

Praktické cvičení č.1 datum:_____ jméno:_____

Okruhy k nastudování a dotazy:

- 1) Přečtete si protokol a příložený příbalový leták
- 2) Zopakujte si základy spektrofotometrie včetně složení spektrofotometru.
- 3) Osvěžte si základy vážení, rozpouštění, pipetování a k tomu potřebné výpočty.
- 4) Jaký je rozdíl mezi kalibrační a absorpční křivkou?
- 5) Z absorbance které látky vyhodnocujeme v tomto stanovení koncentraci glukózy?
- 6) Jaký je rozdíl mezi viditelnou a komplementární barvou? Jakou vlnovou délku absorpčního maxima (přibližně) bude mít červeně se jevící roztok?

Téma praktika:

**1a) Absorpční spektrum barevného produktu reakce (glukóza)
Stanovení absorpčního maxima**

Přístroje a pomůcky:

Spektrofotometr DU – 65 Spectrophotometr Beckman/ Spekol
Stojánky, zkumavky, mikropipety, dávkovače, špičky, standardní roztok glukózy,
souprava Glukosa GOD-PAP, Roche Diagnostic

Úkoly:

Ze standardů 5 a 10 mmol Glu/l připravte vzorky pro analýzu o objemu kolem 0,5 ml a koncentracích 2,5 5,0 10,0 mmol/l.

- 1) Zpracujte blank a naředěné vzorky tak, že smícháte 20 μ l jednotlivých standardů (pro blank 20 μ l vody) a 2,00 ml činidla ze soupravy. Reakční směs nechejte inkubovat 10 min
- 2) Manuální proměření absorpčního spektra a stanovení absorpčního maxima: u jednotlivých vzorků proměřte absorpční spektrum po 20 nm v rozmezí vlnových délek 410 – 660 nm (každá skupina změří jeden vzorek a výsledky poskytně kolegům).
- 3) Výsledky měření zaznamenejte do tabulky. Sestrojte graf (absorpční spektrum) a z grafu stanovte absorpční maximum produktu stanovení glukózy.

λ (nm)	A (pro c=2,5 mmol/l)	λ (nm)	A (pro c=5,0 mmol/l)	λ (nm)	A (pro c=10 mmol/l)
410		410		410	
450		450		450	
480		480		480	
490		490		490	
500		500		500	
510		510		510	
520		520		520	
560		560		560	
600		600		600	
660		660		660	

- 4) Proveďte plně automatické proměření absorpčního spektra v daném rozmezí vlnových délek pomocí funkce Scan, vytiskněte graf absorpčního spektra a výsledky manuálního i automatického měření porovnejte.

Závěr:

Praktické cvičení č.1b datum: _____ jméno: _____

1b) Téma praktika:

Vliv vlnové délky na měřicí rozsah

Přístroje a pomůcky:

Spektrofotometr CARY 3E, Varian

Stojánky, zkumavky, mikropipety, dávkovače, špičky

souprava Glukosa GOD-PAP, Roche Diagnostic, glukosa k přípravě standardního roztoku

Úkoly:

- 1) Připravte 200 ml roztoku glukózy o $c=50,0$ mmol/l, $M(\text{glu})=180,16$
- 2) Připravte kalibrační standardy o objemu 0,5 ml a koncentracích 2,5 5,0 7,5 10,0 15,0 20,0 30,0 50,0 mmol/l ředěním standardního roztoku glukózy o $c = 50,0$ mmol/l

Tabulka ředění:

Standard č.	1	2	3	4	5	6	7	8
c (mmol/l)	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0	30,0	50,0
st.r.50 (ml)								
Dest.H ₂ O(ml)								

- 3) Současně zpracujte blank a naředěné standardy tak, že smícháte 20 μ l standardního roztoku (do blanku 20 μ l destilované vody) a 2,00 ml činidla ze soupravy. Reakční směs nechejte inkubovat 10 minut bez přístupu přímého slunečního světla.
- 4) Měření proveďte při vlnových délkách 380, 500 a 600 nm proti blanku.
- 5) Výsledky měření zaznamenejte do tabulky.

Standard [mmol/l]	A λ 410 nm	Standard [mmol/l]	A λ 500 nm	Standard [mmol/l]	A λ 600 nm
0		0		0	
2,5		2,5		2,5	
5,0		5,0		5,0	
7,5		7,5		7,5	
10,0		10,0		10,0	
15,0		15,0		15,0	
20,0		20,0		20,0	
30,0		30,0		30,0	
50,0		50,0		50,0	

- 6) Na milimetrovém papíru sestrojte kalibrační graf s jednotlivými kalibračními křivkami a určete při které vlnové délce má metoda nejvyšší citlivost a která vlnová délka je nejvhodnější pro měření. Zdůvodněte a srovnajte s hodnotou vlnové délky, při které probíhá měření dle příbalového letáku této metody.

- 7) **Závěr:**