

Spektrofotometr

Pro měření veličin jako absorbance a transmittance, ale někdy např. i turbidance, se používají fotometry a spektrofotometry. Zařízení, která měří při jedné nebo jen několika přesně definovaných vlnových délkách monochromatického světla, označujeme jako **fotometry**. Technicky složitější a dokonalejší přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit, nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, se nazývají **spektrofotometry**.

Uspořádání fotometru

Principiálně se fotometr i spektrofotometr skládá ze čtyř částí:

1. zdroj světla
2. monochromátor
3. oddíl, ve kterém je umístěn vzorek
4. detektor

Zdroj světla

Jako zdroj světla slouží vhodná žárovka nebo výbojka. Žárovky a halogenové žárovky poskytují záření o spojitém spektru ve viditelné a infračervené oblasti, nelze je však použít pro měření v UV oblasti. Jako zdroje ultrafialového záření se používají nejčastěji vodíková nebo deuteriová výbojka. Zdrojem UV i viditelného světla může být také např. xenonová výbojka, široký rozsah vlnových délek je však vyvážen některými nevýhodami: její světlo je složením spojitého a čárového spektra, takže jsou velké rozdíly mezi intenzitami při různých vlnových délkách, výbojka je velmi drahá a intenzita jejího světla není příliš stabilní.

Monochromátor

Polychromatické světlo následně prochází monochromátorem. Nejjednodušší a nejlevnější možností je zařazení vhodného interferenčního filtru do optické dráhy. Komerčně dostupné jsou dnes filtry prakticky pro libovolnou vlnovou délku ultrafialové a viditelné oblasti. Rozlišuje se několik druhů filtrů, jejichž vhodnou kombinací se sestaví filtr požadovaných vlastností. Low-pass filtry propouštějí světlo vlnových délek kratších, než je určitá mez (cut-off). High-pass filtry naopak propouštějí jen světlo, které má větší vlnovou délku, než je hraniční vlnová délka filtru. Pásmové filtry propouštějí určitý rozsah vlnových délek. Protože hranice nebývají zcela ostré, uvádí se jako dolní a horní mez zpravidla taková vlnová délka, pro kterou má filtr padesátiprocentní transmittanci ve srovnání s vlnovou délkou, kterou propouští nejlépe. Někdy se také uvádí střední vlnová délka, kterou filtr propouští, a šířka pásma (nebo polopásma).

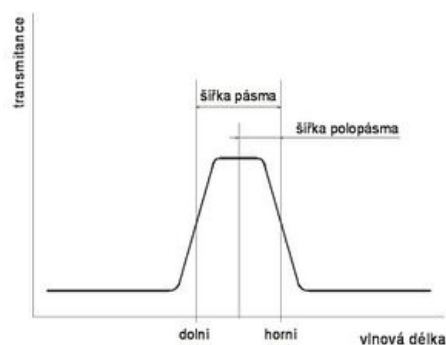
Obvykle dnes jako monochromátor slouží optická mřížka, jejímž nakláněním lze plynule měnit vlnovou délku (např. tzv. Czerného-Turnerův monochromátor). Rozsah vlnových délek, které z monochromátoru vycházejí, určuje štěrba, buď pevně nastavená, nebo rovněž nastavitelná. Čím je štěrba širší, tím větší je intenzita vycházejícího světla, ovšem za cenu menší specifičnosti měření. Naopak užší štěrba zajistí přesnější dodržení požadované vlnové délky, ovšem za cenu menší intenzity světla a zhoršení odstupu signálu od šumu.

Vzorek

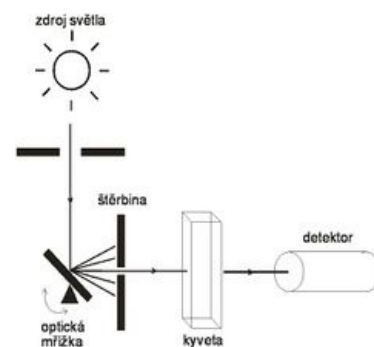
Monochromatické světlo prochází vzorkem. Většinou se pracuje s roztoky, které se plní do standardních kyvet s optickou dráhou 1 cm. Kyvety se v přístroji umísťují do kyvetátoru, který zajišťuje jejich přesnou polohu, může být temperován a někdy obsahuje i magnetickou míchačku, pomocí níž lze po vložení míchadélka do kyvety promíchávat její obsah během měření. Často bývá možné do kyvetátoru založit najednou několik kyvet, které se pak automaticky vsunují do optické dráhy.

Detektor

Světlo vycházející ze vzorku konečně dopadá na detektor, zpravidla fotodiodu nebo jiný fotoelektrický prvek. Intenzita se vyhodnotí pomocí systému převodníků, srovná se s intenzitou světla procházejícího slepým vzorkem, a tím se získá absorbance. Přesnost měření ovlivňuje *integrační čas* – doba, po kterou se absorbance měří. Čím je delší, tím přesnější bude výsledek měření, pokud ovšem není absorbující látka fotocitlivá (tj. pokud nedojde při



Šířka pásma a polopásma interferenčního filtru



Uspořádání spektrofotometru

delším osvitu k vyblednutí vzorku). Nevýhodou dlouhého integračního času je samozřejmě také prodlužování doby měření, což je podstatné zejména při zpracování velkého množství vzorků, při měření při velkém počtu vlnových délek (tj. při měření spekter), nebo při zpracování vzorků, které se v čase mění (kinetická měření).

Kromě tzv. jednopaprskových fotometrů, v nichž se nejprve měří slepý vzorek a pak se do stejné optické dráhy vkládá měřený vzorek, se používají i tzv. *dvoupaprskové fotometry*, které jsou vybaveny dvěma detektory a umožňují měřit slepý i měřený vzorek současně ve dvou optických drahách.

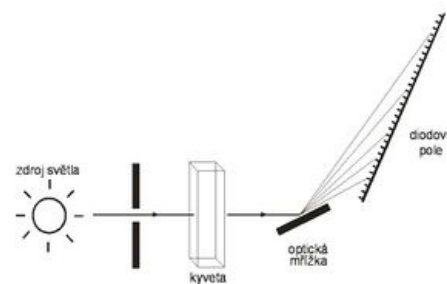
Jiná uspořádání spektrofotometru

Měření spektra na spektrofotometru s optickou mřížkou znamená, že přístroj změří absorbanci při jedné vlnové délce, pak posune mřížku, měří při další vlnové délce a to se neustále opakuje, dokud se neproměří celá požadovaná oblast. To s sebou přináší poměrně dlouhou dobu měření, což může být na závadu z několika důvodů:

- vzorek se může v čase měnit (zejména při kinetických měřeních)
- vzorek může být fotocitlivý, v průběhu měření dochází k jeho vyblednutí
- pokud se zpracovává více vzorků, které nejsou dostatečně stabilní, může být technicky obtížné zajistit stejné podmínky pro první a poslední vzorky
- měření trvá dlouho, výkonnost metody je nízká

Diodové pole

Uvedené nedostatky odstraňuje jiné uspořádání spektrofotometru, měření pomocí *diodového pole* (diode-array). Při něm prochází vzorkem bílé světlo, které je až poté rozloženo na jednotlivé vlnové délky (zpravidla pomocí pevně postavené optické mřížky) a dopadá na destičku s velkým množstvím detektorů – fotodiod (odtud název diodové pole). Diodové pole je přitom umístěno tak, že na každou fotodiodu dopadá určitý (poměrně úzký – např. 2 nm) rozsah vlnových délek. Zařízení neobsahuje žádné pohyblivé prvky, což zvyšuje reproduibilitu měření, a navíc se změří celé spektrum najednou. Doba měření se tak může zkrátit z několika minut na zlomky sekundy. Toto uspořádání navíc umožňuje konstruovat přístroje přibližně o řád přesnější, než klasické fotometry, navíc nevyžadující prakticky žádnou údržbu, kalibraci atd. Zásadní nevýhodou bývá mnohonásobně vyšší pořizovací cena, avšak se zlevňováním miniaturních elektronických prvků se náklady na výrobu diodového pole rychle snižují.



Uspořádání spektrofotometru s diodovým polem

Fotometrie se svislým paprskem

V rutinním použití má klasické uspořádání fotometrie i další nevýhody:

- vyžaduje velké množství vzorku
- má malou výkonnost, zpracování jednotlivých vzorků je pracné
- kyvety jsou drahé a náročné na údržbu
- spektrofotometry jsou nákladné

Tyto nevýhody z velké části odstraňuje měření v mikrotitračních destičkách pomocí *fotometru se svislým paprskem* (čtečka destiček, plate reader). Vzorky se plní do polystyrenových destiček s 96 jamkami, existují ale i jiné formáty (od 4 do 384 jamek). Pro práci s mikrotitračními deskami jsou k dispozici speciální pomůcky (vícekanálové pipety, opakovací pipety atd.), které výrazně urychlují přípravu vzorků. Na rozdíl od klasických fotometrů, v nichž se absorbance měří vodorovným paprskem a optická dráha je daná tloušťkou kyvety, probíhá v tomto případě měření pomocí svislého paprsku a délka optické dráhy závisí na výšce hladiny v jamce. Pokud ke vzorku přidáme určité množství bezbarvého roztoku, sníží se sice koncentrace absorbující látky, zároveň se ale úměrně zvýší hladina roztoku v jamce (prodlouží se optická dráha) a výsledná absorbance bude stejná. Naopak, pokud se ze vzorku odpaří část bezbarvého rozpouštědla, optická dráha se sice zkrátí, zato však stoupne koncentrace absorbující látky a absorbance se opět nezmění. Lze říci, že na rozdíl od klasické fotometrie, kde absorbance odpovídá koncentraci absorbující látky v roztoku, závisí absorbance při měření svislým paprskem na látkovém množství absorbující látky ve vzorku. Pro fotometrii svislým paprskem je třeba mnohem menší objem vzorku – jamky se zpravidla plní jen 100 až 300 µl roztoku. Mikrotitrační destičky jsou jednorázové a jsou vzhledem k počtu zároveň měřených vzorků podstatně levnější než plastové kyvety. Změření všech 96 jamek trvá obvykle jen několik vteřin. Rovněž destičkové fotometry bývají poměrně levné, jako monochromátor většinou používají sadu interferenčních filtrů. Zvláště často se fotometrie svislým paprskem využívá v imunochemii, zejména v metodice ELISA (odtud rozšířené označení přístroje ELISA-reader). Pro větší přehlednost se při fotometrii svislým paprskem kromě pojmu absorbance používá ještě termínu optická hustota (OD – z anglického *optical density*). Platí přitom vztah

$$OD = A / l$$

kde OD je optická hustota, A je absorbance a l je délka optické dráhy.

Optická denzita tedy závisí jen na vlastnostech vzorku, nikoli však na délce optické dráhy, po níž světlo vzorkem prochází.

Reflexní fotometrie

Jinou fotometrickou technikou je *reflexní fotometrie* – technika rutinně používaná například v klinické biochemii v rámci tzv. suché chemie. V suché chemii se biologický materiál nezpracovává obvyklým způsobem ve zkumavkách či jiných nádobkách, ale nanese se na film napuštěný jednotlivými složkami reakční směsi. Výsledkem je změna barvy políčka, kterou lze kvantifikovat pomocí reflexního fotometru – měří se úbytek světla určité vlnové délky odraženého od políčka. Jako zdroj světla se používají buď LED diody emitující vhodnou vlnovou délku, nebo žárovkové zdroje s interferenčními filtry. Pro zvýšení citlivosti se odražené světlo soustřeďuje na detektor vydutým zrcadlem (tzv. Ulbrichtovou koulí). Klasickým příkladem suché chemie a reflexní fotometrie je vyšetření moči pomocí diagnostických proužků, vzhledem k jednoduchosti a rychlosti při přesnosti srovnatelné s klasickými metodami se však množství aplikací rychle rozšiřuje.

Pokročilé spektrofotometrické techniky

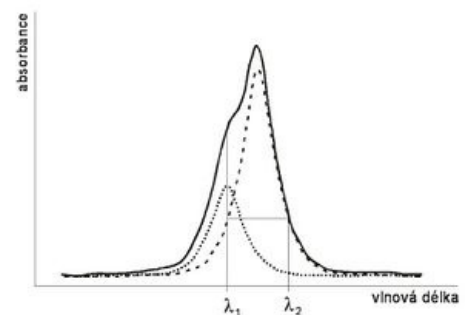
Multikomponentní analýza

Často se stává, že v části spektra, kde má absorpční maximum stanovovaná látka, zároveň absorbuje i další složka reakční směsi. V tom případě nelze snadno stanovit koncentraci měřené látky, protože absorbance při zvolené vlnové délce je součtem absorpčních obou látek. Pokud je koncentrace druhé, „překážející“ složky známá, nebo pokud lze experiment uspořádat tak, aby byla konstantní ve všech vzorcích, lze tuto situaci vyřešit pomocí vhodných slepých vzorků. V některých případech je však nutné postupovat metodami tzv. *multikomponentní analýzy spektra*.

Obvykle se neměří při jedné vlnové délce, ale proměřuje se určitá spojitá část spektra, nebo se přinejmenším měří při několika vlnových délkách. Jsou-li známy extinkční koeficienty jednotlivých látek absorbujících v dané oblasti při různých vlnových délkách (nebo ještě lépe, jsou-li známá absorpční spektra jednotlivých složek směsi), lze koncentraci analytu vypočítat řešením soustavy rovnic.

V nejjednodušším případě je třeba stanovit koncentraci jedné látky, přičemž její absorpční spektrum (na obrázku tečkovaně) překrývá spektrum jiné ve vzorku přítomné látky (čárkovaně). Měření vzorku získáme spektrum, které je součtem obou absorpčních spekter (plnou čarou). I když víme, že stanovovaná látka má absorpční maximum při vlnové délce λ_1 , nemůžeme stanovit její koncentraci přímo, neboť při této vlnové délce nelze zanedbat absorbanci druhé látky. Známe-li však tvar absorpčního spektra druhé látky, můžeme najít vlnovou délku, při které absorbuje stejně, jako při vlnové délce λ_1 (označme ji λ_2), tj. extinkční koeficient je pro λ_1 a λ_2 stejný. Potom absorbance samotné stanovované látky bude

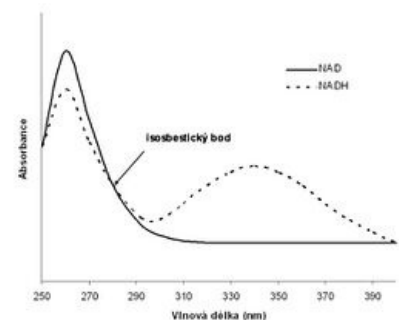
$$A = A(\lambda_1) - A(\lambda_2).$$



Multikomponentní analýza

Využití isosbestického bodu

Pokud látka, která má určité spektrum, se v průběhu nějaké reakce mění na jinou látku, která má jiné spektrum, ale obě spektra se částečně překrývají. Příkladem mohou být spektra NAD^+ a NADH (stanovení těchto koenzymů se využívá při měření aktivity řady enzymů pomocí tzv. Warburgova optického testu). V tomto případě jsou absorpční maxima dostatečně daleko od sebe, takže stanovení jednotlivých forem koenzymu je jednoduché. Užitečná však může být skutečnost, že všechna spektra pro různé poměry $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ (při konstantní celkové koncentraci) se kříží. To je způsobeno tím, že při vlnové délce 281 nm má NAD^+ i NADH stejný extinkční koeficient. Průsečík spekter se nazývá isosbestický bod (z řeckého ισος isos = stejný a σβεννυμι sbennými = zháším) a měření absorbance v tomto bodě snadno zjistíme celkovou koncentraci NAD^+ a NADH, aniž bychom potřebovali znát aktuální poměr koncentrací obou složek.



Isosbestický bod

Další metody

Řadu dalších dat lze získat vhodným matematickým zpracováním naměřených spekter. Při měření složitějších soustav může pomoci *derivační spektrofotometrie*, která umožní po vyhodnocení prvních a druhých derivací spekter podle vlnové délky např. najít přesné polohy absorpčních maxim apod. Rovněž pro zpracování kinetických měření je nezbytné matematické zpracování získaných dat.

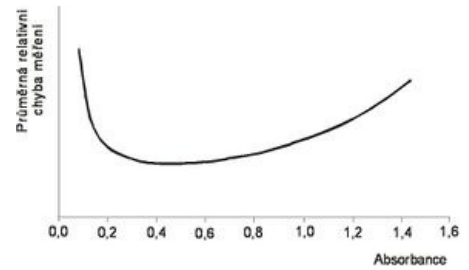
Přesnost fotometrických metod

Většina fotometrů může měřit absorbanci v rozmezí 0 až 3 nebo 4. To však neznamená, že by měření v celém tomto rozsahu bylo rozumné. Za předpokladu, že náhodná chyba detektoru bude mít stále stejné vlastnosti, bude mít průměrná relativní chyba měření absorbance v závislosti na skutečné absorbanci vzorku průběh ve tvaru písmene U. Nejlepších výsledků dosáhneme, bude-li se absorbance vzorku pohybovat v rozmezí 0,2 až 0,8, za

rozumné lze považovat měření v rozsahu 0,2 až 1,2. Je-li absorbance vyšší, je vhodné vzorek ředit. Konkrétní hodnoty samozřejmě závisí na vlastnostech použitého fotometru, ovšem průběh průměrné relativní chyby jako funkce absorbance bude stále stejný (liší se jen „roztážení“ křivky).

Přesnost měření je velmi ovlivněna i přípravou vzorku a kyvety. Uvedme aspoň nejvýznamnější vlivy, které ovlivňují přesnost spektrofotometrických stanovení:

- je třeba měřit ve vhodné kyvetě, zvolená vlnová délka musí ležet v pásmu, pro které je kyveta určena
- měří-li se ve více kyvetách, měly by mít všechny stejný faktor. Plastové kyvety by měly být všechny ze stejné šarže.
- kyvety pro vzorky i blanky musejí být čisté. To lze ověřit tak, že naplněné destilovanou vodou dají všechny stejnou absorbanci.
- s kyvetami je třeba pracovat tak, aby nedošlo ke znečištění optických ploch (např. dotykem prstů). Totéž platí i pro mikrotitrační destičky.
- kyveta musí být zvenčí suchá, uvnitř nesmějí zůstat bublinky vzduchu, měřený roztok musí být homogenní. Kapka stékající po kyvetě, bublinky nebo plovoucí sraženina v měřeném roztoku se projeví obvykle tím, že se naměřená absorbance neustále mění.
- kyveta musí být vzorkem dostatečně naplněná.
- měří-li se více vzorků postupně v jedné kyvetě, je třeba pracovat tak, aby chyba způsobená zbytky předchozího roztoku byla co nejmenší. Obvykle se kyveta mezi vzorky vyplachuje destilovanou vodou a pak se co nejlépe vysuší. Přesnějších výsledků dosáhneme, pokud se kyveta po vymytí ještě propláchne malým množstvím vzorku, který se vylije a pak teprve se kyveta naplní potřebným množstvím vzorku pro měření. Pokud se pracuje s několika podobnými roztoky, může být přesnější kyvety mezi nimi neproplachovat destilovanou vodou, jen je co nejlépe vylít a vysušit.
- při měření v kyvetách je podstatná koncentrace barevné látky v roztoku, při přípravě vzorku je proto nejdůležitější dodržet poměr jednotlivých složek. Je vhodné uspořádat pokus tak, aby se všechny složky pipetovaly pokud možno stejnou pipetou, nejlépe pevně nastavenou.
- Měří-li se v mikrotitračních destičkách, je naopak rozhodující látkové množství barevné látky ve vzorku. Proto je třeba pokus uspořádat tak, aby byl do jamky co nejpřesněji odměřen analyt. Velkou chybou může také způsobit různý tvar hladiny v jednotlivých jamkách, všechny vzorky by proto měly mít stejnou afinitu ke stěnám destičky, případně je vhodné desku před měřením krátce promíchat, aby se zajistilo smočení stěn i nad hladinou roztoku.



Průměrná relativní chyba fotometrického stanovení