

Naudojamų instrumentų aprašymas

Darbuose naudojami prietaisai:

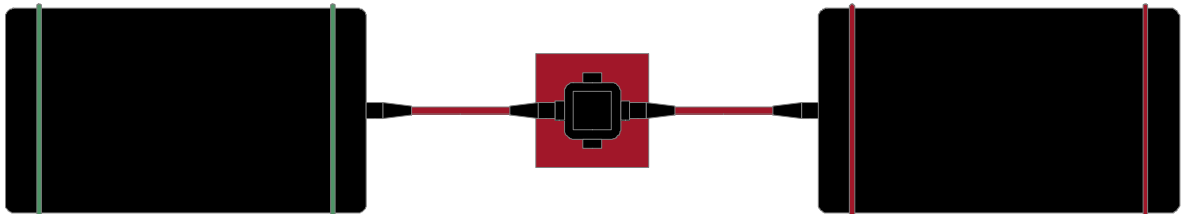
1. Šviesolaidinis spektrofotometras Avantes;
2. Skenuojantis fluorimetras

Sugerties spektrų matavimas

Sugerties spektrus matuojame šviesolaidiniu spektrofotometru Avantes-3648 ar analogišku. Jo schema pavaizduota 1) pav.

[vairiems spektriniam matavimams šioje laboratorijoje naudojama eksperimentinė schema susideda iš šių komponentų:

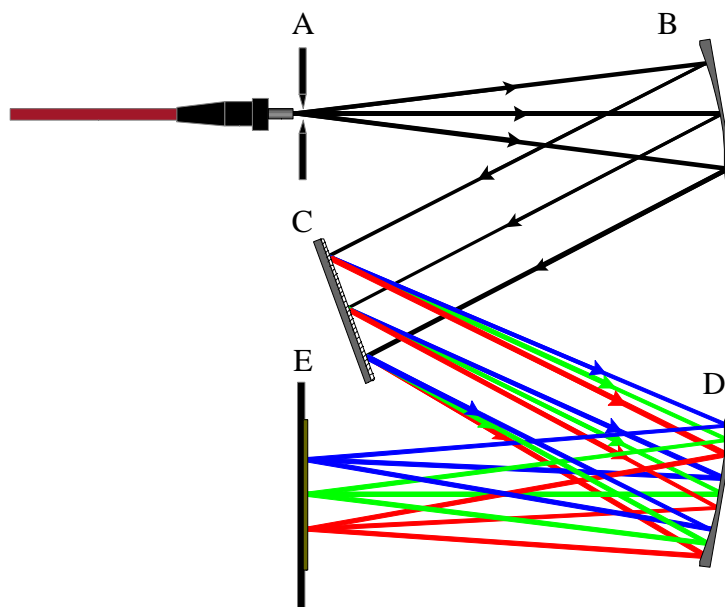
- Šviesolaidinio spektrometro



1) pav. Šviesolaidinio spektrometro schema

- Šviesolaidinio šviesos šaltinio
- Keturių langelių kiuvečių laikiklio
- Jungiamųjų šviesolaidžių

Šia sistema, atlikus nedidelius pakeitimus, galima atlikti sugerties, fluorescencijos ir deguonies koncentracijos matavimus. 1) pav. pateikta paprasčiausia sugerties matavimo schema. Panagrinėsime sistemos komponentus detaliau. Šviesolaidinis spektrometras Avantes AvaSpec-3648 sukomponuotas pagal Cherny-Turner tipo monochromatoriaus schemą (2) pav.). Ji veikia šitaip: šviesa šviesolaidžiu pro įėjimo plyšį (A) patenka į spektrometrą. Pirmasis kolimuojantis sferinis veidrodis (B) patekusią šviesą kolimuoja ir nukreipia į difrakcinę gardelę (C). Nuo jos skirtingų bangos ilgių šviesa atsispindi skirtingais kampais. Šią šviesą antrasis kolimuojantis sferinis veidrodis (D) nukreipia ir fokusuoja į detektorių (CCD ar diodų liniuotę) (E), kuria spektras yra registruojamas ir



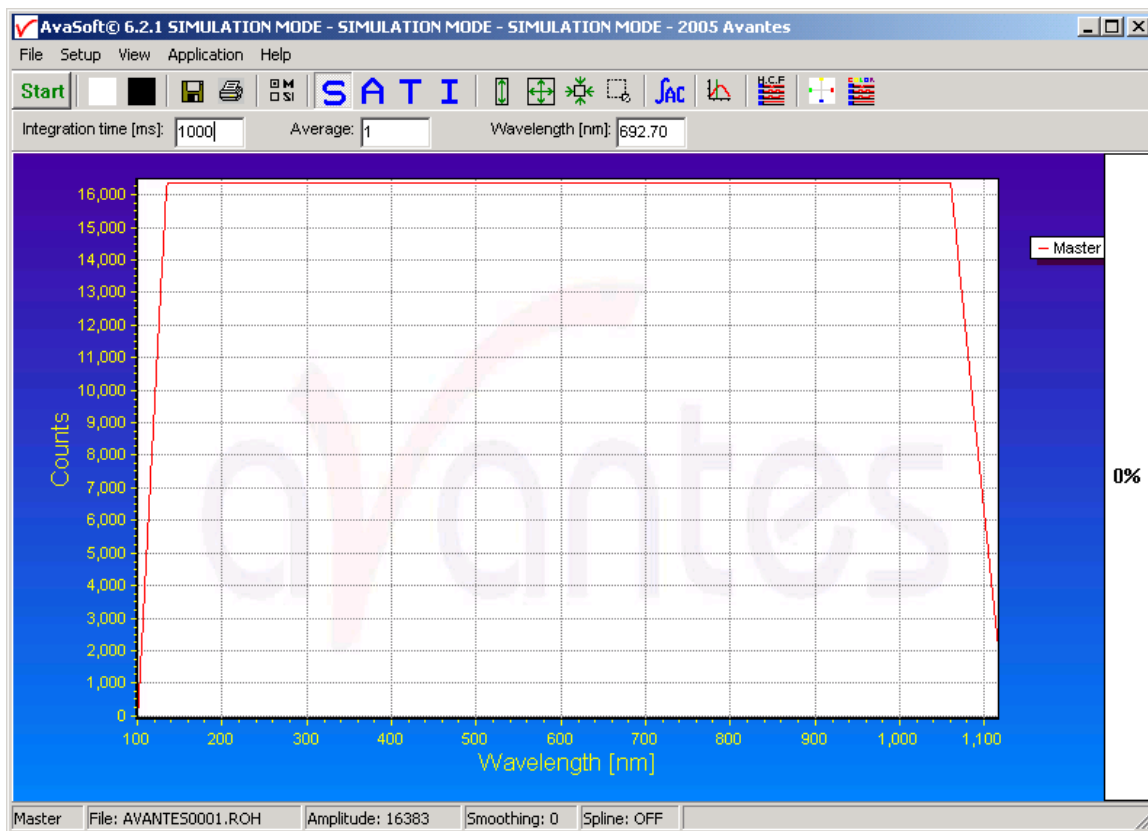
2) pav. Czerny-Turner monochromatoriaus optinė schema

perduodamas į kompiuterį USB 2.0 sąsaja vaizdavimui ar apdorojimui. Pagrindiniai Avantes AvaSpec-3648 šviesolaidinio spektrometro parametrai pateikti 1 lentelėje .

Lentelė 1: Pagrindiniai šviesolaidinio spektrometro AvaSpec-3648 parametrai

Optinė schema	Simetrinė Czerny-Turner, optinio kelio ilgis 75 mm
Spektrinis langas	200 – 1100 nm
Skyra	
Foninė apšvieta	< 0.1 %
Jautrumas (naudojant AvaLight-HAL ir 8 μm šviesolaidį)	14000 s.v./μW (integravimo laikas 1 ms)
Detektorius	CCD liniuotė, 3648 vaizdo elementai
Signalų ir triukšmo santykis	350:1
AD keitiklis	16 bitų, 1 Mhz taktinio dažnio
Galima integravimo trukmė	10 μs .. 10 min
Diskretizacijos sparta su vidurkinimu	3,7 ms vienam matavimui

Darbas su spektrometru. Spektriniai matavimai atliekami programa *AvaSoft*. Jos nuoroda yra ant darbalaukio ir paleidimo meniu. Paleidę programą turėtumėte matyti šitokį vaizdą:



3) Pav. Pradinis AvaSoft vaizdas

Vartotojo sąsaja sudaro šie elementai: meniu juosta, įrankių juosta, nustatymų juosta, informacijos juosta ir matavimo rezultatų langas.

Matavimo režimai



4) Pav. Režimo parinkimo mygtukai

Yra keturi matavimo režimai (4 pav):

- Paprasto vaizdavimo (**Scope**)
- Sugerties (**Absorption**)
- Pralaidumo (**Transmittance**)
- Apšvitos (**Irradiance**)

Eksperimente ketvirtas režimas nebus naudojamas.

Matavimo režimai parenkami įrankių juostoje arba iš **View** meniu.

Integravimo trukmė ir vidutinio spektro matavimas. Kadangi šio spektrometro įėjimo plyšio plotis yra nekeičiamas, reikiamas signalo intensyvumas pasiekiamas integruojant šviesos sugeneruotą krūvį ant CCD liniuotės. Integravimo trukmė milisekundėmis įrašoma nustatymų juostos skiltyje **Integration time [ms]**. Šį parametą galima keisti tik sustabdžius spektro matavimą (įrankių juostoje turi būti žalias užrašas **Start**). Parinkite šią trukmę taip, kad registruojamas šviesos intensyvumas būtų kuo didesnis, tačiau neviršytų maksimalios vertės (16384 arba 65535, priklausomai nuo spektrometro modelio). Taip užtikrinsite geriausią signalo ir triukšmo santykį matuojamuose spektruose.

Patarimas: jei integruojama pakankamai ilgai, **View** meniu patogų pažymėti **Progress Bar Enable** – galėsite matyti, kokia sparta vyksta matavimas ir kiek jo dar liko.

Vidutinio spektro matavimas yra naudinga programos funkcija, statistinėmis priemonėmis leidžianti išskirti signalą iš triukšmo. Visada prieš matuodami atraminis spektrus arba prieš darydami kiekybines išvadas suskaičiuokite kelių ar keliolikos spektrų vidutinę vertę.

Paprasto vaizdavimo režimas pateikia niekaip neapdorotus spektrus, sudėtingesni spektrai paprastai gaunami iš kelių tokiu būdu pamatuotų spektrų.

Pamatuokime vadinamąjį „tamsos“ spektrą. Į šį spektrą įeina įvairi pašalinė apšvita, nesusijusi su tiriamu procesu. Tamsos spektras matuojamas surinkus eksperimentinę schemą bei sujungus visus šviesolaidžius – lygiai tomis pačiomis sąlygomis, kuriomis bus vykdomas eksperimentas. Pakeitus eksperimento schemą, šviesos šaltinį, kokį nors optinį elementą, bandinį ar integravimo trukmę, tamsos spektras matuojamas iš naujo. Turėdami tamsos spektrą galite kaskart matuodami jį atimti iš gaunamo spektro ir taip rezultatuose neatsižvelgti į „parazitinę“ šviesą.

Matavimas vykdomas šitaip:

1. Surinkite eksperimentinę schemą
2. Įjunkite **Scope** režimą
3. Nustatymų juostoje įrašykite reikiamas integravimo ir vidurkinimo (pvz. 5) vertes.

4. Pamatuokite spektrą spausdami **Start**. Rezultatas turėtų būti nedidelio intensyvumo (ne daugiau 100 s.v.), išreikštų maksimumų neturintis spektras.
5. Išmatuotas tamsinis spektras gali būti išsaugomas keliais būdais:
 - a. Meniu juostoje parenkant **File > Save > Dark**
 - b. Nuspaudžiant įrankių juostoje juodą kvadratą (**Save Dark** (5 pav.))



5) Pav. Tamsos (juodas) ir Atraminio spektro (baltas) nustatymo mygtukai

6. Norėdami nustatyti, jog kaskart matuojant išsaugotasis spektras būtų atimamas, parinkite meniu juostoje **Setup > Subtract Saved Dark**

Sugerties spektro matavimas. Sugerties spektras yra šviesos šaltinio (Atraminio) spektro ir registruojamo (Bandinio) spektro skirtumas. *AvaSoft* programoje šiam tikslui yra specialus režimas – Sugerties (**Absorbance**).

Matavimas atliekamas šitaip:

1. Surinkite sugerties matavimo eksperimentinę schemą (1 pav.). Į kiuvetės laikiklį įdėkite iš tokios pat medžiagos pagamintą ir to paties tirpiklio pripildytą kiuvetę, kaip ir bandinio.
2. Įjunkite **Scope** režimą, paleiskite matavimą.
3. Įjunkite šviesos šaltinį.
4. Parinkite tokią integravimo trukmę, kad maksimali intensyvumo vertė būtų kuo didesnė, tačiau detektorius nebūtų persotintas.
5. Vidurkinimo vertę parinkite pagal tai, kiek spektras triukšmingas.
6. Uždenkite šviesos šaltinio optinį kelią (pvz., bandinio vietoje) ir pamatuokite tamsos spektrą (juodas mygtukas). Nustatykite jo kompensavimą.
7. Įjunkite šviesos šaltinį ir pamatuokite “šviesinį” spektrą. Gautasis spektras yra vadinamas atraminiu.
8. Rodomas spektras išsaugomas kaip atraminis keliais būdais:
 - a. Meniu juostoje parenkant **File > Save > Reference**

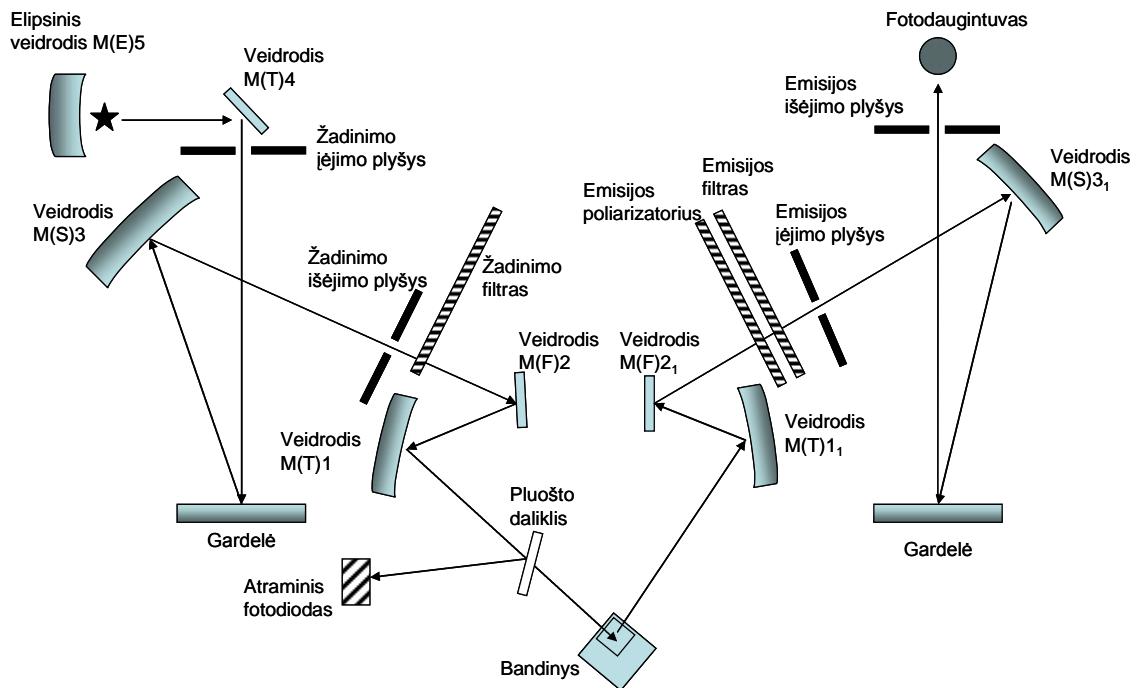
- b. Nuspaudžiant įrankių juostoje baltą kvadratą (**Save Reference**, 5) pav.)
9. Įdėkite bandinį į bandinio laikiklį.
 10. Įjunkite **Absorption** režimą
 11. Dabar galite matuoti bandinio sugerties spektrus. Atminkite, jog pakeitę integravimo laiką turite iš naujo išmatuoti tamsos ir atraminius spektrus, tačiau galite keisti bandinius, jei jie ištirpę tame pačiame tirpiklyje ir įpilti į tos pačios rūšies kiuvetes. Kaip išsaugoti išmatuotus spektrus įvairioms duomenų programoms suprantamu tekstiniu formatu, žr. programos pagalbą.

Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimas

Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai matuojami fluorimetru Perkin Elmer LS55.

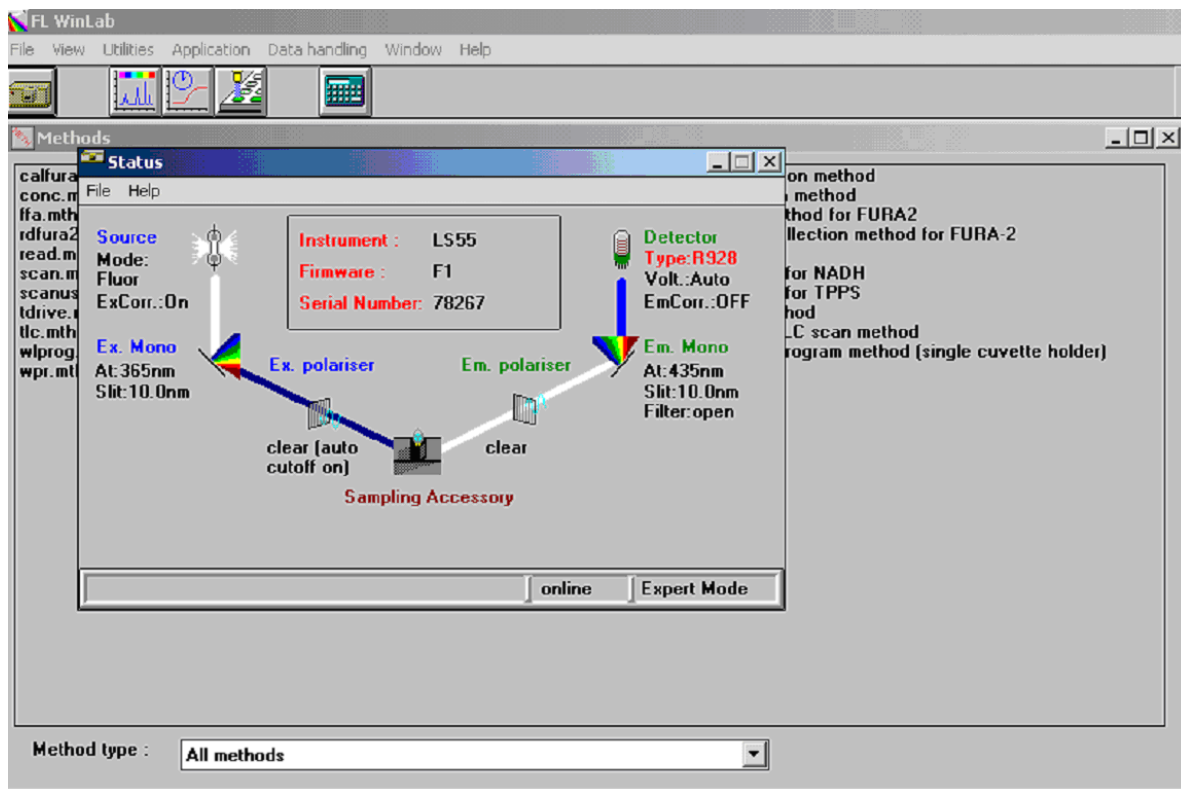
Bendra informacija apie prietaisą

Fluorimetro šviesos šaltinis - ksenono lempa. Šviesa surenkama ir fokusuojama elipsoidiniu veidrodžiu M(E)5 ir toroidiniu veidrodžiu atspindima į žadinančios šviesos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Monochromatorius sudarytas iš įėjimo plyšio, gardelės, sferinio veidrodžio ir išėjimo plyšio. Pro monochromatoriaus išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa, kurios centrinį bangos ilgį nusako gardelės pasukimo kampas. Gardelę sukioja žingsninis variklis. Didžioji žadinančio pluošto dalis toroidiniu veidrodžiu M(T)1 fokusuojama į bandinį, o maža dalis jo energijos pluošto dalikliu



6) pav. Fluorimetro LS55 optinė schema

atspindima į atraminį fotodiodą. Detektoriaus atsakas koreguojamas diodo signalo verte. Korekcijos koeficientas nustatomas pagal standartinio dažiklio, rodamino, korekcinę



7) pav. Fluorimetro elementų valdymo schema

kreivę, įrašytą prietaiso atmintyje. Rodamino dažai sugeria šviesą nuo 230 iki 630 nm bei spinduliuoja apie 650 nm bangos ilgio šviesą su beveik pastoviu kvantiniu efektyvumu.

Mėginio išspinduliuota šviesa fokusuojama toroidiniu veidrodžiu M(T)1 į emisijos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Emisijos monochromatorių, kaip ir žadinančiosios šviesos monochromatorių, sudaro įėjimo plyšys, sferinis veidrodis M(S)3₁, gardelė ir išėjimo plyšys. Pro emisijos monochromatoriaus (taip pat kaip ir pro žadinimo monochromatoriaus) išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa su gardelės apibrėžtu centriniu bangos ilgiu. Gardelės kampas taip pat valdomas žingsniniu varikliuku. Žadinimo ir emisijos monochromatoriai gali skenuoti savo srityse nepriklausomai, sinchroniškai ar tik pažymėtus taškus jų srityse.

Sinchroniškai skenuoti galima pasirinkus bet kurį pastovų bangos ilgių skirtumą ar pastovų energijos skirtumą tarp žadinimo ir emisijos monochromatorių. Monochromatorių spektro sritys yra tokios:

- Žadinimo monochromatoriaus nuo 200 nm iki 800 nm ir nulinė eilė

- Emisijos monochromatoriaus nuo 200 nm iki 900 nm ir nulinė eilė. Prietaiso jautris raudonojoje spektro srityje padidėja nuo 650 nm iki 900 nm, pakeitus standartinį fotodaugintuvą į raudonoje srityje jautresnį fotodaugintuvą R928)

Emisijos spektro matavimas

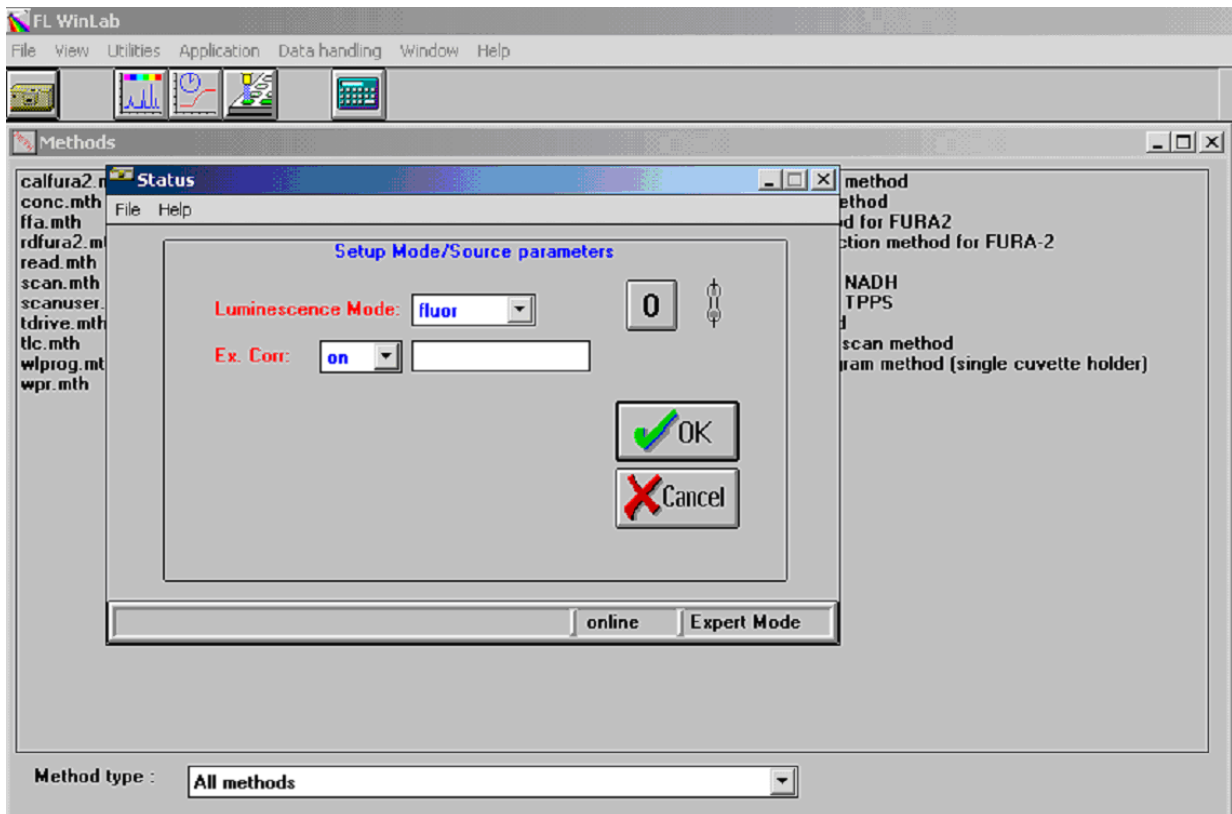
1) Įjungiamas kompiuteris ir fluorescencijos spektrometras (fluorimetras). Prieš matuodami spektrus, leidžiame fluorimetro fotodaugintuvui išilti apie 15 min.

2) Įjungiamas fluorimetro valdymo programa "FL WinLab", kurios piktogramą rasite darbalaukyje. 7) pav. matome fluorimetro elementų valdymo langą. Vieną kartą pele spustelėjus ant vieno iš pavaizduotų prietaiso elementų, atsidaro to elemento valdymo langas (pvz., 8) pav. pateiktas fluorimetro lempos valdymo langas).

3) Atidarome langą *Application>scan*

4) Į fluorimetro kamerą, atidare priekinį gaubtą, įdedame bandinį. Standartinis laikiklis skirtas 1 cm ilgio kvadratinėms kiuvetėms. Uždarome gaubtą.

5) Lange *Application>scan* pasirenkame emisijos langą (3 pav.) Laukeliuose



8) pav. Fluorimetro lempos valdymo langas

Start ir **End** nustatome norimas emisijos spektro ribas, o laukelyje **Excitation** nustatome žadinimo bangos ilgį.

Žadinimo bangos ilgis negali būti fluorescencijos spektro ribose. Žadinimo bangos ilgis turi būti nutolęs nuo fluorescencijos spektro ribų ne mažiau kaip 15 nm.

Laukeliuose **Ex Slit** ir **Em Slit** nustatomi sužadavimo ir emisijos monochromatorių plyšių pločiai. Plyšio plotis gali būti keičiamas, pasiekiant skiriamąją gebą nuo 2,5 nm iki 15 nm žadinimo monochromatoriuje ir nuo 2,5 nm iki 20 nm emisijos monochromatoriuje. Žingsnio dydis – 0,1 nm. Taip pat gali būti parinkta nulinė vertė tiek sužadavimo, tiek emisijos monochromatorių plyšiuose, pasiekiant spektrinę skyrą < 2 nm. Laukelyje **Scan speed** nustatomas skenavimo greitis, nuo kurio priklauso išmatuoto spektro signalo ir triukšmo santykis.

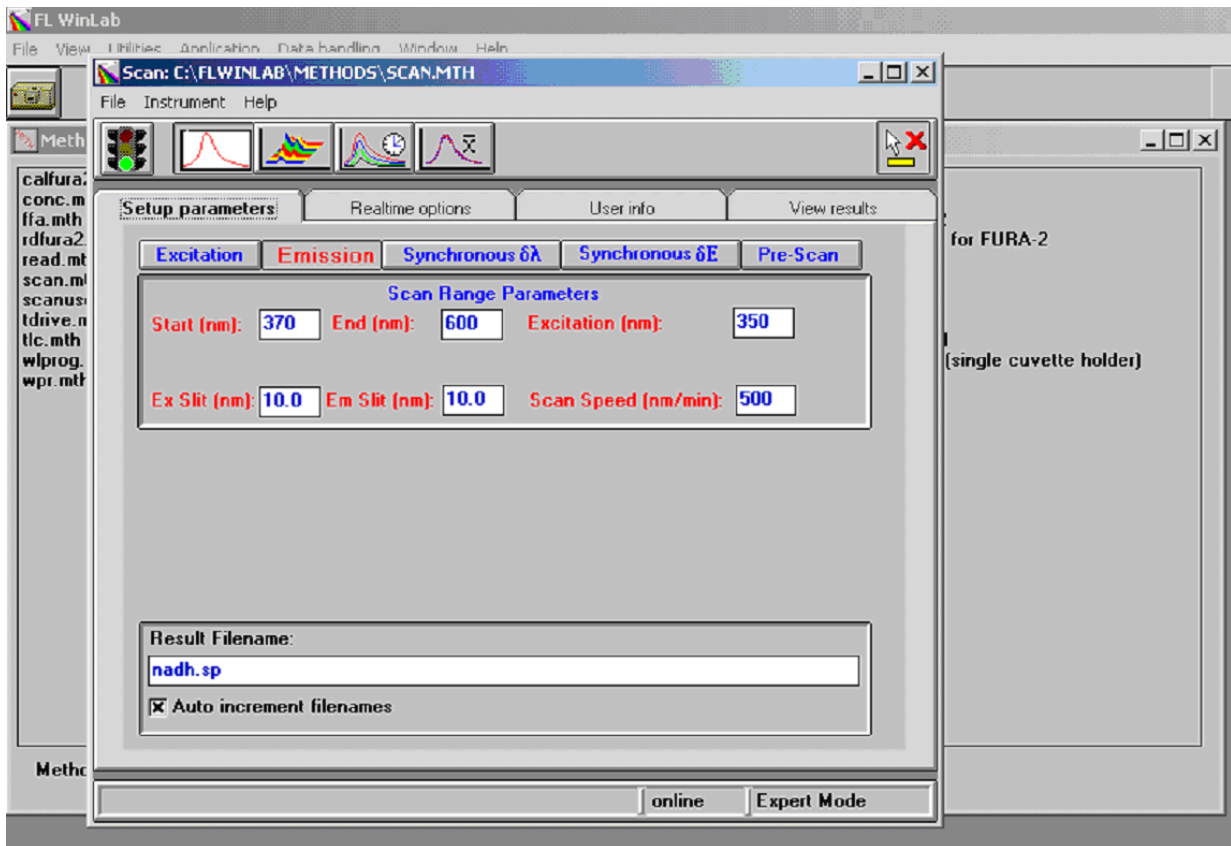
6) Lange **Scan** spaudžiame mygtuką su šviesoforo piktograma - pradedamas matuoti spektras. Spektų failus galima rasti C:\FLWINLAB\DATA.

Žadinimo spektro matavimas

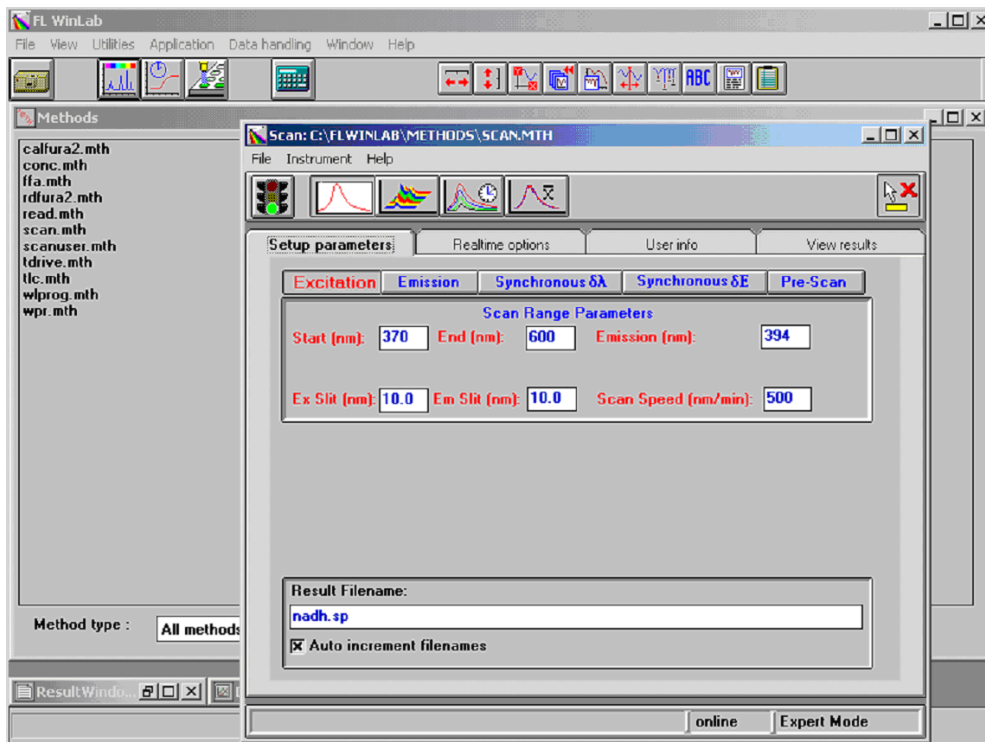
Pirmieji keturi žingsniai – tokie patys kaip ir matuojant emisijos spektrus. Toliau programoje pasirenkame langą **Excitation** (10) pav.). Laukeliuose **Start** ir **End** nustatome reikiamas fluorescencijos žadinimo spektro ribas, o laukelyje **Emission** nustatome fluorescencijos bangos ilgį, ties kuriuo bus matuojamas fluorescencijos intensyvumas.

Fluorescencijos bangos ilgis negali būti fluorescencijos žadinimo spektro ribose. Fluorescencijos bangos ilgis turi būti atitolęs nuo fluorescencijos žadinimo spektro ne mažiau, kaip 15 nm.

Laukeliuose **Ex Slit** ir **Em Slit** nustatomi sužadavimo ir emisijos monochromatorių plyšių pločiai. Plyšio plotis gali būti keičiamas pasiekiant spektro skyrą nuo 2,5 nm iki 15 nm žadinimo monochromatoriuje ir nuo 2,5 nm iki 20 nm emisijos monochromatoriuje. Nustatymo tikslumas - 0,1 nm. Taip pat gali būti parinkta nulinis plyšio plotis, tiek sužadavimo, tiek emisijos monochromatoriuose. Tai užtikrina spektrinę skyrą, kiek geresnę nei 2 nm. Laukelyje **Scan speed** nustatomas skenavimo greitis, nuo kurio priklauso išmatuoto spektro signalo ir triukšmo santykis.



9) pav. Parametrų nustatymų langas emisijos spektrui matuoti



10) pav. Parametrų nustatymų langas žadinimo spektrui matuoti

Nustatę parametrus, lange **Scan** spaudžiame mygtuką su šviesoforo piktograma - pradedamas matuoti spektras. Spektrų failus galima rasti C:\FLWINLAB\DATA.