

E X P E R I M E N T Á L N A T E C H N I K A

Fluorescenční měření universálním spektrofotometrem

E. SMĚKAL

*Katedra lékařské fyziky lékařské fakulty University
J. E. Purkyně, Brno*

V práci je popsána jednoduchá úprava universálního spektrofotometru VSU-1 pro fluorescenční spektrofotometrii a fluorimetrická měření. Ve spojení s liniovým zapisujícím přístrojem je možno přímo registrovat fluorescenční spektra.

Fluorescenční spektrofotometrie a fluorimetrie se stává stále významnější metodou při studiu vlastností látek. Analytické fluorescenční metody svou vysokou citlivostí v mnohých případech předčí běžné metody a dovolují stanovit řadu látek přítomných například v biologickém materiálu (katecholaminy, thiamin apod.) [1]. Většímu rozvoji fluorescenčních měření na našich pracovištích však brání nedostatek vhodných přístrojů. Komerční fluorimetry a fluorescenční spektrofotometry nejsou běžně dostupné, takže za současného stavu se jeví nejefektivnější různé úpravy spektrofotometrů [2—5] pro fluorescenční měření.

V této práci je popsána úprava universálního spektrofotometru VSU-1 fy C. Zeiss, umožňující provádět fluorescenční spektrofotometrii ve viditelné i ultrafialové oblasti. Ve spojení s liniovým zapisujícím přístrojem je pak možno fluorescenční spektra přímo registrovat. Celé zařízení je dále možno použít pro vysoce citlivá fluorimetrická stanovování fluoreskujících látek. Při fluorimetrických měřeních je pak výhodné, že lze snadno měřit libovolnou vlnovou délku fluorescenčního záření vhodným nastavením monochromátoru.

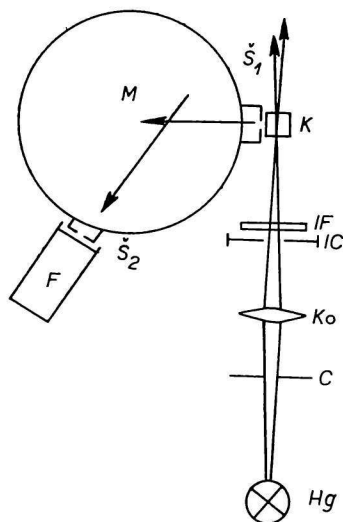
Experimentální část a výsledky

Optická část

Uspořádání měřícího zařízení je na obr. 1. Paprsek ze zdroje prochází clonou, kondensorem, irisovou clonou, výměnným interferenčním filtrem (Metall-Interferenzfilter C. Zeiss) a dopadá na pravouhlou kyvetu umístěnou ve světlotěsném plášti před vstupní štěrbinou zrcadlového monochromátoru VSU-1 C. Zeiss. Emitované fluorescenční záření vystupuje okénkem z kyvety, prochází štěrbinou, optickým systémem monochromátoru, ve kterém je pro spektra ve viditelné oblasti použito skleněného a pro spektra v UV oblasti křemenného hranolu. Výstupní štěrbinou pak vychází světelný paprsek z monochromátoru a dopadá na katodu fotonásobiče umístěného v kovovém pouzdře, které je světlotěsně nasazené na výstupní štěrbinu monochromátoru.

Obr. 1. Schéma optického zařízení pro fluorescenční měření.

Hg — rtuťová vysokotlaká výbojka; C — clona;
Ko — kondenzor; IC — irisová clona; IF —
interferenční filtr; K — kyveta; \check{S}_1 , \check{S}_2 — štěrbi-
ny monochromátoru; M — monochromátor;
F — fotonásobič.



Jako zdroje primárního světla je použito vysokotlaké rtuťové výbojky sovětské výroby, typ DRŠ — 120 V, 250 W; výrobce udává světelný tok 12 500 Lm. Pro tuto výbojku jsme zhotovili ochranný plášť z hliníkového plechu; zadní stěna je parabolického tvaru a celý plášť je vyložen hliníkovou fólií s vysokým leskem. Výbojka je držena zvláštním držákem, který je možno stavěcími šrouby posunovat a takto výbojku přesně centrovat. Výrobce udává, že teplota nesmí ve vzdálenosti 6 cm od stěny lampy překročit 250 °C; v našem zařízení ani po několikahodinovém provozu nepřestoupila přes 60 °C. Výbojka je napájena přes tlumivku stabilizovaným napětím 120 V a její zapálení je provedeno vysokonapětovým startérem z induktoru. K plášti výbojky je připevněn přes izolační tepelnou podložku tubus s kondensorem a irisovou clonou.

Elektronická část

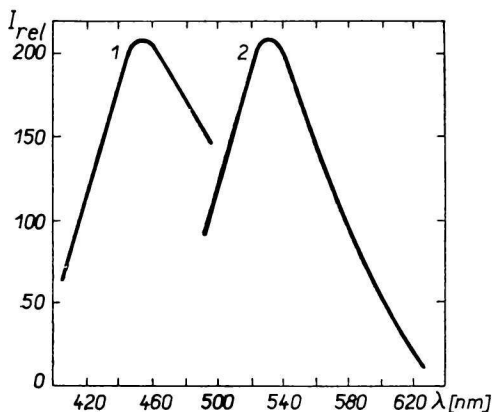
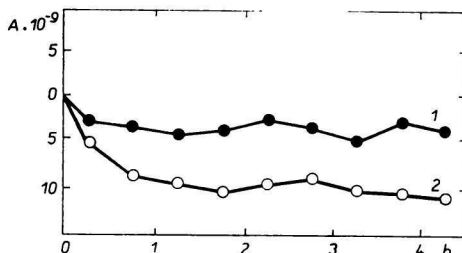
Pro detekci fluorescenčního záření je použito fotonásobičů jednak sovětské výroby, typ FEU 19 M a dále fotonásobiče fy C. Zeiss, typ M10 FS25. Jelikož nebyl k dispozici vhodný zdroj napětí pro fotonásobič, byl též navržen a postaven zdroj stejnosměrného stabilizovaného vysokého napětí [6, 7]. Stabilisátor napětí je konstruktivně jednoduchý a pracuje se stabilitou $2,3 \cdot 10^{-2}$ jmenovitého výstupního napětí 850 V. Současně byl postaven elektronkový voltmetr pro indikaci vzniklých fotonásobičů. Celkové schéma elektronické části je na obr. 2. Napětí ze zdroje VN je odporovým děličem rozděleno na napětí potřebné pro fotonásobič a pro elektronkový voltmetr. Je zde použito můstkové metody, kde dvě ramena jsou tvořena systémem triody 6N8S a v dalších dvou ramenech jsou zapojeny dva pevné odpory 560 k Ω . Indikace rovnováhy můstku je pak provedena měřicím přístrojem (galvanometrem, liniovým registračním přístrojem), který je zapojen v diagonále můstku. Nastavení elektrické nuly, tj. rovnováhy můstku, se provádí potenciometrem (10 k Ω) změnou mřížkového předpětí kompenzační triody při současném uzemnění mřížky měrné triody. Změny osvětlení fotonásobiče způsobí změnu proudu, což se projeví změnou úbytku napětí na pracovních odporech, a tedy i změnou předpětí řídicí mřížky měrné triody. Změna v osvětlení se tedy projeví rozvážením můstku, které je indikováno měřicím přístrojem. Poněvadž i neosvětleným fotonásobičem protéká tzv. temný proud, který při pracovním napětí 850 V činí podle údajů výrobců pro oba typy fotonásobičů asi $0,2 \cdot 10^{-9}$ A, je provedena jeho kompenzace napětím opačné polarity nastavením potenciometru pro kompenzaci temného toku. Měrný systém má sedm přepínatelných stupňů umožňujících měřit s různou citlivostí.

Ověření činnosti zařízení

Stabilita elektronické části, tj. zdroje VN, elektronkového voltmetru a fotonásobiče byla ověřena registrací „nuly“ a „temného toku“ (obr. 3). Z obrázku je patrné, že dlouhodobá stabilita je vyhovující a kolísání během 1 hodiny po zahřátí přístroje nepřesáhlo 2 % z maximální výchylky.

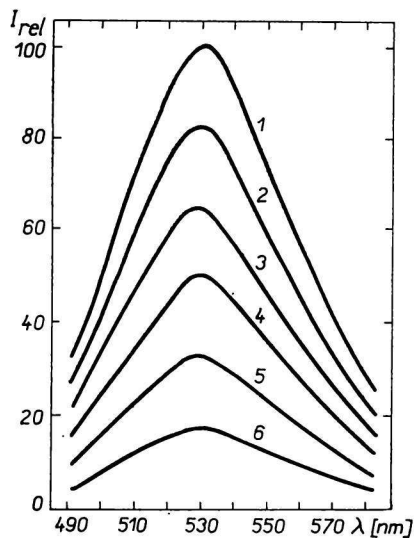
Funkce zařízení a metodika práce byla ověřena proměřením fluorescenčních spekter akridinoranže a síranu chininu a měřením fluorescence síranu chininu v závislosti na koncentraci. Jako fluorescenční standard se používá roztoku $1 \cdot 10^{-6}$ M chininsulfátu v 0,1 M kyselině sírové, jenž má maximum fluorescenčního spektra podle G. Kortůma [8] při $\lambda = 457$ nm. Jako další kontrola byl proměřen roztok $1 \cdot 10^{-5}$ M akridinoranže v pufru o pH 6,0, který má podle literárních údajů [9] maximum při $\lambda = 530$ nm.

Obr. 3. Záznam pro ověření stability:
1. „nuly“; 2. „temného proudu“.



Obr. 4. Fluorescenční spektra.

1. $1 \cdot 10^{-6}$ M síran chininu v 0,1 M kyselině sírové; 2. $1 \cdot 10^{-5}$ M akridinoranž v pufru o pH 6,0. Excitační vlnová délka pro 1. $\lambda = 366$ nm, pro 2. $\lambda = 436$ nm.

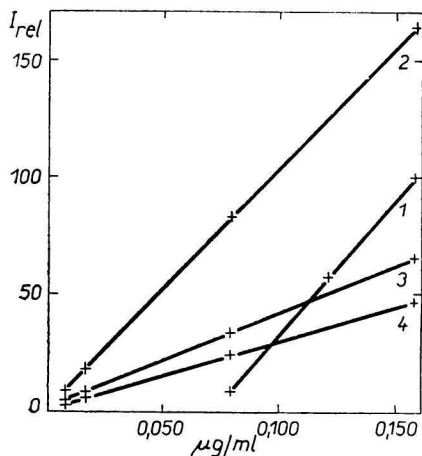


Obr. 5. Fluorescenční spektra akridinoranže registrovaná na elektrickém optickém kymografu.

Koncentrace roztoků: 1. $1 \cdot 10^{-5}$ M; 2. $8 \cdot 10^{-6}$ M; 3. $6 \cdot 10^{-6}$ M; 4. $4 \cdot 10^{-6}$ M; 5. $2 \cdot 10^{-6}$ M; 6. $1 \cdot 10^{-6}$ M; pH 6,0; $\lambda = 436$ nm.

Fluorescenční spektra chininsulfátu a akridinoranže jsou na obr. 4 a 5; srovnáním s literárními údaji je zřejmé, že funkce zařízení pro fluorescenční spektroskopii je vyhovující. Spektra nejsou korigována.

Funkce zařízení jako citlivého fluorimetru je ověřena proměřením intenzity fluorescenčního záření v závislosti na koncentraci u sady různě koncentrovaných roztoků chininsulfátu v 0,1 M kyselině sírové (obr. 6) a je provedeno srovnání s cejchovní křivkou zhotovenou na komerčním fluorimetru LUMETRON fy Photovolt Corp., New York.



Obr. 6. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci roztoku síranu chininu v 0,1 M kyselině sírové.

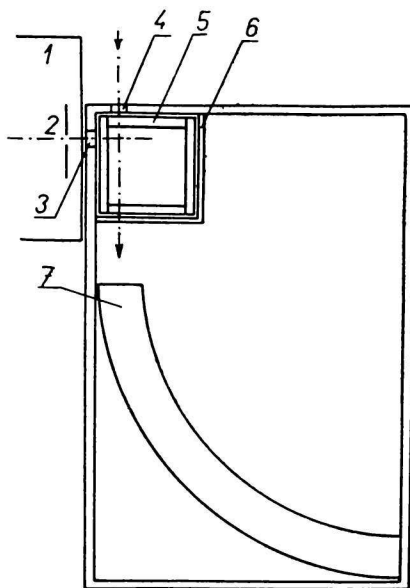
1. fluorimetr LUMETRON; 2–4. upravený univerzální spektrofotometr se změnami citlivosti galvanometru (2. 1/1; 3. 2/3; 4. 1/2). Excitační $\lambda = 366$ nm.

Diskuse

V popsaném zařízení je použito čtyřhranných kyvet. Obecně je způsob osvětlování vzorků excitačním zářením, jakož i způsob snímání emisního záření velmi důležitý, neboť snadno může dojít ke klamným výsledkům [10]. Nejčastěji se používá následujících dvou metod [11]. Při první metodě, tzv. *pravouhlé*, dopadá excitující paprsek na vzorek v kyvetě pod úhlem 0° k normále kyvety a emisní záření pak pod úhlem 90° vystupuje z kyvety a dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Při druhé metodě — tzv. *čelního uspořádání* — je vzorek ozařován opět pod stejným úhlem, ale emisní záření je snímáno na téže straně kyvety pod úhlem 60° . Fluorescenční záření v tomto uspořádání prochází jen tenkou vrstvou kapaliny, takže jeho absorpce je téměř minimální. Toto uspořádání je proto zvláště výhodné pro studium fluorescence pevných látek a barevných roztoků. Při pravouhlém uspořádání mohou být výsledky nepříznivě ovlivněny tím, že může nastat změna jak v intenzitě excitujícího, tak i emisního záření, poněvadž obojí musí procházet určitou vrstvou roztoku, od společného průsečíku optických drah paprsků. Tento úkaz bude zvláště nepříznivý při měření fluorescenčních spekter, jelikož se v těchto případech může uplatňovat rušivě absorpce v závislosti na vlnové

délce excitujícího záření. A jestliže je pak třeba měřit fluorescenci jedné látky v přítomnosti druhé absorbující látky, potom interpretace spekter bude velmi obtížná.

V této práci je použito pravouhlé metody, která je však tak upravena, aby se rušivé jevy uplatňovaly co nejméně. Podstata uspořádání spočívá v nesy-metrickém osvětlení kyvety a v snímání emisního záření. Paprsek excitujícího záření vstupuje do kyvety štěrbinou těsně při boční stěně a emisní záření vystupuje druhou štěrbinou těsně za čelní stěnou kyvety (obr. 7). Při tomto



Obr. 7. Fotometrická komůrka s kyvetou.
1. monochromátor; 2. vstupní štěrbinu;
3 a 4. štěrbinu fotometrické komůrky; 5.
kyveta; 6. rámeček pro uložení kyvety;
7. světelná „past“.

uspořádání může být kyveta velmi malá, takže je možno pracovat s malým množstvím vzorku. Kyveta je umístěna v rohu světlotěsné fotometrické komůrky s víkem ($6 \times 10 \times 18$ cm), aby se rozptýlené záření co nejvíce pohltilo. Pro pohlčení budícího záření je v komůrce umístěna trubka stočená o 90° , do které excitující záření prošlé kyvetou dopadá a je jí absorbováno. V této práci bylo později použito dvou monochromátorů. Druhý monochromátor nahrazuje v původním uspořádání interferenční filtry a jeho význam spočívá v tom, že umožňuje získat tzv. *excitační spektra*. V původním uspořádání je toto též možné výměnou interferenčních filtrů o různých vlnových délkách, ale tento postup je dosti pracný. Excitační spektrum je závislost úhrnné intenzity fluorescenčního záření na vlnové délce excitujícího záření a umožňuje určit vlnovou délku primárního záření, kterou se dosáhne maximální intenzity emisního záření. Mimo jiné uplatnění je tedy možno například vhodně volenou vlnovou délkou primárního záření zvýšit citlivost při fluorimetrickém stano-

vování v analytické chemii. Použitím dvou monochromátorů však práce získává nový význam, o kterém budeme podrobněji referovat v další práci.

Rtuťová vysokotlaká výbojka je chlazena vzduchem a vzhledem ke značné intenzitě světla je clonou vymezen pouze úzký svazek paprsků. Ze záznamu (obr. 3) je patrné, že stabilita celého zařízení, a tedy i světelného toku je uspokojivá. Irisová clona pak umožňuje další korekci primárního záření.

Indikace změn fotoproudu je provedena elektronkovým voltmetrem v můstkovém katodovém zapojení. Jako měřidla je použito zrcátkového galvanometru s dlouhou dobou kyvu (4–8 s), s citlivostí $1 \cdot 10^{-9}$ A/mm/m a tlumeného Ayrtonovým bočníkem, takže je možno měnit citlivost galvanometru v řadě stupňů a stále udržovat jeho tlumení na kritické hodnotě. Podle účelu práce je pak možno výchylky galvanometru odečítat přímo na stupnici, nebo registrovat na elektrickém optickém kymografu, nebo místo galvanometru zapojit liniový registrační měřicí přístroj s dostatečnou citlivostí. V naší práci se používá všech tří způsobů. Pro registraci s plnou citlivostí zařízení se používá kymografu, výrobek n. p. Stavební stroje, Zličín, s 15 cm šíří registračního fotopapíru a s posuvem 0,5 mm/s. Synchronisace vlnových délek s posuvem papíru je zajištěna otáčením hřídele mikrometrického šroubu monochromátoru elektromotorkem a spínáním vhodných kontaktů, tedy vytvářením abscis pro každých 10 dílků mikrošroubu.

Citlivost uvedeného zařízení ve srovnání s běžnými komerčními přístroji je dobrá a obsluha nepřilíš náročná. Pro přímou registraci se používá elektronického kompenzačního registračního přístroje fy MAW, NDR, šíře záznamu 25 cm, nebo EZ 2, výrobek n. p. Laboratorní přístroje, Praha.

Závěrem děkuji doc. J. Drobníkovi, dr. V. Kleinwächterovi, CSc., dr. J. Koudelkovi, CSc., a dr. K. Pátkovi, CSc., za kritické připomínky a podnět k této práci. Současně děkuji doc. J. Staňkovi, CSc., za laskavé umožnění vývoje popsaného zařízení; D. Blankovi a J. Junkovi pak za technickou spolupráci.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ УНИВЕРСАЛЬНЫМ СПЕКТРОФОТОМЕТРОМ

Э. Смекал

Кафедра врачебной физики Медицинского факультета
Университета Я. Э. Пуркине, Брно

Описывается простое видоизменение универсального спектрофотометра VSU-1 (Carl Zeiss, Jena) для флуоресцентной спектрофотометрии. Луч излучения ртутно-кварцевой лампы сверхвысокого давления проходит через диафрагму, кварцевый конденсор, интерференционный фильтр и падает на кварцевую кювету с раствором. Излученное излучение проходит через окошко кюветы и попадает во входное отверстие зеркального монохроматора с кварцевой призмой (рис. 1). К выходу из монохроматора светоне-

проницаемо присоединен фотоумножитель, на который подается стабилизированный постоянный ток высокого напряжения (рис. 2). В схеме, предназначенной для определения и измерения изменений фототоков, в основном применяется катодный повторитель, включенный в мостик. В диагональ мостика подсоединен зеркальный гальванометр с отсчетом на шкале или компенсационный линейный регистрационный самописец.

Preložila T. Dillingerová

FLUORESCENZMESSUNGEN MIT DEM UNIVERSAL-SPEKTROPHOTOMETER

E. Smékal

Lehrstuhl für medizinische Physik, Medizinische Fakultät
an der J. E. Purkyně-Universität, Brno

In der vorliegenden Arbeit wird eine einfache Zurichtung des Universal-Spektrophotometers VSU-1 (Carl Zeiss, Jena) für die Fluoreszenzspektrophotometrie beschrieben. Die Erregungsstrahlung einer Quecksilberhöchstdrucklampe wird nach Durchgang durch eine Blende, einen Quarzkondensator und ein Interferenzfilter der Quarzküvette mit der zu untersuchenden Lösung zugeleitet. Die aus dem Küvettenfenster austretende emittierte Strahlung fällt auf den Eintrittsspalt des Spiegelmonochromators mit einem Quarzprisma (Bild 1). Am Austrittsspalt des Monochromators ist ein Photo-Elektronenvervielfacher lichtdicht angebracht, der aus einer stabilisierten Gleichstrom-Hochspannungsquelle gespeist wird (Bild 2). In der Anordnung für die Indikation und Messung der Änderungen des Photostroms wurde im wesentlichen ein Kathodenfolger in Brückenschaltung verwendet. In die Brückendiagonale wird entweder ein Spiegelgalvanometer mit Skalenablesung oder ein Linien-Kompensationschreiber eingeschaltet.

Preložil M. Liška

LITERATURA

1. Udenfriend S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. Academic Press, New York 1962.
2. Jokl J., *Chem. listy* **52**, 1370 (1958).
3. Tomaňa M., Stránský Z., *Chem. listy* **58**, 978 (1964).
4. Vrinceanu R., Uluitu M., *Studii certet. Fiziol.* **8**, 649 (1963).
5. Koziol J., *Chem. listy* **59**, 96 (1965).
6. Singer E., Růžička B., Turtenwald J., *Chem. listy* **58**, 224 (1964).
7. Smékal E., *Sdělovací technika* (v tisku).
8. Kortüm G., Finckh B., *Z. physik. Chem.* **52**, 263 (1942).
9. Zavildělskij G. B., Borisova O. P., Mičenkova L. E., Minjat E. E., *Biochim.* **29**, 508 (1964).
10. Parker C. A., *Spectrophotofluorimetric Techniques in Biology*. International Course on Spectrophotofluorimetric Techniques in Biology, Milano 1963.
11. Drobník J., *Excitované stavy purinových derivátů*. Habilitační práce, Přírodovědecká fakulta Karlovy university, Praha 1964.

Do redakcie došlo 7. 7. 1965

Adresa autora:

Prom. chem. Emil Smékal, Brno, tř. Obránců míru 10.