

**Praktické cvičení č.1a** datum: \_\_\_\_\_ jméno: \_\_\_\_\_

*Téma praktika:*

**Absorpční spektrum barevného produktu reakce (glukóza)**

**Stanovení absorpčního maxima**

**Okruhy k nastudování a dotazy (společné pro cvičení 1a a 1b):**

- 1) Přečtete si protokol a příložený příbalový leták
- 2) Zopakujte si základy spektrofotometrie
- 3) Osvěžte si základy vážení, rozpouštění, pipetování a k tomu potřebné výpočty
- 4) Jaký je rozdíl mezi kalibrační a absorpční křivkou?
- 5) Z absorbance které látky vyhodnocujeme v tomto stanovení koncentraci glukózy?
- 6) Z čeho se skládá spektrofotometr?
- 7) Jaký je rozdíl mezi viditelnou a komplementární barvou? Jakou vlnovou délku absorpčního maxima (přibližně) bude mít červeně se jevící roztok?

**Přístroje a pomůcky:**

Spektrofotometr DU – 65 Spectrophotometr Beckman  
Stojánky, zkumavky, mikropipety, dávkovače, špičky, standardní roztok glukózy,  
souprava Glukosa GOD-PAP, Roche Diagnostic

**Úkoly:**

- 1) Připravte 200 ml roztoku glukózy o  $c = 10,0$  mmol/l,  $M_r(\text{Glu}) = 180,16$  g/mol  
Připravte vzorky pro analýzu o objemu 1 ml a koncentracích 2,5 5,0 10,0 mmol/l ředěním standardního roztoku glukózy o  $c = 10$  mmol/l.

Tabulka ředění:

Vzorek č.	1	2	4
Koncentrace (mmol/l)	2,5	5,0	10,0
Standard – 10 mmol/l (ml)			
Destilovaná voda (ml)			

- 2) Zpracujte blank a naředěné vzorky tak, že smícháte 20  $\mu\text{l}$  jednotlivých standardů (pro blank 20  $\mu\text{l}$  vody) a 2,00 ml činidla ze soupravy. Reakční směs nechejte inkubovat 10 min
- 3) Manuální proměření absorpčního spektra a stanovení absorpčního maxima: u jednotlivých vzorků proměřte absorpční spektrum po 20 nm v rozmezí vlnových délek 380 – 740 nm (každá skupina změří jeden vzorek a výsledky poskytnete kolegům).
- 4) Výsledky měření zaznamenejte do tabulky. Sestrojte graf (absorpční spektrum) a z grafu stanovte absorpční maximum produktu stanovení glukózy.

$\lambda$ (nm)	A (pro $c=2,5$ mmol/l)	$\lambda$ (nm)	A (pro $c=5,0$ mmol/l)	$\lambda$ (nm)	A (pro $c=10$ mmol/l)
380		380		380	
400		400		400	
420		420		420	
440		440		440	
460		460		460	
480		480		480	
500		500		500	
520		520		520	

540		540		540	
560		560		560	
580		580		580	
600		600		600	
620		620		620	
660		660		660	
700		700		700	
740		740		740	

- 5) Proveďte plně automatické proměření absorpčního spektra v daném rozmezí vlnových délek pomocí funkce Scan, vytiskněte graf absorpčního spektra a výsledky manuálního i automatického měření porovnejte.

**Závěr:**

**Praktické cvičení č.1b** datum: \_\_\_\_\_ jméno: \_\_\_\_\_

*Téma praktika:*

### **Vliv vlnové délky na měřicí rozsah**

#### **Přístroje a pomůcky:**

Spektrofotometr DU – 65 Spectrophotometr Beckman

Stojánky, zkumavky, mikropipety, dávkovače, špičky

souprava Glukosa GOD-PAP, Roche Diagnostic, glukosa k přípravě standardního roztoku

#### **Úkoly:**

- 1) Připravte 200 ml roztoku glukózy o  $c=50,0$  mmol/l,  $M(\text{glu})=180,16$
- 2) Připravte kalibrační standardy o objemu 0,5 ml a koncentracích 2,5 5,0 7,5 10,0 15,0 20,0 30,0 50,0 mmol/l ředěním standardního roztoku glukózy o  $c = 50,0$  mmol/l

Tabulka ředění:

Standard č.	1	2	3	4	5	6	7	8
c (mmol/l)	<b>2,5</b>	<b>5,0</b>	<b>7,5</b>	<b>10,0</b>	<b>15,0</b>	<b>20,0</b>	<b>30,0</b>	<b>50,0</b>
st.r.50 (ml)								
Dest.H <sub>2</sub> O(ml)								

- 3) Současně zpracujte blank a naředěné standardy tak, že smícháte 20  $\mu$ l standardního roztoku (do blanku 20  $\mu$ l destilované vody) a 2,00 ml činidla ze soupravy. Reakční směs nechejte inkubovat 10 minut bez přístupu přímého slunečního světla.
- 4) Měření proveďte při vlnových délkách 380, 500 a 600 nm proti blanku.
- 5) Výsledky měření zaznamenejte do tabulky.

Standard [mmol/l]	A $\lambda$ 380nm	Standard [mmol/l]	A $\lambda$ 500 nm	Standard [mmol/l]	A $\lambda$ 600 nm
0		0		0	
2,5		2,5		2,5	
5,0		5,0		5,0	
7,5		7,5		7,5	
10,0		10,0		10,0	
15,0		15,0		15,0	
20,0		20,0		20,0	
30,0		30,0		30,0	
50,0		50,0		50,0	

- 6) Na milimetrovém papíru sestrojte kalibrační graf s jednotlivými kalibračními křivkami a určete při které vlnové délce má metoda nejvyšší citlivost a která vlnová délka je nejvhodnější pro měření. Zdůvodněte a srovnajte s hodnotou vlnové délky při které probíhá měření dle příbalového letáku této metody.

**Závěr:**

