o známé koncentraci, měřeného za stejných podmínek na tomtéž přístroji.

1.1.2. Absorpční spektra v UV-VIS oblasti

Absorpční spektra v UV-VIS oblasti vznikají díky přechodům mezi elektronovými stavy v molekule. Vedle těchto energeticky nejnáročnějších přechodů se uplatňují i méně náročné přechody mezi vibračními a rotačními hladinami. Vibrace molekuly znamenají periodické změny jaderných vzdáleností nebo valenčních úhlů v molekule. Rotace a s ní spojené rotační stavy se týkají molekuly jako celku. V důsledku toho absorpcí záření dostatečného k přechodu mezi elektronickými hladinami dojde také k excitaci vibračních a rotačních hladin. Vzniká tak pásové spektrum s jemnou strukturou danou řadou vibračních a rotačních přechodů, v kondenzované fázi je tato struktura vlivem interakce mezi molekulami změněna v souvislý absorpční pás.

Absorpce je nejčastěji způsobena elektronovými přechody mezi vazebnými a antivazebnými orbitaly π ($\pi \rightarrow \pi^*$) a přechody z nevazebných orbitalů ($n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$). U bílkovin a nukleových kyselin jsou hlavními chromofory systémy s násobnými vazbami. U konjugovaných systémů (např. porfyrinový kruh) se absorpce záření projevuje hlavně ve viditelné oblasti. [1,6]

Absorpce v oblasti viditelného záření (400-750 nm) způsobuje barevnost látek. Absorpci v UV oblasti lze měřit jen fotoelektrickými detektory, lidské oko toto záření nevnímá. [6]

1.2 Spektrofotometry pro měření absorpce v UV/VIS oblasti

Absorpční spektrofotometr je přístroj k měření transmitance nebo absorbance vzorku jako funkce vlnové délky elektromagnetického záření. Základní části spektrofotometru jsou: zdroj produkující kontinuální elektromagnetické záření v dané oblasti, disperzní systém, který separuje záření z určitého spektrálního intervalu vlnových délek, zařízení pro umístění vzorku

a jeden či více detektorů k měření intenzity záření. Další optické prvky, jako kolimátory, čočky a zrcadla slouží k vedení, koncentraci či zaostřování paprsku. [2]

1.2.1 Zdroj záření

Zdroj záření emituje primární záření, které je vzorkem absorbováno a velikost této absorpce je sledována.

Ideální zdroj by měl poskytovat záření o konstantní intenzitě přes celý rozsah vlnových délek s dlouhodobou stabilitou a nízkým šumem. Pro viditelnou a ultrafialovou oblast se používá rozdílných typů zdrojů záření. Nejrozšířenějším zdrojem UV záření jsou deuteriové a vodíkové výbojky, které za vysokých tlaků plynů emitují spojitě ultrafialové záření a současně emitují několik čar ve viditelné oblasti, jichž se často používá ke kalibraci spektrofotometrů. Dalším možným zdrojem záření v téže oblasti jsou xenonové výbojky, které se ale s ohledem na vyšší cenu používají méně často.

Ve viditelné oblasti se používají halogenové a wolframové lampy. Wolframová lampa poskytuje spojitě záření v rozsahu od 350 nm až do blízké infračervené oblasti. Je to wolframový drát, který umístěný ve skleněné nebo křemenné baňce plněné argonem. Halogenová lampa je v zásadě wolframová lampa, která obsahuje malé množství jódu v křemenné baňce. Plynný wolfram vznikající sublimací ze žhavého wolframového vlákna reaguje s jódem za vzniku WI_2 . Když molekuly WI_2 narazí na vlákno, jodid se rozloží a wolfram se tak vrací zpět na vlákno.[3,4]

1.2.2 Disperzní systém

Disperzní systém tvoří základní optickou část přístrojů a slouží k separaci určité vlnové délky nebo přesněji úzkého pásu vlnových délek. Disperzní systém je realizován pomocí monochromátorů nebo filtrů (u jednodušších přístrojů pro kvantitativní analýzu). [3]

Monochromátory jsou buď hranolové nebo mřížkové. Hranolové monochromátory rozdělují polychromatické záření na základě toho, že různé vlnové délky se lámou pod různými úhly. Z hranolu tedy vystupují paprsky různých vlnových délek různými směry. Otáčením hranolu dopadá na výstupní štěrbinu monochromátoru záření různé vlnové délky.

Mřížkové monochromátory rozdělí od hranolu využívají difrakce (ohybu) záření. [1]

1.2.3 Detektory záření

Detektory převádějí energii dopadajícího záření na jinou formu energie, nejčastěji na energii elektrickou. Detektor by měl být citlivý na záření v širokém rozsahu vlnových délek a poskytovat lineární odezvu bez ohledu velikost energie dopadající záření (dynamický rozsah), mít nízký šum a vysokou citlivost. Spektrofotometry obvykle obsahují jako detektor fotonásobič nebo fotodiodový detektor, popřípadě fotonky. [2]

Fotonásobič je založen na vnějším fotoelektrickém efektu, kdy dochází k emisi elektronů z povrchu elektrody, na kterou dopadá elektromagnetické záření. Fotonásobič je tvořen fotokatodou, anodou a soustavou pomocných elektrod - dynod, které jsou umístěny v evakuované baňce. Foton dopadne vstupním okénkem na fotokatodu, uvolní z ní elektrony, které jsou urychleny vloženým elektrickým polem a dopadají kaskádovitě na dynody. Každý urychlený elektron vyrazí z dynody několik sekundárních elektronů, čímž se účinek záření zesiluje a mezi katodou a anodou pak registrujeme proud.

Kvalita fotonásobiče je především dána hodnotou tzv. temného proudu, což je proud, který prochází při vloženém urychleném napětí, i když na fotokatodu nedopadá záření. Ke vzniku temného proudu přispívá termoemise fotokatody, emise silným elektrickým polem a svodový proud. Jednodušší detektory na stejném principu (fotobuňky) mají pouze fotokatodu a anodu, nedochází na nich k zesílení signálu.

Fotodiodový detektor má širší dynamický rozsah. Ve fotodiodě světlo dopadající na polovodič umožní tok elektronů, takže se vyčerpává náboj kondenzátoru, který je připojen k polovodiči. Množství náboje, které je potřeba k nabití kondenzátoru, je úměrné intenzitě dopadajícího světla. [3]

1.2.4 Absorbující prostředí [3]

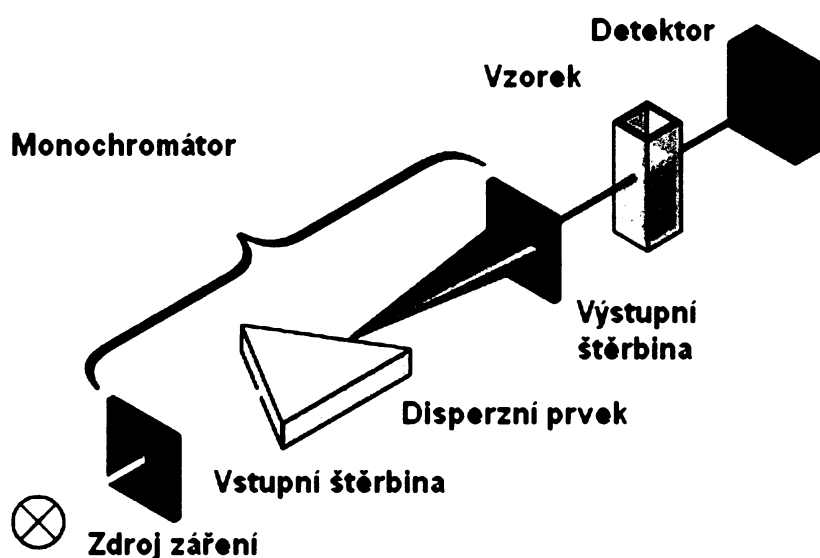
Při nejběžnější práci se používá obvykle rektangulárních kyvet (s konstantní známou vnitřní tloušťkou absorbující vrstvy - v UV-VIS oblasti od 0,1 do 10 cm). Pro běžná měření se nejčastěji používá 1 cm kyvet. Tloušťka kyvet se většinou volí v závislosti na koncentraci měřeného roztoku tak, aby se naměřená hodnota absorpance pohybovala v rozmezí 0,1 až 1. Materiál, ze kterého jsou kyvety vyrobeny, nesmí absorbovat záření ve sledovaném vlnovém rozsahu, proto pro ultrafialovou oblast používáme křemenné kyvety, pro oblast viditelnou postačují skleněné nebo plastové.

1.2.5 Uspořádání základních přístrojových částí [2]

Tradičně se rozlišují dva základní typy konstrukce - jednopaprsková nebo dvoupaprsková.

U jednopaprskového uspořádání jde polychromatické záření ze zdroje na výstupní štěrbinu monochromátoru, kde je selektivně transmitován úzký pruh záření. Toto monochromatizované záření jde přes kyvetový prostor a kyvetu do detektoru. Aby se zjistila absorbance vzorku, musí se nejdříve změřit referenční intenzita záření dopadající na detektor (v kyvetě je referenční roztok), která se poté porovná s intenzitou záření prošlého kyvetou s měřeným vzorkem. Toto uspořádání je vhodné pro měření absorbancí vzorků při jedné vlnové délce.

Schéma jednopaprskového uspořádání je na obrázku 1.



Obr. 1 - Schéma jednopaprskového uspořádání, podle [2], upraveno

V původním uspořádání jednopaprskových přístrojů bylo potřeba měřit spektrum „bod po bodu“, což bylo velmi zdlouhavé a pracné. Tyto přístroje se dnes používají spíše jen ke kvantitativním měřením (při konstantní vlnové délce). Moderní jednopaprskové přístroje registrují celý měřený interval nejprve pro referenční a poté pro měřený vzorek. U jednopaprskového uspořádání, kde je pro získání celého spektra potřeba několik minut, protože se každá vlnová délka musí změřit zvlášť, může dojít k časové nestabilitě použitého zdroje záření.

Dvoupaprskové spektrofotometry umí kompenzovat tyto změny intenzity zdroje záření

blanku a vzorku. V pravých dvoupaprskových přístrojích prochází rozdělený paprsek jak referenčním, tak měřeným vzorkem. Dosahuje se toho tím, že je paprsek rozdělen např. děličem (dvoupaprskové spektrofotometry „v prostoru“) nebo častěji rychle přepínán pomocí rotujícího zrcadla (dvoupaprskové spektrofotometry „v čase“). V současnosti se uplatňují také jednodušší přístroje (tzv. Split Beam), v nichž je kompenzována nestabilita zdroje měřením pomocným detektorem.

Jiným typem jsou spektrofotometry s diodovým polem (diode-array), které mají jednopaprskové uspořádání. Polychromatické záření jde ze zdroje přes kyvetový prostor do výstupní štěrbině polychromátoru. Polychromátor rozptýlí záření na diodové pole, kde každá dioda změří úzkou část spektra. Vlnová délka záření, které je detekováno diodou závisí na velikosti vstupní štěrbině polychromátoru a s velikostí diody.

1.3 Validace přístrojů

Účelem validace přístrojů je potvrzení, že základní parametry, jako je správné nastavení vlnové délky, fotometrická přesnost, rozlišení a další, odpovídají specifikaci přístroje, resp. jsou vhodné pro uvažovanou analytickou metodu.

1.3.1 Přesnost nastavení vlnových délek

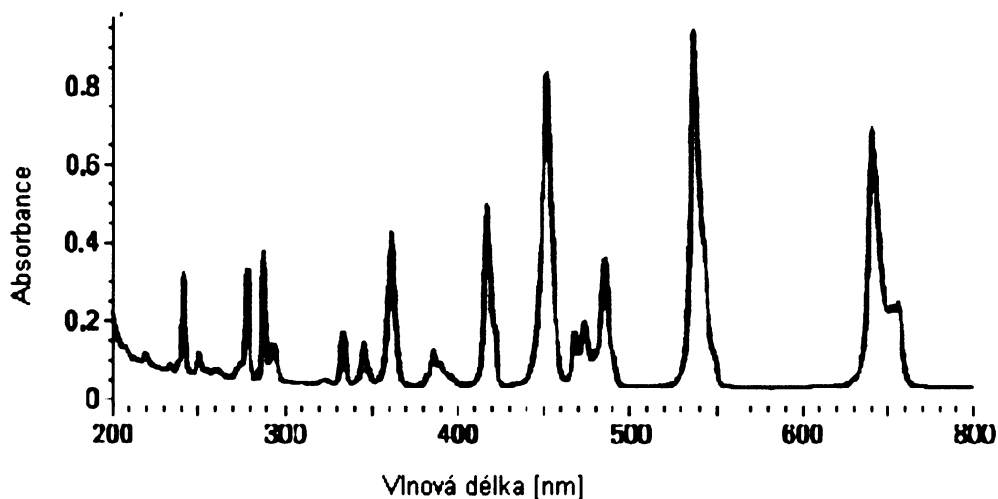
Přesnost nastavení vlnových délek je důležité kritérium pro porovnání spekter, která jsou měřena na různých přístrojích. Také hraje roli v kvantitativní analýze při použití absorpčních koeficientů, které jsou závislé na vlnové délce a měření by mělo být provedeno při vlnové délce, při které byly tyto koeficienty získány. K měření přesnosti nastavení vlnových délek se v ideálním případě používají referenční standardy, které mají velmi úzké a dobře definované píky v celém UV pásu a viditelné oblasti spektra. Obecně připadají v úvahu kalibrační filtry (kapalinové nebo ze speciálních skel) nebo emisní kalibrační výbojky s vysokým podílem čárových emisí. [2]

Podle lékopisu [7] se kontrola vlnových délek provádí pomocí absorpčních maxim roztoku chloristanu holmitého nebo pomocí emisních maxim vhodných výbojek. V tabulce 1 jsou uvedeny polohy čar pro vodíkovou, resp. deuteriovou lampu a poloha čar pro rtuťové páry. Povolená tolerance je ± 1 nm pro ultrafialovou oblast a ± 3 nm pro viditelnou oblast.

Tabulka 1 Maxima absorpce roztoku chloristanu holmitého (Ho), poloha emisních čar pro vodíkovou (Hbeta) a deuteriovou (Dbeta) lampu a rtuťové páry (Hg), podle [7]

λ_{\max} [nm]	λ_{\max} [nm]
241,15 nm (Ho)	404,66 nm (Hg)
253,70 nm (Hg)	435,83 nm (Hg)
287,15 nm (Ho)	486,00 nm (Dbeta)
302,25 nm (Hg)	486,10 nm (Hbeta)
313,16 nm (Hg)	536,30 nm (Ho)
334,15 nm (Hg)	546,07 nm (Hg)
361,50 nm (Ho)	576,96 nm (Hg)
365,48 nm (Hg)	579,07 nm (Hg)

Na obrázku 2 je spektrum roztoku chloristanu holmitého (40 g/l oxidu holmitého v 10% v/v kyselině chloristé). [2,7]

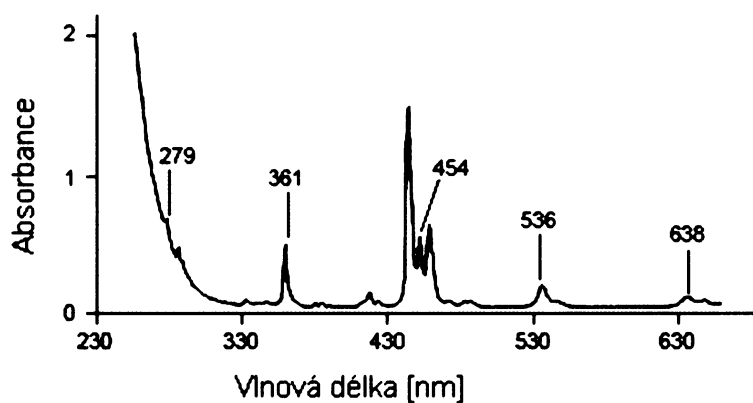


Obr. 2 - Spektrum roztoku chloristanu holmitého, podle [2], upraveno

Kontrolu stupnice vlnové délky lze provést také pomocí holmiového a didymiového skleněného filtru. Polohy maxim absorpce s povolenými tolerancemi jsou uvedeny v tabulce 2 [8]. Spektrum holmiového filtru je na obrázku 3 [9]

Tabulka 1 - Hodnoty vlnových délek absorpčních maxim pro didymiový a holmiový filtr podle [8]

Vlnové délky [nm]	
Holmiový filtr	Didymiový filtr
241,5 ± 0,2	573,0 ± 3,0
279,4 ± 0,3	586,0 ± 3,0
287,5 ± 0,4	685,0 ± 4,5
333,7 ± 0,6	
360,9 ± 0,8	
418,4 ± 1,1	
453,2 ± 1,4	
536,2 ± 2,3	
637,5 ± 3,8	



Obr. 3 - Spektrum holmiového filtru, podle [9], upraveno

U spektrofotometrů s deuteriovými lampami lze použít deuteriové emisní čáry, které jsou při 486,0 nm a 658,1 nm. Nevýhodou deuteriových lamp je, že pro kalibraci jsou k dispozici jen dvě vlnové délky a žádná z nich neleží v UV oblasti. [8, 10]

1.3.2 Fotometrická přesnost

Fotometrická přesnost je důležitá pro kvantitativní analýzu, kde jsou užívány absorpční koeficienty. Také je to důležitý parametr při srovnávacích měřeních. K měření

fotometrické přesnosti se dají použít srovnávací standardy, které by ideálně měly mít stálou absorpenci v celém UV a VIS rozsahu, aby nebyly ovlivněny přesností nastavení vlnových délek. Kontrola absorpencí se provádí mnoha metodami. Některé jsou pro UV oblast, některé pro VIS oblast. [2]

Měření fotometrické přesnosti ve VIS oblasti spektra

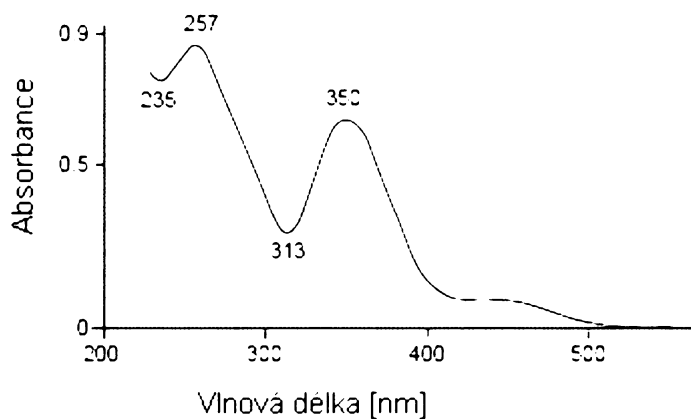
Pro měření fotometrické přesnosti lze ve viditelné oblasti spektra použít skleněných šedých filtrů nebo roztoku CuSO_4 , který se připraví rozpuštěním 20g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve vodě, přidáním 10 ml kyseliny sírové a doplněním na 1000 ml. Hodnoty absorpance tohoto roztoku, změřeného v 1 cm vrstvě proti 1% kyselině sírové, udává tabulka 3. Povolená chyba od naměřených hodnot jsou 2 % udávané hodnoty absorpance.[8]

Tabulka 3 - Hodnoty absorpance roztoku síranu měďnatého (20 g/l) v 1% kyselině sírové podle [8]

λ [nm]	Absorbance
600	0,068
650	0,224
700	0,527
750	0,817

Měření fotometrické přesnosti v UV oblasti spektra

Na kontrolu fotometrické přesnosti lze použít roztok dichromanu draselného, který se připraví rozpuštěním 57 mg až 63 mg dichromanu draselného (předtím vysušeného při 130°C) v kyselině sírové 0,005 mol/l a jejím doplněním na 1000 ml. V tabulce 4 jsou uvedeny specifické hodnoty absorpance tohoto roztoku (1 % roztok měřený v 1 cm květě) včetně povolených odchylek a dále hodnoty absorpance pro roztok obsahující přesně 60,06 mg dichromanu draselného v 1000 ml kyseliny sírové. Spektrum 0,006 % roztoku dichromanu draselného v kyselině sírové je uvedeno na obrázku 4. [7,9]



Obr. 4 - Spektrum 0,006% roztoku dichromanu draselného v kyselině sírové, podle [9], upraveno

Tabulka 4 – Specifické hodnoty absorbance $K_2Cr_2O_7$ v 0,005M kyselině sírové, hodnoty absorbance pro roztok obsahující přesně 60,06 mg $K_2Cr_2O_7$, hodnoty absorbance roztoků A a B $K_2Cr_2O_7$, podle [7,8]

λ [nm]	A (1%, 1 cm)	Tolerance	Absorbance 0,006 % roztoku $K_2Cr_2O_7$	Roztok A	Roztok B
235	124.5	122.9 – 126.2	0.748	0.626	1.251
257	144.0	142.4 – 154.7	0.865	0.727	1.454
313	48.6	47.0 – 50.3	0.292	0.244	0.488
350	106.6	104.9 – 108.2	0.640	0.536	1.071

Další postup kontroly fotometrické přesnosti vychází z přípravy dvou roztoků dichromanu draselného o odlišné koncentraci a následného změření absorbance proti 0,005 mol/l kyselině sírové.

První roztok (roztok A) se připraví rozpuštěním 50 mg \pm 0.5 mg dichromanu draselného do 1 litru 0.005 mol/l kyseliny sírové. Druhý roztok (roztok B) se připraví navážením 100 mg \pm 1.0 mg v 1 litru 0.005 mol/l kyseliny sírové. Povolena odchylka naměřených hodnot od referenčních, uvedených rovněž v tabulce 4, poslední dva sloupce, je do 1.6 %. [8]

1.3.3 Limit rozptýleného záření

Rozptýlené záření (také zbloudilé záření, stray light) se projevuje tím, že detektor poskytuje odezvu i v situaci, kdy v optické dráze a kyvetě je vzorek s nulovou hodnotou transmitance. Jeho vznik je dán jednak tím, že z výstupní štěrbiny monochromátoru vystupuje i záření s vlnovou délkou, které neleží v měřeném spektrálním rozsahu, a které může procházet detektorem a dále tím, že část záření o vlnové délce λ vystupujícího z monochromátoru může dorazit k detektoru různými cestami, popř. se mohou uplatnit i optické „netěsnosti“ přístroje. Vztah pro výpočet transmitance je pak možné upravit do tvaru:

$$T = (I + I_S) / (I_0 + I_S),$$

kde T je transmitance, I_0 je intenzita vstupního světla, I je intenzita světla prošlého kyvetou a I_S je intenzita rozptýleného světla.

Rozptýlené světlo ovlivňuje linearitu vztahu mezi absorbancí a koncentrací při vysokých hodnotách absorbance, což se projevuje jako systematický pokles k nižším absorbancím za vzrůstající koncentrace. Množství rozptýleného světla nesmí překročit určitou hodnotu, aby byla zachována lineární závislost absorbance na koncentraci. Tato hodnota se nazývá limit rozptýleného záření.

Rozptýlené světlo lze měřit např. použitím filtrů, které při určité vlnové délce plně absorbují a světlo, které dopadá na detektor při použití těchto filtrů je rozptýlené světlo. Nejčastěji se používá vhodných filtračních roztoků s vysokou absorpcí při dané vlnové délce. Např. absorbance roztoku chloridu draselného (12 g/l) měřená v 1 cm kyvetě při 200 nm by měla být vyšší než 2 v porovnání s vodou jako kontrolní kapalinou. Pro vlnovou délku 340 nm se používá roztok dusitanu sodného, pro 220 nm lze použít roztok jodidu sodného. [7.10]

1.3.4 Rozlišovací schopnost

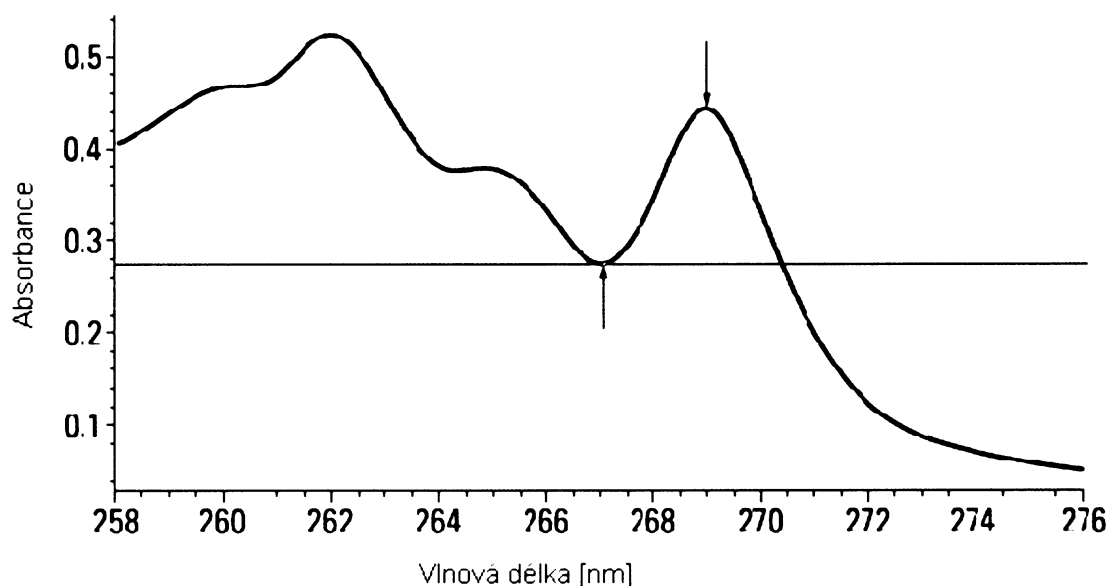
Rozlišovací schopnost je založena na schopnosti rozlišit mezi dvěma blízkými vlnovými délkami; ve spektrofotometrii se tímto pojmem zpravidla rozumí schopnost rozlišit dvě blízká absorpční maxima. Za rozlišená považujeme taková maxima, kde absorpce mezi vrcholy klesne na 80 % maximální hodnoty. Rozlišovací schopnost přístroje by pak byla

definována jako nejmenší rozdíl vlnových délek, při kterém budou blízko ležící maxima ještě rozlišena. [2]

Protože takto definované rozlišení je jen obtížně měřitelné, při validaci přístrojů se nejčastěji pracuje s vhodnou kalibrační sloučeninou s blízko ležícími maximy. Hodnoty poměru absorbancí roztoku toluenu v hexanu (0,02 % V/V, proti čistému hexanu, změřeno spektrum od 265 nm do 272 nm) pro deklarované šířky štěrbiný udává tabulka 5. Spektrum toluenu v hexanu s vyznačenými maximy je na obr. 5. [2.10]

Tabulka 5 - Hodnota $A(269) / A(266)$ pro různé spektrální šířky štěrbiný podle [2]

Spektrální šířka štěrbiný	Poměr A_{269} / A_{266}
0,25	2,3
0,50	2,2
1,00	2,0
2,00	1,4
3,00	1,1
4,00	1,0



Obr. 5 - Spektrum toluenu v hexanu, podle [2], upraveno

1.3.5 Šum

Šum ovlivňuje přesnost měření absorbance. Významně se uplatňuje při nízkých absorbancích vzorku, kdy představuje značnou relativní odchylku. Nejčastěji se měří při nulových absorbancích, to znamená bez vzorku v dráze paprsku. Šum se poté spočítá podle následujícího vztahu (ve kterém je zahrnuta korekce na nestabilitu nulové linie – tzv. drift):

$$\text{šum (rms)} = \sqrt{\frac{\sum (X - x)^2}{2}}$$

kde x jsou naměřené hodnoty, X je klouzavý průměr z pěti po sobě jdoucích hodnot. [11]

1.4 Spektrofotometr MOM 195D [12]

1.4.1. Úvod

Spektrofotometr MOM 195D je jednopaprskový přístroj, který slouží k měření transmitance nebo absorbance kapalin a pevných látek ve vlnovém rozsahu 190 – 1100 nm. Nepatrné rozptýlené světlo přístroje podle údajů výrobce zaručuje vysokou monochromaticnost, přičemž by měla být zaručena platnost Lambertova-Beerova zákona.

1.4.2. Základní části spektrofotometru

Uvnitř přístroje je 5 hlavních stavebních dílů:

1. Zdroj světla
2. Skříňka monochromátoru
3. Prostor kyvety
4. Skříňka přijímače
5. Ovládací prvky

Zdroj světla

Přístroj má dva zdroje světla. Deuteriovou lampu, která se používá při měření v oblasti 190 - 350 nm a halogenovou lampu pro oblast od 320 - 1100 nm. Před lampou se nachází sběrné zrcadlo, jehož poloha může být justována pomocí nastavovacích šroubů zrcadla. Oba zdroje světla je možné zařadit do optické dráhy přepínačem lamp a o jejich zapnutí informuje rozsvícení příslušné kontrolky na přední desce přístroje.

Skříň monochromátoru

Základní části monochromátoru (křemenný hranol, zrcadlo kolimátoru a štěrby) jsou umístěny v hliníkové skříni. Křemenný hranol má hranu podstavy 30 mm, výšku 54 mm a lámavý úhel 30°. Zrcadlo kolimátoru má ohniskovou vzdálenost 500 mm a relativní aperturu 1:10. Vstupní a výstupní štěrbina jsou umístěny nad sebou. Aby se kompenzovalo zakřivení spektrální linie, jsou štěrby vyrobeny s poloměrem zakřivení 700 mm. Fyzická výška štěrby je 13 mm, šířka štěrby se může měnit od 0 - 2 mm. Obě štěrby mohou být měněny současně otočením nastavovacího knoflíku štěrby. Šířka štěrby (v mm) se odečítá na stupnici. Před vstupní štěrbinou mezi monochromátorem a kyvetovým prostorem se nachází zrcadlo, které promítá světlo ze zdroje na vstupní štěrbinu monochromátoru. Toto zrcadlo může být pomocí nastavovacího šroubu zrcadla natáčeno, čímž je umožněna justace chodu svazku paprsku.

Prostor kyvety

V kyvetovém prostoru je běžně možnost umístit 4 kyvety, které lze postupně zařazovat do optické dráhy bez otevření přístroje. Na základní desku lze připevnit otočný držák pro kyvety s různými optickými délkami. Pomocí tohoto zařízení a k tomu příslušného optického přídatného systému lze provádět také měření celkové fluorescence a nefelometrická měření.

Skříňka detektoru

Skříňka přijímače se nachází na pravé straně spektrofotometru a je v ní našroubovaná silikagelová sušící patrona. Fotočlánky jsou umístěny ve vzduchotěsně uzavřené skříni a pomocí nich lze z vnějšku přepínat mezi článkem s antimon-cesiovou fotokatodou (citlivý pro vlnové délky 190 – 650 nm) a článkem s cesiovou fotokatodou (citlivý pro vlnové délky 550 – 1100 nm). Světelný paprsek z kyvetového prostoru vstupuje do skříně detektoru křemenným okénkem.

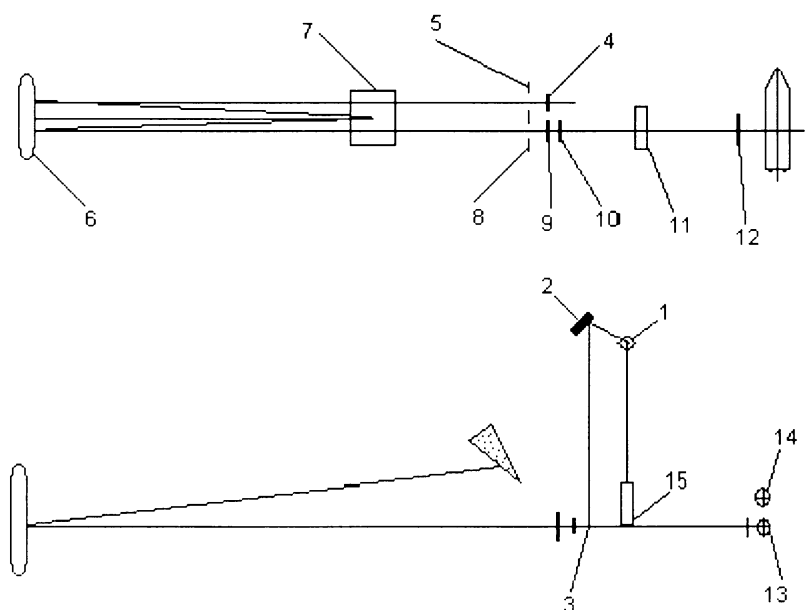
Ovládací prvky

Na levé straně přístroje vedle zástrčky do sítě jsou umístěny obě síťové pojistky, síťový hlavní vypínač, vypínače lamp a šrouby pro nastavení vlnových délek. Na pravé straně přístroje se nalézá přípojka pro zapisovací přístroj (v případě, že je do ni zapisovací přístroj připojen, nefungují vnější ukazatele přístroje).

1.4.3. Optický systém

Světlo, které jde ze zdroje světla, dopadá na sběrné zrcadlo, kde je fokusováno a promítáno na rovinné zrcadlo. Pomocí rovinného zrcadla je svazek paprsků vychýlen o 90° a promítán na vstupní štěrbinu, která je chráněna destičkou z křemenného skla. Paralelní svazek paprsků je promítán do sběrného zrcadla a na křemenný hranol, který paprsek spektrálně rozděluje, a jehož zadní plocha ho promítá na sběrné zrcadlo. Paprsky, které na hranol dopadají, jsou pomocí sběrného zrcadla zaostřovány na výstupní štěrbinu. Pokud se otočí hranol, je změněna vlnová délka světla vycházející z monochromátoru. Po průchodu vzorkem, popř. referenční látkou a ochrannou deskou dopadá světlo na katodu fotobuňky.

Aby se zmenšilo rozptýlené světlo, je možnost dát v oblasti od 320 nm do 400 nm filtr ze skla UG11 a v oblasti nad 600 nm filtr ze skla OG5 (filtry se vloží do cesty paprsku vycházejícího z monochromátoru). Pro kvantitativní měření se použije barevný filtr UG11, pokud je zdrojem paprsku jodová lampa a měření se provádí v oblasti od 320 nm do 400 nm. Optický systém i s popisem jednotlivých částí je znázorněn na obrázku 6.



- | | |
|----------------------|-------------------------------|
| 1) zdroj světla | 8) výstupní štěrbinu |
| 2) sběrné zrcadlo | 9) křemenná čočka |
| 3) rovinné zrcadlo | 10) absorpční filtr |
| 4) křemenná destička | 11) vzorek, referenční látka |
| 5) vstupní štěrbinu | 12) ochranná deska |
| 6) sběrné zrcadlo | 13) nebo 14) katoda fotobuňky |
| 7) křemenný hranol | 15) čočka |

Obrázek 6 - Optický systém, podle [12], upraveno

1.4.4. Postupy při validaci přístroje

V následujícím textu je popsána jen validace vlnové délky a kontroly pozice světelného zdroje, kterých se týká experimentální část.

Kontrola vlnové délky

Jednou z možností kontroly vlnové délky je metoda vizuální, pomocí spektrální rtuťové lampy. Ta se po odstranění krytu umístí před sběrné zrcadlo namísto jodové lampy. Vlnová délka se nastaví na jedno z absorpčních maxim uvedených v tabulce 6. Štěrbinu se otevře na maximum a na bílém listu papíru se v kyvetovém prostoru pozoruje paprsek vycházející z monochromátoru. Když tento paprsek vyplní štěrbinu, odečte se hodnota vlnové délky. Pokud naměřená hodnota neodpovídá údajům z literatury, přístroj se justuje šrouby pro nastavení vlnové délky.

Další možnost kontroly vlnové délky je fotoelektrickou metodou také pomocí rtuťové lampy. Tato metoda je přesnější. Přístroj se zapne, ale lampa se nechá vypnutá. Potenciometr

se nastaví do střední polohy pomocí knoflíku „100 T % FINE“, tak aby hodnota transmitance byla 10-20 %. Poté se pomocí změny nastavení vlnové délky zjistí, kde se nachází maximum. Je-li zjištěna odchylka od deklarované hodnoty postupuje se stejně jako v předchozím případě.

Také je možné použít stejným postupem emisních maxim deuteriové lampy (vlnové délky 656,3 nm nebo 486,1 nm). Nevýhodou je, že jsou k dispozici jen dvě maxima.

Tabulka 6 –Povolené odchylky pro vlnové délky čar [12]

vlnová délka [nm]	± povolená odchylka od vlnové délky [nm]
253,6	0,1
546,1	0,6
579,0	1,0

Kontrola polohy světelného zdroje

Kontrola nastavení zdroje světla do optické osy se provádí po nastavení štěrbinu na 2 mm. Otevře se kryt v kyvetovém prostoru a do cesty paprsku se položí list tuhého papíru. Kryt v prostoru lampy se také odstraní. Zrcadlo se otočí nejprve proti jedné a poté proti druhé lampě. Při kontrole je vhodné nastavit vlnovou délku na 546 nm, která je nejlépe viditelná. V kyvetovém prostoru pozorujeme světlo, které by mělo být rovnoměrné (obraz hranolu). Pokud tomu tak není, pozice lamp se pomocí šroubováku a justačních šroubů nastaví tak, aby osvětlení bylo silné a rovnoměrné.

2. Cíl bakalářské práce

UV-VIS absorpční spektrofotometrie je metoda k určení biochemicky významných látek. Stanovení je založeno na měření velikosti absorpce UV nebo VIS světla vzorkem obsahujícím zkoumanou látku a následném vyhodnocení naměřených hodnot. Pro efektivní využití je nezbytná správná funkce přístroje. Cílem mé práce bylo seznámit se s funkcí a validací spektrofotometrů a dále ověřit správnou funkci spektrofotometru MOM 195D, který se používá na katedře biochemie pro různá biochemická stanovení a opravit případné odchylky. Zaměřila jsem se na přesnost v nastavení vlnových délek, protože zde byla v minulosti zjištěná určitá chyba. Dále bylo cílem prověřit, zda správně funguje přepočítávací obvod přístroje pro přepočet transmitancí na absorbance.

3. Experimentální část

3.1 Použité laboratorní přístroje, filtry

SPEKTROMOM 195D, Magyar Optical Müvek, Budapest, Maďarsko

Spektrofotometr typu diode-array Hewlett-Packard HP 8453. Agilent Technologies, USA

Skleněný didymiový filtr, typu 2, UNICAM, číslo 700871

Skleněný holmiový filtr, typu 2, UNICAM, číslo 700570

Rtuťová výbojka HQE 40, Narva Berlin, Německo

3.2 Zjištění přesnosti nastavení vlnových délek

Na přístroji Hewlett-Packard 8753 bylo zejména pro kontrolu proměřeno spektrum holmiového a didymiového filtru. Pozice maxim absorpce souhlasila s údaji v literatuře [2,7]. Vybraná maxima holmiového filtru - 454 nm, 461 nm a 536 nm byla poté proměřena na přístroji SPEKTROMOM 195D a porovnána, o kolik se tato absorpční maxima liší. Naměřené hodnoty jsou v tabulkách 7 a 8. Maxima 451 nm a 457 nm byla měřena při fyzické šířce štěrbinou 0,075 mm a maximum 533 nm bylo změřeno se štěrbinou o šířce 0,055 mm.

Tabulka 7 - Absorpční maxima pro holmiový filtr (pro teoretické maximum absorpce 454 nm a 461 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
448	0,668	455	0,643
450	1,070	456	0,973
451	1,179	457	1,514
452	0,956	458	1,240
453	0,786	460	0,658
454	0,548		

Tabulka 8 - Absorpční maxima pro holmiový filtr (pro teoretické maximum absorpce 536 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
525	0,088	533	0,361
527	0,109	534	0,338
529	0,173	535	0,293
530	0,235	536	0,241
531	0,300	540	0,149
532	0,341		

Pozn.: zvýrazněné hodnoty v tabulkách označují maxima absorpce

Porovnáním údajů z literatury a výsledků změřených na SPEKTROMOMu 195D ukazuje, že se polohy maxim liší o 3 až 4 nm.

Totéž měření bylo provedeno s didymiovým filtrem pro maxima 573 nm, 741 nm a 748 nm. Maximum 573 nm bylo měřeno při fyzické šířce štěrbiny 0,055 nm a maxima 741 nm a 748 nm při 0,42 nm. Výsledky měření jsou vidět v tabulkách 9 a 10.

Tabulka 9 - Absorpční maxima pro didymiový filtr (573 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
560	0,104	568	1,285
562	0,151	569	1,320
564	0,313	570	1,225
565	0,435	572	1,075
566	0,709	576	0,831
567	0,980		

Tabulka 10 - Absorpční maxima pro didymiový filtr (741 nm a 748 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
730	0,217	740	0,266
732	0,233	741	0,264
734	0,245	742	0,262
735	0,248	744	0,269
736	0,257	746	0,263
737	0,255	748	0,262
738	0,269	750	0,257
739	0,268		

Pozn.: zvýrazněné hodnoty v tabulkách označují maxima absorpce

Také pro didymiový filtr je diference mezi pozicemi z literatury a údaji přístroje 3 až 4 nm.

3.3 Kalibrace nastavení vlnové délky

Ke kalibraci vlnové délky byla použita modifikovaná fotoelektrická metoda podle návodu k přístroji MOM 195D [12].

3.3.1 Nastavení spektrofotometru

Odkrytím levého krytu spektrofotometru byl zpřístupněn šroub pro nastavení vlnové délky. Nejprve byla na přístroji nastavena vlnová délka 486,1 nm, která odpovídá jednomu z teoretické pozice maxima emise deuteriové lampy. Měření intenzity v okolí této hodnoty ale ukázalo, že pozice maxima se jeví již při 483,5 nm. Pomocí pomalého otáčení šroubu za neustálé kontroly maxima vlnové délky, bylo pak nastaveno maximum vlnové délky na správnou hodnotu 486,1 nm.

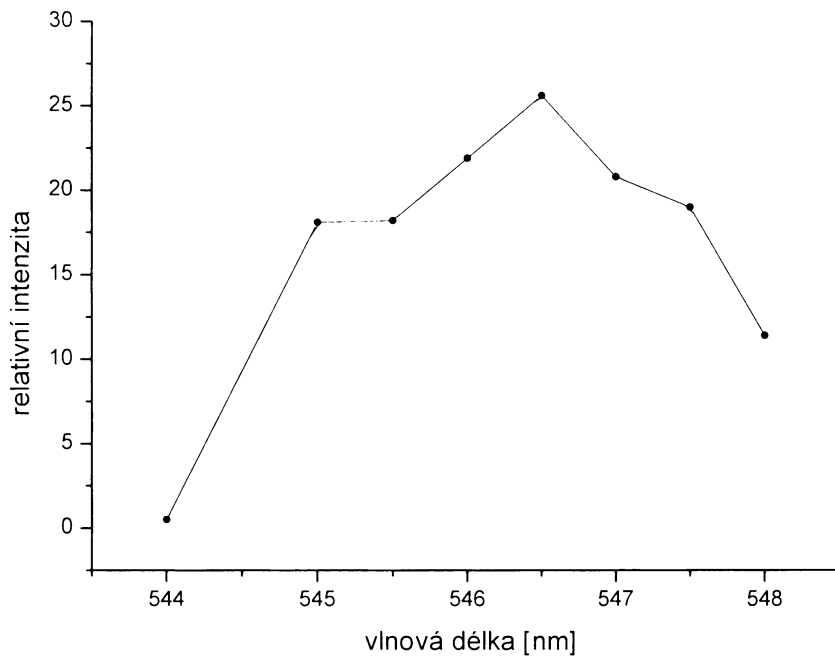
3.3.2 Kontrola nastavení vlnové délky

Po odebrání zadního krytu byla do prostoru pro světelný zdroj zařazena rtuťová výbojka a při fyzické šířce štěrbin 0,05 mm změřena její relativní intenzitu kolem vybraných maxim. Předpokládaná vybraná maxima absorpce byla při vlnových délkách 546,07 nm, 435,83 nm a 365,50 nm. Výsledky měření jsou v tabulce 11.

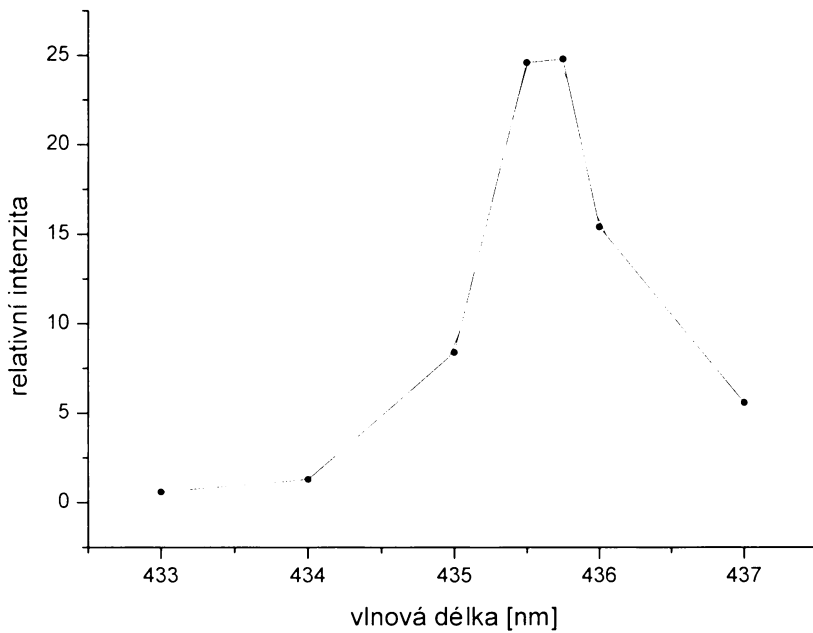
Tabulka 11 - Proměřená vybraná maxima pro rtuťovou výbojku

λ [nm]	relativní intenzita	λ [nm]	relativní intenzita	λ [nm]	relativní intenzita
544	0,5	433	0,6	364	0,5
545	18,1	434	1,3	364,5	13,8
545,5	18,2	435	8,4	365	18
546	21,9	435,5	24,6	365,5	12,2
546,5	25,6	435,75	24,8	366	6,3
547	20,8	436	15,4		
547,5	19,0	437	5,6		
548	11,4				

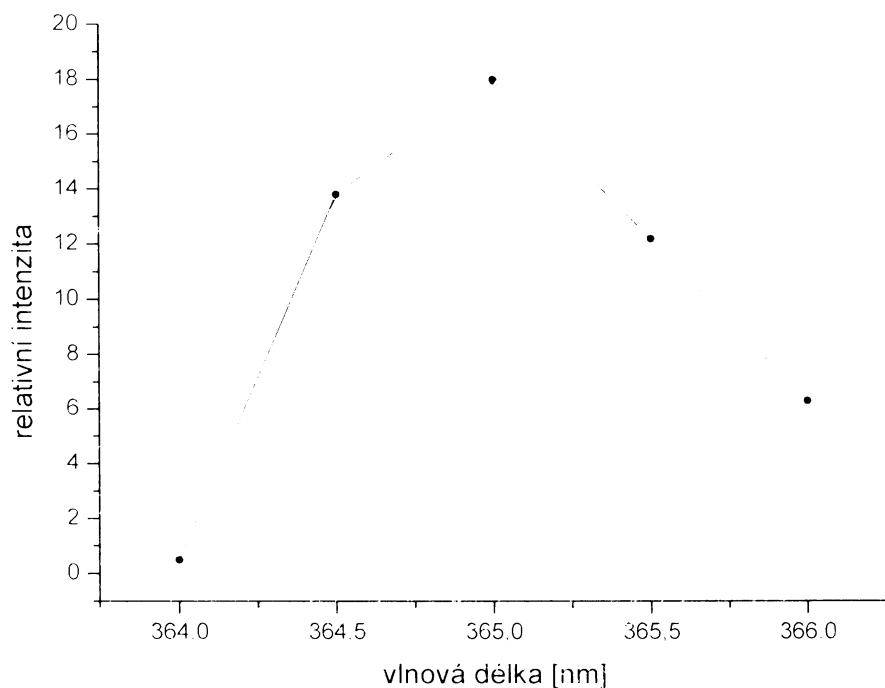
Naměřená poloha maxim pro rtuťovou výbojku se lišila od teoretických pozic v povolených mezích (rozdíl nepřesáhl v žádném z případů 0,5 nm). Hodnoty naměřené relativní intenzity při daných vlnových délkách a tvar maxim je znázorněna na obr. 7 - 9 (spojnice experimentálních bodů pouze usnadňuje "čtení" obrázků).



Obr. 7 - Závislost relativní intenzity rtuťové výbojky na vlnové délce pro emisní čáru 546,07 nm



Obr. 8 - Závislost relativní intenzity rtuťové výbojky pro emisní čáru 435,83 nm



Obr. 9 - Závislost relativní intenzity rtuťové výbojky pro emisní čáru 365,50 nm

Další kontrola vlnové délky byla provedena opětným přeměřením maxim pro holmiový a didymiový filtr. Naměřené hodnoty jsou v tabulkách 12 - 15.

Tabulka 12 - Absorpční maxima pro holmiový filtr (454 nm a 461 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
448	0,720	456	0,599
450	0,749	457	0,485
451	0,577	458	0,494
452	0,607	459	0,699
453	0,745	460	0,905
454	0,854	461	0,913
455	0,762	462	0,734

Tabulka 13 - Absorpční maxima pro holmiový filtr (536 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
525	0.054	534	0.235
527	0.059	535	0.291
529	0.066	536	0,322
530	0.071	537	0.320
531	0.080	538	0.291
532	0.101	540	0.205
533	0.167		

Tabulka 14 - Absorpční maxima pro didymiový filtr (741 nm a 748 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
738	0.214	746	0.243
739	0.221	747	0.232
740	0.226	748	0,249
741	0,239	750	0.248
742	0.236	752	0.245
744	0.234	754	0.240

Tabulka 15 - Absorpční maxima pro didymiový filtr (573 nm)

λ [nm]	A	λ [nm]	A
570	0.600	573	0,932
571	0.833	574	0.887
572	0.923	576	0.819

Jak je vidět z tabulek 12 - 15, hodnota naměřené absorpce se v rámci přesnosti nastavení vlnových délek neliší. Jen u holmiového píku je pro jedno maximum posunuta o 1 nm od udávaných hodnot, což je povolená tolerance.

3.4 Kontrola přepočtu transmittance na absorbanci

Cílem této kontroly bylo zjistit, zda správně pracuje přepočítávací obvod přístroje MOM 195D pro přepočet transmittance na absorbance. Pomocí knoflíku 100 % T byly nastaveny náhodné hodnoty transmittance a k nim proměřeny absorbance. Nejprve bylo měřeno ihned po nastavení přístroje podle návodu [12]. Podstatou této operace je nastavení správných hodnot absorbance ve dvou bodech 0.1 A a 1 A pomocí korekčních potenciometru. Měření bylo provedeno 5x. Výsledky měření a relativní chyby v procentech jsou v tabulkách 16-20. V tabulce 21 jsou průměrné hodnoty naměřených absorpce a chyb přístroje z těchto pěti měření. Průměrné hodnoty z těchto měření jsou vyneseny do grafu na obr. 10 proti logaritmu nastavené transmittance.

Tabulka 16 - Absorbance a chyby pro měření č. 1

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,650	3,00
5,1	1,292	1,309	1,32
6,1	1,215	1,226	0,91
9,8	1,009	1,008	0,10
15,2	0,818	0,812	0,73
22,3	0,652	0,643	1,38
26,0	0,585	0,577	1,37
33,5	0,475	0,467	1,68
40,7	0,390	0,384	1,54
55,8	0,253	0,249	1,58
62,5	0,204	0,200	1,96
70,4	0,152	0,149	1,97
75,8	0,120	0,118	1,67
85,7	0,067	0,064	4,48
98,8	0,005	0,003	40,00

Tabulka 17 - Absorbance a chyby pro měření č. 2

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,659	3,56
5,1	1,292	1,312	1,55
6,1	1,215	1,225	0,82
9,8	1,009	1,003	0,60
15,2	0,818	0,815	0,37
22,3	0,652	0,644	1,23
26,0	0,585	0,578	1,20
33,5	0,475	0,468	1,47
40,7	0,390	0,385	1,28
55,8	0,253	0,249	1,58
62,5	0,204	0,200	1,96
70,4	0,152	0,150	1,32
75,8	0,120	0,118	1,67
85,7	0,067	0,064	4,50
98,8	0,005	0,003	40,00

Tabulka 18 - Absorbance a chyby pro měření č. 3

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,663	3,81
5,1	1,292	1,313	1,63
6,1	1,215	1,231	1,32
9,8	1,009	1,008	0,10
15,2	0,818	0,815	0,37
22,3	0,652	0,645	1,07
26,0	0,585	0,578	1,20
33,5	0,475	0,469	1,26
40,7	0,390	0,385	1,28
55,8	0,253	0,250	1,19
62,5	0,204	0,201	1,47
70,4	0,152	0,150	1,32
75,8	0,120	0,118	1,67
85,7	0,067	0,064	4,48
98,8	0,005	0,004	20,00

Tabulka 19 - Absorbance a chyby pro měření č. 4

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,667	4,06
5,1	1,292	1,310	1,39
6,1	1,215	1,229	1,15
9,8	1,009	1,004	0,50
15,2	0,818	0,813	0,61
22,3	0,652	0,643	1,38
26,0	0,585	0,575	1,71
33,5	0,475	0,468	1,47
40,7	0,390	0,384	1,54
55,8	0,253	0,251	0,79
62,5	0,204	0,201	1,47
70,4	0,152	0,152	0,00
75,8	0,120	0,120	0,00
85,7	0,067	0,067	0,00
98,8	0,005	0,005	0,00

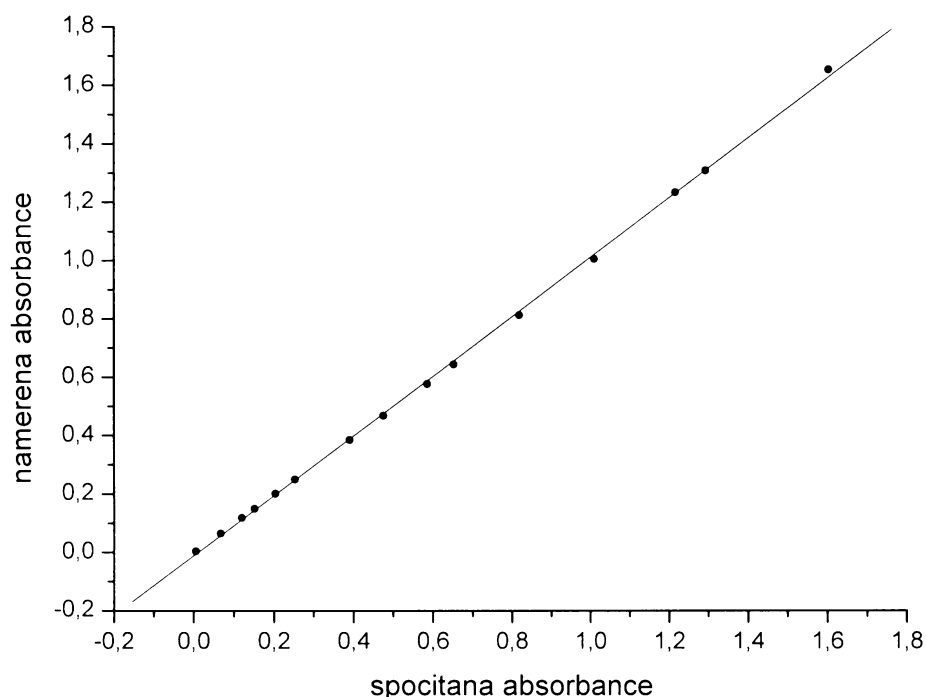
Tabulka 20 - Absorbance a chyby pro měření č. 5

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,662	3,75
5,1	1,292	1,306	1,08
6,1	1,215	1,226	0,91
9,8	1,009	1,006	0,30
15,2	0,818	0,812	0,73
22,3	0,652	0,644	1,23
26,0	0,585	0,577	1,37
33,5	0,475	0,468	1,47
40,7	0,390	0,385	1,28
55,8	0,253	0,250	1,19
62,5	0,204	0,201	1,47
70,4	0,152	0,151	0,66
75,8	0,120	0,120	0,00
85,7	0,067	0,067	0,00
98,8	0,005	0,005	0,00

Tabulka 21 - Průměrné hodnoty absorbancí a chyb měření z pěti měření

T [%]	numericky spočítaná absorbance	naměřená absorbance	průměrná chyba měření [%]
2,5	1,602	1,654	3,25
5,1	1,292	1,310	1,39
6,1	1,215	1,235	1,65
9,8	1,009	1,006	0,30
15,2	0,818	0,813	0,61
22,3	0,652	0,644	1,23
26,0	0,585	0,577	1,37
33,5	0,475	0,468	1,47
40,7	0,390	0,385	1,28
55,8	0,253	0,250	1,19
62,5	0,204	0,201	1,47
70,4	0,152	0,150	1,32
75,8	0,120	0,119	0,83
85,7	0,067	0,065	2,99
98,8	0,005	0,004	20,0

Z tabulek 16-20 je patrné, že přepočítávací obvod přístroje ihned po nastavení (dle návodu) pracuje bez větších chyb kromě hraničních oblastí (2,5 % T a 98,8 % T).



Obr. 10 - Porovnání průměrných hodnot numericky spočítané absorbance a naměřené absorbance

Aby byla ověřena stabilita přístroje, bylo stejné měření provedeno po 4-hodinovém chodu přístroje bez opětovného nastavení. V tabulce 22 jsou naměřené absorbance s chybou měření přístroje.

Tabulka 22 - Hodnoty absorbancí a chyb měření přístroje po 4-hodinovém chodu

T [%]	numericky spočítaná transmitance	naměřená absorbance	chyba měření [%]
2,5	1,602	1,613	0,69
5,1	1,292	1,286	0,46
6,1	1,215	1,200	1,50
9,8	1,009	0,984	2,48
15,2	0,818	0,797	2,57
22,3	0,652	0,613	5,99
26,0	0,585	0,566	3,25
33,5	0,475	0,459	3,37
40,7	0,390	0,376	2,59
55,8	0,253	0,243	3,95
62,5	0,204	0,195	4,41
70,4	0,152	0,152	0,00
75,8	0,120	0,120	0,00
85,7	0,067	0,067	0,00
98,8	0,005	0,005	0,00

Porovnáním výsledků z tabulek 21 a 22 je vidět, že se kvalita přepočtu značně zhoršila, pokud se na něm měřilo po 4-hodinovém chodu bez toho, aby byl znovu nastaven. Nejvýraznější je tento efekt pro často měřené hodnoty (absorbance 0,2 – 1). Výsledky ukazují, že přístroj přepočítává transmitance na absorbance bez větších chyb, ale vyžaduje vždy opětovné nastavení.

4. Souhrn

Pomocí didymiového a holmiového filtru a rtuťové výbojky byla prověřena správnost nastavení vlnové délky MOM 195 D a bylo zjištěno, že hodnoty byly o 3 až 4 nm nižší. Modifikovaného postupu doporučeného výrobcem byla provedena justace vlnové délky a funkčnost přístroje byla znovu ověřena. Bylo dosaženo přesnosti lepší než 1 nm.

V rozsahu 2,5 % T – 98,8 % T byla proměřena linearita funkce přepočítávacího obvodu a střednědobá stabilita přístroje po dobu cca 4 hodin. Bylo zjištěno, že bezprostředně po nastavení je linearita přepočítávání velmi dobrá a relativní chyba je menší než 2 % (s výjimkou nízkých a vysokých absorbancí). Avšak po delší prodlevě po nastavení přístroje a vlastním měřením se kvalita tohoto přepočtu značně zhoršila.

5. Přehled použité literatury

1. Anzenbacher, P., Kovář, J.: Metody chemického výzkumu pro biochemiky, Praha, 1986
2. Owen, T.: Fundamentals of modern UV-Visible spectroscopy. A Primer., Hewlett-Packard, Germany, 1996
3. Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I, Karolinum, Praha, 2004
4. Crooks, J. E.: The Spectrum in chemistry, Academic Press, London, 1978
5. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: Základní analytická chemie, Karolinum, Praha, 2003
6. Kalous, V.: Jak moderní chemie zkoumá strukturu molekul, SNTL, Praha, 1983
7. Český lékopis 1997, 1.díl, Grada Publishing, Praha, str. 117-119, 1997
8. UV/VIS Spectrophotometer Calibration Procedures, International Accreditation New Zealand, 2005
9. Hellma: Calibration Standard Catalogue. Dostupné z URL <<http://www.hellma-worldwide.com/en/default.asp>> [cit. 15.4.2007]
10. Fundamentals of UV-visible spectroscopy, Hewlett Packard, Germany, 1998
11. Good laboratory Practice – validation of a UV-Vis spectroscopy system and method, and data quality assurance, Hewlett Packard, 1993
12. Digitaler Ultraviolett-Spektrophotometer „Spektromom 195 D“. Gebrauchsanweisung., Magyar Optikai Művek, Budapest, (bez vnočení)