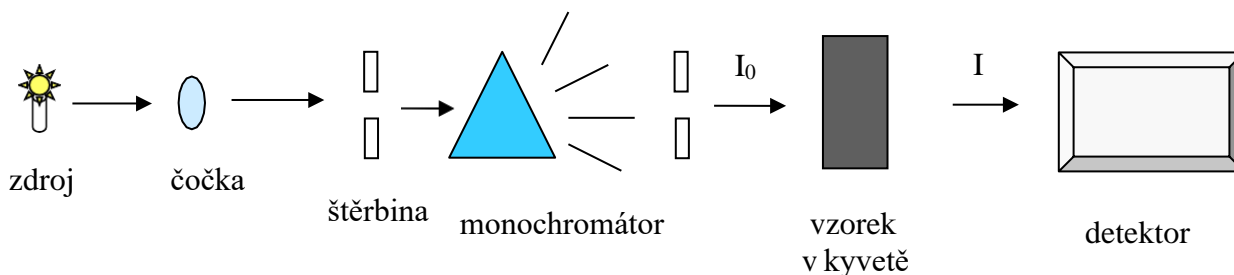


## POUŽITÁ ANALYTICKÁ METODA -SPEKTROFOTOMETRIE

Analyty v klinické biochemii se nejčastěji stanovují spektrofotometricky, používané přístroje se nazývají spektrofotometry. Spektrofotometrie je analytická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem. Část záření je pohlcena (absorbována) analyzovanou látkou, zbývající záření, které analyzovaným roztokem projde, je detekováno detektorem. Intenzita záření poprvé vzorkem ( $I$ ) je menší než původní intenzita záření ( $I_0$ ) do vzorku vstupující:  $I < I_0$ . Množství pohlceného záření závisí na množství analyzované látky ve vzorku: čím vyšší je koncentrace dané látky, tím více záření je pohlceno. Mnoho látek přítomných v biologických tekutinách (hlavně krvi a moči) je v klinických laboratořích analyzováno spektrofotometricky.

### Schéma spektrofotometru:



Pro spektrofotometrickou analýzu barevných roztoků se používá [elektromagnetické záření](#) v oblasti viditelného světla (VIS,  $\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$ ), zdrojem světla je žárovka. Dále je časté použití ultrafialového záření (UV,  $\lambda = 190 - 400 \text{ nm}$ ), kterým můžeme analyzovat i roztoky bezbarvé, zdrojem světla bývá nejčastěji deuteriová výbojka. Každá látka absorbuje záření určité vlnové délky (obsahuje tzv. chromofory schopné toto záření pohltit). Záření určité vlnové délky se označuje jako **monochromatické**. Získá se rozkladem polychromatického záření (u VIS jde o rozklad bílého světla emitovaného žárovkou) pomocí optické mřížky nebo hranolu. Vhodným nastavením štěrbiny za monochromátorem vstupuje do kyvety jen záření o určité vlnové délce, ostatní vlnové délky se odrážejí pod jiným úhlem. Podle oblasti elektromagnetického záření se volí použité kyvety: skleněné pro VIS, křemenné pro UV oblast (UV záření je sklem pohlcováno); v současné době se používají i speciální plastové kyvety.

**Principem analýzy** prováděné v praktickém cvičení je metoda, která je založena na vzniku barevné látky, můžeme ji stanovit spektrofotometricky ve viditelné oblasti spektra.

### **Doplňkové barvy viditelného světla** (viz. také Obr.1):

Pokud **roztok absorbuje určitou vlnovou délku** viditelného spektra (viz. prostřední sloupec tabulky), jeví se nám tento roztok jako barevný. Ostatní vlnové délky roztokem projdou, avšak **pozorované zbarvení roztoku** je dáno tzv. doplňkovou (komplementární) barvou k barvě pohlcené (viz. sloupec vpravo):

vlnová délka (nm)	absorbovaná část VIS spektra	komplementární - propuštěná barva (= určuje zbarvení roztoku )
350 - 430	fialová	žlutá
430 - 475	modrá	žlutooranžová
475 - 495	zelenomodrá	oranžová
495 - 505	modrozelená	červenooranžová
505 - 555	zelená	červená
555 - 575	žlutozelená	purpurová
575 - 600	žlutá	fialová
600 - 650	oranžová	modrá
650 - 700	červená	zelená

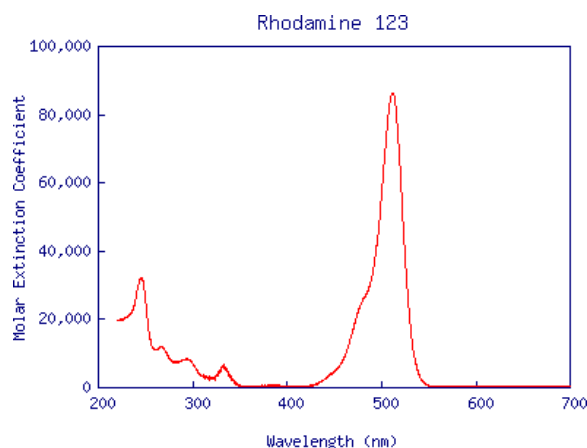
*Příklady:*

- pokud roztok absorbuje záření mezi 400 a 480 nm (modrofialová), bude propouštět všechny ostatní barvy, které budou okem vnímány jako barva žlutooranžová; znamená to, že žlutooranžová barva je komplementární k barvě modrofialové
- pokud necháme procházet bílé světlo roztokem, který absorbuje záření mezi 505 a 555 nm (zelená), propuštěné záření a tudíž i zbarvení roztoku budou vnímány v barvě červené; původní bílé světlo obsahovalo všechny vlnové délky VIS v určitém poměru, tento poměr byl průchodem světla roztokem narušen a světlo tudíž změnilo barvu
- pokud necháme procházet červeným roztokem červené světlo, bude toto záření propuštěno, neboť červený roztok červené záření neabsorbuje; naopak zelené záření (zelená je komplementární k červené) bude při průchodu červeným roztokem pohlcováno



**Obr.1** Komplementární barvy se nacházejí v kolečku naproti sobě

Z uvedeného vyplývá, že pro spektrofotometrické stanovení musíme vybrat takovou vlnovou délku, která bude analyzovanou látkou nejvíce pohlcována. Optimální je, pokud je tato vlnová délka současně co nejméně pohlcována ostatními látkami přítomnými v roztoku. Vhodná vlnová délka se zjišťuje před vlastní spektrofotometrickou analýzou: proměří se tzv. **absorpční spektrum** jako závislost schopnosti absorbovat záření různých, kontinuálně měněných vlnových délek (viz. Obr.2). Pro vlastní analýzu se vybírá vlnová délka, která je analyzovanou látkou nejvíce pohlcována.



**Obr.2** Příklad absorpčního spektra analyzované látky: maximální absorpce byla nalezena kolem 500 nm

**Princip spektrofotometrie:**

Při spektrofotometrii vycházíme z **Lambert-Beerova zákona**, který vyjadřuje **vztah mezi koncentrací látky v roztoku a její absorpencí**, tj. schopností molekul látky pohlcovat elektromagnetické záření o dané vlnové délce. Při průchodu světelného toku roztokem tak dochází k jeho zeslabení, protože částice látek přítomných v roztoku část elektromagnetického záření pohltí (absorbují). Záření, které projde kyvetou dopadá na detektor, který měří jeho intenzitu. Z tohoto důvodu je zavedena veličina zvaná **transmitance** (propustnost), která je definována vztahem:

$$T = I / I_0$$

kde  $I_0$  = intenzita záření vstupujícího do kyvetu;  $I$  = intenzita záření po průchodu kyvetou; transmitance ( $T$ ) nabývá hodnot 0 až 1: nulovou hodnotu má pokud je veškeré záření pohlceno, hodnotu 1 naopak tehdy, pokud kyvetou veškeré záření projde

Někdy se transmitance vyjadřuje v procentech:  $T = (I / I_0) \times 100$  tj. nabývá hodnot 0 až 100 %

Množství absorbovaného záření lze vypočítat z hodnoty transmitance:

$$A = -\log T = \log (1/T) \Rightarrow T = 10^{-A}$$

Veličina  $A$  se nazývá **absorbance** a je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus transmitance. Nabývá hodnot od nuly výše, většinou měříme v rozmezí 0 až 1,5 (nebo méně). Vyšší hodnoty absorbance již bývají málo přesné, měření vždy závisí na citlivosti detektoru (neboť např.  $A = 2$  odpovídá  $T = 0,01$ , tj. pouze jedno procento z původní intenzity záření dopadlo na detektor; pro  $A = 3$  je  $T = 0,001$ , tj. na detektor dopadá jen 0,1 % z původní intenzity záření).

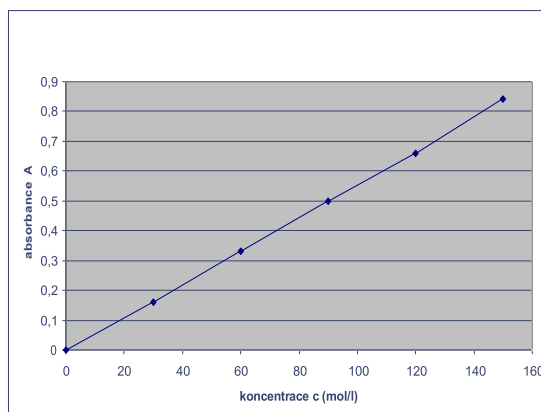
**Lambert-Beerův zákon:**  $A = c \cdot l \cdot e$  nebo  $T = 10^{-c \cdot l \cdot e}$

$A$  = absorbance;  $c$  = molární koncentrace;  $l$  = délka kyvetu, resp. tloušťka vrstvy roztoku, kterou prochází záření;  $e$  = molární absorpční koeficient (tabelovaná hodnota);  $T$  = transmitance; Lambert-Beerův zákon platí pro monochromatické záření a obor nízkých koncentrací, řádově menších než  $10^{-2}$  mol . l<sup>-1</sup>.

**Z Lambert-Beerova zákona vyplývá**, že čím je koncentrace látky v roztoku vyšší, tím je vyšší hodnota naměřené absorbance (tj. absorbance je přímo úměrná koncentraci a naopak). Tato závislost je lineární,

neboť Lambert-Beerův zákon připomíná rovnici přímky ( $A = c \cdot l \cdot \epsilon \approx y = kx + q$ , kde  $x$  odpovídá hodnotě  $c$ , hodnota  $l \cdot \epsilon$  odpovídá  $k$ , tj. směrnici přímky;  $q = 0$ , tj. závislost absorbance na koncentraci prochází počátkem), viz. Obr.3

U barevných roztoků naměříme ve viditelném spektru tím větší absorbanci, čím větší je jejich intenzita zbarvení (= tmavší, koncentrovanější roztok).



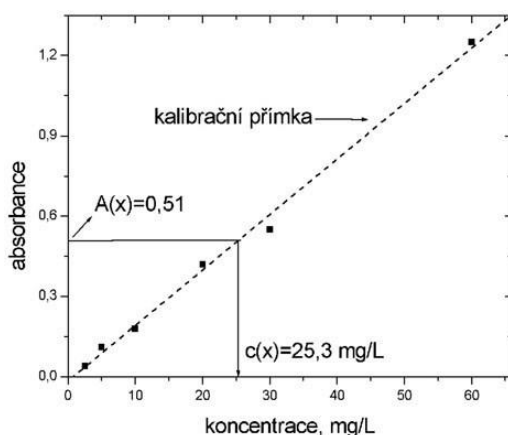
**Obr.3** Závislost absorbance na koncentraci

Transmittance (propustnost) je nepřímo úměrná koncentraci: čím vyšší je koncentrace látky, tím méně záření vzorek propustí, tj. méně záření projde květou → méně záření dopadne na detektor. Mezi koncentrací a transmittancí je exponenciální závislost ( $T = 10^{-c \cdot l \cdot \epsilon}$ ).

Aby bylo možno určit koncentraci stanovované látky je nejprve nutné proměřit a sestavit kalibrační křivku. **Kalibrační křivka** (Obr.4) pro fotometrická stanovení je grafické znázornění **závislosti absorbance** roztoku **na koncentraci** v něm přítomné stanovované látky. Křivku lze zpracovat na počítači, na praktiku však budeme používat ruční zpracování, je nutné přinést si **milimetrový papír**. Pro sestavení kalibrační křivky používáme tzv. **standardní roztoky** stanovované látky (tzv. kalibrační roztoky). Standardním roztokem se rozumí roztok látky o známém složení a koncentraci. V praxi se používají minimálně tři, raději však více, standardní roztoky o různé koncentraci. Lze je nejlépe připravit naředěním koncentrovaného, tzv. **zásobního roztoku** standardu na několik nižších koncentrací. Rozmezí koncentrací by mělo být tak široké, aby se výsledky analýzy vzorků o neznámé koncentraci vešly mezi nejnižší a nejvyšší hodnotu kalibrační křivky. Vzhledem k tomu, že koncentrace některých látek v moči je vysoká, je nutno vzorek moči před analýzou 100x naředit destilovanou vodou. Výsledek koncentrace  $x$  odečtený z kalibrační křivky je proto nutné vynásobit 100, abychom získali skutečnou koncentraci této látky v nenaředěné moči.

Vynesení naměřených hodnot absorbancí standardních roztoků (osa  $y$ ) proti jejich koncentracím (osa  $x$ ) získáme **lineární závislost** mezi absorbancí a koncentrací (viz. Lambert-Beerův zákon). Při sestavování kalibrační křivky nepropojujeme jednotlivé body přímo, ale proložíme jimi přímku procházející co nejlépe všem bodům. Kalibrační přímka by měla procházet také nulou (průsečíkem os  $x$  a  $y$ ). Standardní roztoky je vhodné zpracovávat současně se vzorky o neznámých koncentracích, aby byly zachovány stejné podmínky analýzy, včetně případných nepřesností, např. při pipetování. Po proměření absorbancí standardních roztoků i neznámých vzorků a sestavení kalibrační křivky vyneseme do kalibrační křivky naměřenou hodnotu absorbance neznámých vzorků. Spuštěním kolmice

od bodu, kde hodnota absorbance odpovídá bodu na kalibrační křivce odečteme na ose x hodnotu koncentrace látky v analyzovaném vzorku.



**Obr.4** Kalibrační křivka ( $x$  = neznámý vzorek,  $A$  = absorbance,  $c$  = koncentrace)

Absorbanci **měříme proti tzv. slepému vzorku** (= slepý pokus, blank). Jedná se o roztok obsahující stejné množství všech přidaných činidel jako obsahuje analyzovaný vzorek (standard nebo vzorek o neznámé koncentraci), avšak s výjimkou vlastní stanovované látky. Pipetovaný objem stanovované látky (standardu nebo moči) nahradíme ve slepém pokusu stejným objemem destilované vody. Výraz „měříme proti slepému pokusu“ znamená, že fotometr před vlastním měřením absorbancí vynulujeme na slepý pokus: do kyvety nalijeme tento roztok a naměřenou absorbancí položíme rovnou nule. Při měření absorbancí standardních roztoků i vzorků o neznámé koncentraci tak bude automaticky odečtena případná „absorbance pozadí“, která není dána absorpcí záření analyzovanou látkou (v některých případech mohou totiž dané monochromatické záření absorbovat i přidaná činidla, což by bez použití slepého pokusu způsobilo naměření falešně vyšší absorbance a tím i falešně vyšší hodnotu zjištěné koncentrace).

**V praxi** se většinou fotometr nejprve vynuluje **na vodu** (bezbarvá kapalina, samotné rozpouštědlo, s absorbancí = 0). Po té se do kyvety nalije slepý pokus, naměřená hodnota absorbance se zapíše (pro kontrolu, při příštím měření bychom při správné přípravě reakční směsi měli získat stejnou absorbanci) a fotometr se pak opět vynuluje. Pokud je fotometr vynulován pouze na vodu, je pak třeba od každé naměřené absorbance standardu či vzorku hodnotu absorbance slepého pokusu odečíst samostatně. Teprve tehdy je zajištěno, že při měření vzorků odpovídá absorbance pouze stanovované látce. Hodnota absorbance, a tudíž i výsledná koncentrace, nebude pak zkreslena jinou látkou, která je součástí roztoku.

Výsledná hodnota kvantitativního stanovení (= zjišťujeme koncentraci, tj. kvantitu) závisí na **přesnosti pečlivosti při zpracování**. Přidání pouze „přibližného“ množství činidla, nepřesné pipetování vzorků, nesprávná práce s fotometrem (nepřesné vynulování, špinavé kyvety, zbytky koncentrovanějšího roztoku v kyvetě při měření roztoků méně koncentrovaných, naředění vzorků vodou, která zůstala v kyvetě po proplachování) - to vše vede k získání nepřesných výsledků.