

## Úloha č.2: Jednopaprskový spektrofotometr Spekol 10

### Zadání:

1. Seznamte se s principem činnosti, provozními parametry a příslušenstvím přístroje Spekol 10.
2. Naučte se obsluhovat přístroj pro měření absorpce a transmise a seříd'te optickou část.
3. Změřte spektrum absorpce segmentu listu ječmene.
4. Změřte spektrum absorpce vodou infiltrovaného segmentu listu ječmene.
5. Proveďte extrakci pigmentů segmentu listu ječmene do 80% acetonu (zaznamenejte plochu segmentu a výsledný objem roztoku).
6. Změřte spektrum extraktu a určete koncentraci chlorofylů a, b, a+b, a/b a karotenoidů a odvoďte převodní vztahy pro přepočítávání koncentrací v  $[\text{mg.l}^{-1}]$  na jednotky  $[\text{mol.l}^{-1}]$ , když víte, že relativní molekulová hmotnost chl a a chl b je 893 a 907.
7. Výsledky uveďte ve formě obrázků, tabulky a diskutujte rozdíly.

### Seznam pomůcek:

1. Přístrojové vybavení: Spekol 10, nástavec EK1, sada kyvet, standardní filtry, mléčné sklo
2. Rostlinný materiál: ječmen jarní (*Hordeum vulgare*)
3. Ostatní potřeby: aparatura na urychlenou filtraci (vodní vývěva, promývačka, skleněná nálevka s fritou), váhy, třecí miska, tlouček, 80% aceton,  $\text{MgCO}_3$

### Princip metody:

Absorpční metody patří mezi nejužívanější metody molekulární optické spektroskopie. Podle druhu sledovaných molekulárních přechodů rozlišujeme *elektronovou* absorpční spektroskopii, která užívá optické záření blízké infračervené, viditelné nebo ultrafialové oblasti ( $\lambda < 1 \mu\text{m}$ ), a *vibrační* absorpční spektroskopii, spadající do infračerveného spektrálního oboru (obvyklý interval  $\lambda = 3 \div 25 \mu\text{m}$ ).

### Základní vztahy absorpční spektroskopie.

*Útlum elektromagnetické vlny v absorbujícím prostředí.*

### Lambertův zákon

Při průchodu optického záření absorbujícím prostředím dochází ke snižování jeho intenzity. Velikost útlumu monochromatické vlny o vlnové délce  $\lambda$ , se nejčastěji charakterizuje prostřednictvím *absorbance* (optické hustoty) **A** definované vztahem:

$$A(\lambda) = \log T(\lambda),$$

kde  $T(\lambda)$  je propustnost (transmittance) definovaná jako poměr intenzity záření vystupujícího ze vzorku  $I_{vz}(\lambda)$  ku intenzitě  $I_0(\lambda)$  záření dopadajícího:

$$T(\lambda) = I_{vz}(\lambda)/I_0(\lambda).$$

V optickém prostředí, které lze makroskopicky popsat komplexním indexem lomu, klesá intenzita exponenciálně s dráhou, kterou záření urazí. Tuto závislost vyjadřuje tzv. *Lambertův zákon*, podle kterého je absorbance přímo úměrná dráze  $x$ :

$$A(\lambda) = b(\lambda) x .$$

Látková konstanta  $b$  se nazývá absorpční (extinkční) koeficient. (*Poznámka:* U biologických vzorků můžeme někdy pozorovat odchylky od Lambertova zákona způsobené především nejrozličnějšími fotochemickými reakcemi nebo zvyšováním teploty, které může mít za následek vznik teplotních gradientů, iniciaci konformačních změn, denaturaci, posuvy reakčních rovnováh, aktivaci chemických reakcí apod.)

*Absorpční koeficient v kondenzované fázi.*

### **Beerův zákon**

Při biofyzikálních aplikacích jsou zpravidla měřeny vlastnosti molekul v kondenzovaném prostředí; běžnými typy homogenních vzorků jsou **roztoky, gely, kapaliny, molekulární krystaly, polymerní fólie**. V tomto případě se absorbující molekula nachází v silovém poli sousedních molekul, které ovlivňuje strukturu energetických hladin, pravděpodobnosti přechodů a určuje vnější pohyb molekuly. Přesto si však mnohoatomové organické molekuly obvykle zachovávají svojí individualitu, takže je možné charakterizovat je hodnotou absorpčního koeficientu (ovšem s omezením na daný typ prostředí).

Druhým závažným aspektem kondenzovaného prostředí je tzv. lokální pole. Absorbující molekula se totiž nachází ve střídavém elektromagnetickém poli, které je superpozicí vlastního pole procházejícího optického záření a indukovaných polí sousedních molekul, jejichž velikost není rozhodně zanedbatelná.

Častým typem vzorků jsou **silně zředěné roztoky jednoho druhu absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle**.

Koncentrační závislost absorpčního koeficientu splňuje tzv. *Beerův zákon*:

$$b = \varepsilon C .$$

Konstanta charakterizující absorbující látku  $\varepsilon(\lambda)$  se nazývá **molární absorpční (extinkční) koeficient**. V případě více druhů rozpuštěných absorbujících molekul v roztoku lze předchozí vztah zobecnit na

$$b = \sum \varepsilon^i C^i ,$$

kde  $\varepsilon^i$  (resp.  $C^i$ ) jsou molární absorpční koeficienty (resp. molární koncentrace) jednotlivých složek. Tento vztah však platí pouze za předpokladu, že absorbující molekuly spolu nereagují ani jinak neinteragují.

Poslední dva uvedené vztahy platí i pro některé pevné nebo polotuhé amorfní látky (např. skla, gely), ve kterých jsou s nízkou koncentrací homogenně rozmístěny absorbující látky.

Vztahy  $A(\lambda) = b(\lambda) x$  (Lambertův zákon) a  $b = \varepsilon C$  (Beerův zákon) jsou obvykle spojovány do tzv. *Lambertova-Beerova zákona*:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) C x .$$

## Měření absorpčních spekter

Cílem absorpčních měření je určení spekter absorpčního koeficientu; v případech, kdy tloušťku vzorku není možné nebo potřebné určovat, pak stanovení spektra absorbance. Nejjednodušší a zároveň nejrozšířenější metodou stanovení absorpčních spekter vzorku je měření propustnosti  $T(\lambda)$ .

Přístroj pro měření spekter propustnosti - *absorpční spektrofotometr* - se skládá z části optické, obsahující zdroj záření, monochromátor, detektor, vzorkovou část a optické prvky, a části elektromechanické, zahrnující pohon ladění monochromátoru, měřič signálu detektoru a výstupní zařízení. Vzorek se zpravidla umísťuje mezi monochromátor a detektor; v některých infračervených přístrojích je vzorek před monochromátorem. V současné době je velký výběr komerčně vyráběných spektrofotometrů.

U nejjednodušších jednopaprskových přístrojů (tzv. spektrokolorimetrů) se měření provádí bod po bodu s ručním nastavováním vlnových délek. Při každé hodnotě  $\lambda$  se zasune nejprve do dráhy světelného svazku referenční vzorek (případně se ponechá dráha volná při absolutním měření) a nastaví se zesilovač tak, aby připojený měřicí přístroj udával hodnotu 100%. Poté je zasunut měřený vzorek a odečtena hodnota  $T(\lambda)$ .

Ve dvoupaprskových přístrojích je svazek záření střídavě veden na vzorek a referenci. Po průchodu dopadá záření na společný detektor, jehož výstupní signál je zaznamenáván dvěma měřicími kanály, synchronně přepínanými s alternujícím ozářením vzorku a reference. Určování poměru úrovní v těchto kanálech (který je roven relativní propustnosti vzorku) se často provádí kompenzačním způsobem, kdy je pomocí zpětné vazby kompenzována úroveň signálu vzorku pomocí měřicího potenciometru nebo zasouváním zeslabujících optických klínů do dráhy referenčního vzorku. V obou případech lze pomocí mechanického spřažení kompenzačního prvku s posuvem pera zapisovače jednoduše získat samočinný záznam spektra propustnosti. V novějších přístrojích je podíl intenzity záření propuštěného vzorkem a referencí získáván elektronicky.

*Zelený list jako optický prvek:*

Z hlediska optických vlastností představuje zelený list velmi složitou strukturu. Vykazuje všechny základní jevy: difuzní odrazivost, rozptyl a ohyb světla při průchodu listem, absorpci.

Dopadá-li na list v kolmém směru světlo o intenzitě  $I_0(\lambda)$ , lze pro prošlé světlo  $I_{vz}(\lambda)$  napsat výraz:

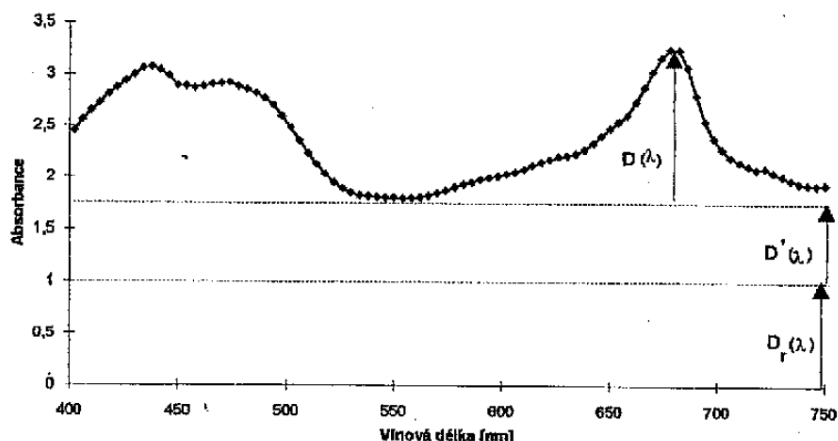
$$I_{vz}(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot [1 - R_D(\lambda)] \cdot 10^{-(A' + A)},$$

Kde  $R_D(\lambda)$  – difuzní odrazivost,  $A'$  - rozptylová konstanta,  $A$  – optická hustota (absorbance).

*Z Lambertova-Beerova zákona víme, že absorbance je:*

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) C x.$$

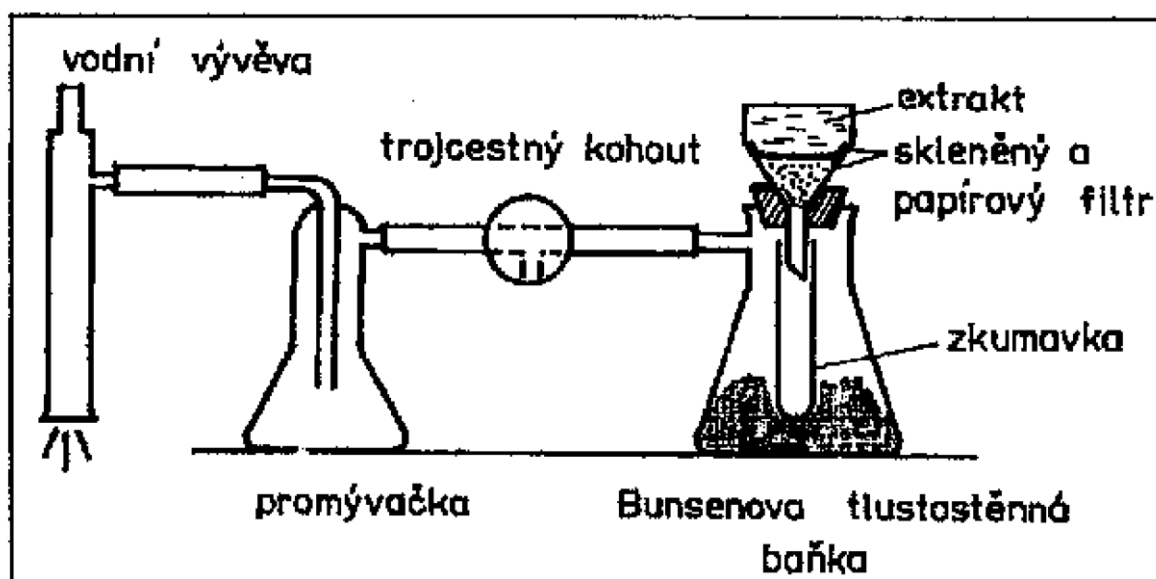
V tomto případě zanedbáváme odrazivost na druhé pokožce listu. Měřené spektrum A bude mít následující charakter (viz. obr. 1).



Obr. 1 . Spektrum absorbance zeleného listu (kde  $D=A$ )

Použijeme-li pro průměrnou hodnotu tloušťky listu  $x = 0,1$  mm a zjistíme-li nezávislým způsobem celkovou koncentraci chlorofylů ( $c_a + c_b$ ) pomocí extrakce do acetonu (viz. dále), lze z měření absorbance nalézt hodnotu  $\bar{\epsilon}(\lambda)$  průměrného molárního absorpčního koeficientu např. pro  $\lambda = 675$  nm, tj. v maximu absorpce listu. Takto získanou hodnotu  $\bar{\epsilon}(\lambda) \cdot x$  je pak možno použít pro daný typ listu pro přibližné stanovení chlorofylu z měření absorbance listu bez nutnosti přípravy extraktu.

Provedeme-li vakuovou infiltraci listu destilovanou vodou, zjistíme podstatné snížení velikosti “pozadí”, tj. “vylepšíme” optické vlastnosti listu. Infiltrace se provádí na stejné aparatuře jako na obr. 2, jen místo frity je zátka a segment je ve zkumavce s vodou v odsávače. Doba vakuové infiltrace je cca 20 minut při použití vodní vývěvy. Při použití olejové vyvěvy stačí cca 5 krát 10s (údaj na manometru by měl být okolo -0,9).

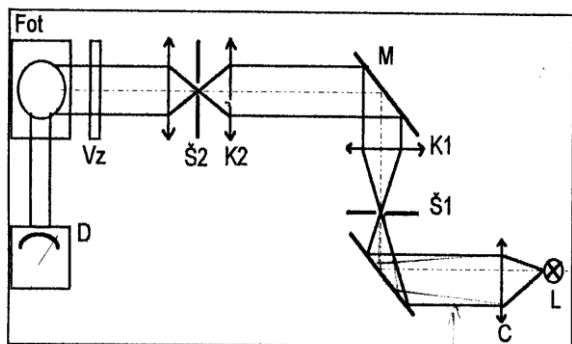


Obr. 2 . Schéma aparatury pro urychlenou filtraci.

## Jednopaprskový spektrofotometr:

### 1) Základní parametry přístroje SPEKOL 10

Spekol 10 je jednopaprskový spektrofotometr firmy Carl Zeiss, Jena, Německo (Obr. 3).



Obr. 3. Optické schéma spektrofotometru Spekol 10

- L – žárovka
- C – kondenzor
- K1, K2 – vstupní a výstupní kolimátory
- Š1, Š2 – vstupní a výstupní štěrbinu
- M – mřížka monochromátoru
- Vz – vzorek
- Fot – fotonky
- D – zdrojový a detekční systém

Optika přístroje je založena na skleněných spojných čočkách. Disperzním elementem je rovinná mřížka s 651 vrypy na mm. Rozsah vlnových délek je 340 – 850 nm. Relativní aperture 1 : 3,4. Štěrbinu monochromátoru jsou pevné o geometrické šířce ~ 1mm a spektrální šířce 11 nm. Z tohoto hlediska se jedná o opticky poměrně málo kvalitní spektrofotometr vhodný pro měření širokopásových absorbních spekter.

Detektory světla jsou dvě plynem plněné fotonky:

Typ 494 d – pro oblast 340 – 620 nm;

Typ 494 y – pro oblast 620 – 850 nm.

Fotonky jsou napájeny ze zdroje stabilizovaným stejnosměrným napětím – 96 V. Detekci proudu fotonkou zajišťuje stejnosměrný zesilovač se dvěma operačními zesilovači. Rozsah zesílení je 1 – 1000 x.

Výstup zesilovače je přiveden na ručkový mikroampérmetr, jehož stupnice je přímo kalibrována buď v propustnosti (0 – 100%) nebo absorpenci (0 – 2).

Celý přístroj je napojen na transformátor 220 V / 6 V. Naměření údaje přístroje je možno také převést na signal pro zapisovač pomocí konektoru na zadní straně přístroje (výstup 0 – 1 V). Spekoem 10 můžeme měřit T a A v kyvetách o optické délce 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 a 5 cm nebo přímo ve zkumavkách, dále lze měřit rozptyl světla pod úhlem 22° pomocí turbidimetrického nástave, odrazivost pod úhlem 45° (nástavec R 45/0) a 0° (nástavec Rd/0) a fluorescence (nástavec FK).

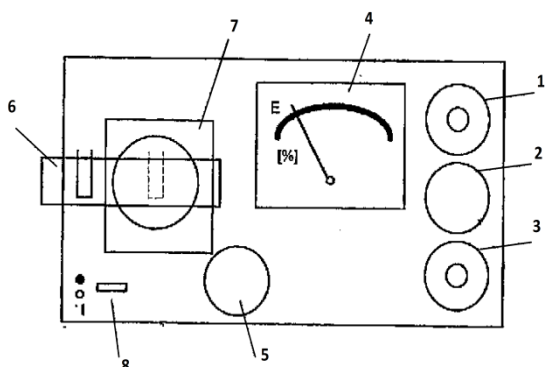
Součástí spektrofotometru je také vysokotlaká rtuťová výbojka HQE 40W připojená přes tlumivku určená pro kalibraci vlnových délek (viz.tab. 1), sada filtrů a soubor kyvet.

Tab. 1: Vlnové délky čárového spektra rtuťové výbojky HQE 40W ve viditelné oblasti

Číslo	Vlnová délka [nm]
1	365
2	404,7/407,8
3	435,8
4	546,1
5	577/579

## 2) Seřizování přístroje a měření

Propojení přístroje s transformátorem a fotonkou se provádí na zadní straně přístroje. Na přední straně Spekol 10 jsou umístěny ovládací a měřicí prvky (viz. obr. 4).



Obr. 4 . Přední panel přístroje Spekol 10

- 1 – nastavení nuly (s aretací)
- 2 – hrubé přepínání zesílení (1, 10 a 100)
- 3 – jemné zesílení (1 – 10)
- 4 – ukazatel naměřených hodnot (T a A)
- 5 – nastavení vlnové délky
- 6 – posuvný držák kyvet K1 a K2 (měřicí a srovnávací)
- 7 – nástavec s připevněnou fotonkou
- 8 – závěrka světla: ○ zavřená  
● otevřená napůl  
| otevřená

## Úkoly:

### A) Uvedení přístroje Spekol 10 do provozu:

Při uvádění přístroje do provozu je nutné provést následující kroky:

- 1) Zapnutí transformátoru
- 2) Seřízení optické soustavy spektrofotometru

Při sejmutém nástavci se na výstupní štěrbinu nasadí mléčné sklo a lampou se pomocí stavěcích šroubů posouvá vodorovně, svisle a do stran tak, aby vlákno žárovky bylo vidět zcela ostře a aby štěrbinu byla rovnoměrně zaplněná světlem. Je vhodné provádět toto nastavení na počátku práce dokud není kryt lampy ještě příliš horký. Místo mléčného skla se pak kolmo k štěrbině připevní nasazovací štěrbinu, přišroubuje příslušný nástavec a fotonky.

### 3) Nastavení nuly detekce

Při závěrném světle (poloha ○) přepneme zesílení na 1000x a knoflíkem 1 nastavíme na přístroji 0. Pak vrátíme zesílení do základní polohy (knoflík 2 na 1x, 3 na cca 1,10). **POZOR! Nikdy nenastavujeme regulator 3 (jemné zesílení) na hodnoty pod 1,10.** Změnu fotonek provádíme při 600 – 620 nm. Při této změně je nutné znovu nastavit nulu detekce.

### 4) Měření absorpčních spekter

Nejčastěji se užívá nástavec EK1 a kyvety 1 cm, které mají dvě protilehlé strany mléčné (zde se uchopují). Kyveta má objem cca 2 ml. Spektra se měří “bod po bodu”. Jednu (srovnávací) kyvetu naplníme čistým rozpouštědlem, druhou studovaným roztokem. Při zasunutí srovnávací kyvetě nastavíme pro danou vlnovou délku pomocí přepínačů zesílení “hrubě” a “jemně” propustnost 100%. Po výměně srovnávací kyvetu za měřenou odečteme na stupnici přímo přímo propustnost v procentech nebo jeho absorbanci. Pro každou vlnovou délku se postup opakuje.

## **B) Měření spektra absorbance zeleného listu**

## **C) Měření spektra absorbance infiltrovaného listu.**

Pro B i C použijeme primární list ječmene a odebereme studovanou část listu ( střední segment o délce cca 2 cm). Segment (B) vložíme do dřevěné kyvety nebo (C) nejprve infiltrujeme a změříme spektrum absorbance. Ve srovnávacím paprsku nepoužijeme nic (měří se proti vzduchu).

## **D) Měření spektra absorbance extraktu z listu.**

Použijeme primární list ječmene a odebereme studovanou část listu (střední segment o délce cca 2 cm). Změříme plochu listu  $P$  [ $\text{cm}^2$ ] a zjistíme čerstvou hmotnost  $m$  [g]. Segment s p59davkem  $\text{MgCO}_3$  (váže buněčné kyseliny a zabraňuje rozkladu chlorofylu na feofytin) rozetřeme v misce. Za stálého tření postupně přidáváme 80% aceton. Extrakt přefiltrujeme membránovým filtrem. Extrakt nevystavujeme světlu, protože na světle a v přítomnosti kyslíku dochází k nenávratné fotooxidaci chlorofylu a na feofytin.

Extrakt ze zelených částí rostlin obsahuje fotosyntetické pigmenty: chlorofyl a, chlorofyl b a směs karotenoidů (karoteny a xantofyly). Tyto mají v 80% acetonu dle Lichtenthalera et al. (1987) svá absorpční maxima při 430 a 663,2 nm, 453 a 646,8 nm a 470 nm. Pro provedení výpočtů koncentrací daných pigmentů použijeme Lichtenthalerovi rovnice:

$$C_a = 12,25 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{646,8} - A_{750})$$

$$C_b = 21,5 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \cdot (A_{663,2} - A_{750})$$

$$C_{a+b} = 7,15 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{646,8} - A_{750})$$

$$C_{a+b+c} = [1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot C_a - 85,02 \cdot C_b]/198$$

Tyto koncentrace jsou udávány v jednotkách [ $\text{mg.l}^{-1}$ ], popř. [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ].

Vztahujeme-li koncentraci na jednotku plochy  $P$ , pak snadno odvodíme:

$$C_p = (C_{a,b} \cdot V)/P,$$

kde  $C_{a,b}$  je koncentrace chlorofylů [ $\text{mg.l}^{-1}$ ],  $V$  je objem extraktu [l] a  $P$  je plocha [ $\text{cm}^2$ ]. Podobně odvodíme koncentraci chlorofylů vztaženou na čerstvou hmotnost listu.