

Návod k obsluze spektrofotometru UNICAM UV550

Tento návod slouží pro základní seznámení se spektrofotometrem Unicam UV550 a jeho obsluhou. Detailní popis veškerých možností spektrofotometru a zejména obslužných programů PRISM a Vision Pro je u k dispozici v Provozní příručce u samotného přístroje v laboratoři.

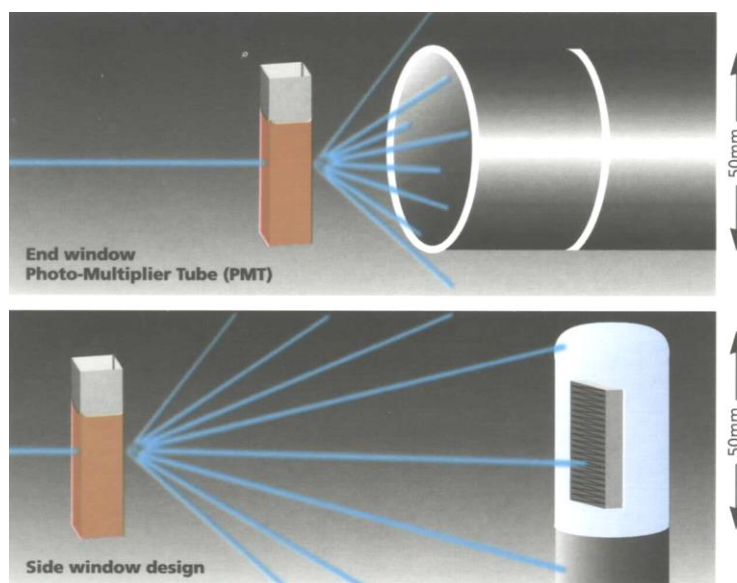
1. Základní charakteristika přístroje

UV550 je dvoupraskový skanovací spektrofotometr pro UV/VIS oblast spektra se zabudovaným ovládacím panelem. Spektrometr řídí integrovaný software PRISM pro lokální ovládání a program Vision Pro pracující pod operačním systémem Windows pro externí ovládání pomocí PC. Spojení s PC zajišťuje standardní výstup RS 232.

Rozsah vlnových délek 190-900 nm

Rozsah absorbance: $-3.0 - 6.0 A$

Detektor: speciální fotonásobič s koncovým oknem pro měření vysoce rozptylujících vzorků (viz obr. 1)



Obr. 1. Geometrie vzorek-detektor u klasických spektrofotometrů (dole) a u UV550 Unicam (nahore)

Spektrální šířka štěrby: 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 nm

Zdroje záření: deuteriová lampa pro měření v ultrafialové oblasti

halogenová žárovka pro měření ve viditelné oblasti

Přesnost nastavení vlnových délek: $\pm 0,3$ nm

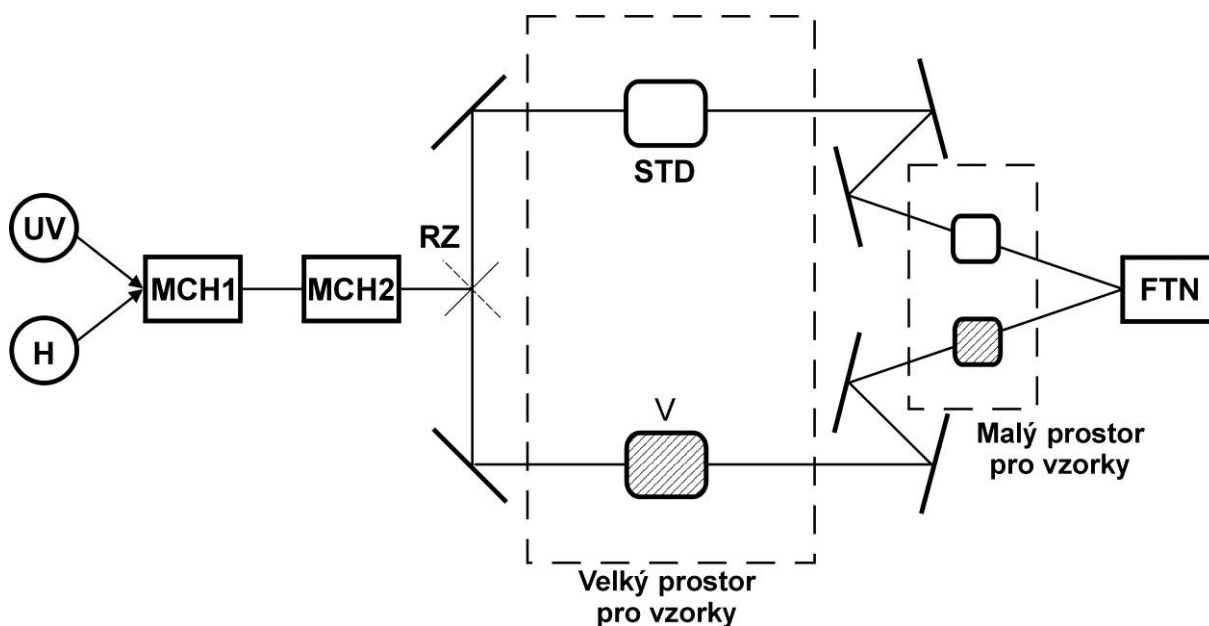
2. Princip činnosti dvoupraskového spektrofotometru

Oproti klasickým jednopaprskovým spektrofotometrům, kdy je třeba při měření měnit pro každou vlnovou délku měřený a srovnávací vzorek, probíhají v prostoru pro vzorky dvoupraprskového přístroje paprsky dva - měřicí a srovnávací. Do dráhy srovnávacího paprsku se vkládá standard (nejčastěji stejná kyveta s čistým rozpouštědlem), do dráhy měřicího svazku kyveta s měřeným vzorkem. Spektrofotometr pak vyhodnocuje podíl signálu, který je úměrný intenzitě dopadajícího měřicího svazku po průchodu měřeným vzorkem a signálu, který je úměrný intenzitě dopadajícího srovnávacího svazku po průchodu standardem. Výsledný podíl je přímo brán jako hodnota propustnosti vzorku. Hodnota absorbance pro vlnovou délku λ [$A(\lambda)$] se počítá ze změřené propustnosti $T(\lambda)$ podle vztahu

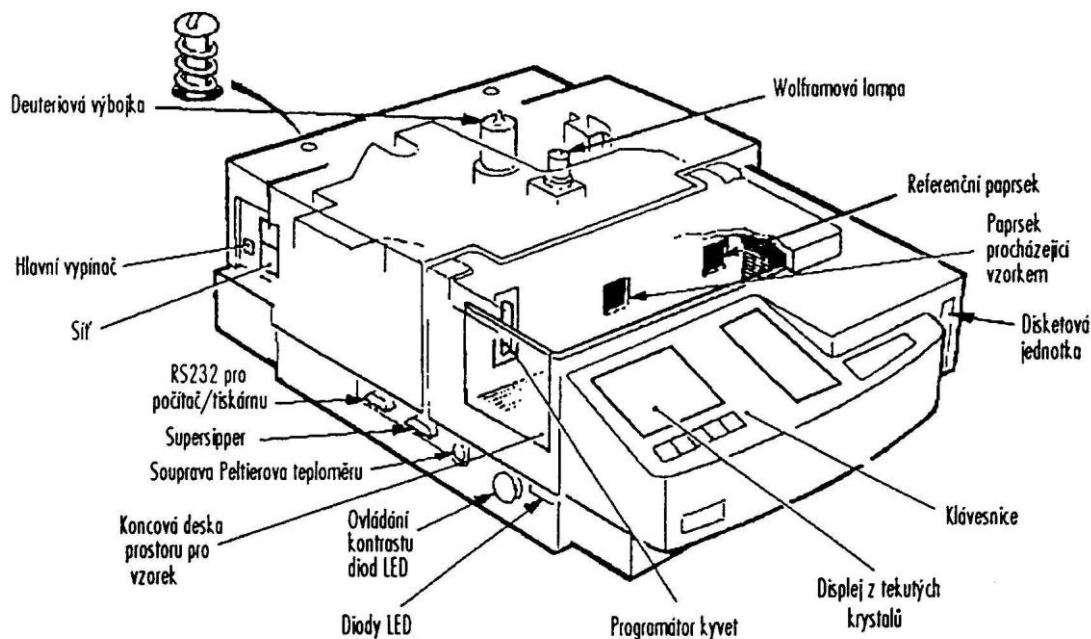
$$A(\lambda) = -\log T(\lambda)$$

Detailní teorie měření se zahrnutím spektrální přístrojové funkce je popsána v úkolu Základní parametry absorpčního spektra. Kromě zvýšení komfortu při měření se ve dvoupraprskovém uspořádání (oproti jednopaprskovým přístrojům) zlepšuje poměr signál/šum. U současných jednopaprskových přístrojů se toto poměrové měření řeší softwarově tj. nejdříve se změří spektrum standardu, uloží do paměti a pak se změří spektrum vzorku. Přístroj pak vypočte podíl obou naměřených spekter.

Zjednodušené blokové optické schéma dvoupraprskového spektrofotometru Unicam UV550 je uvedeno na obr. 2.



Obr. 2. Zjednodušené blokové optické schéma UV550. UV - deuteriová výbojka, H - halogenová žárovka, MCH1 - přidavný monochromátor, MCH2 - hlavní monochromátor, RZ – rotující zrcadlo, STD - prostor pro standard, V – vzorek, FTN – fotonásobič.



Obr. 3. Spektrofotometr Unicam UV550 a jeho hlavní komponenty

3. Externí ovládání spektrofotometru programem Vision Pro

Ovládací program pracuje pod operačním systémem Windows. Program poskytuje 3 hlavní aplikace: SCAN (pro měření spekter), FIXED (pro měření při zvolených vlnových délkách) a QUANT (pro kvantitativní analýzu).

Pomocí aplikace SCAN se měří spektra ve zvoleném rozmezí a rozlišení v rozsahu přístroje. K dispozici jsou možnosti provádění matematických operací se spektry (vyhlazení, sečtení, nalezení maxim atd.).

Aplikace FIXED umožňuje měřit absorbanci nebo transmitanci při kterékoliv vlnové délce v rozsahu přístroje. Může se měřit až při deseti vlnových délkách nebo se může měření při různých vlnových délkách sčítat, odečítat, násobit a dělit.

Aplikace QUANT umožňuje stanovení koncentrace analyzované látky ve vzorku změřením charakteristického maxima ve spektru. Quant poskytuje přímé odečítání koncentrace vzorků po kalibraci pomocí známých standardů. K dispozici je 5 režimů programu

1. „single“ – měření při jediné vlnové délce s kalibrací pomocí známých standardů
2. „reference lambda“ – totéž co „single“ ale navíc se provádí odečet hodnoty při referenční vlnové délce
3. „dual lambda“ - měření se provádí při 2 vlnových délkách
4. „peak height“ – měření se provádí v maximu a ve dvou vlnových délkách po stranách maxima pro kompenzaci nulové úrovně
5. „factor“ – nepoužívá se kalibrace pomocí standardů, ale výsledek se vynásobí vloženým faktorem

Pro všechny metody se používají stejné principy ovládání, kdy si uživatel sestaví metodu podle svých požadavků. Metodou se nastaví např. rozsah vlnových délek, spektrální šířka štěrbin atd. pro měření spektra. Jakmile je metoda vytvořena může dostat jméno a popis, může být uložena na disk.

Výsledky měření se shromažďují v datové paměti (Data Store) a prezentují se ve formě grafu nebo v tabulce. Výsledky mohou dostat jméno a popisy, mohou být uloženy na disk nebo exportovány do souboru.

Postup při spuštění a vypnutí přístroje

Nejprve zkontrolujte propojení počítače se spektrofotometrem, spusťte počítač a ovládací program Vision Pro. Poté spusťte spektrofotometr. Po spuštění spektrometr automaticky spustí iniciační procedury. Postup iniciace je vidět v okně programu. Po skončení iniciace se v základním okně Vision objeví další okna. Pro velmi přesná měření by měl být spektrofotometr v chodu alespoň 30 min s rozsvícenými zdroji světla, které jsou třeba pro měření.

Vypnutí přístroje: Po uložení naměřených dat nastavte v nabídce Command – režim Local Control (přepnutí na interní ovládání pomocí programu PRISM), počkejte až se na interním display UV550 objeví úvodní obrazovka a spektrometr vypněte.

Jak změřit absorpční spektrum

1. Zvolte aplikaci Scan v nabídce Application
2. Nastavte metodu měření spektra (postupně odshora dolů: datový mód – nejčastěji transmittance nebo absorbance; počáteční a konečnou vlnovou délku; spektrální šířku štěrbin; rychlost skanování v nm/min nebo tzv. Intelliscan s optimalizací rychlosti skanování podle tvaru spektra; datový interval v nm; vlnovou délku, při které se mění zdroj - UV lampa za halogenovou žárovku v intervalu 310 - 345 nm; počet cyklů; dobu cyklu a počet vzorků) nebo načtěte (Load) požadovanou metodu (Scan method) z disku.
3. Přejete-li si zaznamenat základní linii (Baseline) zvolte Baseline z lišty nástrojů okna Vision. Volba způsobí, že přístroj provede měření v rozsahu vlnových délek, při spektrální šířce štěrbin a dalších parametrech uvedených v aktuální metodě měření. Používá se k vykompenzování všech rozdílů mezi 2 paprsky procházejícími oběma drahami (měřící versus srovnávací svazek).
4. Spusťte Run z lišty nástrojů. Objeví se okno Present Sample (Aktuální vzorek). Přejete-li si editujte jméno vzorku (Name) a jeho popis (Description).
5. Stiskněte Proceed (Pokračovat) v okně Present Sample.
6. Program vytvoří okno Graph a vynáší spektrum vzorku tak, jak měření spektra postupuje.
7. Po změření spektra vzorku můžete pokračovat měřením dalších vzorků.
8. Údaje o naměřených spektrech jsou přidávány do zásobníku údajů (Data Store)

Pozn.: Měření spektra můžete kdykoliv přerušit zvolením Stop na liště nástrojů.

V Data Store je seznam všech údajů změřených dat, které jsou v systému aktivní (aktuálně změřená nebo načtená z disku). Seznam se skládá z dávek (Batch) – všechny data z jedné analýzy, jednotlivých vzorků (Samples) – jednotlivé složky dávky (max. 999) a cyklů (Cycles) - opakovaná měření stejného vzorku (max. 20).

Se spektry v zásobníku údajů (Data Store) se mohou provádět rozsáhlé manipulace pomocí voleb z nabídky Maths (Matematika) – normalizace, sčítání odečítání atd.

Údaje ze zásobníku dat (Data Store) se mohou přenést a (přetáhnout a spustit) do okna Graph nebo kteréhokoliv okna Maths (matematika) pomocí levého tlačítka myši. Je možné přetahovat i soubory přímo z Průzkumníka systému Windows.

Jak měřit při zvolených vlnových délkách

1. Zvolte aplikaci Fixed v nabídce Application
2. Sestavte metodu Fixed (postupně odshora dolů: vlnové délky (max. 10); datový mód – nejčastěji transmittance nebo absorbance; režim měření - nejčastěji Normal, dobu integrace; vlnovou délku, při které se mění zdroj UV lampa za halogenovou žárovku v intervalu 310 - 345 nm; spektrální šířku štěrbin; počet cyklů; dobu cyklu a počet vzorků) nebo načtete (Load) požadovanou metodu (Scan method) z disku.
3. Přejete-li si zaznamenat základní hodnotu (Zero) zvolte Zero z lišty nástrojů okna Vision. Volba způsobí, že přístroj provede měření pro dané vlnové délky a dalších parametry uvedené v aktuální metodě měření. Používá se k vykompenzování všech rozdílů mezi 2 paprsky procházejícími oběma drahami (měřící versus srovnávací svazek).
4. Spustíte Run z lišty nástrojů. Objeví se okno Present Sample (Současný vzorek). Přejete-li si, editujte jméno vzorku (Name) a jeho popis (Description).
5. Stiskněte Proceed (Pokračovat) v okně Present Sample
6. Program vytvoří okno Tabulka výsledků a vynáší naměřené hodnoty vzorku tak, jak měření postupuje.
7. Po změření vzorku můžete pokračovat měřením dalších vzorků.
8. Údaje o naměřených spektrech jsou přidávány do zásobníku údajů (Data Store)

LITERATURA

Provozní příručka k spektrofotometru UNICAM UV550.

Základní parametry absorpčního spektra, vliv přístrojové funkce (spektrální šířky štěrbin), vliv polohy kyvety a vlastní fluorescence vzorku

A. ZADÁNÍ

1. Naučte se ovládat spektrofotometr Unicam UV550 (způsoby ovládání, možnosti měření, volba parametrů měření) (viz Návod k obsluze spektrofotometru Unicam UV550) a uveďte spektrometr do provozu.
2. Změřte závislost spektrální šířky interferenčního filtru pro různé spektrální šířky měřicího svazku a výsledky diskutujte. Změřte spektrum propustnosti benzenových par pro různé spektrální šířky měřicího svazku a výsledky diskutujte.
3. Proveďte měření absorpčního spektra pigmentového extraktu v 80% acetonu. Vzorek umístěte do vzorkového prostoru dále od fotonásobiče a do vzorkového prostoru blízko fotonásobiče. Diskutujte odlišnosti v naměřených spektrech.

B. SEZNAM POMŮCEK

1. Přístrojové vybavení: spektrofotometr Unicam UV550 (ThermoSpectronic, Anglie)
2. Ostatní potřeby: interferenční filtr, pigmentový extrakt z listu, aceton, kyvety a další běžné laboratorní pomůcky

C. TEORIE

Absorpční spektra látek v UV-VIS oblasti spektra

Ultrafialová a viditelná spektra odpovídají změnám elektronového stavu molekuly. Jestliže molekula absorbuje energii, vybudí se ze základního do excitovaného stavu. Excitacemi, při kterých přechází elektron z jedné elektronové hladiny na druhou, se zabývá elektronová absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS).

Chromofory jsou skupiny atomů v molekule, ve kterých při dopadu záření s vlnovou délkou 200 - 1000 nm přecházejí elektrony do antivazebných orbitalů (s hvězdičkou). Molekuly se stejnými chromofory mají i podobné absorpční spektrum. Přítomnost určitých skupin v blízkosti chromoforu, tzv. auxochromů (-OH, -O-CH₃, -NH₂, -NHR), může ovlivnit průběh spektra tak, že se absorpční maxima posunou k větší nebo menší vlnové délce, což je obvykle provázeno zvýšením nebo snížením absorpce. Podle funkce se v molekule rozlišují tři typy elektronů - σ , π a nevazebné elektrony n . Podílejí se na elektronových přechodech označených jako:

1. $\pi \rightarrow \pi^*$. Vyskytují se v látkách s násobnými vazbami.
2. $n \rightarrow \pi^*$. Setkáváme se s nimi v látkách s heteroatomy vázanými násobnou vazbou, např. C=O, C=S, N=O.
3. $n \rightarrow \sigma^*$. Lze je pozorovat v některých nasycených aminech a v molekulách obsahujících Br, I, S.
4. $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Přechody elektronů na všech jednoduchých vazbách. Dochází k nim však ve vzdálené UV oblasti ($\lambda < 180$ nm).

Ultrafialová spektra se měří v křemenných kyvetách (tavený SiO_2) a jako rozpouštědlo se nejčastěji používá voda, resp. pufrý (pro anorganické látky, resp. aminokyseliny, peptidy, bílkoviny a nukleové kyseliny) nebo methanol, ethanol, heptan, hexan, acetonitril, dioxan či cyklohexan pro organické látky. Rozpouštědlo obecně tlumí absorpční schopnost chromoforu, a to tím víc, čím polárnější charakter mají jeho molekuly. Polární rozpouštědlo (ethanol) uděluje často absorpčním pásům difúzní charakter, popřípadě způsobuje splývání blízkých pásů. Proto je výhodné měřit UV spektrum jak v polárním tak nepolárním rozpouštědle.

Ve srovnání s infračervenými spektry jsou UV spektra mnohem jednodušší. Skládají se z jednoho nebo několika absorpčních pásů, daných přítomností určitých chromoforů v molekule, a proto spektra sloučenin majících různou strukturu, ale stejné chromofory, jsou si podobná. V literatuře [1] a [2] jsou podrobně popsána UV spektra organických látek, absorpční spektra jednotlivých chromoforů a obecné zákonitosti vlivu jednotlivých auxochromů (substituent nebo skupina atomů s volným elektronovým párem (např. $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$)) na absorpci různých chromoforů.

Aminokyseliny a proteiny

UV spektrum proteinů je sumou spekter aminokyselin, ze kterých se skládá. Ačkoliv jsou bílkoviny polyamidové kondenzované polymery mající intenzivní absorpční pás při 190 nm (charakteristický pro amidové skupiny), tato oblast se většinou nevyužívá. Při detekci bílkovin se měří absorpce při 280 nm, která charakterizuje chromofory bočních skupin řetězce, a to aminokyselin tyrosinu ($\epsilon \cong 2000 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a tryptofanu ($\epsilon \cong 4500 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Fenylalanin absorbuje při vlnové délce 260 nm ($\epsilon \cong 200 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), disulfidová skupina cystinu při 240 nm. Pro rychlé stanovení obsahu bílkovin se předpokládá, že jedna jednotka absorbance v kyvetě s optickou dráhou 1 cm odpovídá pro většinu globulárních bílkovin koncentraci 0,5 - 2 mg.ml^{-1} . Mimo to existuje několik přesnějších empirických vzorců pro stanovení koncentrace bílkovin v roztoku [1], jejichž výpočet vychází z absorbance při dvou vlnových délkách (205, 215, 235 nebo 280 nm).

Nukleosidy, nukleotidy a nukleové kyseliny

Přítomnost pyrimidinových anebo purinových bází ve všech nukleosidech způsobuje silnou absorpci v oblasti vlnových délek 240 - 270 nm. Tento poznatek se běžně využívá k detekci přítomnosti nukleových kyselin. Na rozdíl od proteinů (280 nm) se měří při vlnové délce zhruba 254 až 260 nm a použitím empirických korekčních faktorů lze vypočítat přibližnou koncentraci nukleové kyseliny. Molární absorpční koeficient ϵ se pro jednotlivé nukleotidy při $\lambda = 260 \text{ nm}$ pohybuje [1] v rozmezí 9200 - 15400 $\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Optické filtry

Filtry představují jednoduchý a levný (ve srovnání s monochromátory) prostředek k získání "monochromatického" světla.

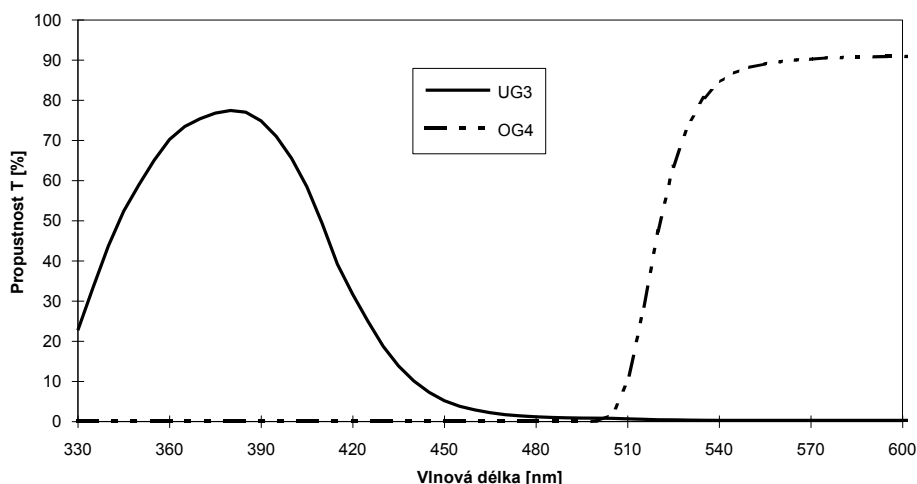
Pro optickou spektroskopii používáme 3 základní druhy filtrů:

a) Pásové filtry

Propouštějí světlo v široké oblasti spektra, obvykle s pološířkou 50 nm a více a s maximem propustnosti nad 90 % (obr. 1). Používají se na vymezení požadované části optického spektra.

b) Hranové filtry

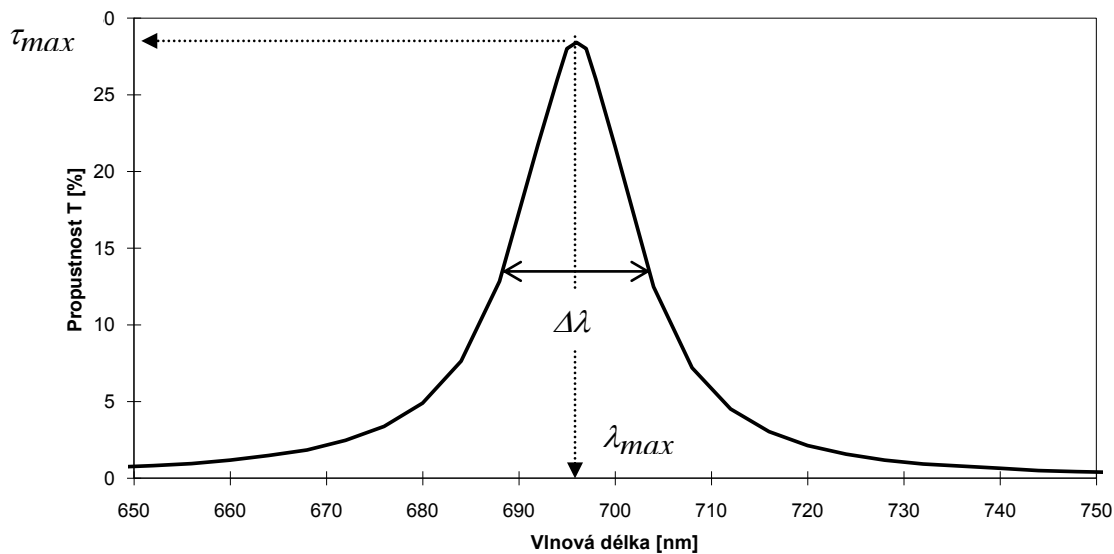
Propouštějí světlo od určité vlnové délky, tzv. hrany, obvykle až do konce viditelného spektra nebo naopak propouštějí světlo až do určité vlnové délky. Maximum propustnosti bývá nad 90 % (viz obr. 1). Tyto filtry bývají charakterizovány vlnovou délkou, při které mají 50 % propustnost.



Obr. 1. Spektrum propustnosti pásového (UG3) a hranového (OG4) filtru

c) Interferenční filtry

Interferenční filtry mají spektrálně úzký pás propustnosti. Bývá charakterizován vlnovou délkou maximální propustnosti λ_{\max} , hodnotou propustnosti pro λ_{\max} - τ_{\max} - a pološířkou $\Delta\lambda$ - spektrální šířka na úrovni propustnosti $\tau_{\max}/2$ (obvykle 5 - 15 nm) (obr. 3). Tyto filtry jsou tvořeny tenkou planparalelní vrstvou, na jejímž povrchu jsou napařeny tenké polopropustné (obvykle kovové) reflexní vrstvy. Na těchto vrstvách dochází k interferenci mnoha svazků. Po průchodu takovou vrstvou jsou potlačeny všechny vlnové délky, které nesplňují podmínku pro vznik interferenčních maxim. Interferenčním maximům různých řádů odpovídají různá pásma propustnosti. Aby se odstranila nežádoucí maxima, doplňují se interferenční filtry pásovými. **Poloha pásu propustnosti interferenčních filtrů závisí na úhlu dopadu paprsků.** Proto se interferenční filtry používají jen pro svazek kolmý na rovinu filtru. Vlastnosti interferenčních filtrů závisí jednak na řádu používaného interferenčního maxima, jednak na odrazivosti a absorpci reflexních vrstev. Se stříbrnými reflexními vrstvami lze pro 1. řád interference dosáhnout hodnot $\tau_{\max} \cong 0,4$ a $\Delta\lambda \cong 10$ nm; pro 2. řád interference $\tau_{\max} \cong 0,25$ a $\Delta\lambda \cong 6$ nm. Použitím mnohonásobných dielektrických reflexních vrstev lze dosáhnout hodnot $\tau_{\max} \cong 0,9$ a $\Delta\lambda \cong 1$ nm.



Obr. 2. Spektrum propustnosti interferenčního filtru s pološířkou $\Delta\lambda$ a maximální propustností τ_{max}

Vliv přístrojové funkce (spektrální šířky štěrbin) na tvar měřených spekter

Jelikož nelze provádět měření absorpčních spekter svazkem o nekonečně malé spektrální šířce je výsledné naměřené spektrum vždy do určité míry zkreslené. Míra zkreslení je dána poměrem mezi spektrální šířkou měřeného pásu ($\Delta\lambda$) a spektrální šířkou měřícího světelného svazku ($\Delta\lambda_m$) **V praxi by při měření absorpčních pásů mělo být dodrženo pravidlo, že $\Delta\lambda/\Delta\lambda_m$ by mělo větší než 5.** Pro nižší hodnoty poměru je měřený absorpční pás již výrazně nižší a širší než ve skutečnosti.

Přístrojová funkce – teorie (nepovinné):

Při zanedbání prostorové diferenciaci měřeného svazku je měřené spektrum obecně konvolucí ideálního spektra a symetrické spektrální přístrojové funkce $h(\underline{\lambda}, \lambda)$, pro kterou platí $\int h(\underline{\lambda}, \lambda) d\lambda = 1$ (viz [1]). Spektrální přístrojová funkce je vlastně normovaným spektrem měřícího světelného svazku se středem při vlnové délce $\underline{\lambda}$.

Pro případ dvoupráskového spektrofotometru lze odvodit vztah pro propustnost vzorku následujícím způsobem.

Pro intenzitu světla procházející vzorkem platí

$$I_m(\underline{\lambda}) = \int I_0(\lambda) 10^{-\varepsilon(\lambda)cl} h(\underline{\lambda}, \lambda) d\lambda \quad (1)$$

což je konvoluce $h(\underline{\lambda}, \lambda)$ a spektra intenzity prošlého světla $I_0(\lambda) 10^{-\varepsilon(\lambda)cl}$ podle Lambert-Beerova zákona ($I_0(\lambda)$ je intenzita dopadajícího světla, c je koncentrace látky a l je tloušťka vzorku). Intenzita světla v referenčním svazku je pak

$$I_r(\underline{\lambda}) = \int I_0(\lambda) h(\underline{\lambda}, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

Dvoupaprskový spektrofotometr vyhodnocuje propustnost vzorku $T_m(\lambda)$ jako podíl signálů úměrných $I_m(\lambda)$ a $I_r(\lambda)$. Pro $T_m(\lambda)$ pak lze psát konečný vztah

$$T_m(\lambda) = \frac{\int I_0(\lambda) 10^{-\varepsilon(\lambda)cl} h(\lambda, \lambda) d\lambda}{\int I_0(\lambda) h(\lambda, \lambda) d\lambda} \quad (3)$$

Pro $h(\lambda, \lambda)$ ve tvaru δ -funkce (nekonečně úzký spektrální pás jednotkové plochy) má rovnice (3) jednoduchý tvar

$$T_m(\lambda) = 10^{-\varepsilon(\lambda)cl} \quad (4)$$

a představuje *ideální spektrum propustnosti* nezkreslené spektrální přístrojovou funkcí. Reálné funkce $h(\lambda, \lambda)$ spektrofotometrů mají obvykle tvar podobný Gaussovým nebo Lorenzovým křivkám.

D. LITERATURA

- [1] Ferenčík M., Škárka B. a kol.: Biochemické laboratorne metódy. ALFA, Bratislava, SNTL, Praha 1981.
- [2] Červinka O., Dědek V., Ferles M.: Organická chemie. SNTL Praha, ALFA Bratislava 1980.
- [3] Klimovič J.: Praktikum chemické fyziky. SPN Praha, 1980 (skriptum MFF UK).

Analýza směsi tří typů látek - směs fotosyntetických pigmentů z listu v acetonovém extraktu

A. ZADÁNÍ

1. Proveďte extrakci pigmentů ze segmentu listu ječmene v 80% acetonu a zaznamenejte výsledný objem roztoku, zaznamenejte plochu a čerstvou plochu segmentu.
2. Změřte absorpční spektrum pigmentového extraktu ve viditelné oblasti spektra a určete koncentraci chlorofylů *a* a *b* a sumární koncentraci karotenoidů v extraktu na plochu a čerstvou hmotnost.
3. Stanovte koncentrace v různých segmentech různých listů.

B. SEZNAM POMŮCEK

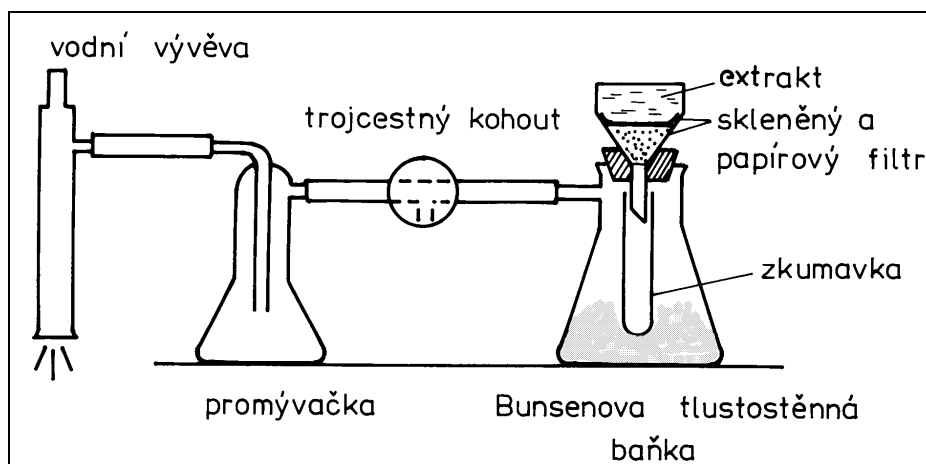
1. Přístrojové vybavení: spektrofotometr UV550 (Unicam, Anglie), odstředivka, olejová vývěva, předvážky.
2. Rostlinný materiál: předpěstovaný ječmen jarní (*Hordeum vulgare*)
3. Ostatní potřeby: aparatura na urychlenou filtraci (vodní vývěva, promývačka, skleněná nálevka s fritou), třecí miska, kalibrovaná zkumavka, filtrační papír, aceton, $MgCO_3$, průhledný milimetrový papír, homogenní tvrdý papír

C. PRINCIP METODY

Extrakce fotosyntetických pigmentů ze zelených listů

Obsah pigmentů vztažený na jednotkovou plochu listu C_P , na jednotkovou hmotnost sušiny C_S nebo na jednotkovou hmotnost čerstvého pletiva $C_Č$, závisí na vyšetřovaném místě daného listu. Proto je užitečné pro charakterizaci lokálních hodnot použít následující mikrometodu.

Odebereme studovanou část listu (u ječmene segment o délce cca 2 cm), zjistíme jeho čerstvou hmotnost $m_Č$ [g] a plochu P [cm²]. Segment s přídavkem špetky $MgCO_3$, který váže buněčné kyseliny a zabraňuje přeměně chlorofylů na feofytiny, roztřeme v třecí misce. Za stálého tření postupně přidáváme 80% aceton. Extrakt přefiltrujeme v aparatuře pro usnadněnou filtraci (obr. 1).

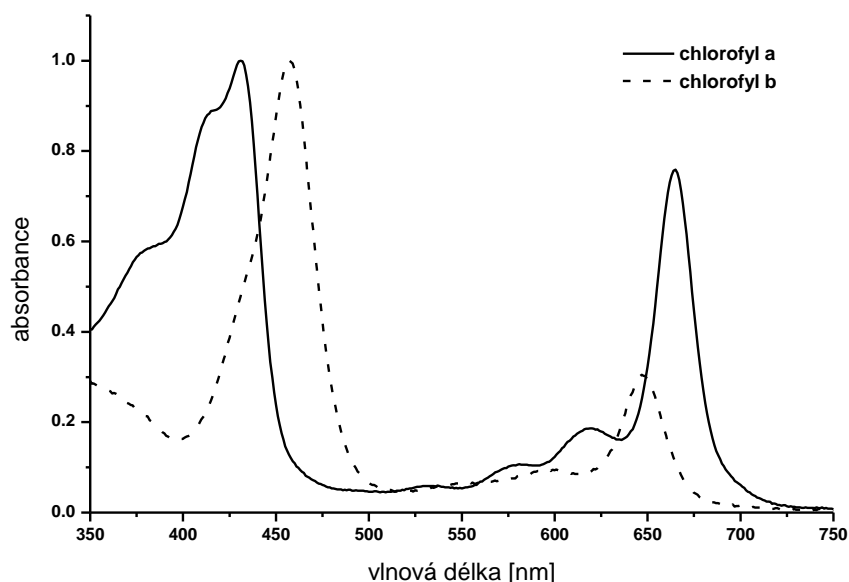


Obr. 1. Schéma aparatury pro urychlenou filtraci

Na skleněnou fritu položíme kruhový papírový filtr navlhčený acetonem. Extrakt (cca 5 ml) jímáme do kalibrované zkumavky a výsledný objem přesně odečteme. Alternativním postupem je odstředění extraktu 5 minut při přetížení 4500 g. Je třeba dávat pozor na dobré uzavření centrifugačních kyvet!

Extrakt pokud možno nevystavujeme světlu, protože na světle v přítomnosti O₂ dochází k nevratné fotooxidaci chlorofylu (viz úkol Studium pomalé fotochemické reakce - rozkladu pigmentů pod vlivem světla).

Extrakt fotosyntetických pigmentů ze zelených částí vyšších rostlin obsahuje zejména chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a směs karotenoidů (β -karoten a xantofyly).



Obr. 2. Absorpční spektra chlorofylu *a* a *b* v 80 % acetonu, normalizovaná na absorpční maximum. Chlorofyly byly izolovány pomocí tenkovrstevné chromatografie.

Použití absorpčního spektra pigmentového extraktu pro analytické účely

Absorpční spektra chlorofylu *a* a *b* a v 80 % acetonu izolovaných z listů ječmene jarního jsou na obr. 2. Karotenoidy mají navzájem velmi podobná absorpční spektra se 3 charakteristickými pásy v Soretově oblasti spektra. Ve spektrální oblasti nad 600 nm karotenoidy prakticky neabsorbují. Absorpční spektrum pigmentového extraktu v oblasti 600 – 800 nm je určováno prakticky výhradně chlorofylem *a* a chlorofyl *b*.

Pro zjištění zastoupení chlorofylu *a*, *b* a sumy karotenoidů v acetonovém extraktu se používá měření absorbance na vybraných vlnových délkách.

Podle literatury (Lichtenthaler 1987) má chlorofyl *a* v 80% acetonu absorpční maximum při 663,2 nm. Jeho specifický absorpční koeficient při této vlnové délce je

$\varepsilon_a(663,2) = 86,3 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Chlorofyl *b* má maximum u 646,8 nm a $\varepsilon_b(646,8) = 49,18 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (obr. 2).

Změříme-li tedy optické hustoty (absorbance) pro dvě vlnové délky $\lambda_1 = 663,2 \text{ nm}$ a $\lambda_2 = 646,8 \text{ nm}$ pak platí:

$$D(\lambda_1) = \varepsilon_a(\lambda_1) \cdot C_a \cdot t' + \varepsilon_b(\lambda_1) \cdot C_b \cdot t'$$

$$D(\lambda_2) = \varepsilon_a(\lambda_2) \cdot C_a \cdot t' + \varepsilon_b(\lambda_2) \cdot C_b \cdot t'$$

kde t' – délka optické dráhy v kyvetě.

$$\varepsilon_a(646,8) = 20,49 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_b(663,2) = 11,20 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Dle pravidel lineární algebry:

$$C_a = \frac{\det a}{\det}, \quad C_b = \frac{\det b}{\det}.$$

Po provedení příslušných výpočtů dostaneme:

$$C_a = 12,25 \cdot D(663,2) - 2,76 \cdot D(646,8) \quad \text{koncentrace chlorofylu } a,$$

$$C_b = 21,50 \cdot D(646,8) - 5,10 \cdot D(663,2) \quad \text{koncentrace chlorofylu } b,$$

$$C_{a+b} = 7,15 \cdot D(663,2) + 18,71 \cdot D(646,8) \quad \text{celková koncentrace chlorofylu } a+b$$

Tyto koncentrace jsou udávány v jednotkách $[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$, popř. $[\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$. Pro převod na jednotky $[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ použijeme molekulové hmotnosti $M_{(\text{chl } a)} = 893$, $M_{(\text{chl } b)} = 907$.

Vztahujeme-li koncentraci chlorofylů na jednotku plochy P (tj. C_P), pak snadno odvodíme:

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

Díky výraznému překryvu absorpčních spekter jednotlivých karotenoidů, jejich absorpčních koeficientů a navíc díky jejich překryvu s absorpcí chlorofylů v Soretově oblasti spektra nelze absorpční spektrum pigmentového extraktu použít ke stanovení koncentrace jednotlivých karotenoidů. Absorpčního spektra lze však použít k poměrně přesnému stanovení celkového množství karotenoidů v extraktu. Hlavní absorpční maximum jednotlivých karotenoidů (prostřední pás) se vyskytuje kolem 440 nm. Při této vlnové délce silně absorbují také chlorofyly (obr. 2) a proto se pro stanovování celkového množství karotenoidů používá absorbance v oblasti dlouhovlnnějšího absorpčního pásu karotenoidů tj. při 470 nm, kde chlorofyl *a* prakticky neabsorbuje a chlorofyl *b* absorbuje jen částečně. Hodnota absorpčního koeficientu pro celkové množství karotenoidů v 80 % acetonu při 470 nm byla vypočítána z průměrného relativního zastoupení karotenoidů v zelených listech a známých absorpčních koeficientů jednotlivých karotenoidů (Lichtenthaler 1987). Celková koncentrace karotenoidů v extraktu se vypočítá podle vztahu:

$$C_{\text{kar}} = (1000 \cdot D(470) - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

Tato koncentrace je udávány opět v jednotkách [mg.l⁻¹], popř. [μg.ml⁻¹].

4. LITERATURA

Lichtenthaler H.K.: Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382 (1987).

Studium pomalé fotochemické reakce - rozkladu chlorofylu *a* pod vlivem světla

A. ZADÁNÍ

1. Změřte absorpční spektrum roztoku chlorofylu *a* v 80 % acetonu ve spektrálním rozsahu 350 – 750 nm. Volte takovou koncentraci chlorofylu *a*, aby absorbance v maximu v červené oblasti spektra byla kolem hodnoty 1. K roztoku chlorofylu přikápněte kapku 1 zředěné HCl, protřepejte a opět změřte absorpční spektrum. Diskutujte změnu ve spektru.
2. Exponujte acetonový roztok chlorofylu *a* při ozáření 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR, tj. ve spektrální oblasti 400 – 700 nm) po různou dobu (1, 2, 4, 8, 16 min). K ozařování použijte „studený“ zdroj světla KL 1500 (Zeiss, Německo) se světlovodnými kabely. Ozáření měřte pomocí integrálního radiometru LICOR LI-189 s kvantovým detektorem LI-1000 (LICOR, U.S.A.).
3. Diskutujte změny ve spektrech a vyhodnoťte závislost absorbance acetonového roztoku chlorofylu *a* a degradačních produktů při 663 nm na době ozařování.

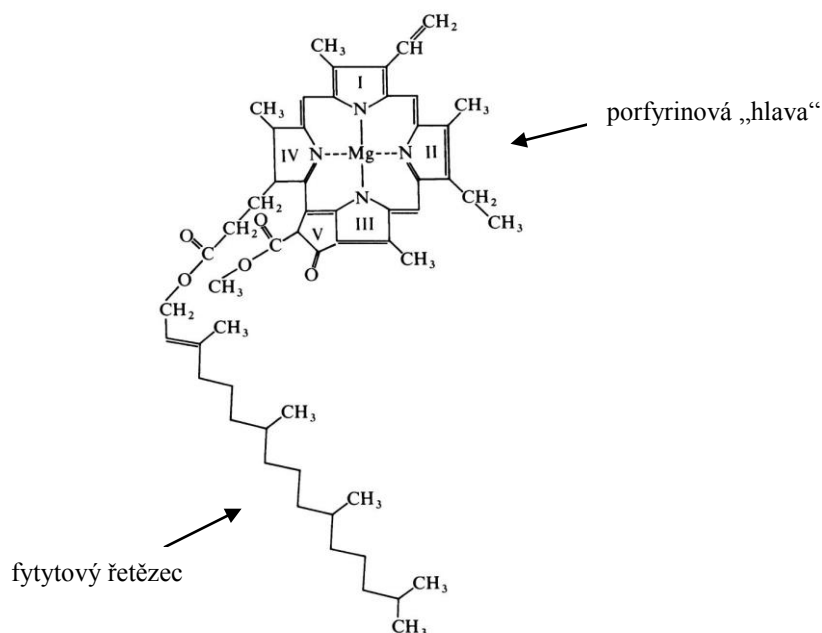
B. SEZNAM POMŮCEK

1. Přístroje: spektrofotometr UV550 (Unicam, Anglie), integrální radiometr LI-189 s kvantovým detektorem LI-1000 (LICOR, U.S.A.)
2. Materiál: vysušený chlorofyl *a* izolovaný z listů ječmene pomocí tenkovrstevné chromatografie
3. Ostatní potřeby: aceton, kyvety, stojan, automatické pipety, běžné laboratorní pomůcky.

C. TEORIE

Chlorofyl *a* je dihydroporfyrin s koordinačně vázaným Mg^{2+} v centru porfyrinového skeletu („hlavy“). K hydrofilní „hlavě“ je navázán hydrofóbní (lipofilní) fytol (Obr. 1). U molekul chlorofylu *a* převládá lipofilní charakter, takže je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech (aceton, etanol, metanol, éter, benzen, ...).

Chlorofyl *a* je snadno degradovatelný. Slabými alkoholovými roztoky hydroxidů alkalických kovů se odštěpuje fytol za vzniku chlorofylidu *a*. Působením slabých kyselin se uvolňuje z chlorofylu *a* uvolňuje centrální Mg^{2+} a vzniká feofytin *a*. Silné kyseliny destrukují porfyrinovou „hlavu“ molekuly. K nevratné destrukci porfyrinového skeletu dochází i při dlouhodobém intenzivním osvětlování roztoku chlorofylu *a* v přítomnosti oxidantů. K pozvolným strukturálním změnám dochází i na slabém světle fotooxidací vzdušným kyslíkem rozpuštěným v roztoku. V rostlinách za normálních podmínek je degradace chlorofylů řízena enzymaticky.

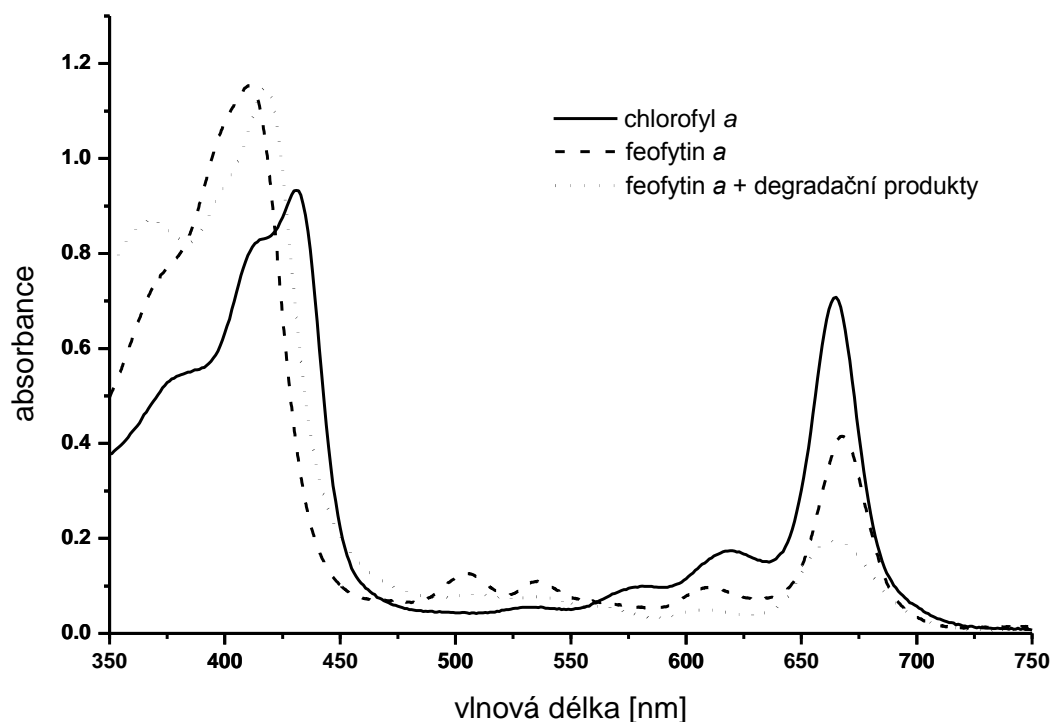


Obr. 1. Struktura molekuly chlorofylu *a*

Absorpční spektrum chlorofylu *a* má 2 hlavní pásy v červené a modré oblasti spektra odpovídající elektronovým přechodům $S_0 - S_1$ a $S_0 - S_{3(4)}$. Protože fytylový řetězec molekuly chlorofylu *a* neovlivňuje elektronové stavy delokalizovaných elektronů porfyrinového skeletu má chlorofylid *a* (chlorofyl *a* bez fytylu) stejné absorpční spektrum jako chlorofyl *a*. Absorpční spektrum feofytinu *a* je charakteristické zejména krátkovlnějším hlavním maximem v Soretově oblasti spektra a dvěma poměrně intenzivními pásy v oblasti 500 – 550 nm (viz obr. 2 a tab. 1). Degradací produkty chlorofylu *a* bez porfyrinového skeletu postrádají absorpční pásy v červené oblasti spektra a intenzivně absorbují zejména v oblasti pod 400 nm. Roztok s degradačními produkty chlorofylu je tedy zbarven dohněda.

přechod	maximum [nm]	mol. extinkční koef. ϵ [$l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
<i>chlorofyl a</i>		
Q_y 0-0 ($S_0 - S_1$)	663,2	$77,07 \cdot 10^3$
Q_y 0-1	618,2	$13,53 \cdot 10^3$
Q_x 0-0 ($S_0 - S_2$)	582,4	$9,24 \cdot 10^3$
$B_{x(y)}$ 0-0 ($S_0 - S_{3(4)}$)	431,2	$85,57 \cdot 10^3$
<i>feofytin a</i>		
Q_y 0-0 ($S_0 - S_1$)	665,4	$45,19 \cdot 10^3$
Q_y 0-1	608,2	$8,53 \cdot 10^3$
?	535,8	$10,23 \cdot 10^3$
?	506,2	$10,55 \cdot 10^3$
$B_{x(y)}$ 0-0 ($S_0 - S_{3(4)}$)	411,0	$106,64 \cdot 10^3$

Tab. 1. Vlnové délky hlavních absorpčních maxim chlorofylu *a* a feofytinu *a* v 80 % acetonu (podle Lichtenthaler 1987)



Obr. 3. Absorpční spektrum chlorofylu a a jeho degradačních produktů v 80 % acetonu. Vzorek s feofytinem a byl vytvořen přidáním kapky zředěné HCl ke vzorku s chlorofylem a. Vzorek s degradačními produkty feofytinu a byl vytvořen přidáním kapky koncentrované HCl ke vzorku s feofytinem a. Chlorofyl a byl izolován z listů ječmene jarního pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC).

D. LITERATURA

- Lichtenthaler H.K.: Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382 (1987).
 Kaplanová M. a kol.: Fyzikální základy fotosyntézy. SPN 1987, Praha.

Absorpční spektra různých vrstev listů ve viditelné a UV-oblasti - ochranná role UV-filtrujících pigmentů

A. ZADÁNÍ

1. Změřte absorpční spektrum listu s výraznou kutikulární vrstvou (list fikus, begonie apod.) ve vzorkovém prostoru blíže fotonásobiči a ve standardním vzorkovém prostoru dále od fotonásobiče a diskutujte jejich rozdíly.
2. Změřte absorpční spektrum svrchní vrstvy listu (epidermis) pečlivě odřezané žiletkou ve vzorkovém prostoru blíže fotonásobiče a porovnejte s absorpčním spektrem listu. Zaměřte se na změny v UV oblasti.

B. SEZNAM POMŮCEK

3. Přístrojové vybavení: spektrofotometr UV550 (Unicam, Anglie)
4. Rostlinný materiál: listy v fikus nebo begonie
5. Ostatní potřeby: žiletka, křemenná kyveta, izolepa a další běžné laboratorní pomůcky

C. TEORIE

Porušování ozónové vrstvy Země vede ke zvýšení intenzity ultrafialového záření zejména složky UV-B (280-320 nm), která nepříznivě ovlivňuje všechny formy života na Zemi. Zvýšená intenzita UV-B záření má za následek zvýšenou produkci volných radikálů, které ničí proteiny i DNA v exponovaných buňkách rostlin.

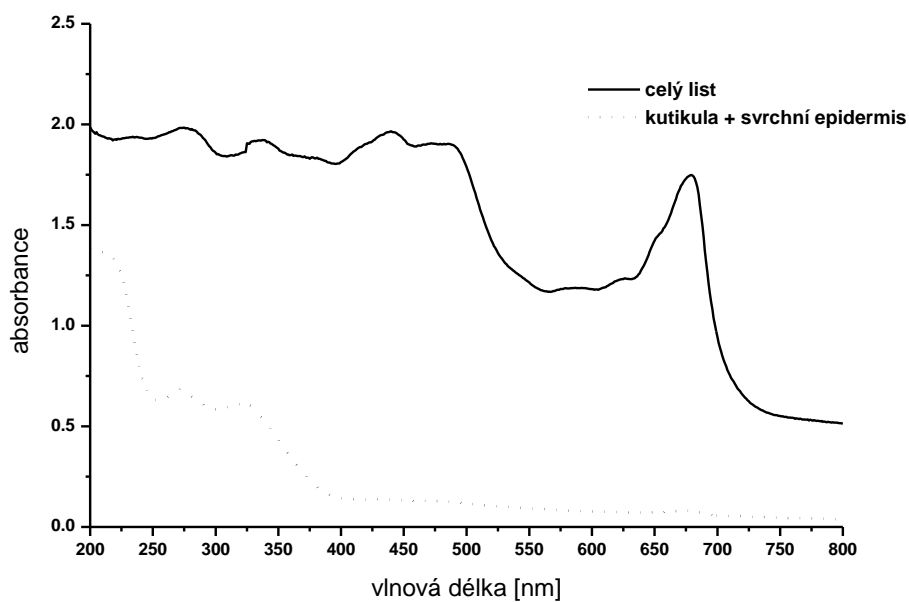
Důležitou ochrannou odezvou rostlinných buněk vůči nadměrné expozici UV-B záření je syntéza ochranných látek, které toto záření absorbují (flavonoidy a jiné fenolické látky). Velmi vysoké dávky UV-B však mohou syntézu těchto látek inhibovat. UV-A a viditelné záření tuto syntézu podporují. Přesný mechanismus aktivace zvýšené syntézy flavonoidů není známý. Jde pravděpodobně o systém světlocitlivých reakcí aktivovaných přes fytochromový systém a pomocí vysoké intenzity modrého nebo červeného světla samotného.

Většina nasyntetizovaných flavonoidů je koncentrována ve vakuolách exponovaných epidermálních buněk. Bylo ukázáno, že většina záření UV-B se zachytí právě v epidermálních buňkách rostlin. Protahování epidermálních buněk zjištěné pod vlivem nadměrného záření UV-B je tedy zřejmou ochrannou strategií ve smyslu prodloužení optické dráhy.

Existenci flavonoidů v epidermálních buňkách je možné pozorovat i fluorimetricky (viz též úlohy z Fluorescenční mikroskopie)

Další důležitou ochrannou odezvou na zesilující UV-B záření je zvýšená tvorba voskovité kutikuly listů. Kutikula díky své vysoké odrazivosti (až 80 %) tím výrazně přispívá filtraci UV-B.

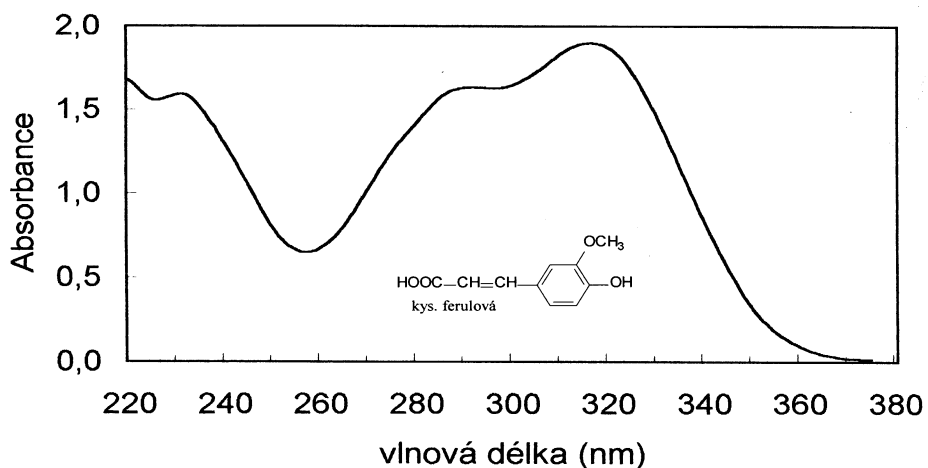
Obr. 1 ukazuje absorpční spektrum listu begonie s výraznou voskovou kutikulou a absorpční spektrum jeho kutikuly se svrchním epidermis naměřené na pomocí spektrofotometru UV550 Unicam. Oba vzorky byly přichyceny ke stěně křemenné kyvety. Spektra byla měřena ve vzorkovém prostoru určeném pro vysoce rozptylující vzorky, tj. před fotokatodou fotonásobiče. List měřicí svazek značně rozptyluje a odráží, což se projevuje v poměrně výrazném signálu pozadí. Signál pozadí je však menší, než při měření



Obr. 1. UV-VIS absorpční spektrum listu begonie a kutikuly se svrchním epidermis téhož listu.

v klasickém vzorkovém prostoru daleko od fotonásobiče.

Ve spektrální oblasti UV-B se jak u listu tak u svrchních vrstvy listu objevují pásy s maximy kolem 270 a 320 nm, což odpovídá fenolickým látkám. Obr. 2 pak ukazuje absorpční spektrum kyseliny ferulové, fenolické látky vázané k buněčným stěnám s podobnými pásy v UV oblasti spektra.



Obr. 2. Absorpční spektrum kyseliny ferulové v metanolu

D. LITERATURA

- Bajgar, R.: Změny fluorescence listu buzené v UV-oblasti pod vlivem vybraných stresů. Diplomová práce. Olomouc 1998.
- Lichtenthaler, H.K., Schweiger, J.: Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. J. Plant Physiol. 152, 272-282, 1998.