

VÝUKA CHEMIE

EXPERIMENT PRO VÝUKU – FOTOMETRIE

JIRÍ KALINA^a, BARBORA HRVOLOVÁ^b, JANA KROHOVÁ^b, MAROŠ ŠMONDRK^b a MAREK PENHAKER^b

^a Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ^b Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství, FEI, VŠB-Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba

jiri.kalina@osu.cz, barbora.hrvolova@vsb.cz,
jana.krohova@vsb.cz, maros.smondrk@vsb.cz,
marek.penhaker@vsb.cz

Došlo 15.1.13, přijato 9.5.13.

Klíčová slova: fotometrie, absorbance, LED, kvantitativní stanovení

Úvod

Velkou skupinou analytických metod, jež využívají interakce hmoty a elektromagnetického záření, jsou metody spektrometrické. Tyto metody lze rozdělit podle typu interakce na metody nespektroskopické a spektroskopické. O nespektroskopické metody se jedná v případě, že sledujeme změny některých vlastností záření (např. směr, rychlost, rovinu polarizace po průchodu záření hmotou). Při spektroskopických metodách většinou sledujeme absorpci záření po průchodu hmotou. Spektrometrie se zabývá vznikem, vlastnostmi a interpretací spekter všech druhů^{1,2}.

Tato práce se zabývá návrhem zařízení, které využívá jednu ze spektrometrických metod.

Fotometrie umožňuje kvantitativní stanovení určité látky v roztoku na základě absorpce světla o dané vlnové délce (λ), přičemž u spektrofotometrie je zkoumána absorpce procházejícího záření při různých vlnových délkách^{1,2}.

Při průchodu optického záření absorbujícím prostředím dochází ke snižování jeho intenzity. Velikost útlumu monochromatické vlny o frekvenci (ν) se nejčastěji charakterizuje prostřednictvím absorbance $A(\lambda)$ (cit.¹).

$$A(\lambda) = \log[I^0(\lambda)/I(\lambda)] \quad (1)$$

kde $I(\lambda)$ je velikost intenzity záření monochromatické vlny o frekvenci ν po průchodu látkou a $I^0(\lambda)$ je její počáteční hodnota¹.

V optickém prostředí, které lze makroskopicky popsat komplexním indexem lomu, klesá intenzita exponenciálně s dráhou, kterou záření urazí. Tuto závislost vyjadřuje tzv. Lambertův zákon.

Jedním z nejčastějších typů vzorků proměřovaných v absorpční spektrofotometrii či fotometrii jsou zředěné roztoky jednoho druhu absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle. Z toho vyplývá, že dalším důležitým parametrem pro fotometrická měření je molární koncentrace analytu^{1,3}. Koncentrační závislost absorpčního koeficientu vyjadřuje Beerův zákon³.

Výše uvedené zákony jsou obvykle spojovány do tzv. Lambertova-Beerova zákona³:

$$-\log(I/I_0) = A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) C x \quad (2)$$

kde $\varepsilon(\lambda)$ je molární absorpční koeficient, C je molární koncentrace roztoku [mol l^{-1}] a x je dráha.

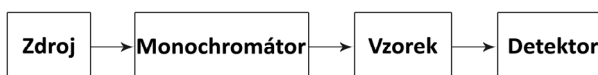
Tento zákon vyjadřuje závislost mezi absorbancí, délkou dráhy absorbujícího prostředí a koncentrací absorbující látky. Jelikož je tato závislost pro silně zředěné roztoky jednoho druhu absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle lineární, dá se jí využít ke zjištění neznámé koncentrace daného vzorku.

Pomocí fotometrie lze stanovit koncentraci všeho, co je barevné, tedy např. roztoky měďnatých, železnatých, železitých iontů, krevního barviva hemoglobinu či bilirubinu, což jsou látky běžně stanovené v biochemických a biomedicínských laboratořích⁴.

Na trhu je dostupných několik typů zařízení umožňujících stanovení fotometrickou metodou^{5,6}. Nejčastěji používaným a zároveň nejdražším řešením jsou spektrofotometry, které se skládají ze čtyř základních částí, zdroje polychromatického záření, monochromátoru, který slouží k výběru požadované vlnové délky, absorpčního prostředí – vzorku a detektoru, kterým je nejčastěji fotonásobič (obr. 1). Spektrofotometry nám umožňují získat komplexní informaci o míře absorpce dané látky, a to nejčastěji ve viditelné a ultrafialové oblasti vlnového spektra. Z výsledné závislosti absorbance na vlnové délce, tedy absorpčního spektra, je možné určit látkové složení neznámého vzorku.

Dalším dostupným typem jsou např. jednocelové kapesní fotometry od Fisher Scientific nebo Hanna Instruments^{5,6} atd. (obr. 2).

Námi navržené zařízení je 20krát levnější než nejlevnější jednocelové kapesní fotometry^{5,6}, přičemž může dosáhnout obdobných výsledků. Díky své jednoduchosti a nízké pořizovací ceně by mohl tento přístroj sloužit



Obr. 1. Blokové schéma spektrofotometru



a

b

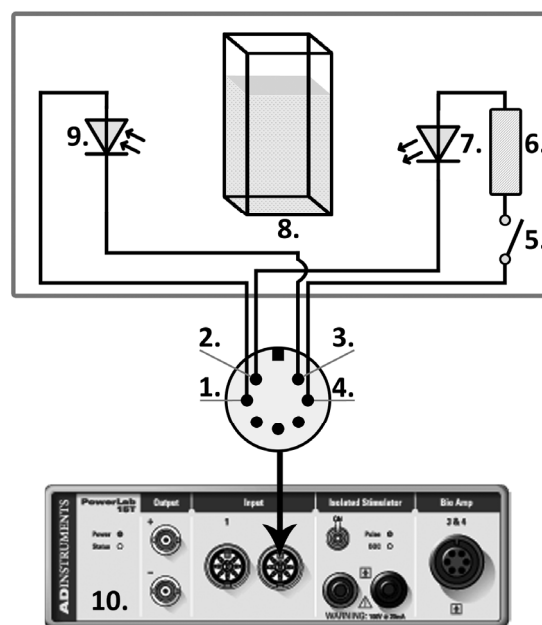
Obr. 2. **Komerčně dostupné fotometry**; A – fotometr s wolframovou lampou a interferenčním filtrem¹⁰, B – fotometr s barevnou LED diodou¹¹

k levné analýze vzorků a především k výuce základních fotometrických principů při různých laboratorních cvičeních.

Návrh a realizace fotometru pro výuku

Hlavní myšlenka vedoucí ke zhotovení jednoduchého fotometru spočívá v přímém použití monochromatického zdroje záření namísto polychromatického zdroje s monochromátorem. Aby však bylo možné jednoduchý fotometr použít, musíme znát absorpční spektrum nebo alespoň absorpční maximum dané látky kvůli výběru monochromatického zdroje záření, kterým je LED dioda s příslušným emisním maximem. V dnešní době je možné pořídit mnoho typů LED diod s různými vlnovými délkami emise⁷. Nejběžnější a nejlépe dostupné jsou LED diody s emisním maximem ve viditelné oblasti spektra, ale dostupné jsou i LED diody s emisním maximem v ultrafialové i infračervené oblasti spektra⁷.

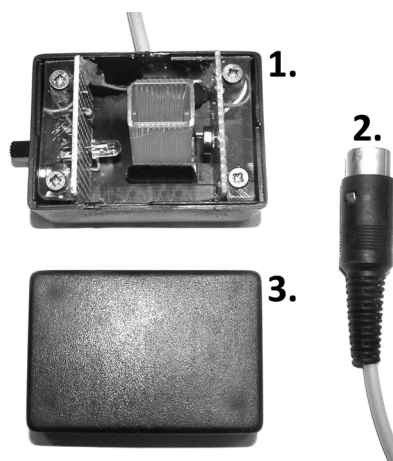
Navržené zařízení obsahuje pouze analogovou část. Skládá se z vypínače, LED diody, plastové kyvety a fotodiody (obr. 3). Jako zdroj záření byla použita LED dioda 520PG2C s dominantní vlnovou délkou 525 nm a vyzářovacím úhlem od 17° do 23° (cit.⁸). Tato LED dioda se dá jednoduše zaměnit za LED diodu s jinou dominantní vlnovou délkou. Záření prochází komorou délky 3 cm, ve které je v kyvetě umístěný vzorek o max. objemu dle rozměrů kyvety 1 cm x 1 cm x 4,4 cm, tedy cca 3,5 ml. Detektor tvoří fotodioda BPW21 schopná detekce záření v rozsahu od 350 nm až 820 nm a s maximální citlivostí na vlnové délce 550 nm (cit.⁹). Výstupem je měřená hodnota napětí, jako důsledek záření dopadajícího na detektor (řádově od 0 až 400 mV). Výstup a vstup našeho zařízení je realizovaný pomocí DIN konektoru. DIN konektor je přivedený na akviziční jednotku – DAU (PowerLab 15T, ADInstruments, Nový Zéland) pro následné zpracování. PowerLab 15T umožňuje ukládání naměřených hodnot do databáze. Navržené zařízení je snadno modifikovatelné. Malými



Obr. 3. **Blokové schéma navrženého fotometru s akviziční jednotkou PowerLab 15T**; 1 – signálový vstup, 2 – analogová zem, 3 – signálová zem, 4 – napájecí napětí 5 VDC, 5 – vypínač, 6 – rezistor, 7 – LED, 8 – plastová kyveta, 9 – fotodioda, 10 – DAU PowerLab 15T

úpravami je možno napájení (vstup zařízení) nahradit např. baterií, USB kabelem, výstup zařízení pak může být snímán např. běžně dostupným multimetrem, nebo pomocí různých akvizičních jednotek. Pro zvýšení přesnosti měření je možné zabezpečit konstantní intenzitu vyzářování, a to proudovým stabilizátorem.

Navrhované zařízení je malé, kompaktní, přenosné a uložené v otevíratelné krabičce o velikosti 6,5×4,5×8 cm. Fotometr musí být uložen v světlotěsné krabičce, abychom



Obr. 4. **Navržené fotometrické zařízení**; 1 – analogová část, 2 – DIN konektor, 3 – obal

zabránili dopadu parazitního záření na detektor. Takovéto parazitní záření by způsobilo významnou chybu měření. Zařízení je napájeno zdrojem 5 VDC přes DIN konektor z DAU (PowerLab 15T) (obr. 4).

Vzhledem k možnosti výměny zdroje záření uživatelem (LED diody o jiné emisní vlnové délce), je možné toto technické řešení využít pro celou řadu roztoků, které absorbují jak ve viditelné, tak i v blízké ultrafialové i infračervené oblasti elektromagnetického spektra. Po výměně LED diody je důležité její vycentrování do optické osy. Vycentrování se provádí dle maximální odezvy detektoru při zapnuté LED diodě. Výhodami je tedy modulárnost, jednoduchost konstrukce a rychlost měření.

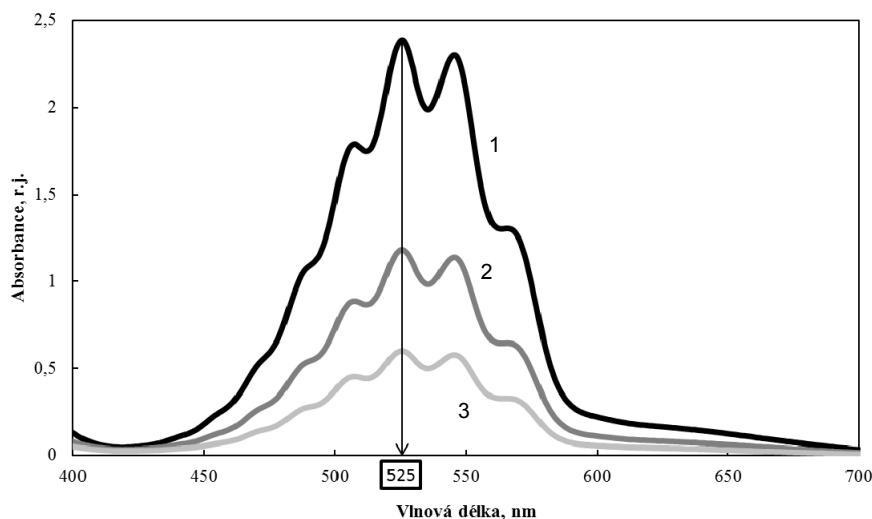
Experimentální část

Navržené zařízení slouží především k určení neznámé koncentrace známého analytu. Standardní metodou používanou ve fotometrických metodách ke zjištění neznámé koncentrace známého vzorku je sestavení kalibrační přímky, tedy závislosti absorbance stanovené látky na její koncentraci. Pomocí našeho zařízení získáme závislost výstupního napětí na koncentraci měřeného roztoku.

Testovací měření jsme prováděli za laboratorních podmínek. Pro testovací měření jsme použili manganistan draselný (KMnO_4), který absorbuje v oblasti vlnových délek od 400 do 600 nm a jehož hlavní absorpční maximum je 525 nm (obr. 5).

Z tohoto důvodu jsme pro stanovení této látky použili v námi navrženém zařízení jako zdroj záření LED diodu s emisním maximem o dominantní vlnové délce 525 nm.

Ke zhotovení kalibrační přímky potřebné k určení koncentrace neznámého vzorku jsme připravili sadu kalibračních roztoků o koncentracích 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,001 mM KMnO_4 .



Obr. 5. Absorpční spektrum tří různých koncentrací roztoku KMnO_4 ; absorpční maximum KMnO_4 – 525 nm, (1) černá čára – 1 mM roztok KMnO_4 , (2) tmavě šedá čára – 0,5 mM roztok KMnO_4 , (3) šedá čára – 0,25 mM roztok KMnO_4

Navržené zařízení bylo připojeno přes DIN konektor do akviziční jednotky PowerLab 15T, která byla zapojena přes USB rozhraní do počítače. Pro zobrazení a měření výstupního napětí jsme použili softwarové rozhraní LabTutor (ADI Instruments, Nový Zéland).

Z naměřených hodnot výstupního napětí a použitých koncentrací jsme sestrojili kalibrační křivku (obr. 6). Kalibrační přímku jsme získali proložením naměřených hodnot lineární spojnicí trendu (Microsoft Excel verze 2010). Pro tuto modelovou křivku jsme vypočítali její rovnici (3) a koeficient determinace (R^2), (Microsoft Excel verze 2010).

$$y = -41,152x + 199,29 \quad (3)$$

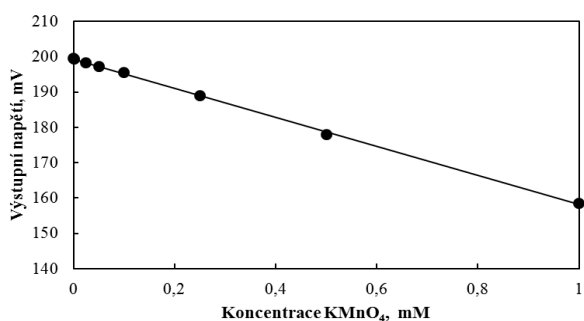
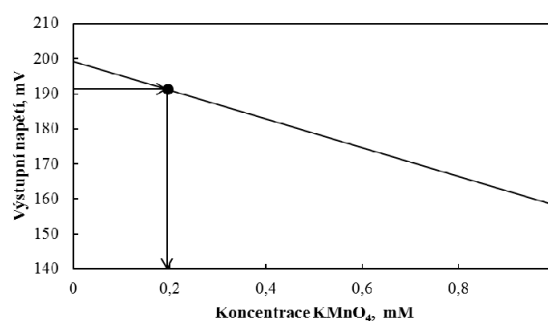
Hodnota koeficientu determinace byla pro náš model rovná 0,9994.

Koncentraci vzorku KMnO_4 o neznámé koncentraci určíme výpočtem z rovnice (3) našeho lineárního modelu dosazením naměřené hodnoty výstupního napětí tohoto vzorku.

Dalším způsobem, jakým je možné určit koncentraci vzorku o neznámé koncentraci z kalibrační přímky, je grafická metoda (obr. 7).

Při našem kontrolním experimentu jsme zředili vzorek o 1 mM koncentraci KMnO_4 na koncentraci 0,2 mM. Tento vzorek jsme považovali za vzorek o neznámé koncentraci. Po proměření tohoto vzorku jsme získali hodnotu výstupního napětí fotometru 191,2 mV. Po dosazení změřeného napětí do rovnice lineárního modelu (3) jsme vypočítali hodnotu koncentrace 0,197 mM.

Stejného výsledku jsme dosáhli i grafickou metodou (obr. 7).

Obr. 6. Kalibrační křivka – závislost výstupního napětí na koncentraci KMnO_4 Obr. 7. Stanovení neznámé koncentrace KMnO_4 z kalibrační křivky pomocí grafické metody. Odečtením výstupního napětí a vedením rovnoběžky s osou x získáme průsečík s kalibrační přímkou a poté vedením rovnoběžky s osou y můžeme odečíst koncentraci roztoku

Závěr

Hlavním cílem této práce bylo vytvořit účelové, cenově dostupné, komplexní, malé a přenosné zařízení pro fotometrická měření. Naše navržené zařízení je hlavně určeno pro určování koncentrace vzorků a výuku fotometrických principů na středních popř. základních školách. Díky své modulárnosti je využitelné ve více aplikacích. Výstupy měření mohou být jak analogové (zobrazení výstupu na osciloskopu, multimetru), tak digitální (zobrazení výstupu na PC přes DAU jednotku). Pomocí našeho zařízení je možné stanovit všechny běžné látky, které absorbují ve viditelné a blízké UV oblasti. Je možné stanovit koncentraci např. roztoků měďnatých, železnatých, železitých iontů, hemoglobinu a bilirubinu, což jsou látky běžně používané v chemických i biomedicinských laboratořích. Musí se však znát jejich absorpční spektrum nebo aspoň hlavní absorpční maximum, aby bylo možné správně vybrat a použít LED diodu s příslušným emisním maximem.

Článek je podpořen v rámci projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR. Dále je podpořen projektem SGS SP2013/35 „Biomedicínské inženýrské systémy IX“ a projektem TACR SCADA systém pro řízení a monitorování procesů v reálném čase TA01010632. Část článku je podpořena také z projektu IT4 Innovation Centrum excellence, reg. č. CZ.1.05/1.1.00/02.0070, podpořený z operačního programu „Věda a vývoj pro inovace“ podpořená ze strukturálních fondů a Evropské unie a státního rozpočtu České republiky.

LITERATURA

1. Kalina J., Špunda V.: *Optická spektroskopie I*, str. 96. Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava 2004.

2. Harris D. A.: *Light Spectroscopy*. Bios Scientific Publishers, Oxford 1996.
3. Prosser V. a spol.: *Experimentální metody biofyziky*, str. 315. Academia, Praha 1989.
4. Mieczkowska E., Koncki R., Tymecki L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 9, 399 (2011).
5. <http://www.hanna-instruments.cz>, staženo 12. září 2012.
6. <http://www.fishersci.com/ecom/servlet/cmstatic?href=index.jsp&store=ScienceEducation&segment=scienceEduStandard&storeId=10652>, staženo 12. září 2012.
7. <http://www.gme.cz/optosoucastky>, staženo 12. září 2012.
8. <http://www.gme.cz/led-kulate-pouzdro/led-5mm-pure-green-9000-20-p511-434>, staženo 12. září 2012.
9. <http://www.gme.cz/dokumentace/520/520-028/dsh.520-028.1.pdf>, staženo 12. září 2012.
10. www.darumakoi.nl/catalog/images/Testsets/Hanna/enkel%20foto.jpg, staženo 12. září 2012.
11. <http://www.verkon.cz/data/catalog/big/img3503.jpg>, staženo 12. září 2012.

J. Kalina^a, B. Hrvolova^b, J. Krohova^b, M. Šmondrk^b, and M. Penhaker^b (^aDepartment of Chemistry, University of Ostrava, Ostrava, ^bDepartment of Cybernetics and Biomedical Engineering, University of Mining, Technical University, Ostrava): **An Experiment for Teaching – Photometry**

Photometry enables determination of a substance in solution based on the absorption of monochromatic light. A simple photometer was designed, which can serve for teaching the principles of photometry and photometric determinations. The designed photometer is small, compact, modular, portable and inexpensive.