

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

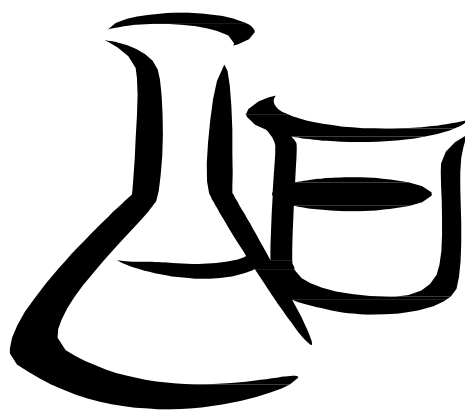
# Spektrofotometrie

---

Praktické cvičení z lékařské biochemie

*Všeobecné lékařství*

Iva Subhanová



2022/2023

## **Obsah:**

### **Úvod do spektrofotometrie**

Základní pojmy ve spektrofotometrii	3
Kvalitativní a kvantitativní analýza	12
Aplikace a limitace spektrofotometrie	16
Barevnost komplexů	18

**Spektrofotometrie** je v současnosti nejvíce využívanou laboratorní technikou v klinické biochemii, je metodou první volby při **analýze látek, které jsou samy barevné nebo mohou reagovat za tvorby barevného produktu**. Pokud se látky nacházejí ve vyšetřovaném materiálu v menším množství, než bychom dokázali spektrofotometricky stanovit, nebo ve směsi se strukturně podobnými látkami, které by vzájemně analyticky interferovaly, volí se jiné, např. imunochemické či chromatografické techniky. Avšak i tyto citlivější metody jsou často na spektrofotometrii závislé – mohou ji využívat jako následný detekční systém.

## Základní pojmy ve spektrofotometrii

**Absorbance (A)** - udává množství světla pohlceného měřeným roztokem

**Absorpce světla** - pohlcení a zeslabení záření při průchodu měřeným roztokem

**Absorpční spektrum** - závislost absorbance na vlnové délce  $\lambda$  :  $A = f(\lambda)$

**Atest** - známá hodnota standardu, stanovená nezávislou metodikou

**Blank** (slepý vzorek) - roztok obsahující všechny složky kromě analyzovaného vzorku (reagenční blank) nebo jen vzorek bez reagensů (vzorkový blank)

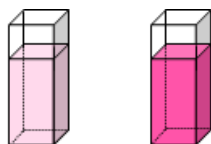
**Chromofor** - skupina (seskupení atomů) v molekule, která způsobuje absorpci v UV-VIS oblasti

**Kalibrační křivka** - závislost absorbance na koncentraci  $A = f(c)$

**Standard** - vzorek analytu o známé koncentraci dané atestem

**Transmittance (T)** - propustnost - poměr intenzity záření prošlého a vstupujícího

**UV-VIS** - ultrafialová a viditelná část elektromagnetického spektra



Vidíme-li 2 roztoky stejné látky o různé intenzitě zbarvení, automaticky předpokládáme, že tmavší roztok je více koncentrovaný. Tento předpoklad je vlastně podstatou spektrofotometrie. **Pokud víme, kolik světla roztoky prochází, můžeme zjistit, jakou mají koncentraci.** Množství procházejícího světla můžeme analyzovat spektrofotometrem na principu molekulové absorpční spektrofotometrie.

## Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS

Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV oblasti měří absorpci světla od 200 do 380 nm (bezbarvé látky) a ve viditelné oblasti (lidským okem) od 380 nm do 800 nm (barevné látky).

### Co je to barva?

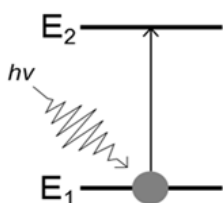
Víme, že světlo je elektromagnetické záření (vlnění) charakterizované **vlnovou délkou** (kolik nm za jeden kmit urazí) a **frekvencí** (kolikrát za sekundu vlnění kmitne). Právě **frekvence světla určuje barvu** - odlišnou frekvenci vnímáme jako odlišnou barvu: jestliže vlna vibruje rychleji, světlo je modřejší (380-500 nm), vibruje-li pomaleji, světlo je červenější (okolo 650 nm). Jednoduše řečeno, barva je frekvence (obr. 1). Ovšem praktičtější je měřit vlnovou délku než frekvenci. Vlnová délka je nepřímo úměrná frekvenci, **čím delší je vlnová délka, tím nižší frekvence.**



Obr 1: Elektromagnetické vlnění a viditelné spektrum.

### Jaký je vztah energie k vlnové délce při absorpci světla?

Molekuly mění svoji energii o hodnotu energie dopadajícího fotonu - dochází k přechodu valenčních elektronů na vyšší energetickou hladinu. (viz obr. 2)



Obr 2: Energetické hladiny molekuly. Absorpcí energie fotonu vhodné vlnové délky dochází k přechodu valenčních elektronů ze základního ( $E_1$ ) do excitovaného stavu ( $E_2$ ).

Má-li molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií, musí absorbovat energii fotonu (o vlnové délce  $\lambda$  a frekvenci  $\tilde{\nu}$ ), která odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami  $E_2$  a  $E_1$ :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \tilde{\nu} \quad (1)$$

$E_2$  = energie excitované hladiny,  $E_1$  = energie základní hladiny (eV)

$h$  = Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  J s)

$\tilde{\nu}$  = frekvence (Hz)

Vlnová délka absorbovaného světla je nepřímo úměrná jeho frekvenci:  $\lambda = c / \tilde{\nu}$  (2)

$c$  = rychlost světla ( $3 \cdot 10^8$  m/s)

$\lambda$  = vlnová délka (nm)

$\tilde{\nu}$  = frekvence (Hz)

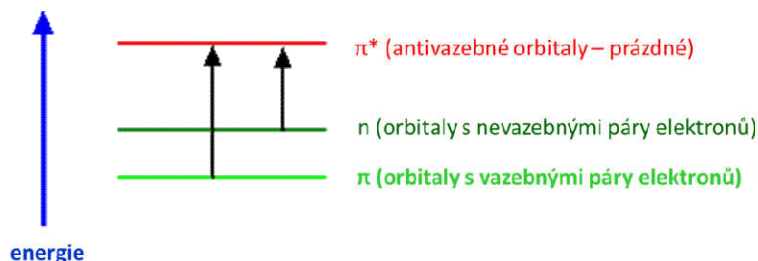
Ze závislostí (1) a (2) vyplývá, že vztah energie k vlnové délce absorbovaného světla je inverzní - čím kratší vlnovou délku molekula absorbuje, tím vyšší energii pro přechod elektronu získá.



Obr. 3: VIS spektrum: Fotony o kratších vlnových délkách (modré světlo) mají vyšší energii než fotony o delších vlnových délkách (červené světlo) (Upraveno dle: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9\\_spektrum#/media/File:Spectre.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9_spektrum#/media/File:Spectre.svg))

**Nejvýznamnější přechody valenčních elektronů jsou:**

- $\pi - \pi^*$  (z  $\pi$  vazebných orbitalů do  $\pi^*$  antivazebných orbitalů) – sloučeniny s dvojnými a trojnými vazbami
- $n - \pi^*$  (z  $n$  nevazebných do  $\pi^*$  antivazebných orbitalů) v molekule je kromě dvojných vazby přítomen také atom s volným elektronovým párem

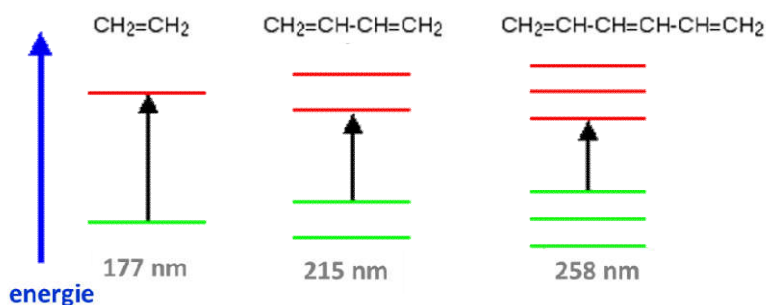


Obr. 4: Přechody valenčních elektronů: Podmínkou, aby sledovaná látka absorbovala v ultrafialové nebo viditelné oblasti záření, je přítomnost vazebných  $\pi$  elektronů ve vazebných molekulových orbitalech a/nebo nepárových elektronů v nevazebných molekulových orbitalech. (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>)

Skupiny v molekule, které umožňují absorpci, nazýváme **chromofory**. Jsou to strukturní prvky nebo funkční skupiny, obsahující násobné (hlavně dvojně) vazby.

Na chromofor se mohou navázat substituenty nebo skupiny atomů s volným elektronovým párem – tzv. **auxochromy**, které v konjugaci  $\pi$ -elektronovým chromoforem zvyšují jeho barevnost – posouvají absorpci k delším vlnovým délkám.

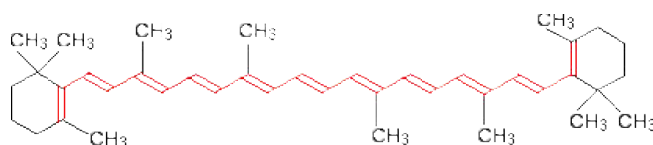
Čím vyšší je **konjugace dvojných vazeb**, vazeb, tím **nižší energie** je potřeba k přechodu do antivazebného orbitalu a tím **vyšší vlnová délka** se absorbuje (viz obr. 5)



Obr. 5: Konjugací dvojných vazeb se snižuje energie potřebná k přechodu elektronu. 1,3,5-hexatrien se třemi dvojnými vazbami bude k přechodu elektronů potřebovat méně energie než 1,3-butadien se dvěma volnými vazbami. Obě sloučeniny potřebují menší množství energie než ethen s jednou dvojnou vazbou. Tomu odpovídají i absorbované vlnové délky. Ethen maximálně absorbuje při nejkratší vlnové délce 177 nm, 1,3-butadien při 217 a 1,3,5-hexatrien při nejdelší vlnové délce 258 nm. (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>)

Z obrázku 5 je zřejmé, že 3 dvojně vazby hexatrienu nedostačují na absorpci ve viditelném spektru. Aby byla látka barevná (absorbovala záření ve VIS), musí obsahovat rozsáhlejší systémy konjugovaných dvojných vazeb, pro které je typická delokalizace elektronů.

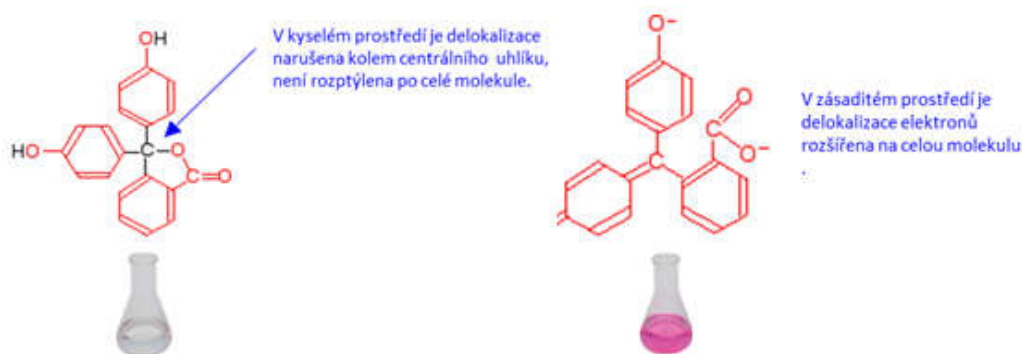
**Vysoce delokalizované systémy posunou maximum absorpce k vyšším vlnovým délkám** (tj. z UV do VIS). Čím je vyšší rozsah delokalizace, tím delší vlnové délky jsou absorbovány. Např. oranžovou barvu beta karotenu vidíme díky konjugovanému systému 11 dvojných vazeb (viz obr. 6).



Obr. 6: Delokalizované elektrony beta karotenu (zvýrazněny červeně) s absorpcí ve VIS (470 nm) (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>)

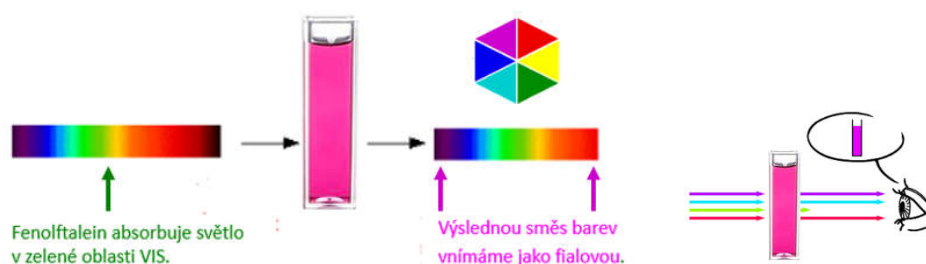
Dalším příkladem delokalizovaných elektronů mohou být **organická barviva na bázi trifenylmethanu s asymetrickými substituenty**. V praktickém cvičení věnovaném kvantitativní analýze jsme používali jako indikátor acidobazické titrace **fenolftalein**, který je v kyselém prostředí bezbarvý (absorbuje v UV oblasti) a barevný pouze v alkalickém prostředí (absorbuje 553 nm). Změna pH má vliv na změnu konjugovaného chromoforního systému fenolftaleinu. **Barevná forma v alkalickém prostředí vzniká díky vyššímu stupni**

**delokalizace elektronů, který posune absorpci k vyšším vlnovým délkám (viz obr. 7).**



Obr. 7: Fenolftalein v kyselém a zásaditém prostředí. V kyselém prostředí brání uhlíkový atom se 4 jednoduchými vazbami interakci 3 delokalizovaných systémů, v zásaditém prostředí se po odštěpení 2 protonů otevře laktamový kruh a delokalizovaný systém elektronů se rozšíří na celý systém (zvýrazněno červeně), což se projeví posunem absorpce do viditelné oblasti spektra. (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>)

Fenolftalein tedy absorbuje vlnové délky zelené oblasti spektra (553 nm) a zbarví se doplňkovou (komplementární) barvou (v jejímž spektru absorbované vlnové délky chybí).



Obr. 8: Absorpce fenolftaleinu ve VIS. (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>)

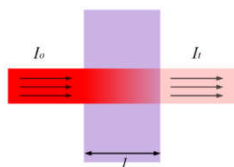
Průhledná látka má barvu odpovídající záření, které neabsorbuje, ale propouští (které projde roztokem až k našemu oku). Znamená to, že **pokud je z bílého světla absorbována určitá vlnová délka, naše oči detekují směs všech ostatních vlnových délek viditelného spektra jako komplementární barvu**. Komplementární barvy světla jsou takové, které po smíchání dávají bílé světlo (to ovšem neplatí u barev na malířské paletě – pokud bychom smíchali zelenou a červenou, rozhodně nedostaneme bílou). K barevnému roztoku, jehož koncentraci budeme spektrofotometricky zjišťovat, volíme vlnovou délku vhodnou k analýze jako komplementární k barvě roztoku.

Otestovat si své vnímání komplementárních barev můžete na:

[https://scilearn.sydney.edu.au/fychemistry/calculators/colour\\_wheel.shtml](https://scilearn.sydney.edu.au/fychemistry/calculators/colour_wheel.shtml)

## Lambert-Beerův zákon

Pokud budeme spektrofotometricky měřit koncentraci roztoku, budeme analyzovat, kolik světla roztokem prochází. Prochází-li světelný paprsek roztokem, který část světla absorbuje, je **intenzita paprsku vstupujícího vyšší než intenzita paprsku prošlého**.



Obr. 9: Transmittance (Dle Heesung Shim):

[https://chem.libretexts.org/Core/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry/Kinetics/Reaction\\_Rates/Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry)

Zajímá nás poměr obou veličin (poměr vstupního světla  $I_0$  k propuštěnému  $I_1$ ).

Tento poměr udává **transmittance T** (propustnost):  $T = I_1 / I_0$

Máme-li tedy 2 roztoky látky o různé koncentraci, potom platí, že

$$I_0 > I_1 > I_2$$



Čím vyšší bude koncentrace roztoku, tím větší šanci má procházející foton, že bude absorbován. **Pravděpodobnost jeho absorpce bude růst s koncentrací.**

Máme-li 2 roztoky téže látky stejné barvy a stejné intenzity zbarvení, a jeden umístíme do delší kyvety než druhý, budou se lišit pouze v dráze, kterou musí foton roztokem projít. Pokud svítíme světlem stejné intenzity na obě kyvety, delší kyvetou světlo prochází déle než v užší, potom platí, že

$$I_0 > I_2 > I_3$$



Čím déle bude foton procházet, tím větší má šanci, že bude absorbován. V širší kyvetě bude jeho dráha i absorpce vyšší. **Pravděpodobnost jeho absorpce bude růst s délkou dráhy.**

**Absorpce fotonu tedy roste s rostoucí koncentrací i délkou dráhy.**



Transmitance barevného roztoku pro určitou vlnovou délku závisí na:

- vlastnostech absorbující látky
- koncentraci absorbující látky
- délce dráhy (kyvety)

Tyto předpoklady vyjadřuje **Lambert-Beerův zákon**:  $T = 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}$  (3)

$\varepsilon$  = molární absorpční koeficient ( $\text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) = charakterizující míru absorpce látky při určité vlnové délce v roztoku o koncentraci 1 mol/l v 1 cm kyvetě

$c$  = koncentrace rozpuštěné látky (mol/l)

$l$  = tloušťka absorbující vrstvy (cm)

Lambert-Beerův zákon platí jen pro **monochromatické záření a zředěné roztoky** o koncentraci  $<10^{-2}$  mol/l, ve kterých rozpuštěné částice nepodléhají žádným interakcím a v roztoku je jen jedna absorbující složka.

Ze závislosti (3) vyplývá, že **transmitance T je exponenciálně závislá na koncentraci látky**. Pro vyjádření závislosti absorpce záření na koncentraci absorpční složky je vhodné vztah logaritmovat, čímž se z exponenciální závislosti stane lineární.

Byla zavedena bezrozměrná veličina **absorbance (A)**, která kvantitativně vyjadřuje absorpci světla chromoforem (je-li nulová absorpce, je nulová i absorbance, s rostoucí absorpcí roste i absorbance).

$$A = -\log(T) = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

Absorbance a transmitance jsou tedy v inverzním vztahu – čím více roztok světlo absorbuje, tím méně ho propouští. **Transmitance** nabývá hodnot od 0 (nepropustný vzorek) do 1 (zcela propustný vzorek). **Absorbance** nabývá hodnot od 0 (vzorek neabsorbuje) do  $\infty$  (absorbuje veškeré záření dané vlnové délky). Pro praktické měření mají z hlediska jeho přesnosti význam jen hodnoty absorbance nepřekračující hodnotu 1.

Platí-li vztah (4), že  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$  (a koeficient ( $\varepsilon$ ) i délka dráhy ( $l$ ) jsou konstantní), potom platí, že **absorbance roztoku je lineárně závislá na jeho koncentraci,  $A = f(c)$** .

Pomocí Lambert-Beerova zákona tedy můžeme kvantitativně stanovit koncentraci látky v roztoku měřením jeho absorbance s využitím spektrofotometru.

## Měření na spektrofotometru

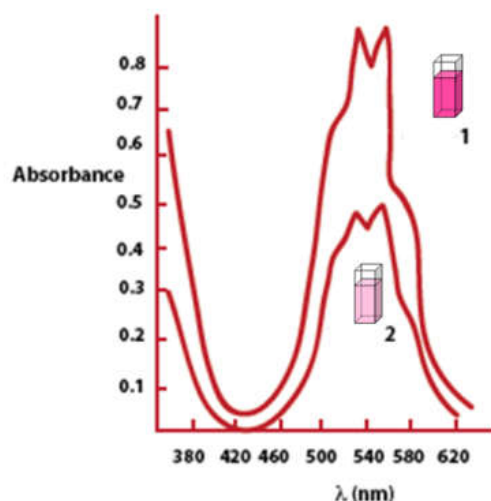
**Měření provádíme vždy v téže kyvetě**, aby byly dodrženy stejné podmínky. Nejprve změříme **blank**, tedy nastavíme nulovou absorbanci roztoku blanku, čímž získáme „baseline“ **pro měření** všech standardů i vzorků. Tato „baseline“ musí zůstat stejná po celou dobu měření (nejsme-li si jistí, změříme v průběhu analýz blank jako vzorek – měl by ukazovat nulovou absorbanci). Blank obsahuje jen reagenční směs bez analyzovaného vzorku. Je to tzv. **reagenční blank**, používá se ke kompenzaci vlivu reagensů. (Roztok blanku může být barevný, máme-li barevné činidlo).

U některých měření, absorbují-li silně složky matrice analytu (sérum, moč), se používá rovněž tzv. **vzorkový blank**, který kompenzuje vliv matrice vzorku. Vzorkový blank je jen vzorek doplněný vodou nebo fyziologickým roztokem do celkového objemu reakční směsi, neobsahuje reagenzie. Naměřená absorbance vzorkového blanku se odečítá od absorbance příslušného vzorku.

Spektrofotometr umožňuje měřit absorbance až do 2,5, vzorky s vyšší absorbancí se musí ředit a výsledek násobit faktorem ředění. V laboratorní praxi se při kvantitativní analýze standardně ředí vzorky s absorbancí nad 1,0, neboť měření absorbancí nad tuto hodnotu je zatíženo velkou chybou - viz Přesnost fotometrických metod/průměrná chyba fotometrického stanovení: <http://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie>

## Stanovení koncentrace pomocí spektrofotometrie

Nejprve **musíme nalézt optimální vlnovou délku, při které budeme měření provádět**. Teoreticky bychom mohli měřit při libovolné vlnové délce, která je absorbována, v oblasti maximální absorpce je však měření nejcitlivější - molární absorpční koeficient  $\epsilon$  je nejvyšší a změny koncentrace jsou zde nejvíce patrné (viz obr.11).



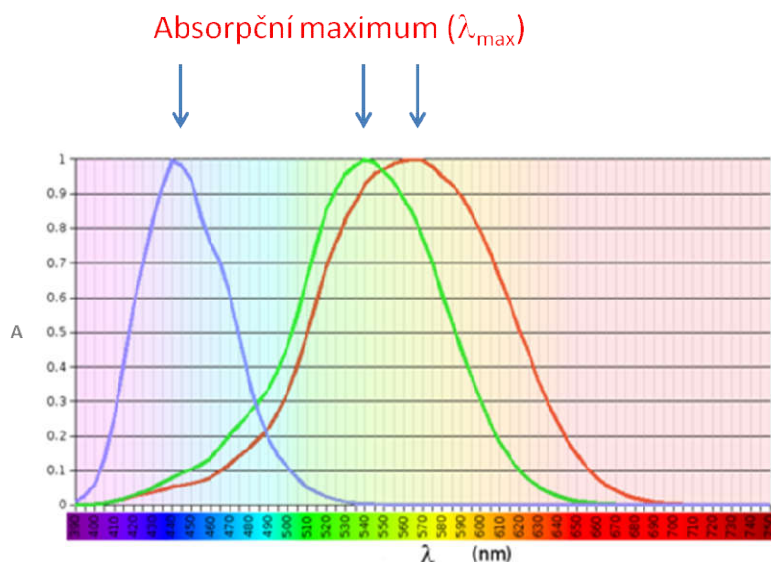
Obr. 11: Absorpční spektrum manganistanu draselného (KMnO<sub>4</sub>) při dvou různých koncentracích. Obě spektra mají podobný tvar se shodnou vlnovou délkou maximální absorpce (charakterizuje danou látku). Zjištění koncentrace je při vlnové délce absorpčního maxima nejcitlivější - jsou nejvíce patrné změny koncentrace. (Upraveno dle: [employees.oneonta.edu/kotzjc/LAB/Spec\\_intro.pdf](http://employees.oneonta.edu/kotzjc/LAB/Spec_intro.pdf))

Proměříme si tedy absorpční spektrum v celém rozsahu vlnových délek (např. 300-800 nm).

## Absorpční spektrum

Absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce  $A = f(\lambda)$ . Tato závislost je jednoznačnou, na koncentraci nezávislou charakteristikou barevné látky. Pomocí absorpčního spektra zjišťujeme optimální vlnovou délku pro měření koncentrace látky. Vlnovou délku, při které absorpce dosahuje maxima, označujeme jako  $\lambda_{\max}$  (lambda max).

Měření při absorpčním maximu látky je maximálně citlivé, umožňuje stanovit fotometricky nejnižší koncentrace absorbující látky. **Jsou-li v roztoku přítomny další složky, které absorbují při stejné vlnové délce, je zjištěná hodnota absorbance součtem hodnot jednotlivých složek ve směsi.** Pokud jsou absorpční maxima jednotlivých složek příliš blízko, nelze koncentraci látky stanovit bez její separace (např. chromatografií).



Obr. 12: Absorpční spektrum. (Upraveno dle:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spectrale\\_gevoeligheid\\_kegeltjes.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spectrale_gevoeligheid_kegeltjes.png))

## Kvantitativní analýza

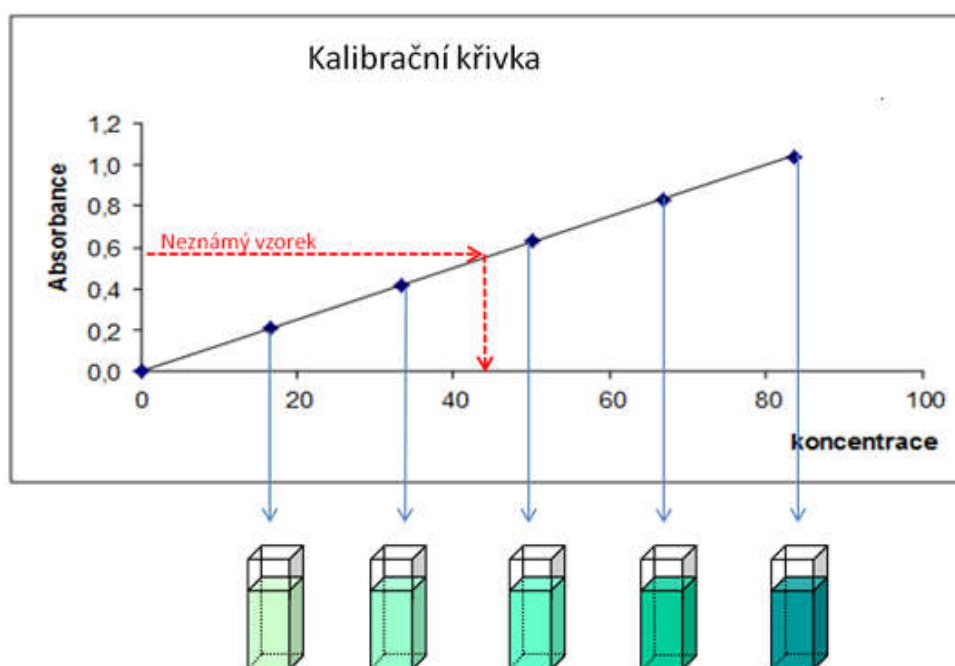
Pokud provedeme měření absorbance optimální vlnové délce, kvantifikovat koncentraci při můžeme třemi způsoby:

1. Teoreticky je možné **vypočítat koncentraci přímo z Lambert-Beerova zákona**, známe-li z literatury molární absorpční koeficient, není to však nejpřesnější metoda – koeficient se může lišit od skutečnosti v důsledku různé absorptivity rozpouštědel. Rovněž musíme při tomto způsobu použít přesně danou délku kyvety.

2. Prakticky se provádí stanovení koncentrace **ze směrnice kalibrační křivky**. Kalibrační křivka nám rovněž potvrdí platnost Lambert-Beerova zákona pro naše měření – tedy linearitu v celém rozsahu měření. Nepotřebujeme znát hodnotu molárního absorpčního koeficientu a nezáleží na šířce kyvety (všechny vzorky měříme ve stejné). K sestrojení kalibrační křivky potřebujeme **řadu standardů o známé koncentraci**. Lze použít 1 standard a rovnoměrně ho naředit pro alespoň 5 bodů kalibrační křivky, hodnota atestu standardu pak bude jejím horním bodem (nejvyšší koncentrace). **U všech standardů změříme absorbanci spolu s absorbancí neznámého vzorku** (při vlnové délce absorpčního maxima, v téže kyvetě a v přístroji vynulovaném na blank) Kalibrační křivku  $A = f(c)$  získáme po vynesení **koncentrace standardů na osu x (nezávislá proměnná) a absorbance standardů na osu y (závislá proměnná)**. V případě přesného měření získáme lineární závislost. Podle Lambert-Beerova zákona je při nulové koncentraci nulová absorbance-**křivka by měla vycházet z bodu 0**. Kalibrační křivku si můžeme sestavit na papíře (A) nebo pomocí Excelu (B)

(A) Kalibrační křivka na papíře:

- **Graficky:** Křivka má lineární závislost - pro každou koncentraci bude absorbance ležet na přímce, koncentraci neznámého vzorku tak získáme odečtením z grafu na ose x.



Obr. 13: Kalibrační křivka

- **Výpočtem - kalibračním faktorem:** Známe-li koncentraci i absorbanci standardů, můžeme si **pro každý bod křivky** vypočítat faktor. Délku dráhy i absorpční koeficient můžeme považovat za konstantní, neboť vzorek i standard měříme za stejných

podmínek. Ke každému standardu si vypočítáme faktor jako podíl známé koncentrace a změřené absorbance standardu  $f = C_{st} / A_{st}$  (= převrácená hodnota směrnice přímky). Z těchto faktorů vypočítáme **průměrný faktor**, kterým vynásobíme změřenou absorbanci vzorku s neznámou koncentrací.

**(B) Kalibrační křivka v Excelu:**

- **Graficky (po vytištění křivky):** Křivka má lineární závislost pro každou koncentraci bude absorbance ležet na přímce, koncentraci neznámého vzorku tak získáme odečtením z grafu na ose x

➤ **Výpočtem (Lineární regresí z rovnice kalibrační křivky):**

Postup:

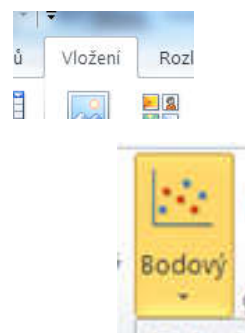
→ Zadáme do tabulky Excelu naměřené absorbance pro příslušné koncentrace

	A	B
	c	A
	20	0,077
	40	0,144
	60	0,24
	80	0,33
	100	0,426

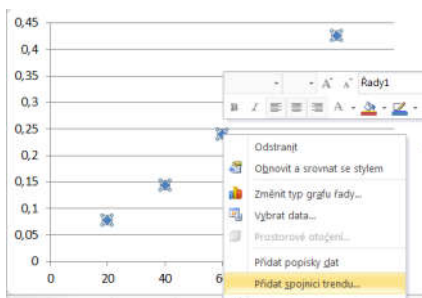
→ Označením (myší) vybereme data

	A	B
	c	A
	20	0,077
	40	0,144
	60	0,24
	80	0,33
	100	0,426

→ Vložíme graf (vybereme bodový)



→ Označíme pravou myší libovolný bod přímky a vybereme „Přidat spojnicí trendu“



→ Zde se objeví možnosti, z nichž vybereme:

**lineární graf** a zatrhneme hodnotu  $y=0$ , zobrazení rovnice grafu a hodnoty spolehlivosti  $R$ :

Hodnota  $Y =$    
 Zobrazit rovnici v grafu  
 Zobrazit hodnotu spolehlivosti  $R$

$$y = 0,0041x$$

$$R^2 = 0,991$$

→ Zobrazí se **kalibrační přímka spolu s rovnicí lineární regrese**:

Hodnota  $R^2$  nám ukazuje, jak přesně jsme pracovali, měla by být **ideálně > 0,99** (odlehlost hodnoty absorbance vzniklou náhodnou chybou lze odstranit).

**Kalibrační faktor** si z rovnice vypočítáme jako **převrácenou hodnotu směrnice  $k$**  lineární funkce  $y = k \cdot x$ , kde  $y$  odpovídá absorbanci a  $x$  odpovídá koncentraci, tedy  $1/k$  (Zde je faktor  $1/0,0041 = 244$ ). Tímto faktorem pak vynásobíme změřenou absorbanci neznámého vzorku.

Osy i graf pojmenujeme (v Excelu nebo po vytištění).

3. Pokud jsme si ověřili linearitu kalibrační křivky (tedy platnost Lambert-Beerova zákona) pro naše měření, můžeme pro výpočet použít **metodu jednoho standardu**, což je nejčastěji využívaná metoda v praxi. **Změříme absorbanci standardu i neznámého vzorku** (při vlnové délce absorpčního maxima, v téže kyvetě a v přístroji vynulovaném na blank). Platí, že poměr absorbance standardu a vzorku se rovná poměru jejich koncentrací.

$$A_{st}/A_{vz} = C_{st}/C_{vz}$$

Koncentraci neznámého vzorku pak vypočítáme:

$$C_{vz} = C_{st} / A_{st} * A_{vz}$$

## Aplikace spektrofotometrie

- **Kvalitativní analýza** - Identifikace analytu (shoda spektra a polohy absorpčního maxima analytu se standardem).
- **Kvantitativní analýza** – Určení množství analytu ve vzorku z výšky signálu absorpčního maxima.

### Typy spektrofotometrického stanovení

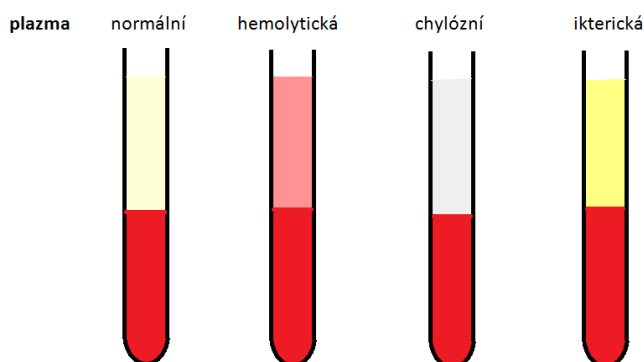
- **Přímé:** Přímé měření přirozeně absorbujících látek (např. spektrofotometrie likvoru – analýza absorpčních maxim hemoglobinu a bilirubinu pro určení přítomnosti a stáří krvácení)
- **Nepřímé stanovení látek**, které samy nejsou barevné, mohou však reagovat za tvorby barevného produktu. Stanovujeme je pomocí tzv. **indikačních reakcí**, které přemění bezbarvý analyt na barevný produkt. Budeme se s nimi setkávat jednotlivě u dalších klinicko-biochemických spektrofotometrických analýz a jejich souhrn „*Vybrané indikační reakce*“ naleznete jako dodatek v praktických cvičeních věnovaných oxidoredukčním metodám.

### Typy kvantitativního spektrofotometrického stanovení:

- **End-point:** Měříme absorbanci na konci reakce, využívá se u stanovení řady látek – bílkoviny, minerálů, glukózy, bilirubinu a mnoha dalších.
- **Kinetické:** Měříme změnu absorbance za časovou jednotku. Využívá se zejména u stanovení enzymů.

## Limitace spektrofotometrie

Ve spektrofotometrii při vyšetření biologického materiálu jsou nejčastějšími interferenty **hemoglobin** (červené zbarvení vzorku), **bilirubin** (žluté zbarvení vzorku) a **triacylglyceroly** (zákal vzorku). Barva krevní plazmy ovlivněná uvedenými interferenty může analyticky interferovat se spektrofotometrickým měřením.



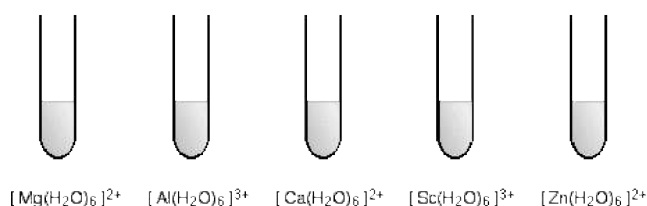
Obr. 14: Zbarvení krevní plazmy interferenty. (Upraveno dle: <http://laboratoryinfo.com/tests-affected-hemolyzed-lipemic-icteric-samples-mechanism/#prettyPhoto>)

Hemolýza vzorku bývá nejčastější příčinou preanalytických chyb (= k chybám došlo před vlastní analýzou vzorku). Máme-li červeně zbarvenou matici vzorku, ovlivní to metody stanovující absorbanci blízko absorpčního maxima hemoglobinu (400 nm). Zakalený vzorek chylózního séra může interferovat rozptylem záření. Následkem analytických interferencí pak může být **falešně pozitivní nebo negativní výsledek analýzy**. Všechny komerční soupravy musí pro každý analyt uvádět přípustné množství interferentu pro vydání validního výsledku. Každý vzorek pacienta se před analýzou z hlediska uvedených interferentů posuzuje a **vzhled vzorku** je vždy uveden u výsledků biochemického stanovení (jako hemolytický, ikterický nebo chylózní).

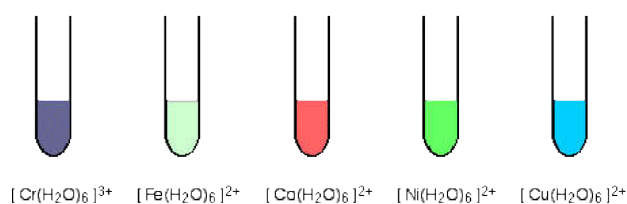


## Barevnost koordinačních sloučenin

Porovnáme-li akvakomplexy  $[M(H_2O)_6]^{n+}$  některých kovů s aquakomplexy přechodných prvků, rozdíl je v jejich barevnosti. Aquakomplexy nepřechodných kovů jsou bezbarvé:

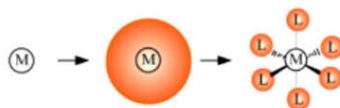


Auakomplexy přechodných kovů jsou **barevné**:



Obr. 15: Akvakomplexy přechodných a nepřechodných kovů (Obr. viz: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>)

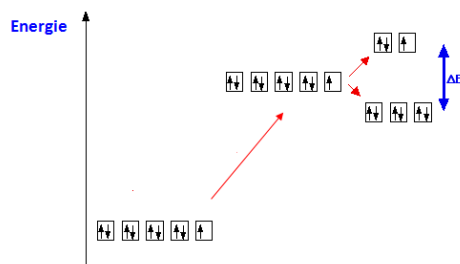
Přechodné kovy jsou definovány jako kovy s částečně zaplněnými d-orbitaly. Tvoří komplexní sloučeniny, které jsou často barevné.



Obr.: 16: Vazba ligandů kolem centrálního kovu (obr. viz:

[www.slideshare.net/christophsonntag/bonding-in-coordination-complexes-part-1](http://www.slideshare.net/christophsonntag/bonding-in-coordination-complexes-part-1))

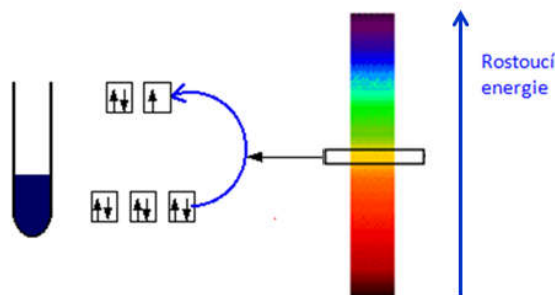
Naváže-li se 6 ligandů (zde  $H_2O$ ) kolem centrálního iontu (kov) (obr. 16), elektrony ligandu se navzájem odpuzují s elektrony **d-orbitálu** kovového iontu, čímž se **zvýší jejich energie** a následně se **rozštěpí na 2 skupiny s různými energetickými hladinami**. Následující schéma ukazuje uspořádání elektronů v d-orbitalech před a po navázání 6 molekul vody.



Obr. 17: Uspořádání elektronů v d-orbitalech před a po navázání 6 molekul vody (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>)

5 d-orbitalů se rozdělí do 2 skupin. 2 s vyšší a 3 s nižší energií. Elektrony původního orbitalu se přeskupí – budou zaplňovat elektrony do orbitalu s nižší energií. Aby zaplnily 2 orbitaly s vyšší energií, musí překonat tzv. **sílu ligandového pole  $\Delta E$**  (rozdíl energií mezi rozštěpenými d orbitaly).

Síla ligandového pole je tedy energie, kterou musí elektron překonat, aby zaplnil energeticky vyšší orbitaly. **Čím vyšší je síla ligandového pole, tím vyšší energii vyžaduje elektron k přechodu do vyššího orbitalu (a tím kratší vlnovou délku záření absorbuje).**

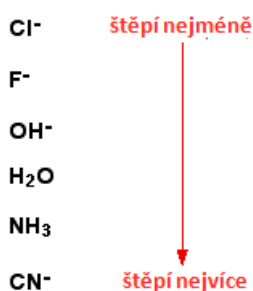


Obr. 18: Absorpcí světla při přechodu mezi d-d orbitaly (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>)

**Pokud síla ligandového pole odpovídá energii žlutého světla, absorpcí žlutého světla dojde k přechodu elektronu do vyššího orbitalu. Aquakomplex bude mít komplementární modrou barvu.**

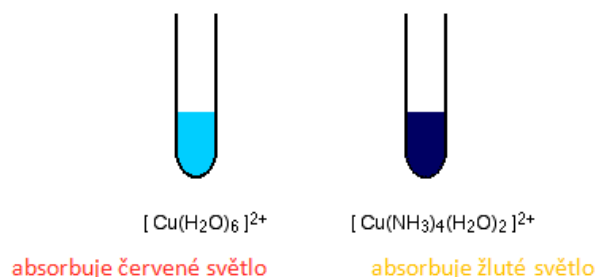
### Barvu komplexu ovlivňuje:

**1. Typ ligandu má na barvu komplexu největší vliv.** Změna zbarvení komplexu vlivem různých ligandů je základem spektrochemické řady ligandů, kde jsou ligandy **seřazeny podle klesající vlnové délky světla absorbovaného příslušnými komplexy viz obr...**



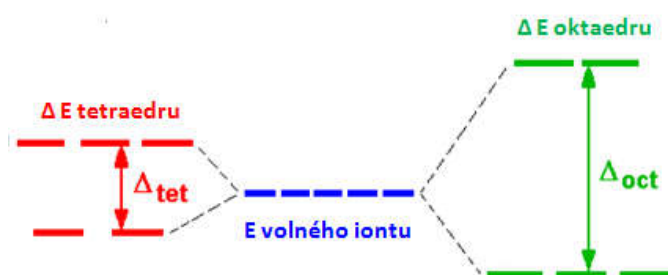
Obr. 19: Nejběžnější ligandy seřazené podle síly ligandového pole. Ligandy na počátku řady (halogenidy) rozštěpí d-orbitaly jen málo, ligandy na konci řady (CO, CN<sup>-</sup>) štěpí d-orbitaly výrazně.

Zaměníme-li v akvakomplexu Cu(II) ligand vody za amoniak, změní se barva komplexu směrem k nižším vlnovým délkám odpovídajícím vyšší energii. První komplex absorbuje červené světlo, druhý komplex absorbuje ve žluté oblasti. Žluté světlo má vyšší energii než červené.



Obr. 20: Vliv typu ligandu na barvu komplexu (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>)

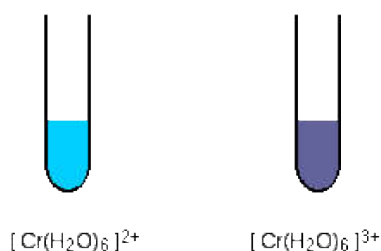
**2. Geometrie komplexu** – počet ligandů navázaných na centrální kov. Při vzniku oktaedru dochází k vyšší míře štěpení než při vzniku tetraedru – barva se bude měnit se změnou koordinačního čísla.



Obr. 21: Vliv geometrie komplexu na jeho zbarvení. (Upraveno dle: Robert John Lancashire, <http://wwwchem.uwimona.edu.jm>)

**3. Oxidační číslo centrálního kovu:** Zvýšení oxidačního čísla centrálního atomu vede k intenzivnějšímu přitahování ligandů k centrálnímu atomu, čímž roste odpuzování elektronů, síla ligandového pole se zvyšuje.

Změna oxidačního čísla (z +2 na +3):



Obr. 22: Vliv oxidačního čísla kovu na barvu ligandu (Upraveno dle: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>)

Zdroje:

[www.wikiskripta.eu](http://www.wikiskripta.eu)

<http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/theory.html>

<http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/colour.html>