

Bakalářská práce



České
vysoké
učení technické
v Praze

F3

Fakulta elektrotechnická

UV-VIS spektrofotometr pro analýzu tekutin

Georgii Dudashvili

Školitel: Ing. Adam Bouřa, Ph.D.
Srpen 2020

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Dudashvili** Jméno: **Georgii** Osobní číslo: **474231**
Fakulta/ústav: **Fakulta elektrotechnická**
Zadávací katedra/ústav: **Katedra mikroelektroniky**
Studijní program: **Elektronika a komunikace**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

UV-VIS spektrofotometr pro analýzu tekutin

Název bakalářské práce anglicky:

UV-VIS spectrophotometer for fluid analysis

Pokyny pro vypracování:

1. Seznamte se s problematikou UV-VIS spektrofotometrie [1, 2]. Proveďte rešerši využití této metody a sumarizujte parametry dostupných přístrojů.
2. Na základě získaných poznatků navrhnete a realizujete zařízení, které umožní kvalitativní analýzu vybraných tekutin pomocí zařízení OceanOptics STS-UV Microspectrometer [3] jako detektoru. Pro zvolený zdroj záření a vybrané tekutiny navrhnete mechanické uspořádání, kyvetu a optickou cestu, kterou následně realizujete pomocí technologie 3D tisku. Vypracujte metodiku analýzy s využitím software SpectraSuite od firmy Ocean Optics.
3. Vyberte vhodné typy tekutin a otestujte pomocí nich funkčnost vašeho řešení. Výsledky kriticky zhodnoťte a navrhnete další možná vylepšení.

Seznam doporučené literatury:

- [1] NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P.: Spektrometrické analytické metody. Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
[2] Bartovský, T.: Infračervené analyzátory plynů, Automa 10/2013, URL: http://www.automa.cz/Aton/FileRepository/pdf_articles/10739.pdf
[3] OceanOptics, STS-UV Microspectrometer, URL: <https://www.gmp.ch/pdf/OCO/STS-Tech-Sheet.pdf>

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Adam Bouřa, Ph.D., katedra mikroelektroniky FEL

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **06.02.2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: _____

Platnost zadání bakalářské práce: **30.09.2021**

Ing. Adam Bouřa, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

prof. Ing. Pavel Hazdra, CSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

prof. Mgr. Petr Páta, Ph.D.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

Datum převzetí zadání

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce Ing. Adamu Bouřovi, Ph.D., za jeho trpělivost, lidský přístup a cenné rady, které mi poskytl.

Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům a sestře za neocenitelnou podporu během celého studia.

Nakonec bych chtěl poděkovat svým spolužákům z vysoké školy, zejména Il-daru Raupovovi, Iakovu Elistratovovi a Tomáši Zámostnému za morální podporu, která pomohla překonat všechny překážky na dlouhé cestě k odevzdání této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně, a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu.

V Praze, 14. srpna 2020

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá realizací UV-VIS spektrofotometru pro analýzu tekutin pomocí zařízení STS-UV Microspectrometer jako detektoru. Abychom toto zařízení mohli postavit, museli jsme se seznámit s problematikou optické spektrometrie, zejména molekulové absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti. Teoretická část práce shrnuje poznatky o základních fyzikálních principech spektroskopie, metodách spektrometrické analýzy a k tomu potřebné instrumentaci. Využitím veškerých nabytých znalostí, v praktické části navrhne a realizujeme UV-VIS spektrofotometr a provedeme jeho testování na vybraných tekutinách. Výstupem této práce je funkční spektrometrický přístroj, který umožňuje provádět kvantitativní, případně kvalitativní analýzu v UV-VIS spektrální oblasti.

Klíčová slova: UV-VIS spektrometrie, spektrofotometr, analýza tekutin

Školitel: Ing. Adam Bouřa, Ph.D.
Praha, Technická 2, B2-s141b

Abstract

This bachelor's thesis deals with the realization of UV-VIS spectrophotometer for fluid analysis using STS-UV Microspectrometer as a detector. In order to construct it, we had to get acquainted with the problematics of optical spectrometry, particularly with UV-VIS molecular absorption spectrometry. The theoretical part of this thesis summarizes basic physical principles of spectroscopy as well as spectrometric analytical methods and instrumentation. Using the acquired knowledge we have designed and implemented the UV-VIS spectrophotometer, that have been tested on selected fluids afterwards. The result of this bachelor's thesis is a functional spectrometric device that enables qualitative and quantitative analysis in the UV-VIS spectrum range.

Keywords: UV-VIS spectroscopy, spectrophotometer, fluid analysis

Title translation: UV-VIS spectrophotometer for fluid analysis

Obsah

1 Úvod	1	6.2.2 Evolution 350 UV-Vis	38
2 Základní fyzikální principy	3	7 Navrh a realizace UV-VIS spektrofotometrů	39
2.1 Elektromagnetické záření	3	7.1 Detektor STS-UV	
2.2 Kvantová teorie a kvantování energie	5	Microspectrometer	39
3 Molekulová spektroskopie	7	7.2 Výběr zdroje záření	40
3.1 Absorpční spektroskopie	8	7.2.1 Chirana Sirius R02	40
3.1.1 Molekulová absorpční spektroskopie v UV-VIS oblasti .	10	7.2.2 Navrh a realizace LED driveru	42
4 Instrumentace v optické spektrometrii	13	7.3 Navrh a realizace mechanického uspořádání	44
4.1 Zdroje záření	13	7.3.1 Blok s optickou cestou a detektorem	44
4.1.1 Zdroje záření v UV-VIS oblasti	14	7.3.2 Blok se zdrojem záření	46
4.2 Detektory záření	19	7.4 Výběr kyvety	47
4.2.1 Detektory záření v UV-VIS oblasti	19	7.5 Výběr chemikálií a rozpouštědla	48
4.3 Selektory vlnových délek	21	8 Testování	49
4.3.1 Monochromatory	22	9 Výsledky měření a návrh dalších vylepšení	53
4.3.2 Polychromátory	23	10 Závěr	55
4.3.3 Filtry	23	Literatura	57
4.4 Kyvety	24	A Výroba desky plošných spojů	61
4.5 Spektrometry v oblasti UV-VIS	25	B Měření absorpce a kalibrační křivka	65
4.5.1 Jednopaprskové spektrometry	25	C Kompletní uspořádání spektrofotometru	69
4.5.2 Dvoupaprskové spektrometry	26		
5 Aplikace UV-VIS spektrometrie k kvalitativní a kvantitativní analýze	29		
5.1 Absorbující specie a interpretace spektra	29		
5.2 Vliv rozpouštědla	31		
5.3 Kvalitativní analýza	32		
5.4 Kvantitativní analýza	32		
5.4.1 Metoda kalibrační křivky a výběr vlnové délky	32		
5.4.2 Metoda standardního přídatku	33		
5.4.3 Vicesložková analýza	34		
6 Komerčně dostupné UV-VIS spektrofotometry	35		
6.1 Spektrofotometry firmy Metash .	35		
6.1.1 UV-6100 UV/VIS	35		
6.1.2 UV-8000ST Double Beam UV/VIS	36		
6.2 Spektrofotometry firmy Thermo Scientific	36		
6.2.1 Genesys 10S UV-Vis	37		

Obrázky

2.1 Elektromagnetická vlna [36]	4	6.2 Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer [31]	37
2.2 Spektrum elektromagnetického záření [3]	5	6.3 Evolution 350 UV-Vis Spectrophotometer [32]	38
3.1 Typy rozptylu [4]	8	7.1 STS-UV Microspectrometer [33]	39
3.2 Účinek polychromatického záření na platnost Lambertova-Beerova zákona [8]	9	7.2 Zářič Chirana Sirius R02 [34]	41
3.3 Diagram elektronových přechodů [9]	11	7.3 Emisní spektrum rtuťové výbojky	41
4.1 Spektroskopické přístrojové vybavení [10]	13	7.4 Zapojení obvodu se dvěma LED	42
4.2 Emitované spektrum wolframové žárovky [11]	14	7.5 Rozmístění součástí a jejich propojení	43
4.3 Halogenové žárovky [13]	14	7.6 LED driver	43
4.4 Deuteriová výbojka [12]	15	7.7 3D model bloku s optickou cestou a detektorem	44
4.5 Schéma výbojky s dutou katodou [14]	16	7.8 3D model krytu	45
4.6 Tříhladinový a čtyřhladinový laser [15]	17	7.9 Vytištěný blok s optickou cestou a detektorem	45
4.7 Dusíkový laser MNL 330 [16]	18	7.10 3D model bloku s zdrojem záření	46
4.8 Fotonásobiče společnosti Hamamatsu [17]	20	7.11 3D model krytu zdroje	46
4.9 Zapojení fotodiody do obvodu [18]	21	7.12 Vytištěný blok se zdrojem záření	47
4.10 Monochromator typu Czerny-Turner využívající difrakční mřížku [21]	22	7.13 Spektrofotometrické standardní kyvety objemem 4,5 ml [35]	48
4.11 Princip interferenčního filtru [22]	24	8.1 Spektrum LED driveru	49
4.12 Příklady komerčně dostupných kyvet [23]	24	8.2 Spektrum vody	50
4.13 Schema jednopaprskového spektrometru [26]	25	8.3 Spektrum roztoku síranu měďnatého s koncentrací 50 g/L ve vodě	50
4.14 Schema diode-array spektrometru [24]	26	8.4 Roztoky síranu měďnatého o různé koncentraci	51
4.15 Schema dvouprskového spektrometru [25]	27	A.1 Vytištěný motiv spoje	61
5.1 Absorpční maxima vybraných chromoforů [27]	30	A.2 Krabice pro UV osvit	62
5.2 Absorpční hrany různých rozpouštědel [27]	31	A.3 Osvícená deska	62
5.3 Typická kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [28]	33	A.4 Leptaní desky v leptacím roztoku	63
6.1 UV-6100 UV/VIS Spectrophotometer [31]	36	A.5 Proces pájení	63
		B.1 Výběr režímu měření	65
		B.2 Výběr režímu měření absorpce	65
		B.3 Nastavení parametrů měření	66
		B.4 Uložení spektra referenčního vzorku	66
		B.5 Uložení temného proudu	67
		B.6 Kalibrační křivka síranu měďnatého	67
		C.1 Kompletní uspořádání spektrofotometru	69

Tabulky

6.1 Parametry spektrofotometru UV-6100 UV/VIS [29]	35
6.2 Parametry spektrofotometru UV-8000ST Double Beam UV/VIS [30]	36
6.3 Parametry spektrofotometru Genesys 10S UV-Vis [31]	37
6.4 Parametry spektrofotometru Evolution 350 UV-Vis [32]	38
7.1 Parametry detektoru STS-UV Microspectrometer [33]	40



Kapitola 1

Úvod

O přínosu spektrometrických metod pro stále se rozvíjející svět kolem nás nemůže být pochyb. Měření spektra hraje významnou roli, například, ve vzniku současné teorie stavby atomu a studiu složení vzdalých objektů ve vesmíru. V současné době se analytické techniky využívají prakticky ve všech vědeckých oborech: v astronomii, chemii, medicíně, stejně jako v geologii, archeologii a kriminalistice.

Abychom různá měření mohli provádět, používáme přístroj obvykle nazývaný spektrometr, jenž má za účel detekovat a vyhodnocovat dopadající záření. Metodu spočívající v hodnocení absorpce analytu v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) oblasti spektra nazýváme spektrofotometrie. Odpovídající této technice přístroje jsou označovány jako spektrofotometry.

Cílem této práce je seznámit čtenáře se základy molekulové absorpční spektrometrii v UV-VIS oblasti, provést podrobnou rešerši komponent spektrometrických přístrojů a na základě získané informace navrhnout, realizovat a ověřit funkčnost UV-VIS spektrofotometru pro analýzu tekutin.

Kapitola 2

Základní fyzikální principy

2.1 Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření definujeme jako příčné postupné vlnění. Skladá se z elektrického a magnetického pole, jenž jsou neoddělitelně spjaté. Elektrická složka je představena vektorem intenzity elektrického pole E . Magnetická složka je tvořena vektorem magnetické indukce B . Vektory E a B jsou na sebe navzájem kolmé a jsou navíc kolmé ke směru šíření vlny.

Veličina která popisuje amplitudu a směr šíření elektromagnetické vlny se nazývá Poyntingův vektor. Poyntingův vektor svým směrem představuje směr toku energie a svojí absolutní hodnotou - plošnou hustotu výkonu přenášeného elektromagnetickým polem. Značíme ho písmenem S , má jednotku $\frac{W}{m^2}$ a je dán rovnicí 2.1. [1]

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} \cdot \vec{E} \times \vec{B} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (2.1)$$

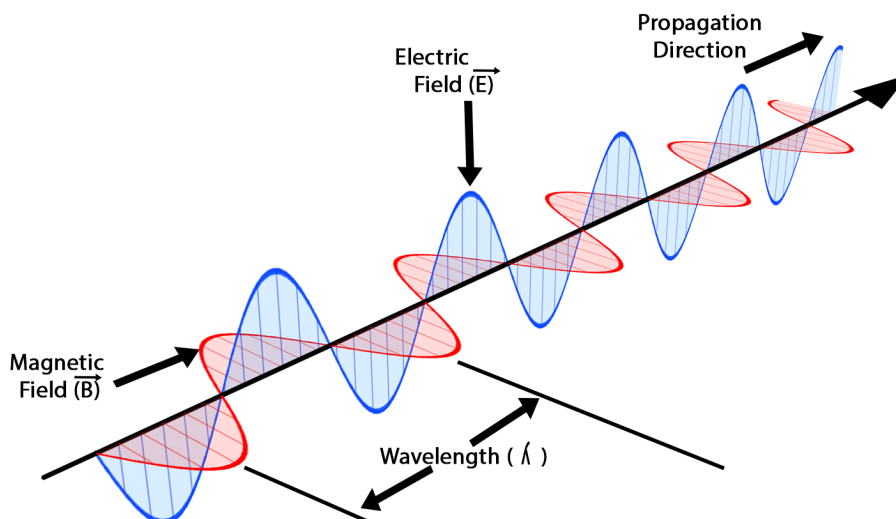
kde konstanta $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{H}{m}$ je permeabilita vakua. [2] Míra silových účinků magnetického pole je popsána vektorovou veličinou, kterou nazýváme intenzita magnetického pole. Označuje se písmenem H a má jednotku $\frac{A}{m}$.

Platí, že obě složky, elektrická a magnetická, jsou ve fázi. To znamená, že oni nabývají svých nejvyšších hodnot ve stejném časovém okamžiku. Jinými slovy, mají stejnou frekvenci ν definovanou rovnicí 2.2.

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.2)$$

kde konstanta $c = 3 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$ je rychlost světla ve vakuu. [2] Vlnová délka λ je nejmenší vzdálenost mezi dvěma korespondujícími body, tj. body které v daném časovém okamžiku jsou ve fázi.

Electromagnetic Wave



Obrázek 2.1: Elektromagnetická vlna [36]

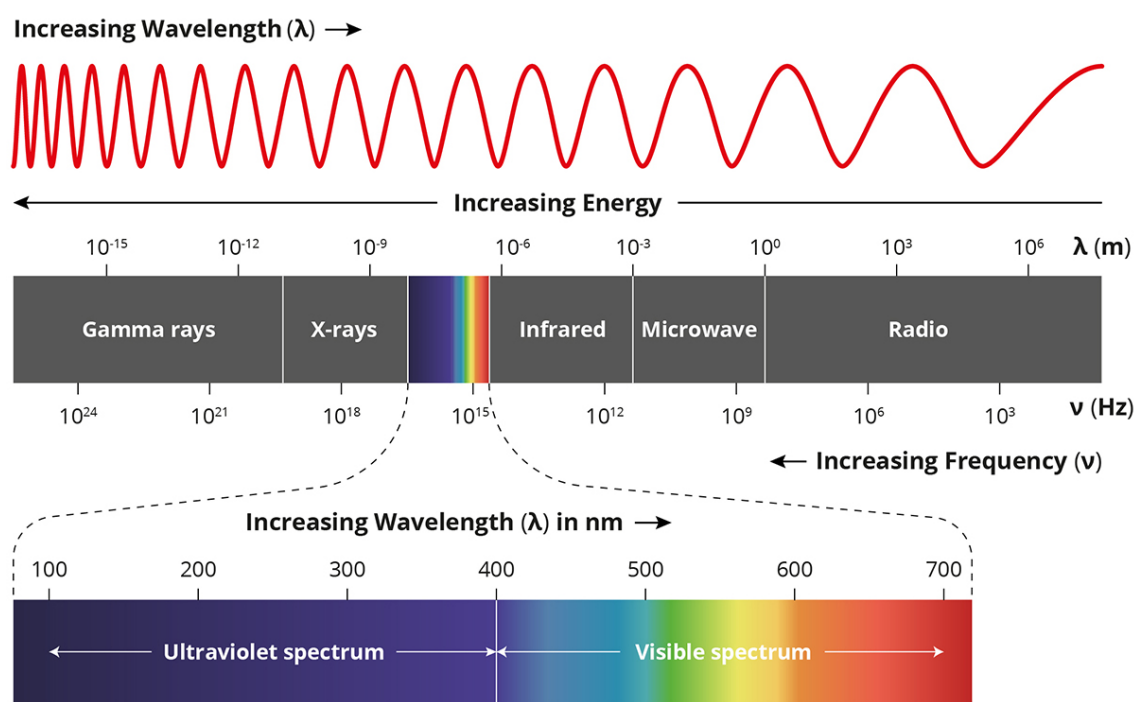
Rovnice 2.3 [2] udává vztah pro hustotu energie elektromagnetického pole, pokud okamžité hodnoty elektrického a magnetického pole jsou respektivě E a H :

$$w = w_e + w_m = \frac{1}{2}\epsilon_0 E^2 + \frac{1}{2}\mu_0 H^2 \quad (2.3)$$

kde konstanta $\epsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12} \frac{F}{m}$ je permitivita vakua. Veličina w je energie, která je uložena rovnoměrně mezi elektrickým a magnetickým polem v jednotkovém objemu.

Nehledě na to, že elektromagnetické záření po celém spektru má stejný matematický popis, obvykle rozdělujeme ho podle vlnové délky. Hranice mezi jednotlivými druhy záření nejsou ostré, ale související s nimi molekulární procesy jsou zcela odlišné. Od nejvyšší do nejnižší vlnové délky rozlišujeme:

- Rádiové záření
- Mikrovlny
- Infračervené záření
- Viditelné světlo
- Ultrafialové záření
- Rentgenové záření
- Záření gama



Obrázek 2.2: Spektrum elektromagnetického záření [3]

2.2 Kvantová teorie a kvantování energie

Zavedené Isaacem Newtonem zákony klasické mechaniky byly velice úspěšně použity při popisu chování planet či objektu, se kterými se člověk setkává běžně kolem sebe. Ovšem, s rostoucím počtem experimentálních dat na konci 19. století se ukázalo, že klasická mechanika selhává při popisu subatomárních částic.

Na začátku 20. století německý fyzik Max Planck odvodil teorii záření černého tělesa a postuloval, že atomy a molekuly mohou nabývat pouze diskrétních hodnot energie. Toto omezení se nazývá kvantování energie. Na první pohled to leží v protikladu k každodennímu pozorování jevů ve světě kolem nás. Nicméně, je chybou říct, že zákony kvantové a klasické mechaniky jsou ve sporu. [6][7]

Z kvantového hlediska světlo považujeme za tok částic, které nazýváme fotony. Každý foton má energii $h\nu$, kde $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ Js je Planckova konstanta a ν je frekvence. Energie, která je nutná pro přechod molekuly z nižší energetické hladiny E_1 do vyšší E_2 je dána vztahem [7]:

$$h\nu = \frac{hc}{\lambda} = E_2 - E_1 \quad (2.4)$$

Pokud energie je emitována ve formě záření, rovnice 2.4 stále platí. Molekula spadá na nižší energetickou hladinu a vyzařuje foton o příslušné frekvenci.

Kapitola 3

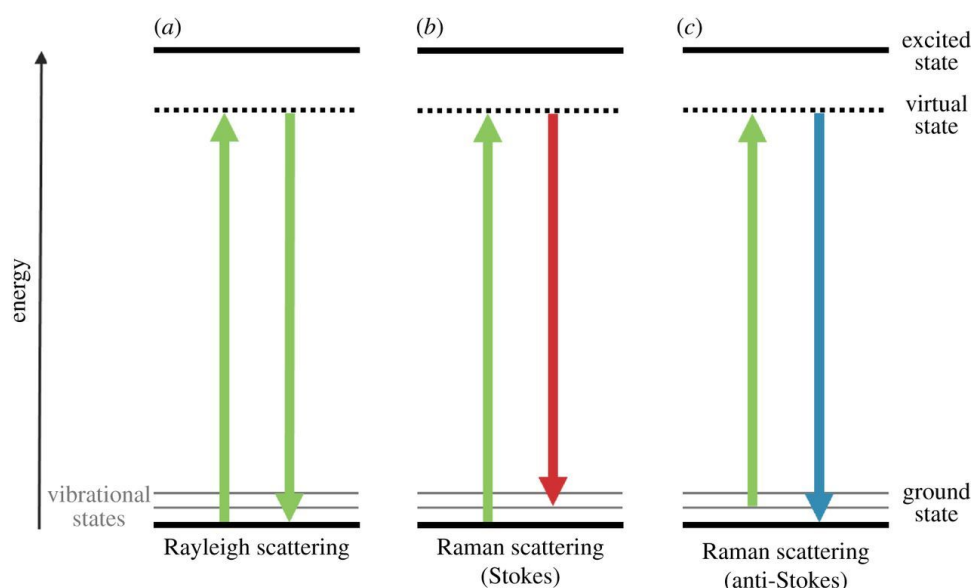
Molekulová spektroskopie

Spektroskopie je oblast fyziky, která se zabývá studiem spektra elektromagnetického záření. Pod tímto pojmem si také můžeme představit obor, studující interakci mezi zářením a hmotou. Spektroskopické metody jsou založené na měření absorbovaného, emitovaného nebo rozptýleného záření. Spektrum tedy představuje zobrazení intenzity záření v závislosti na parametrech, které charakterizují energii fotonu.

Různé typy spekter mají některé společné vlastnosti. V emisní spektroskopie molekula podléhá přechodu z vyššího energetického stavu E_2 do nižšího E_1 , přičemž přebytek energie je emitován jako foton. Sledujeme tedy závislost toku emitovaného záření na vlnové délce.

Objektem absorpční spektroskopie je studium čisté absorpce dopadajícího záření. Říkáme čistá protože uvažujeme skutečnost, že pokud je analyt ozářován, proběhne nejen absorpce ale i emise. Detektor tedy měří rozdíl mezi absorbovaným a emitovaným zářením. V tom případě, kdy vlnová délka emitovaného záření je odlišná od délky záření excitačního, jedná se o fotoluminiscenční spektroskopie.

Po interakci záření a vzorku můžeme sledovat změnu směru toku fotonu v důsledku odrazu nebo pružného rozptylu. Některé interakci vedou k nepružnému rozptylu, jinak řečeno, ke změně vlnové délky fotonů. V Ramanově spektroskopii sledujeme změnu energetického stavu molekul prostřednictvím pozorování frekvenci fotonů, rozptýlených molekulami. V případě když dopadající foton nějakou energii molekulě předá, a pak je pozorován při nižší energii, mluvíme o Stokesově rozptylu. Naopak, pokud fotony od molekuly energii přijímají, objevuje se záření o vyšší frekvenci. Toto záření označujeme jako anti-Stokesův rozptyl. Pokud je záření rozptýleno bez změny frekvence, mluvíme o Rayleighově rozplylu. [5] [6]



Obrázek 3.1: Typy rozptylu [4]

Metody spektrometrie se dá rozdělit podle různých kritérií:

- Z hlediska oblasti elektromagnetického záření (ultrafialové záření, viditelné světlo, infračervené záření atd.)
- Z hlediska měřicí techniky (emisní, absorpční, Ramanová atd.)
- Z hlediska částic, které interagují s zářením (atomová, molekulová)

V rámci této bakalářské práce pro nás ale nejvyšší význam bude mít molekulová absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti.

3.1 Absorpční spektroskopie

Každý analyt je schopen absorbovat elektromagnetické záření na určitých vlnových délkách. Vyhodnotit absorpci můžeme tedy tím způsobem, že porovnáme intenzitu vnějšího záření před a po průchodu měřeným vzorkem. Intenzita prošlého záření závisí na látkové koncentraci c a délce vzorku absorbujícího analytu b . Podle Lambertova-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon bc \quad (3.1)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, obvyklé má jednotku $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. [7]

Transmittance T neboli propustnost je dána vztahem:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.2)$$

kde I_0 je intenzita záření před interakcí se vzorkem a I je intenzita prošlého záření (také se tomu říká zářivý tok). [7]

Absorbance A je logaritmicky vztažena k transmitanci:

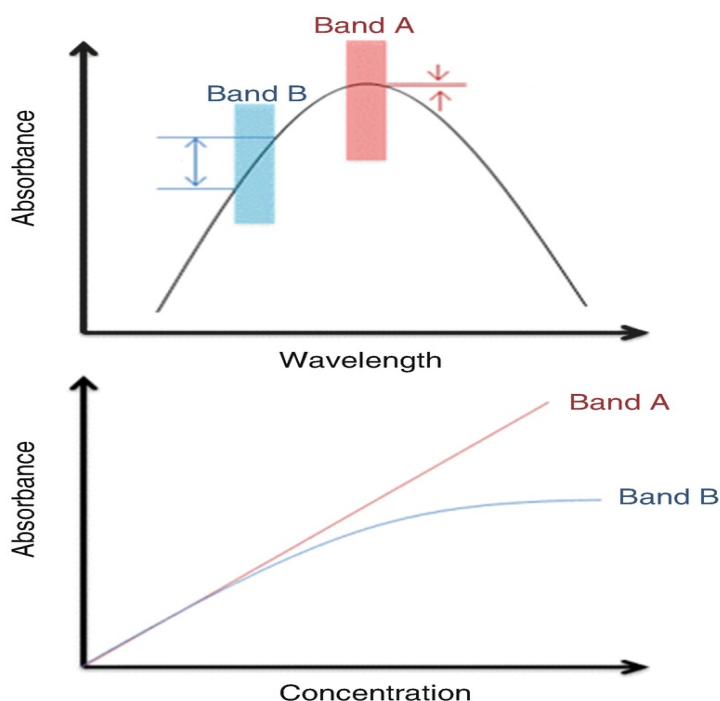
$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.3)$$

Lambertův-Beerův zákon se také používá pro analýzu n -složkové směsi. Celková absorbance je součtem příspěvků všech komponentů systému na jedné vlnové délce [7]:

$$A_\lambda = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots + \varepsilon_n b c_n \quad (3.4)$$

V skutečnosti platnost Lambertova-Beerova zákona může být omezená kvůli častým odchylkám od přímé úměrnosti mezi absorbancí a koncentrací. Některé odchylky jsou fundamentální a představují reální omezení platnosti absorpčního zákona. Kromě toho, nepřesnost může být způsobena podmínkami experimentu, například:

- Lambertův-Beerův zákon platí výhradně pro měření s monochromatickým zdrojem záření. Polychromatické zdroje záření se používají v kombinaci s mřížkou nebo filtrem.
- Nastavení vlnové délky je nutno provádět s velkou přesností, neboť dokonce i malá chyba může způsobit značnou nepřesnost v stanovení absorpce. Nejlépe proto je zvolit vlnovou délku v maximu absorpčního pásu, v němž je nejmenší změna molárního absorpčního koeficientu.



Obrázek 3.2: Účinek polychromatického záření na platnost Lambertova-Beerova zákona [8]

Další nepřesnosti mohou být vyvolány vlastnostmi analytu, například:

- Vzájemná interakce složek analytu
- Účast v asociaci, disociaci nebo reakci s rozpouštědlem
- Změna indexu lomu v závislosti na koncentraci.

Absorpční spektrum je závislost absorpance případně transmitance na vlnové délce nebo na jiných parametrech dopadajícího záření. Graf molárního absorpčního koeficientu ε jako funkci vlnové délky je nezávislý na koncentraci. Každá molekula má svůj příznačný spektrum a to se používá k identifikaci zkoumaného vzorku.

Atomová absorpční spektra mají čárový charakter, tj. jednotlivé přechody se ve spektru projevují jako velmi úzké čáry. Například, když ozáříme nějaké medium s atomy plynu polychromatickým zářením, tak výsledné absorpční spektrum bude tvořeno velmi úzkými izolovanými liniemi. Přechody mezi dvěma různými orbitály nazýváme elektronové přechody. Měření atomových absorpčních spekter jsou instrumentálně složitá, k tomu se používají velmi úzké monochromatické zdroje záření.

Molekulová absorpční spektra jsou tvořena pásy, které se často vzájemně překrývají. V molekulách se kromě elektronových přechodů projevují vibrační a rotační přechody díky většímu počtu energetických hladin. Vibrační stavy souvisejí s chemickou vazbou která spojuje atomy do jedné molekuly. Ve svém nejnižším vibračním stavu se jádra nacházejí v pozici rovnováhy. Pokud dojde k elektronovému přechodu, začnou na jádra působit jiné síly a ty budou vibrovat kolem svých nových pozic rovnováhy. Vibrační a rotační strukturu spektra elektronových přechodů můžeme pozorovat jen v plynném stavu. Rozdíl energie mezi vibračními stavy je podstatně menší než mezi elektrickými hladinami. U plynů můžeme také rozlišit jemnou strukturu rotačních přechodů. Celková energie E souvztažena s jednou molekulou je dána vztahem:

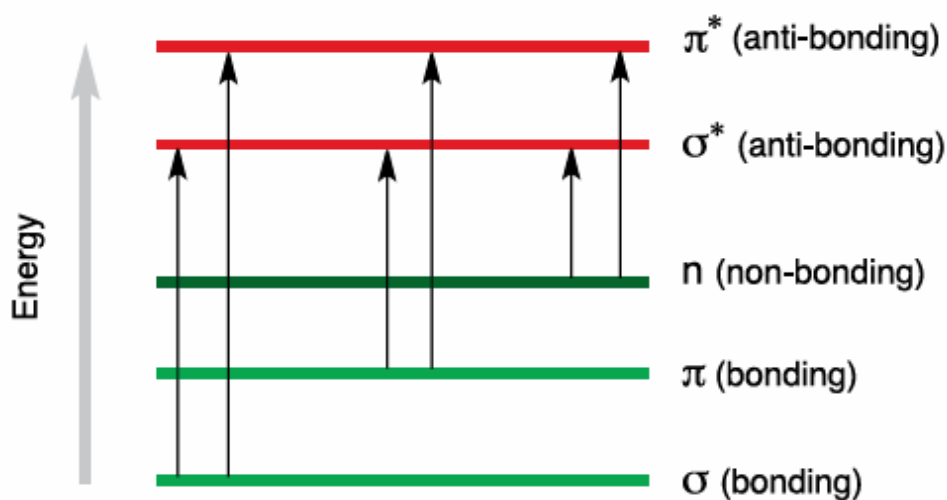
$$E = E_{\text{elektronová}} + E_{\text{vibrační}} + E_{\text{rotační}} \quad (3.5)$$

kde $E_{\text{elektronová}}$ je energie přechodů elektronů na excitovanou elektronovou hladinu, $E_{\text{vibrační}}$ je energie atomových vibrací molekuly, $E_{\text{rotační}}$ je energie souvztažena s rotací molekuly kolem svého gravitačního centru. [5][6][7][20]

■ 3.1.1 Molekulová absorpční spektroskopie v UV-VIS oblasti

Absorpce v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) a infračervené (IR) oblasti spektra je široce používána k identifikaci organických, neorganických a biochemických látek. UV-VIS absorpční spektroskopie je jedna z nejběžnějších technik kvantitativní analýzy v chemických a klinických laboratořích.

Molekulová absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti je spojena s přechody valenčních elektronů na excitovanou elektronovou hladinu. Mezi molekulovými orbitaly jsou ale povolené pouze vybrané přechody.



Obrázek 3.3: Diagram elektronových přechodů [9]

Rozlišujeme základní 4 typy elektronových přechodů:

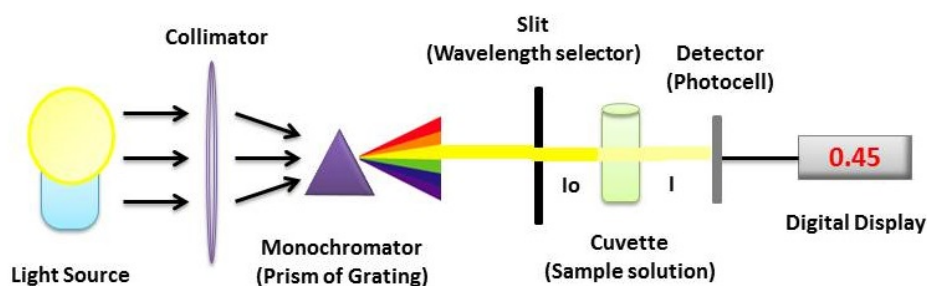
- Přechody $\sigma \rightarrow \sigma^*$ představují největší rozdíl energie mezi vazebnými a antivazebnými elektrony. Díky tomu se v absorpčním spektru projevují ve vákuové UV oblasti (pod 180 nm). Prakticky nepoužívané vzhledem ke krátkým vlnovým délkám (nutno pracovat ve vakuu).
- Přechody $n \rightarrow \sigma^*$ můžeme pozorovat ve sloučeninách obsahující ne vazebné elektrony, například atomy N, S, Br, I (kolem 200 nm).
- Přechody $\pi \rightarrow \pi^*$ vyskytují u funkčních skupin obsahujících π elektronu, např. konjugované systémy dvojných vazeb. Polohy absorpčního maxima se s rostoucí konjugací dvojných vazeb posouvají k větším vlnovým délkám.
- Přechody $n \rightarrow \pi^*$ objevují se ve spektru pro elektrony ne vazebných elektronových párů, např. karbonylová skupina. Energie přechodu $n \rightarrow \pi^*$ je silně ovlivněna typem atomu nesoucím elektronový pár. [5][20]

Kapitola 4

Instrumentace v optické spektrometrii

Základní části přístrojů používaných pro spektroskopická měření v UV-VIS a IR oblasti jsou si velmi podobné. Tyto části jsou označovány jako optické přístroje i přesto, že lidské oko detekuje pouze záření ve viditelné oblasti. Základní části společné pro absorpční, emisní a luminiscenční měření jsou:

- Zdroje záření
- Disperzní soustavy
- Kyvety
- Detektory záření
- Jednotky pro zpracování elektrického signálu



Basic Instrumentation of a Spectrophotometer

Obrázek 4.1: Spektroskopické přístrojové vybavení [10]

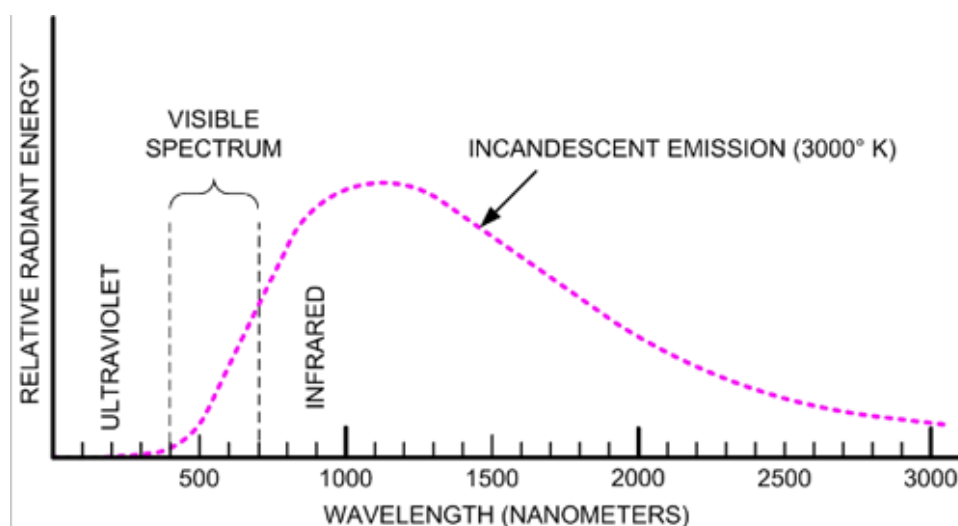
4.1 Zdroje záření

Zdroje záření obecně musí splňovat dvě podmínky. První je časová stabilita emitovaného záření. Druhá je dostatečně velká intenzita v požadované oblasti vlnových délek. Tyto požadavky splňuje velké množství různých zdrojů, z nichž se omezíme na ty nejčastěji používané v UV-VIS spektrometrii.

4.1.1 Zdroje záření v UV-VIS oblasti

■ Wolframové žárovky

Emitují při teplotách kolem 3000 K spojité záření v rozsahu 350 až 3500 nm s maximem intenzity v blízké IR-oblasti (≈ 1200 nm). Využívají se pro spektrometrická měření ve viditelné (případně blízké infračervené) oblasti spektra. [5][7]



Obrázek 4.2: Emitované spektrum wolframové žárovky [11]

■ Halogenové žárovky

Halogenová žárovka je speciální žárovka, která spolu s wolframovým vláknem obsahuje také sloučeninu halového prvku (nejčastěji jodu), uzavřených v baňce z křemenného skla. Tato žárovka má oproti běžné žárovce vyšší teplotu vlákna a tedy vyšší intenzitu zářivých toků. Křemenné sklo na rozdíl od křemičitého propouští ultrafialové záření a to od vlnové délky cca 240 nm. [5][7]



Obrázek 4.3: Halogenové žárovky [13]

■ Xenonové výbojky

Jako alternativní zdroj záření se používají xenonové výbojky, které pokrývají celou UV-VIS spektrální oblast (190 až 1000 nm). Zářivý tok se vytváří vznikem výboje mezi dvěma elektrodami, které jsou uzavřené v baňce z křemenného skla naplněné inertním plynem (xenonem). [5][7][20]

■ Deuteriové a vodíkové výbojky

Jako zdroj spojitého záření v UV-VIS oblasti se používají deuteriové a vodíkové výbojky. Produkují zářivý tok v spektrálním rozsahu 160-380 nm. Částo se používají v kombinaci s jinými zdroji pro pokrytí celého UV-VIS spektra. V současnosti se deuteriové výbojky využívají více než vodíkové jelikož mají mnohem vyšší intenzitu záření. Sestávají ze kovové elektrody a oxidem pokrytého vlákna mezi nimiž probíhá elektrický výboj. Výbojem dochází k excitaci molekuly deuteria D_2 , její následnému štěpení a emisi fotonu o příslušné vlnové délky. [5][7][20]



Obrázek 4.4: Deuteriová výbojka [12]

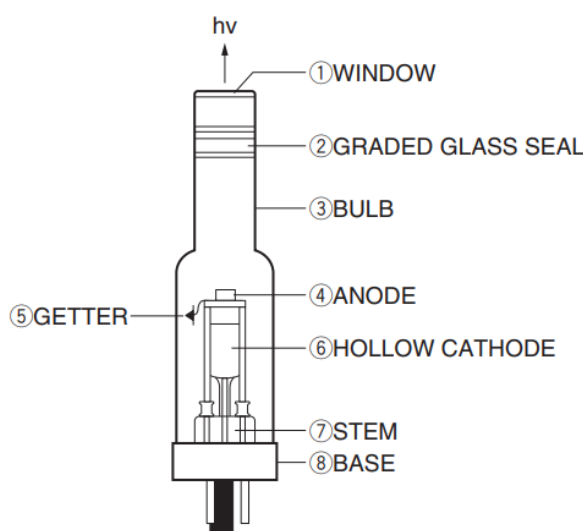
Vyše uvedené zdroje produkují spojitě záření v širokém spektrálním rozsahu, avšak ve spektrometrických měřeních se také používají čárové zdroje záření. Produkují omezený počet úzkých spektrálních čar. Jsou to například:

- **Rtuťové výbojky** (mají převládající emisní čáru na 254 nm). [7]

■ Výbojky s dutou katodou

Nejčastěji používaným zdrojem primárního záření v atomové absorpční spektrometrii je výbojka s dutou katodou (angl. hollow cathode lamp). Dutá válcová katoda je vyrobena z čistého kovu, k jehož stanovení se výbojka používá. V případě kovů s vysokou teplotou tání může být katoda vyrobena z jiného materiálu pokrytého tenkou vrstvou stanovovaného

prvku. Anoda se obvykle vyrábí z wolframu nebo jiného kovu s vysokým bodem tání. Výbojka je plněná inertním plynem (argon, neon) o tlaku 100-200 Pa. Mezi katodou a anodou vložením napětí dochází k ionizaci plynu. Kationy plynu bombardují povrch katody s energií dostatečnou k uvolnění atomů kovu a tím vytváří oblako atomů. Tento proces se nazývá rozprašování. Atomy kovu nacházející v excitovaném stavu vyzárají foton a postupně se vrací zpět do základního stavu. [5][7][20]



Obrázek 4.5: Schéma výbojky s dutou katodou [14]

■ Bezelektrodové výbojky

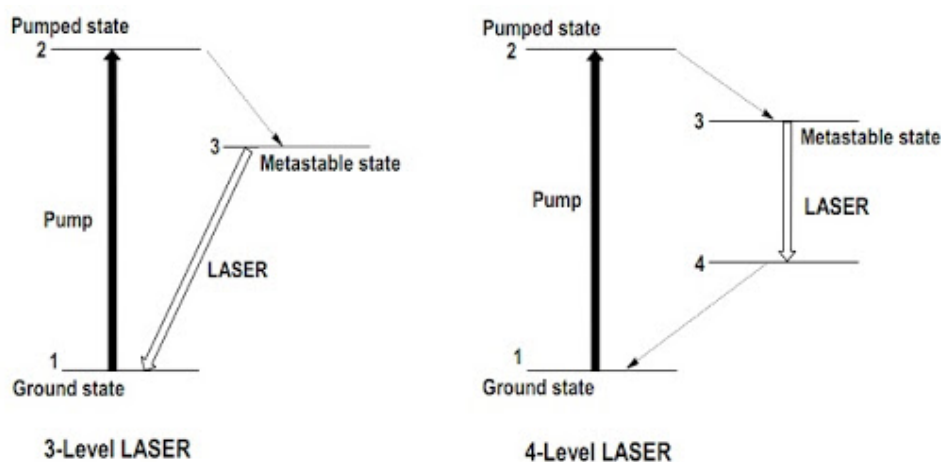
Bezelektrodová výbojka (angl. electrodeless-discharge lamp) produkuje úzké spektrální čáry s intenzitou o jeden řád vyšší než výbojky s dutou katodou. Tato výbojka se skládá z uzavřené trubice naplněné vhodným množstvím stanovovaného prvku nebo jeho halogenidu ve směsi s inertním plynem. Okolo trubice je navinutá cívka, která generuje intenzivní radiofrekvenční nebo mikrovlnné záření. Působením elektromagnetického pole se urychlují ionty plynu a dochází k excitaci atomů kovu. Bezelektrodové výbojky se využívají především pro prvky, jejichž emisní čáry jsou v oblasti pod 220 nm (např. selen, arsen). [5][7][20]

■ Lasery

Lasery (z angl. *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) mají řádu specifických charakteristik, které umožňují jejich využití ve výzkumných projektech. Produkují monochromatický, koherentní, úzký svazek s vysokou intenzitou záření. Princip laseru spočívá v zesilování optického záření. První podmínkou je, aby vyšší energetická hladina byla obsazena více než nižší energetická hladina. V termodinamické rovnováze to platí právě naopak, a proto musíme dosáhnout populační inverze, tj. takového stavu kdy se do vyššího energetického stavu dostalo

více molekul. Splníme-li tuto podmínku, pak bude system chovat jako zesilovač optického záření. Prostředí s populační inverzí označujeme jako aktivní prostředí.

Ve skutečnosti lasery potřebují minimálně tři nebo lépe čtyři energetické hladiny k dosazení populační inverze. Proces se označuje jako buzení (z angl. *pumping*) a dosahuje se působením elektromagnetického záření, chemickou reakcí nebo využitím elektrického proudu. V případě tříhladinového laseru elektrony jsou buzením excitovány do přechodního stavu 2, nezářivým přechodem zaplňují metastabilní (s dostatečně dlouhou dobou života) hladinu 3 a mezi hladinami 3 a 1 se ustavuje populační inverze.



Obrázek 4.6: Tříhladinový a čtyřhladinový laser [15]

Toto schema je nevýhodné tím, že laserový přechod končí v základním stavu, který je vždy silně obsazený. Proto potřebujeme buď větší energii buzení nebo použijeme čtyřhladinové uspořádání, ve kterém nad základním stavem 1 leží ještě jedna hladina 4. Tato hladina není obsazená na počátku, a tedy při menším buzení dojde k populační inverzi mezi hladinami 3 a 4. Kromě toho, populační inverzi můžeme udržet za podmínky rychlého vyprázdnění dolní laserové hladiny 4. Díky tomu čtyřhladinové schéma je vhodné pro spojitě pracující lasery.

Existuje velké množství dostupných typů laserů, které se dá rozdělit podle několika kritérií. Podíváme se na některé typy laserů lišících se materiálem aktivního prostředí. [5][6][7][20]

■ Pevnolátkové lasery

Pevnolátkové lasery představují skupinu s řadou použitelných charakteristik. Mají kompaktní rozměry, vysokou hustotu aktivních částic a dobrou laditelnost výstupního záření. Mezi lasery s pevnolátkovým aktivním prostředím patří např. rubinový laser, jehož aktivním médiem je krystal Al_2O_3 (korund) s příměsí Cr^{3+} . Nejrozšířenější pevnolátkové lasery současnosti jsou Nd:YAG lasery.

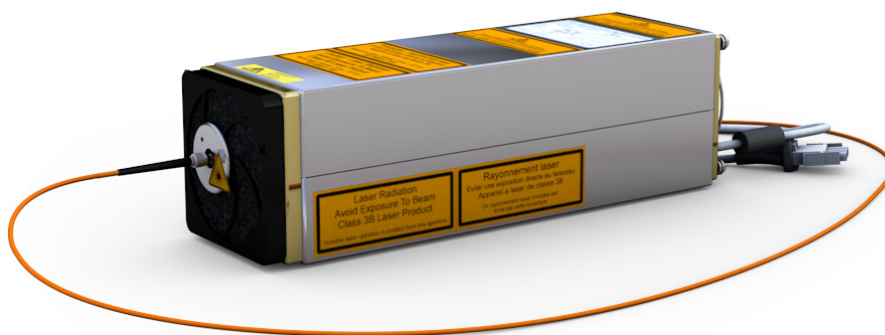
Emitují záření v NIR (blízké infračervené oblasti) ale mohou také generovat záření o vlnové délce 532 nm. [6][7]

■ Plynové lasery

Další skupinu tvoří plynové lasery, které jako aktivní prostředí mají směs plynových komponent, z nichž pouze jedna je aktivní. Běžně používaný je He-Ne laser, jehož buzení probíhá mezi hladinami neonu, helium slouží k vytvoření elektrického výboje. Emitují záření o vlnové délce 633 nm, což odpovídá červené barvě viditelného světla.

Argonový iontový laser jako aktivní medium obsahuje argon, kterým prochází elektrický výboj. Ionty Ar^{2+} a Ar^+ přechodem na nižší energetickou hladinu emitují tvrdé ultrafialové záření o 72 nm. Kromě toho se ve spektru projevují emisní čáry o 488 a 514 nm.

Dusíkový laser pracuje v pulsním režimu a má velkou účinnost stimulovaného přechodu. Generuje záření o vlnové délce 337 nm, což odpovídá blízké ultrafialové oblasti.



Obrázek 4.7: Dusíkový laser MNL 330 [16]

Excimerové lasery používají směs dvou vzácných plynů, ve kterých elektrickým výbojem vzniká takzvaný excimer. Excimer je spojení dvou atomů do molekuly, která okamžitě po vyzáření disociuje. Mezi excimerové lasery patří například XeCl^* laser generující záření o 308 nm., KrF^* laser s vlnovou délkou 249 nm. nebo ArF^* laser s vlnovou délkou 193 nm. [6][7]

■ Polovodičové lasery

Polovodičové lasery jsou založeny na vytvoření populační inverze na rozhraní p-n polovodičové diody. Tento typ laserů má vysokou účinnost a miniaturní rozměry v porovnání s jinými laserovými zdroji. Generují záření převážně v NIR oblasti a mají nejvyšší uplatnění v Ramanově spektroskopii. [6][7]

4.2 Detektory záření

Detektory záření slouží k detekci zářivého toku propuštěného nebo emitovaného vzorkem. Tyto zařízení detekují a převádí energii záření v jinou formu energie. Dnes je to nejčastěji energie elektrická, protože lze je velice přesně měřit a pak zpracovávat. Ideální detektor musí splňovat následující podmínky:

- Vysoká citlivost, tj. schopnost detektoru reagovat na malé zářivé toky.
- Široký pracovní rozsah, tj. rozsah vlnových délek, ve kterých detektor poskytuje významnou odezvu na dopadající záření.
- Nízká uroveň elektrického šumu. Šumem nazýváme nežádoucí časově proměnný signál, jenž detektor poskytuje i bez ozáření. Může být způsoben například nahodnými vlivy indikačního obvodu. Poměr střední hodnoty výstupního signálu k směrodatné odchylce šumu označujeme zkrátkou SNR (angl. *signal-to-noise ratio*).

Výstupní veličinu S (obvykle napětí nebo elektrický proud) vyjadřujeme vztahem

$$S = kI \quad (4.1)$$

kde k je citlivost detektoru, tj. odezva detektoru na jednotkový dopadající zářivý tok I . [7]

Existují různé typy detektorů používaných ve spektrometrických měřeních. Ty se dá rozdělit podle mnoha kritérií, pro naše účely ale bude vhodnější vydělit dvě základní skupiny [5][7][20] :

■ Fotonové detektory

Princip této skupiny detektorů je založen na fotoelektrickém jevu (emise elektronů povrchového materiálu v důsledku dopadu fotonů) nebo také na fotovodivosti (excitace elektronů do vyššího energetického stavu způsobující vodivost materiálu). Fotonové detektory se běžně využívají k detekci záření v UV-VIS a NIR oblasti, proto se na ně níže zaměříme.

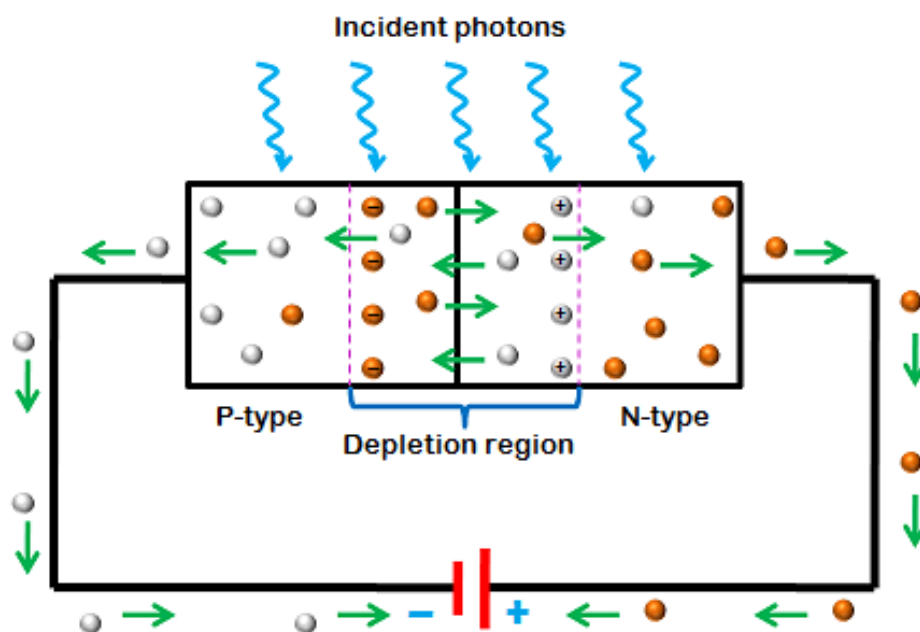
■ Tepelné detektory

Detektory této skupiny měří změnu teploty materiálu (někdy změnu objemu plynu) v důsledku absorpce elektromagnetického záření. Patří sem například pyroelektrické detektory, termočlánky a bolometry. Jelikož tepelné detektory pracují pouze v IR oblasti, nemají pro naše účely praktický význam.

4.2.1 Detektory záření v UV-VIS oblasti

■ Fotonásobiče

Fotonásobiče jsou založeny na vnějším fotoelektrickém jevu. Jejich konstrukce se skládá z fotokatody, anody a serií dynod, umístěných uvnitř



Obrázek 4.9: Zapojení fotodiody do obvodu [18]

■ Detektory s diodovým polem

Detektory s diodovým polem (angl. *diode-array detectors*) představují spojení mnoha křemíkových fotodiód na jediném mikročipu. Mezi výhody těchto detektorů patří kompaktní rozměry (v řadě jednotek mm) a velmi rychlá odezva, avšak v porovnání s fotonásobiči mají nižší citlivost. Nacházejí uplatnění ve spektrofotometrii, skenerech a polohových senzorech. [7][20]

■ Detektory CTD

Detektory CTD (angl. *charge-transfer device*) jsou plošné detektory, které poskytují informaci o spektru ve dvou dimenzích. Jednotlivé detekční elementy jsou na čipu umístěny ve řadách a sloupcích. Mají vysokou kvantovou účinnost, nízký šum a pokrývají celou UV-VIS oblast (0,1 až 1100 nm.). V současnosti se uplatňují v mikroskopii, optických dalekohledech a dalších zobrazovacích technologiích. [7][20]

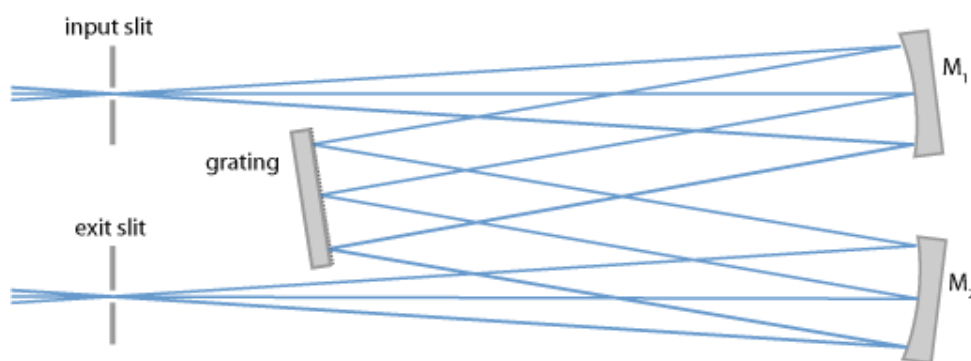
■ 4.3 Selektory vlnových délek

Spektrometry v ultrafialové a viditelné oblasti spektra jsou obvykle vybaveny dispenzním nebo nedisperzním systémem, jenž je základní optickou součástí přístroje. Tento systém se skládá z jednoho či více prvků, které slouží k prostorové separaci záření o určité vlnové délce. Díky tomu se výrazně zlepšuje selektivita a citlivost spektrometru. Kromě toho, výběrem úzkého spektrálního pásma snížíme riziko odchylky od Lambertova-Beerova zákona.

U kvalitních přístroju je toto spektrální pásmo tak úzké, že záření považujeme za monochromatické.

4.3.1 Monochromatory

Monochromátor je disperzní přístroj vybaveny difrakční mřížkou a využívá se k rozložení polychromatického záření na jednotlivé vlnové délky. Skládá se s vstupní štěrbinou, difrakční mřížky (v starších přístrojích se používal hranol) a výstupní štěrbinou. Rotací mřížky můžeme měnit vlnovou délku procházející výstupní štěrbinou. Efektivní šířka pásu udává rozmezí vlnových délek na výstupní štěrbině. Tato hodnota pohybuje kolem 20 nm pro levnější a kolem 1 nm pro dražší přístroje. Díky jednoduchosti se kterou můžeme měnit vlnovou délku jsou přístroje s monochromátorem využívány ke snímání spekter na konstantních vlnových délkách.



Obrázek 4.10: Monochromator typu Czerny-Turner využívající difrakční mřížku [21]

Kvalitu monochromatoru popisují 4 základní parametry:

■ Spektrální čistota

Popisuje jak je vystupující svazek ovlivněn zářením, které neodpovídá nastavení přístroje. Příčinou tohoto záření může být parazitní záření nebo rozptyl záření (např. způsobeny prachem v monochromatoru).

■ Disperzní charakteristika

Popisuje disperzní schopnost difrakční mřížky. Pro uhlovou disperzi mřížky D_a platí [5]:

$$D_a = \frac{d\beta}{d\lambda} = \frac{|m|}{d \cos \beta} = \frac{\sin \alpha + \sin \beta}{\lambda \cos \beta} \quad (4.2)$$

kde α je úhel dopadajícího a β úhel difraktovaného paprsku vzhledem k normále mřížky, λ vlnová délka, d mřížková konstanta a m řád difrakce.

■ Rozlišení monochromátoru

Rozlišení $\Delta\lambda$ je dáno dvojnásobkem geometrické spektrální šířky svazku:

$$\Delta\lambda = 2s_g = 2R_d w \quad (4.3)$$

kde R_d je rozlišení monochromátoru a w je šířka štěrbin. [5]

■ Optická propustnost

Tok záření procházející výstupní štěrbinou je uměrný čtverci geometrické šířky štěrbin w^2 .

Difrakční mřížky v moderních monochromátorech sestávají z optického leštěného povrchu, do kterého jsou speciálním nástrojem vyryty husté a souběžně orientované vrypky. Pro UV-VIS oblast nejběžnější hustota vrypů je 1200-2400 na 1 mm. [5][7][20]

■ 4.3.2 Polychromátory

Polychromátor obsahuje větší počet výstupních štěrbin, což umožňuje provádět měření při větším počtu vlnových délek současně. Typická konstrukce polychromátoru je založena na Rowlandově kruhové montáži. Nacházejí uplatnění v emisní spektroskopii. [5][7]

■ 4.3.3 Filtry

Filtry záření slouží k izolaci určitého pásu vlnových délek. Rozlišujeme dva základní typy filtrů, absorpční a interferenční filtry.

■ Absorpční filtry

Absorpční filtry jsou levnější než interferenční filtry ale jejich funkčnost se omezuje jen na oblast viditelného záření. Jsou to nejčastěji obarvená skla, které propouštějí záření požadované barvy a absorbují vlnové délky jiných barev. Mají značnou pološířku (50 až stovky nm). Opakem takových filtrů jsou "notch" filtry, které absorbují záření jen v úzkém intervalu. Spektrální pásy absorpčních filtrů jsou obvyklé od 30 až po 250 nm, přičemž se zmenšováním intervalu klesá i transmittance. [5][7]

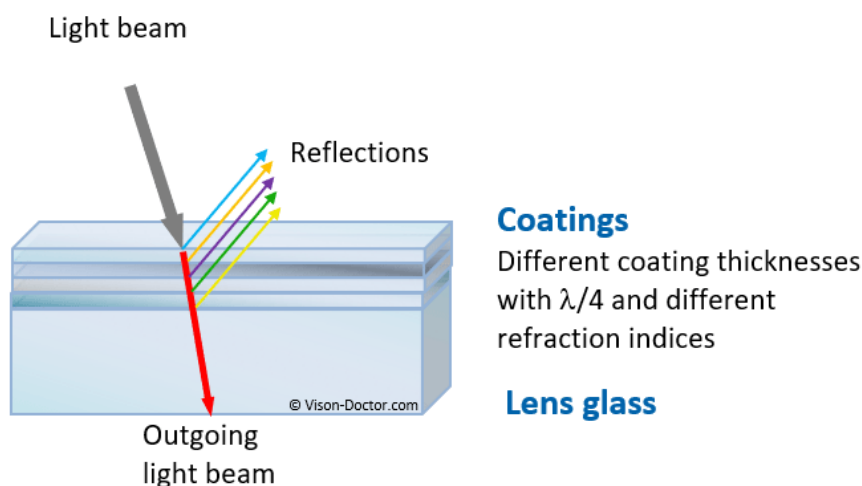
■ Interferenční filtry

Interferenční filtry se používají v UV-VIS-IR oblasti až do vlnové délky 14 μm . Na rozdíl od absorpčních filtrů propouštějí zářivý tok o vyšší intenzitě, nejsou omezeny jen na VIS oblast a mají užší šířku propuštěného pásu. Ve těchto filtrech je malá mezera mezi odraznými plochami vyplněna transparentním dielektrikem s malým indexem lomu. Tato vrstva je oboustranně potažena kovovým filmem. Vlnová délka propuštěného interferenčním filtrem λ_{max} záření se počítá podle vzorce:

$$\lambda_{max} = \frac{2t\eta}{n} \quad (4.4)$$

kde t je tloušťka dielektrika, η je index lomu dielektrika a n je řád spektra. [7]

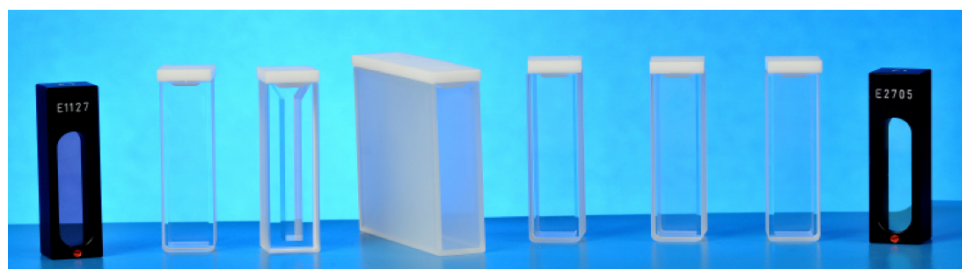
Výhody filtrů spočívají v jejich jednoduchosti a nízké ceně. Nevýhodou je že filtr izoluje pouze jeden spektrální interval. Pro měření v jiném rozmezí vlnových délek je tedy potřeba filtr vyměnit. Používají se ve spektrometrech kde není třeba často měnit vlnovou délku. [5][7]



Obrázek 4.11: Princip interferenčního filtru [22]

4.4 Kyvety

Spektrometrická měření vzorků se provádí ve speciálních nadobách, které nazýváme kyvety. Existuje velké množství komerčně dostupných kyvet pro absorpční spektrometrii v UV-VIS oblasti. Mohou se lišit podle velikosti, tvaru a tloušťky absorbující vrstvy. Standardní tloušťka je 10 mm, ale běžně dostupné jsou také kyvety 1 až 100 mm. Pro specifické účely se používají průtokové kyvety, kyvety se zmenšeným vnitřním objemem, cylindrické kyvety atd.



Obrázek 4.12: Příklady komerčně dostupných kyvet [23]

Hlavním parametrem ovšem je materiál, ze kterého je vyrobena kyveta. Tento materiál musí být vždy propustný v požadovaném spektrálním intervalu. V UV-VIS spektrometrii široké využití má křemenné sklo (tavený SiO_2)

propustné v UV-VIS-NIR oblasti (180 nm až 3 μm). Skleněné a plastové (akrylátové) kyvety jsou výrazně levnější oproti křemenným ale jejich použití je omezeno na VIS-NIR oblast (375 nm až 2 μm). Ve viditelné a blízké infračervené oblasti se občas používají kyvety z polymerních materiálů, např. NaCl a KBr ale jejich nevýhodou je rozpustnost v některých rozpouštědlech.

Kvalitu a přesnost měření může ovlivnit nevhodné zacházení při práci s kyvetou. Naznačíme základní požadavky pro přesná měření [5][7][20] :

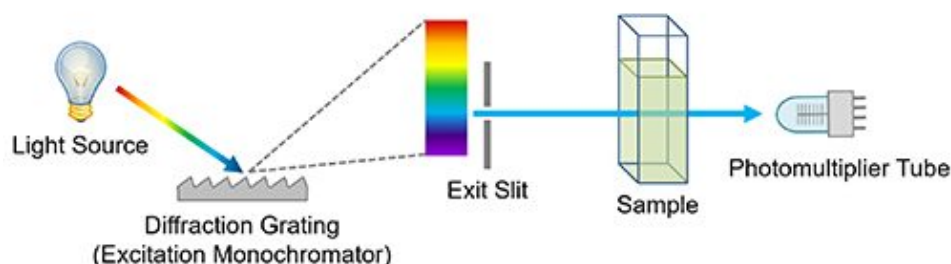
- Stěny kyvety (vstupní a výstupní okénka) musí být paralelní a kolmé na svazek dopadajícího záření.
- Kyvetu je nutno vždy před použitím pečlivě očistit a při manipulaci vyvarovat se dotyku optických okének.
- Okénka musí mít ploché a vysoce leštěné povrchy. Ztráty způsobené odrazy na zakřiveném povrchu mohou negativně ovlivnit kvalitu naměřených dat.
- Musíme se vyhýbat příliš horkému prostředí, aby se nezměnily rozměry kyvety.

4.5 Spektrometry v oblasti UV-VIS

Existuje řada komerčně dostupných přístrojů pro absorpční měření v UV-VIS oblasti. Lze je rozdělit podle různých kritérií, např. podle účelu použití (výzkumné nebo provozné), velikosti, portability (přenosné nebo stacionární), výbavy atd. Dle vnitřního uspořádání základních prvků rozlišujeme jednopaprskové a dvoupraprskové spektrometry.

4.5.1 Jednopaprskové spektrometry

Jednopaprskové přístroje jsou jednodušší, jejich výhodou je nízká cena a snadná obsluha. Obvykle jsou vybaveny monochromatorem a fotonásobičem.



Obrázek 4.13: Schema jednopaprskového spektrometru [26]

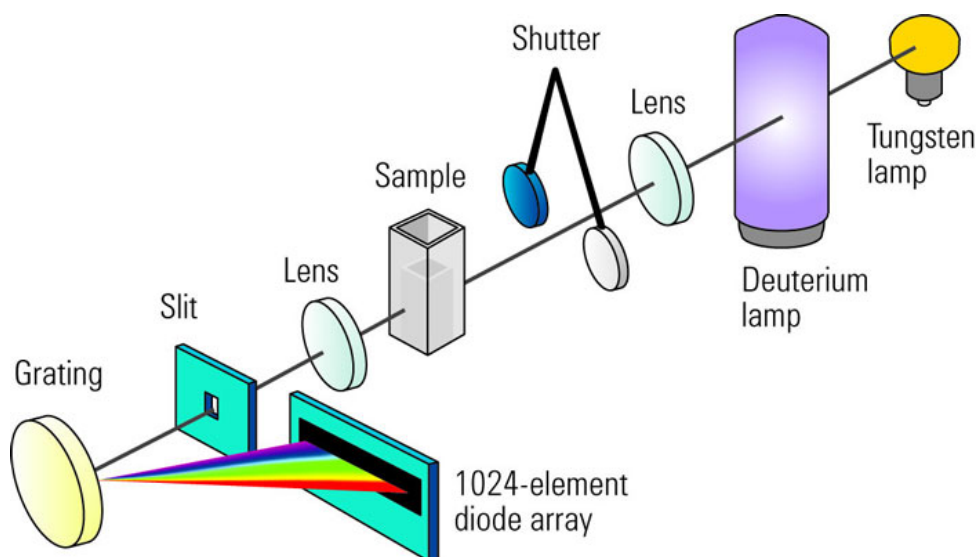
V tomto uspořádání kyvetou s čistým rozpouštědlem po nastavení vlnové délky projde svazek záření a dopadne na detektor. Změřenému fotoelektrickému proudu přiřadíme nulovou hodnotu absorbance. Pak vložíme kyvetu se

vzorkem a změříme jeho absorbance. Tímto postupem odstraňujeme efekty, které mají vliv na intenzitu procházejícího svazku a nesouvisí s přítomností vzorku v rozpouštědle.

Většinou jsou tyto přístroje vhodné pro určování koncentrace vzorků při měření na jedné vlnové délce. Nicméně, při měření celého spektrálního intervalu se může projevit chyba v důsledku časové nestability zdroje. Tuto nevýhodu nemají například spektrometry s diodovým polem. [5][7][20]

■ Spektrometry s diodovým polem

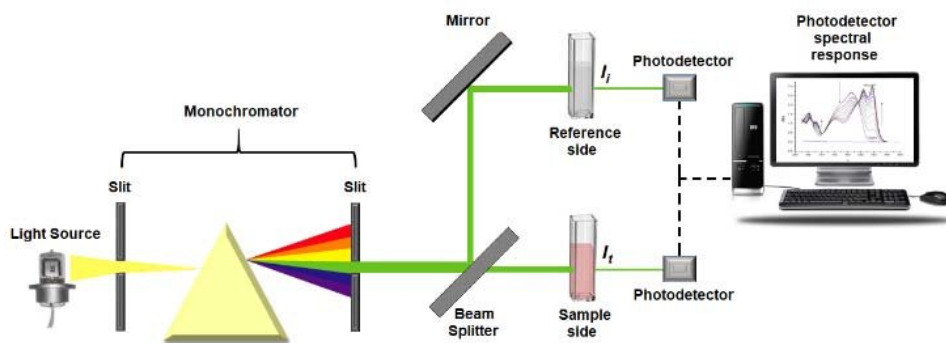
Podskupinu jednopaprskových spektrometrů tvoří simultánní spektrometry s diodovým polem. V nich je jeden detektor nahrazen stovkami citlivých fotodiod s rozlišovací schopností kolem 0,5 nm. Monochromátor nebo polychromátor je v tomto uspořádání umístěn za kyvetu a signály všech vlnových délek se detekují všemi fotodiodami současně. Takový systém umožňuje měřit rychlé změny spektra v dynamických měřeních. Kromě toho, uplatňují se v kinetických měřeních ke stanovení závislosti absorbance na času ve vicesložkové analýze. [5][7][20]



Obrázek 4.14: Schema diode-array spektrometru [24]

■ 4.5.2 Dvoupaprskové spektrometry

Dvoupaprskové spektrometry jsou vybaveny zrcadlem, které rozdělí svazek záření na dva paprsky. Jeden paprsek prochází kyvetou se vzorkem, druhý prochází referenční kyvetou s čistým rozpouštědlem. Tyto paprsky dopadají na vlastní detektor a jejich odezvy jsou pak zesíleny. Logaritmus jejich poměru odpovídá výsledné hodnotě měření.



Obrázek 4.15: Schema dvoupraskového spektrometru [25]

V novějším uspořádání dvoupraskového spektrometru je svazek pomocí rotujícího zrcadla střídavě směřován do měrné a referenční kyvety. Pak jsou oba pulsy pomocí hřebeného zrcadla spojeny do jednoho paprsku, který dopadá na detektor. Toto zapojení umožňuje měření s jedním detektorem a proto je preferováno v moderních spektrometrech.

Mezi výhody dvoupraskových spektrometrů patří kompenzace kolísání intenzity zdroje a možnost kontinuálního záznamu absorpčního spektra. [5][7][20]

Kapitola 5

Aplikace UV-VIS spektrometrie k kvalitativní a kvantitativní analýze

Molekulová absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti nachází analytické využití jak v organické, tak i v anorganické analýze. Absorpce ultrafialového a viditelného záření může podat informaci o přítomnosti v molekule látky typických funkčních skupin, které nazýváme chromofory. Identifikace těchto chromoforů slouží ke kvalitativnímu posouzení struktury látek a jejich následnému stanovení.

5.1 Absorbující specie a interpretace spektra

Spektrum látky se skládá z jednoho nebo více elektronových absorpčních pásů. Absorpční pásy se mohou buď vzájemně překrývat, nebo být oddělené mezi sebou. Sestávají z množství diskretních čar, které vznikají v důsledku přechodu elektronů ze základního energetického stavu do vyšší excitované hladiny. Vibrační a rotační stavy mají podobnou energii a tedy jejich absorpční čáry nejsou značně vzdálené od sebe.

■ Absorpce organickými sloučeninami

Elektrony v chemických vazbách mohou být poutány různou energií a právě na této energii závisí jakou vlnovou délku bude mít absorbované záření. Jednoduché vazby typu uhlík-vodík a uhlík-uhlík jsou vázány velmi pevně a k jejich excitaci je potřebné ozáření vakuovým ultrafialovým zářením o vlnové délce kratší než 180 nm. Na těchto vlnových délkách už absorbují záření atmosferické plyny (např. kyslík) a běžné optické materiály (např. křemčité a křemenné sklo). Vzniká tedy nutnost provádět měření ve vakuu s použitím propustných materiálu (např. LiF). Kvůli těmto experimentálním problémům není vzdálená ultrafialová oblast pro analytické účely významně využívána.

Menší energií jsou svázány elektrony ve dvojných a trojných molekulových vazbách. Chromofory, které vykazují charakteristickou absorpci v UV-VIS oblasti jsou například konjugované dvojně vazby, aromatické sloučeniny atd. Vlnové délky absorpčních maxim a příslušné molární absorpční koeficienty jsou tabelovány pro velké množství organických a

organických kyselin. K absorpci dochází při přechodu elektronů mezi d-orbitaly a potřebná energie závisí na pozici v periodické soustavě, navazaných ligandech a oxidačním čísle prvku.

Lanthanoidy a aktinoidy obsahují zodpovědné elektrony v zanořených orbitalech 4f a 5f. Jejich spektrum se skládá z úzkých absorpčních pásů, na jejichž pozici už nemají vliv navázané ligandy. [5][7][20]

5.2 Vliv rozpouštědla

Polohu absorpčního pásu ovlivňují fyzikálně-chemické změny v důsledku vlivu prostředí. Vliv rozpouštědla se projevuje u přechodu $n - \pi^*$, kde je základní stav polárnější než excitovaný. Dipol-dipolové interakce v polárních rozpouštědlech vedou k zvýšení energie přechodu a posouvají λ_{\max} ke kratší vlnové délce.

Maxima absorpčních pásů $\pi - \pi^*$ přechodů jsou v polárních rozpouštědlech naopak pozorovány při delší vlnové délce. V těchto přechodech je excitovaný stav zpravidla polárnější než stav základní a tedy dipol-dipolové interakce způsobují snížení energie přechodu.

Polární rozpouštědla (např. voda a alkoholy) mají tendenci stírat jemnou vibrační strukturu a tedy neumožňují zachování detailů spektra. Nepolární rozpouštědla (např. cyklohexan) naopak umožňují pozorovat podstatnou část jemné struktury spektra a tyto spektra jsou podobné spektrům v plynné fázi.

Absorpční hrana rozpouštědla je hodnota vlnové délky, při které v kyvetě o tloušťce 1 cm překročí absorbance hodnotu 1 vůči vodě. Obrázek (5.2) shrnuje nejčastěji používaná rozpouštědla v UV-VIS absorpční spektrometrii. Přesná hodnota může být značně ovlivněna čistotou rozpouštědla. [5][7][20]

Rozpouštědlo	Spodní mez λ (nm)	Rozpouštědlo	Spodní mez λ (nm)
acetonitril, voda	190	chloroform	240
isooktan, cyklohexan	195	ethylacetát	260
hexan	201	dimethylformamid	270
methanol, ethanol	205	octová kys.	270
1,4-dioxan	215	benzen	280
diethylether	220	toluen	285
glycerol	230	pyridin	300
dichlormethan	233	aceton	330

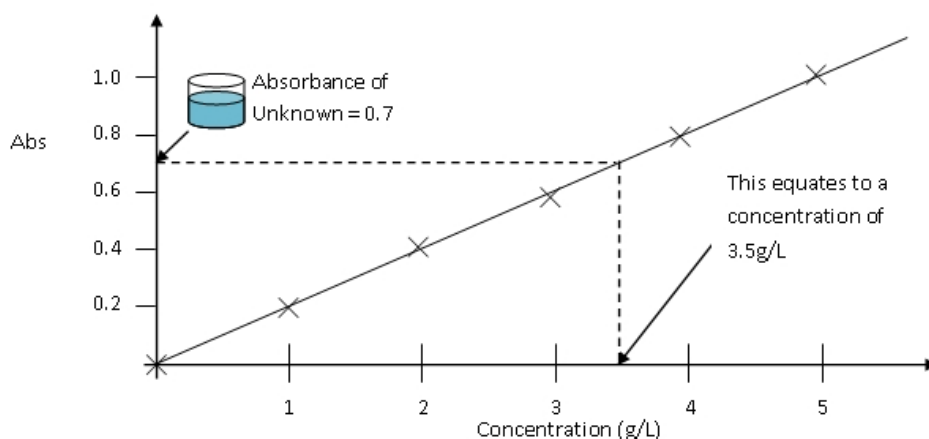
Obrázek 5.2: Absorpční hrany různých rozpouštědel [27]

absorbance A_λ na koncentraci c při konstantní tloušťce absorbující vrstvy b a zvolené vlnové délce λ .

Obvykle je preferována λ_{max} absorpčního pásu. Při výběru maxima dochází k nejmenší změně molárního absorpčního koeficientu ε a tedy nebude významná i odchylka od Lambertova-Beerova zákona. Navíc, výběr λ_{max} umožňuje nejvyšší citlivost stanovení.

Pro vytvoření kalibrační křivky potřebujeme připravit sadu roztoků standardů (roztoků o známé koncentraci) ve sledovaném koncentračním rozsahu. Pak kalibrační křivku získáme na základě hodnot absorbance závislých na známé koncentraci látky v analytu. Optimální vlnovou délkou bude ta, pro kterou je dosažen nejvyšší koeficient determinace R^2 (max. hodnota 1) a tedy nejvyšší lineárta závislosti absorbance na koncentraci.

Teprve poté můžeme přejít k měření vzorku s neznámou koncentrací. Ze získané hodnoty absorbance ve zvolené vlnové délce se pak z kalibrační křivky odečte odpovídající koncentrace látky. [5][7][20]



Obrázek 5.3: Typická kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [28]

V případě, kdy může signál analytu ovlivnit nějaká další část vzorku, je vhodné tyto vlivy částečně kompenzovat metodou standardního přídatku.

5.4.2 Metoda standardního přídatku

V UV-VIS absorpční spektrometrii se nejčastěji používá metoda násobných přídatku. V této metodě se k sadě baněk se stejným objemem vzorku přidává různé objemy roztoku standardu. Koncentraci je potřeba volit tak, abychom pohybovali v lineární části kalibrační křivky. Do první baňky roztok standardu nepřidáváme a do dalších baněk přidáváme různé množství roztoku standardu o předem známé koncentraci. Roztoky v odměrných baňkách následně naředíme rozpouštědlem na stejný objem a změříme jejich absorbance.

Předpokládáme identické objemy vzorku V_x o neznámé koncentraci c_x , proměnný ale známý objem roztoku standardu V_s o koncentraci c_s a celkový

Kapitola 6

Komerčně dostupné UV-VIS spektrofotometry

V této kapitole si ukážeme některé z komerčně dostupných spektrofotometrů a uvedeme jejich důležité vlastnosti.

6.1 Spektrofotometry firmy Metash

Firma Metash Instruments vznikla v roce 2008, vyrábí laboratorní a vědecké přístroje. Poskytují širokou nabídku spektrofotometru, zejména VIS nebo UV-VIS, jednopaprskové nebo dvoupaprskové spektrofotometry. Produkty firmy Metash se uplatňují v potravinářském, kosmetickém, chemickém a farmaceutickém průmyslech.

6.1.1 UV-6100 UV/VIS

Spektrofotometry řady UV-6100 kombinují nejlepší vlastnosti jednopaprskových přístrojů. Mezi fotometrickými módy výrobku patří skenování při jedné vlnové délce, kinetika (kinetický režim, v němž se měří změna absorbance na času), měření při více vlnových délkách, testy DNA/proteinu.

Optický systém	Jednopaprskový
Zdroj světla	Wolframová lampa a deuteriová lampa
Rozsah vlnových délek [nm]	190 - 1100
Přesnost vlnové délky [nm]	±0.3
Efektivní šířka pásu [nm]	1.8
Fotometrická přesnost [%T]	±0.3
Fotometrický rozsah	-0.3-3A; 0-200%T; ±0-9999C
Detektor	Křemíková fotodioda
Displej	320*240 LCD
Rozměry [mm]	625 x 430 x 206
Hmotnost [kg]	28

Tabulka 6.1: Parametry spektrofotometru UV-6100 UV/VIS [29]



Obrázek 6.1: UV-6100 UV/VIS Spectrophotometer [31]

6.1.2 UV-8000ST Double Beam UV/VIS

Jedná se o dvoupraskové spektrofotometry s kvalitním disperzním systémem, nízkým vlivem bludného záření a vysokou přesností měření. Tyto přístroje jsou vybaveny moderním dotykovým displejem, vestavěnou pamětí 32 Gb a podporou Bluetooth.

Optický systém	Dvoupraskový, mřížka 1200 vrypů
Zdroj světla	Wolframová lampa a deuteriová lampa
Rozsah vlnových délek [nm]	190 - 1100
Přesnost vlnové délky [nm]	± 0.1 (D_2 na 656.1nm), ± 0.3
Efektivní šířka pásu [nm]	0.5, 1.0, 2.0, 4.0
Fotometrická přesnost [%T]	± 0.2
Fotometrický rozsah	-4.0-4.0A; 0-200%T; $\pm 0-9999C$
Detektor	Duální křemíková fotodioda
Displej	800*480 touch screen
Rozměry [mm]	630 x 430 x 210
Hmotnost [kg]	28

Tabulka 6.2: Parametry spektrofotometru UV-8000ST Double Beam UV/VIS [30]

6.2 Spektrofotometry firmy Thermo Scientific

Firma Thermo Fisher Scientific Inc. je jedním z největších světových dodavatelů laboratorní techniky. Působí v farmaceutickém, biotechnologickém, ekologickém, klinickém a dalších oborech.

6.2.1 Genesys 10S UV-Vis

Spektrofotometr Genesys 10S UV-Vis je velmi oblíbený mezi pracovníky vědeckých a výukových institucí. Tento přístroj umožňuje skenování spekter v celém rozsahu vlnových délek až do rychlosti 4200 nm/min. Xenonová výbojka produkuje záření o vysoké intenzitě zejména v UV oblasti, což umožňuje měření s vysokou citlivostí v nejrůznějších oborech. Jeho disperzní systém tvoří štěrbinu s optickou šířkou 1,8 nm, což vyhovuje přísným požadavkům a zajišťuje vysokou hodnotu SNR.

Optický systém	Dvoupaprskový
Zdroj světla	Xenonová výbojka
Rozsah vlnových délek [nm]	190 - 1100
Přesnost vlnové délky [nm]	±1
Efektivní šířka pásu [nm]	1.8
Fotometrická přesnost [%T]	±0.005
Fotometrický rozsah	-0.5-5.0A; -1.5-125%T; ±0-9999C
Detektor	Duální křemíková fotodioda
Displej	9.7 x 7.1 cm LCD
Rozměry [mm]	300 x 400 x 250
Hmotnost [kg]	8.6

Tabulka 6.3: Parametry spektrofotometru Genesys 10S UV-Vis [31]



Obrázek 6.2: Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer [31]

6.2.2 Evolution 350 UV-Vis

Dvoupaprskový spektrofotometr Evolution 350 UV-Vis je kvalitní laboratorní přístroj, který zajišťuje vysokou přesnost měření v pokročilých aplikacích. Reprezentuje vyšší třídu spektrofotometrů vhodných jak pro základní výzkum, tak pro nejpřesnější farmaceutické analýzy v oblasti kontroly kvality. Vybavení xenonovou výbojkou v kombinaci s proměnnou šířkou štěrbinou od 0,5 do 4,0 nm umožňuje provádět měření s maximální rozlišovací schopností. Využitím softwaru Thermo Scientific Insight získáváme přístup k vyčerpávající nabídce programů pro sbírání, zpracování a vyhodnocení dat.

Optický systém	Dvoupaprskový, mřížka 1200 vrypů
Zdroj světla	Xenonová výbojka
Rozsah vlnových délek [nm]	190 - 1100
Přesnost vlnové délky [nm]	± 0.2 (Hg na 546.07 nm), ± 0.3
Efektivní šířka pásu [nm]	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0
Fotometrická přesnost	1A: $\pm 0.004A$; 2A: $\pm 0.004A$; 3A: $\pm 0.006A$
Fotometrický rozsah	$>4A$
Detektor	Duální křemíková fotodioda
Displej	není
Rozměry [mm]	610 x 530 x 380
Hmotnost [kg]	22

Tabulka 6.4: Parametry spektrofotometru Evolution 350 UV-Vis [32]



Obrázek 6.3: Evolution 350 UV-Vis Spectrophotometer [32]

Kapitola 7

Navrh a realizace UV-VIS spektrofotometrů

Hlavním cílem této práce byl návrh a realizace zařízení, které by umožnilo kvalitativní (případně kvantitativní) analýzu vybraných tekutin v ultrafialové a viditelné oblasti spektra využitím detektoru STS-UV Microspectrometer.

V této kapitole podrobně popíšeme proces vybudování mechanického uspořádání a zdůvodníme výběr základních součástek na základě získaných poznatků v oblasti molekulové absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti.

7.1 Detektor STS-UV Microspectrometer

Jako detektor záření jsme použili zařízení STS-UV Microspectrometer společnosti Ocean Insight. Nehledě na kompaktní rozměry, tento výrobek poskytuje fotometrické charakteristiky srovnatelné s dražšími alternativami.



Obrázek 7.1: STS-UV Microspectrometer [33]

Díky vysoké citlivosti CMOS detektoru a vysoké hodnotě SNR je to univerzální řešení pro měření nízkých koncentrací. Výběrem šířky vstupní štěrbiny

můžeme regulovat efektivní šířku pásu (používá se také termín optické rozlišení) v závislosti na zvolené aplikaci. Při měřeních s vysokou intenzitou záření, nejvyššího optického rozlišení dosáhneme volbou nejmenší šířky štěrbin. Naopak, v aplikacích s nízkou intenzitou je vhodné zvolit větší šířku štěrbin, aby do spektrometru prošlo co nejvíce světla.

Typ detektoru	1024-pixel linear CMOS
Typ monochromatoru	Asymmetric crossed Czerny-Turner
Mřížka	600 vrypů/mm
Vstupní štěrbina [μm]	10, 25, 50, 100, 200
Rozsah vlnových délek [nm]	190-650
Čas integrace	10 μs - 10 s
SNR	>1500:1
Temný proud	~ 50 counts/sec at 35°C
Efektivní šířka pásu [nm]	1, 1.5, 6, 12
Bludné záření	$\leq 0.25\%$
Rozměry [mm]	40 x 42 x 24
Hmotnost [g]	60
Pozhrání	USB 2.0, 12 Mbps

Tabulka 7.1: Parametry detektoru STS-UV Microspectrometer [33]

Využitím softwaru OceanView od firmy Ocean Insight můžeme přímo ovládat spektrometrem a měnit jeho nastavení v závislosti na požadovaných výsledcích. Podrobně se budeme prací v programu zabývat v další kapitole.

7.2 Výběr zdroje záření

Základní součástí spektrofotometrického přístroje je zdroj záření, na jehož parametrech závisí, zda je tento zdroj vhodný pro naše účely. Jak už bylo řečeno v odstavci 4.1, podmínku vysoké intenzity a stability splňuje většina známých typů zdrojů a tedy pro naše konečné rozhodnutí jsme museli prozkoumat emitované spektrum vybraných zdrojů světla.

7.2.1 Chirana Sirius R02

Jednou z možností bylo použití zářiče Chirana Sirius R02, jehož základní součástí je rtuťová výbojka Tesla RVK 125W. Jedná se o kombinovaný UV a IR zářič s možností nastavení režimu přepínačem. Podle typu produkovaného spektra je to typický čárový zdroj záření s dominantními piky na 313, 365, 405, 436, 546 a 578 nm, což přesně odpovídá tabulkovým hodnotám.

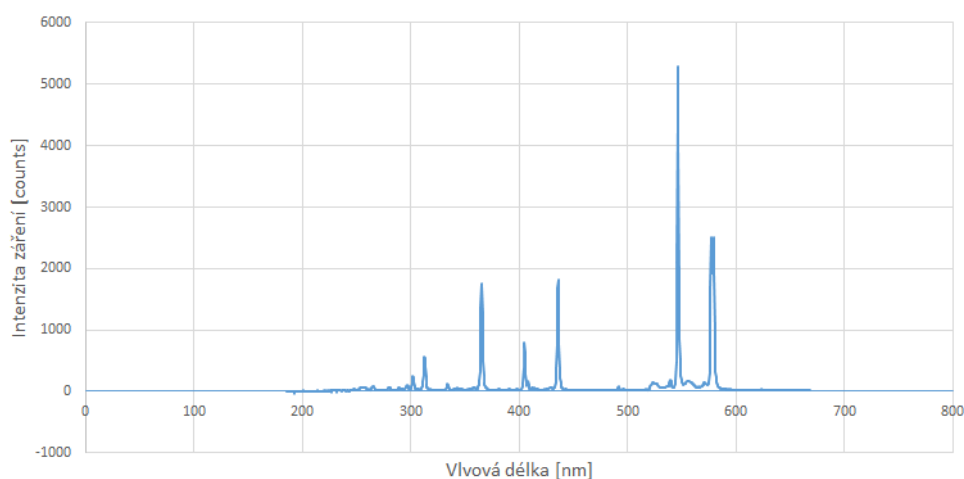
Působením krátkovlnného UVB záření (280 až 315 nm) na molekuly kyslíku vzniká ozon, který můžeme hned zaregistrovat kvůli intenzivnímu pachu. V lidském těle tento plyn způsobuje tvorbu volných radikálů, pro člověka je karcinogenní a ve vysokých koncentracích jedovatý.



Obrázek 7.2: Zářič Chirana Sirius R02 [34]

Působení UVB záření má zhoubné účinky pro lidský organismus. Při manipulaci s tímto zdrojem záření je nutno používat ochranné brýle a vyvarovat se dlouhému působení na kůži, neboť může dojít ke její spálení.

Vzhledem k výše uvedeným negativním zdravotním účinkům a čárovému charakteru emitovaného spektra, což neumožňuje provádět kvalitativní analýzu látek, tuto variantu jsme řešili v rámci této bakalářské práce nepoužívat.



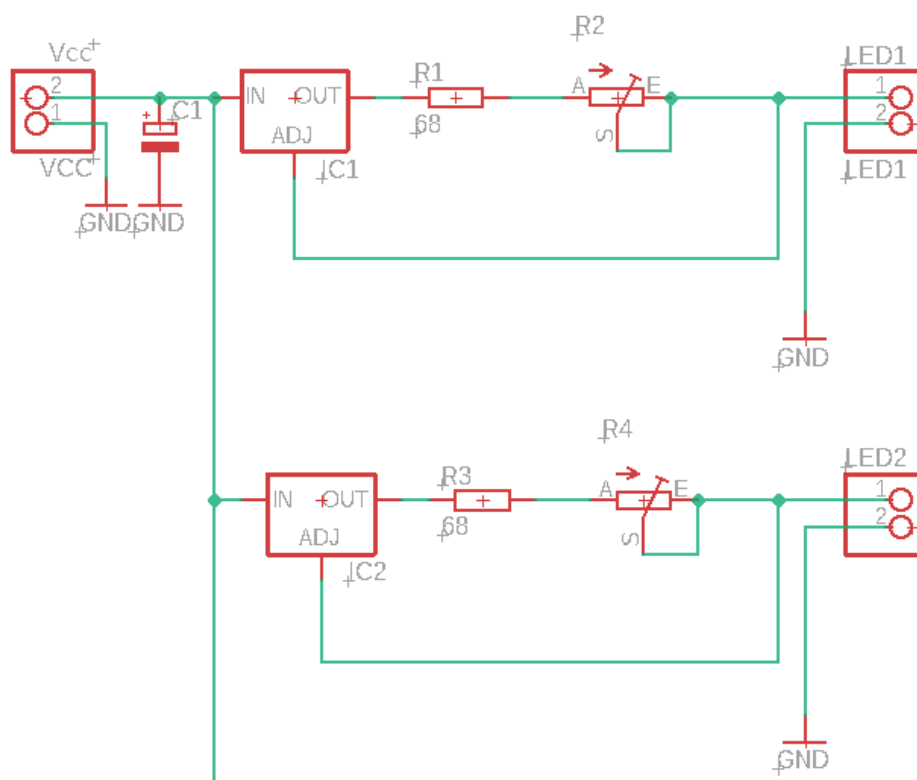
Obrázek 7.3: Emisní spektrum rtuťové výbojky

7.2.2 Navrh a realizace LED driveru

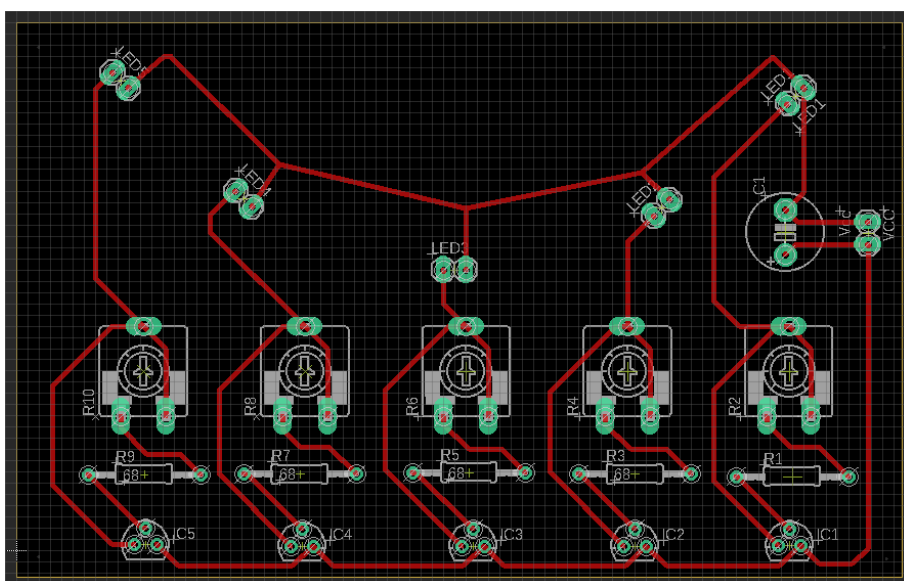
Jednou z možností realizace zdroje záření byla deska plošných spojů, která by představovala paralelní zapojení pěti LED diod se stabilizátory napětí. Barvy jednotlivých LED volíme tak, abychom ve výsledku měli maximální pokrytí UV-VIS oblasti. Za tímto účelem jsme si vybrali ultrafialovou, modrou, zelenou, červenou a bílou LED diody.

Pro navrh desky plošných spojů jsme použili aplikaci Autodesk Eagle. Tento software poskytuje uživatelsky přívětivé rozhraní s možností schematického zachycení, rozmístění a propojení součástek ve fyzické vstvě pomocí autorouteru.

Elektronické schéma obvodu se dvěma LED ukazuje obrázek 7.4. Stejně tak se paralelně zapojí ostatní tři LED. Velikost proudu jednotlivými diodami závisí na odporu rezistoru R1 (příp. R3, R5, R7, R9) o velikosti 68Ω a zapojeného do série potenciometru R2 (příp. R4, R6, R8, R10), kterým budeme regulovat intenzitu světla. Jako stabilizátor napětí jsme použili součástku LM317, hodnotu kapacitoru jsme zvolili $10\ \mu\text{F}$ a celý obvod budeme napájet stejnosměrným signálem z laboratorního zdroje. Fyzické uspořádání desky ukazuje obrázek 7.5.

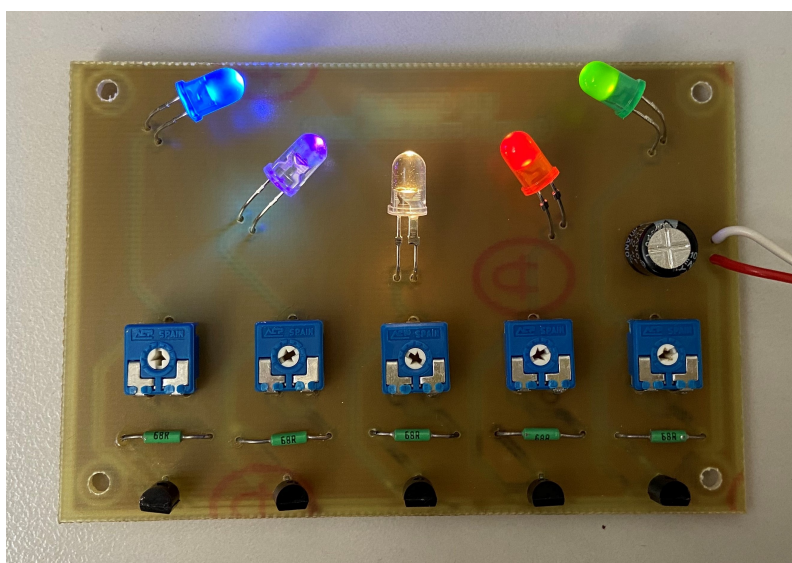


Obrázek 7.4: Zapojení obvodu se dvěma LED



Obrázek 7.5: Rozmístění součástek a jejich propojení

Samotný výrobní proces desky není složitý, ale vyžaduje trpělivost. Motiv spoje zrcadlově vytiskneme na průhlednou fólii ve dvou exemplářích. Tyto stejné motivy navrstvíme přes sebe a přiložíme k světlocitlivé cuprexitové desce. Do otevřené krabice pro UV osvit vložíme desku s motivem, zavěříme víko a počkáme cca 2 minuty. Osvícenou desku pak necháme plavat na hladině leptacího roztoku (v našem případě roztok chloridu železitého) motivem dolů. Leptání trvá cca 20 minut, ke konci můžeme vidět prosvítání motivu. Nakonec, štětečkem nanésmo ochranný lak aby nedošlo k oxidaci mědi. Vyvrtáme všechny díry, připájíme součástky a máme hotovo. Finální tvar LED driveru ukazuje obrázek 7.6. Podrobný popis výroby desky najdete v příloze A.



Obrázek 7.6: LED driver

7.3 Navrh a realizace mechanického uspořádání

Vzhledem k použití jednoho detektoru jsme se rozhodli realizovat náš spektrofotometr v jednopaprskovém uspořádání s možností použití filtru jako selektoru vlnových délek.

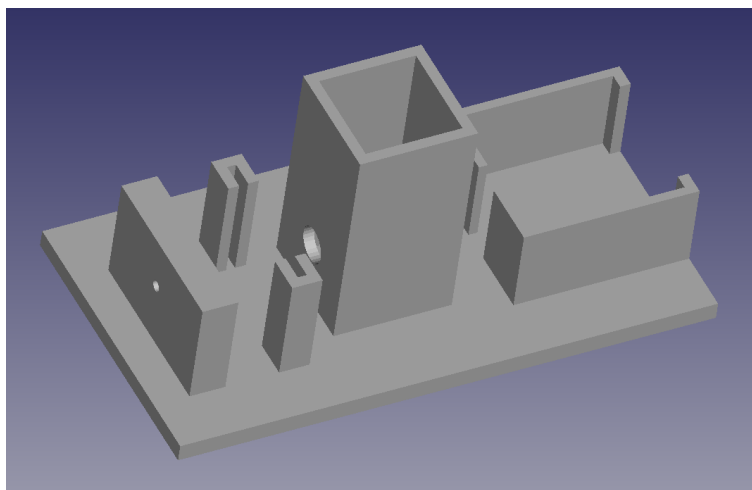
Za tímto účelem bylo potřeba navrhnout 3D model kostry spektrofotometru, který bychom následně mohli vytisknout pomocí 3D tiskárny v laboratoři na katedře mikroelektroniky. K vytvoření 3D modelu jsem použil multifunkční modelovací nástroj FreeCAD, který je vhodný jak pro zkušenější konstruktéry, tak i pro úplné začátečníky.

Konstrukce spektrofotometru se skládá ze dvou základních částí, které se mezi sebou spojí optickým vláknem.

7.3.1 Blok s optickou cestou a detektorem

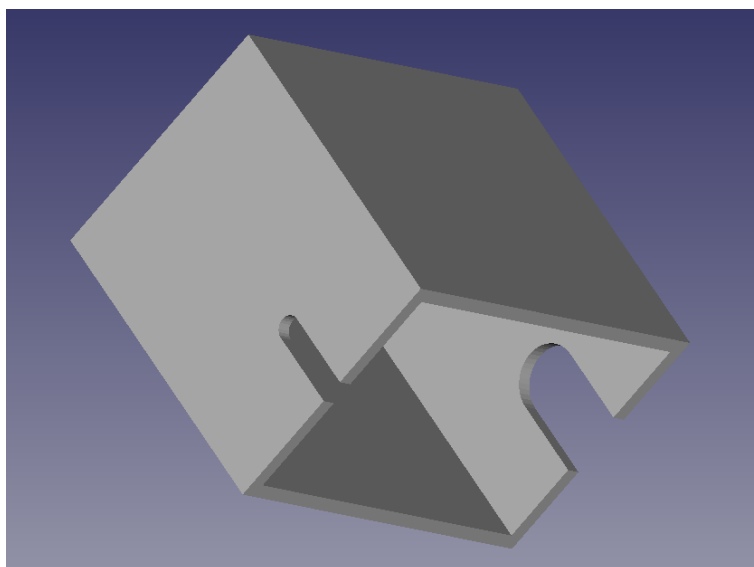
Na obrázku 7.7 můžete vidět 3D model bloku s optickou cestou a detektorem v systému FreeCAD. Zleva doprava jsou následující části v pořadí: hrana se vstupem pro optické vlákno, držák filtru, držák kyvety a nakonec držák detektoru. Uvedeme jejich důležité parametry:

- Typ konektoru a průměr optického vlákna - SMA 905, 3.2 mm
- Šířka filtru - 2 mm
- Rozměry kyvety - 27 x 27 mm
- Rozměry detektoru - 40 x 42 x 24 mm



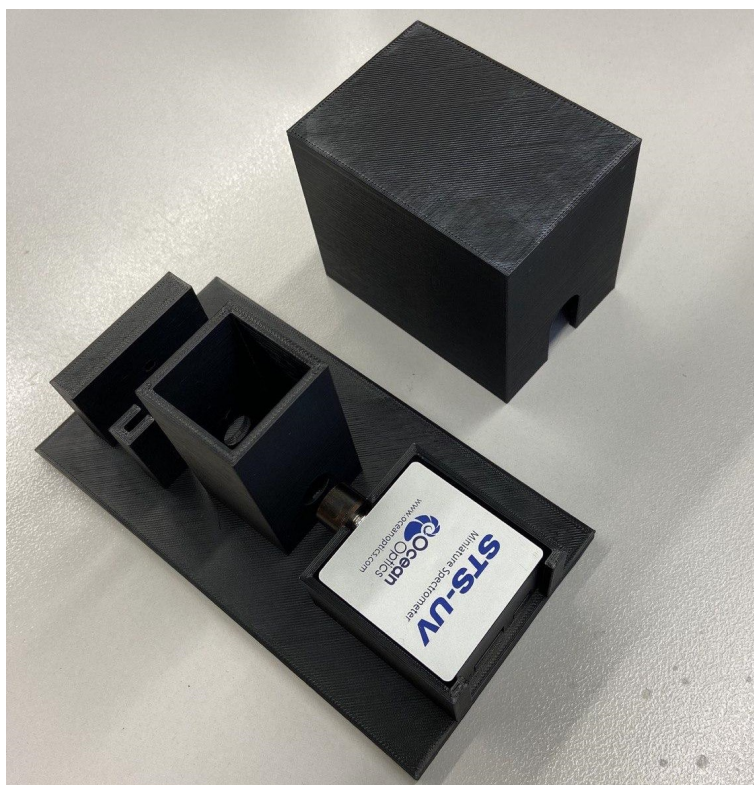
Obrázek 7.7: 3D model bloku s optickou cestou a detektorem

Optickou cestu musíme zabránit vnějším vlivům okolního světla. Celý prostor mezi vstupem a detektorem bychom tedy měli při měření přikrýt. 3D model krytu ukazuje obrázek 7.8.



Obrázek 7.8: 3D model krytu

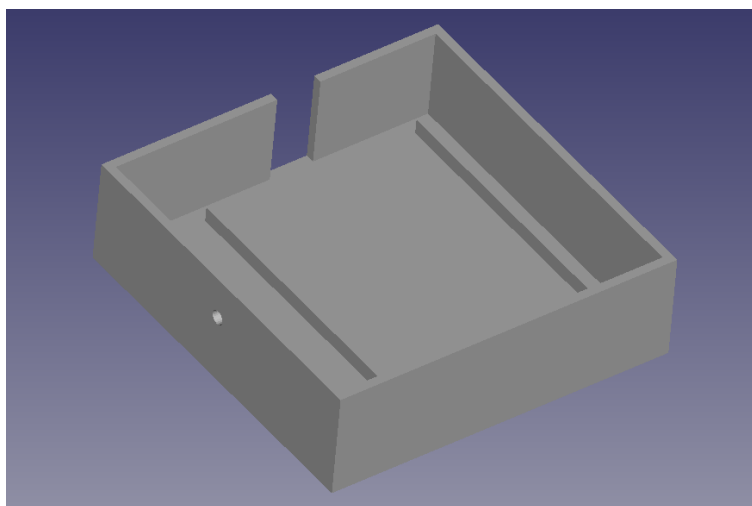
Vytvořené 3D modely jsme převedli do formátu STL a vytiskli na 3D tiskárně s přesností tisku 0.2 mm. Celková doba tisku přesáhla 10 hodin. Výsledek tisku můžete vidět na obrázku 7.9.



Obrázek 7.9: Vytisknutý blok s optickou cestou a detektorem

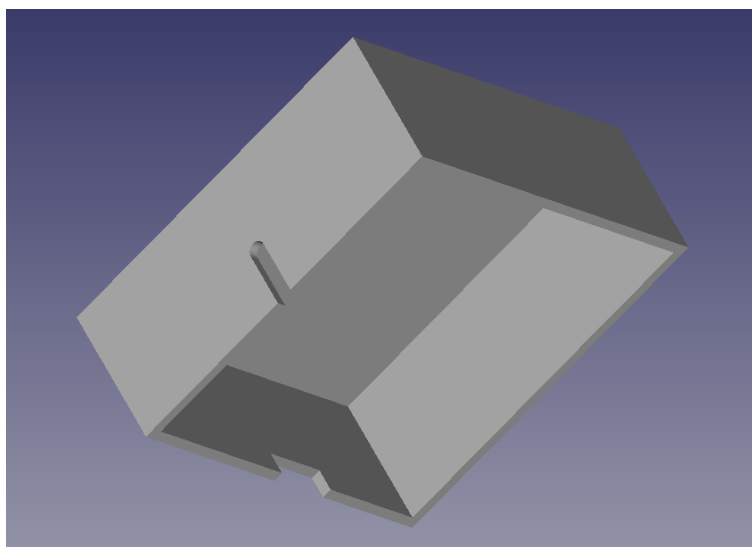
7.3.2 Blok se zdrojem záření

Na obrázku 7.10 můžete vidět 3D model bloku s zdrojem záření v systému FreeCAD. Rozměry desky plošných spojů jsou 68 x 101 mm. Chceme maximálně nasměrovat světlo na vstup optického vlákna, a proto jsme LED driver posunuli o cca 30 mm od přední hrany. Zboku jsme udělali otvor pro napájecí kabel.



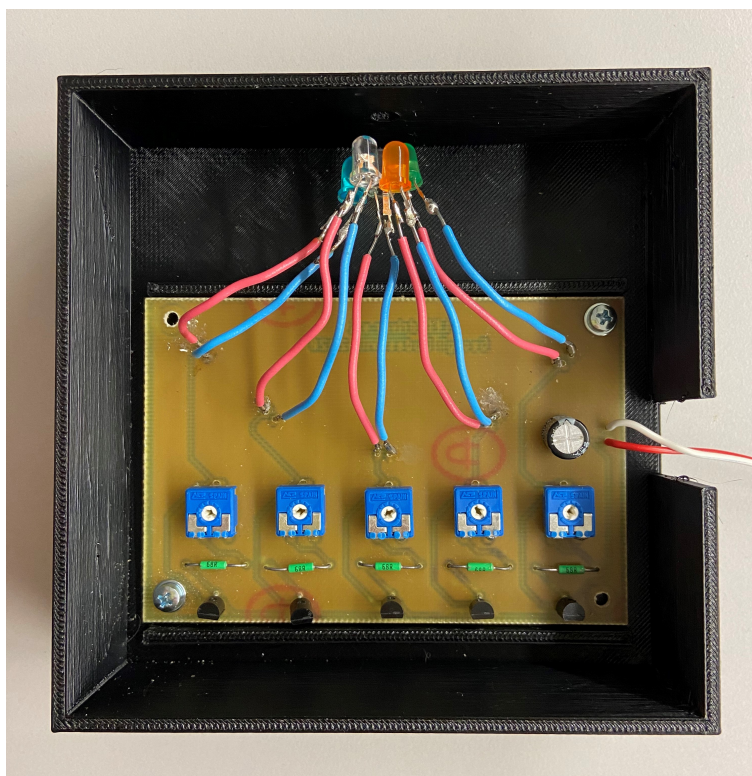
Obrázek 7.10: 3D model bloku s zdrojem záření

3D model krytu zdroje ukazuje obrázek 7.11



Obrázek 7.11: 3D model krytu zdroje

V vytištěném bloku jsme pak provrtali otvory a připevnili LED driver pomocí šroubů a matic. Museli jsme také prodloužit vývody LED diod o cca 4 cm, aby na vstup optického vlákna dopadalo záření o nejvyšší intenzitě. Rozmístění zdroje v vytištěném bloku ukazuje obrázek 7.12.



Obrázek 7.12: Vytištěný blok se zdrojem záření

7.4 Výběr kyvety

Výběr kyvety byl značně ovlivněn nejen optickými vlastnostmi materiálu, ale i finančním kritériem. Z sekce 4.4 vyplývá, že nejlepší variantou pro UV-VIS absorpční měření jsou kyvety z křemenného skla. Nicméně, maloobchodní cena takových výrobků obvykle pohybuje v intervalu 2 až 3 tisíce korun. Kromě toho, použití jedné kyvety je vhodné spíše pro kvalitativní měření, kde si vystačíme pouze s jedním roztokem. Pro kvantitativní analýzu, zejména pro metody kalibrační křivky a standardního přídávku, potřebujeme několik roztoků standardů, a tudíž více než jednu kyvetu.

Z výše uvedeného vyplývá, že v rámci této bakalářské práce kompromisním řešením by bylo finančně dostupné balení kyvet z materiálu, propustného v maximálním rozsahu vlnových délek.

Tyto požadavky splňují, například, spektrofotometrické kyvety z polymethylmethakrylátu (PMMA). Daný materiál je propustný v rozsahu 280 až 800 nm, což je pro naše účely dostačující. Kyvety z tohoto materiálu se obvykle prodávají v stokusových baleních za relativně nízkou cenu.

Kyvety byly zakoupeny na e-shopu společnosti P-LAB ¹. Kyvety mají optickou dráhu 10 mm a objem 4,5 ml.

¹Odkaz na e-shop - <https://www.p-lab.cz/>



Obrázek 7.13: Spektrofotometrické standardní kyvety objemem 4,5 ml [35]

7.5 Výběr chemikálií a rozpouštědla

K ověření funkčnosti spektrofotometru bylo potřeba otestovat vybrané roztoky absorbujících specií. Jak už bylo zmíněno v sekci 5.1, v UV-VIS spektrální oblasti absorbuje velké množství jak organických, tak i neorganických látek.

Rozhodli jsme tedy naše řešení otestovat na síranu měďnatém. Je to anorganická látka (sumární vzorec CuSO_4), nejběžnější sloučenina mědi s triviálním názvem modrá skalice.

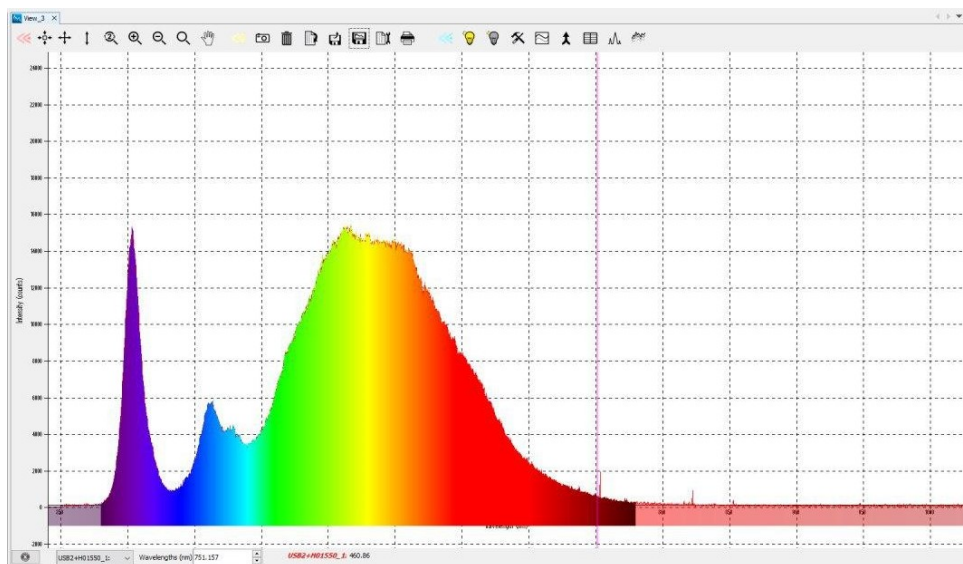
Jako typické polární rozpouštědlo jsme zvolili vodu (sumární vzorec H_2O). Distilovaná voda byla zakoupena na e-shopu společnosti P-LAB.

Kapitola 8

Testování

Cílem této části práce je ověření funkčnosti našeho spektrofotometru (kompletní uspořádání najdete v příloze C na obrázku C.1) na vybraných tekutinách využitím softwaru OceanView od firmy Ocean Insight. Detektor STS-UV Microspectrometer jsme tedy prostřednictvím rozhraní USB 2.0 připojili k laboratornímu počítači a zpustili program.

Nejprve bylo nutné změřit emitované spektrum zdroje a nastavit polohu jednotlivých LED diod tak, abychom měli co nejvyšší intenzitu záření a maximální pokrytí UV-VIS spektrální oblasti. Ovšem se ukázalo, že ve spektru značně převládá složka té LED diody, která je nejvíc nasměrovaná na vstup optického vlákna. Projevit se tedy ve spektru mohou maximálně 2 až 3 LED diody, jež musíme rozmístit vedle sebe a stejně daleko od konektoru vlákna. Spektrum LED driveru s převládajícími složkami bílé a ultrafialové LED diod ukazuje obrázek 8.1.



Obrázek 8.1: Spektrum LED driveru

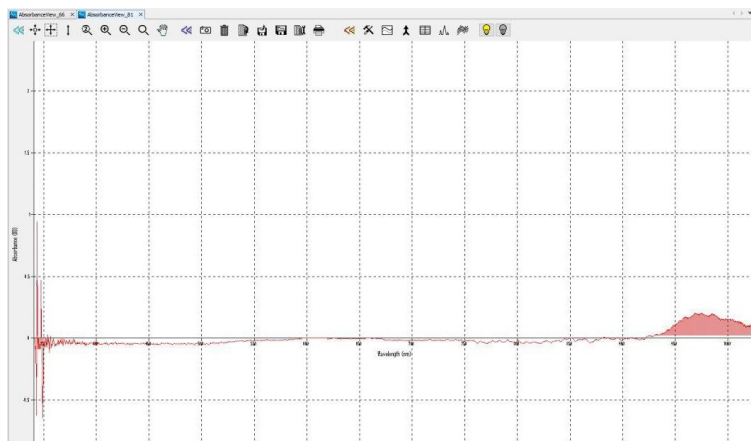
Na obrázku můžeme rozlišit složku bílé LED, jež pokrývá interval od 400 do 750 nm, a složku UV LED se spektrální čarou na 400 nm.

■ Měření absorpčního spektra

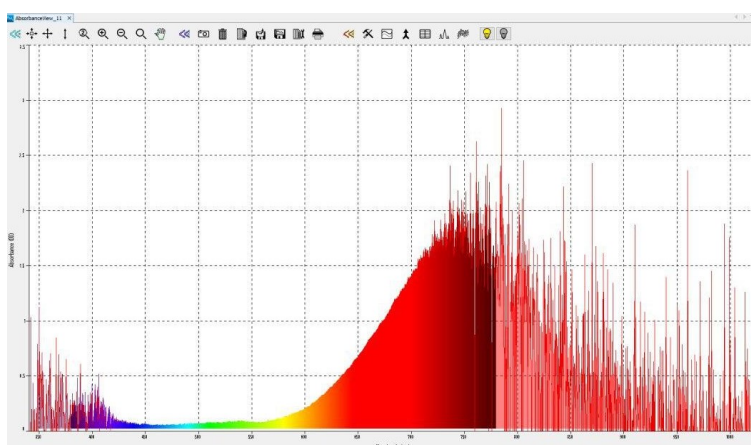
Měření absorpce spočívá v porovnání naměřeného spektra referenční kvyety s rozpouštědlem a kvyety se vzorkem.

V programu OceanView si nejdřív zvolíme režim měření absorpce. Pak nastavíme vhodnou integrační dobu spektrometru a počet měření pro průměrování signálu. Vložíme referenční kvetu s rozpouštědlem a uložíme její spektrum. Vypneme zdroj záření a uložíme rovněž temný proud detektoru. Znovu zapneme zdroj a po vložení kvyety se vzorkem se pak v programu zobrazí jeho absorbance.

Podrobný návod k měření absorpčního spektra najdete v příloze B. Na obrázku 8.2 můžete vidět absorpční spektrum vody. Je zřejmé, že voda neabsorbuje ve viditelné oblasti spektra, vykazuje však absorpci v blízké infračervené oblasti. Obrázek 8.3 ukazuje absorpční spektrum roztoku síranu měďnatého s koncentrací $c=50$ g/L rozpuštěného ve vodě. Maximum absorpce můžeme pozorovat na hranici VIS a NIR oblasti.



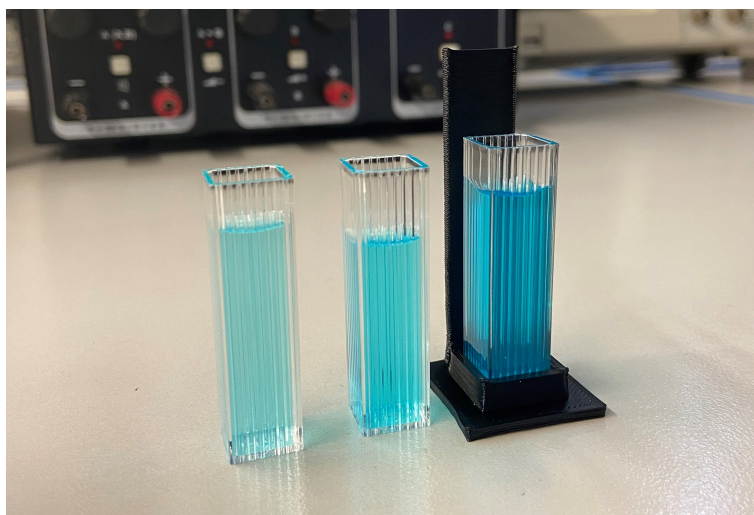
Obrázek 8.2: Spektrum vody



Obrázek 8.3: Spektrum roztoku síranu měďnatého s koncentrací 50 g/L ve vodě

■ Metoda kalibrační křivky

Způsob stanovení koncentrace neznámého roztoku pomocí metody kalibrační křivky jsme podrobně probírali v podsekcí 5.4.1. Pro účely našeho měření jsme zhotovili 3 roztoky standardu se známou koncentrací síranu měďnatého rozpuštěného ve vodě. Na obrázku 8.4 jsou zleva doprava následující roztoky standardu s koncentrací v pořadí: 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L. Navrhli jsme také a pak vytiskli na 3D tiskárně vhodný pro tyto květy držák.



Obrázek 8.4: Roztoky síranu měďnatého o různé koncentraci

Začneme tím, že v programu OceanView zvolíme režim sestavení kalibrační křivky z roztoků o známé koncentraci. Stejně jako v předchozím měření nejdřív uložíme referenční spektrum a temný proud. Pak zvolíme vlnovou délku, na které bychom chtěli měřit absorpce, a začneme popořadě vkládat jednotlivé roztoky standardu. U každého roztoku uvedeme jeho koncentraci a změříme absorbanci. Program z naměřených bodů sestaví graf závislosti absorbance na koncentraci a proloží kalibrační křivku. V našem případě koeficient determinace vyšel skoro roven 0.992, což je poměrně vysoká míra spolehlivosti.

Ze získané kalibrační křivky s koeficientem R^2 blízcím se hodnotě 1 můžeme s velkou přesností stanovit koncentraci látky v neznámém roztoku. Kalibrační křivku vytvořenou v programu OceanView můžete najít v příloze B na obrázku B.6.

Kapitola 9

Výsledky měření a návrh dalších vylepšení

Jelikož se jedná o první prototyp zařízení, můžeme diskutovat o možnostech vylepšení našeho spektrofotometru v budoucnosti. Uvedme aspoň pár z nich:

■ Použití jiného zdroje záření

V rámci této bakalářské práce jsme se především zaměřili na viditelnou oblast spektra, neboť i použitá UV LED produkuje spektrální čáru na hranici UV a VIS oblasti. Vzhledem k tomu, neměli pro naše měření význam látky absorbující převážně v UV oblasti (např. aceton a kofein, jejichž spektrum jsme také chtěli změřit).

Jako alternativu LED driveru bychom mohli použít xenonovou výbojku, která by pokrývala celou UV-VIS oblast a produkovala záření s vysokou intenzitou.

■ Možnost provedení analýzy plynů

Funkcionalita spektrofotometru by se také mohla rozšířit o analýzu plynů. Řada látek v plynném stavu absorbují UV-VIS záření. Jsou to, například, páry rtuti, chlor a oxid siřičitý. Měření koncentrace bychom mohli provádět využitím mikropumpy nebo mikroventilátoru, které by umožňovali proudění plynu skrz speciální květu na měření plynů s větší délkou absorbující vrstvy.

Kapitola 10

Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce byl návrh a realizace spektrofotometru, který by umožnil analýzu tekutin.

Teoretická část práce představuje komplexní pohled na problematiku molekulové absorpční spektrometrie v UV-VIS oblasti. V této části jsme nejdříve měli za účel pochopit fyzikální principy interakce hmoty a záření, na nichž je založen obor spektroskopie. Využitím poznatků v daném oboru, velkou pozornost jsme pak věnovali popisu spektrometrické instrumentaci, včetně zdrojů a detektorů záření, optické cesty a typu uspořádání jednotlivých spektrometrů. Nakonec, provedli jsme rešerši využití spektrofotometrie ke kvalitativní a kvantitativní analýze látek. Na konci teoretické části jsme sumarizovali parametry komerčně dostupných spektrofotometrů.

V praktické části práce jsme na základě nabytých znalostí navrhli a následně pomocí 3D tiskárny vytiskli kostru našeho přístroje, jehož optická cesta byla realizována v jednopaprskovém uspořádání. Jako zdroj záření jsme použili vlastně vyrobenou desku plošných spojů s pěti LED diody a možností měnit jejich intenzitu. Nakonec, zvolili jsme vhodné pro naše účely optické materiály, chemikálie a rozpouštědlo.

Realizovaný spektrofotometr jsme otestovali využitím softwaru OceanView na vybraných tekutinách. Hlavním výstupem z provedené analýzy je plně funkční zařízení, které splňuje požadavky na měření jak absorpčního spektra, tak i stanovení koncentrace vybraných látek.

Dalším krokem ve vývoji spektrofotometru by mohla být implementace navržených vylepšení uvedených v kapitole 9.



Literatura

- [1] JULY, Thomas, Mark HENNINGS a Jimin KHIM. Poynting Vector [online]. [cit. 2019-12-17]. Dostupné z: <https://brilliant.org/wiki/poynting-vector/>
- [2] PANKRÁC, V. Pomocné texty k přednáškám z teorie elektromagnetického pole [online]. , str. 10 [cit. 2019-12-17]. Dostupné z: https://elmag.fel.cvut.cz/sites/default/files/users/pankrac/files/text_A1B17EMP_22_leden_2016.pdf
- [3] Photomedicine [online]. [cit. 2020-01-02]. Dostupné z: <https://www.clinuvel.com/photomedicine/physics-optics-skin/electromagnetic-spectrum/understanding-the-electromagnetic-spectrum>
- [4] Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration [online]. [cit. 2020-01-31]. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2016.0182>
- [5] ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [6] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. Fyzikální chemie. v Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [7] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Analytická chemie. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [8] AKASH, Muhammad Sajid Hamid a Kanwal REHMAN. Essentials of Pharmaceutical Analysis: Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy [online]. Springer, Singapore, 2020 [cit. 2020-02-01]. ISBN 978-981-15-1547-7.
- [9] Portable UV-Near IR Spectrometer [online]. In: . [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: <http://fab.cba.mit.edu/classes/862.19/people/filippos/links/final-projects/spectrometer/index.html>

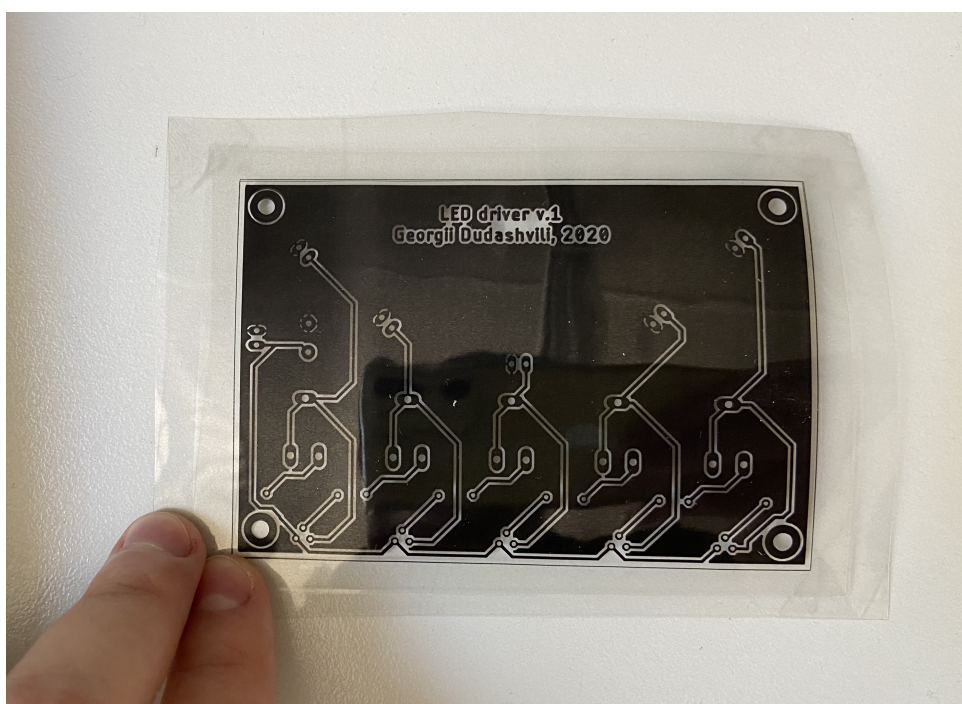
- [10] In: Biochemistry Den: Spectrophotometer Instrumentation: Principle and Applications [online]. [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.biochemden.com/spectrophotometer-instrumentation-principle/>
- [11] In: EDN: Extend the life of LED lighting systems with thermal management [online]. [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.edn.com/extend-the-life-of-led-lighting-systems-with-thermal-management/>
- [12] [online]. In: . [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.premierlabsupply.com/product/deuterium-lamp-uv-20054-3-det/>
- [13] Halogenové žárovky od společnosti OSRAM – jasné světlo s širokými možnostmi použití [online]. In: . [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://www.ledvance.cz/produkty/znalosti-produktu/halogenove-svetelne-zdroje/index.jsp>
- [14] Hollow cathod lamps [online]. In: . [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/Hollow_TLS1014E.pdf
- [15] [online]. In: . [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <http://www.tutorsglobe.com/homework-help/chemistry/lasers-710023.aspx>
- [16] In: LTB: MNL 330 [online]. [cit. 2020-04-11]. Dostupné z: <http://www.ltb-berlin.de/en/products/lasers/mnl-330/>
- [17] In: Hamamatsu: Photomultiplier tubes (PMTs) [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/optical-sensors/pmt/pmt_tube-alone/index.html
- [18] In: Physics and-radio-electronics: Photodiode [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.physics-and-radio-electronics.com/electronic-devices-and-circuits/semiconductor-diodes/photodiodesymboltypes.html>
- [19] ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [20] NĚMCOVÁ, Irena, Ludmila ČERMÁKOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ. Spektrometrické analytické metody. Praha: Univ. Karlova, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [21] In: RP Photonics Encyclopedia: Monochromators [online]. [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://www.rp-photonics.com/monochromators.html>
- [22] In: Vision Doctor: Interference filters [online]. [cit. 2020-07-08]. Dostupné z: <https://www.vision-doctor.com/en/interference-filters.html>
- [23] In: Shimadzu: Cuvettes For Spectrophotometry [online]. [cit. 2020-07-09]. Dostupné z: <https://shimadzu.com.au/cuvettes-spectrophotometry>

- [24] In: Lab-Training: Benefits of Photodiode Array Detection over conventional Scanning detection [online]. [cit. 2020-07-10]. Dostupné z: <https://lab-training.com/2015/07/13/benefits-of-photodiode-array-detection-over-conventional-scanning-detection/>
- [25] BRAGA, Mauro Sergio, Osmar Francisco GOMES, Ruth Flavia Vera Villamil JAIMES, Edmilson Roberto BRAGA, Walter BORYSOW a Walter Jaimes SALCEDO. Multispectral colorimetric portable system for detecting metal ions in liquid media. In: 2019 4th International Symposium on Instrumentation Systems, Circuits and Transducers (INSCIT) [online]. IEEE, 2019, 2019, s. 1-6 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1109/INSCIT.2019.8868861. ISBN 978-1-7281-2109-3. Dostupné z: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8868861/>
- [26] In: Edinburgh Instruments: What is a Spectrometer? [online]. [cit. 2020-07-13]. Dostupné z: <https://www.edinst.com/blog/what-is-a-spectrometer/>
- [27] In: Prof. Dr. Ing. Richard KOPLÍK: Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti [online]. [cit. 2020-07-15]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf
- [28] In: The University of Queensland (UQ): Spectrophotometry [online]. [cit. 2020-07-28]. Dostupné z: <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/spectrophotometry>
- [29] Metash instrument Co.,Ltd: UV-6100 UV/VIS Spectrophotometer [online]. [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: http://en.metash.com/ProductShow_154.html
- [30] Metash instrument Co.,Ltd: UV-8000ST Double Beam UV/VIS [online]. [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: http://en.metash.com/ProductShow_200.html
- [31] Thermo Fisher Scientific: GENESYS™ 10S UV-Vis Spectrophotometer [online]. [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/840-208100#/840-208100>
- [32] Thermo Fisher Scientific: Evolution™ 350 UV-Vis Spectrophotometer [online]. [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/840-310800?SID=srch-srp-840-310800#/840-310800?SID=srch-srp-840-310800>
- [33] [online]. In: . [cit. 2020-02-04]. Dostupné z: <https://www.oceaninsight.com/products/spectrometers/microspectrometer/sts-series/sts-uv/>
- [34] In: OdKarla: Horské slunce Chirana Sirius R02 [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://www.odkarla.cz/horske-slunce-chirana-sirius-r02>

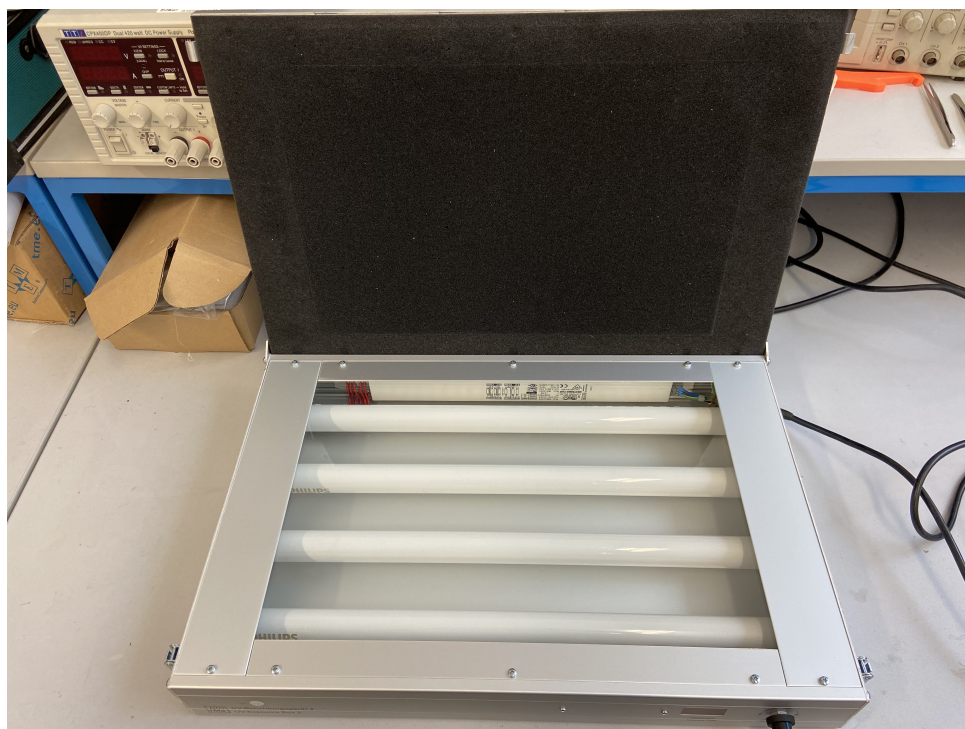
- [35] In: Společnost VERKON s.r.o.: Kyveta spektrofotometrická [online]. [cit. 2020-08-05]. Dostupné z: <https://www.verkon.cz/kyveta-spektrofotometricka/>
- [36] In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-08-07]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_waves.png

Příloha A

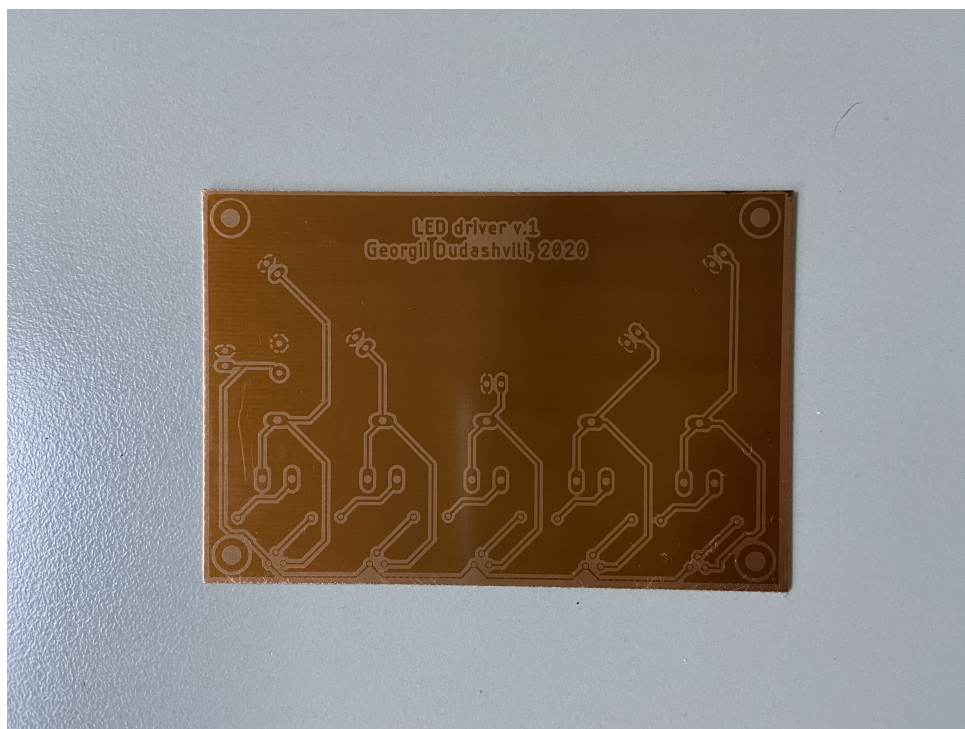
Výroba desky plošných spojů



Obrázek A.1: Vytisknutý motiv spoje



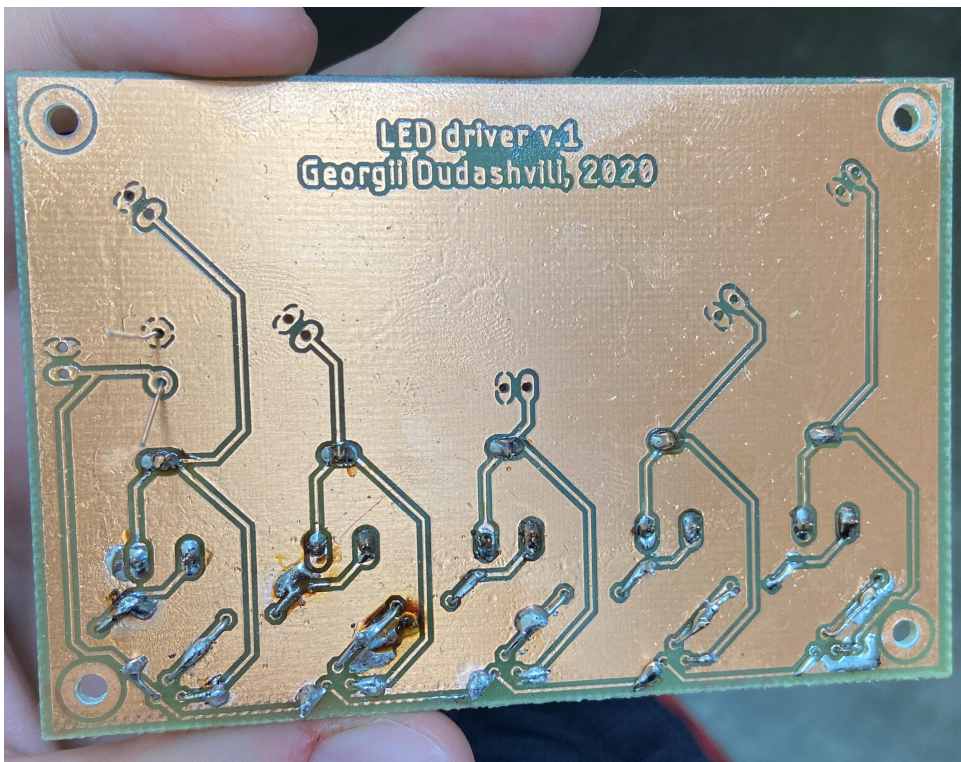
Obrázek A.2: Krabice pro UV osvit



Obrázek A.3: Osvícená deska



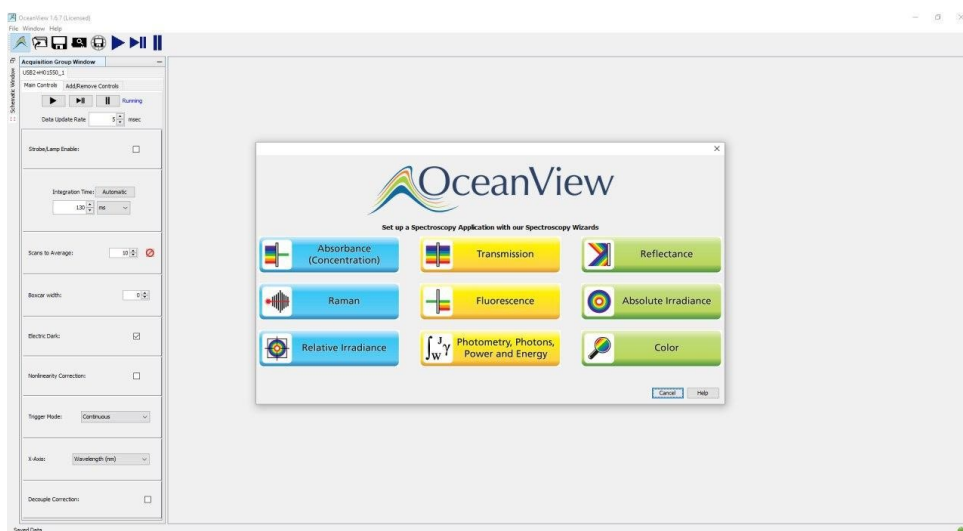
Obrázek A.4: Leptání desky v leptacím roztoku



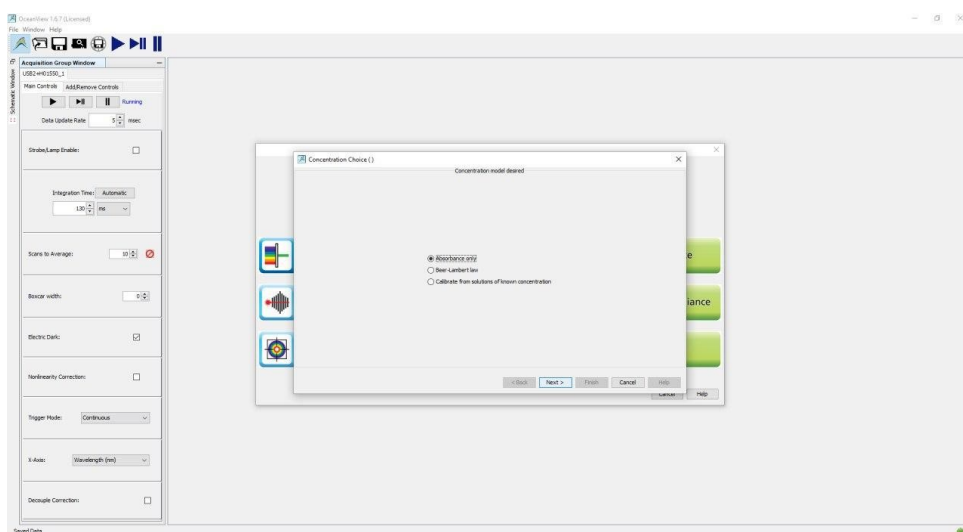
Obrázek A.5: Proces pájení

Příloha B

Měření absorpce a kalibrační křivka

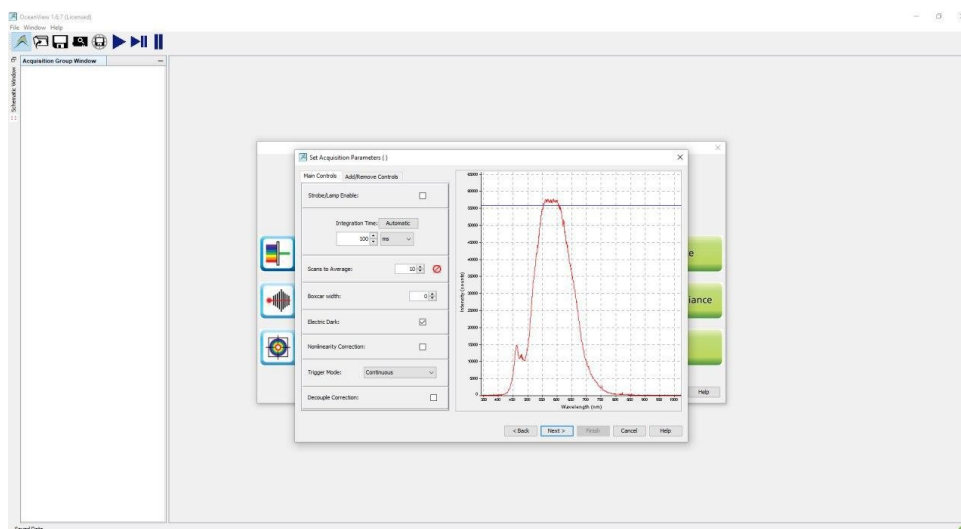


Obrázek B.1: Výběr režimu měření

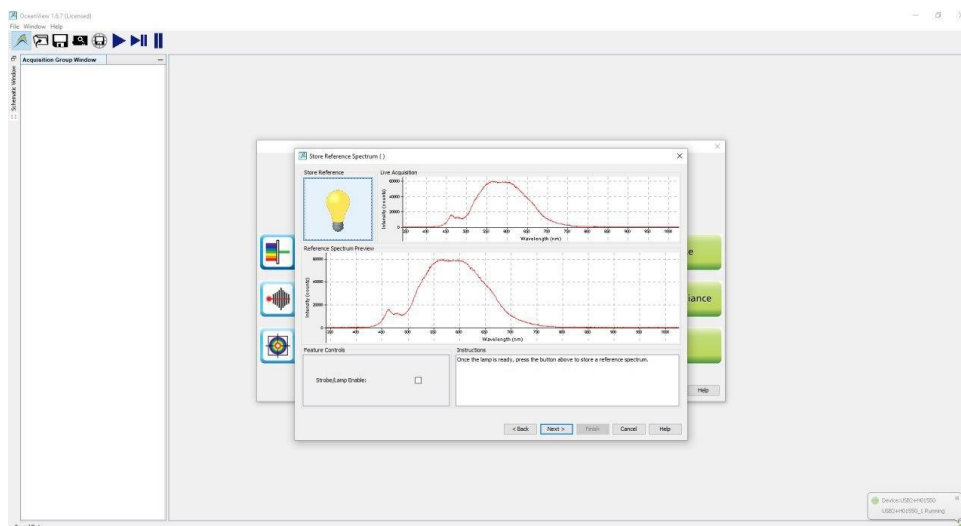


Obrázek B.2: Výběr režimu měření absorpce

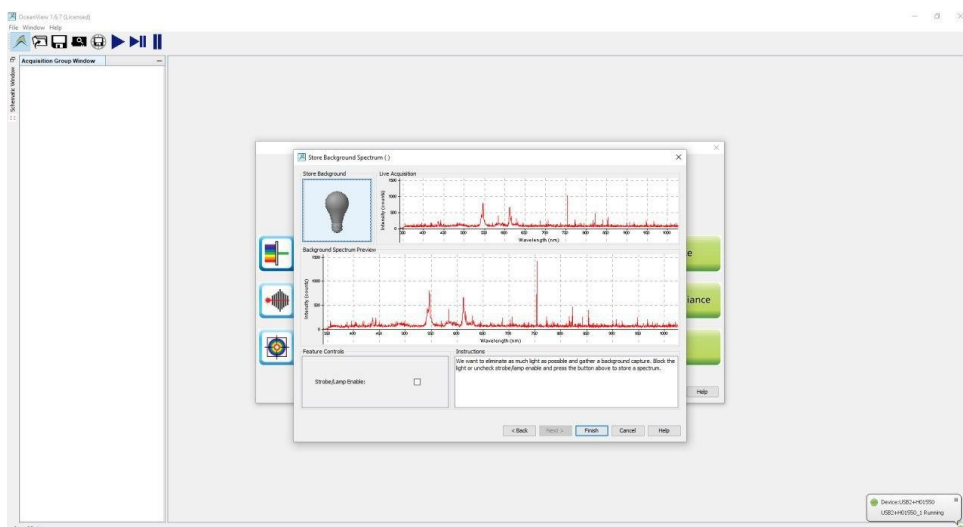
B. Měření absorpce a kalibrační křivka



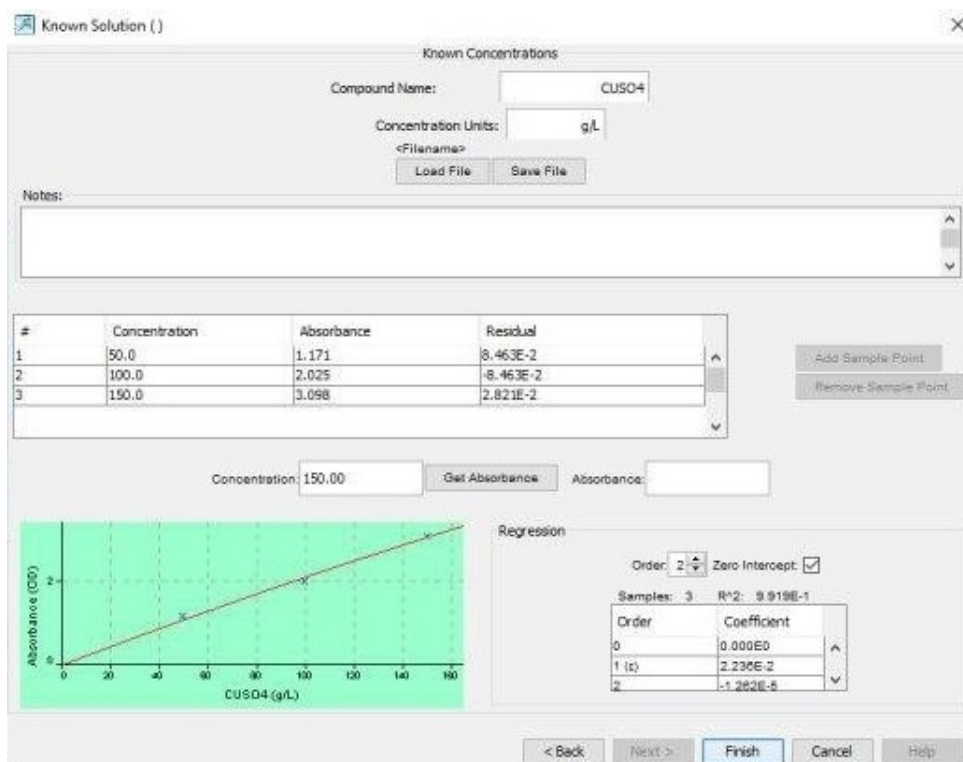
Obrázek B.3: Nastavení parametrů měření



Obrázek B.4: Uložení spektra referenčního vzorku



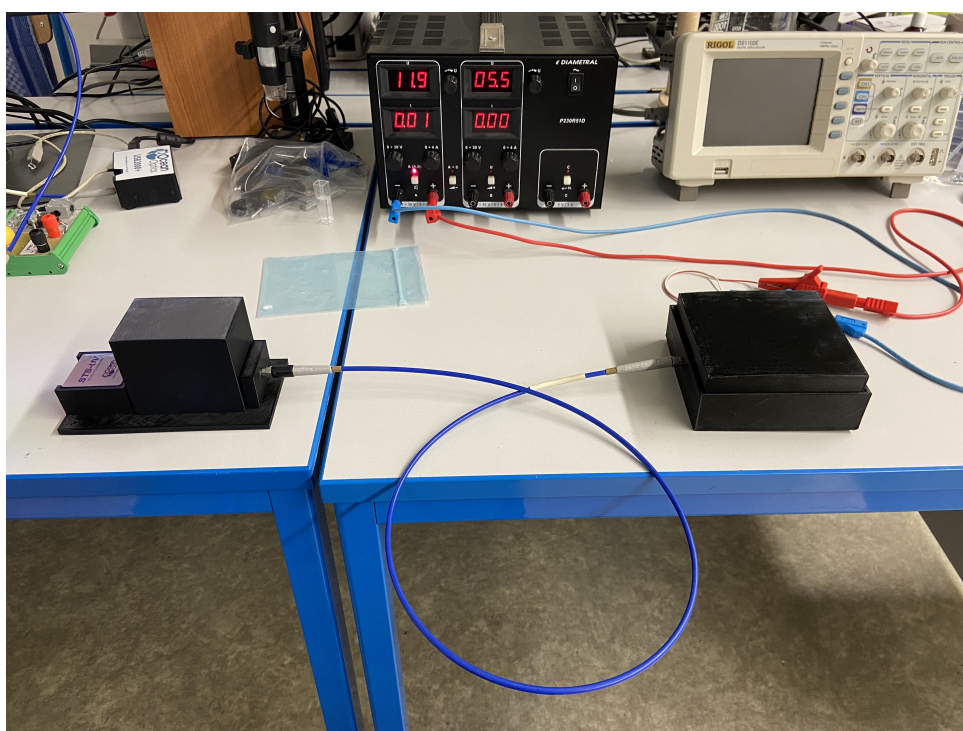
Obrázek B.5: Uložení temného proudu



Obrázek B.6: Kalibrační křivka síranu mednatého

Příloha C

Kompletní uspořádání spektrofotometru



Obrázek C.1: Kompletní uspořádání spektrofotometru