MUNI MED Biofyzikální ústav

Lékařská biofyzika – cvičení

(Obory: Zdravotnický záchranář, Porodní asistentka a Všeobecná sestra)

Zadání samostatného cvičení:

1. Optické laboratorní metody

Klíčové pojmy:

spektrofotometrie, absorbance, Lambert-Beerův zákon, transmitance, luminiscence, absorpční křivka, absorpční maximum, refraktometrie, Abbeho refraktometr, Snellův zákon, mezí úhel, polarimetrie, polarizace světla, opticky aktivní látky

Praktický význam:

Optické laboratorní metody tvoří základ chemické diagnostiky v medicínských i jiných biochemických laboratořích. Jsou součástí nejen velkých průmyslových analyzátorů, ale i příručních přístrojů, např. glukometrů. Refraktometrie má význam více ve zkoumání umělých roztoků – léčiv, či v širším pohledu v optometrii. Polarimetrie je asi nejznámější z nemedicínského života při stanovení cukernatosti.

1.1. Spektrofotometrie

Cíl:

Měření absorpční křivky a určení maxima v oblasti viditelného spektra.

Pomůcky:

Spektrofotometr Specol, automatická pipeta, roztoky pro měření, destilovaná voda

Postup:

1) Zapněte spektrofotometr a nastavte pomocí voliče vlnových délek vlnovou délku 500nm.
2) Zkontrolujte čistotu kyvet (pozor: každá kyveta má 2 stěny čiré a 2 matné). Kyvetu uchopte vždy pouze za matné stěny.
3) Spektrofotometr Specol má pohyblivý držák měřícího nástavce pro 2 kyvety, vložte nejprve kyvetu s destilovanou vodou do jednoho úchytu, do druhého úchytu kyvetu s měřeným roztokem. Kyvety musí být naplněny nejméně do dvou třetin.
4) Do posuvného držáku vložte jednu kyvetu s destilovanou vodou a jednu s měřeným vzorkem. Nejprve změřte hodnotu absorbance, pro destilovanou vodu (blank) a pomocí tlačítka R ji vynulujte. Nyní do měřícího prostoru zasuňte kyvetu s měřeným roztokem a odečtěte jeho absorbanci A.
5) Poté do měřícího prostoru zasuňte opět kyvetu s destilovanou vodou (blank) a hodnotu vlnové délky zvětšete o 5 nm. Po vynulování displeje vložte do měřícího prostoru kyvetu se zkoumaným roztokem a odečtěte jeho absorbanci A.
6) Uvedený postup opakujte a vlnovou délku světla zvyšte při každém kroku o 5 nm. Při proměřování absorpční křivky postupujeme do vlnové délky 600 nm.

Vytvořeno v rámci projektu Fond rozvoje MU 1383/2019.

7) Do grafu vyneste závislost absorbance na vlnové délce a odečtěte absorpční maximum, což je vlnová délka, při které je absorbance měřeného roztoku nejvyšší.

Výstup:

Graf závislosti absorbance na vlnové délce s vyznačením absorpčního maxima.

Diskuze:

Popište, jak by se změnil průběh křivky měřili bychom roztok jiné látky a jak by se změnila při použití roztoku stejné látky o menší a větší koncentraci.

1.2. Refraktometrie

Cíl:

Stanovení koncentrace NaCl v neznámém vzorku

Pomůcky:

Abbeho refraktometr, osvětlovací lampa, krystalický NaCl, stojan se zkumavkami, automatické pipety, destilovaná voda, buničitá vata, váhy, váženka

Postup:

1) Připravte 10 ml roztoku NaCl v destilované vodě o koncentraci 200g/l.
2) Ředěním připraveného základního roztoku si připravte koncentrace NaCl 50, 100, 150g/l.
3) Osvětlovací hranol refraktometru oddělte od měřícího hranolu. Přesvědčte se o čistotě obou hranolů. Pokud uvidíte zbytky nečistot, opláchněte je destilovanou vodou a vysušte buničitou vatou.
4) Na plochu hranolu kápněte kapku zkoumané kapaliny a hranoly opět přiklopte.
5) Nyní otáčejte spodním knoflíkem přístroje tak, až se v zorném poli okuláru objeví rozhraní „světlé – tmavé“. Může být barevné díky rozdílným indexům lomu kapaliny a skla hranolů a tedy neostré. Kompenzaci, tj. „odbarvení“ a zároveň „zaostření“ proveďte otáčením horního knoflíku přístroje (uvnitř se otáčí dvojice kompenzačních hranolů, které při vhodném natočení eliminují barevnost rozhraní, které se stane černo-bílým a tedy i ostrým). Takto vykompenzované rozhraní nastavte na střed kříže. Pozn.: Otáčením knoflíku pro vyhledání rozhraní otáčíme systémem hranolů a de facto vyhledáváme oblast osvětlenou světlem, které se láme pod úhlem maximálně rovným úhlu meznímu pro aktuálně použitou kapalinu.
6) Ve spodní části odečtěte hodnotu indexu lomu kapaliny (s přesností nejméně na tři desetinná místa).
7) Postupně proměřte indexy lomu všech kalibračních roztoků, včetně základního. Nejprve změřte index destilované vody, dále postupujte od roztoku s nejnižší koncentrací k roztoku o nejvyšší koncentraci. Všechny naměřené hodnoty zapište do tabulky a poté vytvořte graf závislosti indexu lomu na koncentraci.
8) Nakonec změřte index lomu neznámého vzorku, a z grafu odečtěte jeho koncentraci.
9) Po skončení měření otřete plochy obou hranolů buničinou zvlhčenou destilovanou vodou nebo opláchněte destilovanou vodou a otřete buničinou a nechte hranoly odklopeny.

Vytvořeno v rámci projektu Fond rozvoje MU 1383/2019.

Výstup:

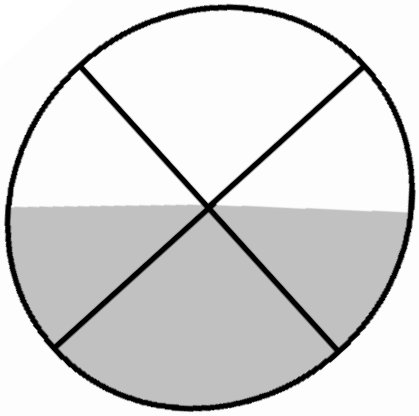
Graf závislosti indexu lomu kapaliny na její koncentraci, včetně vyznačení hodnot neznámého vzorku.

Diskuze:

Uveďte limitace této metody při hodnocení biologických vzorků. Uveďte praktické využité refraktometrie ve zdravotnictví.

Příloha:

Obrazec hledaný v refraktometru:



Vytvořeno v rámci projektu Fond rozvoje MU 1383/2019.