

FLUORIMETRIE

Jan Fährich, Lucie Kolesníková

Obecné základy

Fluorimetrie je analytická metoda využívající schopnosti některých látek vysílat (emitovat) po předchozím převedení do **vzbuzeného (excitovaného) stavu** fluorescenční záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. K převedení do vzbuzeného stavu (k excitaci vzorku) je zpravidla využívána absorpce ultrafialového nebo viditelného záření. Omezíme se zde pouze na fluorimetrii zředěných roztoků fluoreskujících látek v rozpouštědle, které neabsorbuje ani excitační ani emitované záření.

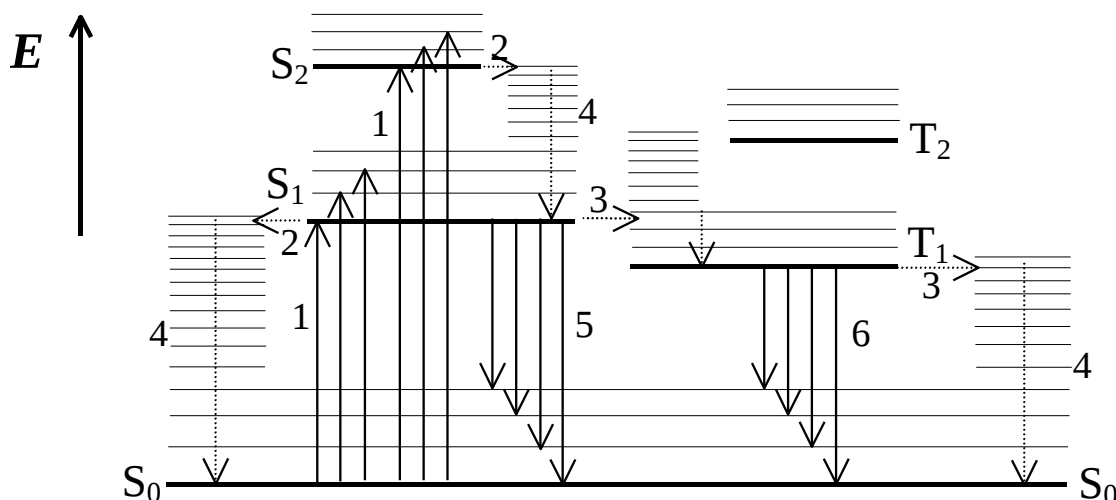
Na **obr. 1** je znázorněno zjednodušené schéma energetických hladin v molekule se sudým počtem elektronů. V základním stavu S_0 většinou obsazují vždy dva elektrony stejný elektronový stav s opačným spinem. Jejich spiny se vzájemně kompenzují, takže celkové spinové kvantové číslo molekuly je 0. Takový stav molekuly je označován jako **singletní**. I po excitaci jednoho valenčního elektronu na vyšší elektronovou hladinu mohou elektrony zachovat svůj celkový spin, což je vyznačeno řadou excitovaných singletních stavů molekuly S_1 , S_2 atd. Po excitaci však již dva elektrony nejsou spárovány a jejich celkové spinové kvantové číslo také může mít hodnotu 1. Molekula se pak nachází ve stavu označovaném jako **tripletní**, kterých opět může být celá řada (T_1 , T_2 ,...). Přechody molekuly mezi singletním a tripletním stavem jsou o několik řádů pomalejší, než podobné přechody uvnitř řady singletních stavů a uvnitř řady tripletních stavů.

Každý elektronový stav je v důsledku vibračního pohybu molekuly, který zvyšuje její celkovou energii, tvořen sérií **vibračních hladin**. Hladina elektronového stavu s nejnižší vibrační energií je označována jako základní vibrační hladina elektronového stavu. Ve stavu tepelné rovnováhy se za normálních teplot převládá část molekul nachází na základní vibrační hladině stavu S_0 . Při absorpci záření je energie absorbovaného fotonu spotřebována na převedení molekuly do excitovaného stavu (děj 1 na **obr. 1**). Stejně jako při emisi fotonu musí platit Planckova podmínka

$$|\Delta E| = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

kde ΔE je rozdíl energií molekuly v cílovém a výchozím stavu, h je Planckova konstanta, ν je frekvence a λ vlnová délka absorbovaného (emitovaného) záření. Protože pravděpodobnost takového přechodu se pro jednotlivé hladiny liší, závisí schopnost molekuly absorbovat fotony na vlnové délce absorbovaného záření. Tuto závislost popisuje **absorpční spektrum** látky, tedy závislost absorbance roztoku

nebo absorpčního koeficientu látky na vlnové délce (viz úloha „Kapalinová chromatografie a absorpční UV-spektrometrie“).



Obr. 1: Schéma energetických hladin molekuly a přechodů mezi nimi

S_0 - základní stav, $S_1, S_2 \dots$ - excitované singletní stavy, $T_1, T_2 \dots$ - excitované tripletní stavy.

1 - absorpce záření, 2 - vnitřní konverze, 3 - mezisystémový přechod, 4 - vibrační relaxace, 5 - fluorescence, 6 - fosforescence

Po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle předává získanou energii svému okolí a tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze - **obr. 1** děj 2 - a mezisystémový přechod - děj 3) následovanými vibrační relaxací (děj 4) se dostává postupně do nižších excitovaných stavů. Pomalejší bývá většinou až nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 . Teprve mezi těmito hladinami se vedle nezářivých přechodů může uplatnit přechod spojený s vyzářením (emisí) fotonu. Tato emise záření je označována jako **fluorescence** (děj 5). Její doba dosvitu po přerušení excitace bývá řádově 10^{-6} až 10^{-9} s. Většinou až z hladiny S_1 se případně uplatní i nezářivý mezisystémový přechod do některého z tripletních stavů. Zářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu T_1 do základního stavu S_0 má dlouhou dobu dosvitu řádu 10^{-3} až 10^1 s a je označován jako **fosforescence** (děj 6).

Vzhledem k tomu, že molekula před emisí fotonu fluorescenčního záření ztratí část energie dodané fotonem excitačního záření, je (až na výjimky) vlnová délka fluorescenčního záření větší, než vlnová délka excitačního záření. Pokud fluorescence probíhá tak, jak je zobrazeno na **obr. 1**, je vlnová délka fluorescenčního záření dokonce větší nebo rovna vlnové délce nejdouhovlnějšího pásu absorpčního spektra (přechod mezi základními vibračními hladinami stavu S_0 a S_1). Fluorescenci látky, jejíž absorpční spektrum známe, proto hledáme v blízkosti prvního absorpčního pásu směrem k větším vlnovým délkám. Dobře známou výjimkou v tomto směru je azulen a jeho deriváty, jejichž fluorescence vychází ze stavu S_2 .

Fluorescenční schopnost látky popisuje **kvantový výtěžek fluorescence** Y_F , který je definován jako poměr počtu fotonů vyzářených látkou ve formě fluorescence n_F ku počtu fotonů látkou absorbovaných n_A

$$Y_F = \frac{n_F}{n_A} \quad (2)$$

Kvantový výtěžek umožňuje určit **zářivý tok** emitovaný vzorkem ve formě fluorescenčního záření vyjádřený jako počet fotonů za jednotku času $\Phi_{p,F}$ ze zářivého toku látkou absorbovaného $\Phi_{p,A}$ jako

$$\Phi_{p,F} = Y_F \Phi_{p,A} \quad (3)$$

Kvantový výtěžek je určen podílem rychlosti vlastního fluorescenčního přechodu a celkové rychlosti všech dějů, které vycházejí ze stavu S_1 . Kromě dějů výše zmíněných se může uplatnit i vliv dalších komponent přítomných v roztoku, které deaktivují stav S_1 a tak zhášejí fluorescence. Tyto látky jsou označovány jako **zhášedla** (angl. „*quenchers*“). Mezi nejběžnější zhášedla patří kyslík a také látky obsahující prvky s vyšším atomovým číslem. I samotná fluoreskující látka může při vyšších koncentracích snižovat kvantový výtěžek. Hovoříme pak o koncentračním zhášení fluorescence. Mohou se při něm uplatnit různé mezimolekulární interakce, jako je tvorba molekulárních asociátů v základním či excitovaném stavu, přenos energie apod. Velice účinně je za běžných podmínek zhášena fosforescence, protože sama probíhá velmi pomalu. Proto není za běžných podmínek pozorována. Objeví se např. až v tuhých zchlazených roztocích (často na teplotu kapalného dusíku 77 K), kdy jsou vnější zhášecí mechanismy potlačeny.

Jak je patrné z **obr. 1**, není fluorescenční záření emitováno při jedné vlnové délce, protože cílovým stavem mohou být i vibračně excitované hladiny základního elektronového stavu. Rozdělení zářivého toku mezi jednotlivé emitované vlnové délky λ_{em} popisuje **emisní spektrum**. Jeho exaktním vyjádřením je fluorescenční **spektrální zářivý tok** $\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em})$ udávající zářivý tok vyzařovaný vzorkem v jednotkovém intervalu vlnových délek v okolí vlnové délky λ_{em} . Celkový fluorescenční zářivý tok je vázán se spektrálním zářivým tokem integrálem

$$\Phi_{p,F} = \int_0^{\infty} \Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em}) d\lambda_{em} \quad (4)$$

Důležitým závěrem vyplývajícím ze schémat na **obr. 1** je skutečnost, že tvar emisního spektra není závislý na excitační vlnové délce, protože je určen pouze základní vibrační hladinou stavu S_1 a vibračními hladinami základního stavu S_0 .

Pokud by vibrační hladiny stavů S_1 a S_0 měly podobnou strukturu, byla by také vibrační struktura emisního fluorescenčního spektra podobná vibrační struktuře prvního pásu v absorpčním spektru. Ve frekvenční či vlnočtové stupnici pak bude

fluorescenční spektrum přibližně zrcadlovým obrazem prvního absorpčního pásu s osou symetrie v blízkosti vlnótu přechodu mezi základními vibračními hladinami obou stavů (tzv. pravidlo zrcadlové symetrie). Mezi látky splňující většinou pravidlo zrcadlové symetrie patří aromatické uhlovodíky, např. anthracen (viz dále **obr. 3 a 4**).

I když tvar emisního spektra není závislý na podmínkách excitace, mění se celkový fluorescenční zářivý tok. Proto je účelné použít jako charakteristiku emisních vlastností látky spektrální zářivý tok vztažený např. na spektrální zářivý tok v maximum této závislosti. Takto definované emisní spektrum je bezrozměrné a v maximum má hodnotu 1. Jinou možností je vztáhnout spektrální zářivý tok na celkový zářivý tok

$$E_c(\lambda_{em}) = \frac{\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em})}{\Phi_{p,F}} \quad (5)$$

Takto definované emisní spektrum má rozměr převrácené jednotky vlnové délky, např. nm⁻¹, a jeho integrál na intervalu (0,∞) je roven jedné.

Pokud fluoreskující roztok v kyvetě čtvercového průřezu obsahuje jedinou absorbující složku, která má schopnost fluoreskovat, platí pro absorpci excitačního záření Lambertův-Beerův zákon

$$A = \varepsilon b c_f \quad (6)$$

kde A je absorbance roztoku, ε je molární absorpční koeficient složky, b je tloušťka kyvety a c_f je látková koncentrace fluoreskující složky v roztoku. Odtud můžeme absorbovaný zářivý tok $\Phi_{p,A}$ vyjádřit ze zářivého toku excitačního záření dopadajícího na kyvetu $\Phi_{p,0}$ jako

$$\Phi_{p,A} = \Phi_{p,0}(1 - 10^{-\varepsilon b c_f}) \quad (7)$$

Pro nízké hodnoty absorbance můžeme aproximovat tuto závislost lineárním vztahem

$$\Phi_{p,A} = 2,3 \Phi_{p,0} \varepsilon b c_f \quad (8)$$

Z rovnice (3) pak pro fluorescenční zářivý tok plyne

$$\Phi_{p,F}(\lambda_{ex}) = 2,3 Y_F \Phi_{p,0}(\lambda_{ex}) \varepsilon(\lambda_{ex}) b c_f \quad (9)$$

kde argumentem (λ_{ex}) je vyjádřeno, které veličiny závisejí v tomto vztahu na vlnové délce excitačního záření λ_{ex} . (Kvantový výtěžek v roztocích většinou na excitační vlnové délce nezávisí.) Pro spektrální fluorescenční zářivý tok pak plyne vztah

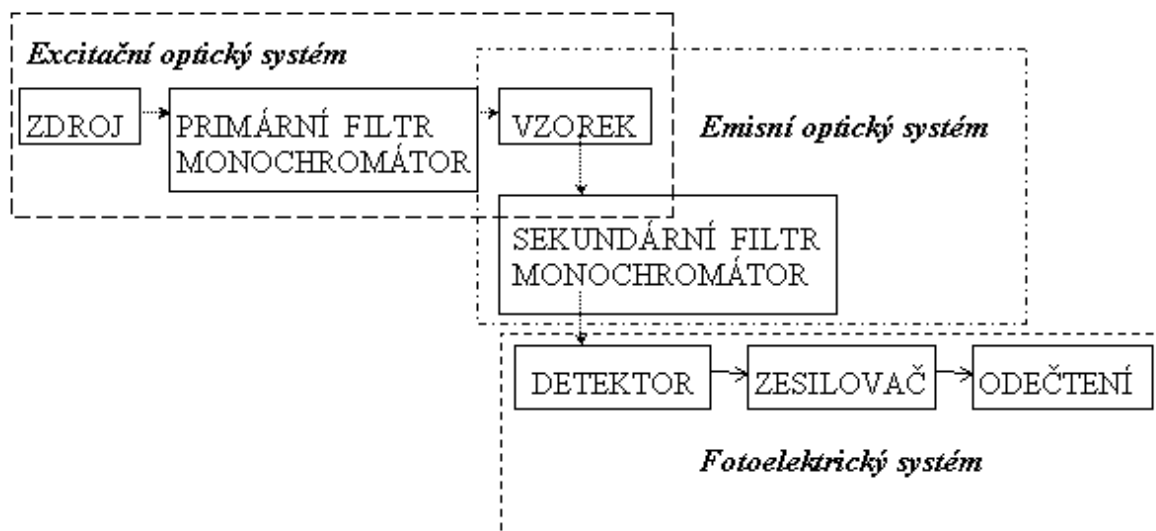
$$\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = 2,3 Y_F E_c(\lambda_{em}) \Phi_{p,0}(\lambda_{ex}) \varepsilon(\lambda_{ex}) b c_f \quad (10)$$

Fluorescenční spektrální zářivý tok tedy závisí na vlnové délce excitačního záření a na emisní vlnové délce. Pro málo absorbující roztoky obsahující jednu složku se dá vyjádřit jako součin dvou faktorů, z nichž jeden $\Phi_{p,0}(\lambda_{ex})\varepsilon(\lambda_{ex})$ závisí pouze na vlnové délce excitačního záření, a druhý $E_c(\lambda_{em})$ pouze na emisní vlnové délce. Závislost fluorescenčního zářivého toku na vlnové délce excitačního záření za konstantních podmínek měření emise je označována jako **excitační spektrum**. Pokud bychom měli k dispozici zdroj excitačního záření s proměnnou vlnovou délkou, jehož zářivý tok by byl na vlnové délce nezávislý, bylo by excitační spektrum zředěného roztoku obsahujícího jedinou fluoreskující látku až na násobek totožné s jejím absorpčním spektrem a to nezávisle na proměřované emisní vlnové délce. Podobně i emisní spektrum až na násobek nezávisí na excitační vlnové délce. Jak excitační, tak i emisní spektrum je využitelné pro identifikaci látky porovnáním se spektry standardní látky. Pokud je v roztoku přítomno více fluoreskujících látek a jejich koncentrace je nízká, takže se vzájemně neovlivňují, jejich fluorescenční zářivé toky se sčítají.

Pro kvantitativní analýzu vyplývá z rovnice (10), že při nízkých hodnotách absorbance (koncentrace) roztoku vzrůstá zářivý tok fluorescence lineárně s koncentrací fluoreskující látky.

Přístroj pro měření fluorescenčního záření je označován jako fluorimetr. Pokud můžeme přístrojem měřit excitační a emisní spektra, bývá pro zdůraznění této skutečnosti používáno označení **spektrofluorimetr**. Základní blokové schéma fluorimetru je znázorněno na **obr. 2**.

Ze záření vysílaného intenzivním excitačním zdrojem izolujeme primárním (excitačním) filtrem nebo monochromátorem záření těch vlnových délek, které chceme použít pro excitaci vzorku. Toto záření dopadá na vzorek a excituje v něm fluorescenční záření. Fluorescenční záření vystupuje ze vzorku všemi směry. Jenom jeho část vystupuje v takovém směru, že prochází přes sekundární (emisní) filtr nebo monochromátor a dopadá na fotoelektrický detektor. Zde vyvolá elektrický signál, který se dále zesiluje a měří. Jeho velikost je mírou fluorescenčního zářivého toku vysílaného vzorkem na vlnových délkách izolovaných emisním filtrem (monochromátorem). Podmínky buzení jsou přitom určeny zdrojem excitačního záření a primárním filtrem (nastavením excitačního monochromátoru). Pokud je přístroj v excitačním optickém systému vybaven monochromátorem, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je tento monochromátor nastaven, a zaznamenat excitační spektrum vzorku. Pokud je přístroj vybaven monochromátorem v emisním optickém systému, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je nastaven tento monochromátor, a zaznamenat emisní spektrum vzorku.



Obr. 2: Blokové schéma fluorimetru

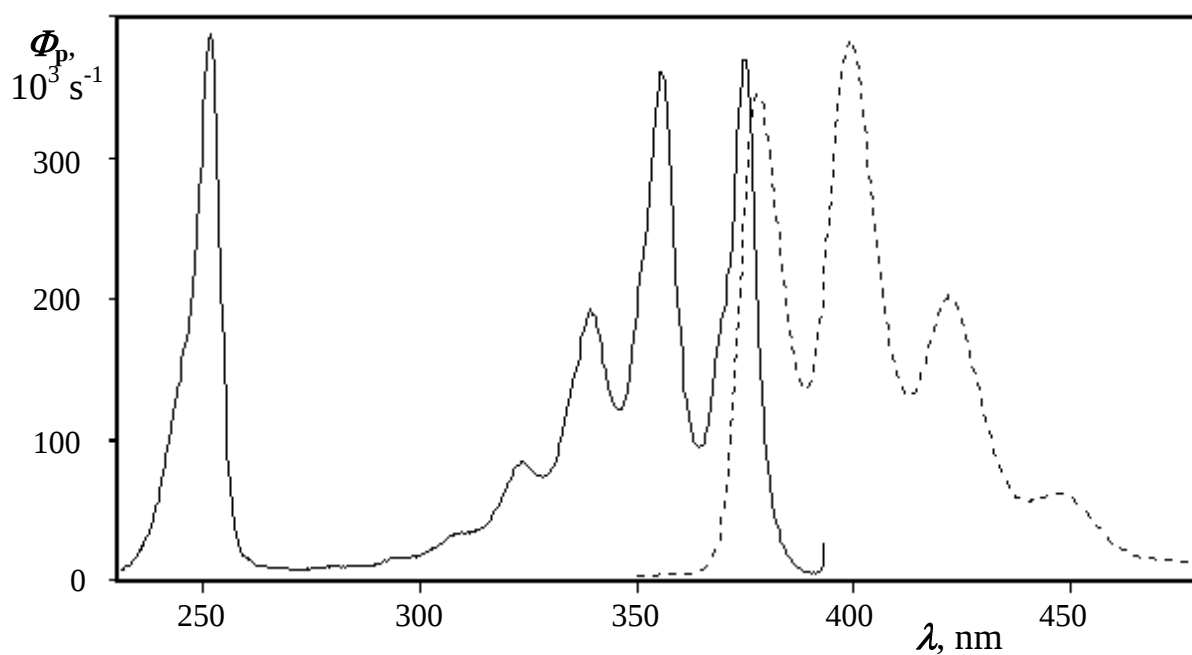
Excitační a emisní spektra takto přímo měřená spektrofluorimetry jsou zkreslena charakteristikami přístroje a jsou označována jako **spektra nekorigovaná**. Emisní spektra jsou zkreslena především z toho důvodu, že detektor není stejně citlivý na záření různých vlnových délek. Protože ani excitační zdroj nevyzařuje stejně v celém rozsahu vlnových délek, jsou zkreslená i excitační spektra. Abychom se přiblížili skutečnému průběhu spekter ve smyslu rovnice (10), museli bychom naměřená spektra násobit pro každou vlnovou délku příslušným korekčním faktorem. Získají se tzv. **korigovaná spektra**. Tato spektra jsou důležitá, pokud např. chceme porovnávat data změřená na různých přístrojích. Z toho důvodu by v literatuře měla být publikována pokud možno spektra korigovaná. Korigované excitační spektrum by také mělo být podle rovnice (10) až na násobek totožné s absorpčním spektrem látky. Při využití fluorescenční spektrometrie pro praktické analytické účely však většinou vystačíme se spektry nekorigovanými.

Jako příklad nekorigovaných spekter je na **obr. 3** uvedeno excitační a emisní spektrum anthracenu. V porovnání s absorpčním spektrem (**obr. 4**) je v excitačním spektru výrazně slabší pás okolo 251 nm, protože záření excitační xenonové výbojky se směrem ke kratším vlnovým délkám značně zeslabuje. Jinak si jsou obě spektra celkem podobná díky tomu, že spektrum xenonové výbojky se v této oblasti vlnových délek mění plynule. Pokud má excitační zdroj čarové spektrum (rtuťová výbojka, do určité míry i xenonová výbojka v oblasti vlnových délek 450-500 nm a delších), má i nekorigované excitační spektrum čarový charakter a jeho podobnost se spektrem absorpčním se ztrácí. Za povšimnutí stojí také vzájemná poloha excitačního a emisního spektra anthracenu splňující poměrně dobře pravidlo zrcadlové symetrie s osou symetrie okolo vlnové délky 377 nm (viz str.4).

Další zkreslení spekter se uplatňuje u vzorků, které výrazněji absorbují záření o excitační nebo emisní vlnové délce. Pokud vzorek absorbuje excitační záření do té

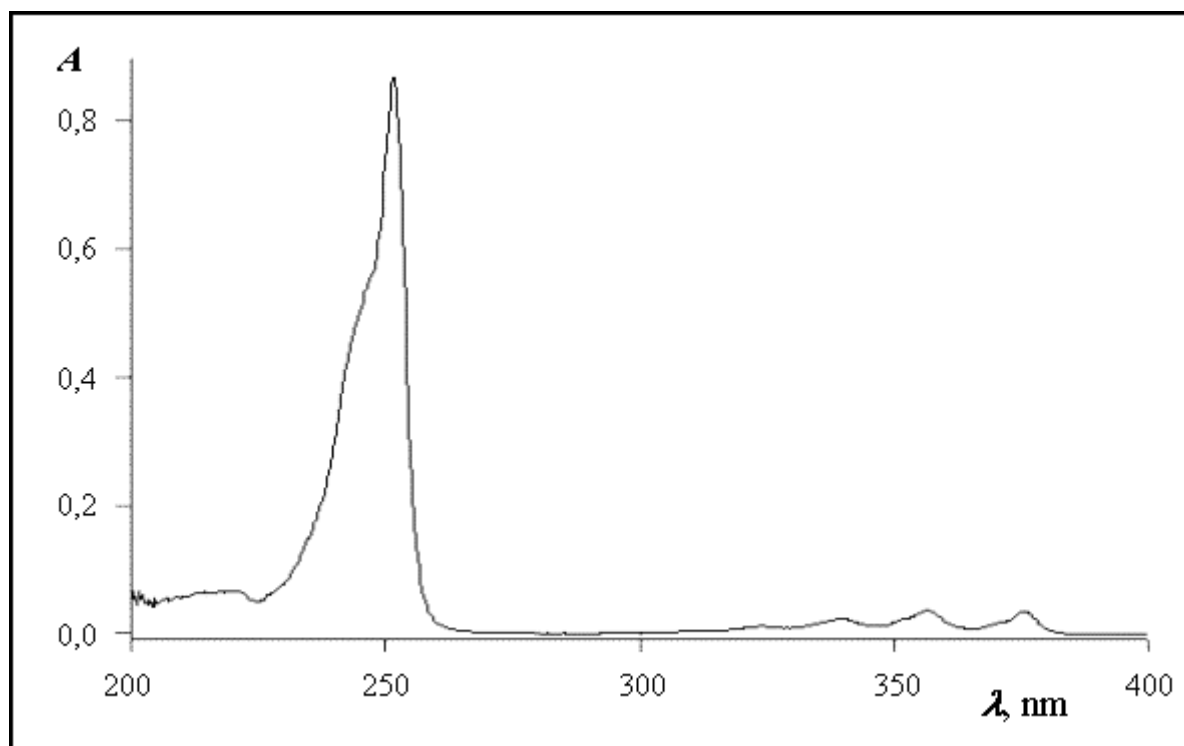
míry, že se excitační paprsek při průchodu vzorkem zeslabuje, hovoříme o tzv. **efektu vnitřního filtru**. V důsledku tohoto efektu není při vyšších koncentracích kalibrační závislost lineární. Dále jsou deformována excitační spektra, protože je silněji zeslaben signál v absorpčních maximech než v absorpčních minimech. Tento efekt bývá výrazný u přístrojů s tzv. kolmým uspořádáním, ve kterém je pozorováno emisní záření vycházející přibližně z oblasti okolo středu kyvety ve směru kolmém na excitační paprsek. Nelinearita kalibračních závislostí je v tomto uspořádání ještě výraznější, než odpovídá rovnici (7), a pro vyšší koncentrace fluoreskující látky klesá měřený signál dokonce až na nulu. Pro silně absorbující roztoky se totiž excitační paprsek absorbuje hned v povrchové vrstvě vzorku a vůbec nepronikne do jeho středu. Také emisní záření může být při průchodu vzorkem absorbováno. Tato tzv. **reabsorpce** se projevuje zeslabením emisního záření a deformací emisních spekter.

O tom, zda se u neznámého vzorku uplatňuje efekt vnitřního filtru nebo reabsorpce, se nejlépe přesvědčíme tak, že změříme předem jeho absorpční spektrum. Má-li roztok v kyvetě o tloušťce absorbující vrstvy 1 cm absorbanci 0,04, pak se paprsek na vzdálenosti 0,5 cm (polovina tloušťky kyvety) zeslabí téměř o 5 %. Proto by měřené roztoky měly mít jak na excitační, tak i na emisní vlnové délce hodnotu absorbance nižší.



Obr. 3: Nekorigované excitační a emisní spektrum anthracenu v methanolu

Přístroj Fluoromax-2, excitační spektrum (—) změřeno pro emisní vlnovou délku 399 nm, emisní spektrum (- - - -) bylo buzeno zářením o vlnové délce 251 nm. Koncentrace anthracenu $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

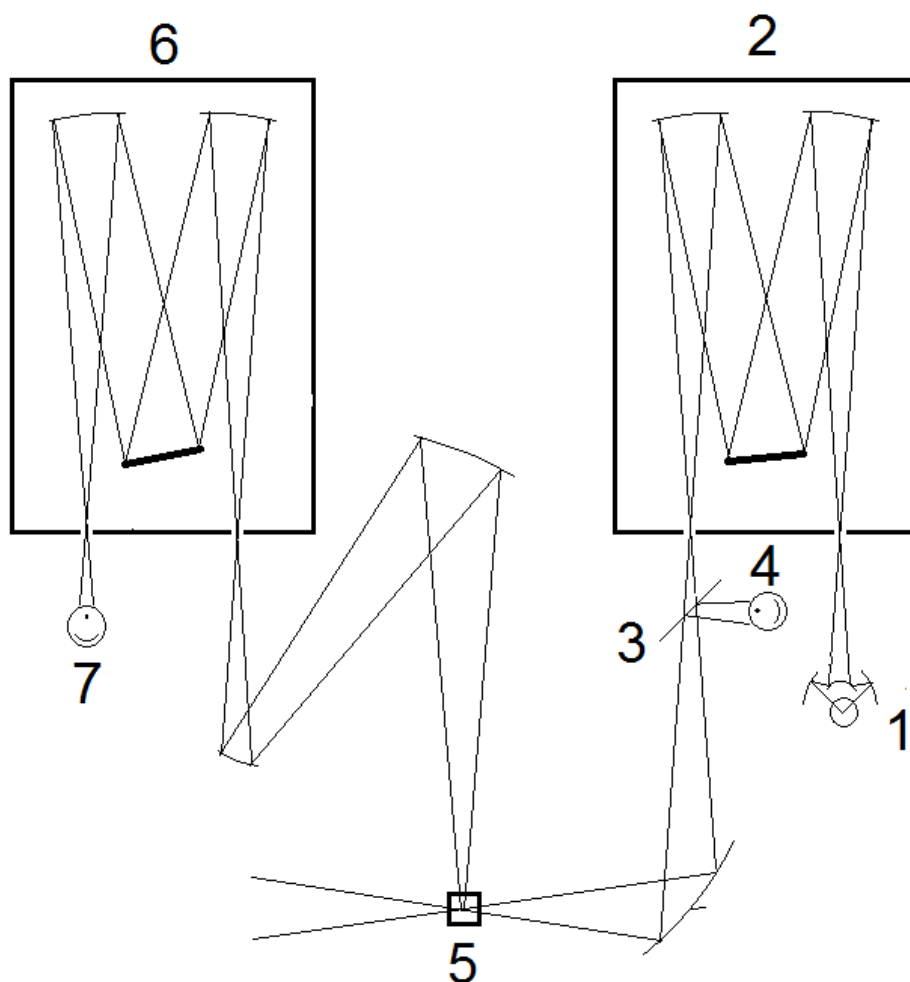


Obr. 4: Absorpční spektrum anthracenu v methanolu

Koncentrace anthracenu $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, kyveta 1 cm

Měření na přístroji Cary Eclipse

Laboratoře jsou vybaveny přístrojem Cary Eclipse. Velmi zjednodušené optické schéma tohoto spektrofluorimetru je na **obr. 5**. Je vybaven s mřížkovým excitačním (2) a emisním monochromátorem (6), které jsou nastavitelné v rozsahu vlnových délek 190 – 1100 nm. S ohledem na omezenou spektrální citlivost použitých fotonásobičů je ale použitelný pouze rozsah vlnových délek asi 200 – 900 nm. Monochromátory mají 5 volitelných šířek štěrby, které odpovídají spektrálním šířkám procházejícího záření 1,5, 2,5, 5, 10 a 20 nm. Oba monochromátory jsou doplněny volitelnými optickými filtry, jejichž účelem je omezit spektra vyšších řádů a rušivé rozptýlené záření. Toto záření v důsledku rozptylu na stěnách a optických prvcích monochromátoru opouští jeho výstupní štěrbinu a přitom nemá vlnovou délku, na kterou je monochromátor nastaven.



Obr. 5: Zjednodušené optické schéma přístroje Cary Eclipse

1-excitační zdroj (pulzní xenonová výbojka), 2-excitační monochromátor, 3-dělič paprsku, 4-referenční fotonásobič, 5-vzorek, 6-emisní monochromátor, 7-fotonásobič

Jako zdroj excitačního záření (1) je použita pulzní xenonová výbojka, která pracuje s frekvencí 80 Hz, přičemž jednotlivé světelné pulzy mají šířku 2 až 3 μ s. Záření ze zdroje je soustředěno zrcadlovým kondenzorem Schwartzschildova typu na vstupní štěrbinu monochromátoru (2). Část excitačního záření (asi 8%) o zvolené vlnové délce vystupující štěrbinou z monochromátoru je děličem paprsku (3) odraženo na referenční fotonásobič (4). Před dopadem na fotonásobič je ještě 10000-krát zeslabeno barevně neutrálními filtry. Hlavní podíl excitačního záření je soustředěn na vzorek v kyvetovém prostoru (5). Část luminiscenčního záření vysílaného vzorkem je soustavou zrcadel soustředěna na vstupní štěrbinu emisního monochromátoru (6). Víceméně monochromatické záření vycházející z jeho výstupní štěrbiny je měřeno fotonásobičem (7).

Nutnost použít referenční fotonásobič při měření fotoluminiscence je dána poměrně malou opakovatelností intenzity excitačních pulzů. Proto se při měření fluorescence během každého světelného pulzu excitační výbojky vyhodnotí vedle intenzity pulzu fluorescenčního záření S detekovaného fotonásobičem (7) i intenzita pulzu excitačního záření R detekovaného referenčním fotonásobičem (4). V době mezi světelnými pulzy je měřen i signál neosvětlených fotonásobičů S_t a R_t , aby bylo možno hodnoty korigovat na úroveň temného proudu fotonásobičů. Systém jako výsledek měření udává hodnotu poměru

$$p = 1000 \frac{S - S_t}{R - R_t} \quad (11)$$

přičemž neposkytne hodnoty mimo přípustný rozsah omezený hodnotou 1000.

Kromě fluorescenčního měření je k dispozici i měření fosforescence a Bio/Chemiluminiscence. V režimu měření fosforescence je signál S měřen s volitelným zpožděním (*Delay Time*) oproti excitačnímu pulzu a také doba, po kterou je měřen, je volitelná (*Gate Time*). V režimu Bio/Chemiluminiscence není zapínána excitační výbojka a fotonásobičem (7) se měří světlo vysílané samotným vzorkem.

Spektrofluorimetr je opatřen pouze síťovým vypínačem v dolní části předního panelu. Jeho činnost je po zapnutí zcela řízena počítačem. Po otevření složky *Cary Eclipse* umístěné na ploše se objeví nabídka aplikací pro různé způsoby využití spektrofluorimetru. V práci z nich vystačíte pouze s aplikací *Scan* a *Simple Reads*, z nichž první slouží k záznamu spekter a druhá k jednoduchému měření signálu pro zvolené podmínky. V aplikaci *Scan* změříte spektra chininu, porovnáte je se spektry analyzovaného nápoje a určíte, jaká excitační a emisní vlnová délka je vhodná pro stanovení chininu. Fluorescenční intenzity potřebné pro stanovení chininu získáte v aplikaci *Simple Reads*.

Struktura okna ovládacího programu je ve většině aplikací podobná. Průběžně měřené hodnoty signálu a vlnových délek jsou zobrazovány v horních rozích obrazovky. Horní lišta obsahuje nabídky *File*, *Edit*, *View*, *Commands*, *Setup*, *Graph* a *Help*. Pracovní plocha může obsahovat grafy a výpis naměřených hodnot (*Report*), který je možno editovat. Činnost přístroje je řízena příkazy v nabídce *Commands*,

z nichž nejdůležitější je možno vyvolat i tlačítka rozmístěnými nad a vedle pracovní plochy. Pro některé příkazy jsou k dispozici klávesové zkratky. V nabídce *View* nebo na spodní liště některých oken je užitečné nastavit zobrazení tabulky s údaji o momentálním stavu systému (*Status display*).

Současně může být otevřeno více aplikací, pouze jedna z nich ale může ovládat spektrofotometr. Tato aplikace buď právě měří, nebo je k měření připravena. V tom případě je zobrazeno tlačítko *Start*, kterým se měření spustí, a v něm zelený semafor. Není-li aplikace spojena se spektrometrem, je místo tlačítka start zobrazeno tlačítko *Connect*, kterým aplikace může převzít řízení spektrofotometru, pokud právě není zaměstnán jinou aplikací.

Podmínky měření jsou zadávány v nabídce nebo v okně *Setup*. Pro aplikaci *Scan* je to na záložce *Cary* (**obr. 6**):

- Režim měření (*Data Mode: Fluorescence, Bio/Chemi-luminescence, Phosphorescence*)
- Typ měřené závislosti (*Excitation, Emission, Synchronous*, kdy je udržován konstantní rozdíl excitační a emisní vlnové délky nebo vlnočtu)
- Oblast proměřovaných vlnových délek. Při zadávání vlnových délek pro měření excitačního spektra se zadá konstantní hodnota emisní vlnové délky a počáteční a koncová hodnota excitační vlnové délky, pro měření emisního spektra konstantní hodnota excitační vlnové délky a počáteční a koncová emisní vlnová délka. Není vhodné volit vlnové délky tak, aby se během záznamu spektra shodovala excitační a emisní vlnová délka, protože intenzita excitačního záření rozptýleného ve vzorku může být značná a při vysoké citlivosti může poškodit fotonásobič. Proto by se vlnové délky, na které jsou nastaveny oba monochromátory, měly během měření lišit alespoň o spektrální šířku štěrbin monochromátorů. V režimu *3-D mode* je možno změřit řadu excitačních, emisních nebo synchronních spekter s postupně narůstající hodnotou emisní vlnové délky, excitační vlnové délky nebo jejich rozdílu (*Delta*) a tímto způsobem proměřit celou excitačně emisní matici. Zde je užitečný synchronní způsob měření, kde se můžeme vyhnout bodům se shodnou excitační a emisní vlnovou délkou, které jsou ovlivněny rozptylem excitačního záření ve vzorku.
- Spektrální šířka štěrbin monochromátorů (*Excitation/Emission slit*). Volbou širší štěrbin se zvýší intenzita měřeného signálu, zhorší se ale spektrální rozlišení.
- Rychlost záznamu spektra buď z připravených nabídek (*Lowest až Survey*) nebo v režimu *Manual* prostřednictvím rychlosti záznamu (*Scan rate*), dobou měření jednoho bodu (*Averaging Time*) nebo intervalu mezi měřenými body (*Data interval*). Při změně jedné hodnoty se jiná hodnota dopočítává.

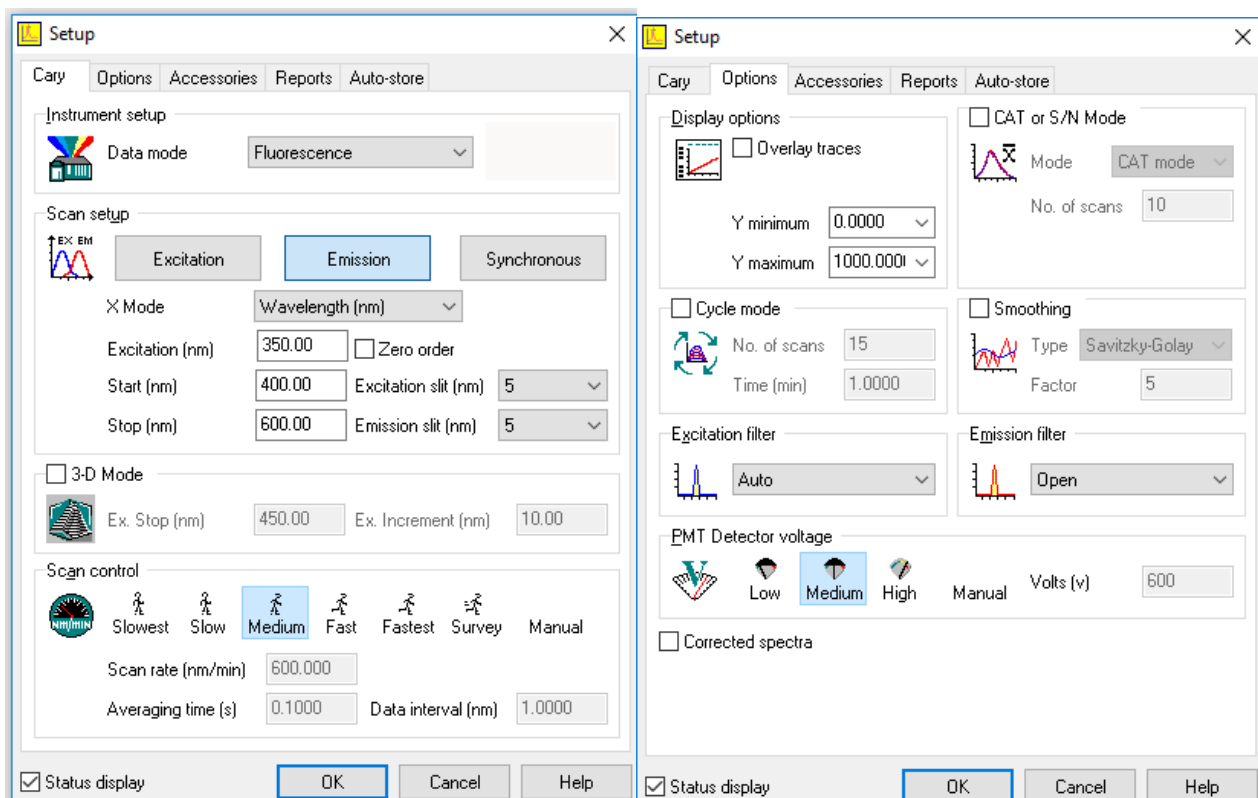
Na kartě *Option* (**obr. 6**) se volí:

- Způsob zobrazení změřených spekter (většinou vyhovuje *Overlay traces*, kdy se spektra postupně zobrazují v jednom společném grafu)

- Možnost opakovaného měření spekter ve zvolených časových intervalech (*Cycle mode*)
- Zařazení pomocných excitačních a emisních filtrů
- Napětí na fotonásobiči (7) pro signál vzorku (Předefinované hodnoty *Low*, *Medium*, *High* tj. 400, 600 a 800 V nebo v režimu *Manual* libovolná hodnota do napětí 1000 V.) Vyšší napětí na násobiči zvýší jeho zesílení. Zvýšení napětí o 10% přibližně zvýší signál na dvojnásobek.

Na kartě *Auto-store* je možno nastavit automatické upozornění na uložení naměřeného spektra buď před zahájením jeho měření, nebo po ukončení. Spektra je také možno uložit hromadně v různých formátech (*File/Save as ...*), mj. v textovém souboru *Spreadsheet Ascii* s příponou *csv* vhodném pro další zpracování v programu *Excel*.

V aplikaci *Simple Reads* jsou zadávané parametry podobné, místo intervalů jsou voleny pouze kombinace vlnových délek a z parametrů zadávaných pro rychlost záznamu zůstává pouze doba jednoho měření (*Ave. Time*). Hodnota se změří po kliknutí na tlačítko *Read* (klávesová zkratka F9 nebo Alt R) a objeví se s pořadovým číslem na výpisu.

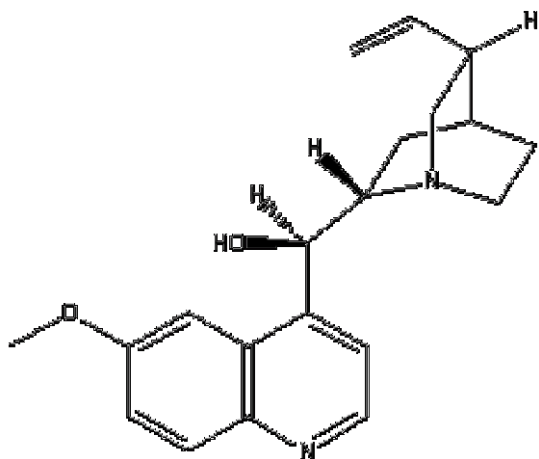


Obr. 6: Záložky *Cary* a *Options* z nabídky *Setup*.

Návod laboratorní práce

Fluorimetrické stanovení chininu v nápojích

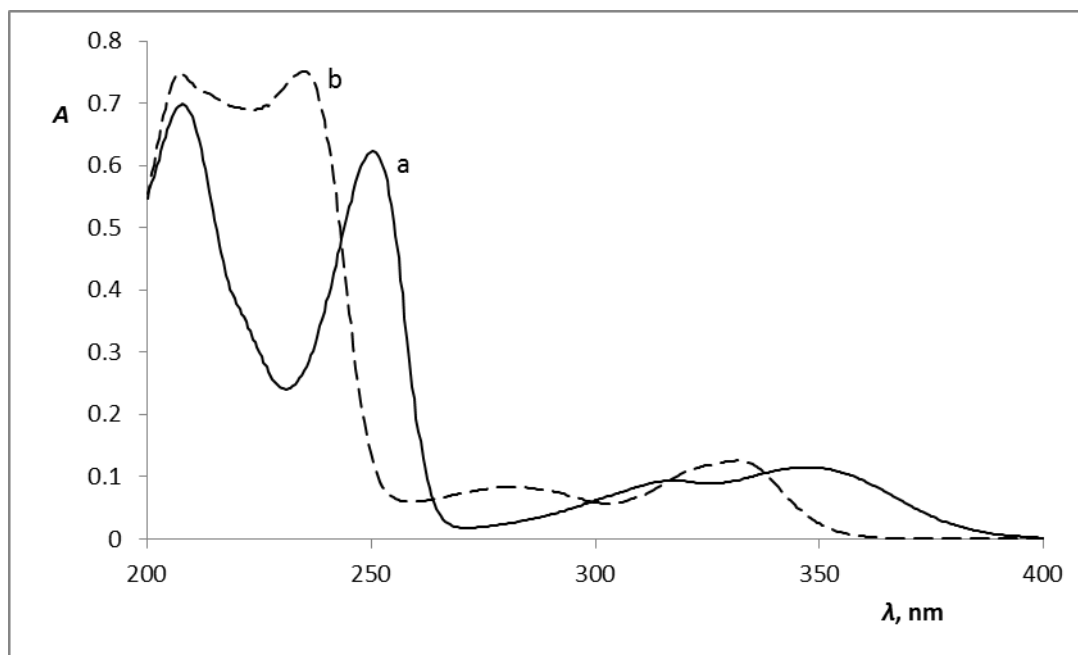
Úkolem práce je stanovit chinin v předloženém kapalném vzorku a ve vzorku nápoje.



Obr. 7: Strukturní vzorec chininu

Chinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ($M_r=324,42$) je alkaloid, jehož strukturní vzorec je na **obr. 7**. Chinin se vyskytuje v kůře tropických stromů rodu *Cinchona*. Stále ještě je významným lékem proti malárii. Má výrazně hořkou chuť a je proto přidáván do některých typů nápojů. Oba dusíkové atomy v molekule chininu mohou být protonizovány. Opětná disociace těchto vodíkových iontů je charakterizována disociačními konstantami přibližně $pK_1=4,3$ (chinolinový dusík) a $pK_2=8,3$ (chinuklidinový dusík). S kyselinami tvoří chinin soli. Bývá dodáván ve formě síranu $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ ($M_r=782,96$), který je ale mírně hygroskopický, takže obsah vody v různých preparátech může kolísat. Jeho roztoky za určitých podmínek jasně modře fluoreskují. Emisní spektrum leží v oblasti vlnových délek nad 400 nm s širokým maximem okolo 460 nm. Fluorescenční vlastnosti chininu jsou poměrně dobře prozkoumány, a proto se často používá při fluorescenčních měřeních jako srovnávací látka. Fluorescence chininu je zhasena některými ionty, např. chloridovými či bromidovými.

Absorpční spektra protonizovaných forem chininu jsou uvedena na **obr. 8**.



Obr. 8: Absorpční spektrum roztoku chininu v 0,05 M kyselině sírové (a) a ve fosfátovém tlumiči o pH=7 (b). Koncentrace chininu $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, kyveta o tloušťce 1 cm.

Úkoly

1. Proměřte excitační a emisní spektra chininu v závislosti na kyselosti roztoku přibližně v oblasti pH = 1 až pH = 7.
2. Na základě výsledků z bodu 1 zvolte prostředí vhodné pro přípravu kalibrační závislosti a analýzu vzorků.
3. Pro prostředí zvolené v bodu 2 připravte roztok zadaného vzorku a zvoleného nápoje a změřte jejich excitační a emisní spektrum.
4. Proměřte excitačně-emisní matici roztoku nápoje z bodu 3
5. Zvolte koncentrační rozsah pro kalibrační závislost. Na základě údajů z bodu 1 a předběžného měření z bodu 3 zvolte vhodné ředění vzorků. Připravte kalibrační roztoky, tři naředěné roztoky vzorku o stejné koncentraci, roztok nápoje a roztok nápoje s přidáním standardem. Proměřte fluorescenční signály všech roztoků při konstantní excitační a emisní vlnové délce.
6. Zpracujte kalibrační závislost a určete hmotnostní koncentraci chininu ve vzorku a v nápoji.
7. Z měření podle bodu 1 vyhodnoťte přibližně disociační konstantu chininu (není povinné).

V laboratoři využívají dva studenti jeden spektrofluorimetr. Všechny úkoly ale plní samostatně, pouze v bodu 4 je z časových důvodů možné, aby ukázkovou excitačně-emisní matici proměřili společně pouze pro jeden z obou nápojů.

Pracovní návod

1. *Příprava pracovního roztoku chininu.* Ze základního roztoku chininu o koncentraci $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, který je v laboratoři k dispozici v automatické byretě, připravíte do odměrky 250 ml pracovní roztok chininu o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.
2. *Příprava roztoků chininu s různou hodnotou pH.* Do 7 odměrek na 25 ml připravíte řadu sedmi roztoků chininu o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ s různou hodnotou pH podle **tabulky I**.

Tabulka I: Příprava 25 ml roztoku o přibližném pH

pH	Dávkovaný objem roztoku, ml			
	0,25 M H ₂ SO ₄	0,0125 M H ₂ SO ₄ ^a	0,0005 M H ₂ SO ₄ ^a	0,02 M fosfátový tlumič pH=7,5
1,3	5,0	-	-	-
2,1	-	10,0	-	-
2,7	-	2,0	-	-
3,4	-	-	10,0	-
4,1	-	-	2,0	-
4,3	-	-	1,0	-
7,6	-	-	-	2,0

^a Fosfátový tlumič a 0,25 M kyselina sírová jsou v laboratoři k dispozici. Zředěná 0,0125 M kyselina sírová se připraví naředěním 0,25 M kyseliny a 0,0005 M kyselina sírová se připraví naředěním 0,0125 M kyseliny sírové. Pro celou práci vystačíte se 100 ml roztoku 0,0125 M kyseliny sírové a 25 ml 0,0005 M kyseliny sírové.

3. *Spuštění spektrofluorimetru a měření spekter.* Přístroj a počítač zapnete síťovým vypínačem a na ploše otevřete složku *Cary Eclipse*. Na listu *Setup* nastavíte měření fluorescence, měření excitačního nebo emisního spektra, a spektrální šířky štěrbin obou monochromátorů na 5 nm. Do kyvetového prostoru umístíte kyvetu s roztokem chininu o pH = 1. Pokud je již ukončena inicializace spektrofluorimetru a svítí zelený semafor, spustíte předběžné měření příkazem *Prescan*. Zvolte přitom zaškrtnutím v úvodním dialogu zobrazení oblastí ovlivněných rozptylem. Průběh měření nezávisí na zvoleném typu měřeného spektra. Spektrofluorimetr nastaví emisní (mřížkový) monochromátor do nultého řádu, kdy jím prochází záření všech vlnových délek, a při střední hodnotě napětí na fotonásobiči proměří excitační spektrum. Překročí-li signál rozsah měření, spektrofluorimetr sníží napětí na fotonásobiči a měření se opakuje. Najde-li ve spektru maximum, zvolí jeho vlnovou délku jako excitační a změří spektrum emisní. Pokusy případně opakuje při vyšších hodnotách napětí na fotonásobiči. Pokud není měřený vzorek příliš komplikovanou směsí fluoreskujících látek, poskytne obvykle tento postup základní informaci o poloze excitačních a emisních maxim a na výsledném emisním spektru zobrazí

polohu rušivých signálů rozptýleného záření. Na základě tohoto postupu pak zvolíte excitační resp. emisní vlnovou délku, rozsah měřených spekter a proměříte emisní resp. excitační spektra. Podle obr. 8 je možno v roztoku kyseliny sírové očekávat v excitačním spektru chininu jedno maximum okolo vlnové délky 250 nm a druhé v okolí 345 nm. Pro vlnovou délku 250 nm již významnou část záření absorbuje samotná plastová kyveta. Také je větší pravděpodobnost, že ve vzorku bude přítomna nějaká složka, která toto záření bude absorbovat. Pro stanovení chininu je proto většinou výhodnější použít excitační záření o vlnové délce okolo 345 nm. Napětí na fotonásobiči nastavíte tak, aby maximum emisního spektra bylo okolo poloviny rozsahu intenzit. V označení měřených spekter je vhodné uvést kromě charakteristiky měřeného vzorku také typ spektra (emisní resp. excitační), zvolenou konstantní excitační resp. emisní vlnovou délku a případně napětí na fotonásobiči. V označení nepoužívejte čárku, protože ta je používána při exportu do textového souboru jako oddělovač. Spektra proměříte se stejným nastavením i pro ostatní roztoky připravené podle tabulky I. Pokud se změní vlnové délky excitačního nebo emisního maxima upravíte navíc příslušně nastavení vlnových délek a měření zopakujete. Seznam naměřených spekter je možno zobrazit ikonou vlevo v horní části okna se spektry. Lokální menu se zobrazí pravým tlačítkem myši. V levém sloupci seznamu je možno zaškrtnutím volit, která spektra mají být zobrazena a ve druhém sloupci nebo kliknutím na křivku lze v grafu vybrat jedno spektrum jako aktivní. Pro toto spektrum, které se zobrazí červeně, je možno přizpůsobit osy zobrazení dalšími tlačítky v horní části grafu. Během měření jsou ve spektrech vyhledávána maxima a jejich vlnové délky a intenzity jsou zobrazovány nad spektry a vypisovány v *Reportu*. Všechna naměřená spektra uložte hromadně (*Batch*) do souboru s příponou FBSW, který budete moci znovu otevřít pouze v programu *Scan*, a do textového souboru (*Spreadsheet Ascii*) s příponou csv, který můžete dále zpracovávat např. v programu *Excel*. *Report* zkopírujte přes schránku do poznámkového bloku a uložte. **Do souborů se ukládají pouze spektra zobrazená v grafu!** Soubory a všechna svá další měření ukládejte do svého pracovního adresáře na disku F s názvem QXrrmdd, kde X = A až D označuje spektrofleurimetr (od vchodu do laboratoře zleva doprava) a rrmdd označuje datum. Např. pro druhý spektrofleurimetr zleva dne 23. října 2018 bude název adresáře QB181023.

Poznámka 1: V laboratoři jsou k dispozici plastové kyvety o čtvercovém průřezu s vnitřním rozměrem 1 cm a o výšce 4 cm. Všechny čtyři stěny jsou průhledné a jsou částečně propustné i v UV oblasti asi do 270 nm. Pro měření je důležité, aby v oblasti, kde jimi prochází excitační a měřený emisní paprsek, byly pokud možno dokonale průhledné. Každá nečistota nebo poškození povrchu způsobí zeslabení měřeného fluorescenčního signálu. Nedotýkejte se proto stěn kyvety zhruba v oblasti spodních 3 cm a při manipulaci ji držte spíše za hrany v horní části. Kyvetu plňte měřeným roztokem do dostatečné výšky asi 2,5 až 3 cm, aby excitační paprsek dopadal zcela pod hladinu roztoku v kyvetě. Při čištění kyvetu opláchněte vodou případně s přidavkem saponátu. Kyvety neotírejte a neleštěte, protože se snadno poškrábou, a tím znehodnotí. Kapky na vnější stěně je možno opatrně vysát hranou filtračního papíru nebo buničitou vatou. Při plnění roztokem stačí, když kyvetu několikrát (min. 3x) vypláchnete měřeným roztokem. Snažte se, abyste přitom pokud možno nesmočili vnější stěny kyvety, protože pak

se zpravidla změni propustnost světla stěnou kyvety. Čistotu kontrolujte prohlédnutím kyvety proti světlu. I slabě znečištěná okénka (ulpěné kapky, otisky prstů) zkreslují měření fluorescence. Při vkládání kyvety do držáku v přístroji pokud možno zachovávejte orientaci kyvety, protože vlastnosti jednotlivých okének kyvety se mohou lišit. Plastové kyvety většinou nejsou použitelné pro organická rozpouštědla, která jejich povrch přinejmenším naleptávají.

4. *Určení vhodného pH pro stanovení chininu.* Na základě měření z předchozího bodu zvolíte prostředí, které je pro fluorimetrické stanovení chininu nejvhodnější. Toto prostředí použijete ve všech dalších měřeních. Při volbě prostředí se nemusíte omezit pouze na složení podle Tabulky I. Pro prostředí volte tak, aby intenzita fluorescence byla vysoká a neměnila se příliš se změnou pH, to znamená, aby metoda stanovení byla robustní. Přihlédněte také k tomu, aby příprava roztoků byla co možná jednoduchá.

5. *Orientační proměření signálu vzorků.* Do jedné odměrky na 25 ml odměříte 1 ml zadaného vzorku a do druhé 1 ml analyzovaného nápoje. V obou odměrkách upravíte prostředí podle závěrů z předchozího bodu. Pro tyto roztoky proměříte excitační a emisní spektra. Posoudíte, zda ve spektrech vzorku nápoje není patrná přítomnost jiné komponenty, která by mohla svou fluorescencí ovlivnit stanovení chininu. Naměřená spektra uložíte spolu se spektry naměřenými v bodu 3.

6. *Proměření excitačně emisní matice roztoku nápoje.* Zatímco budete připravovat roztoky podle následujícího odstavce, proměří spektrofluorimetr automaticky celou excitačně emisní matici roztoku nápoje. Ze seznamu zobrazených spekter odstraníte všechna dosud naměřená a již uložená spektra. Do kyvetového prostoru umísíte kyvetu naplněnou roztokem nápoje z předchozího bodu. Podmínky pro měření excitačně-emisní matice budou stejné, jako při měření spekter. Pouze v případě, že spektra přesahovala rozsah měření, snížíte přiměřeně napětí na fotonásobiči. Dále zvolíte **režim 3D**, měření emisních spekter v rozsahu (**Start**) **300 nm** až (**Stop**) **600 nm** s intervalem (**Data interval**) **5 nm**, excitaci (**Excitation**) **250 nm** s koncovou hodnotou (**Ex. Stop**) **600 nm** a s krokem (**Ex. Increment**) **5 nm**. Proměření matice při měření jednoho bodu (**Averaging time**) **0,1 s** trvá asi 10-15 minut. Naměřená spektra uložíte. Matici můžete zobrazit třírozměrně buď jako *Contour Graph* nebo v *3D* pohledu, který využívá program *Grams*. V grafech je za osu X pokládána vlnová délka měřených spekter, která je zadána hodnotami *Start*, *Stop* a *Data interval*, za osu Y intenzita, a za osu Z druhá vlnová délka (nebo *delta* pro synchronní spektra), jejíž koncová hodnota a krok je zadáván v části *3D* na listu *Cary* v okně *Setup*. Stejně hodnoty je třeba znovu zadat pro osu Z po volbě zobrazení *Contour* nebo *Grams 3D*.

Poznámka 2: Za takto zvolených podmínek bude do excitačně-emisní matice zahrnuta i oblast rozptýleného záření. Je to možné, protože jsou měřeny poměrně koncentrované roztoky, kdy vystačíme s nízkou citlivostí spektrofluorimetru (s nízkým napětím na fotonásobiči). Rozptýlené záření pro čiré roztoky má v tomto případě srovnatelnou intenzitu s fluorescenčním signálem a pravděpodobně nepřesáhne rozsah spektrofluorimetru. Pokud bychom *3D* spektra zaznamenávali jako synchronní, mohli bychom se pohodlně vyhnout rozptýlenému záření. Synchronní *3D* spektra jsou ale méně názorná, protože excitační a emisní spektra jsou představována diagonálními řezy a nikoliv řezy rovnoběžnými s osami vlnových délek. Takové řezy se dají snadno zobrazit v bodech

zvolených v presentaci *Contour Graph* i v 3D pohledu programu *Grams*, který navíc umožňuje libovolné natáčení objektu.

7. *Příprava kalibračních roztoků a naředění vzorků.* Pro zvolené prostředí připravíte 6 kalibračních roztoků s koncentrací rostoucí **rovnoměrně** od nulové do maximální hodnoty. Ani pro roztok s nejvyšší koncentrací by se neměl zřetelně uplatnit efekt vnitřního filtru. Proto jeho koncentraci zvolíte tak, aby pro excitační vlnovou délku byla absorbance v kyvetě o tloušťce 1 cm nižší než 0,03. Fluorescenční signál by také neměl být zbytečně slabý, proto by měla být absorbance kalibračního roztoku s nejvyšší koncentrací vyšší než asi 0,02. Absorpční spektrum chininu je na **obr. 8**, v kyselém prostředí je molární absorpční koeficient chininu pro maximum na vlnové délce 348 nm $5700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Zadaný vzorek naředíte na základě výsledků z bodu 5 tak, aby jeho koncentrace ležela spíše v horní polovině kalibrační závislosti, kde lze očekávat nižší relativní nejistotu výsledku. Připravíte paralelně tři stejně naředěné roztoky. Při analýze nápoje budete postupovat metodou přidavku standardu. Do dvou odměrek na 25 ml (případně 50 ml nebo 100 ml) odměříte takový objem nápoje, aby koncentrace chininu ležela po doplnění po značku okolo poloviny kalibrační závislosti, protože v rozsahu kalibrační závislosti by měl ležet i signál pro roztok s přidavkem standardu. Do druhé odměrky (25 ml) pak navíc přidáte 2 ml pracovního roztoku chininu o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Všechny roztoky vzorků naředěné pro měření musejí mít stejně upravené prostředí jako kalibrační roztoky.

Poznámka 3: Pro přípravu kalibračních roztoků a naředěných vzorků je k dispozici mikropipeta s nastavitelným objemem do 1 ml. Kalibrační roztoky i vzorky je vhodné připravit opakovaným dávkováním se stejným nastavením mikropipety, čímž se eliminuje vliv případné systematické odchylky dávkovaného a nastaveného objemu. Výrobce udává při odměřování objemu 1 ml preciznost lepší než 0,15%. Je ale třeba dodržovat některé zásady, které jsou shrnuty v Dodatku 3.

8. *Stanovení chininu ve vzorcích.* Spustíte a aktivujete aplikaci *Simple Reads*. Nastavíte excitační a emisní vlnovou délku podle předchozího měření, ostatní volitelné podmínky (štěrby, filtry, napětí na fotonásobiči) budou stejné jako pro měření spekter. Pro každý připravený roztok změříte (alespoň) 10 hodnot, které se zaznamenají ve výpisu měření. Roztoky proměřte nejlépe v pořadí: 6 kalibračních roztoků od nulové do maximální koncentrace, tři roztoky vzorku, roztok samotného nápoje a roztok nápoje s přidáním standardem. Otevřete aplikaci Poznámkový blok (*Notepad*) a výsledky z výpisu přenesete přes schránku do Poznámkového bloku a uložíte jako textový soubor. K vyhodnocení koncentrací a jejich nejistot je na počítačích v kořenovém adresáři na disku F k dispozici soubor QX19mdd.xls, který lze otevřít v programu *LibreOffice Calc*. V tomto souboru jsou připraveny dva listy pro výpočty koncentrace metodou vážené lineární regrese. Soubor zkopírujete do svého pracovního adresáře a přejmenujete podobně jako pracovní adresář. Do volného místa na jednom z obou listů přenesete přes schránku naměřené signály ze souboru otevřeného v poznámkovém bloku. Zde hodnoty signálu oddělíte od pořadového čísla měření příkazem *Data/Text to Columns*, uspořádáte vedle sebe vždy 10 naměřených hodnot každého roztoku ve výše uvedeném pořadí a transponované

přenesete (*Copy, Edit/Paste Special*) do odpovídajících políček D10:M20 na listu. Na listu je spočten průměr signálů a zpracuje se jak lineární, tak i kvadratická kalibrační závislost metodou vážené lineární regrese (viz Dodatek 1). Po zadání odměřovaných objemů jsou spočteny i obsahy chininu ve vzorcích. Vypočtené hodnoty naleznete ve sloupci N a jejich nejistoty ve sloupci O. Na základě testu koeficientu u kvadratického členu kalibrační závislosti (Q50:R50) posoudíte, zda vaše měření prokazují její zakřivení. Podle toho zvolíte odpovídající typ kalibrace pro určení koncentrace chininu ve vzorcích. **Do protokolu uvedete průměrné hodnoty signálů pro kalibrační závislost a vzorky, parametry použité kalibrační závislosti a provedete kontrolní výpočty koncentrací, zjevné výtěžnosti a přepočtů koncentrací na původní vzorky. Podle hodnoty zjevné výtěžnosti posoudíte, zda matrice nápoje ovlivňuje fluorescenci chininu (viz Dodatek 2). Výsledné hmotnostní koncentrace chininu uvedete včetně nejistoty nebo rozšířené nejistoty a koeficientu rozšíření, které přenesete z výpočtů v programu *LibreOffice Calc* nebo *Excel*. Nejistota se uvádí nejvýše na dvě platné cifry a samotná hodnota na stejný počet desetinných míst jako nejistota.**

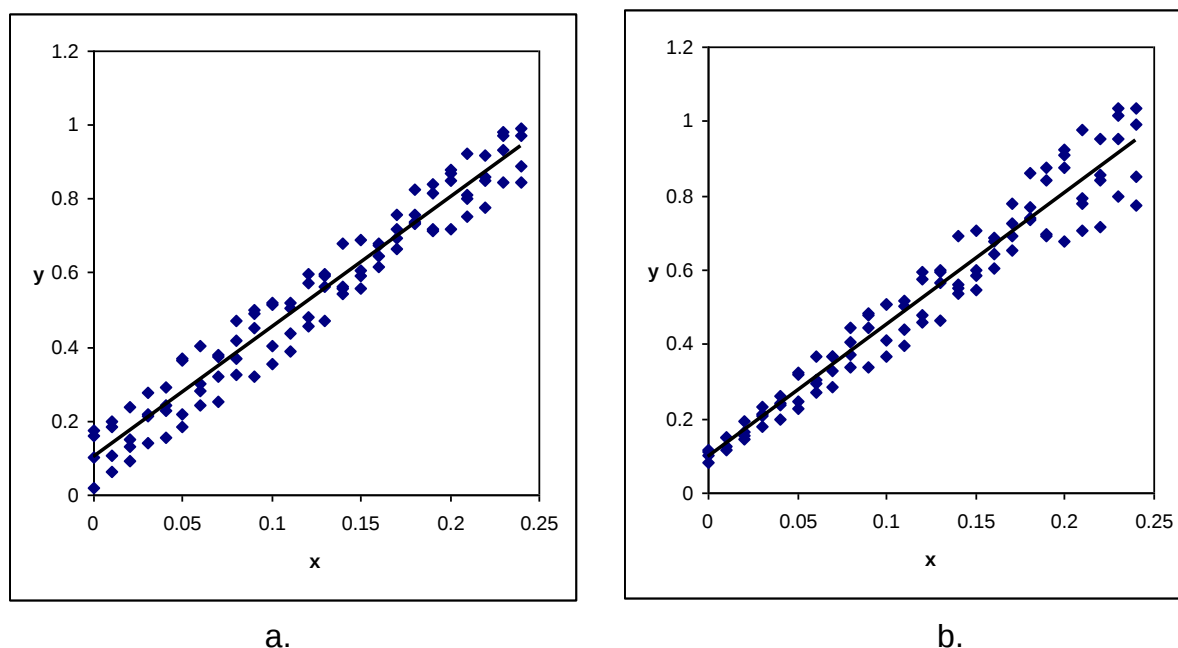
Poznámka 4: Program *Cary Eclipse* obsahuje rovněž aplikaci *Calibration*, která vyhodnocuje kalibrační závislosti a vypočítává koncentrace. Používá ale metodu nevážené lineární regrese, nemá prostředky pro posouzení linearitu kalibrační závislosti a neposkytuje žádnou informaci o nejistotě výsledku. Zde uvedený postup se pro získání těchto informací jeví momentálně jako nejschůdnější. Pro úkol č. 7 uvedete do protokolu postup při vyhodnocování disociační konstanty chininu a výslednou hodnotu pK_1 . Při výpočtu disociační konstanty můžete postupovat (například) podobně, jako při řešení příkladu 10.13 na str. 88 ve skriptech *Příklady z analytické chemie pro bakaláře* (Volka K. a kol., VŠCHT Praha, 2. vydání, verze 1.0, 2010) (https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-743-9). Na str. 88 je také v horní části návod, jak by se mělo při řešení příkladu postupovat. Při vyhodnocení fluorescence je třeba místo absorpčních koeficientů použít poměr intenzity fluorescence a koncentrace pro jednotlivé formy. Za spektra čistých forem je možno přibližně pokládat spektra změřená při pH 2.7 (forma BH_2^{2+}) a 7.4 (forma BH^+).

Kontrolní otázky

1. Co je to emisní fluorescenční spektrum?
2. Co je to excitační fluorescenční spektrum a jaký bude postup při měření excitačního a emisního spektra na spektrofluorimetru vybaveném excitačním a emisním monochromátorem?
3. Jaké děje probíhají v molekulách fluoreskující látky při buzení a emisi fluorescenčního záření a jaká nerovnost proto platí mezi vlnovou délkou excitačního a emitovaného záření?
4. Jak závisí tvar emisního spektra na excitační vlnové délce pro jednu fluoreskující látku a pro směs fluoreskujících látek?
5. Jak závisí tvar excitačního spektra na emisní vlnové délce pro jednu fluoreskující látku a pro směs fluoreskujících látek?
6. Co je to pravidlo zrcadlové symetrie?
7. Jak závisí fluorescenční signál na koncentraci fluoreskující látky v roztoku?
8. Jaká je souvislost mezi absorpčním a excitačním spektrem?
9. Co je to efekt vnitřního filtru a reabsorpce?
10. Co je to korekce fluorescenčních spekter a jaké jsou hlavní příčiny zkreslení nekorigovaných excitačních a emisních spekter?

DODATEK 1: VYHODNOCENÍ KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI V PRÁCI FLUORIMETRIE

V této práci se k vyhodnocení dat metodou kalibrační závislosti příliš nehodí běžná metoda lineární regrese, protože používá předpoklad homoskedasticity, tj. konstantní nejistoty závislé proměnné v celém jejím rozsahu (**obr. 9a**). Tento předpoklad ale při fluorimetrickém stanovení není zpravidla splněn a rozložení experimentálních bodů v kalibrační závislosti se více blíží **obr. 9b**. V takových (heteroskedastických) případech je obvyklé použít metodu vážené lineární regrese, která bere rozdíly v nejistotě závislé proměnné do úvahy, vyžaduje ale předběžnou znalost nejistot závislé proměnné pro jednotlivé experimentální body. Pokud je k dispozici dostatečně velký počet bodů, jako je tomu na **obr. 9**, můžeme proměnlivost nejistoty odhadnout z těchto dat. V laboratořích je však kalibrační závislost zkonstruována pouze ze 6 bodů. Pak je třeba vycházet z poznatků získaných během validace metody nebo použít pro nejistoty dobře zdůvodněný model.



Obr. 9: Lineární závislost s konstantní nejistotou závislé veličiny (a) a s nejistotou úměrnou této veličině (b)

Při fluorimetrickém měření jsou hlavní příspěvky k nejistotě měřeného signálu přibližně přímo úměrné úrovni tohoto signálu. Sem patří faktory jako např. nestabilita zdroje excitačního záření, obsah dalších složek vzorku, které absorbují záření, poloha kyvety, světelné ztráty odrazy na stěně kyvety a na nečistotách a částečně také nejistota fotometru měřícího zářivý tok. Do nejistoty měřeného signálu se promítá také nejistota koncentrace kalibračních roztoků. Ta by podle předpokladů, z nichž metoda lineární regrese vychází, měla být zanedbatelná, ale ve skutečnosti tomu tak nemusí být. Při ředění spíše bývá konstantní relativní nejistota koncentrace

výsledného roztoku, na níž se podílí např. proměnná teplota, doplňování odměrky po značku, nejistota kalibrace odměrného nádobí, u pipet kalibrovaných na vylití podíl kapaliny ulpělý na stěnách a ve špičce pipety, odpařování rozpouštědla nebo odparek a nečistoty, které se opláchnou z hrdla nádoby při vylévání roztoku.

Při nízkých úrovních zářivého toku je nejistota jeho měření úměrná druhé odmocnině zářivého toku. Je tomu tak v případě, kdy signál vzniká zprůměrováním fotoproudu generovaného nízkým počtem fotonů, protože jejich počet se řídí Poissonovou statistikou.

Jen menší část nejistoty měřeného signálu nezávisí na úrovni tohoto signálu. K této části přispívá např. rozptýlené záření, fluorescenční záření nečistot, parazitní světlo z okolí, které se dostane k detektoru, a částečně nejistota fotometru měřícího zářivý tok. Z těchto důvodů se jako přiměřený model nejistoty signálu jeví lineární závislost mezi nejistotou a signálem.

Odhad parametrů závislosti a nejistot metodou lineární regrese

Metoda lineární regrese předpokládá, že platí lineární závislost mezi závisle proměnnou veličinou y a jedním nebo několika členy (proměnnými) x_k ve tvaru

$$y = \sum_{k=1}^p a_k x_k \quad (12)$$

kde a_k jsou konstanty a p je počet členů. Metoda lineární regrese poskytuje odhad koeficientů a_k a případně i dalších parametrů na základě řady n hodnot y_i určených pro n kombinací členů x_{ki} ($i=1..n$). Přitom hodnoty y_i jsou zatíženy nejistotou, o níž běžná metoda lineární regrese předpokládá, že je konstantní v celém rozsahu hodnot y . Nejistota členů x_{ki} se předpokládá nulová. Metoda lineární regrese určuje odhady parametrů $\hat{a}_k$ jako hodnoty, které poskytují minimální hodnotu součtu druhých mocnin residuálních odchylek, tj. rozdílů hodnot y_i a hodnot $\hat{y}_i$ vypočtených ze vztahů

$$\hat{y} = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{ki} \quad i = 1, \dots, n \quad (13)$$

Minimalizace (residuálního) součtu čtverců

$$S_{\text{res}} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{ki})^2 \quad (14)$$

vyžaduje, aby jeho parciální derivace podle všech koeficientů $\hat{a}_l$ byly nulové, což vede na soustavu p lineárních rovnic pro odhady koeficientů $\hat{a}_k$ ve tvaru

$$\sum_{i=1}^n y_i x_{li} = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k \sum_{i=1}^n x_{ki} x_{li} \quad l = 1, \dots, p \quad (15)$$

resp.

$$S_l = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k S_{kl} \quad l = 1, \dots, p \quad (16)$$

Součty

$$S_l = \sum_{i=1}^n y_i x_{li} \quad (17)$$

jsou lineární funkcí y_i , zatímco čtvercová a symetrická matice soustavy

$$S_{kl} = \sum_{i=1}^n x_{ki} x_{li} \quad k, l = 1, \dots, p \quad (18)$$

závisí pouze na hodnotách x_{ki} a na hodnotách y_i nezávisí. Znamená to, že ani inverzní matice S^{inv} není na hodnotách y_i závislá a řešení

$$\hat{a}_k = \sum_{l=1}^p S_l S_{kl}^{\text{inv}} \quad (19)$$

je prostřednictvím součtů S_l lineární funkcí hodnot y_i . Nejistotu odhadů těchto koeficientů je tak možno určit podle jednoduchých pravidel o šíření nejistot, pokud určíme nejistotu hodnot y . Pokud není známo nic jiného, pokládá se za tuto nejistotu její odhad $\hat{s}_y$ z residuálního součtu čtverců (14) podle vztahu

$$\hat{s}_y^2 = \frac{S_{\text{res}}}{n-p} \quad (20)$$

Nejistota odhadnutých koeficientů $\hat{a}_k$ je pak dána diagonálními prvky inverzní matice

$$u(\hat{a}_k) = \hat{s}_y \sqrt{S_{kk}^{\text{inv}}} \quad (21)$$

Podobně i odhad hodnoty $\hat{y}_0$ odpovídající daným hodnotám členů $x_{k,0}$ ($k=1..p$) je zatížen nejistotou, kterou je možno určit ze vztahu

$$u(\hat{y}_0) = \hat{s}_y \sqrt{\sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^p x_{k,0} S_{kl}^{\text{inv}} x_{l,0}} \quad (22)$$

Výše popsaný způsob vyhodnocení je používán i v analytické chemii k vyhodnocení kalibrační závislosti analytického signálu y na obsahu analytu x . Tato závislost na obsahu x bývá často lineární, může být ale popsána např. polynomem vyššího stupně, kdy sčítanci ve funkčním vztahu jsou násobky mocnin $1, x, x^2, \dots, x^d$, kde d je stupeň polynomu. Prvý člen určuje úsek na ose y .

Na kalibrační závislosti se ze změřené hodnoty signálu Y odečítá odpovídající hodnota obsahu $\hat{X}$. V nejistotě, se kterou hodnotu $\hat{X}$ určíme, se projeví kromě nejistoty kalibrace podle vztahu (22) i nejistota, se kterou byla změřena hodnota

signálu Y . Nejistotu hodnoty $\hat{X}$ určíme jako podíl celkové nejistoty signálu Y a směrnice kalibrační závislosti $\hat{a}$ v daném bodě. Pro kalibraci ve tvaru polynomu stupně d bude

$$u(\hat{X})^2 = \frac{1}{\hat{a}^2} [u(Y)^2 + \hat{s}_y^2 \sum_{k=0}^d \sum_{l=0}^d \hat{X}^k S_{kl}^{\text{inv}} \hat{X}^l] \quad (23)$$

Pro lineární závislost y na x vyplývá z tohoto postupu i známý vztah (24) pro nejistotu obsahu $\hat{X}$ odhadnutého z kalibrační závislosti pro průměrnou hodnotu signálu Y získanou z m měření

$$u(\hat{X})^2 = \frac{\hat{s}_y^2}{\hat{a}_1^2} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(Y - \bar{y})^2}{\hat{a}_1^2 Q_{xx}} \right) \quad (24)$$

kde $\hat{a}_1$ je (odhadnutá) směrnice závislosti, veličina

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (25)$$

je střední hodnota signálů y_i kalibrační závislosti a Q_{xx} je rozptyl hodnot x_i kalibrační závislosti okolo střední hodnoty $\bar{x}$:

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (26)$$

Odhad parametrů závislosti a nejistot metodou vážené lineární regrese

Metoda vážené lineární regrese odhaduje koeficienty a další veličiny minimalizací váženého součtu

$$S_{\text{res},w} = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n w_i \left(y_i - \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{ki} \right)^2 \quad (27)$$

kde w_i jsou váhy přiřazované jednotlivým bodům. Vyšší váha je přiřazována bodům s menší nejistotou hodnoty y podle vztahu

$$w_i = \frac{K}{u(y_i)^2} \quad (28)$$

a koeficient K se volí tak, aby součet vah byl roven počtu bodů n . Je tedy

$$K = \frac{n}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{u(y_i)^2}} \quad (29)$$

a platí též

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n w_i u(y_i)^2}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i u(y_i)^2}{\sum_{i=1}^n w_i} = w_j u(y_j)^2 \quad (30)$$

To znamená, že koeficient K je roven váženému kvadrátu nejistoty, tj. součinu kvadrátu nejistoty a váhy, pro každý bod i jejich váženému průměru a nahrazuje jednu hodnotu nejistoty při lineární regresi s konstantní hodnotou nejistoty. Stojí za povšimnutí, že váhy a proto ani odhady parametrů závislosti nejsou závislé na absolutní velikosti nejistot pro jednotlivé body, ale pouze na jejich vzájemném poměru. Pokud zvětšíme všechny nejistoty ve stejném poměru, váhy ani odhady samotných parametrů to neovlivní. Nezmění se ani minimalizovaný residuální součet čtverců, změní se ale odhady nejistot některých odvozených parametrů.

Další postup je podobný jako pro metodu lineární regrese s konstantními nejistotami. Parciální derivace vedou na soustavu lineárních rovnic pro koeficienty $\hat{a}_k$ ve tvaru

$$\sum_{i=1}^n w_i y_i x_{li} = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k \sum_{i=1}^n w_i x_{ki} x_{li} \quad l = 1, \dots, p \quad (31)$$

tj. ve stejném tvaru jaký má soustava rovnic (16), kde ale nyní vystupují vážené součty

$$S_{l,w} = \sum_{i=1}^n w_i y_i x_{li} \quad (32)$$

které jsou opět lineární funkcí y_i , zatímco matice soustavy

$$S_{kl,w} = \sum_{i=1}^n w_i x_{ki} x_{li} \quad (33)$$

závisí pouze na hodnotách x_{ki} a vahách w_i a nezávisí na hodnotách y_i . Znamená to, že výpočet odhadů koeficientů $\hat{a}_k$ je analogický jako při nevážené regresi (rovnice 19). Dokonce i při určování nejistot koeficientů jsou vztahy stejné s tím, že kvadrát nejistoty hodnot y se nahradí váženým kvadrátem nejistoty, tedy konstantou K , a ta se analogicky vztahu (20) odhadne z váženého residuálního součtu čtverců (27)

$$K = s_{y,w}^2 = \frac{S_{\text{res},w}}{n-p} \quad (34)$$

Při určení nejistot hodnot $\hat{X}$ odhadnutých z regresní závislosti je ale třeba použít také nejistotu hodnoty Y odpovídající příslušné oblasti a např. vztah (24) přejde na

$$u(\hat{X})^2 = \frac{1}{\hat{a}_1^2} \left(\frac{u(Y)^2}{m} + \frac{s_{y,w}^2}{n} + \frac{s_{y,w}^2 (Y - \bar{y}_w)^2}{\hat{a}_1^2 Q_{xx,w}} \right) \quad (35)$$

Pro určení nejistoty $\hat{X}$ tedy potřebujeme použít i konkrétní nejistotu hodnoty Y v dané oblasti plynoucí z použitého modelu s určenou hodnotou konstanty K .

Použití souboru pro Excel (LibreOffice Calc) v laboratoři

V laboratoři je pro zpracování kalibrační závislosti na počítačích k dispozici předem připravený soubor pro program *Excel* nebo *LibreOffice Calc*. Obsahuje dva stejné listy, z nichž jeden nepoužitý přejmenujete na své jméno. Nebudete zasahovat do druhého listu s daty kolegy. Po úpravách ukládáte vždy celý soubor pod původním jménem.

Vstupní data jsou zadávána do žlutě podbarvených buněk. Koncentrace kalibračních roztoků v oblasti C10:C15 jsou počítány z pipetovaných objemů pracovního roztoku chininu, které uvedete do oblasti B10:B15. Pro každý roztok v kalibraci i pro vzorky vložíte 10 hodnot změřených spektrofotometrem do oblasti D10:M20. K dalšímu vyhodnocení jsou použity průměry těchto hodnot spočtené v oblasti N10:N20. Pipetované objemy pro roztoky vzorků se zadávají do oblasti N21:N27. Prvý graf na listu zobrazuje kalibrační závislost vyhodnocenou metodou běžné (nevážené) lineární regrese. V druhém grafu je znázorněna závislost směrodatné odchylky průměru z deseti měření signálu na velikosti signálu.

Odhady koeficientů kalibrační závislosti jsou spočteny v oblasti N34:N35 (N48:N50) pro lineární (kvadratickou) závislost. Z těchto hodnot a ze změřeného signálu pro vzorek je určena koncentrace chininu v měřeném roztoku v buňce N37 (N52) a přepočtena na ředění a na hmotnostní koncentraci v oblasti N38:N39 (N53:N54).

Koncentrace roztoku nápoje a roztoku nápoje s přídavkem standardu je spočtena z kalibrační závislosti v oblasti N40:N41 (N55:N56). Z těchto hodnot je spočtena zjevná výtěžnost R v buňce N42 (N57) jako podíl jejich rozdílu ku přidané koncentraci chininu. Touto hodnotou je vydělena koncentrace roztoku samotného nápoje a přepočtena na ředění a hmotnostní koncentraci v oblasti N43:N44 (N58:N59). V buňce N45 (N60) je pro srovnání přímo přepočtena koncentrace chininu změřená v roztoku nápoje na ředění a hmotnostní koncentraci. Tato hodnota je výsledkem analýzy, pokud matrice nápoje neovlivní fluorescenční signál chininu ($R = 1$).

Při odhadu parametrů kalibrační závislosti se předpokládá lineární závislost nejistoty signálu na hodnotě signálu. V buňce Q2 je možno změnit hodnotu, která udává, kolikrát má být nejistota minimálního signálu nižší oproti nejistotě signálu maximálního. (Pokud se sem zadá hodnota 1, přejde vyhodnocení na běžnou metodu lineární regrese s konstantní nejistotou signálu.) Na základě této závislosti jsou určeny v oblasti Q10:Q20 relativní hodnoty nejistot signálů a z nich jsou v buňkách R10:R15 spočteny váhy jednotlivých kalibračních bodů. Ty jsou použity při vážené lineární regresi a poskytnou kromě odhadů koeficientů kalibrační závislosti také hodnotu $s_{y,w}$ v buňce N36 pro lineární a v buňce N51 pro kvadratickou kalibrační

závislost. Na jejich základě je pak v buňce O6 určena konstanta K , a v buňkách O10:O20 je vytvořen model závislosti nejistoty signálu na jeho velikosti. Zda je model vytvořen pro lineární nebo kvadratickou závislost určuje hodnota v buňce O2 (pro 0 je model spočten pro lineární kalibraci, pro nenulovou hodnotu je zvolena kalibrace kvadratická). Z tohoto modelu jsou pak počítány nejistoty koncentrací spočtených ze signálů pro vzorky v oblasti O37:O45 (O52:O60). Nejistoty objemů jsou uvedeny v oblasti O21:O27.

V oblasti T37:T60 jsou spočteny nejistoty výsledných hodnot s využitím Kragtenova schématu (T7:AL60) a jsou použity u výsledků získaných metodou přídatku standardu. V oblasti F37:G41 (F58:J62) je pro srovnání proveden výpočet parametrů kalibračních závislostí obvyklou metodou nevážené lineární regrese.

V buňkách Q34:Q35 a Q48:Q50 je ověřováno, zda jsou koeficienty kalibrační závislosti statisticky významně odlišné od nuly. Jestliže se pro kvadratickou kalibrační závislost (buňka O2≠0) objeví v buňce Q50 "false", není kvadratický koeficient statisticky významný a použijeme výsledky z lineární kalibrace poté, co v buňce O2 nastavíme nulovou hodnotu.

DODATEK 2: KOMENTÁŘ K METODĚ PŘÍDAVKU STANDARDU

Řada analýz vyžaduje, aby byl analyt ze vzorku před vlastním měřením nejprve izolován v přečištěné formě. Používají se k tomu různé separační metody jako extrakce, chromatografie apod., které jsou doprovázeny ztrátami analytu. Velikost ztrát popisuje výtěžnost metody R (*Recovery*), což je poměr množství analytu obsaženého v izolovaném podílu n_1 ku množství analytu přítomného v původním vzorku n_x . K určení výtěžnosti se používají analýzy referenčních materiálů, u kterých je znám obsah analytu. Jinou možnost poskytuje metoda přídatku standardu, kdy se k druhé stejné alikvotní části vzorku přidá známé množství analytu n_s . Pro prvou část vzorku platí

$$n_1 = Rn_x \quad (36)$$

Pokud přidáný standard analytu bude izolován se stejnou výtěžností jako analyt obsažený ve vlastním vzorku, bude pro izolovaný podíl z druhé části vzorku n_2 platit

$$n_2 = R(n_x + n_s) \quad (37)$$

Odečtením rovnic získáme vztah

$$n_2 - n_1 = Rn_s \quad (38)$$

a pro výtěžnost R

$$R = \frac{n_2 - n_1}{n_s} \quad (39)$$

Obsah ve vzorku získáme z hodnoty n_1 po opravě na výtěžnost dělením

$$n_x = \frac{n_1}{R} \quad (40)$$

Po formální stránce se podobně může projevit vliv přítomnosti dalších komponent, které vzorek obsahuje, na analytický signál, v našem případě na intenzitu fluorescence. Jestliže některé složky ze vzorku budou zhaset fluorescenci, bude intenzita fluorescence snížena, a hodnota koncentrace odečtená z kalibrační závislosti změřené bez přítomnosti těchto složek bude nižší, než odpovídá skutečnosti. Podíl koncentrace získané takto z kalibrační závislosti ke koncentraci přítomné ve vzorku je označován jako zjevná (zdánlivá) výtěžnost (*Apparent Recovery*). I v tomto případě je často pro vyhodnocení analýzy vhodná metoda přidavku standardu. V této práci používáme při analýze nápoje dvě odměrky o stejném objemu a do každé z nich pipetujeme stejný objem vzorku. Do druhé odměrky přidáme navíc známé množství standardu. Zjevnou výtěžnost R vyhodnotíme ze vztahu

$$R = \frac{c_2 - c_1}{c'_s} \quad (41)$$

kde v čitateli je rozdíl změřených koncentrací analytu c_2 a c_1 pro obě odměrky a ve jmenovateli je zvýšení koncentrace analytu ve druhé odměrce způsobené přidavkem standardu c'_s . Případné zhasení fluorescence se projeví hodnotou zjevné výtěžnosti významně menší než 1.

Při určování nejistoty výsledku získaného metodou přidavku standardu podle Kragtenova schématu je třeba pro zahrnutí vlivu nejistoty pipetovaných objemů vzorku a objemů odměrek použít k výpočtu výtěžnosti a koncentrace obecnější vztah pro případ, kdy tyto objemy nejsou pro oba roztoky stejné. Pro první roztok bude pro změřenou koncentraci analytu c_1 platit

$$c_1 = R \frac{c_v V_{v1}}{V_{o1}} \quad (42)$$

kde c_v je hledaná koncentrace analytu v analyzovaném roztoku (vzorku), V_{v1} je objem analyzovaného roztoku odpipetovaný do první odměrky o objemu V_{o1} a R je hodnota zjevné výtěžnosti. Pro druhý roztok bude změřená koncentrace c_2

$$c_2 = R \frac{c_v V_{v2} + c_s V_s}{V_{o2}} \quad (43)$$

kde V_{v2} je objem analyzovaného roztoku odpipetovaný do druhé odměrky o objemu V_{o2} , c_s je koncentrace přidaného roztoku standardu a V_s jeho objem.

Úpravou získáme z rovnice (42)

$$c_1 \frac{V_{o1}}{V_{v1}} = R c_v \quad (44)$$

a z rovnice (43)

$$c_2 \frac{V_{o2}}{V_{v2}} = R c_v + R c_s \frac{V_s}{V_{v2}} \quad (45)$$

Z rozdílu obou rovnic plyne pro výtěžnost R vztah

$$R = \frac{c_2 \frac{V_{o2}}{V_{v2}} - c_1 \frac{V_{o1}}{V_{v1}}}{c_s \frac{V_s}{V_{v2}}} \quad (46)$$

Vypočtená hodnota výtěžnosti se použije k určení obsahu analytu ve vzorku c_v podle rovnice (42).

Jestliže jsou objemy vzorku přidané do obou odměrek stejné ($V_{v1}=V_{v2}$), lze rovnici (46) přepsat jako

$$R = \frac{c_2 V_{o2} - c_1 V_{o1}}{c_s V_s} = \frac{n_2 - n_1}{n_s} \quad (47)$$

kde v čitateli je změřený přírůstek látkového množství analytu porovnáván s přidaným látkovým množstvím standardu ve jmenovateli. Jsou-li i objemy obou odměrek stejné ($V_{o1}=V_{o2}$), zjednoduší se rovnice (42) dále na rovnici (41), protože

$$R = \frac{c_2 - c_1}{c_s \frac{V_s}{V_{o2}}} = \frac{c_2 - c_1}{c'_s} \quad (48)$$

kde

$$c'_s = c_s \frac{V_s}{V_{o2}} \quad (49)$$

je právě zvýšení koncentrace v druhé odměrce způsobené přidavkem standardu.

DODATEK 3: ZÁSADY PRO PRÁCI S MIKROPIPETOU

Mikropipety, jimiž jsou laboratoře vybaveny, jsou určeny pro dávkování kapaliny v rozsahu 0,1 až 1 ml. Kapalina je nasávána do vyměnitelné špičky, která je nejčastěji vyrobena z polypropylenu, pístovým mechanismem. Pohyb pístu je na

kapalinu přenášen sloupcem vzduchu. Dávkovaný objem je určen zdvihem pístu, který je nastavován šroubem. Šroubem lze otáčet buď spodní částí pístového tlačítka, nebo kolečkem v horní části mikropipety. To jinak slouží pro případnou kalibraci mechanismu. Nastavený objem je vidět na číselníku v horní části mikropipety. Při stisku pístového tlačítka se píst nejprve zarazí v poloze, která odpovídá nastavenému objemu, při silnějším stisku se dostane do spodní krajní polohy, což umožní případně odstranit ze špičky i zbytky kapaliny, která ulpí na vnitřních stěnách špičky a teprve dodatečně se shromáždí v její spodní části.

Při používání mikropipety je třeba dodržovat několik zásad.

Pístem pohybujte vždy zvolna a rovnoměrně. V krajních polohách by se nemělo ozvat výrazné cvaknutí.

Kapalina se nesmí dostat do vnitřní části mikropipety. Proto nesmí být pohyb pístu prudký, nesmí se mikropipeta obracet špičkou vzhůru ani se nesmí pokládat v horizontální poloze, je-li ve špičce kapalina. Nejvhodnější je ukládat mikropipetu do držáku ve svislé poloze.

Objem se nesmí nastavovat mimo určený rozsah. Pro přesné nastavení se k cílové hodnotě přibližujte směrem od vyšších hodnot a to alespoň o třetinu otáčky šroubu.

Při práci by mikropipeta měla být ve svislé poloze. Případný náklon snižuje správnost odměřeného objemu.

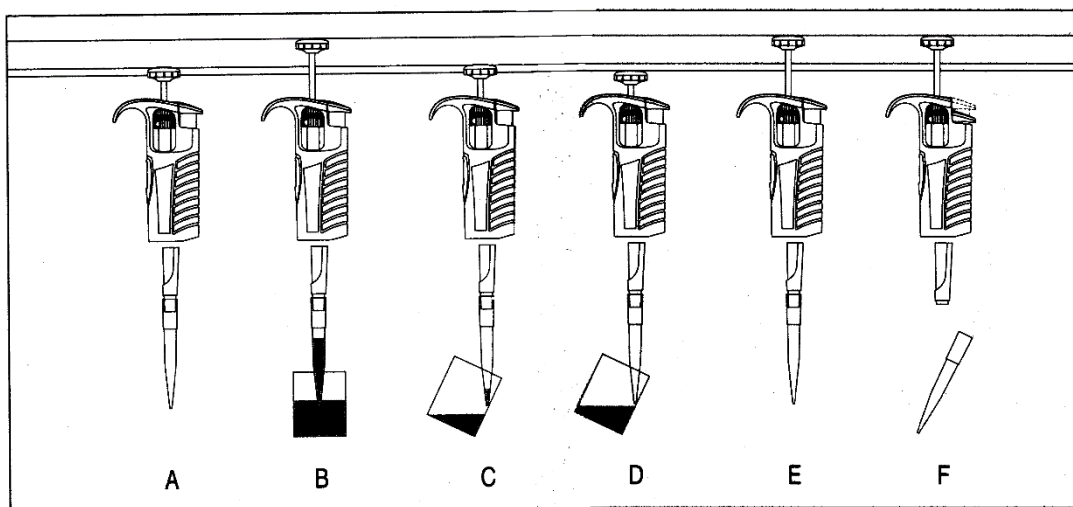
Při nasávání do špičky by měl být konec špičky ponořen do kapaliny co nejméně. Tím se sníží možnost, že kapalina ulpí na vnějších stěnách špičky a přenesení se do cílové nádoby. Při vyšší hloubce ponoru také hydrostatický tlak stlačí sloupec vzduchu v pipetě a tím se ovlivní množství kapaliny nasáté do špičky. Hloubka doporučeného ponoru závisí na objemu, pro který je mikropipeta určena. Pro typ používaný v laboratoři by měl být konec špičky asi 2 až 3 mm pod hladinou.

Je třeba dbát na to, aby se do špičky spolu s kapalinou nedostaly bubliny vzduchu.

V případě, že je třeba z vnější stěny špičky odstranit kapky kapaliny, odsajte je savým materiálem. Nesmíte se ale přitom dotknout otvoru špičky, aby se nevysála i kapalina z jejího vnitřního prostoru.

Špičku nasadte na konec mikropipety a pevně dotlačte za mírného otáčení, aby se dosáhlo vzduchotěsného upevnění. Špičku je vhodné několikrát smočit dávkovanou kapalinou, aby se smočily stěny špičky a vnitřní prostor nad kapalinou se nasytil jejími parami.

Před použitím zkontrolujte těsnost mechanismu mikropipety a nasazené špičky. Nasajte do špičky kapalinu a zkontrolujte, zda samovolně nevytéká nebo se na špičce nevytvářejí kapky. V opačném případě nemůže být odměřování objemů spolehlivé.



Obr. 10: Postup při dávkování vzorků mikropipetou.

Při nejčastějším způsobu dávkování (*forward pipetting* - **obr. 10**) nejprve stisknete píst do prvního odporu (A). Pak ponoříte konec špičky 2 – 3 mm pod hladinu. Pak zvolna a plynule uvolníte píst do horní polohy (B), vyčkejte asi 1 s a vyjměte špičku z kapaliny. Při vyjímání z kapaliny se dotýkejte koncem špičky stěny nádoby, aby se odstranila kapalina z vnější stěny špičky. Koncem špičky se dotkněte špičkou stěny cílové nádoby pod úhlem 10 až 40 stupňů, píst zvolna stisknete až do prvního odporu (C) a vyčkejte asi 1 s. Stisknete píst na druhý doraz a vytlačte případnou zbývající kapalinu ze špičky (D). S pístem stisknutým na doraz tahem podél stěny nádoby vyjměte špičku z nádoby a uvolníte píst (E). Pokud by to bylo třeba, např. při následném pipetování kapaliny o výrazně odlišném složení, uvolníte špičku stiskem bílého tlačítka na mikropipetě (F).

Při dávkování nehomogenních kapalin, jako je krev nebo sérum, se tento postup modifikuje. Špička se po naplnění kapalinou ponoří do cílového roztoku, píst se stlačí do prvního odporu, a hlavní podíl kapaliny se převede do cílového roztoku. Pak se píst znovu uvolní do horní polohy, do špičky se nasaje cílový roztok a znovu vrátí do cílové nádoby. Nasátí roztoku se může opakovat, až na stěnách špičky nejsou patrné zbytky původní kapaliny a špička je tak vypláchnuta cílovým roztokem. Pak se špička z kapaliny vyjme a v kontaktu se stěnou nádoby se vyprázdní postupným stlačením pístu až na druhý doraz jako tomu bylo v předchozím způsobu.

Pro dávkování kapalin viskózních, kapalin s tendencí vytvářet pěnu nebo pro těkavé kapaliny se doporučuje reverzní pipetování (*reverse pipetting*). Při tomto způsobu nejprve stisknete píst až na druhý doraz, ponoříte špičku 2 – 3 mm pod hladinu dávkované kapaliny a plynule uvolníte píst do horní polohy. Vyčkejte, až se

špička naplní kapalinou, a vyjměte špičku z kapaliny. Při vyjímání z kapaliny se dotýkejte koncem špičky stěny nádoby, aby se odstranila kapalina z vnější stěny špičky. Do konce špičky nesmí vniknout vzduchová bublina. Koncem špičky se dotkněte špičky stěny cílové nádoby a stiskněte píst do prvního odporu a držte v této poloze, až kapalina přestane ze špičky vytékat. Pak tahem špičky po stěně nádoby špičku vyjměte z nádoby a kapalinu zbylou ve špičce buď vyprázdněte do odpadu, nebo případně vraťte do původní nádoby s kapalinou.

Podobný postup je možné s výhodou použít při opakovaném dávkování stejného objemu, kdy po vyjmutí špičky z cílové nádoby se hned nabere další dávka kapaliny.

Pro zpracování kapitoly byly použity práce:

M. Hejtmánek a K. Volka: Emisní fluorescenční spektroskopie ve skriptech Laboratorní cvičení z instrumentální analýzy. (M. Hejtmánek a kol.), str.101. VŠCHT, Praha 1981.

D.T. Burns, K. Danzer, A. Townshend: Use of the Terms "Recovery" and "Apparent Recovery" in Analytical Procedures. Pure Appl. Chem., 2002, 74, 2201.

<https://www.linguee.com/english-czech/search?source=auto&query=apparent+recovery> (14.12.2018)