

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Vývoj software pro komunikaci UV-VIS detektoru s přístrojem FaFSIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2006

Jiří Smutek

Úvodem bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, Csc. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a pochopení v průběhu celé mé práce. M. Ořapkovi za prozíravý nápad zapojit mě do této oblasti výzkumu. Také bych chtěl poděkovat své mamince, bez jejíž podpory bych se k psaní diplomové práce vůbec nedostal. M. Č. za trpělivost a shovívavost.

Obsah:

1. Úvod a cíl práce	5
2. Teoretická část	6
2.1. Sekvenční injekční analýza	6
2.1.1. Princip metody	6
2.1.2. SIA analyzátor	8
2.1.3. Charakteristické rysy SIA	9
2.1.4. Využití metody SIA	9
2.2. SIA analyzátor a program FaFSIA 1.0	11
2.3. Programovací prostředí LabVIEW	13
2.3.1. Front panel	13
2.3.1.1. Controls	13
2.3.1.2. Indicators	13
2.3.2. Block diagram	14
2.3.3. Tok dat	14
2.4. Spektrofotometrie v UV a VIS oblasti	15
2.4.1. Teoretické základy	15
2.4.2. Využití spektrofotometrie v UV a VIS oblasti spektra	16
2.4.2.1. Kvalitativní analýza	16
2.4.2.2. Kvantitativní analýza	17
2.5. Spektrofotometr pro oblast UV a VIS	18
2.5.1. Zdroj záření	18
2.5.2. Monochromátor	18
2.5.2.1. Lámavé hranoly	19
2.5.2.2. Mřížky	19
2.5.2.3. Barevné absorbční filtry	20
2.5.3. Detektor	21
2.5.4. Měrné zařízení	21
2.5.5. Absorbující systém	21
2.5.5.1. Rozpouštědla	21
2.5.5.2. Kyvety	21
2.5.6. Pomocná optika	22
2.6. Spektrofotometr pro oblast UV a VIS s diode array detektorem	23

3. Experimentální část	24
3.1 Použitá zařízení.....	24
3.2. Použité chemikálie a roztoky	25
3.2.1 Chemikálie	25
3.2.2 Roztoky	25
3.2.2.1 Zásobní roztok bromthymolové modři.....	25
3.2.2.2 Zásobní roztok tetraboritanu sodného	25
3.3. FaFSIA UV-VIS	26
3.3.1 Požadované vlastnosti	26
3.3.2 Koncept vlastního programu	26
3.3.3 Popis programu FaFSIA UV-VIS	27
3.3.3.1 Úvod.....	27
3.3.3.2 Popis jednotlivých nových funkcí programu.....	27
3.3.3.2.1 Panel dialogu pro editaci programového řádku v modulu Program ...	27
3.3.3.2.2 Panel Nastavení UV-VIS	28
3.3.3.2.3 Panel UV-VIS	30
3.3.3.2.3.1 Prvky uživatelsky aktivní s okamžitým účinkem	30
3.3.3.2.3.2 Prvky uživatelsky aktivní s účinkem až při dalším spuštění	31
3.3.3.2.3.3 Prvky uživatelsky pasivní	31
3.3.3.2.4 Měření detektory připojenými ke kartě AT-MIO-16E10	32
3.4 Testování systému.....	33
3.4.1 Nastavení detektoru.....	33
3.4.2 Program kalib.prg.....	34
4. Výsledky a diskuse	35
4.1 Program FaFSIA UV-VIS	35
4.2 Testování systému.....	36
4.2.1 Kalibrační přímka bromthymolové modři	36
4.2.2 Reprodukovatelnost měření	40
4.3 Možnosti dalšího vývoje programu FaFSIA UV-VIS	41
4.4 Instalační CD	42
5. Závěr.....	43
6. Literatura	45

1. Úvod a cíl práce

Spektrofotometrická detekce v oblasti UV-VIS je metoda oblíbená pro svou jednoduchost, univerzálnost, dobrou citlivost a rychlost. Je nejpoužívanější metodou kvantitativního stanovení. Nové typy detektorů už v sobě mají zabudovanou AD kartu a komunikují s počítačem přímo přes port USB (universal serial bus), kterým jsou zároveň i napájeny elektrickým proudem, to vše uživateli velmi usnadňuje práci.

Průtokové metody analýzy, k nimž patří i SIA, jsou velmi populární, protože jsou rychlé, v provozu ekonomicky nenáročné a často plně automatické.

Na katedře analytické chemie FaF UK byl studentem A. Svobodou sestaven SIA analyzátor a program nazvaný FaFSIA, který umožňuje daný analyzátor ovládat.¹⁾ I přesto, že program je tvořen s velmi otevřenou architekturou, v době, kdy byl programován nebyl standard USB rozšířen a většina periférií komunikovala přes rozhraní COM (RS232C). To je nyní opouštěno pro svou velikost, v současné době neuniverzálnost a nízkou datovou propustnost.

Mým cílem bylo upravit program FaFSIA nebo vytvořit nový tak, aby SIA analyzátor byl schopen pracovat se spektrofotometrem USB2000 UV-VIS firmy Ocean Optics.

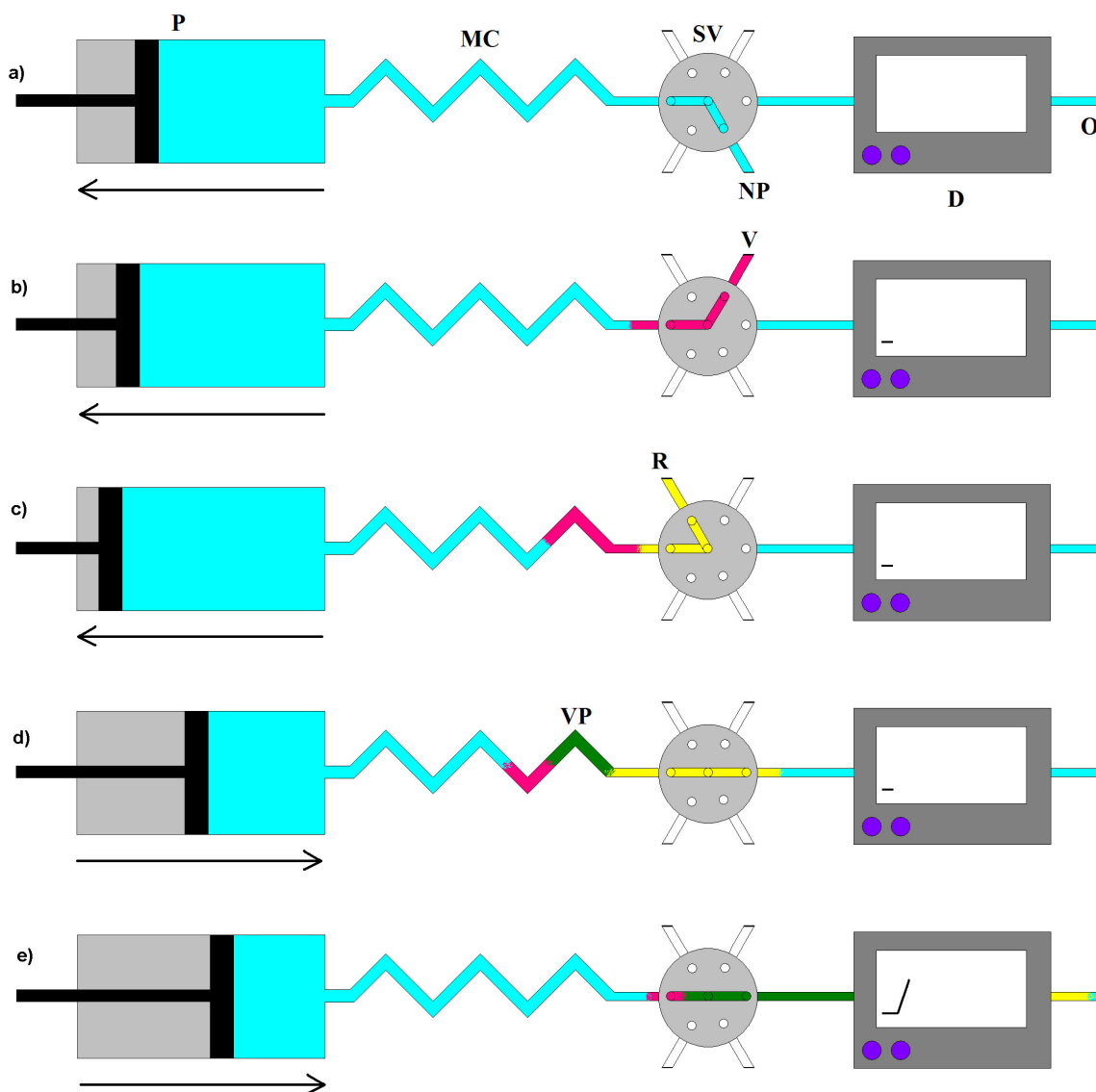
2. Teoretická část

2.1. Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických metod, jež vznikly různými modifikacemi původní průtokové injekční analýzy (Flow Injection Analysis, FIA)²⁾. SIA bývá též označována jako druhá generace těchto analytických technik³⁾. Byla vyvinuta právě při odstraňování některých nevýhod FIA kolektivem vědců z University of Washington vedených J. Růžičkou. Jedná se o metodu relativně novou, první článek definující její koncepci je z roku 1990.⁴⁾

2.1.1. Princip metody volně podle 5)

Základním principem detekce stanovované látky v SIA systému je chemická reakce převádějící tuto látku na detekovatelný produkt, jehož množství je změřeno v závěrečné fázi detektorem. Tento základní princip je vlastně stejný jako u klasické analytické reakce ve zkumavce. U SIA ale mísení probíhá při protékání roztoků reaktantů trubičkou, přičemž tok kapaliny je zajištěn pumpou (u SIA pístovou, která umožní přímý i zpětný tok). Klíčovým prvkem konstrukce u SIA metody je vícecestný selekční ventil, který ji odlišuje např. od FIA a který je postupně použit k nasátí nosné kapaliny, vzorku i činidel a následně je po obrácení směru toku použit i k přivedení produktu k detektoru. Jedno měření tak představuje cyklus kroků, po jehož provedení se SIA analyzátor dostane do stejného stavu jako na začátku (co se týče polohy ventilu a pístu pumpy) a může ihned provést další měření. Jeden takový cyklus je velmi názorně vystižen na obrázku č.1^{1, upraveno)} a jeho popis je zároveň téměř vyčerpávajícím vysvětlením fungování SIA.



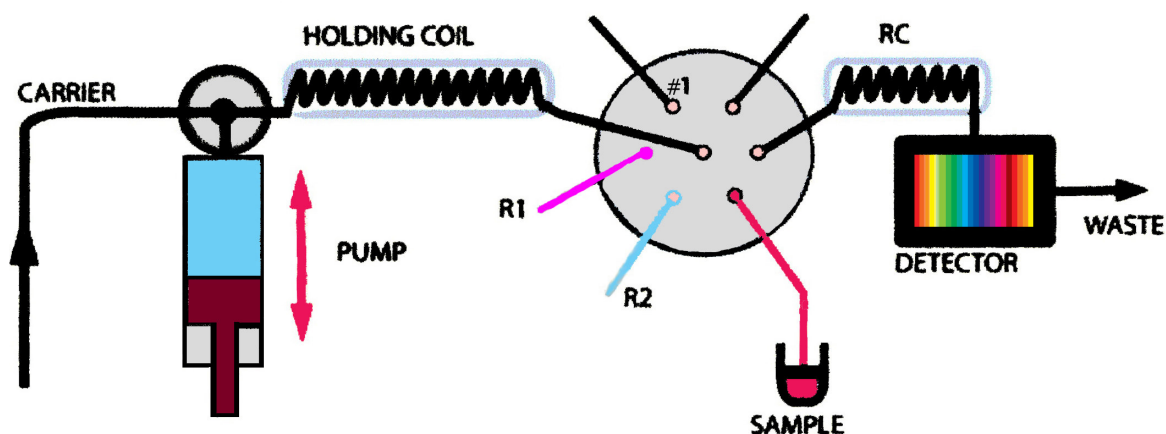
Obrázek č. 1: Průběh měřicího cyklu v SIA

P – peristaltická pumpa, *MC* – míchací cívka, *SV* – selekční ventil, *D* – detektor, *O* – odpad, *NP* – nosný proud, *V* – vzorek, *R* – činidlo, *VP* – vznikající produkt, $\leftarrow \rightarrow$ směr pohybu pístu pumpy

V prvním kroku (obr. č. 1a) je nasáta kapalina tvořící nosný proud (NP), poté se přetočí selekční ventil (SV) do polohy, která umožní aspiraci vzorku (V), což je zobrazeno na obr. č. 1b. Následuje opět změna polohy ventilu a další aspirace, tentokrát činidla (R) (obr. č. 1c). Je možné použít i více různých činidel, která mohou být připojena k dalším výstupům selekčního ventilu. Obrázek č. 1d demonstruje hned několik důležitých aspektů. Jednak chemickou reakci, která začíná probíhat v míšící cívce (MC), což je na obrázku znázorněno zeleně (VP), přetočení selekčního ventilu na výstup k detektoru a především

obrácení směru toku (píst pumpy tlačí obráceně). Poslední obrázek (obr. č. 1e) ukazuje příchod produktu k detektoru (D) a nárůst sledované veličiny na níž je založena detekce. Po odtečení reakční směsi ze systému a změně polohy selekčního ventilu na NP se může celý cyklus opakovat.

2.1.2. SIA analyzátor⁵⁾



Obrázek č. 2: SIA analyzátor podle³⁾

Carrier - nosný proud, *pump* - pumpa, *holding coil* - mísící cívka, *R₁*, *R₂* - reagentia, *Sample* - vzorek, *RC* - reakční cívka, *Detector* - detektor, *Waste* - odpad

Obrázek č.2 ukazuje běžné provedení analyzátoru založeného na sekvenční injekční analýze.³⁾ Funkce pístové pumpy, mísící cívky (holding coil), selekčního ventilu a detektoru již byla objasněna, zde je znázorněna ještě reakční cívka (reaction coil, RC) a samostatný přívod nosné kapaliny (carrier). Reakční cívka umístěná mezi výstup ze selekčního ventilu a detektor umožňuje dokonalejší průběh reakce, u rychle probíhajících reakcí jí však většinou není zapotřebí.²⁾ Samostatný přívod nosné kapaliny je praktické a obvyklé řešení, které na podstatě přístroje nic nemění (vůči předchozímu schématu je ovšem třeba navíc jeden dvoucestný ventil). Nosná kapalina je totiž většinou stále stejná a spotřebuje se jí největší množství.

Je zde však ještě jedna nezbytná součást systému, která není znázorněna na obrázku a zatím nebyla zmíněna: řídicí jednotka. Přesnost i reprodukovatelnost analýzy je podmíněna přesným a stále stejným načasováním jednotlivých akcí. Proto jsou selekční ventil i pumpa ovládány pomocí řídicí jednotky, jež je schopna zajistit správné časování a synchronizaci.^{2, 3)} Dnes je to zpravidla běžné PC vybavené příslušným softwarem, jež

nejen ovládá pohyby pumpy a ventilu, ale též zajišťuje sběr dat z detektoru a pomáhá s jejich vyhodnocením.

2.1.3. Charakteristické rysy SIA⁵⁾

- použití vícecestného selekčního ventilu, způsob vstupu reagujících látek do systému aspirací do mísící cívky; můžeme říci, že látky jsou do systému postupně neboli sekvenčně injikovány (odtud název metody)
- obrácení toku po aspiraci, tok je tedy dvousměrný a též přerušovaný³⁾ (když se mění poloha ventilu pumpa musí stát) na rozdíl kupříkladu od FIA
- práce analyzátoru v určitých měřicích cyklech, každý cyklus je vlastně sekvencí pohybů ventilu a pumpy, která musí být precizně načasována a synchronizována, aby byla zajištěna reprodukovatelnost reakce proběhlé v analyzátoru (a tím i následného měření)
- vysoká flexibilita systému, použití výpočetní techniky je sice vynuceno z důvodů uvedených v předchozím bodě, ale zároveň přináší možnost velice snadných změn, je-li ovládací software vytvořen tak, že lze programovat jednotlivé kroky měřicího cyklu pomocí jednoduchých příkazů pro ventil a pumpu; vzhledem k tomu, že řídicí jednotka ovládá prakticky všechny podstatné parametry systému^{2, 3)} je velmi rychlé a jednoduché jej překonfigurovat na zcela odlišný typ měření; např. možnost nastavit objem aspirovaných roztoků je principiálním rozdílem (a výhodou) oproti FIA
- relativně malé objemy použitých látek (řádově desítky mikrolitrů), typický průměr trubiček SIA systému je 0,5 milimetru³⁾ (0,7 – 0,8 mm)²⁾

2.1.4 Využití metody SIA²⁾

Rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují techniku SIA jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků (např. rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči) nebo sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výrob, monitorování hladin léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů).

Možnost uplatnění SIA ve farmacii se vztahuje na kontrolu kvality a účinnosti léčiv nebo na hodnocení déle trvajících stabilitních studií. V technologii pomáhá zjistit stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího

uvoňování z dané lékové formy (disoluční testy). Významná je také možnost využití SIA při studiu vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny.²⁾

Aktuální informace o vývoji SIA i ostatních průtokových metod poskytuje webová stránka firmy FIAlab Instruments⁷⁾, která je lídrem na poli těchto technologií, a vyrábí komerčně dostupné SIA systémy.

2.2. SIA analyzátor a program FaFSIA 1.0⁵⁾

SIA analyzátor sestavený na Katedře analytické chemie FaF UK v rámci diplomové práce Antonínem Svobodou¹⁾ se skládá z následujících částí:

- pístové čerpadlo CAVRO XL - řízeno počítačem přes sériový port (RS232C); kromě pohybu pístu lze ovládat i selekční ventil, který umožňuje spojení se dvěma přívody (označeny jako IN a OUT), podrobnější údaje lze najít v manuálu⁷⁾
- osmicestný selekční ventil VICI VALCO - taktéž možnost řízení počítačem pomocí sériového portu, umožňuje nastavení i zjištění polohy a směru otáčení ventilu
- řídicí jednotka - obyčejné PC-ATX, rozšířené o speciální karty (karta pro sběr dat AT-MIO-16E10 a karta AT-232/4 rozšiřující výbavu počítače o 4 sériové porty), vybavené operačním systémem Windows 98, vývojovým prostředím LabVIEW 5.1 a programem FaFSIA v 1.0
- karta pro sběr dat AT-MIO-16E10 - umožňuje zpracovávat data z detektoru, další údaje jsou v katalogu⁸⁾

Asi největším tvůrčím počinem je program FaFSIA 1.0, vytvořený taktéž v rámci zmiňované diplomové práce,¹⁾ který slouží k ovládní analyzátoru. Autor si při tvorbě tohoto programu stanovil (a splnil) tyto cíle¹⁾

- plné ovládní pístové pumpy
 - reprodukovatelné dávkování objemu
 - nastavitelná rychlost pístu
 - ovládní dvoucestného selekčního ventilu
- plné ovládní osmicestného selekčního ventilu
 - nastavení příslušné polohy
- sběr dat z analogových detektorů
 - zobrazení záznamu z detektoru v reálném čase
 - možnost volby detektorů (až 8 různých analogových detektorů)

- vyhodnocení dat
 - automatické nalezení píku
 - vyhodnocení výšky píku
 - možnost manuálních oprav a doplnění poloh a výšky píku
 - možnost jednoduchého přenosu dat do tabulkového programu Excel
- archivace dat
 - možnost uložení naměřených dat s jejich identifikací

Program FaFSIA 1.0 byl vytvořen ve vývojovém prostředí LabVIEW 5.0.1 firmy National Instruments. Skládá se z několika vzájemně komunikujících modulů, které zajišťují různé dílčí úkoly. Každý modul je reprezentován vlastním panelem, v němž se odehrává většina komunikace modulu s uživatelem. Následuje seznam a stručný popis jednotlivých modulů obsažených v programu FaFSIA 1.0:

- Main – hlavní modul, provádí některé inicializační kroky pro celý program, pro uživatele je především prostředkem ke spuštění ostatních modulů.
- Program – modul programu, umožňuje tvořit sekvence příkazů ovládajících především pumpu a selekční ventil analyzátoru; tyto sekvence jsou nazývány jako programy.
- Message list – modul zpráv, slouží k zobrazení údajů o probíhajícím měření, především je zaznamenáváno vykonání každého příkazu programu vytvořeného v modulu Program.
- Measure – modul měření, provádí vlastní vykonání sekvence příkazů definované v modulu Program, dále zaznamenává data z detektoru a umožňuje také jejich ukládání.
- Peak detection – modul detekce píku, umožňuje automaticky (pomocí zadaných parametrů) vyhodnotit získaná data a určit polohu a výšku píku; je zde i možnost provést toto vyhodnocení manuálně v případě, že se automatická detekce nedaří; umožňuje export výsledků.

Na detailnější popis zde není prostor, a tedy nezbyvá než odkázat na původní práci.¹⁾

2.3 Programovací prostředí LabVIEW⁹⁾

LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) je programovací prostředí založené na jazyku G. První verze je z roku 1986. Od běžných programovacích jazyků (C++, Pascal, Java) se nejvíce liší tím, že je grafické (nikoliv textové), což výrazně zjednodušuje práci zvláště vědeckým pracovníkům, kteří běžně nemají programátorské vzdělání. Příkazy se v něm tvoří pomocí ikon příkazů (nikoliv přesnou textovou syntaxí) a posloupnost příkazů je dána tzv. tokem dat (angl. data flow) (nikoliv posloupností řádků za sebou), což velmi usnadňuje např. naprogramovat vykonávání více procesů „zároveň“ (multitasking). Tvorba je - zvláště u jednodušších programů - velmi jednoduchá a intuitivní. LabVIEW je modulární a hierarchické.

Každý program v LabVIEW se nazývá Virtual Instrument (VI), což by se do češtiny dalo přeložit jako „obraz skutečného přístroje v počítači“, i když ne vždy program přístroj přímo ovládá. VI se skládá ze dvou částí (oken):

2.3.1 Front panel

Front panel („čelní panel“) - slouží jako grafické uživatelské rozhraní při běhu programu. Název je tvůrci záměrně zvolen tak, aby evokoval čelní panel skutečného přístroje a programátor ho díky široké paletě doplňkových funkcí může vytvořit tak, aby jako přístroj opravdu vypadal. Vedle pasivních grafických objektů (pozadí, obrázky, text, atd.) obsahuje také prvky aktivní (ne všechny musí být pro uživatele viditelné):

2.3.1.1. Controls („prvky určené k ovládání programu uživatelem“)

umožňují uživateli ovlivňovat – pokud je to nutné nebo žádoucí - chování programu (tedy přeneseně měnit nastavení přístroje) – tlačítka, přepínače, prvky pro zadávání číselných, slovních nebo jiných hodnot, rolovací nabídky, atd. Hodnoty controls může měnit pouze uživatel, nikoliv program pomocí příkazů. Vychází to z logiky toku dat (viz dále).

2.3.1.2. Indicators („prvky indikační, informující uživatele“)

Prvky informující o aktuálním stavu proměnných programu (stavu přístroje) – grafy, ukazatelé číselných, textových nebo logických hodnot, atd. Uživatel je na rozdíl od prvků ze skupiny Controls nemůže měnit. Opět odkazují na logiku toku dat v programu.

2.3.2. Block diagram

„Schéma, diagram“. Jde o vlastní zdrojový kód zkonstruovaný v G. Při běhu programu se uživateli nikdy nezobrazuje. Každý objekt z front panelu má své zobrazení (terminal) i v block diagramu. Kromě terminals prvků controls a indicators toto okno obsahuje objekty konstant a příkazů (takto lze použít i jiné VI) a také prvky zajišťující již zmíněný tok dat mezi těmito objekty (wires – „dráty“).

2.3.3 Tok dat

Tok dat (data flow) je zajištěn logikou programu. Program je vykonán tak, aby data (informace) „tekly“ od svých zdrojů k příkazům a od příkazů k indikátorům. Jako zdroje dat lze použít:

- prvky ze skupiny controls (viz výše)
- prvky konstant
- speciální druh příkazů – např. tzv. hodnotu generujících (např. příkaz generování náhodného čísla)
- data externě dodaná do systému – pomocí celé skupiny příkazů lze provést např. sběr dat z detektorů, komunikaci pomocí portů COM (a jiných portů), síťových prvků, atd. a to i přes síť internet, apod.

Při vlastním programování jde s nadsázkou vlastně jen o to, aby programátor vybral od kterých zdrojů k příkazům a poté k jakým indikátorům data „potečou“. O zbytek se postará LabVIEW. Ne vždy je však jednoduché toho dosáhnout.

2.4 Spektrofotometrie v UV a VIS oblasti

2.4.1 Teoretické základy^{10, 11)}

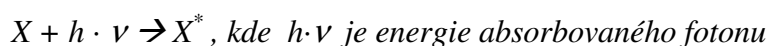
Tento druh spektrofotometrie využívá pro detekci elektromagnetického záření o vlnové délce přibližně 10 – 1000 nm. Vedle viditelné části spektra 400 – 760 nm zahrnuje také oblast 760 – 1000 nm z oblasti infračervené a také oblast ultrafialovou (UV) a to běžně používanou *blízkou UV* oblast 200 - 400 nm a méně používanou *vzdálenou UV* oblast (10 – 200), pro kterou musí být celá měřicí aparatura vakuovaná.

Elektromagnetické záření jako formu zářivé energie můžeme současně považovat za elektromagnetické vlnění, jakož i za proud korpuskulárních částic (fotonů), kde každá částice je současně i kvantem energie (E). V monochromatickém paprsku platí:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

kde h je Planckova konstanta, ν kmitočet záření, c rychlost světla a λ vlnová délka záření. Tedy se zkracující se vlnovou délkou vzrůstá energie záření.

Principem každé absorpční spektrální analýzy, tedy i spektrofotometrie, je absorpce zářivé energie určitým prostředím. Absorbací záření se zvýší energie atomu (molekuly), čímž se částice dostává ze svého základního stavu o nejmenší energii (X) do stavu excitovaného o energii vyšší (X*):



Absorbovaná energie se přitom mění v energii tepelnou, tj. energii neuspořádaného pohybu atomů (molekul) absorbující látky:



Částice záření (foton) z oblasti UV a VIS má právě tolik energie, aby excitovala elektronový systém, resp. valenční elektrony atomu nebo molekuly. Proto se oblast UV a VIS nazývá také oblast elektronových spekter. Při excitaci elektronů však dochází také ke změnám ve vibračních a rotačních stavech molekuly, a proto absorpční pásy pokrývají širší interval vlnových délek.

Při průchodu homogenním prostředím (vzorkem) je tedy záření o určité intenzitě (I_0) částečně absorbováno a část záření prochází (I).

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Je důležité si uvědomit, že absorpcí se snížila intenzita záření, ale nikoliv jeho vlnová délka, tedy energie!

Množství absorbovaného a propuštěného záření záleží na několika faktorech, které jsou shrnuty ve spojeném Lambertově-Beerově zákoně:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] (látková konstanta), c je koncentrace látky v roztoku [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] a l je tloušťka absorbující vrstvy [cm], což jinak řečeno znamená, že absorbance je funkcí koncentrace látky v roztoku. Zákon však platí jen pro určitý rozsah koncentrace a monochromatické světlo. K odchýlkám od tohoto zákona dochází také při změnách ε následkem disociace, dimerizace, hydrolýzy, reakce s rozpouštědlem, tvorby komplexů, nebo jen změnou teploty.

Hodnota vlnové délky v maximu absorpce (λ_{max}) určuje rozdíl v energii základního a excitovaného stavu. Intenzita absorpce, tj. hodnota ε_{max} absorpčního pásu souvisí s pravděpodobností, se kterou se přechod uskuteční. Pro analytickou chemii mají význam přechody s $\varepsilon_{\text{max}} = 10^2$ až 10^5 .

To, že organická látka absorbuje, je způsobeno zvláštním seskupením atomů v molekule látky (násobné vazby, konjugované systémy, volné elektronové páry), tzv. chromoforem. Dále mohou absorbovat organické i anorganické látky vytvářející v roztoku donor-akceptorové komplexy a také komplexní ionty přechodných prvků.

2.4.2 Využití spektrofotometrie v UV a VIS oblasti spektra.¹¹⁾

Výhodou spektrofotometrie v UV a VIS oblasti je její citlivost a jednoduchost provedení, a proto má velmi široké využití. Je také jednou z lékopisných zkušebních metod.¹²⁾

2.4.2.1 Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza na základě absorpčních spekter je vhodná pouze pro čisté látky. Je založena na porovnání absorpčního spektra neznámé sloučeniny s absorpčním spektrem standardu, změřeného za stejných podmínek nebo se vzorovým spektrem uvedeným v atlasu spekter. Porovnání absorpčního spektra neznámé látky s hodnotami uvedenými v atlasech spekter je nutné pokládat pouze za orientační identifikační znak. Jestliže počet a poloha absorpčních maxim standardu a neznámé látky souhlasí, a to i při měření v různých rozpouštědlech, pak můžeme pokládat obě látky za identické. V mnohých případech i stopy znečištěnin mohou silně ovlivnit absorpční spektrum analyzované látky. Pro kvalitativní analýzu se používají spíše jiné metody, např. spektrofotometrie v IČ oblasti nebo chromatografické metody (HPLC, GC) s vhodnou detekcí.

2.4.2.2 Kvantitativní analýza

Naproti tomu je spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti jednou z nejvíce používaných metod kvantitativní analýzy. Vyniká jednoduchostí, přesností a vysokou citlivostí. Stanovení sloučenin je založeno na platnosti Lambertova-Beerova zákona. Zpravidla se měří při vlnové délce maxima absorpčního pásu, kdy je měření nejcitlivější a nejméně ovlivněno nepřesností nastavení vlnové délky. Chemické složení roztoku (pH roztoku, přítomnost činidla aj.) musí zaručovat, že analytická koncentrace stanovované látky se rovná rovnovážné koncentraci absorbentu. Stanovit je možné sloučeniny anorganické i organické na základě jejich vlastní absorpce ve viditelné oblasti (tj. barevné sloučeniny) nebo ultrafialové oblasti. Sloučeniny, které nevykazují vlastní absorpci je možné stanovit tak, že se vhodnou chemickou reakcí s činidlem derivatizují, tj. převedou na sloučeniny, které absorbují. Vlastní výpočet koncentrace stanovované sloučeniny se provádí podle Lambertova- Beerova zákona na základě znalosti molárního absorpčního koeficientu z tabulek nebo lépe z měření standardního roztoku. Při sériových analýzách se obvykle výpočet koncentrace stanovované sloučeniny provádí metodou kalibrační křivky. Je-li kalibrace přímková a reprodukovatelná, provede se lineární regrese a vlastní výpočet obsahu stanovované sloučeniny se pak provádí na základě zjištěných parametrů rovnice přímky.

Spektrofotometricky je možné stanovit jednotlivé složky v několikasožkových směsích na základě aditivity absorbance a jejího měření při několika vhodných vlnových délkách.

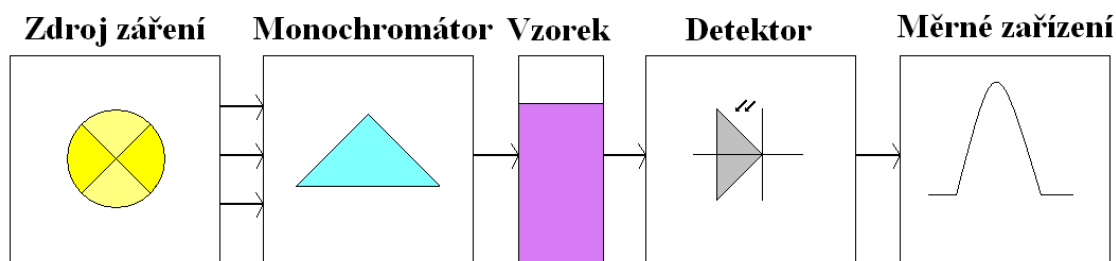
Spektrofotometrie se široce využívá i při studiu průběhu chemických reakcí a reakčního mechanismu, kinetiky reakcí, výpočtu rovnovážných konstant - např. disociačních konstant, ve farmacii při stabilitních testech léčivých přípravků, sledování disoluce pevných lékových forem aj.

2.5 Spektrofotometr pro oblast UV a VIS

Spektrofotometr se skládá z několika základních částí:

- zdroj záření
- monochromátor (hlavní optika)
- absorbující systém (kyveta, rozpouštědlo, vzorek)
- detektor
- měrné zařízení
- pomocná optika

Na obr. č. 3 lze vidět blokové schéma UV-VIS spektrofotometru.



Obr. č. 3: Blokové schéma UV-VIS spektrofotometru.

2.5.1 Zdroj záření

Zdroj záření má zajišťovat v požadovaném intervalu vlnových délek spojitě záření dostačující intenzity.¹¹⁾ Jako zdroj záření pro UV oblast se používá deuteriová nebo xenonová lampa.¹³⁾ Pro viditelnou a IČ oblast se využívají wolframové nebo halogenové lampy. Pro celou šíři spektra se dnes užívá vysoce výkonných xenonových lamp¹³⁾ nebo lamp kombinovaných. K zajištění záření stálé intenzity musí být použito konstantního napájení – stabilizovaný zdroj, akumulátor.¹¹⁾

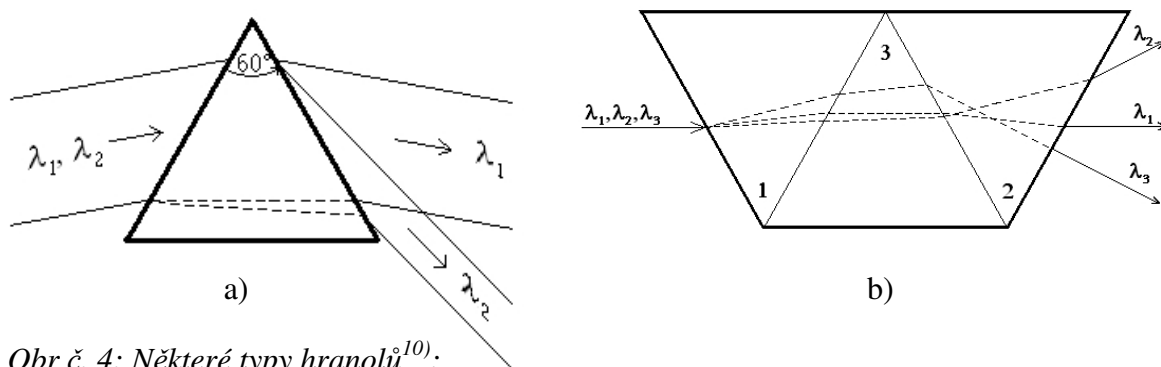
2.5.2 Monochromátor¹⁰⁾

Důležité je, aby světlo dopadající na detektor bylo pokud možno monochromatické. Nejsprávnější hodnoty absorpčních koeficientů se získávají při nejvyšší možné kvalitě monochromatického záření. Toho se docílí monochromátorem v kombinaci se štěrbinami a další pomocnou optikou (viz dále). Jako monochromátorů se nejčastěji

používá disperzního prostředí lámavých hranolů a mřížek, popř. barevných absorpčních filtrů.

2.5.2.1 Lá mavé hranoly

Lá mavé hranoly slouží k rozdělení polychromatického svazku rovnoběžných paprsků podle vlnových délek na základě lomu paprsků (refrakce); z hranolu vystupují svazky různých vlnových délek různými směry. Hranoly jsou konstruovány buď jako jednoduché, z izotropních materiálů (obr. č. 4a), nebo jako složené z několika hranolů různého materiálu (obr. č. 4b). Základní charakteristikou hranolu je jeho úhlová disperze $d\delta/d\lambda$, tj. úhel, pod kterým z hranolu vystupují dva svazky paprsků, lišící se ve vlnové délce o 0,1 nm. Aby se zrušil vliv dvojlomu a optické otáčivosti krystalického křemene, jsou hranoly složeny ze dvou polovin, pravotočivé a levotočivé tak, že základna je rovnoběžná s osou krystalů. Složených hranolů se používá pro zvětšení disperze zvětšením lámavého úhlu základního hranolu (u jednoduchých by nastal odraz uvnitř hranolu), popř. jako tzv. hranolů přímohledných. (obr. 4b)



Obr. č. 4: Některé typy hranolů¹⁰⁾:

a) 60° lámavý hranol: $\lambda_1, \lambda_2 \dots$ světelné paprsky, každý o jiné vlnové délce;

b) Hranol Amicchiho-přímohledný:

$\lambda_1 \dots$ paprsek této vlnové délky prochází neodchýlen; $\lambda_2, \lambda_3 \dots$ paprsky krajní červené a krajní fialové oblasti; 1,2 ... hranoly z korunového skla; 3 ... hranol ze skla flintového

2.5.2.2 Mřížky

Mřížka plní tutéž úlohu jako hranol na základě ohybu světla (difrakce). Na obr. č. 5 je znázorněn princip rovinné transparentní mřížky tvořené řadou štěrbin, jejichž středy jsou vzdáleny od sebe o mřížkovou konstantu d . Pro chod svazku mřížkou platí vztah:

$$d(\sin \alpha + \sin \beta) = m\lambda$$

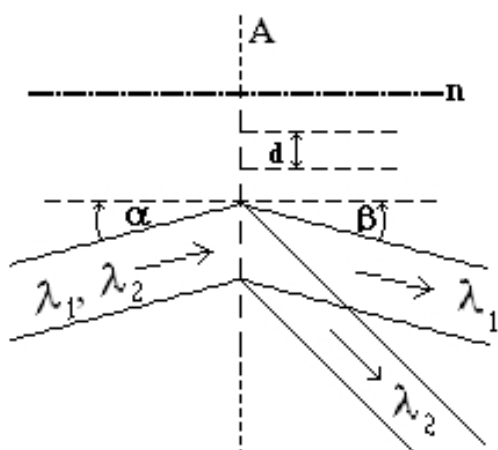
kde m je tzv. řád spektra, α úhel dopadu a β úhel odrazu. Z rovnice dostaneme pro úhlovou disperzi mřížky:

$$\frac{d\beta}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos \beta}$$

Úhlová disperze je nejmenší pro svazky málo se odchylojící od normály, tedy pro $\beta \approx 0$ (tzv. normální spektrum). V tomto případě platí vztah:

$$\Delta\beta = \text{konst}\Delta\lambda$$

V normálním spektru je úhlová vzdálenost dvou svazků konstantního rozdílu vlnových délek v každém místě spektra stejná. Tím se mřížka charakteristicky liší od hranolu a mřížkové spektrum od spektra hranolového; kromě toho se u mřížky nejvíce odchylojí dlouhé vlny, tedy opačně než u hranolu. Dnes pracují prakticky všechny mřížky jako odrazné - jsou vyryty do materiálů dobře odrážejících záření ve spektrálním oboru, pro nějž jsou určeny. Mřížka je charakterizována šířkou účinné plochy pokryté ryskami, délkou rysek a počtem rysek na délkovou jednotku. Počet rysek je volen účelně, tj. pro daný obor spektra. U mřížek s velkým počtem rysek na jeden mm se dosahuje sice velké disperze už v prvním řádu, ale současně klesá využitelný rozsah spektra (úhlová šíře spektra).



Obr. č. 5: Schéma funkce mřížky:¹⁰⁾

- A... rovina mřížky,
- d... konstanta mřížky,
- n... normála roviny mřížky,
- α ... úhel dopadu svazku sevřený s normálou roviny mřížky n ,
- β ... úhel výstupu svazku (pro různé vlnové délky různý)

2.5.2.3 Barevné absorbní filtry

Patří mezi nejjednodušší monochromátory. Jsou to buď skla přímo vybarvovaná oxidy některých kovů, nebo skla pokrytá vrstvou želatiny, v níž jsou rozpuštěna organická barviva. Tyto filtry však z původního polychromatického záření propouští jenom více

méně širokou část o spektrální šířce přibližně 20 – 50 nm, tudíž nejsou tak kvalitní monochromátory jako lámavé hranoly nebo mřížky.

2.5.3 Detektor¹⁴⁾

Jako detektory se v současné době používají nejčastěji polovodičové fotodiody s připojeným kondenzátorem (CCD). Fotodioda začne po dopadu světla propouštět elektrický proud (množství je proporcionální k intenzitě světla) a vybíjí připojený kondenzátor. Po přednastavené době (integrační čas) je kondenzátor znovu nabit. To, kolik se přitom spotřebuje elektrické energie se vezme v potaz při hodnocení intenzity. Vychází se z úvahy: kolik elektrického náboje bylo potřeba na nabití, tolik náboje se předtím vybilo přes diodu, a propočtem lze získat o kolik se změnila intenzita světla (vybití kondenzátoru) oproti referenční hodnotě.

2.5.4 Měrné zařízení

V současné době se jako měrné zařízení používá téměř výhradně A/D převodník, který díky speciálnímu software dále komunikuje s uživatelským rozhraním na PC. A/D převodník je buď samostatný prvek¹⁵⁾ nebo je součástí počítače jako standardní rozšiřující karta¹⁵⁾ nebo je integrovaný přímo na detektoru.¹⁶⁾

2.5.5 Absorbující systém¹⁰⁾

Rozpouštědlo, právě tak jako materiál kyvety, musí propouštět záření v rozsahu vlnové délky, v jakém se měření provádí.

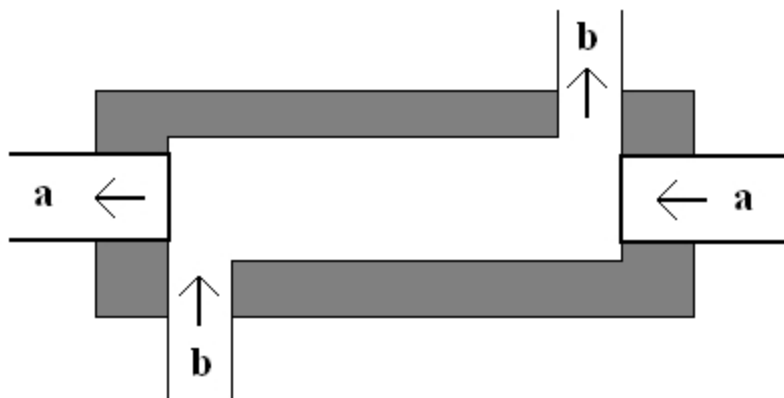
2.5.5.1 Rozpouštědla

Všechna rozpouštědla - obzvláště pro UV oblast - je třeba připravovat v co nejčistším stavu. Voda jako nejběžnější rozpouštědlo propouští záření až do vlnové délky 200 nm. Některá organická rozpouštědla v UV oblasti sama silně absorbují, a proto je možné je použít až od určité vlnové délky.

2.5.5.2 Kyvety

Nejjednodušší kyvety jsou válcové („kulaté“), pro přesnější měření se používají kyvety „hrnaté“, tedy s konstantní vzdáleností dvou planparalelních destiček. Tyto kyvety se vkládají mezi monochromátor a detektor. Další typy kyvet jsou např. kyvety průtokové, kyvety pro měření absorbce plynů, kyvety pro měření absorbce tavenin, atd. Standardní

tloušťka analyzované vrstvy se pohybuje v rozmezí 1 – 100 mm. Kyvety se běžně vyrábějí ze skla, pro UV oblast spektra z křemene. Při speciální konstrukci kyvety (viz. obr. č. 6) lze použít i jiných materiálů.



Obrázek č.6: Průtoková kyveta.

a...optická vlákna; ← ... směr postupu záření;

b... měřený roztok; ↑... směr pohybu měřeného roztoku.

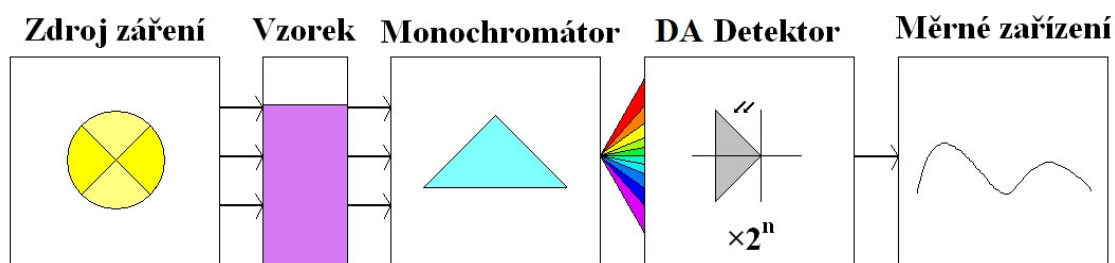
2.5.6 Pomocná optika

Jako pomocné optiky se užívá vstupních a výstupních štěrbin, zrcadel, čoček, odrazových hranolů, optických vláken apod. Blíže viz.^{10, 15, 16)}

2.6 Spektrofotometr pro oblast UV a VIS s diode array detektorem (DA spektrofotometr)

Zásadní rozdíl u DA spektrofotometru je v tom, že dokáže měřit zároveň odezvu u více vlnových délek (1024, 2048 a nově i 3648¹⁷⁾), což měření výrazně zrychluje a zefektivňuje.¹⁴⁾

Této schopnosti je dosaženo jednak jiným uspořádáním přístroje (obr. č. 7), ale hlavně díky detektoru, který je složen z lineárního „pole“ (angl. array) jednoduchých diodových detektorů. Prakticky toho je dosaženo tak, že všechny polovodičové fotodiody jsou osazeny v lineární řadě na jeden křemíkový krystal a to i včetně podpůrné elektroniky. Při snímání signálu je využit mikroprocesor (taktéž na stejném krystalu), který zabezpečí, aby byly všechny elementy pole odečteny ve správném pořadí a ve správný čas. Polychromatické záření zdroje prochází nejdříve vzorkem a poté teprve disperzním prostředím, které zajistí, že každá vlnová délka záření se zakříví pod jiným úhlem a pod ním (každá vlnová délka samostatně) dopadne na jiný element detektoru. Tedy každý element detektoru snímá intenzitu záření o jiné vlnové délce. Tím je dosažena podmínka o monochromatickosti záření a zároveň je celé spektrum odečteno najednou.¹⁴⁾



Obr. č. 7: Blokové schéma DA spektrofotometru

3. Experimentální část

3.1 Použitá zařízení

- analytické váhy SARTORIUS A200S
- SIA systém popsáný v kapitole 2.2, jeho základní součásti:
 - pístové čerpadlo CAVRO XL
 - selekční ventil VICI VALCO
- Řídící jednotka – počítač PC ATX (procesor Intel Pentium II 333 Mhz, 64MB operační paměti) vybavený vývojovým prostředím LabVIEW 5.1, operační systém Windows 98; přídatné karty AT-MIO-16E10 a AT-232/4 pro sběr dat a ovládání analyzátoru
- spojovací materiál – teflonové hadičky o vnitřním průměru 0,75 mm, Watrex, Praha, optická vlákna firmy Ocean Optics
- Diode array spektrofotometr USB2000 firmy Ocean Optics¹⁸⁾
- Světelný zdroj LS-1 firmy Ocean Optics¹⁹⁾
- průtoková kyveta, délka 3 cm
- počítač PC ATX, na kterém probíhala část vývoje programu FaFSIA UV-VIS, operační systém Windows 98 SE, vývojové prostředí LabVIEW 5.1 (procesor AMD Sempron 754 1,6 GHz, 512MB operační paměti)
- k vytvoření instalačního CD byla použita DVD±RW mechanika NEC 2510A

3.2 Použité chemikálie a roztoky

3.2.1 Chemikálie

Bromthymolová modř (BTM) $C_{27}H_{28}O_5Br_2S$, IND., Lachema, š. 101260591.

Tetraboritan sodný (TBN) $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, P. A., Lachema, š. 3307390787.

3.2.2 Roztoky

Jako rozpouštědlo jsem u všech roztoků použil destilovanou vodu.

3.2.2.1 Zásobní roztok bromthymolové modři

Navážka BTM: 30,9 mg.

Koncentrace: $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Objem: 500 ml.

K rozpuštění pevné BTM jsem před zředěním vodou na konečný objem použil 10 ml ethanolu denaturovaného methanolem.

Ze zásobního roztoku jsem naředil roztoky o koncentraci BTM $0,5 \cdot 10^{-5}$, $2,0 \cdot 10^{-5}$, $4,0 \cdot 10^{-5}$, $6,0 \cdot 10^{-5}$, $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.2.2.2 Zásobní roztok tetraboritanu sodného (tetraborátový pufr)

Navážka 1,8954 g.

Koncentrace $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Objem 500 ml.

pH $\approx 9,2$.

Tento roztok jsem dále užíval bez dalšího ředění.

3.3 FaFSIA UV-VIS

3.3.1 Požadované vlastnosti

Mým úkolem bylo upravit program FaFSIA nebo vytvořit nový tak, aby mohl pracovat s UV-VIS spektrofotometrem USB2000 firmy Ocean Optics. To zahrnovalo naprogramovat uživatelské rozhraní, které by umožnilo uživateli ovládat základní nastavení spektrofotometru, a dále provést změny v základním programu FaFSIA umožňující oboustrannou komunikaci programu a spektrofotometru a také následné vyhodnocení naměřených dat.

3.3.2 Koncept vlastního programu

První problém, který bylo potřeba vyřešit, spočíval v tom, zda zachovat původní FaFSIA se všemi jeho funkcemi a jen přidat další typ detektoru, nebo vytvořit program podobný původní FaFSIA, ale zaměřený jen na detekci pomocí spektrofotometru USB2000. První řešení by bylo z hlediska uživatelské přehlednosti elegantnější (vezmeme-li v úvahu, že by vznikl už třetí program se stejným základem, ale v průběhu programování jsem od něj musel z důvodu náročnosti a rozsahu změn ustoupit a vytvořil jsem program nový, nazvaný FaFSIA UV-VIS.

Další problém spočíval v tom, že připojovaný spektrofotometr má diode array detektor, tudíž naměří najednou více hodnot, ale původní modul mesure dokáže pracovat jen s hodnotou jedinou. Tento problém jsem nakonec vyřešil tak, že lze stále měřit u jedné hodnoty vlnové délky, kterou si uživatel vybere před měřením a zbytek spektra je pomocí software odfiltrován.

Asi největším problémem bylo ovšem zjištění, že detektor nedokáže kontinuálně měřit se zadanou vzorkovací frekvencí. Tento problém jsem víceméně úspěšně vyřešil pomocí software triggering.

3.3.3 Popis programu FaFSIA UV-VIS v 0.6

3.3.3.1 Úvod

Vzhledem k tomu, že program FaFSIA UV-VIS je vytvořen na základě FaFSIA, zůstala většina funkcí stejných. Zde se zaměřím jen na funkce, které byly změněny.

Pokud vezmeme v úvahu třídění na moduly, tak největších změn doznal modul Measure a z něj zejména program measure.vi. Další změny se týkaly modulu Program a v menší míře také modulu Main. Snažil jsem se pro větší přehlednost všechny .vi, které jsou použity jen ve FaFSIA UV-VIS doplňovat v názvu o „UV“.

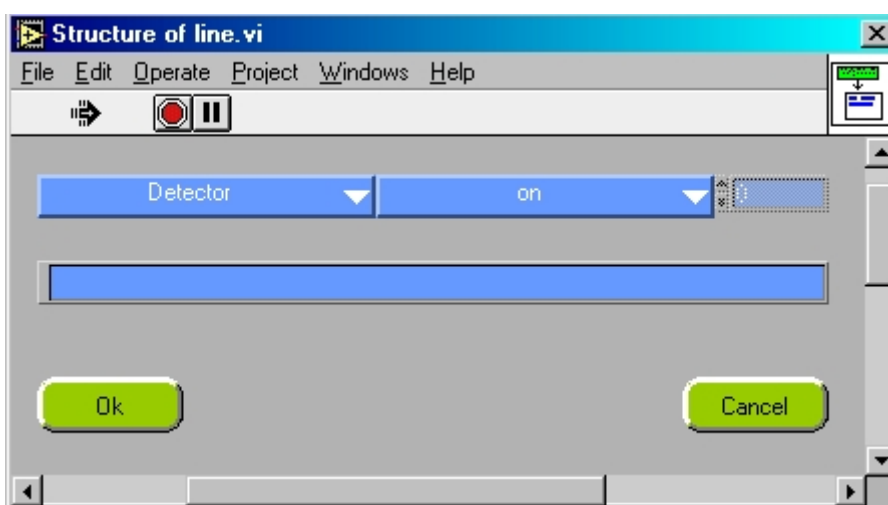
Díky tomu, že v době mé práce na přístroji neprobíhala žádná vědecká práce, mohl jsem většinu vývoje provádět přímo na počítači s připojeným SIA analyzátořem a detektorem. To mi velmi pomohlo zvláště při odladění.

3.3.3.2 Popis jednotlivých nových funkcí programu

Drtivá většina funkcí zůstala stejná jako v původním programu FaFSIA v 1.0. Jejich popis je uveden v původní práci,¹⁾ a proto se jimi zde nebudu zabývat. Popíši jen funkce nové nebo změněné:

3.3.3.2.1 Panel dialogu pro editaci programového řádku v modulu Program

U zařízení detector se změnila funkce příkazů „on“ a „off“. (Obr. č. 8.) Pro začátek sběru dat do modulu measure je potřeba zadat příkaz „on“, pro uživatelem řízené ukončení sběru je potřeba zadat příkaz „off“. Sběr se samozřejmě zastaví i s koncem programu. Dokud není zadán příkaz „on“, do modulu measure je odesílána hodnota 0,0; stejně tak i po zadání příkazu „off“.



Obr. č. 8: Panel dialogu pro editaci programového řádku v modulu Program.

3.3.3.2.2 Panel Nastavení UV-VIS

První uživatelsky viditelnou změnu oproti původní FaFSIA je vidět až při spuštění modulu measure.

Hned na úvod se objeví panel Nastavení UV-VIS (obr. č. 9), ve kterém lze nastavit parametry, se kterými bude detektor měřit. Panel lze – pokud není momentálně spuštěn měřicí cyklus pomocí tlačítka START v panelu Measure - znovu vyvolat pomocí nabídky „detektor“ na horní liště panelu Measure. Původní význam tohoto menu z FaFSIA nebyl zachován. Zde je popis funkcí jednotlivých prvků v panelu:



Obr. č. 9: Panel Nastavení UV-VIS.

- Vlnová délka [nm] – odezva této vlnové délky bude vyjmuta ze spektra pro další použití v modulu measure.

Možnosti jsou: 200 – 850 nm.

Standartní hodnota je: 500 nm.

- Integrovaní čas [ms] – čas, po který je senzor detektoru exponován světlu (v milisekundách).

Možnosti jsou: 10 – 200.

Standartní hodnota je 100.

- Box car smoothing – nastaví počet senzorů detektoru na každou stranu, které budou zprůměrovány do jedné výstupní hodnoty. Tím se může zvýšit reprodukovatelnost měření za cenu snížení rozlišení detektoru. Pro FaFSIA UV-VIS to znamená, že zapnutím této funkce se může i dost výrazně změnit hodnota Vypočítané vlnové délky; viz 3.3.3.2.3.3.

Možnosti jsou: 0,1,3,5 (senzorů na každou stranu).

Standartní hodnota je: 0 (neprůměruje se).

- Vzorkování [Hz] – nastaví počet měření za sekundu.

Možnosti jsou: 1,2,4.

Standartní hodnota je 2.

- Bodů do průměru – nastaví počet po sobě jdoucích měření, které budou zprůměrovány. Průměrovány jsou hodnoty podle algoritmu: 1. výstupní hodnota - měření 1,2,3, 2. výstupní hodnota – měření 4,5,6, atd. To samozřejmě snižuje vzorkovací frekvenci.

Možnosti jsou: 1,3,5.

Standartní hodnota je 1 (neprůměruje se).

- Mode – nastaví mód měření.

Možnosti jsou: Absorbance, Transmittance, Irradiance, Scope („surová“ odezva detektoru).

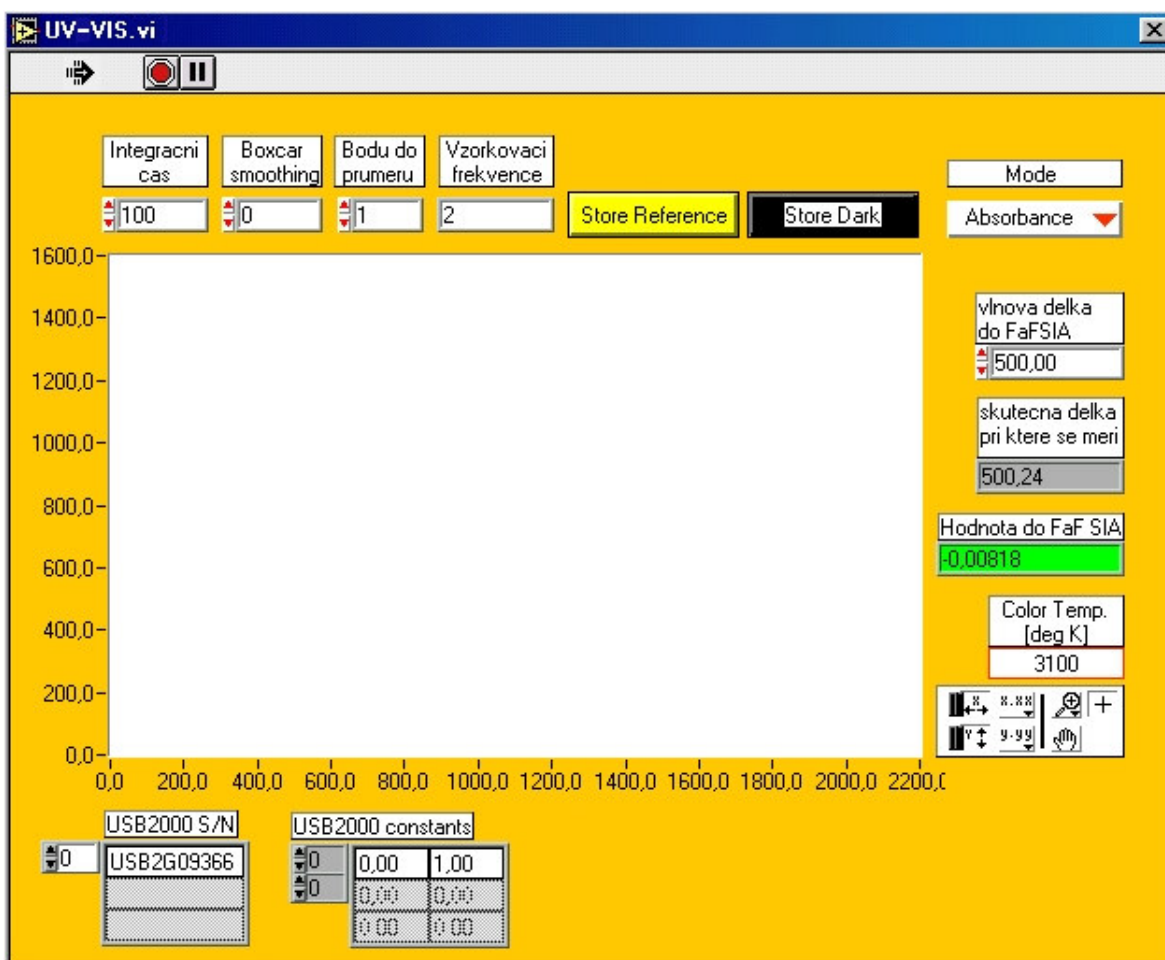
Standartní hodnota je Absorbance.

- OK – potvrdí nastavení.

- CANCEL – zruší změny a zachová původní hodnoty při otevření panelu.

3.3.3.2.3 Panel UV-VIS

Další uživatelsky významnou změnou je, že po stisku tlačítka START v panelu Measure se objeví - na rozdíl od FaFSIA v 1.0 - ještě jeden panel (obr. č. 10). Ten slouží k dalšímu ovládání detektoru a k zobrazení informací o průběhu a nastavení měření.



Obr. č. 10: Panel UV-VIS.

Popis funkcí tohoto panelu:

3.3.3.2.3.1 Prvky uživatelsky aktivní (uživatel je může měnit) s okamžitým účinkem:

- Store Dark – po stisknutí se následující změřené spektrum uloží do paměti jako tmavé spektrum. V paměti zůstane, dokud není program FaFSIA UV-VIS ukončen tlačítkem EXIT v modulu Main.

- Store Reference – po stisknutí se následující změřené spektrum uloží do paměti jako referenční spektrum. V paměti zůstane, dokud není program FaFSIA UV-VIS ukončen tlačítkem EXIT v modulu Main.

- Mode – po stisknutí se změní aktuální mód měření.

Možnosti jsou: Absorbance, Transmittance, Irradiance, Scope.

Původní hodnota je převzata z panelu „Nastavení UV-VIS“.

3.3.3.2.3.2 Prvky uživatelsky aktivní s účinkem až při dalším spuštění.

Slouží jednak jako informační, jednak usnadňují změnu nastavení. Jde o stejné prvky, jako v panelu „Nastavení UV-VIS“ popsaného výše. Původní hodnoty a rozsahy jsou z něj převzaty. Změna těchto prvků se projeví až po novém spuštění měření v panelu Measure pomocí tlačítka START. Možnost měnit tyto prvky během měření jsem přidal pro zjednodušení práce s programem pro uživatele. Uživatel nyní může měnit nastavení během programu bez okamžitého vlivu změn na měření, a proto nemusí čekat až do ukončení měření a poté otevírat panel „Nastavení UV-VIS“.

Jsou to tyto prvky:

- vlnová délka
- integrační čas
- box car smoothing
- bodů do průměru.

3.3.3.2.3.3 Prvky uživatelsky pasivní (pouze informují, uživatel je nemůže měnit):

- Vypočítaná vlnová délka – kvůli rozlišení detektoru se teoreticky vypočítaná vlnová délka liší od zadané.
- Hodnota do FaFSIA – hodnota odezvy u vypočítané vlnové délky. Tato hodnota se přenáší jako měřená do modulu Measure.
- Pole grafu – zobrazuje celé spektrum, které detektor měří.
- USB2000 S/N – výpis sériového čísla připojeného detektoru USB2000.
- USB2000 constant – ovládací .vi jsou schopny získat opravné koeficienty přímo z vnitřní paměti detektoru, takže není třeba je nahrávat z diskety. Zde se zobrazují.

3.3.3.2.4 Měření detektory připojenými ke kartě AT-MIO-16E10

Tento způsob získávání dat nebyl zachován. Funkci jsem musel zrušit pro náročnost změn, které jsem byl v původním FaFSIA v 1.0 nucen provést. Funkce nabídky „detektor“ na horní liště panelu Measure byla nahrazena funkcí „Nastavení UV-VIS“. Viz 3.3.3.2.2.

3.4 Testování systému

Systém jsem testoval měřením absorbance roztoku bromthymolové modři (BTM). Jde o látku, která mění zbarvení (a tedy i absorpční maximum) v závislosti na pH. K přechodu ze žluté na modrou formu BTM dochází při pH 5,8-7,4.¹²⁾ K vytvoření dostatečně zásaditého prostředí jsem používal roztok tetraboritanu sodného, a poté měřil absorbanci modré formy BTM. Stejný princip měření jsem používal i ve všech fázích vývoje programu FaFSIA UV-VIS.

3.4.1 Nastavení detektoru

U všech měření jsem použil stejné nastavení detektoru:

Parametr	Hodnota
Vlnová délka [nm]	616
<i>Vypočítaná vlnová délka [nm]</i>	<i>616,04</i>
Vzorkování [Hz]	2
Integrační čas [ms]	100
Box car smoothing	0
Bodů do průměru	1

3.4.2 Program kalib.prg

K ovládání analyzátoru jsem u všech měření použil stejnou sekvenci příkazů:

```
Syringe pump      Initialize                0
Timer             pause [s]                1
Detector          on
Syringe pump      valve position IN        {nosny proud}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     100
Syringe pump      aspirate [ul]           500
Syringe pump      valve position OUT       {system}
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       7 {BTH}
Syringe pump      aspirate [ul]           15
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       1 {detektor}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     20
Syringe pump      empty syringe
Syringe pump      valve position IN        {nosny proud}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     100
Syringe pump      aspirate [ul]           500
Syringe pump      valve position OUT       {system}
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       7 {BTH}
Syringe pump      aspirate [ul]           15
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       1 {detektor}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     20
Syringe pump      empty syringe
Syringe pump      valve position IN        {nosny proud}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     100
Syringe pump      aspirate [ul]           500
Syringe pump      valve position OUT       {system}
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       7 {BTH}
Syringe pump      aspirate [ul]           15
multi-port valve set valve position       5 {pufr}
Syringe pump      aspirate [ul]           50
multi-port valve set valve position       1 {detektor}
Syringe pump      set flow rate [ul/s]     20
Syringe pump      empty syringe
```

Každou koncentraci roztoku BTM jsem tedy při jednom spuštění změřil třikrát.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Program FaFSIA UV-VIS

Vytvořil jsem program FaFSIA UV-VIS, který umožňuje k SIA analyzátoru¹⁾ popsaného v kapitole 2.2 připojit UV-VIS detektor USB2000 firmy Ocean Optics.¹⁸⁾

Vycházel jsem z programu FaFSIA¹⁾ v 1.0 (taktéž viz. kapitola 2.2), který je určen k ovládní tohoto analyzátoru. Program FaFSIA je určen pro sběr dat pomocí AD karty AT-MIO-16E10, která má pro komunikaci s detektory své vlastní rozhraní. Detektor USB2000 však má AD kartu již zabudovanou jako svou součást a komunikuje s počítačem přes rozhraní USB, tudíž obchází celý systém sběru dat z FaFSIA. Proto jsem nemohl detektor připojit k analyzátoru bez zásadních změn v této části původního FaFSIA. Změny vyústily v to, že ve FaFSIA UV-VIS zůstaly všechny původní funkce FaFSIA až na možnost měření pomocí detektorů připojených přes kartu AT-MIO-16E10 a bez možnosti výběru se dá používat jen USB2000 připojený přes port USB. Nakonec se toto řešení ukázalo jako lepší, neboť spektrofotometr není k přístroji připojen permanentně (na rozdíl od analogového fluorimetru) a tudíž je výhodnější nezatěžovat základní program FaFSIA dalšími doplňky a tyto vložit jen do programu FaFSIA UV-VIS.

Program FaFSIA UV-VIS umožňuje:

- ✓ automatické rozpoznání připojeného detektoru USB 2000, včetně sériového čísla a načtení koeficientů z vnitřní paměti detektoru. Detektor je možné připojit do libovolného neobsazeného USB portu počítače.
- ✓ snadné nastavení parametrů detektoru pomocí uživatelského rozhraní (integrační čas, vzorkovací frekvence,...).
- ✓ z celého rozsahu detektoru měřit vždy u jedné zadané vlnové délky.
- ✓ převod detektorem naměřených dat do modulu Measure.
- ✓ použití všech funkcí původní FaFSIA v 1.0, kromě sběru dat pomocí karty AT-MIO-16E10.

Provedené změny i jejich význam jsem posal v kapitole 3.3.

V době psaní této práce se program FaFSIA UV-VIS nacházel ve verzi 0.6.

4.2 Testování systému

4.2.1. Kalibrační přímka bromthymolové modři

Systém jsem otestoval vytvořením kalibrační přímky modré formy bromthymolové modři (BTM).

Použil jsem tyto koncentrace roztoků BTM (viz. kapitola 3.2.2.1):

Koncentrace BTM [$10^{-5} \cdot \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	0,5	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
--	-----	-----	-----	-----	-----	------

Pro vytvoření dostatečně zásaditého prostředí jsem použil roztok tetraboritanu sodného o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (viz. kapitola 3.2.2.2).

U všech měření jsem použil stejné nastavení detektoru (viz. kapitola 3.4.1) a stejný program ovládající SIA analyzátor (viz. kapitola 3.4.2).

Výsledky měření jsou přehledně uvedeny v tabulkách č. 1 a č.2 . V tabulce č. 1 jsou zaznamenány výšky píků tří po sobě jdoucích měření (jeden cyklus programu) pro dané koncentrace BMT, v tabulce č.2 jsou uvedeny plochy pod křivkou vypočítané modulem Peak detection u stejných měření. Při sestavování grafu kalibrační přímky jsem nebral v úvahu výsledky měření získané pro koncentraci BTM $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, protože byly příliš odchýlené od přímky. Je možné, že se tak stalo, protože hodnota odezvy píku byla menší než 0,2, kdy se již mohl projevit šum základní linie. Kalibrační přímka podle výšky píku je uvedena v grafu č.1, kalibrační přímka podle plochy pod křivkou píku je uvedena v grafu č.2 . Na obr. č. 11 je zachycena ukázka výsledků tak, jak ji vidí uživatel na panelu Measure UV-VIS.

Tabulka č. 1: Výška píku odezvy detektoru měřená jako absorpance podle koncentrace BTM:

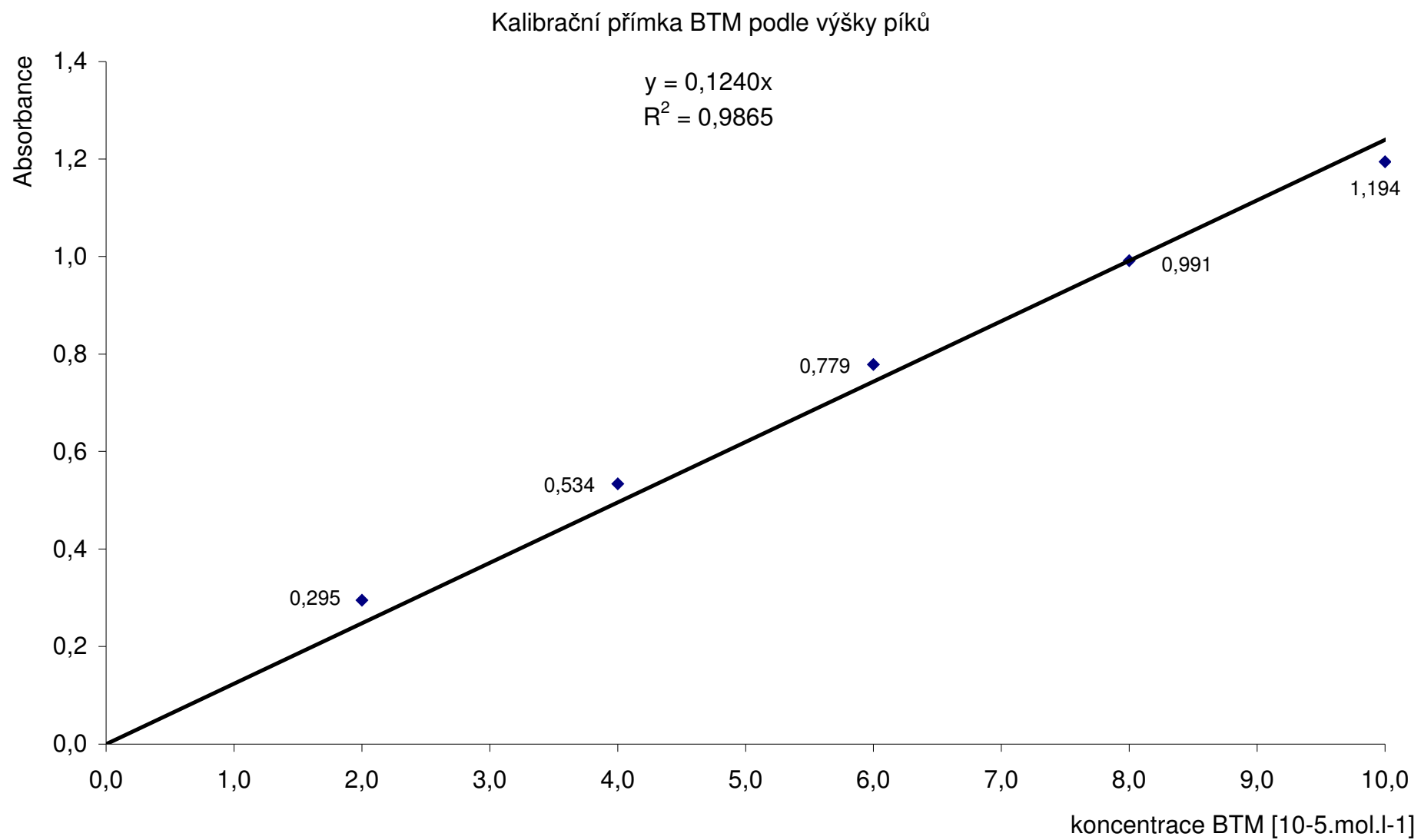
koncentrace BTM [10 ⁻⁵ ·mol·l ⁻¹]	Výška píku [A]				
	Měření č.:			Průměr	RSD [%]
	1	2	3		
0,5	0,209	0,188	0,192	0,1961	4,64
2,0	0,293	0,301	0,291	0,2948	1,50
4,0	0,564	0,537	0,500	0,5337	4,89
6,0	0,727	0,807	0,803	0,7788	4,74
8,0	0,995	0,979	0,999	0,9912	0,88
10,0	1,214	1,143	1,226	1,1944	3,06

Tabulka č. 2: Plocha pod křivkou píku podle koncentrace BTM:

koncentrace BTM [10 ⁻⁵ ·mol·l ⁻¹]	Plocha pod křivkou píku				
	Měření č.:			Průměr	RSD [%]
	1	2	3		
0,5	0,95295	0,89840	0,84995	0,900433	4,67
2,0	1,56829	1,47701	1,47959	1,508297	2,81
4,0	3,32220	2,84699	2,81052	2,993237	7,79
6,0	4,35890	4,39573	4,57293	4,442520	2,10
8,0	5,66666	5,56302	5,83765	5,689110	1,99
10,0	7,72960	7,70610	7,77641	7,737370	0,38

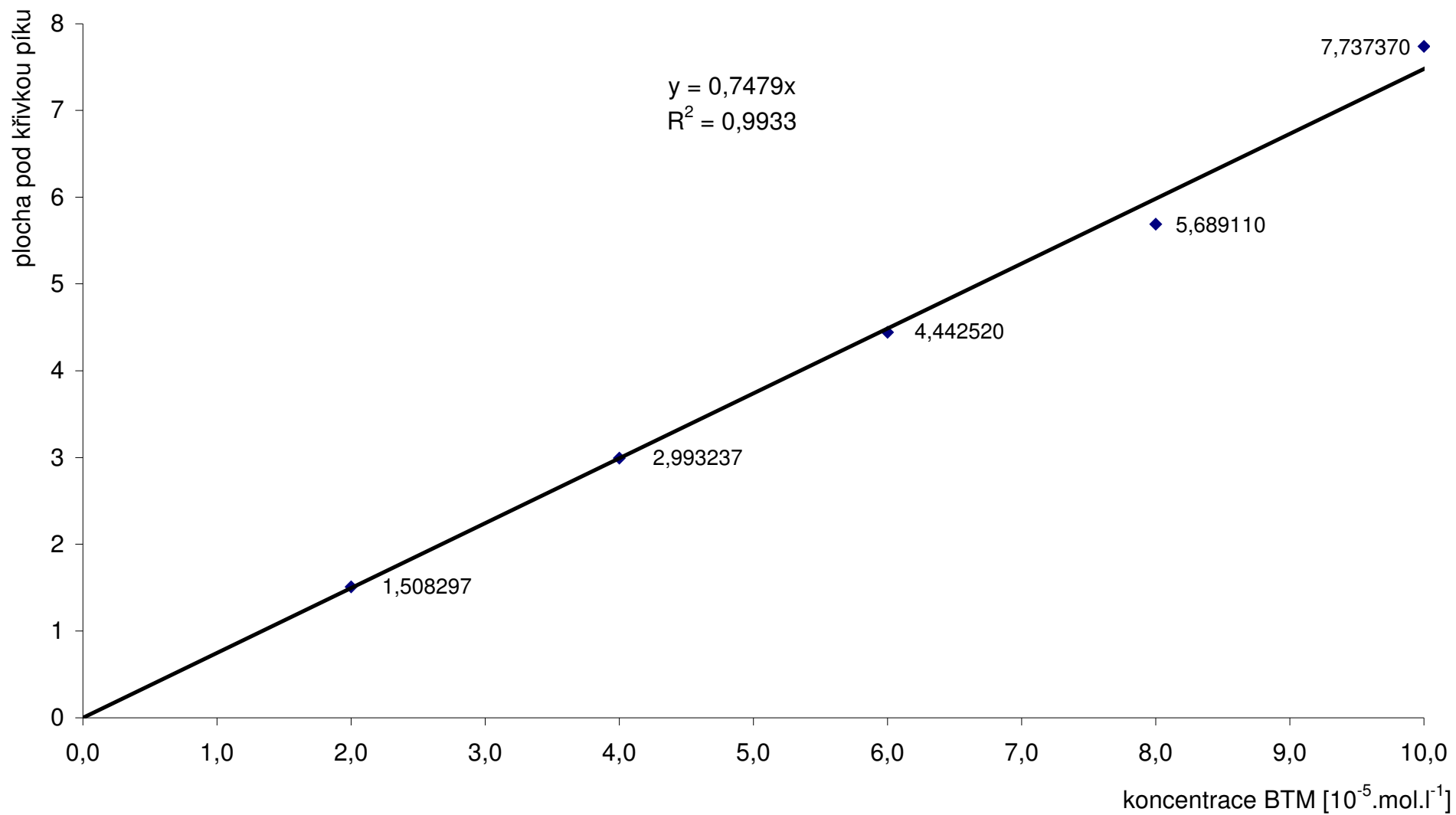
RSD – relativní směrodatná odchylka.

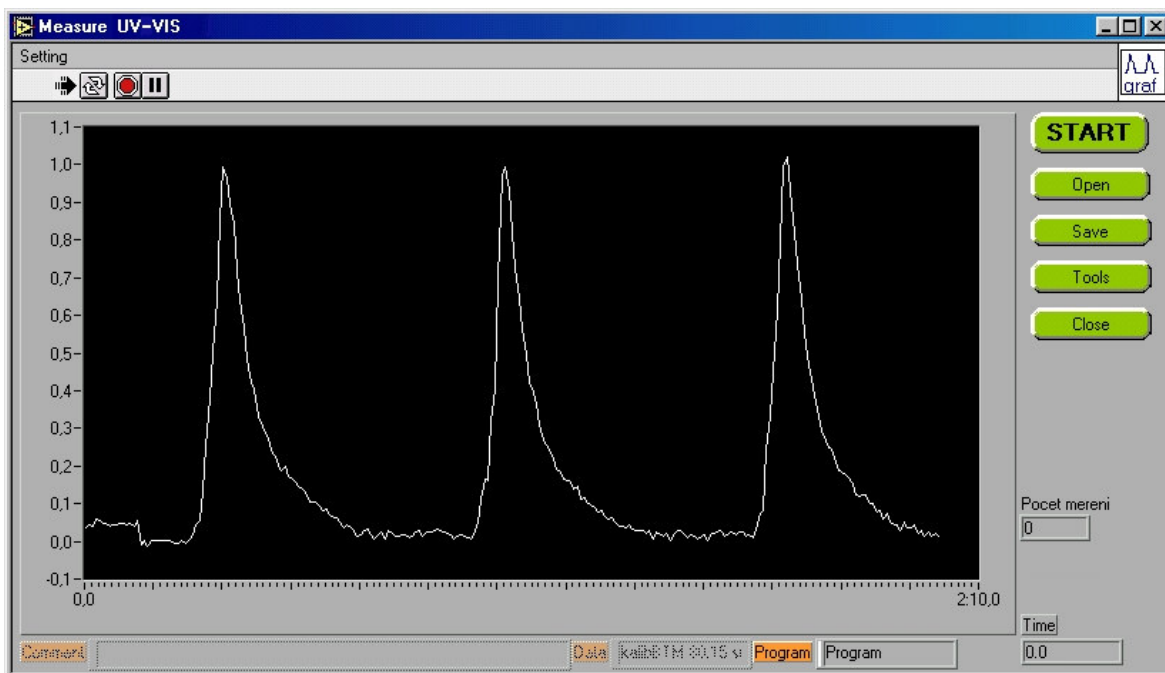
Graf č. 1:



Graf č. 2:

Kalibrační přímka BTM podle plochy pod křivkou píku





Obr. č. 11: Ukázka výsledků tak, jak je vidí uživatel na panelu MeasureUV-VIS. „Schod“ na začátku měření vznikl nastavením referenční hodnoty.

4.2.2 Reprodukovatelnost měření

Změřil jsem devětkrát stejnou koncentraci ($0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) roztoku BTH. (tři cykly programu kalibr.prg – viz kapitola 3.4.2). Z hodnocení jsem vyloučil sedmé měření, pro jeho velkou odchylku od průměru. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 : Reprodukovatelnost měření.

Měření č.	Výška píku [A]	Plocha pod křivkou píku
1	0,995	5,66666
2	0,979	5,56302
3	0,999	5,83765
4	0,933	6,34762
5	0,898	5,75288
6	0,915	5,61300
7	1,141	5,90340
8	0,997	5,80683
9	0,973	5,89322
Průměr	0,9613	5,810110
RSD [%]	3,90	3,95

4.3 Možnosti dalšího vývoje programu FaFSIA UV-VIS

Samozřejmě se mi nepodařilo odstranit všechny nedostatky, které program má. Například se mi nepodařilo odstranit problém se synchronizací časování při frekvenci 4 Hz. Bohužel pro AD kartu detektoru USB 2000 neexistuje příkaz pro automatické odesílání dat počítači při zadané frekvenci. Karta sice dva časovače má, ale ty jsou využity pro jiné prostředky detektoru. Proto je potřeba příkaz pro získání dat zadávat vždy znovu v požadované frekvenci. Využil jsem k tomu časovač karty AT-MIO-16E10, nicméně mé řešení přenosu spouštěcího signálu se při dané frekvenci nesešlo s úplným úspěchem, protože řídicí počítač je dost zatížen a díky tomu ne vždy dokáže včas „stisknout spoušť“. Jako další cestou se jeví využití možnosti tzv. „hardware triggering“ mezi kartou AT-MIO-16E10 a detektorem.

Při tvorbě jsem použil mimo jiné také knihovny s .vi ovládající detektor, které dodává firma Ocean Optics. Nicméně až při psaní této práce jsem našel úplnou dokumentaci k detektoru, ve které jsem se dočetl, že s detektorem lze komunikovat i přímo pomocí jednoduchých textových příkazů, což nabízí mnohem širší možnosti než zmiňovaná .vi. Například lze už na úrovni detektoru z celého spektra vybrat jen malou část a teprve tu poslat počítači, tudíž program poté nemusí zpracovávat celé spektrum, což samozřejmě sníží nároky na počítač a zvýší stabilitu systému, zvláště, když původní modul Measure dokáže pracovat jen s jednou hodnotou.

Dále by se mohlo naprogramovat, aby se hodnoty „dark spektrum“ a „reference spektrum“ daly zadat jako příkaz pro analyzátor, stejně jako například otočení ventilu, popř. vložit je do panelu „Nastavení UV-VIS“. Nicméně pro takové změny by se musela změnit struktura programu.

Také by mohlo být užitečné přidat funkci porovnávání dvou (více) hodnot vlnových délek.

Další směry vývoje programu se jistě ještě ukáží v průběhu jeho používání.

4.4 Instalační CD

Jako přílohu této práce jsem vytvořil CD, které obsahuje:

- ✓ soubor ctime.txt
- ✓ tuto práci ve formátu PDF
- ✓ program FaFSIA UV-VIS v 0.6. Nicméně pro spuštění je potřeba mít nainstalováno prostředí LabVIEW firmy National Instruments ve verzi alespoň 5.1.
- ✓ Podrobnou dokumentaci k detektoru USB2000 ve formátu PDF.
- ✓ instalační balíček programu Acrobat reader v 6.0; v tomto programu lze otevřít dokumenty ve formátu PDF

5. Závěr

Vytvořil jsem program FaFSIA UV-VIS, který umožňuje k SIA analyzátoru vytvořenému na katedře analytické chemie v rámci diplomové práce¹⁾ připojit diode array (DA) spektrofotometr USB2000 firmy Ocean Optics pro oblast UV a VIS.¹⁸⁾ Pomocí grafického rozhraní na odděleném panelu lze nastavit základní parametry detektoru pro měření, jako například vlnová délka (USB2000 je sice DA spektrofotometr, ale jádro programu dokáže pracovat jen s jednou hodnotou), mód měření, frekvence sběru dat, atd. a odeslání naměřených dat zpět do základního programu pro jeho další zpracování. Vycházel jsem z programu FaFSIA v 1.0 (vznikl také v rámci již zmiňované diplomové práce¹⁾), který je určen pro ovládání analyzátoru, ale není schopen komunikovat s daným typem detektoru. Z tohoto důvodu jsem musel do programu zasáhnout. Při tom jsem využil i ovládací programy (vi) dodávané výrobcem detektoru.

V současné verzi 0.6 program FaFSIA UV-VIS obsahuje všechny funkce původního programu FaFSIA 1.0 kromě funkce měření pomocí detektorů připojených ke kartě AT-MIO-16E10. Soubory programů (*.prg) a naměřených dat (*.sia) z původní FaFSIA jsou plně kompatibilní s FaFSIA UV-VIS a naopak.

Celý systém jsem otestoval vytvořením kalibrační přímky modré formy bromthymolové modři (BTM). Použil jsem tyto roztoky:

BTM o koncentracích 0,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 · 10⁻⁵ mol·l⁻¹.

Tetraboritan sodný (pH ≈ 9,2) o koncentraci 0,01 mol·l⁻¹.

Parametry detektoru byly pro všechna měření stejné:

Vlnová délka [nm]	616
Vypočítaná vlnová délka [nm]	616,04
Vzorkování [Hz]	2
Integrační čas [ms]	100
Box car smoothing	0
Bodů do průměru	1

Pro všechna měření jsem použil stejný program pro ovládání SIA analyzátoru (viz kapitola 3.4.2).

Spolehlivost linearity byla pro kalibrační přímku založenou na výšce píku $R^2 = 0,9870$; pro kalibrační přímku založenou na velikosti plochy pod křivkou píku $R^2 = 0,9930$. Při výpočtu obou spolehlivostí jsem nebral v úvahu hodnoty naměřené u koncentrace BTM $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro jejich statisticky významnou chybu.

Reprodukovatelnost měření jsem ověřil srovnáním devíti naměřených hodnot u stejné koncentrace BTM ($0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Jedno měření jsem z hodnocení vyloučil pro jeho statisticky významnou chybu. Relativní směrodatná odchylka byla pro výšku píků 3,90% a pro plochu pod křivkou píku 3,95%.

Na dalším vývoji programu FaFSIA UV-VIS chci pokračovat v rámci svého doktorandského studia.

6. Literatura

- 1) Svoboda A.: Vývoj a konstrukce automatického analyzátoru na bázi SIA. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 1999
- 2) Paseková H., Polášek M., Solich P.: SIA-sekvenční injekční analýza, Chemické listy 93, 1999, str. 354-359
- 3) Růžička J.: Flow injection, propagační CD, FIALab Instruments Inc., 2002
- 4) Růžička J., Marshall G.D.: Anal. Chim. Acta 237, 1990, str. 329
- 5) Ořapka M.: Vývoj software pro automatickou optimalizaci operačních parametrů v sekvenční injekční analýze. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2003
- 6) <http://www.flowinjection.com>
- 7) CAVRO XL 3000 Modular Digital Pump, Operator's manual, Cavro Scientific Instruments Inc., 1993
- 8) Measurement and Automation Catalogue, National Instruments, 1999
- 9) Travis J.: LabView for everyone, Prentice Hall PTR Inc., 2. vydání, USA, 2002
- 10) Zýka J. a kol.: Analytická příručka díl II, 3. vydání, SNTL, Praha, 1980
- 11) Karlíček R. a kol.: Analytická chemie, učební texty pro posluchače Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, Karolinum, Praha, 2001
- 12) Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2002
- 13) <http://www.oceanoptics.com/lightsources>
- 14) <http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/HP8452.html>
- 15) <http://www.ni.com/>
- 16) <http://www.oceanoptics.com/products/spectrometers.asp>
- 17) <http://www.oceanoptics.com/Products/usb4000.asp>
- 18) ?dokumentace USB2000?
- 19) ?dokumentace LS-1?