

Metody výpočtu neznámé koncentrace aneb spektrofotometrie v praxi

Představení kapitoly

V této kapitole se zaměříme na způsoby, jakými lze z experimentálních dat určit neznámou koncentraci látky. V praktickém cvičení si tyto postupy vyzkoušíte na příkladu spektrofotometrie, kdy z naměřené absorbance odvodíte koncentraci vzorku. Principy výpočtu jsou však obecně použitelné i u dalších analytických metod a tvoří základní dovednost v laboratorní práci.

Obsah

1	Úvod do tématu	1
2	Metody výpočtu neznámé koncentrace (Spektrofotometrie)	2
2.1	Metoda kalibrační křivky	2
2.2	Metoda standardního vzorku	3
3	Spektrofotometrie v praxi	4
3.1	Vzorový příklad výpočtu 1	5
3.2	Vzorový příklad výpočtu 2	6

1 Úvod do tématu

V laboratoři se často setkáme se situací, kdy potřebujeme zjistit **koncentraci neznámé látky** v roztoku. Obvykle sledujeme nějakou **fyzikálně-chemickou vlastnost**, která se mění v závislosti na koncentraci. Tou může být například intenzita absorbovaného světla, elektrický potenciál nebo migrační doba v chromatografii.

Jednou z nejčastějších a nejdostupnějších metod je **spektrofotometrie**, která měří, jak látka pohlcuje světlo o určité vlnové délce. Z absorbance lze následně – pomocí matematických vztahů – vypočítat koncentraci. Klíčovým zákonem je **Lambertův-Beerův zákon**, který popisuje lineární vztah mezi absorbancí a koncentrací ve zředěných roztocích.

Více o spektrofotometrii a optických metodách se dočtete v sekci „Optické metody – Spektrofotometrie“

Existuje více způsobů, jak z absorbance určit koncentraci. **Metoda kalibrační křivky** patří k nejpřesnějším, protože využívá srovnání se sérií standardů o známých koncentracích. **Metoda standardního vzorku** je rychlejší a jednodušší, protože pracuje pouze s jedním známým standardem, ale na druhou stranu je méně přesná.

2 Metody výpočtu neznámé koncentrace (Spektrofotometrie)

V rámci praktických cvičení ze spektrofotometrie budete zjišťovat neznámou koncentraci látky v roztoku/ve vzorku. Některé postupy si ukážeme v následujících kapitolách.

2.1 Metoda kalibrační křivky

Tato metoda zahrnuje vytvoření křivky na základě absorbance řady standardních vzorků o známé koncentraci. Při měření standardních vzorků je třeba ověřit platnost Lambertova-Beerova zákona, který předpokládá lineární vztah mezi absorbancí a koncentrací vzorků (proto se body prokládají křivkou). Získané hodnoty jsou vyneseny do grafu, přičemž na osu x se vynášejí koncentrace a na osu y absorbance.

Lineární rovnice kalibrační křivky:

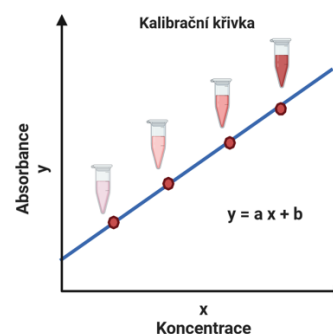
$$y = a \cdot x + b$$

y... absorbance (vynesena na vertikální ose)

x... koncentrace (vynesena na horizontální ose)

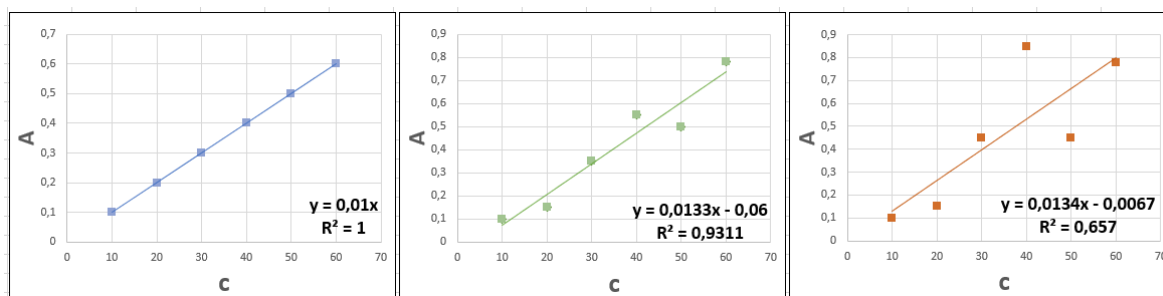
a... směrnice přímky

b... průsečík s osou y - hodnota absorbance, když je koncentrace analytu nulová



Poznámka: Vytvořená kalibrační křivka nemusí vždy procházet nulou na ose X nebo Y.

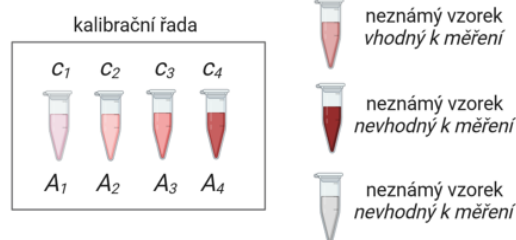
Linearita kalibrační křivky je často hodnocena pomocí korelačního koeficientu, reprezentovaného hodnotou R^2 . Hodnota R^2 blíží se k 1 znamená silnou lineární korelaci (jak je vidět na modrém grafu). V praxi nemusí přímka procházet přímo každým datovým bodem. Pro ideální křivku platí, že rozložení datových bodů na obou stranách přímky by mělo být rovnoměrné a hodnota R^2 by měla být vyšší než 0,9. Velký rozptyl vzorků (viz oranžový graf) může naznačovat chyby při přípravě kalibračních vzorků (například špatná technika pipetování).



Příklady kalibračních křivek: Ideální lineární závislost znázorňuje modrý graf. Body v kalibrační řadě leží na přímce, hodnota $R^2=1$, což indikuje absolutní korelaci mezi koncentrací a absorbancí. V zeleném grafu je hodnota $R^2=0,93$, což ukazuje na silný pozitivní lineární vztah mezi koncentrací a absorbancí, a potvrzuje spolehlivost kalibrační křivky. V oranžovém grafu hodnota $R^2=0,65$ znamená, že křivka by nemusela být spolehlivým nástrojem pro určení koncentrací.

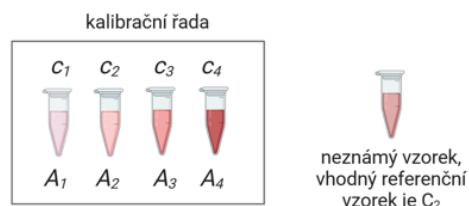
Při použití lineární rovnice kalibrační křivky nám znalost absorbance (y) neznámého vzorku umožňuje určit jeho koncentraci (x). Existují však potenciální úskalí při určování koncentrace vzorku.

- Pokud absorbance neznámého vzorku přesáhne hodnotu absorbance nejkoncentrovanějšího standardního vzorku v kalibrační křivce, může ležet mimo lineární závislost absorbancí. V takových případech je vhodné vzorek zředit.
- Na druhou stranu, pokud je absorbance pod nejnižším bodem křivky, existuje riziko interference dalších složek vzorku. V takových situacích musíme zvolit citlivější analytickou metodu (více viz. výukový materiál „Optické analytické metody se zaměřením na spektrofotometrii“)



2.2 Metoda standardního vzorku

Tato metoda je rychlá a praktická pro rutinní použití, avšak méně přesná než práce s kompletní kalibrační křivkou, protože předpokládá dokonalou linearitu signálu v daném rozsahu měření. V klinické biochemii je to jeden z hlavních způsobů zjišťování neznámé koncentrace. Vedle vzorku o neznámé koncentraci (c_x) se zpracuje i vzorek standardní (c_1) o známé koncentraci. Koncentrace neznámého vzorku se vypočte z absorbancí obou vzorků a známé koncentrace:



$$(c_1) : (A_1) = (c_x) : (A_x)$$

Koncentrace standardu je volena tak, aby byla ve středu kalibrační přímky (viz. obrázek).



Otázka: Zkuste se zamyslet jaké výhody a nevýhody by mohlo mít stanovení koncentrace pomocí kalibrační křivky a pomocí standardního vzorku?

Jaká je koncentrace látky, pokud jsme naměřili u našeho vzorku $A=0,286$ a náš standard má při koncentraci $c=5 \text{ mmol/l}$ absorbanci $A=0,364$?

3 Spektrofotometrie v praxi

Přestože spektrofotometrie je velmi přesná a spolehlivá metoda, i zde mohou nastat chyby. Ty mohou vycházet z nesprávné kalibrace, nevhodného zacházení se vzorkem nebo z přítomnosti interferencí ve vzorku. Proto je důležité porozumět principům správného vyhodnocení a možným zdrojům chyb měření.

Kalibrace přístroje:

Aby spektrofotometr poskytoval správné hodnoty, je nutné jej pravidelně kalibrovat. Kalibrace probíhá pomocí **standardních roztoků o známé koncentraci**. Bez správné kalibrace by výsledky mohly vykazovat systematické chyby, vedoucí k podhodnocení či nadhodnocení koncentrace analytu.

Slepý vzorek (blank):

Součástí každého správného měření je tzv. **slepý vzorek** (blank). Ten obsahuje všechny složky reakční směsi kromě stanovovaného analytu. Slouží k vynulování absorbance rozpouštědla, přítomnosti kyvety nebo činidel, takže výsledkem je čistý signál pocházející pouze od měřeného analytu. Použití blanku tedy eliminuje vliv pozadí a činidel na konečný výsledek.

Lineární rozsah:

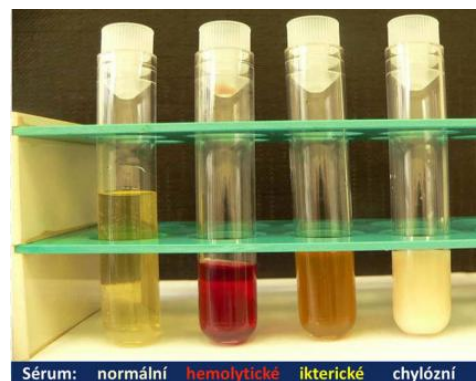
Lambert–Beerův zákon platí jen v určitém intervalu koncentrací, kde je vztah mezi koncentrací látky a absorbancí lineární. Při velmi nízkých koncentracích jsou hodnoty absorbance blízké nule a snadno se ztrácí přesnost měření. Naopak při vysokých koncentracích může dojít k tomu, že prakticky žádné světlo kyvetou neprojde a přístroj již nedokáže správně vyhodnotit absorbanci. Proto se za optimální považuje interval 0,1–1,0 absorbance. U koncentrovaných vzorků je nutné provést vhodné ředění, aby měření spadalo do lineárního rozsahu.

Interference:

Významným zdrojem chyb mohou být i různé **interference**, tedy vlivy látek, které absorbují světlo na podobných vlnových délkách nebo způsobují rozptyl paprsku. V tomto případě je nutné použít indikační reakce.

Interference mohou být způsobeny:

- **Hemolýza** – uvolnění hemoglobinu z červených krvinek výrazně zvyšuje absorbanci a může zkreslit výsledky.
- **Ikterus** – bilirubin přítomný v séru pohlcuje světlo v UV/VIS oblasti a ovlivňuje výsledky řady biochemických vyšetření.
- **Lipémie** – vysoký obsah lipidů vede k zákalu séra a rozptylu světla, čímž se absorbance uměle navyšuje.
- **Léky a metabolity** – některé léčivé látky nebo jejich produkty mají vlastní absorpční maxima, případně mohou reagovat s činidly, což vede k falešným výsledkům.



(Zdroj: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page09.html>)

3.1 Vzorový příklad výpočtu 1

Princip stanovení glukózy

V biochemii se pro stanovení glukózy často využívá enzymatická reakce, při níž vzniká **barevný produkt**. Nejčastěji jde o postup založený na kombinaci enzymů:

1. **Glukózaoxidáza** katalyzuje přeměnu glukózy na glukonolakton za současné tvorby peroxidu vodíku (H_2O_2).
2. **Peroxidáza** využije H_2O_2 k oxidaci chromogenní látky (např. o-dianisidinu, ABTS nebo POD-barviva), čímž vznikne **barevný produkt**.

Intenzita zbarvení (měřená spektrofotometrem) je přímo úměrná množství glukózy ve vzorku.

Postup

1. **Příprava standardu**
 - Připravíme roztok glukózy o známé koncentraci, např. **5 mmol/l**.
 - Změříme jeho absorbanci po provedení enzymatické reakce (např. při $\lambda = 505 \text{ nm}$).
2. **Měření neznámého vzorku**
 - Stejnou reakci provedeme s vyšetřovaným sérem.
 - Změříme absorbanci produktu.
3. **Výpočet koncentrace**
 - Pokud použijeme pouze **jeden standard**, použijeme vztah:

$$\frac{c_1}{A_1} = \frac{c_2}{A_2}$$

kde c_1 , A_1 jsou koncentrace a absorbance standardu, c_2 , A_2 pak hodnoty vzorku.

- Pokud máme celou **kalibrační křivku**, odečteme koncentraci vzorku přímo z grafu (absorbance vs. koncentrace), nebo přesněji pomocí rovnice přímky

Vzorový výpočet:

- Standard glukózy: $c_1 = 5 \text{ mmol/l}$, absorbance $A_1 = 0,364$
- Vzorek pacienta: absorbance $A_2 = 0,286$

Dosadíme do poměru:

$$\frac{5}{0,364} = \frac{c_2}{0,286}$$
$$c_2 = \frac{5 \times 0,286}{0,364} = 3,93 \text{ mmol/l}$$

Interpretace:

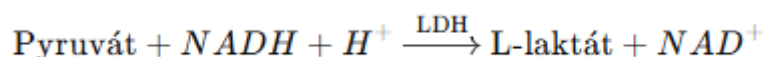
- **Naměřená koncentrace glukózy = 3,9 mmol/l.**
- Tato hodnota je pod fyziologickým rozmezím glukózy v plazmě (cca 3,9–5,6 mmol/l nalačno).
- Výsledek by mohl odpovídat **hypoglykémii** (nutno potvrdit klinickým kontextem).

3.2 Vzorový příklad výpočtu 2**Princip stanovení glukózy enzymové aktivity pomocí NADH/NAD⁺ (Warburgův optický test)**

V předchozí části jsme si ukázali dvě základní cesty, jak stanovit neznámou koncentraci. Stejný postup použijeme i u enzymů – jen s jedním rozdílem: místo jednorázové koncentrace nás zajímá, jak rychle se koncentrace mění. Tedy **aplikujeme Lambert–Beerův zákon dynamicky**.

Princip stanovení laktátdehydrogenázy (LDH)

Pyruvát se přemění LDH na laktát, kofaktorem je NADH:



- **NADH** absorbuje při 340 nm, **NAD⁺** nikoliv.
- Absorbance tedy postupně klesá.
- Pokud máme vytvořenou **kalibrační křivku pro NADH**, dokážeme z poklesu absorbance v čase vypočítat rychlost úbytku NADH. To je přímo úměrné aktivitě enzymu.

Příklad: Postup s využitím kalibrační křivky:**1. Kalibrace (ověření linearity)**

Připravíme si řadu standardních roztoků NADH o známé koncentraci (např. 0,05–0,5 mmol/l).

- Naměříme jejich absorbanci při 340 nm.
- Vykreslíme kalibrační křivku (Absorbance vs. koncentrace).
- Zkontrolujeme linearitu ($R^2 > 0,99$).

2. Měření vzorku

- Do reakční směsi (pyruvát, pufr, NADH) přidáme sérum pacienta obsahující LDH.
- Sledujeme **pokles absorbance v čase** (např. každých 30 sekund po dobu 2–3 minut).

3. Výpočet koncentrace NADH

- Pro každou naměřenou hodnotu absorbance najdeme odpovídající koncentraci NADH z kalibrační křivky.
- Získáme tabulku: čas (min) vs. koncentrace NADH (mmol/l).

Shrnutí

Cílem kapitoly je ukázat, jak z měřitelného signálu (například absorbance) dopočítat **neznámou koncentraci**. V praxi používáme dvě cesty: **kalibrační křivku** (nejpřesnější, založenou na sérii standardů) nebo **porovnání s jedním standardem** (rychlé, ale méně přesné a spolehlivé jen v ověřeném lineárním intervalu). Spolehlivost měření stojí na správné **kalibraci přístroje**, použití **blanku**, práci v **lineárním rozsahu** (typicky $A \approx 0,1-1,0$) a kontrole **interferencí** (hemolýza, ikterus, lipémie, léky). Principy nejsou omezené jen na spektrofotometrii, ale platí pro jakoukoli metodu se signálem úměrným koncentraci.

Kontrolní otázky

1. Jak zní Lambertův-Beerův zákon a co vyjadřují jeho jednotlivé členy?
2. Jaký je rozdíl mezi kalibrační křivkou a metodou standardního vzorku?
3. Jak se vyhodnocuje linearita kalibrační křivky?
4. Proč je nutné někdy neznámý vzorek pře stanovením ředit?
5. Jaké výhody a nevýhody má metoda standardního vzorku?
6. Jaké faktory mohou vést k porušení Lambertova-Beerova zákona?
7. Jaké aplikace Lambert-Beerova zákona najdeme v klinické praxi?