

Spektrofotometrie (2. LF UK) OLD

Samostatná práce



Tento článek je editován studenty 2. LF UK v rámci plnění jejich studijních povinností (seminární práce – vypracování zkouškových otázek z biofyziky). Ostatní uživatele prosíme, nezasahujte výrazněji do jeho tvorby až do doby, než bude práce odevzdána (s výjimkou malých editací – opravy překlepů, pomoci s formátováním apod.). Máte-li nějaké náměty či připomínky, uveďte je prosím v . V případě potřeby kontaktujte autory stránky – naleznete je v historii ([https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)_OLD&action=history](https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometrie_(2._LF_UK)_OLD&action=history)).

Stránka byla naposledy aktualizována v pátek 2. 10. 2020 v 16.25.

Článek ke kontrole



Žádá se kontrola tohoto článku učitelem.

Navržený učitel: Petr Heřman

Teoretická část:

Spektroskopie je fyzikálně-chemická disciplína, která se zabývá vznikem a vlastnostmi všech druhů spekter, interakcemi mezi hmotou a elektromagnetickým zářením. Zkoumá závislosti absorpce, emise nebo rozptylu elektromagnetického záření jako funkce vlnové délky nebo frekvence. Výsledkem zkoumání je křivka zvaná spektrum látky, jejíž interpretací můžeme získat informace o kvantitě a kvalitě zkoumaných látek.

***UV/VIS spektroskopie a fotometrie** jsou disciplíny využívající světlo z UV oblasti (vlnová délka 10–390 nm), viditelné oblasti (vlnová délka 390–790 nm) a přilehlé infračervené oblasti (vlnová délka 770 nm–1 mm) ke zkoumání spektroskopických vlastností.*

Spektrofotometrie je založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem, kdy je část záření absorbována částicemi vzorku. Absorpce fotonu se mění energie molekuly a vzniká excitovaný atom, kdežto část záření projde roztokem a je následně detekována přístrojem. Množství světla propuštěného, odraženého nebo pohlceného jistou látkou je závislé na vlnové délce záření a na koncentraci zkoumané látky. Jelikož je intenzita prošlého světla (I_0) vždy menší než intenzita světla na látku dopadajícího (I), je zavedena veličina **transmitance (T)** popisující právě toto zeslabení. Může nabývat hodnot 0 (veškeré záření pohlceno) až 1 (veškeré záření prošlo; při fluorescenčních látkách může být větší než 1) a někdy se udává i v procentech:

$$T = I/I_0$$

Ve spektrofotometrii se setkáváme dále také s veličinou charakterizovanou záporným dekadickým logaritmem transmitance nazývanou **absorbance (A)**. Absorbance je fyzikální veličina, která zjednodušeně řečeno "vyjadřuje schopnost molekul látky pohlcovat elektromagnetické záření určité vlnové délky". Logaritmická funkce je ve vzorci použita z důvodu exponenciálního úbytku intenzity světla průchodem látkou:

$$A = -\log_{10}(I/I_0)$$

Výsledkem spektrofotometrického měření je tzv. **absorpční spektrum**, které charakterizuje vlastnosti prostředí. Jedná se o grafickou závislost absorbance nebo energie na vlnové délce. Zobrazené křivky jsou charakteristické svým tvarem a polohou maxima. (*Měření absorpčních spekter - viz Praktická část - Úloha 1.*) Spektrofotometrie je založena na **Lambert-Beerově zákoně**, který popisuje vztah mezi koncentrací látky v roztoku a její absorbancí:

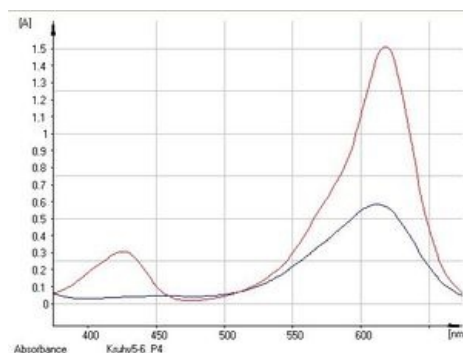
$$A_\lambda = -\log_{10}(I/I_0) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c = k \cdot c$$

Vyplývá z něho, že při dané vlnové délce je absorbance přímo úměrná koncentraci látky c [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] a tloušťce absorbující vrstvy l [cm], tedy šířce kyvety (obvykle 1 cm). **Molární extinkční (absorpční) koeficient ε** [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] je konstanta úměrnosti, která je specifická pro danou látku a vlnovou délku. **Jeho hodnoty můžeme zjistit** z fyzikálně-chemických tabulek nebo **změřením absorbance roztoků o známých koncentracích a vytvořením kalibrační křivky** (viz. Praktická část - Úloha 2), případně stanovením kalibračního koeficientu.

Z tohoto vztahu rovněž plyne, že pro měření stejného analytu při stejné vlnové délce a ve stejné kyvetě



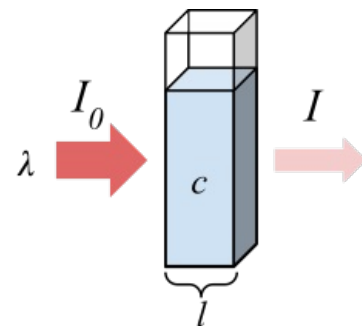
Spektrofotometr SPECORD 40



Příklad absorpčního spektra

můžeme nahradit součin $(\epsilon_{\lambda} \cdot l)$ konstantou k . Z naměřené absorbance vzorku a vypočtené konstanty k lze poté určit látkovou koncentraci neznámého vzorku: $c_{VZ} = A_{VZ}/k$.

Lambert-Beerův zákon platí při aplikaci monochromatického světla, konstantní délky kyvet, stejného rozpouštědla a konstantní koncentraci látky během celého měření. V praxi je platnost tohoto zákona limitovaná rozptylem světla v důsledku jemných nečistot ve vzorku, fosforescencí anebo fluorescencí vzorku, malým množstvím procházejícího světla při vysokých koncentracích, změnami hodnot absorpčního koeficientu a posunem chemické rovnováhy způsobeným vysokou koncentrací látky ve vzorku. Dalšími podmínkami pro použití Lambert-Beerova zákona jsou nízká koncentrace látky (řádově menší než 10^{-2} mol/l) a také, že studovaná látka se neúčastní chemické rovnováhy.



Absorpce světla

Lambert-Beerův zákon nám v praxi při spektrofotometrických měření umožňuje zjistit **neznámou koncentraci roztoků látek**. Ta se určuje dvěma způsoby: metodou kalibrační křivky (viz Úloha 2) a metodou standardního přídávku.

- Metoda kalibrační křivky je postup, kdy se změří absorbance několika kalibračních roztoků o různých koncentracích, a to ve stejné kyvetě a při stejné vlnové délce. Z průběhu kalibrační křivky můžeme ověřit platnost Lambert-Beerova zákona. Výsledná závislost by v ideálním případě měla být lineární, procházející počátkem - tzv. kalibrační přímka. Tato metoda je ovšem použitelná jen pro jednoduchou matici (např. pitnou vodu).
- Metoda standardního přídávku je postup, během kterého se změří absorbance neznámého vzorku A_{VZ} a pak se koncentrace látky ve vzorku zvýší definovaným přídávkem standardu a změří se odpovídající absorbance roztoku. Touto metodou se dá stanovit látka ve složitě matrici (např. v odpadní vodě), kdy stanovení metodou kalibrační křivky bylo poměrně složité.

Využití isosbestického bodu: Pokud látka, která má určité spektrum, se v průběhu reakce mění na jinou látku, která má jiné spektrum, ale obě spektra se částečně překrývají. Příkladem mohou být spektra NAD⁺ a NADH (stanovení těchto koenzymů se využívá při měření aktivity řady enzymů pomocí tzv. Warburgova optického testu). V tomto případě jsou absorpční maxima dostatečně daleko od sebe, takže stanovení jednotlivých forem koenzymu je jednoduché. Užitečná však může být skutečnost, že všechna spektra pro různé poměry NAD⁺/NADPH (při konstantní celkové koncentraci) se kříží. To je způsobeno tím, že při vlnové délce 281 nm má NAD⁺ i NADH stejný extinkční koeficient. Průsečík spekter se nazývá isosbestický bod (z řeckého ισος isos = stejný a σβεννυμι sbennými = zháším) a měřením absorbance v tomto bodě snadno zjistíme celkovou koncentraci NAD⁺ a NADH, aniž bychom potřebovali znát aktuální poměr koncentrací obou složek.^[1]

Využití v medicíně: *Spektrofotometrie mozkomíšního moku* se využívá v diagnóze náhlých cévních mozkových příhod především při podezření na krvácení do subarachnoidálního prostoru. Poskytuje informaci o stáří krvácení a o protrahovaném či opakovaném krvácení. Spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku ve viditelné části spektra umožňuje charakterizovat na základě rozdílných absorpčních maxim oxyhemoglobin, methemoglobin a bilirubin. Protože při spektrofotometrickém měření nedochází k poškození měřených látek, využívá se tato technika také velmi často v různých biochemických experimentech (například s DNA/RNA a různými proteiny), kdy tyto látky většinou nezískáváme ve velkých množstvích.

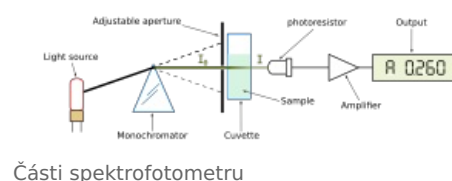
Spektrofotometry jsou technicky složitější a dokonalejší přístroje plně ovladatelné pomocí počítače pro spektrofotometrická stanovení, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek. Využívají se k měření absorpčních spekter anebo ke stanovení kvantitativních měření, ale umožňují také měření kinetiky jednoduchých, například enzymových reakcí. Nacházejí široké uplatnění v oborech chemie, fyziky, biochemie, biologie i medicíny.

Spektrofotometry se dělí podle počtu paprsků na:

- Jednopaprskové spektrofotometry měří pouze vystupující tok záření, proto se nejprve musí provést referenční měření rozpouštědla a teprve potom se může měřit vzorek.
- Dvoupaprskové spektrofotometry měří jedním paprskem slepý vzorek, tzv. BLANK (rozpuštědlo bez stanovované látky), zatímco druhým se měří zkoumaný vzorek. Jednopaprskové spektrofotometry jsou z konstrukčního hlediska jednodušší a velikostně menší a v některých případech se připojují rovnou k mikroskopům.

Části spektrofotometru:

- Zdroj záření – žárovka nebo halogenová lampa pro VIS a deuteriová lampa pro UV oblast
- Čočky a zrcadla – usměrňují paprsek světla
- Monochromátor – zařízení propouštějící pouze světlo určité vlnové délky (vytvoří z polychromatického záření monochromatické); rozkladným prvkem může být hranol nebo optická mřížka (pro viditelnou oblast spektra se nejčastěji používá hranol ze skla)
- Kyvetový prostor – prostor pro vzorky v kyvetách; používá se skleněná optika (pro VIS oblast), křemenná optika (pro UV oblast), solná optika (pro IR oblast) nebo kyvety z plastu
- Detektor – CCD kamera nebo fotodioda



Části spektrofotometru

6. Výstupní zařízení – software na analýzu dat

Na praktiku se používá **Spektrofotometr SPECORD 40**. Je to jednopaprskový spektrofotometr, který měří v oblasti vlnových délek 190–1100 nm (pro 190–300 nm deuteriová lampa a pro 300–1100 nm halogenová lampa). Umožňuje měření absorbancí v intervalu hodnot $A = (-3) - (+3)$. Lze ho ovládat z hlavního panelu na přístroji a také pomocí programu WinASPECT, který současně umožňuje jednoduchou a rychlou analýzu dat.

Roztoky se nám jeví jako barevné, neboť absorbují určitou vlnovou délku viditelného spektra. Barva roztoku je potom dána komplementární barvou k pohlcené barvě. Schopnosti pohlcování určitých vlnových délek elektromagnetického záření částicemi látky znázorňuje absorpční spektrum látky. Na praktiku si vyzkoušíte měření absorpčních spekter **malachitové zeleně** a **indigotinu (indigocarminu)**. Malachitová zeleň je organické barvivo temně zelené barvy, které se mimo jiné používá k bakteriologickému barvení či jako lokální antiseptikum. Absorbuje v modré a červené oblasti spektra, a proto se nám jeví jako zelené. Indigotin (indigocarmin) je náhražka přírodního barviva indigo. Je to organické barvivo, které absorbuje především v červené oblasti spektra, proto se nám jeví jako modré.

<mediaplayer width="500" height="300"><https://www.youtube.com/embed/pxC6F7bK8CU></mediaplayer>

Absorbční vlnová délka (nm)	Barva absorpčního světla	Barva látky
400 – 435	Fialová	Žlutozelená
435 – 480	Modrá	Žlutá
480 – 490	Zelenomodrá	Oranžová
490 – 500	Modrozelená	Červená
500 – 560	Zelená	Purpurová
560 – 580	Žlutozelená	Fialová
580 – 595	Žlutá	Modrá
595 – 605	Oranžová	Zelenomodrá
605 – 670	Červená	Modrozelená

Tabulka doplňkových barev viditelného světla

Praktická část:

Spektrofotometr SPECORD 40. Jednopaprskový spektrofotometr, který měří v oblasti vlnových délek 190–1100 nm (pro 190–300 nm deuteriová lampa a pro 300–1100 nm halogenová lampa). Umožňuje měření absorbancí v intervalu hodnot $A = (-3) - (+3)$. Lze ho ovládat z hlavního panelu na přístroji a také pomocí programu WinASPECT, který současně umožňuje jednoduchou a rychlou analýzu dat.

Malachitová zeleň absorbuje v modré a červené oblasti spektra (oblasti viditelného záření).

Indigotin (Indigocarmin) absorbuje pouze v červené oblasti spektra (oblasti viditelného záření).

Úloha 1: Měření absorpčního spektra roztoků malachitové zeleně a indigotinu

Úkolem první úlohy je zkoumat, jak látky absorbují viditelné světlo (jejich absorbanci) v závislosti na jeho barvě (vlnové délce) a sestavit graf této závislosti (absorpční spektrum). Tento graf následně analyzujeme – stanovíme vlnovou délku, při které je naměřená absorbance nejvyšší, tudíž látka elektromagnetické záření absorbuje nejlépe. Měření je prováděno pro vlnové délky v rozmezí 375–675 nm.

Ukládání souborů a jejich názvy

Všechny soubory vytvořené během praktické části této úlohy ukládejte do adresáře **Praktikum_CZ** (odkaz najdete na ploše). Jako název souboru vždy uvádějte **název Vaší skupiny** - prvním znakem je číslo Vašeho kruhu a druhým pak písmeno Vašeho týmu (např. kruh 9 skupina C => název bude **9C**).

Bezpečnostní upozornění

• S roztoky pracujte v rukavicích, nevdechujte je ani nepožívejte.

• Spektrofotometr je zařízení citlivé na vlhkost. S kapalinami pracujte opatrně! Při případném vylití políťte prostor okamžitě osušte!

Chemikálie:

Roztoky KA4 a KB

Destilovaná voda

Postup práce

1. Zapněte spektrofotometr síťovým vypínačem na zadní straně přístroje

2. Zapněte PC

3. Spusťte program WinASPECT (*START/PROGRAMY/WinASPECT/WinASPECT*)

4. Po spuštění programu otevřete panel *Measurement* na horním panelu a zvolte *Initalize device*. Po potvrzení volby se objeví otázka na použití UV lampy, kterou zamítneme. Spektrofotometr automaticky spustí inicializaci a vnitřní kalibraci. *Panel Settings*

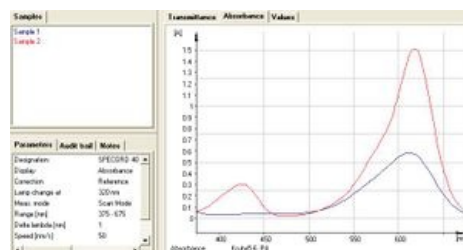
5. Po dokončení inicializace nastavte parametry měření. V nabídce *Measurements* zvolte možnost *Set Parameters*. Objeví se panel nastavení parametrů. Kliknete na *New* na panelu nastavení parametrů.

Nastavení parametrů

V programu WinASPECT nastavíme parametry měření. Interval měření je 1 nm, co znamená, že jsou zaznamenány konkrétní hodnoty absorbance pro každou vlnovou délku v našem rozmezí s daným rozdílem (pro 375, 376, ..., 675 nm). Rychlost měření je 50 nm/s, tudíž měření jednoho vzorku trvá pouhých 6 sekund. Některé parametry jsou přednastavené. Pro správné nastavení měření nastavte následující:

Panel Settings: • V okně *Title* vyplňte název dle názvu Vaší skupiny (instrukce uvedené výše).

• Funkce *Cycle Mode* deaktivovaná výběrem možnosti *None*



Absorpční spektra barviv (Sample 1 - indigotin, Sample 2 - malachitová zeleň)



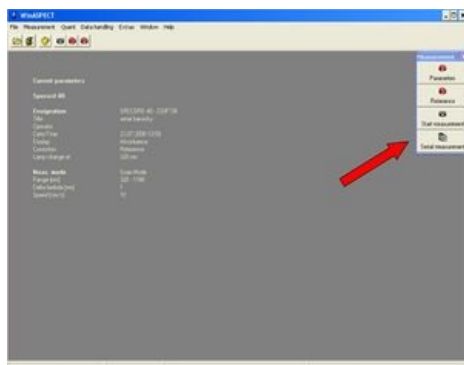
Kyvety

- Funkce *Display* – vyberte možnost *Absorbance*
- Funkce *Correction* – vyberte možnost *Reference*

Panel Mode:

- V okně *Meas. Mode* vyberte možnost *Scan Mode*
- Nastavení funkce *Scan Mode* nastavte následující hodnoty:
 - *Range* = 375– 675 nm (výběr šířky sledovaného spektra)
 - *Delta lambda* = 1 nm (výběr délky intervalů měření)
 - *Speed* = 50 nm/s (výběr rychlosti měření) (měření jednoho vzorku tedy trvá jen 6s).

Po nastavení parametrů klikněte na ikonu *OK* na panelu nastavení měření. Objeví se okno možnosti uložení. Soubor uložte do výše uvedeného adresáře pod názvem své skupiny. Po uložení zavřete okno nastavení měření.



Panel Measurement

6. Spektrofotometr je nyní připraven pro vlastní měření. Nyní je otevřen panel *Measurement*. Vyberte možnost *Serial measurement*.

7. V programu WinASPECT je nyní aktivní otevřené okno *Serial Measurements*. Pro nastavení parametrů měření vyberte z nabídky *Edit* panelu nástrojů možnost *Setup*.

Nastavte následující parametry:

- Panel *General: Description*:

zadejte název své skupiny.

- Panel *Samples: Number of measurements*: zadejte počet vzorků (v tomto případě 2).

Číslo vzorku	Název vzorku	Koncentrace
1	KA4	
2	KB	

8. Před měřením vzorků je nezbytné provést referenční měření pomocí slepého vzorku, tzv. blanku (rozpouštědlo bez stanovované látky). Vzorky – barviva – jsou rozpuštěné v destilované vodě, proto použijte jako blank destilovanou vodu. Do kyvety nalijte destilovanou vodu tak, aby její hladina sahala do 1/2 kyvety (přibližně k vrcholu úzké části). Při měření vzorků s různou koncentrací je nejlepší postupovat od nejřednějšího roztoku po nejkoncentrovanější, nemusíme pak vymývat a vysoušet kyvetu (např. buničinou) po každém měření.

Kyvetu vždy držte za matné strany. Světelný paprsek prochází čirými stranami a jejich znečištěním (včetně otisků prstů) může dojít ke zkreslení výsledků měření. Proto kyvetu před měření otřete dosucha a současně setřete případné nečistoty a otisky prstů (např. suchou buničinou).

9. Otevřete prostor na vkládání vzorků. Do držáku na kyvety vložte kyvetu s blankem(destilovanou vodou). Poté zavřete dvířka prostoru pro vzorky. **Kyvetu vkládáme co nejtěsněji ke stěně držáku, tak aby čirými plochami mohl procházet světelný paprsek. Dbejte, aby kyveta stála v držáku kolmo!**

Spektrofotometr je přístroj citlivý na vylití kapalin. Pracujte proto opatrně. V případě vylití kapaliny opatrně vysušte polité místo!

10. Spusťte referenční měření kliknutím na ikonu *Reference* v panelu nástrojů okna *Serial Measurement*. Spektrofotometr proměří absorpční spektrum blanku.

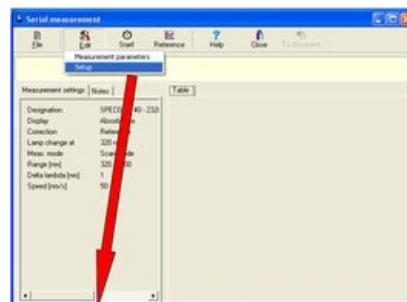
11. Po provedení referenčního měření je spektrofotometr připravený pro měření vzorků. Měření vzorků spusťte kliknutím na ikonu *Start*. Do čisté kyvety nalijte první vzorek (KA4) a umístěte kyvetu do držáku kyvet (viz body 8 a 9). Použijeme nejkoncentrovanější roztoky barviv, protože dle Lambert-Beerova zákona je koncentrace přímo úměrná absorbanci, a tedy výsledná křivka spektra bude výraznější. Zavřete víko spektrofotometru a v programu potvrďte vložení vzorku („OK“). Spektrofotometr proměří absorpční spektrum prvního vzorku.



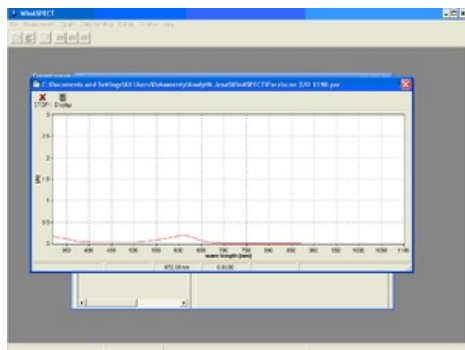
Panel Settings



Panel Mode



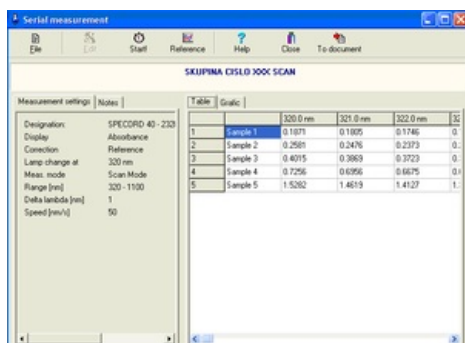
Serial Measurement



Obrázek k bodu č. 11



Obrázek k bodu č. 11



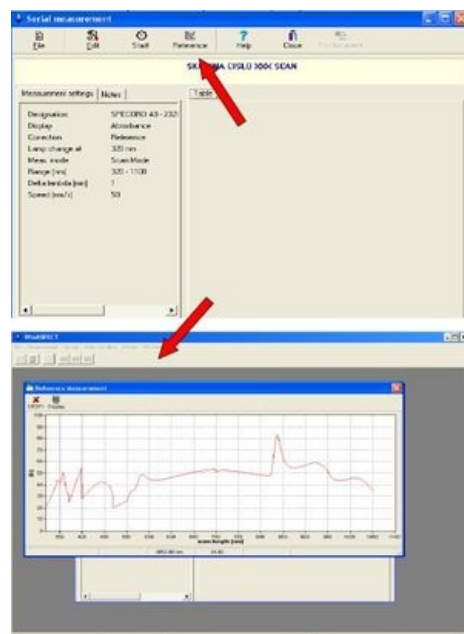
Obrázek k bodu č. 13

12. Po ukončení měření prvního vzorku vložte do kyvety druhý vzorek a opět potvrďte vložení.

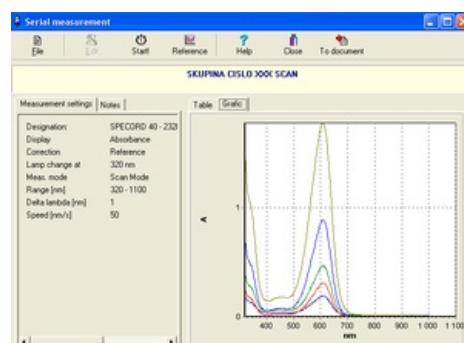
13. Po změření všech vzorků se zobrazí tabulka obsahující naměřené hodnoty absorbance při dané vlnové délce (panel *Table*) nebo grafické zobrazení hodnot v tabulce (panel *Grafic*).

14. Kliknutím na možnost *To document* na panelu nástrojů okna *Serial measurements* převedte výsledky do podoby dokumentu. Uložte jej pod názvem své skupiny. Dokument umožňuje prohlížení hodnot v tabulce i hodnot absorbance a transmittance vztažených k vlnové délce.

15. Určíme „ideální“ vlnové délky pro roztoky indigotinu a malachitové zeleně (vlnové délky, při kterých jsou jejich naměřené absorbance nejvyšší) a absorpční spektra vytiskneme.



Obrázek k bodu č. 10



Obrázek k bodu č. 13

Úloha 2: Určení koncentrace neznámého vzorku a Lambert - Beerův zákon

Cílem druhé úlohy je určit neznámou koncentraci roztoku jednoho z barviv. Podle Lambert-Beerova zákona je závislost absorbance na koncentraci v určitém rozsahu koncentrací lineární. Před měřením neznámých vzorků je potřebné určit koeficient úměrnosti. Proto konstruujeme kalibrační křivku pomocí měření absorbance vzorků o známé koncentraci.

Postup práce:

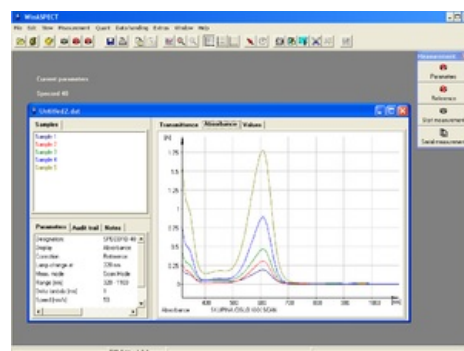
Chemikálie:

Čtyři roztoky indigotinu o různých koncentracích (roztoky KA1, KA2, KA3, KA4), roztok o neznámé koncentraci (NA).

Postup práce:

Kalibrační křivka

Číslo vzorku	Název vzorku	Koncentrace [$\mu\text{M/l}$]
1	KA1	
2	KA2	
3	KA3	
4	KA4	



Tisk obrázku

Nejprve si sestavíme kalibrační křivku, která zobrazuje závislost přístrojem naměřené absorbance na koncentraci roztoku. Pro její stanovení potřebujeme čtyři roztoky indigotinu o různých koncentracích (12,5; 25; 50; 100 µM/l). Program na základě kalibrační křivky vypočítá hodnoty potřebné pro vypočtení molárního extinkčního koeficientu a nakonec určí neznámou koncentraci vzorku v kyvetě.

1. V programu WinASPECT zvolte z nabídky *Quant* na panelu nástrojů možnost *Calibration*.

2. Na obrazovce se zobrazí okno *Calibration* pro nastavení parametrů měření.

Plocha *General*:

- Název skupiny (*Designations*): název Vaší skupiny
- Model regrese (*Regression Model*): zvolte možnost: $y = A + B \cdot x$
- Vlnová délka (*WAVELENGTH1*) (nejvhodnější společná pro roztoky KA4 a KB): zvolte na základě naměřených hodnot v úkolu 1.
- Jednotky koncentrace (*Calibration Unit*): zvolte podle jednotek uvedených na vzorcích
- Měřená veličina (*Ordinate*): absorbance
- Šířka kyvety (*Cell Pathlength*): změřte šířku kyvety
- Počet standardů (*No. of Standards*): 4 pro KA
- *Parameter file*: **9C.par** (příklad - 9 - devátý kruh, C - tým C)

3. Na panelu *Mode* z nabídky *Meas. mode* vyberte možnost *Wavelengths*. Vhodnou vlnovou délku zvolíte kliknutím na možnost *Edit*. Nasledně napište hodnotu vlnové délky a pro potvrzení opět klikněte na ikonu *Edit*. Kliknutím na ikonu *OK* se vrátíte do nabídky *Calibration*.

4. Po návratu do nabídky *Calibration* a zadání výše uvedených parametrů klikneme na ikonu *Standards*.

5. Po kliknutí na ikonu *Standards* se otevře okno; vyplňte koncentrace jednotlivých standardů v příslušných jednotkách.

Standard: vyplňte názvy standardů

Conc.: do příslušných polí vyplňte hodnoty koncentrací

Source: hodnota zadána automaticky

Standards			
<div> <div>OK</div> <div>Cancel</div> <div>Start</div> <div>Reference</div> <div>Statistics</div> </div>			
Standard	Conc.	Source	A
Standard 1	0.091	Measure: SKUPINA CI	0.0000
Standard 2	0.0369	Measure: SKUPINA CI	0.0000
Standard 3	0.364	Measure: SKUPINA CI	0.0000
<div> <div>Selected standard: Standard 2</div> <div>(De)activate</div> </div>			
<div> <div>Measure: SKUPINA CISLO XXX QL</div> <div>Source</div> </div>			

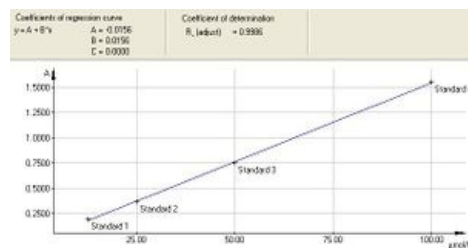
Ikona Standards

6. Změřte absorbanci referenčního vzorku (blank). Kyvetu naplněnou destilovanou vodou vložte do držáku kyvet a kliknutím na ikonu *Reference* provedte referenční měření.

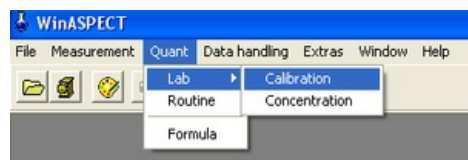
7. Klikněte na ikonu *Start* a vložte vzorek KA1. Poté změřte vzorky KA2, KA3, KA4 v pořadí udaném v tabulce. Po ukončení měření všech vzorků klikněte na ikonu *OK*.

8. Otevře se okno *Calibration* s grafickým znázorněním kalibrační křivky a rovnicí regresní přímky.

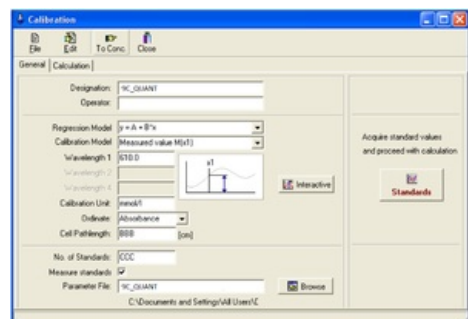
9. Soubor uložte přes *File* a *Save as* pod názvem své skupiny. Kalibrační křivku vytiskněte přes *File* a *Print*. Při kliknutí na *Print* se vám zobrazí okno *Print - Calibration*. V okně mějte zaškrtnuté jenom první čtyři možnosti (*Calibration curve*, *Parameters*, *Standards* a *Statistics*). Pokud je poslední možnost *Audit trail* zaškrtnuta, tak ji odškrtněte. Vlastní tisk spustíte kliknutím na ikonu *Print* v okně *Print - Calibration*.



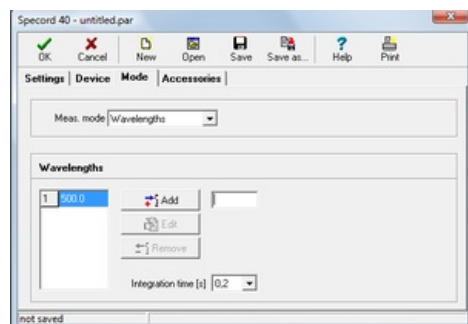
Kalibrační křivka indigotinu



Kalibrace



Plocha General



Edit - Panel Mode

Kalibrační křivku je možné uložit i po kliknutí na ikonu *To Conc.*

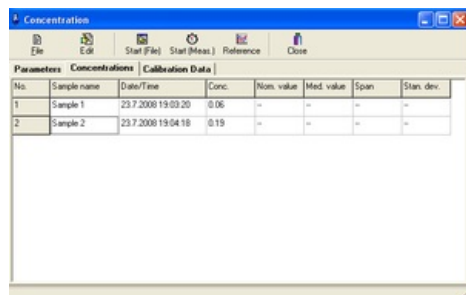
Určení koncentrace neznámého vzorku (pro vzorek NA)

10. Po uložení program automaticky otevře okno *Concentration*, které umožňuje stanovit koncentrace neznámých vzorků na základě kalibrační křivky.

11. Pro měření koncentrací neznámého vzorku vložte vzorek v kyvetě do držáku kyvet a kliknutím na ikonu *Start (Meas.)* přístroj změří absorbanci a na základě koeficientů kalibrační křivky vypočítá koncentraci neznámého vzorku.

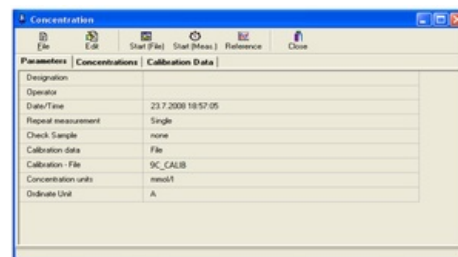
12. Po ukončení měření se hodnoty koncentrace zobrazí v tabulce.

Tabulka - měření koncentrace neznámého vzorku



No.	Sample name	Date/Time	Conc.	Non. value	Med. value	Span	Stan. dev.
1	Sample 1	23.7.2008 19:03:20	0.06	"	"	"	"
2	Sample 2	23.7.2008 19:04:18	0.19	"	"	"	"

Tabulka měření koncentrace neznámého vzorku



Koncentrace

13. Uložte dokument pod názvem své skupiny a hodnotu změřené koncentrace si запиšte do protokolu.

Uložení dokumentu

14. Po ukončení měření použité kyvety opláchnete destilovanou vodou ze stříčky.

Videotutoriál

<mediaplayer width="500" height="300"><https://www.youtube.com/embed/KXJ7gXPpoo0></mediaplayer>

Výpočet lineární regrese

Nakonec pomocí rovnice kalibrační křivky (rovnice neboli modelu regrese) a zjištěné koncentrace vypočítáme teoretickou velikost absorbance vzorku, kterou porovnáme s absorbancí naměřenou přístrojem. Jednotlivé koeficienty rovnice regrese interpretujeme a zhodnotíme rozdíl absorbancí.

$y = a + b \cdot x$ Lineární regrese

Vzorec obecné rovnice lineární regrese vychází z Lambert-Beerova zákona. Obsahuje dvě proměnné (**x**, **y**) a dva regresní koeficienty (**a**, **b**). Obě proměnné můžeme snadno nahradit veličinami z grafu kalibrační křivky, která nám vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci. Tudíž **x** znamená koncentraci (**c**) a **y** absorbanci (**A**).

$A = a + b \cdot c$

Nyní už nám jen zbývá vysvětlit si oba regresní koeficienty. Regresní koeficient **a** vyjadřuje možnou systematickou chybu měření (případně odchylky způsobené nečistotami na steně kyvety apod.). Tím, že předpokládáme jeho existenci, tyto chyby "odfiltrujeme".

Lineární člen **b · c** již odpovídá "čistému" Lambert-Beerovu zákonu. Podle něj je absorbance roztoku rovna **A = ε · l · c**. Koncentrace vystupuje v obou výrazech, proto můžeme říci, že koeficient regrese **b** se rovná součinu molárního extinkčního koeficientu a šířky kyvety. Tento prvek nám v rovnici regrese vyjadřuje směrnici přímky.

$b = \epsilon \cdot l$

Odtud určíme molární extinkční koeficient **ε = b / l**.

Musíme však dát pozor na jednotky, neboť k koncentrace je udána v mikromolech na litr (uMol/L), zájmco šířku kyvety máme změřenou v centimetrech.

Použitá literatura

1. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie>

Amler E. et al. Praktické úlohy z biofyziky I. Ústav biofyziky UK, 2. Lékařské fakulty, Praha 2006

Navrátil L. et al. Medicínská biofyzika, Grada Praha 2005

On-line educational hypermedia – Hypermedia for Science Education) – <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/index.htm>

UV VIS Spektrofotometry SPECORD® 50, SPECORD® 40, SPECORD® 30 se zabudovaným ovládáním. Provozní příručka. Analytik Jena AG. ChromSpec srov.o. Číslo publikace: 221:408.23, Vydání – únor 2002

WinASPECT®. Uživatelská příručka

Wikiskripta 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze [https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_(2._LF_UK)) (21.10.2017)

NÁVRATIL, ROSINA A KOLEKTIV., *Medicínská biofyzika*, Vyd. 1. Praha : Grada, 2005. 524 s. : , il., portréty, tabulky. Avicenum. ISBN 80-247-1152-4.

SVOBODA A KOLEKTIV., *Přehled středoškolské fyziky*, 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1991. 588 s. : , il. Kostka. ISBN 80-04-22435-0.

KVASNICOVÁ, BALÍNOVÁ. *Stanovení koncentrace kreatininu v moči* [online]., [cit.2015-11-26]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B1.htm>