

Spektrofotometrie (2. LF UK)

Zadání úlohy

- Identifikujte a určete koncentraci neznámého vzorku AX.
 - Proměřte a charakterizujte absorpční spektrum roztoku A, B a C a identifikujte jednotlivé roztoky.
 - Změřte absorbance vzorků A1, A2, A3, A4 a A5 o různých koncentracích při vlnové délce odpovídající maximální absorbanci vzorku A z předešlého kroku a vytvořte kalibrační křivku.
 - Pomocí kalibrační křivky a absorbance určete koncentraci neznámého vzorku AX.

Teoretický úvod

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 (λ) nebo frekvence (f). Interpretací výsledků můžeme získat informace o kvalitě a kvantitě zkoumaných látek. **Spektrofotometrie** je jedním z oborů spektroskopie, zabývá se kvantitativním studiem spekter, to znamená měřením množství světla propuštěného, odraženého nebo pohlceného jistou látkou v závislosti na vlnové délce.

Jednou z charakteristických optických vlastností látek je absorpce záření. Při interakci elektromagnetického záření (světla) vhodné vlnové délky s látkou dochází k absorpci energie fotonu. Intenzita prošlého světla (I) je tedy menší než intenzita světla na látku dopadajícího (I_0). Pro intenzitu prošlého světla (I) platí **Lambertův zákon**:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\mu \cdot l},$$

kde l je tloušťka absorbující vrstvy a μ se nazývá **lineární absorpční koeficient**. Poměr intenzit prošlého a dopadajícího světla nazýváme **transmitancí** (T):

$$T = \frac{I}{I_0}.$$

Transmitance nabývá hodnot od 0 (veškeré záření pohlceno) do 1 (veškeré záření prošlo; při fluorescenčních látkách může být větší než 1) a někdy se udává i v procentech. Záporný dekadický logaritmus transmitance nazýváme **absorbancí** (A). Platí tedy

$$A = -\log T = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right) = \mu \cdot l.$$

Grafická závislost absorbance, kterou pozorujeme při průchodu světla určitou látkou, na vlnové délce nazýváme **absorpčním spektrem**.

Pro absorpci v roztocích platí **Beerův zákon**:

$$\mu = \epsilon \cdot c.$$

Absorpční koeficient roztoku je přímo úměrný **molární koncentraci** c a **molární absorpčnímu koeficientu** (**konstantě**) ϵ . Molární absorpční koeficient je specifický pro danou látku a vlnovou délku (viz úloha 1). Kombinací obou zákonů dostáváme **Lambertův-Beerův zákon**

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c.$$

Absorbance je tedy přímo úměrná koncentraci látky c a tloušťce absorbující vrstvy l , to znamená na délce optické dráhy neboli šířce kyvety (obvykle 1 cm). Transmitanci potom můžeme po úpravě vyjádřit jako:

$$T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}.$$

Budeme-li absorpci považovat za závisle proměnou $A = y$ a molární koncentraci ze nezávisle proměnou $c = x$ v Lambertově-Beerově zákoně. Označíme-li součin molárního absorpčního koeficientu a tloušťky absorbující vrstvy (tloušťka kyvety) jako konstantu $b = \epsilon \cdot l$. A zavedeme-li konstantu a vyjadřující možnost systematické chyby měření (případně odchylky způsobené nečistotami na stěně kyvety apod.), která se projeví nenulovou absorpcí při nulové koncentraci. Tak se nám podařilo ztotožnit Lambertův-Beerův zákon s lineární rovnicí přímky neprocházející počátkem $y = a + b \cdot x$, která vyjadřuje lineární závislost absorpce na koncentraci. Konstanta b určuje sklon přímky, která je popsána touto rovnicí přímky. To znamená, že čím vyšší je součin $\epsilon \cdot l$, tím strměji se bude zvyšovat absorpce při zvyšování koncentrace.

Jelikož je závislost absorpce lineárně závislá na koncentraci, jak bylo uvedeno v předešlém odstavci, můžeme využít metody lineární regrese pro zjištění neznámé koncentrace u vzorku. Tento postup spočívá ve změření absorpcí u série vzorků se známými koncentracemi. Vyneseme-li tato měření do grafu, kde na ose **x** je koncentrace a na ose **y** je absorpce, získáme body, které leží přibližně na jedné přímce. Tuto přímku můžeme považovat za řešení Lambertova-Beerova zákona pro danou látku, vlnovou délku a tloušťku absorbující vrstvy. Pro výpočet koncentrace potřebujeme získat koeficienty **a** a **b** lineární rovnice přímky, které získáme z lineární regrese pomocí metody nejmenších čtverců.

Princip měření

Pro spektrofotometrická stanovení se používají fotometry a spektrofotometry. Zařízení, která měří při jedné nebo jen několika přesně definovaných vlnových délkách monochromatického světla, označujeme jako **fotometry**. Technicky složitější a dokonalejší přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, se nazývají **spektrofotometry**. Měří intenzitu světla po průchodu vzorkem (**I**) a dává ji do poměru k intenzitě světla před průchodem vzorkem (**I₀**). Na základě výše uvedených vztahů mezi veličinami můžeme určovat například transmitanci, absorbanci, koncentraci vzorku. Spektrofotometr se skládá z těchto částí:

- Zdroj záření (halogenová lampa pro VIS a deuteriová pro UV oblast)
- Čočky a zrcadla usměrňující paprsek světla
- Monochromátor (zařízení propouštějící pouze světlo určité vlnové délky) - jako monochromátor dnes slouží obvykle optická mřížka, jejímž nakláněním lze plynule vlnovou délku měnit. Rozsah vlnových délek, které z monochromátoru vycházejí, určuje šterbina, buď pevně nastavená, nebo rovněž nastavitelná. Čím je šterbina širší, tím větší je intenzita vycházejícího světla, ovšem za cenu menší specifičnosti měření. Naopak užší šterbina zajistí přesnější dodržení požadované vlnové délky, ovšem za cenu menší intenzity světla a zhoršení odstupu signálu od šumu.
- Kyvetový prostor - prostor na vzorky v kyvetách z plastu, skla nebo křemenného skla
- Detektor (CCD kamera anebo fotodioda) - Přesnost měření ovlivňuje *integrační čas* - doba, po kterou se absorbance měří. Čím je delší, tím přesnější bude výsledek měření, pokud ovšem není absorbující látka fotocitlivá (tj. pokud nedojde při delším osvětlení k vyblednutí vzorku). Nevýhodou dlouhého integračního času je samozřejmě také prodloužování doby měření, což je podstatné zejména při zpracování velkého množství vzorků, při měření při velkém počtu vlnových délek (tj. při měření spekter), nebo při zpracování vzorků, které se v čase mění (kinetická měření).
- Výstupní zařízení (software na analýzu dat, často také počítač)

Podle počtu paprsků využívaných k měření rozlišujeme jedno anebo dvoupaprskové spektrofotometry. U dvoupaprskového spektrofotometru jeden paprsek měří stanovený vzorek, druhý tzv. **slepý vzorek neboli „blank“** (rozpuštědlo bez stanovené látky). Při použití jednopaprskového přístroje musíme nejdříve změřit vlastnosti slepého vzorku, tedy provést referenční měření rozpuštědla a teprve potom měřit vzorek.

Moderní spektrofotometry jsou automatizované a plně ovladatelné pomocí počítače. Využívají se k měření absorpčních spekter (širší spektrum vlnových délek) anebo kvantitativní měření (při jedné anebo několika vlnových délkách). Umožňují také měření kinetiky jednoduchých, například enzymových reakcí. Proto spektrofotometrické metody nacházejí široké uplatnění - v oborech chemie, fyziky, biochemie, biologie i medicíny.

V praxi je však platnost Lambert-Beerova 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.

Využití v medicíně

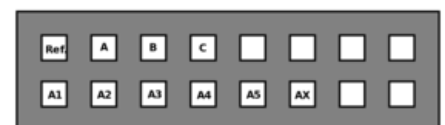
Spektrofotometrie mozkomíšního moku se využívá v diagnóze náhlých cévních mozkových příhod především při podezření na krvácení do subarachnoidálního prostoru. Poskytuje informaci o stáří krvácení a o protrahovaném či opakovaném krvácení. Spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku ve viditelné části spektra umožňuje charakterizovat na základě rozdílných absorpčních maxim oxyhemoglobin, methemoglobin a bilirubin.

Identifikace a stanovení koncentrace neznámého vzorku

Chemikálie

Pro měření v této spektrofotometrické úloze jsou použity tyto chemické látky:

1. **Síran měďnatý pentahydrát** má absorpční maximum v infračervené oblasti.
2. **Chlorid kobaltnatý hexahydrát** má absorpční maximum v zelené oblasti.
3. **Síran nikelnatý hexahydrát** má absorpční maxima v fialové a červené oblasti.
4. **Destilovaná voda**, která je použita jako referenční vzorek (slepý vzorek nebo blank) a na výplach kyvet.



Rozmístění jednotlivých kyvet se vzorky ve stojánku na kyvety.

S roztoky pracujte v rukavicích a ochrannými brýlemi, nevdechujte je ani nepožívejte.

Vzorky

V praktiku jsou připraveny v zásobních lahvičkách vzorky s označením A, B a C pro měření spekter. Pro stanovení koncentrace pomocí spektrofotometrie je připravena série vzorků s označením A1, A2, A3, A4 a A5 pro kalibrační křivku a vzorek o neznámé koncentraci s označením AX. Před samotným započítím vlastního měření si připravte kyvety s referenčním vzorkem (destilovaná voda) a jednotlivými vzorky a umístěte je do připraveného stojánu na kyvety. **Jednotlivé kyvety by měly být naplněny vzorky, tak aby byly zaplněny přibližně k vrcholu zúžené části a není třeba je plnit k jejich vrcholu.**

Vkládání kyvety

Před vložením kyvetu jemně otřete od přebytečné kapaliny a odstraňte případné nečistoty na jejím povrchu. Otevřete prostor na vkládání vzorků. Do držáku na kyvety vložte kyvetu. Kyvetu vkládáme co nejtěsněji ke stěně držáku, tak aby světelný paprsek procházel širší částí zúženého spodku kyvety. Poté zavřete dvířka prostoru pro vzorek. **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!**



Vzorky pro první úkol.

Krok 1 - Identifikace jednotlivých roztoků a učení vhodné vlnové délky

V tomto úkolu proměřte spektrum vzorků A, B a C v rozmezí vlnových délek 380–1100 nm. Identifikujte jednotlivá absorpční maxima. Následně na základě počtu absorpčních maxim určete, kterou chemickou látku (viz. Chemikálie) reprezentují jednotlivé vzorky A, B a C. Do protokolu uveďte vlnové délky a odpovídající barvy ve viditelném spektru pro jednotlivá maxima. Pro další úkol určete nejlepší vlnovou délku (kdy je maximální absorpce) pro vzorek A, kterou použijete při měření kalibrační křivky a stanovení koncentrace neznámého vzorku v dalším úkolu. Vygenerovaný soubor v programu WinASPECT při tisku do pdf souboru nahrajte na na server moodle s protokolem.



Vzorky pro druhý úkol.

Podrobný návod na ovládání programu při měření spekter A, B a C je v následujícím souboru. Návod na měření spekter

Krok 2 - Určení koncentrace neznámého vzorku

Pomocí vzorků A1, A2, A3, A4 a A5 vytvořte kalibrační křivku a v protokolu zaznamenejte data (jednotlivé koncentrace a absorpce, koeficient lineární rovnice přímky, koeficient determinace). Z hodnot lineární regrese pro kalibrační křivky vypočítejte molární absorpční koeficient ϵ a v protokolu uveďte její hodnotu a vzorec, který jste použili. Následně změřte koncentraci neznámého vzorku AX. Použijte vypočtený molární absorpční koeficient ϵ a změřenou koncentraci vzorku AX a vypočítejte odpovídající absorbanci, v protokolu uveďte její hodnotu a vzorec, který jste použili. Závěrem porovnejte změřenou absorbanci a vypočtenou absorbanci. Vygenerovaný soubor v programu WinASPECT při tisku do pdf souboru nahrajte na na server moodle s protokolem.

Podrobný návod na ovládání programu při měření koncentrace je v následujícím souboru. Návod na měření koncentrace

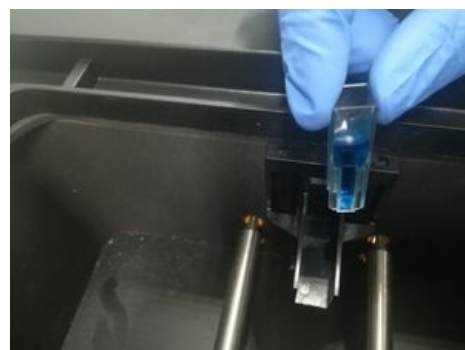


Zúžení kyvety v její dolní části.

Kontrolní otázky

1. Co je Lambertův zákon?
2. Co je lineární absorpční koeficient?
3. Co je transmitance?
4. Jaká je závislost transmitance na tloušťce absorbující vrstvy?
5. Co je absorbance?
6. Jaká je závislost absorbance na tloušťce absorbující vrstvy?
7. Co je absorpční spektrum?
8. Co je Beerův zákon?
9. Co je molární absorpční koeficient?
10. Na čem závisí molární absorpční koeficient?
11. Co je Lambertův-Beerův zákon?
12. Jaká je závislost absorpce na koncentraci?
13. Co lineární rovnice přímky neprocházející počátkem?
14. Jaký je vztah mezi sklonem přímky z lineární regrese a Lambertovim-Beerovim?

Literatura



Vkládání kyvety do držáku kyvety v prostoru pro vzorky.

1. Amler E. et al. Praktické úlohy z biofyziky I. Ústav biofyziky UK, 2. lékařské fakulty, Praha 2006
2. Navrátil L. et al. Medicínská biofyzika, Grada Praha 2005
3. On-line educational hypermedia - Hypermedia for Science Education) - <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/index.htm>
4. 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
5. WinASPECT®. Uživatelská příručka
6. 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)

Související stránky

- Portál:Biofyzikální praktikum (2. LF UK)



Vložená kyveta z pohledu procházejícího paprsku.