

Ćwiczenie 19K.

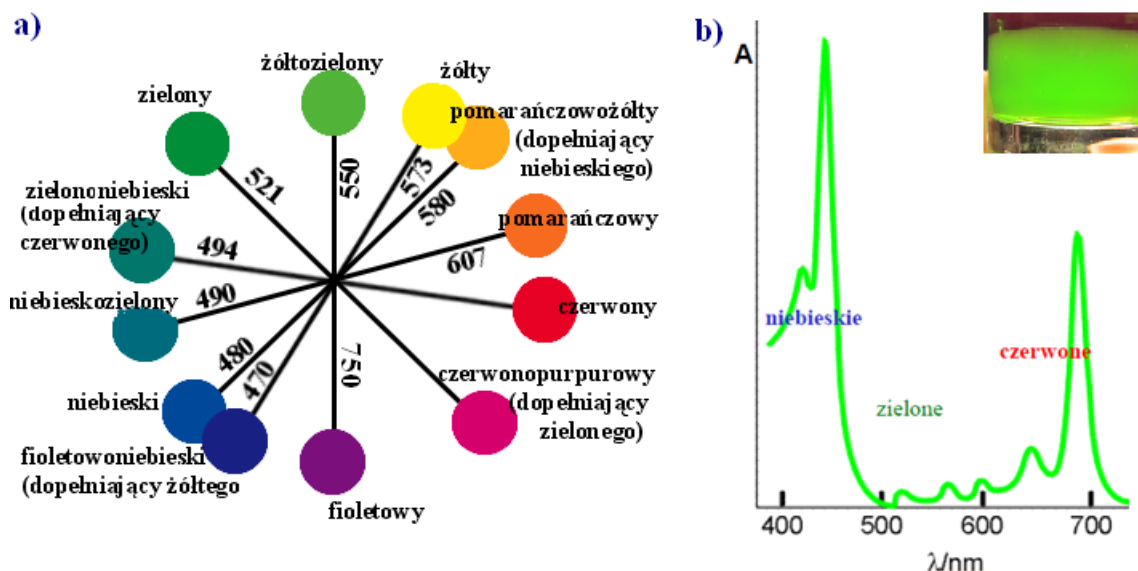
Interakcja światła z materią. Absorpcja światła. Wyznaczanie widm absorpcji wybranych biomolekuł – widmo absorpcji hemoglobiny i jego zmiany pod wpływem czynników redukujących/utleniających.

Część teoretyczna:

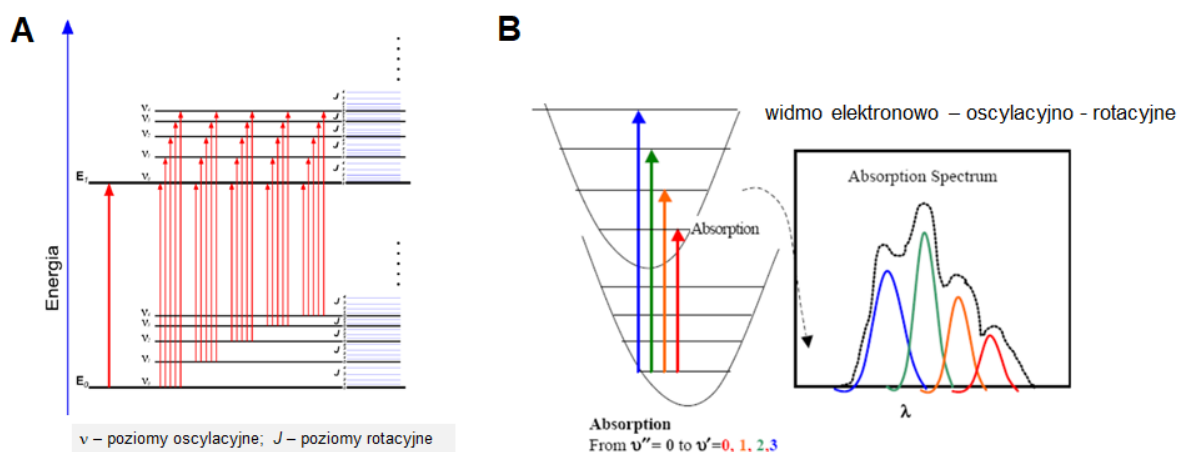
Dział nauki zajmujący się badaniem oddziaływań światła z materią określany jest mianem spektroskopii. Metody spektroskopowe często są stosowane w badaniach dotyczących analizy struktury pewnych związków, określenia ich ilości czy określania pewnych właściwości badanych cząsteczek. W wyniku absorpcji światła przez daną substancję można obserwować przejścia elektronowe zachodzące w cząsteczkach (spektroskopia UV-VIS), czy zmiany oscylacji poszczególnych grup atomów (spektroskopia w podczerwieni, IR). Promieniowanie z zakresu nadfioletu i światła widzialnego (10-770 nm) powoduje bowiem zmiany energii elektronów walencyjnych, podczas gdy fale dłuższe (780 nm-500 μm , o niższej energii) przyczyniają się do zmian energii oscylacyjnej cząsteczek. Ponieważ oko przeciętnego człowieka reaguje na promieniowanie o długości fali 380-780 nm (światło widzialne, VIS) skupimy się na omówieniu właśnie tego promieniowania. Ciekawą właściwością światła białego (które zawiera wszystkie długości fal światła widzialnego), jest to że jeśli padnie ona na dowolne ciało to część tego światła jest odbijana/rozpraszana, a część pochłaniana. W zależności od tego jakie długości fal świetlnych zostaną zaabsorbowane, a jakie odbite zależy obserwowany kolor tego przedmiotu.

Podczas przechodzenia światła białego przez barwny roztwór do oczu obserwatora dociera jedynie barwa dopełniająca w stosunku do zaabsorbowanej. Na barwę dopełniającą składają się wszystkie fale, które nie zostały pochłonięte przez roztwór. Przykładowo, jeżeli absorbowane jest światło o barwie żółtej (jak ma to miejsce w przypadku roztworów zawierających jony Cu^{2+}), a inne nie - to roztwór wykazuje niebieskie zabarwienie. Typowe zestawienie barw dopełniających pokazano na Ryc. 1a, gdzie możemy zaobserwować, że naprzeciw kolorów o odcieniu żółtego znajdują się odcienie niebieskiego, a naprzeciw czerwonego – zielono-niebieskie. Dlatego, jeżeli popatrzymy na typowe substancje barwne występujące w przyrodzie, jak chociażby chlorofil, który odpowiada za zieloną barwę liści to okaże się, że pochłania on różne długości fal (różne barwy, poza zieloną). Na Ryc. 1b przedstawiono **widmo absorpcji** chlorofilu (czyli wykres przedstawiający absorpcję światła (A) w zależności od długości fali świetlnej (λ)). Każda substancja ma swoje charakterystyczne widmo absorpcji, w których występują maksima absorpcyjne dla określonej długości światła (częstości promieniowania; $\nu = 1/\lambda$). Każde maksimum absorpcyjne odpowiada przejściu cząsteczki z określonego poziomu energetycznego na wyższy, co schematycznie przedstawiono na ryc. 2. Jak można zauważyć w każdej cząsteczce rozróżniamy skwantowane poziomy energetyczne, gdzie na skutek absorpcji energii można obserwować przejścia na wyższy poziom energetyczny. Każdej barwie można przypisać odpowiednie przejścia,

w przypadku koloru niebieskiego absorbowana jest większa ilość energii niż ma to miejsce w przypadku koloru zielonego czy czerwonego (Ryc. 2B). Jeżeli wykonalibyśmy wykres ilości zaabsorbowanego światła w zależności od długości fali świetlnej (λ) uzyskamy widmo absorpcji, które ilustruje nam jakie pasma energii są pochłaniane przez dany związek w wyniku przepuszczenia przez niego światła.



Ryc. 1. a) zestawienie barw dopełniających; **b)** widmo przedstawiające absorpcję (A) poszczególnych długości fal (λ) przez chlorofil (roztwór chlorofilu w prawym górnym rogu).



Ryc. 2. Widmo w obszarze UV/VIS nazywane jest elektronowym widmem absorpcyjnym¹.

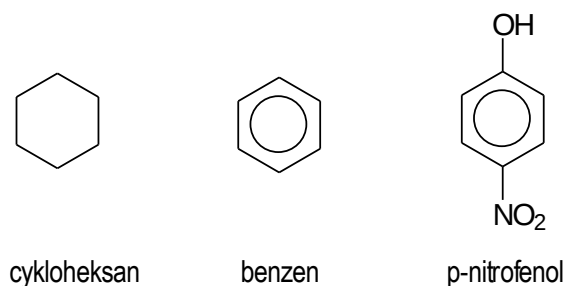
Jak zaznaczono, w przypadku chlorofilu absorbowane są głównie zakresy fal odpowiadające barwie niebieskiej i czerwonej (Ryc. 1b), a odpowiadające im kolory dopełniające (Ryc. 1a) to: żółty, żółto-pomarańczowy i niebiesko-zielony, co w wyniku ich

¹ Widmo absorpcyjne związku chemicznego jest miarą ilości światła zaabsorbowanego przez ten związek (absorbancja) w zależności od długości fali świetlnej (λ).

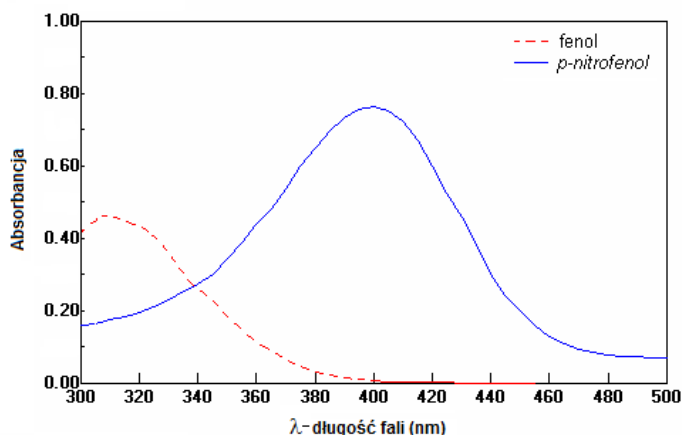
nałożenia na siebie pozwoli uzyskać odcień barwy zielonej. Trzeba bowiem mieć świadomość, że poprzez odpowiednie mieszanie barw możemy uzyskać niemal każdy kolor, o odpowiednim odcieniu i intensywności. Wykorzystuje się to w drukarkach kolorowych, które pomimo tego, że mają jedynie pojemniki z 3 kolorami, to na wydrukach pozwalają uzyskać dowolną barwę. Jeśli skierujemy światło białe (zawierające wszystkie długości fal) na taki wydruk, to pochłonięte zostaną te długości fal świetlnych, które stanowią barwę dopełniającą do obserwowanej. W przypadku koloru białego barwą dopełniającą jest czarna – czyli substancja absorbująca wszystkie długości fal świetlnych (światło białe) w naszym odczuciu będzie czarna. Dlatego też wyidealizowane ciało fizyczne, które całkowicie pochłania padające na nie promieniowanie elektromagnetyczne nazywane jest **ciałem doskonale czarnym** (nie istnieją w rzeczywistości bowiem zawsze jakaś nawet niewielka część promieniowania ulega odbiciu, czy rozproszeniu).

Jedną z przyczyn absorpcji jest obecność w związku chemicznym grup atomów zawierających elektrony o małych energiach wzbudzenia. Grupy takie, nazywane są **chromoforami** (z *grec.* – „*niosący kolor*”). Najczęściej są to pierścienie aromatyczne (aromatyczny sekstet elektronów), wiązania wielokrotne (wiązania typu π), czy też atomy zawierające wolne pary elektronowe (tzw. elektrony niewiążące n). Związki zawierające elektrony niewiążące (n) i elektrony typu π najczęściej absorbują światło w obszarze nadfioletu. Obok chromoforów w cząsteczkach mogą znajdować się inne grupy atomów określane mianem **auksochromów**. Wzmacniają one działanie chromoforów, oraz mogą przesunąć maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych (tzw. batochromy, np.: $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$), bądź w kierunku fal krótszych (tzw. hipsochromy, np.: $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-$, $-\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$).

Efekt działania grup chromoforowych na widma absorpcyjne możemy zademonstrować porównując widma 3 związków: cykloheksanu, benzenu oraz *p*-nitrofenolu. Jak widzimy są to cykliczne związki zawierające 6 atomów węgla. Jeżeli jednak popatrzymy na ich widma to zaobserwujemy że cykloheksan wcale nie absorbuje światła, benzen silnie adsorbuje w nadfiolecie (200-300 nm), a *p*-nitrofenol zarówno w zakresie UV, jak i światła widzialnego.



Za absorpcję światła w zakresie UV odpowiada obecność pierścienia aromatycznego (grupy chromoforowej), natomiast przyłączenie batochromów ($-\text{OH}$, $-\text{NO}_2$) powoduje przesunięcie w kierunku fal dłuższych (czyli w zakres światła widzialnego). Na ryc. 4 przedstawiono widma absorpcyjne fenolu ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$; pierścień benzenowy z dodatkową grupą $-\text{OH}$) i *p*-nitrofenolu (zawierającego zarówno grupę $-\text{OH}$ i $-\text{NO}_2$). Jak widać na rys. fenol pochłania



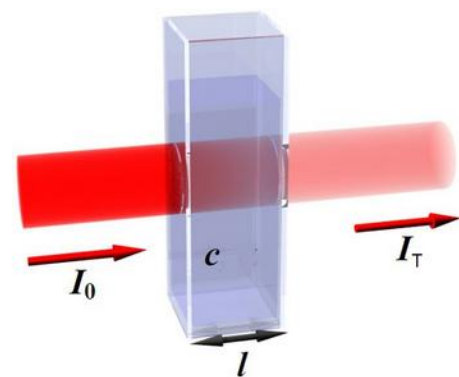
światło o długości poniżej 380 nm (dlatego jego roztwór jest bezbarwny), natomiast *p*-nitrofenol (zawierający 2 grupy auksochromowe) absorbuje zarówno światło UV i VIS (maksymalną absorpcję wykazuje dla długości fali ok. 390-410 nm, które odpowiadają barwie niebieskiej). Jak wspomniano już wcześniej barwą

dopełniającą do niebieskiego jest kolor żółty, dlatego też związki *p*-nitrofenolu w środowisku alkalicznym wykazują intensywne żółte zabarwienie.

Do innych substancji absorbujących w zakresie światła widzialnego należą związki pierwiastków bloku *d*. Cechą tych pierwiastków jest niecałkowicie wypełnienie podpowłoki *d*, w związku z czym elektron z łatwością może być przeniesiony w obrębie poziomów energetycznych podpowłoki *d*. Wartość energii przejścia pomiędzy poziomami *d* odpowiada energii promieniowania widzialnego (400-800 nm). Dlatego też większość roztworów związków zawierających pierwiastki bloku *d* wykazuje zabarwienie, co jest wykorzystywane do ich analizy (np. Cu^{2+} - niebieskie, CrO_4^{2-} - żółte, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ - pomarańczowe, Cr^{3+} - zielone, MnO_4^- - fioletowe, Fe^{2+} - jasnozielone, Fe^{3+} - żółte). Przy całkowicie wypełnionej podpowłoce *d* lub braku na niej elektronów jony proste metali bloku *d* są bezbarwne (np.: bezbarwny Cu^+ (natomiast Cu^{2+} niebieskie), czy bezbarwny Ti^{4+} , w odróżnieniu od fioletowego Ti^{3+}).

Prawa absorpcji

Jeżeli na próbkę pada promieniowanie elektromagnetyczne (światło) o natężeniu I_0 to część tego promieniowania zostanie zaabsorbowana, a część przechodzi przez tą próbkę. Rejestrując natężenia promieniowania padającego (I_0) i przechodzącego (I_T) możemy wyznaczyć ilość światła która ulega pochłonięciu przez roztwór (absorbancja, A), lub która przeszła przez niego (transmitancja, T):

$$A = \log \frac{I_0}{I_T} = \log \frac{1}{T} \quad \text{lub} \quad T = \frac{I_T}{I_0}$$


Absorbancja przy danej długości fali zależy od molowego współczynnika absorpcji (ϵ), grubości warstwy absorbującej (zwykle 1cm) i stężenia badanego roztworu. Zależność ta matematycznie jest wyrażona przez **prawo Lamberta-Beera** (absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu i grubości warstwy absorbującej), co możemy zapisać:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

gdzie: A – absorbancja;

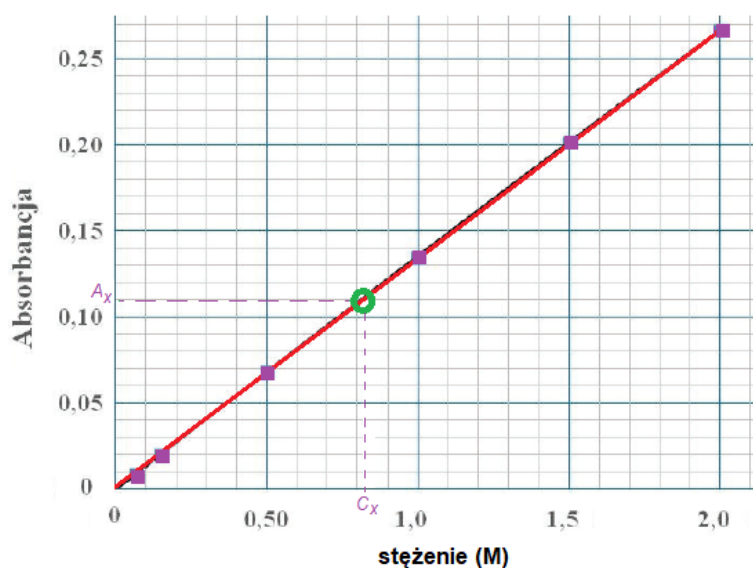
ϵ – molowy współczynnik absorpcji [cm^2/mol],

l – grubość warstwy absorpcyjnej [cm];

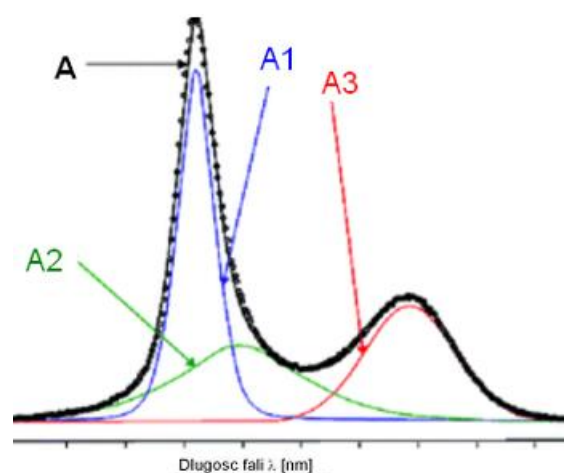
C – stężenie badanego roztworu [mol/dm^3].

We wzorze Lamberta-Beera pojawia się współczynnik proporcjonalności (ϵ), który nazywany jest **molowym współczynnikiem absorpcji**. Jest on charakterystyczny dla danej substancji i ma stałą wartość przy określonej długości fali. Liczbowo przedstawia on absorbancję wykazywaną przez roztwór o stężeniu 1 mol/dm^3 , przy grubości warstwy 1 cm . Znajomość wartości molowego współczynnika absorpcji pozwala określić stężenie roztworu po oznaczeniu jego absorbancji (ekstynkcji) bądź też wykorzystywać do obliczania

Prawo Lamberta – Beera można też przedstawić w postaci graficznej jako zależność $A = f(c)$. Będzie to linia prosta przechodząca przez początek układu współrzędnych (ryc. 6), gdzie dla danego stężenia zaznaczono odpowiadającą mu wartość absorbancji.



Ryc. 6. Krzywa wzorcowa nazywana też krzywą kalibracyjną. Przygotowuje się serię roztworów o znanych stężeniach, dla których mierzy się absorbancję i na tej podstawie wyznacza wykres (prostoliniowy, zaczynający się w punkcie 0). Następnie po określeniu absorbancji roztworu (A_x) o nieznanym stężeniu i na podstawie wykresu można wyznaczyć stężenie tej substancji (C_x) w badanej próbce.



Ryc. 7. Widmo roztworu zawierającego trzy barwne składniki. Mierząc absorbancję takiego roztworu uzyskamy sumaryczne widmo, gdzie poszczególne wartości absorbancji przy danej długości fali ulegają zsumowaniu.

Prawo Lamberta – Beera odnosi się do przypadku, gdy w roztworze znajduje się jedna substancja absorbująca. Jeżeli w roztworze będzie kilka składników, które wykazują zdolności absorpcyjne to oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo addytywności absorbancji, według którego całkowita absorbancja (A) jest sumą niezależnych absorpcji poszczególnych składników ($A_1, A_2, \dots, A_n$): $A = A_1 + A_2 + \dots + A_n$. Na rycinie 7 pokazano sumaryczne widmo absorbancji roztworu (A), który zawierał 3 substancje barwne, z których każda pochłaniała światło o innej długości fali (zaznaczone jako A_1, A_2 i A_3).

Pomiar absorbancji

Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, iż zmierzona wartość absorbancji jest sumą absorbancji próbki i absorbancji odnośnika. Przed wykonaniem

pomiaru absorpcji należy wykalibrować spektrofotometr poprzez ustawienie absorpcji na wartość równą zero, gdy w kuwecie znajduje się odnośnik. Jako odnośniki stosuje się: powietrze; roztwory nie absorbujące przy żadnej z używanych długości fali (roztwory buforowe, woda); roztwory absorbujące, ale nie wchodzące w reakcje z badaną substancją lub roztwory o znanym stężeniu, które będzie się zmieniało w wyniku zachodzących reakcji.

Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, iż na uzyskany wynik absorpcji wpływ ma również materiał, z jakiego wykonana jest kuweta pomiarowa. Przyczyną tego jest fakt, sama kuweta również może absorbować światło. Jeżeli wiązkę światła przepuścimy przez pustą kuwetę, to po dotarciu do detektora będzie ona miała mniejsze natężenie niż wiązka światła padającego. W związku z tym w zależności od zakresu długości fali, przy jakiej jest wykonywany pomiar należy odpowiednio dobierać rodzaj kuwety pomiarowej. Poniżej przedstawiono w jakim zakresie poszczególne materiały, z których wykonuje się kuwety, przepuszczają światło:

- Polistyren: 340 – 800 nm
- Szkło: 334 – 2500 nm
- Kwarc: 170 – 2600 nm
- Polimetakrylan: 280 – 800 nm

Również przepuszczalność światła przez dwie kuwety (wykonanych nawet z tego samego materiału) może się istotnie różnić. Dlatego należy dobierać kuwety o zbliżonej przepuszczalności światła lub dokonywać pomiaru absorpcji próbki i odnośnika w tej samej kuwecie dokładnie przemywając i osuszając kuwetę pomiędzy mierzonymi próbkami. Powinno się też pamiętać, aby nie dotykać palcami ścianek kuwety, przez które przechodzi wiązka światła, a w przypadku ich zabrudzenia należy je przemyć wodą i delikatnie wytrzeć miękką chusteczką.

Interakcja światła z wybranymi biomolekułami

Światło wchodząc w interakcję z powierzchnią skóry, może ulec odbiciu, rozproszeniu lub absorpcji (pochłanianiu). W skórze zawarte są różne rodzaje barwników, którą mogą odpowiadać za pochłanianie światła. Mogą nimi być składniki naturalne (np. melanina, hemoglobina) lub być wprowadzone z zewnątrz do organizmu (np. barwniki tatuaży, składniki kremów itp.).

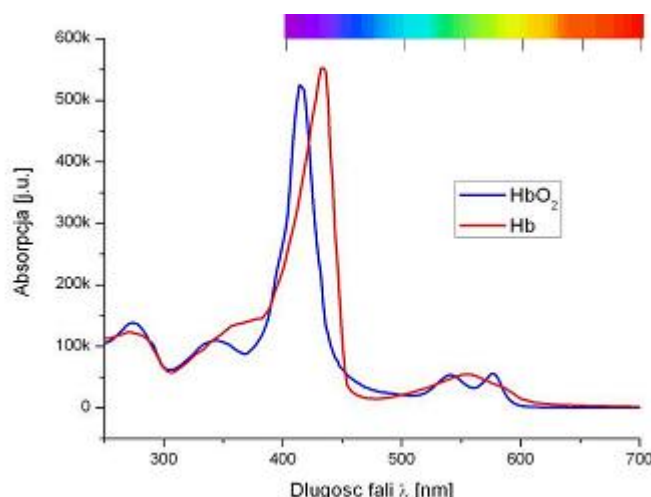
Kolor naszej skóry zależy od ukrwienia i grubości naskórka, a przede wszystkim od obecności melaniny - naturalnego barwnika skóry. Jej nazwa wywodzi się z greckiego „melas” (Μέλαν) – co odnosi się określenia koloru czarnego, ciemno - brązowego. Wytwarzanie tego barwnika uzależnione jest od czynników genetycznych i hormonalnych, oraz czynników zewnętrznych (np. promieniowanie ultrafioletowe). Zachodzi one w melanocytach – komórkach usytuowanych w warstwie podstawnej naskórka. W odpowiedzi na różne bodźce melanina przenoszona jest do bardziej zewnętrznych warstw naskórka. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego ilość melaniny w skórze zwiększa się, co możemy zaobserwować poprzez przejściową zmianę zabarwienia (opaleniznę). Pierwsze i najszybsze przebarwienie skóry jest wynikiem działania długofalowych promieni

UVA (320-400 nm). Za późniejszą i trwałą opaleniznę odpowiada promieniowanie UVB, (280-320 nm), które ze względu na krótsze długości fal (a przez to większą częstotliwość) niesie ze sobą większą energię. Uwaga: duże dawki promieniowania UVB mogą doprowadzić do poparzenia skóry objawiającego się bolesnymi obrzękami i pęcherzami. Zwiększenie ilości melaniny przyczynia się do zwiększenia absorpcji światła przez co znacznie mniejsze ilości światła będzie docierać do głębiej położonych tkanek (najintensywniej pochłaniane jest promieniowanie UV, ale w mniejszym stopniu także i fale z zakresu światła widzialnego). Dlatego im więcej światła słonecznego (zawierającego UV) dociera do skóry, tym więcej melaniny pojawia się w komórkach naskórka. Komórki naskórka wraz z zawartą w nich melaniną obumierają i złuszcza się, co sprawia że opalenizna po pewnym czasie zanika.

Ludzka melanina zawiera eumelaninę (brązowo-czarny barwnik) i feomelaninę (czerwono-żółty barwnik), które odpowiadają za absorpcję promieniowanie w zakresie UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) oraz w paśmie światła widzialnego. Najnowsze badania naukowe dowodzą, że światło widzialne także może być szkodliwe dla człowieka, podobnie jak promieniowanie UV. Dotyczy to zwłaszcza światła o wysokiej energii (ang. *High Energy Visible Light, HEV*) charakteryzującego się wysoką częstotliwością i długości fali 400- 500 nm. Światło to nie powoduje zaczerwienienia skóry, jak ma to miejsce podczas absorpcji promieniowania UV. Skutki działania HEV objawiają się w późniejszym czasie, kiedy pod jego wpływem dochodzi do zwiększonego powstawania reaktywnych form tlenu (wolnych rodników). Przyczynia się to do pośredniego uszkodzenia DNA oraz aktywacji metaloproteinaz, a tym samym przedwczesnego starzenia się skóry. Uważa się, że może to być również powodem powstawania przebarwień i pokrzywek słonecznych.

W produktach kosmetycznych od dawna stosuje się preparaty zawierające melaninę. Ponieważ są to związki wielkocząsteczkowe mają one niewielką szansę, aby przeniknąć w głąb skóry i ich działanie ogranicza się do warstwy powierzchniowej. Obecnie obserwuje się zwiększone zainteresowanie przemysłu kosmetycznego frakcjonowaną melatoninę, która znacznie lepiej penetruje naskórek. Filtrujące i antyrodnikowe właściwości takiej melatoniny są podkreślane poprzez umieszczanie dopisku *Liposhield® HEV Melanin* w nazwie produktu.

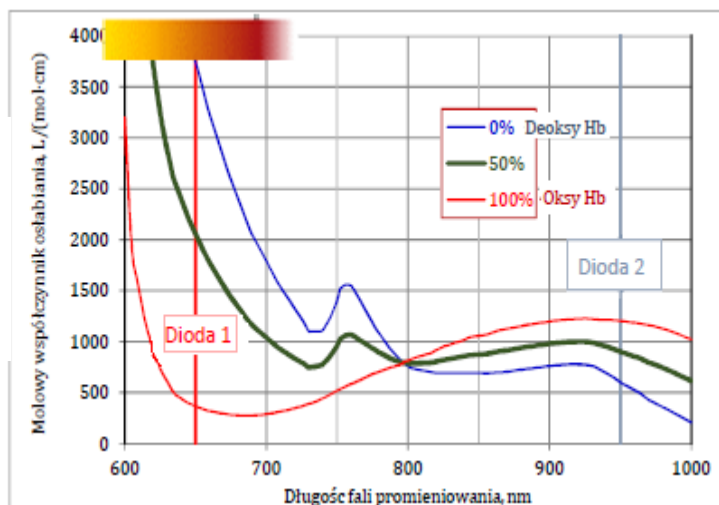
W odróżnieniu od wody, krew cechuje się wyjątkowo silnym pochłanianiem fal o długościach odpowiadających barwie niebieskiej (420-490 nm), zielonej (490-550 nm) i żółtej (565-590 nm). Dominującą rolę w absorpcji światła przez krew odgrywa hemoglobina. Hemoglobina występująca w formie utlenowanej (oksyhemoglobina, HbO_2) ma barwę jasnoczerwoną i badana na spektrofotometrze wykazuje największą absorpcję przy 414 nm oraz charakterystyczne piki absorpcyjne przy 542 nm i 578 nm. Hemoglobina odtlenowana (Hb) ma barwę czerwono-fioletową i w spektrofotometrze obserwuje się piki absorpcyjne w zakresie 400-450 nm i przy długości fali równej 565 nm (ryc. 8, poniżej).



Zmiany w widmie absorbancji można zaobserwować w roztworze hemoglobiny. W wyniku kontaktu z powietrzem hemoglobina nasycą się tlenem i możemy zaobserwować, że roztwór przyjmuje charakterystyczną czerwoną barwę. W wyniku oddania tlenu oksyhemoglobina przechodzi w deoksyhemoglobina (hemoglobinę odtlenowaną) o czym świadczy zmiana barwy na czerwono-fioletową. Można to zaobserwować dodając do roztworu oksyhemoglobiny kilku kryształków ditionianu sodu (zachodzi reakcja: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHS}_2\text{O}_3$), czy borowodorku sodowego (NaBH_4). Także wiele innych związków/ligandów (np.: tlenek węgla (CO) czy jon cyjankowy (CN^-)) może być wiązanych przez żelazo w cząsteczce hemu, co będzie przyczyniać się do zmiany barwy przez hemoglobinę. Przykładowo w wyniku reakcji z żelazicyjankiem potasu ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), czy nadmiarem NaNO_2 , dochodzi do zmiany stopnia utlenienia żelaza w cząsteczce hemu na +3 stopień utlenienia i powstaje wtedy methemoglobina (metHb) o charakterystycznej brunatnej barwie. Obecność jonu Fe^{3+} powoduje, że taka cząsteczka nie jest w stanie wiązać tlenu i methemoglobina nie jest zdolna do transportu tego gazu do tkanek. Natomiast pod wpływem jonów CN^- methemoglobina przechodzi w trwałą cyjanomethoglobina, z maksimum absorpcji światła przy 540 nm, co wykorzystuje się w analityce do ilościowego oznaczania hemoglobiny. Natomiast widoczne różnice w widmie hemoglobiny w zależności od połączenia z tlenem, przedstawione na ryc. 8, mogą być wykorzystywane do oznaczania stopnia wysycenia hemoglobiny tlenem. Na tej zasadzie działają urządzenia nazywane pulsoksymetrami, które na podstawie pomiaru absorpcji promieniowania elektromagnetycznego (czerwonego i podczerwonego) określają stopień wysycenia hemoglobiny przez tlen. Promieniowanie emitowane przez dwie diody przechodzi przez palec, gdzie jest absorbowane przez tkanki, skórę i krew żylną, i dociera do detektora. Większość światła jest pochłaniana, a element światłoczuły wbudowany w czujnik pulsoksymetru oblicza procent absorpcji fal o długości 660 nm i 940 nm, co pozwala mu na tej podstawie wyliczyć procent saturacji krwi tlenem (Ryc. 9). Układ obliczeniowy pulsoksymetru z całkowitego sygnału wyodrębnia składową zmienną absorpcji przy w/w długościach fal, opisującą absorpcję promieniowania zachodzącą w tętnicy. Pomiar tej

składowej umożliwia identyfikację krwi tętniczej i na podstawie zmiany pulsacyjnego komponentu absorpcji w formie graficznej oblicza wartość tętna. Ponieważ światło czerwone jest silniej absorbowane przez deoksyHb (hemoglobina pozbawiona tlenu), a podczerwone przez oksyHb (hemoglobina utlenowana) to na tej podstawie możliwe jest wyznaczenie saturacji Hb tlenem.

Ryc. 9. Różnice w absorpcji światła o długości fal 660 nm i 940 nm stanowią podstawę analizy saturacji krwi tlenem przez pulsoksymetr



Część eksperymentalna:

1. Sporządzanie krzywej wzorcowej i jej wykorzystanie do oznaczania stężenia substancji badanej (substancja badana: *p*-nitrofenol)

Wykorzystując wyjściowy roztwór *p*-nitrofenolu o stężeniu 10 mM przygotować roztwory wzorcowe o następujących stężeniach: 50; 100; 200; 300 i 500 μ M. Przygotowanie poszczególnych rozcieńczeń ułatwi poniższa tabela:

Roztwór	Objętość roztworu V [ml]	V _{H₂O} [ml]	Stężenie <i>p</i> -nitrofenolu C [mM]
A	0,5 ml roztworu wyjściowego	9,5	0,5
B	0,3 ml roztworu wyjściowego	9,7	0,3
C	4,0 ml roztworu A	6,0	0,2
D	5,0 ml roztworu C	5,0	0,1
E	5,0 ml roztworu D	5,0	0,05

Następnie do czystych probówek lub kuwet spektrofotometrycznych odmierzyć po 0,5 ml uprzednio przygotowanych roztworów wzorcowych. Do wszystkich prób dodać po 2 ml 0,1M r-ru NaOH i wymieszać (w kuwetach za pomocą mieszadła). *P*-nitrofenol w środowisku zasadowym tworzy żółto zabarwiony anion *p*-nitrofenolanowy. Zmierzyć wartość absorbancji (A) dla poszczególnych prób, przy długości fali 415 nm, stosując wodę jako odnośnik. Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą wzorcową (zależność $A = f(c)$).

Analogicznie wykonać pomiar absorbancji dla próbki o nieznanym stężeniu *p*-nitrofenolu. Do 0,5 ml roztworu próbki o nieznanym stężeniu należy dodać 2 ml 0,1 M r-ru NaOH,

wymieszać i zmierzyć absorbancję. Na podstawie wcześniej wykreślonej krzywej wzorcowej wyznaczyć stężenie *p*-nitrofenolu w badanej próbce.

2. Wyznaczanie widm absorpcji i określanie maximum absorpcji wybranych biomolekuł

Przygotować roztwory badanych substancji w probówkach z korkiem o objętości 10 ml.

Substancjami badanymi są:

1. **Fluoresceina** : (roztwór o stężeniu 0,1 - 0,5 mg/ml). Zakres badania 400 – 540 nm.
2. **Melanina** (Zakres badania 250 – 800 nm)
0,4 ml roztworu wyjściowego + 7,6 ml NaOH (3×10^{-3} M)
3. **Witamina A** (Zakres badania 250 – 500 nm)
0,5 ml roztworu wyjściowego + 3,5 ml DMSO
4. roztwór **hemoglobiny** (ok. ~1%, w przypadku wyższych stężeń rozcieńczyć za pomocą 0,9 % NaCl). Zakres badania 350 – 600 nm

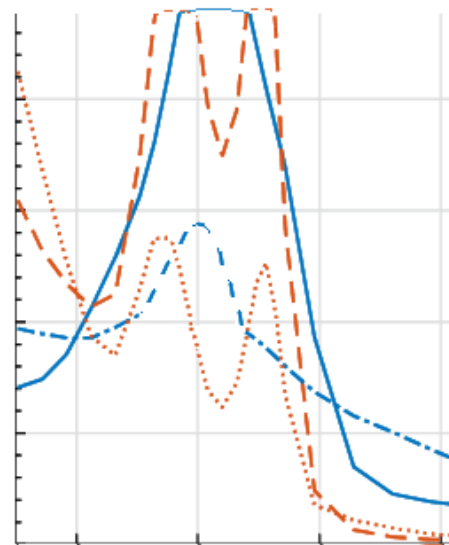
W przypadku hemoglobiny roztwór wyjściowy zawierający hemoglobinę rozcieńczyć 10× i do jednej z kuwet pomiarowych przenieść roztwór wyjściowy, a do drugiej roztwór rozcieńczony. Wykonać widmo roztworu wyjściowego i jeżeli okaże się, że wartość absorbancji przy 400 nm przekroczy 3 i uzyskamy pik z spłaszczonym wierzchołkiem (jak zapis wykonany linią ciągłą na wykresie obok) należy przeprowadzić pomiar dla roztworu rozcieńczonego (powinny być widoczne pojedyncze piki, z wyraźnie zaznaczonym szczytem). Zanotować przy jakich długościach fali świetlnych pojawiają piki (widoczne wychylenia od linii bazowej).

Po wykonaniu widma hemoglobiny przygotować 2 dodatkowe kuwety zawierające roztwór hemoglobiny, a następnie dodać:

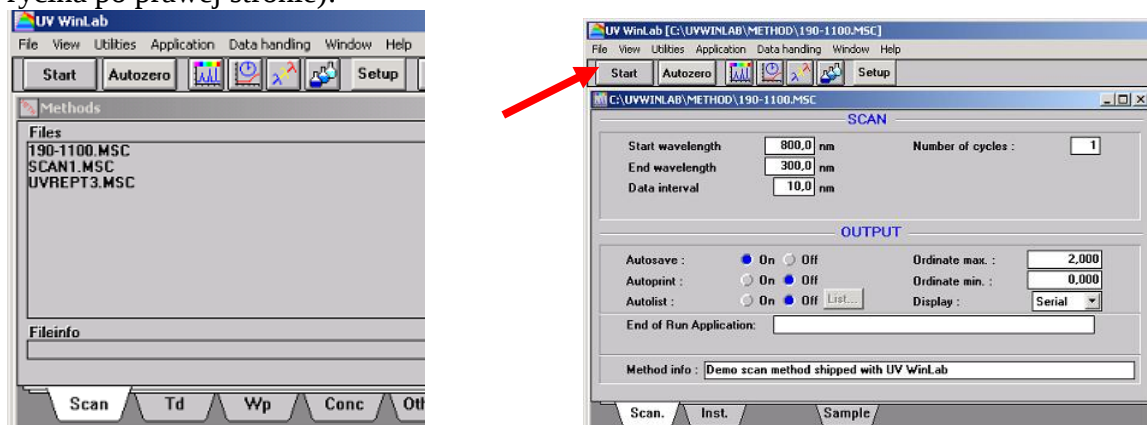
- a) do pierwszej kilka kryształków ditionianu sodu – (na czubku szpatułki ok. 2-5 mg)
- b) do drugiej 10 μ l 0,05 M $K_3Fe(CN)_6$ lub odczynnika Drabkina (szczegóły ustalić z prowadzącym ćwiczenia) i wymieszać.

Zanotować różnice w zmianie barwy roztworów hemoglobiny oraz wykonać ich widma absorpcji w zakresie 360-640 nm. Przy jakich wartościach obserwuje się zanik absorpcji promieniowania, a przy jakich pojawiają się nowe piki (pasma) absorbowanego światła.

Widmo badanych substancji wykreślić przy pomocy aparatu Elmer Perkin. Po uruchomieniu programu wybieramy metodę (okno METHODS): **190-1100 MSC.** Wybór potwierdzić dwukrotnym kliknięciem na nazwie metody. Pojawia się okno parametrów metody, gdzie podajemy początkową (start wevelenght) i końcową (end) długość fali, oraz interwał (data



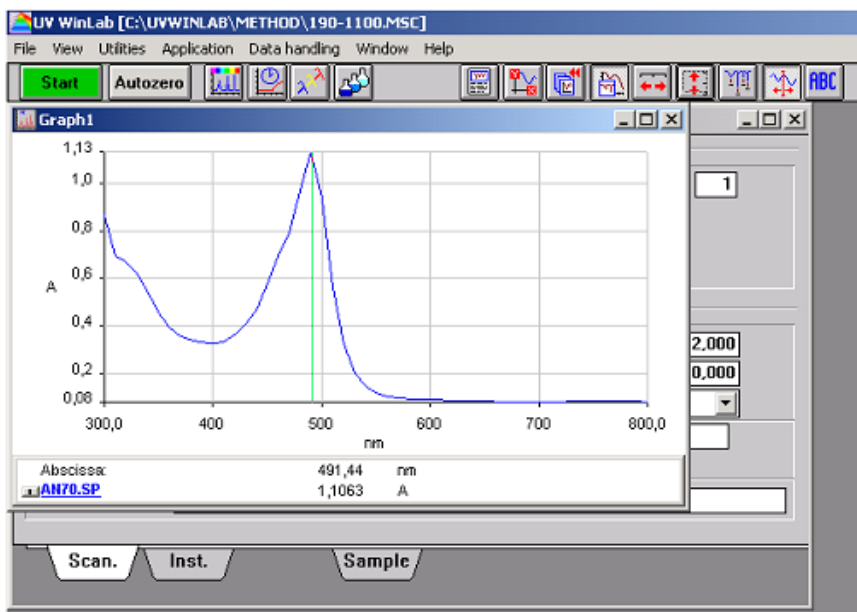
interwał; odstęp pomiędzy poszczególnymi pomiarami). Proszę zwrócić uwagę, że najpierw podajemy wyższą długość fali (jako start), a jako końcową - niższą wartość (co pokazuje rycina po prawej stronie):



Początkowa i końcowa długość fali, jaką należy ustawić podane są w instrukcji (przy każdej substancji) jako zakres badania. Interwał ustawiamy na 5 nm (wartość interwału może być zmieniona przez prowadzącego ćwiczenia). Po ustawieniu wszystkich wartości i umieszczeniu kuwet z wodą (ok. 1 ml) w komorze pomiarowej i referencyjnej spektrofotometru wciskamy klawisz START (zaznaczony czerwoną strzałką na ryc. powyżej, po prawej stronie)

Pojawia się okno informacyjne - proszące o wstawienie próby odniesienia (ang. *BLANK* – tzw. ślepa próba). Po zatwierdzeniu poprzez kliknięcie na OK – aparat przeprowadzi automatyczną kalibrację dla podanego zakresu długości fal (wyznaczy tzw. linię bazową). Następnie po kalibracji pojawia się komunikat proszący o wstawienie badanej próby (*SAMPLE*).

Do uchwytu oznaczonego jako „próba” wstawiamy kuetę z roztworem badanej substancji. Próba z wodą jako odnośnikiem pozostaje w komorze oznaczonej jako „refer”. Zamykamy pokrywę spektrofotometru i wciskamy OK. Aparat automatycznie dokonuje pomiaru wykreślając widmo, które jest widoczne w oknie „Graph 1” (ryc. poniżej). Zwrócić uwagę w jakim zakresie długości fal absorbują poszczególne substancje. Porównać barwę substancji z zakresem długości fali świetlnej, przy której obserwuje się największą absorpcję (pochląnianie) światła. Wyznaczyć długości fali (nm), przy której poszczególne związki wykazują najwyższą absorbancję (*A*).



Klikając na ikonę  umiejscowioną w pasku nad rysunkiem możemy dopasować odpowiednią skalę dla wykreślonego widma. Po kliknięciu na  i wybraniu opcji „Peak” automatycznie zostanie wyznaczona długość fali przy której związek wykazuje maksymalną absorbancję.

Po wybraniu  pojawia się zielona linia, którą możemy przesuwając za pomocą znacznika myszki i ustawić w miejscu gdzie związek wykazuje maksymalną absorbancję. Program automatycznie wyświetli długość fali i wartość absorbancji, przy której został ustawiony wskaźnik (ryc. powyżej)