

FLUORIMETRIE

Jan Fährich

Obecné základy

Fluorimetrie je analytická metoda využívající schopnosti některých látek vysílat (emitovat) po předchozím převedení do **vzbuzeného (excitovaného) stavu** fluorescenční záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. K převedení do vzbuzeného stavu (k excitaci vzorku) je zpravidla využívána absorpce ultrafialového nebo viditelného záření. Omezíme se zde pouze na fluorimetrii zředěných roztoků fluoreskujících látek v rozpouštědle, které neabsorbuje ani excitační ani emitované záření.

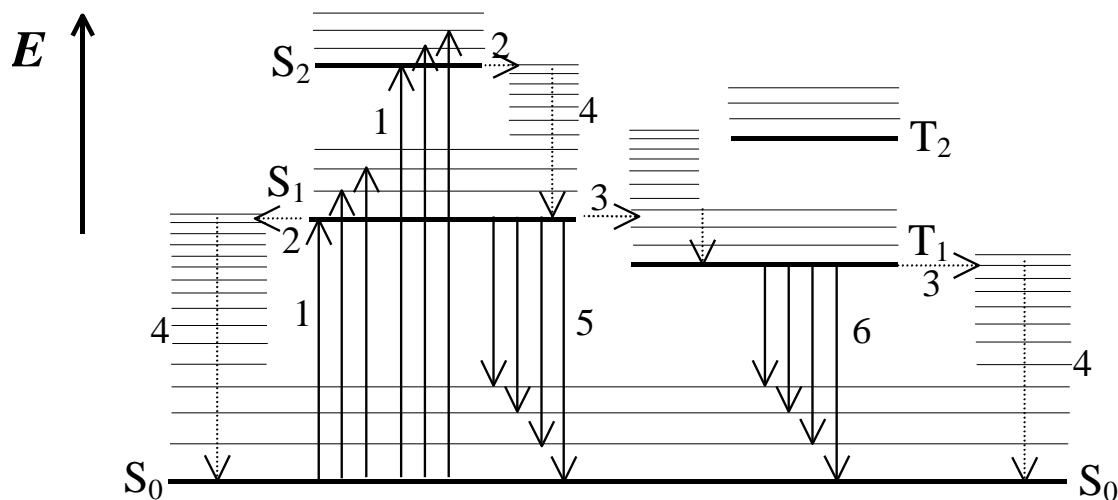
Na **obr.1** je znázorněno zjednodušené schéma energetických hladin v molekule se sudým počtem elektronů. V základním stavu S_0 většinou obsazují vždy dva elektrony stejný elektronový stav s opačným spinem. Jejich spiny se vzájemně kompenzují, takže celkové spinové kvantové číslo molekuly je 0. Takový stav molekuly je označován jako **singletní**. I po excitaci jednoho valenčního elektronu na vyšší elektronovou hladinu mohou elektrony zachovat svůj celkový spin, což je vyznačeno řadou excitovaných singletních stavů molekuly S_1, S_2 atd. Po excitaci však již dva elektrony nejsou spárovány a jejich celkové spinové kvantové číslo také může mít hodnotu 1. Molekula se pak nachází ve stavu označovaném jako **tripletní**, kterých opět může být celá řada (T_1, T_2, \dots). Přechody molekuly mezi singletním a tripletním stavem jsou o několik řádů pomalejší, než podobné přechody uvnitř řady singletních stavů a uvnitř řady tripletních stavů.

Každý elektronový stav je v důsledku vibračního pohybu molekuly, který zvyšuje její celkovou energii, tvořen sérií **vibračních hladin**. Hladina elektronového stavu s nejnižší vibrační energií je označována jako základní vibrační hladina elektronového stavu. Ve stavu tepelné rovnováhy se za normálních teplot převládá část molekul nachází na základní vibrační hladině stavu S_0 . Při absorpci záření je energie absorbovaného fotonu spotřebována na převedení molekuly do excitovaného stavu (děj 1 na **obr.1**). Stejně jako při emisi fotonu musí platit Planckova podmínka

$$|\Delta E| = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

kde ΔE je rozdíl energií molekuly v cílovém a výchozím stavu, h je Planckova konstanta, ν je frekvence a λ vlnová délka absorbovaného (emitovaného) záření. Protože pravděpodobnost takového přechodu se pro jednotlivé hladiny liší, závisí schopnost molekuly absorbovat fotony na vlnové délce absorbovaného záření. Tuto

závislost popisuje **absorpční spektrum** látky, tedy závislost absorbance roztoku nebo absorpčního koeficientu látky na vlnové délce (viz úloha „Kapalinová chromatografie a absorpční UV-spektrometrie“).



Obr. 1: Schéma energetických hladin molekuly a přechodů mezi nimi

S₀ - základní stav, S₁, S₂...- excitované singletní stavy, T₁, T₂...- excitované tripletní stavy.

1 - absorpce záření, 2 - vnitřní konverze, 3 - mezisystémový přechod, 4 - vibrační relaxace, 5 - fluorescence, 6 - fosforescence

Po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle předává získanou energii svému okolí a tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze - **obr. 1** děj 2 - a mezisystémový přechod - děj 3) následovanými vibrační relaxací (děj 4) se dostává postupně do nižších excitovaných stavů. Pomalejší bývá většinou až nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S₁ do základního stavu S₀. Teprve mezi těmito hladinami se vedle nezářivých přechodů může uplatnit přechod spojený s vyzářením (emisí) fotonu. Tato emise záření je označována jako **fluorescence** (děj 5). Její doba dosvitu po přerušení excitace bývá řádově 10⁻⁶ až 10⁻⁹ s. Většinou až z hladiny S₁ se případně uplatní i nezářivý mezisystémový přechod do některého z tripletních stavů. Zářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu T₁ do základního stavu S₀ má dlouhou dobu dosvitu řádu 10⁻³ až 10¹ s a je označován jako **fosforescence** (děj 6).

Vzhledem k tomu, že molekula před emisí fotonu fluorescenčního záření ztratí část energie dodané fotonem excitačního záření, je (až na výjimky) vlnová délka fluorescenčního záření větší, než vlnová délka excitačního záření. Pokud fluorescence probíhá tak, jak je zobrazeno na **obr.1**, je vlnová délka fluorescenčního záření dokonce větší nebo rovna vlnové délce nejdélnějšího pásu absorpčního spektra (přechod mezi základními vibračními hladinami stavu S₀ a S₁). Fluorescenci látky, jejíž absorpční spektrum známe, proto hledáme v blízkosti prvního absorpčního pásu směrem k větším vlnovým délkám. Dobře známou výjimkou v tomto směru je

azulen a jeho deriváty, jejichž fluorescence vychází ze stavu S_2 .

Fluorescenční schopnost látky popisuje **kvantový výtěžek fluorescence** Y_F , který je definován jako poměr počtu fotonů vyzářených látkou ve formě fluorescence n_F ku počtu fotonů látkou absorbovaných n_A

$$Y_F = \frac{n_F}{n_A} \quad (2)$$

Kvantový výtěžek umožňuje určit **zářivý tok** emitovaný vzorkem ve formě fluorescenčního záření vyjádřený jako počet fotonů za jednotku času $\Phi_{p,F}$ ze zářivého toku látkou absorbovaného $\Phi_{p,A}$ jako

$$\Phi_{p,F} = Y_F \Phi_{p,A} \quad (3)$$

Kvantový výtěžek je určen podílem rychlosti vlastního fluorescenčního přechodu a celkové rychlosti všech dějů, které vycházejí ze stavu S_1 . Kromě dějů výše zmíněných se může uplatnit i vliv dalších komponent přítomných v roztoku, které deaktivují stav S_1 a tak zhasí fluorescence. Tyto látky jsou označovány jako **zhášedla** (angl. „quenchers“). Mezi nejběžnější zhášedla patří kyslík a také látky obsahující prvky s vyšším atomovým číslem. I samotná fluoreskující látka může při vyšších koncentracích snižovat kvantový výtěžek. Hovoříme pak o koncentračním zhášení fluorescence. Mohou se při něm uplatnit různé mezimolekulární interakce, jako je tvorba molekulárních asociátů v základním či excitovaném stavu, přenos energie apod. Velice účinně je za běžných podmínek zhášena fosforescence, protože sama probíhá velmi pomalu. Proto není za běžných podmínek pozorována. Objeví se např. až v tuhých zchlazených roztocích (často na teplotu kapalného dusíku 77 K), kdy jsou vnější zhášecí mechanismy potlačeny.

Jak je patrné z **obr.1**, není fluorescenční záření emitováno při jedné vlnové délce, protože cílovým stavem mohou být i vibračně excitované hladiny základního elektronového stavu. Rozdělení zářivého toku mezi jednotlivé emitované vlnové délky λ_{em} popisuje **emisní spektrum**. Jeho exaktním vyjádřením je fluorescenční **spektrální zářivý tok** $\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em})$ udávající zářivý tok vyzařovaný vzorkem v jednotkovém intervalu vlnových délek v okolí vlnové délky λ_{em} . Celkový fluorescenční zářivý tok je vázán se spektrálním zářivým tokem integrálem

$$\Phi_{p,F} = \int_0^{\infty} \Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em}) d\lambda_{em} \quad (4)$$

Důležitým závěrem vyplývajícím ze schémat na **obr.1** je skutečnost, že tvar emisního spektra není závislý na excitační vlnové délce, protože je určen pouze základní vibrační hladinou stavu S_1 a vibračními hladinami základního stavu S_0 .

Pokud by vibrační hladiny stavů S_1 a S_0 měly podobnou strukturu, byla by také vibrační struktura emisního fluorescenčního spektra podobná vibrační struktuře prvního pásu v absorpčním spektru. Ve frekvenční či vlnočtové stupnici pak bude fluorescenční spektrum přibližně zrcadlovým obrazem prvního absorpčního pásu s osou symetrie v blízkosti vlnočtu přechodu mezi základními vibračními hladinami obou stavů (tzv. pravidlo zrcadlové symetrie). Mezi látky splňující většinou pravidlo zrcadlové symetrie patří aromatické uhlovodíky jako např. anthracen (viz dále **obr.3 a 4**).

I když tvar emisního spektra není závislý na podmínkách excitace, mění se celkový fluorescenční zářivý tok. Proto je účelné použít jako charakteristiku emisních vlastností látky spektrální zářivý tok vztažený např. na spektrální zářivý tok v maximum této závislosti. Takto definované emisní spektrum je bezrozměrné a v maximum má hodnotu 1. Jinou možností je vztáhnout spektrální zářivý tok na celkový zářivý tok

$$E_c(\lambda_{em}) = \frac{\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{em})}{\Phi_{p,F}} \quad (5)$$

Takto definované emisní spektrum má rozměr převrácené jednotky vlnové délky, např. nm^{-1} , a jeho integrál na intervalu $(0, \infty)$ je roven jedné.

Pokud fluoreskující roztok v kyvetě čtvercového průřezu obsahuje jedinou absorbující složku, která má schopnost fluoreskovat, platí pro absorpci excitačního záření Lambertův-Beerův zákon

$$A = \varepsilon b c_f \quad (6)$$

kde A je absorbance roztoku, ε je molární absorpční koeficient složky, b je tloušťka kyvety a c_f je látková koncentrace fluoreskující složky v roztoku. Odtud můžeme absorbovaný zářivý tok $\Phi_{p,A}$ vyjádřit ze zářivého toku excitačního záření dopadajícího na kyvetu $\Phi_{p,0}$ jako

$$\Phi_{p,A} = \Phi_{p,0} (1 - 10^{-\varepsilon b c_f}) \quad (7)$$

Pro nízké hodnoty absorbance můžeme aproximovat tuto závislost lineárním vztahem

$$\Phi_{p,A} = 2.3 \Phi_{p,0} \varepsilon b c_f \quad (8)$$

Z rovnice (3) pak pro fluorescenční zářivý tok plyne

$$\Phi_{p,F}(\lambda_{ex}) = 2.3 Y_F \Phi_{p,0}(\lambda_{ex}) \varepsilon(\lambda_{ex}) b c_f \quad (9)$$

kde argumentem (λ_{ex}) je vyjádřeno, které veličiny závisejí v tomto vztahu na vlnové délce excitačního záření λ_{ex} . (Kvantový výtěžek v roztocích většinou na excitační vlnové délce nezávisí.) Pro spektrální fluorescenční zářivý tok pak plyne vztah

$$\Phi_{p,F,\lambda}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = 2.3 Y_F E_c(\lambda_{em}) \Phi_{p,0}(\lambda_{ex}) \varepsilon(\lambda_{ex}) b c_f \quad (10)$$

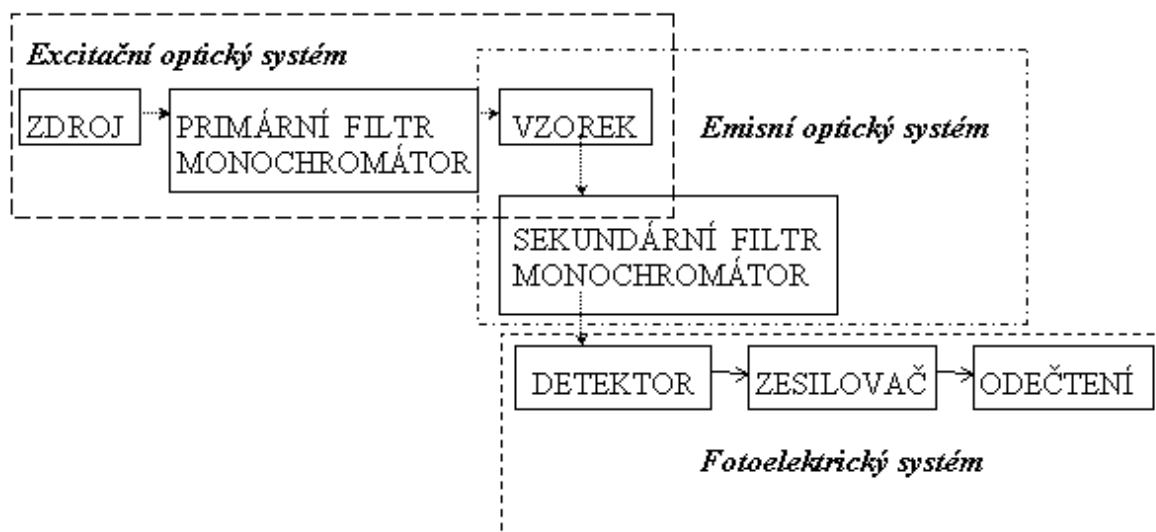
Fluorescenční spektrální zářivý tok tedy závisí na vlnové délce excitačního záření a na emisní vlnové délce. Pro málo absorbující roztoky obsahující jednu složku se dá vyjádřit jako součin dvou faktorů, z nichž jeden $\Phi_{p,0}(\lambda_{ex}) \varepsilon(\lambda_{ex})$ závisí pouze na vlnové délce excitačního záření, a druhý $E_c(\lambda_{em})$ pouze na emisní vlnové délce. Závislost fluorescenčního zářivého toku na vlnové délce excitačního záření za konstantních podmínek měření emise je označována jako **excitační spektrum**. Pokud bychom měli k dispozici zdroj excitačního záření s proměnnou vlnovou délkou, jehož zářivý tok by byl na vlnové délce nezávislý, bylo by excitační spektrum zředěného roztoku obsahujícího jedinou fluoreskující látku až na násobek totožné s jejím absorpčním spektrem a to nezávisle na proměřované emisní vlnové délce. Podobně i emisní spektrum až na násobek nezávisí na excitační vlnové délce. Jak excitační, tak i emisní spektrum je využitelné pro identifikaci látky porovnáním se spektry standardní látky. Pokud je v roztoku přítomno více fluoreskujících látek a jejich koncentrace je nízká, takže se vzájemně neovlivňují, jejich fluorescenční zářivé toky se sčítají.

Pro kvantitativní analýzu vyplývá z rovnice (10), že při nízkých hodnotách absorbance (koncentrace) roztoku vzrůstá zářivý tok fluorescence lineárně s koncentrací fluoreskující látky.

Přístroj pro měření fluorescenčního záření je označován jako fluorimetr. Pokud můžeme přístrojem měřit excitační a emisní spektra, bývá pro zdůraznění této skutečnosti používáno označení **spektrofluorimetr**. Základní blokové schéma fluorimetru je znázorněno na **obr.2**.

Ze záření vysílaného intenzivním excitačním zdrojem izolujeme primárním (excitačním) filtrem nebo monochromátorem záření těch vlnových délek, které chceme použít pro excitaci vzorku. Toto záření dopadá na vzorek a excituje v něm fluorescenční záření. Fluorescenční záření vystupuje ze vzorku všemi směry. Jenom jeho část vystupuje v takovém směru, že prochází přes sekundární (emisní) filtr nebo monochromátor a dopadá na fotoelektrický detektor. Zde vyvolá elektrický signál, který se dále zesiluje a měří. Jeho velikost je mírou fluorescenčního zářivého toku vysílaného vzorkem na vlnových délkách izolovaných emisním filtrem (monochromátorem). Podmínky buzení jsou přitom určeny zdrojem excitačního záření a primárním filtrem (nastavením excitačního monochromátoru). Pokud je přístroj v excitačním optickém systému vybaven monochromátorem, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je tento monochromátor nastaven, a zaznamenat excitační spektrum vzorku. Pokud je přístroj vybaven monochromátorem v emisním

optickém systému, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je nastaven tento monochromátor, a zaznamenat emisní spektrum vzorku.



Obr.2: Blokové schéma fluorimetru

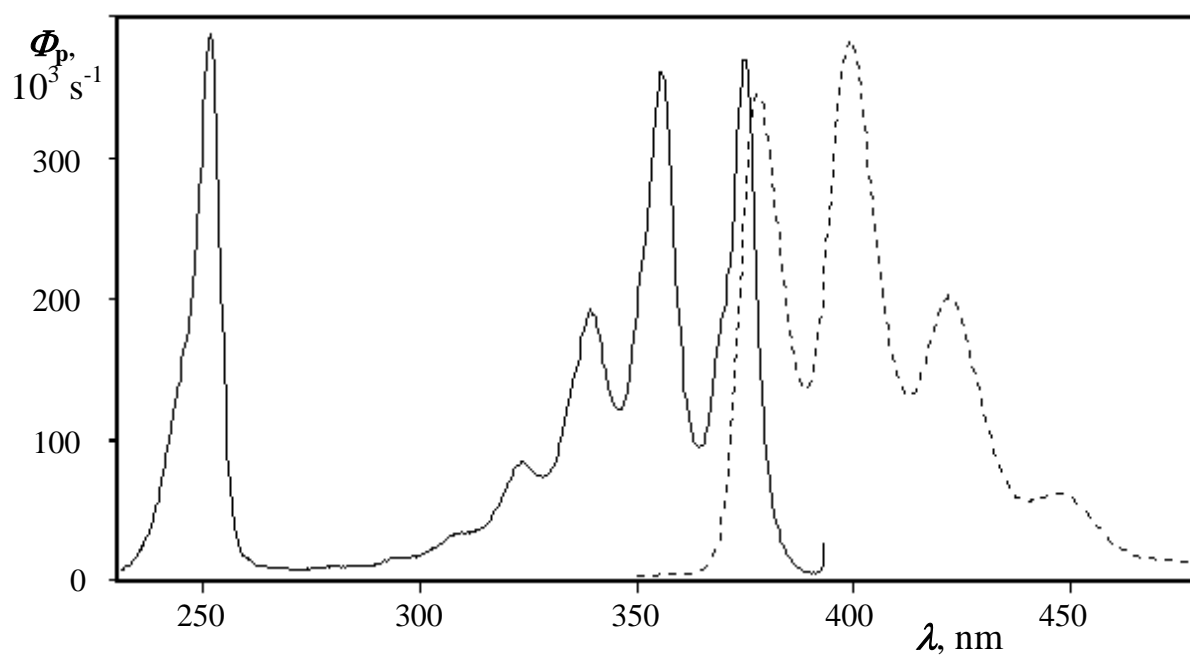
Excitační a emisní spektra takto přímo měřená spektrofluorimetrem jsou zkreslena charakteristikami přístroje a jsou označována jako **spektra nekorigovaná**. Emisní spektra jsou zkreslena především z toho důvodu, že detektor není stejně citlivý na záření různých vlnových délek. Protože ani excitační zdroj nevyzařuje stejně v celém rozsahu vlnových délek, jsou zkreslená i excitační spektra. Abychom se přiblížili skutečnému průběhu spekter ve smyslu rovnice (10), museli bychom naměřená spektra násobit pro každou vlnovou délku příslušným korekčním faktorem. Získají se tzv. **korigovaná spektra**. Tato spektra jsou důležitá, pokud např. chceme porovnávat data změřená na různých přístrojích. Z toho důvodu by v literatuře měla být publikována pokud možno spektra korigovaná. Korigované excitační spektrum by také mělo být podle rovnice (10) až na násobek totožné s absorpčním spektrem látky. Při využití fluorescenční spektrometrie pro praktické analytické účely však většinou vystačíme se spektry nekorigovanými.

Jako příklad nekorigovaných spekter je na **obr.3** uvedeno excitační a emisní spektrum anthracenu. V porovnání s absorpčním spektrem (**obr.4**) je v excitačním spektru výrazně slabší pás okolo 251 nm, protože záření excitační xenonové výbojky se směrem ke kratším vlnovým délkám značně zeslabuje. Jinak si jsou si obě spektra celkem podobná díky tomu, že spektrum xenonové výbojky se v této oblasti vlnových délek mění plynule. Pokud má excitační zdroj čarové spektrum (rtuťová výbojka, do určité míry i xenonová výbojka v oblasti 450-500 nm), má i nekorigované excitační spektrum čarový charakter a jeho podobnost se spektrem absorpčním se ztrácí.

Za povšimnutí stojí také vzájemná poloha excitačního a emisního spektra anthracenu splňující poměrně dobře pravidlo zrcadlové symetrie s osou symetrie okolo vlnové délky 377 nm (viz str.4).

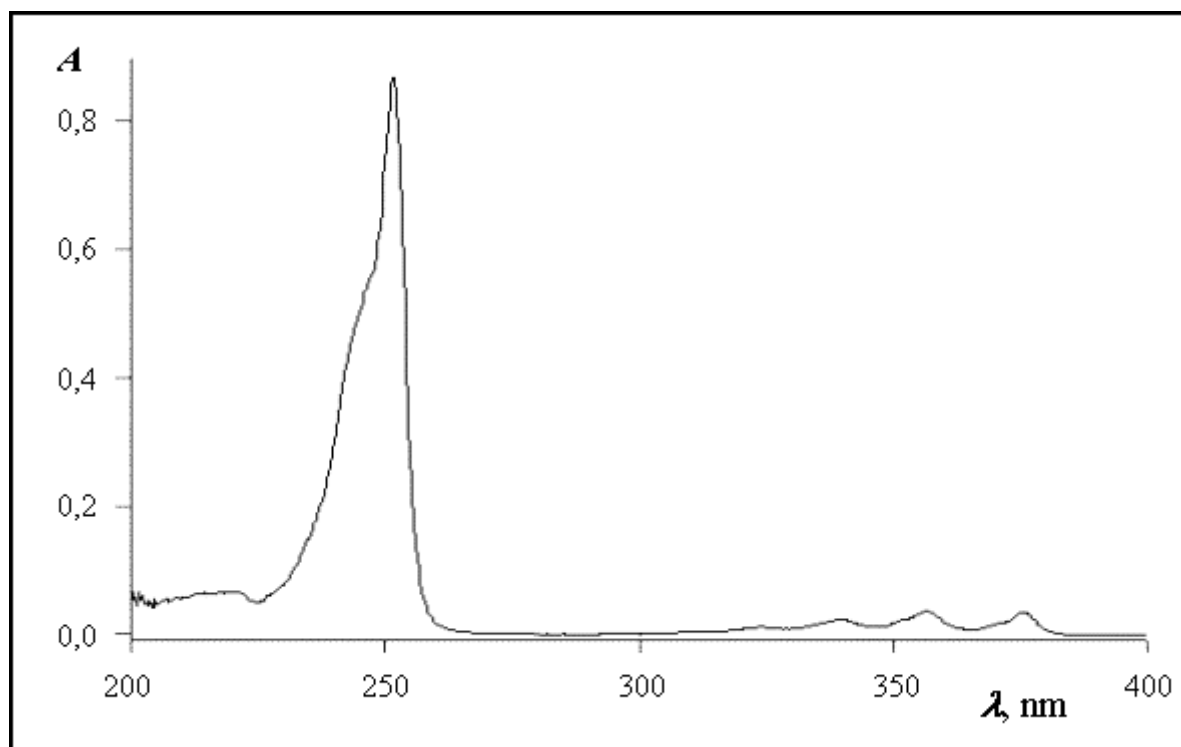
Další zkrácení spekter se uplatňuje u vzorků, které výrazněji absorbují záření o excitační nebo emisní vlnové délce. Pokud vzorek absorbuje excitační záření do té míry, že se excitační paprsek při průchodu vzorkem zeslabuje, hovoříme o tzv. **efektu vnitřního filtru**. V důsledku tohoto efektu není při vyšších koncentracích kalibrační závislost lineární. Dále jsou deformována excitační spektra, protože je silněji zeslaben signál v absorpčních maximech než v absorpčních minimech. Tento efekt bývá výrazný u přístrojů s tzv. kolmým uspořádáním, ve kterém je pozorováno emisní záření vycházející přibližně z oblasti okolo středu kyvety ve směru kolmém na excitační paprsek. Nelinearita kalibračních závislostí je v tomto uspořádání ještě výraznější, než odpovídá rovnici (7), a pro vyšší koncentrace fluoreskující látky klesá měřený signál dokonce až na nulu. Pro silně absorbující roztoky se totiž excitační paprsek absorbuje hned v povrchové vrstvě vzorku a vůbec nepronikne do jeho středu. Také emisní záření může být při průchodu vzorkem absorbováno. Tato tzv. **reabsorpce** se projevuje zeslabením emisního záření a deformací emisních spekter.

O tom, zda se u neznámého vzorku uplatňuje efekt vnitřního filtru nebo reabsorpce, se nejlépe přesvědčíme tak, že změříme předem jeho absorpční spektrum. Má-li roztok v kyvetě o tloušťce absorbující vrstvy 1 cm absorbanci 0,04, pak se paprsek na vzdálenosti 0,5 cm (polovina tloušťky kyvety) zeslabí téměř o 5 %. Proto by měřené roztoky měly mít jak na excitační, tak i na emisní vlnové délce hodnotu absorbance nižší. Nemáme-li možnost změřit absorbanci vzorku, můžeme porovnat fluorescenční signály pro různě naředěný vzorek.



Obr.3: Nekorigované excitační a emisní spektrum anthracenu v methanolu

Přístroj Fluoromax-2, excitační spektrum (————) změřeno pro emisní vlnovou délku 399 nm, emisní spektrum (-----) bylo buzeno zářením o vlnové délce 251 nm. Koncentrace anthracenu $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr.4: Absorpční spektrum anthracenu v methanolu

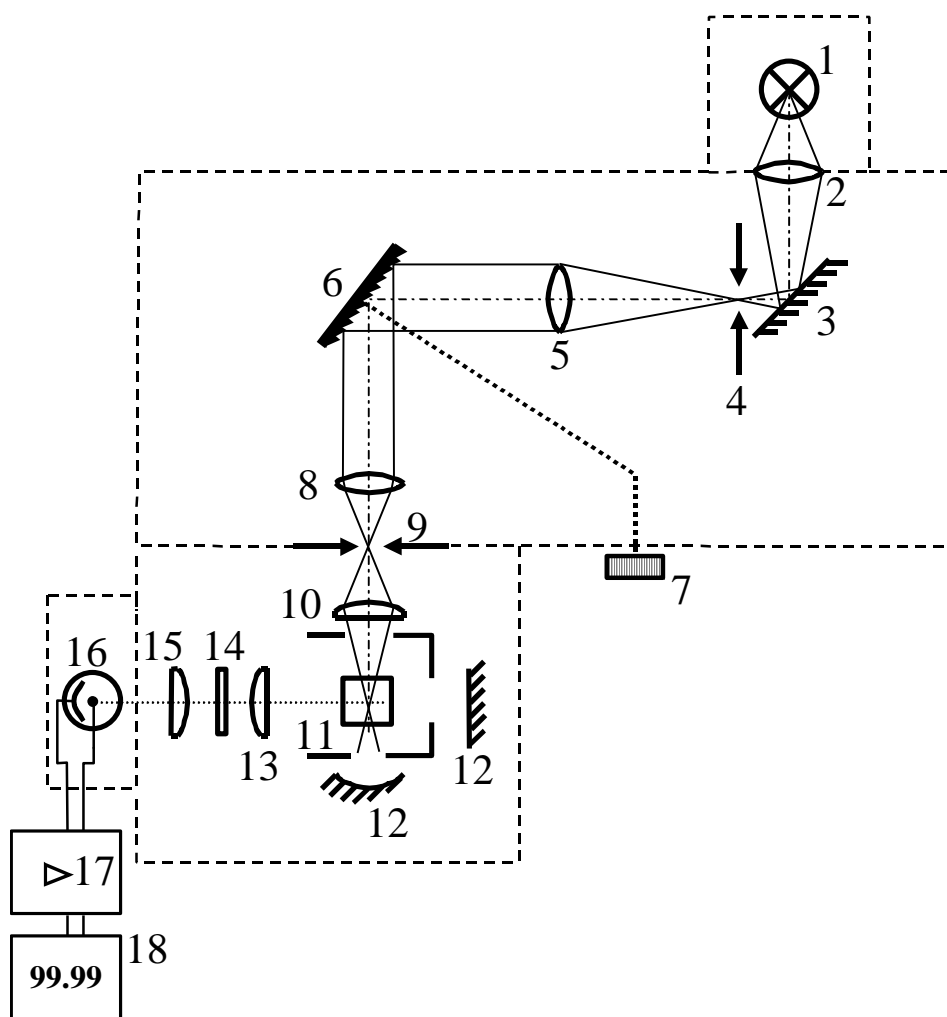
Koncentrace anthracenu $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, kyveta 1 cm

Měření na přístroji SPEKOL 11 s fluorescenčním nástavcem

Laboratoře jsou vybaveny přístrojem SPEKOL 11 (výrobce Carl Zeiss, Jena). Je to jednopaprskový absorpční spektrofotometr s mřížkovým monochromátorem nastavitelným v rozsahu vlnových délek 310 – 850 nm. Pro měření fluorescence je vybaven nástavcem FK, kterým se nahradí nástavec pro měření absorpce. Funkční schéma tohoto uspořádání je na **obr.5**.

Jako zdroj excitačního záření (1) může být použita halogenová žárovka, která je běžným vybavením přístroje. Pro vlnové délky 365, 406, 436, 546 a 578 nm lze ale dosáhnout intenzivnější excitace rtuťovou výbojkou, která na těchto čarách vyzařuje velmi silně. Rtuťová výbojka je napájena ze sítě přes tlumivku, jejíž impedance určuje velikost střídavého proudu, který výbojkou prochází. Záření ze zdroje je soustředěno kondenzorem (2) na vstupní štěrbinu monochromátoru (4). Excitační záření o zvolené vlnové délce vystupující štěrbinou (9) z monochromátoru můžeme v případě potřeby zeslabit štěrbinovou clonkou. Také může být do dráhy paprsku zařazen hranový filtr, který zadržuje záření o vlnové délce větší než 390 nm, zatímco záření o kratších vlnových délkách propouští. Filtr je vhodné použít při práci v ultrafialové oblasti, protože se jím omezí rušivé rozptýlené záření. Toto záření v důsledku rozptylu na stěnách a optických prvcích monochromátoru opouští jeho výstupní štěrbinu, ačkoliv nemá vlnovou délku, na kterou je monochromátor nastaven.

Fluorescenční nástavec je přidržován dvěma šrouby u výstupní štěrbinu monochromátoru (9). Excitační záření z monochromátoru je soustředěno objektivem (10) do kyvety (11). Otočný držák dvou kyvet umožňuje jejich střídavé přemísťování do kyvetového prostoru. Vybuzené fluorescenční záření vystupující z kyvety v kolmém směru z oblasti zhruba uprostřed kyvety je měřeno fotonkou (16). Mezi fotonku a kyvetu je možno umístit sekundární filtr (14) buď interferenční s úzkými pásmy propustnosti, nebo hranový, který propouští vlnové délky delší než je vlnová délka jeho absorpční hrany. Držák kyvet dosedá na kolíček ve spodní části nástavce, který otvírá uzávěrku zabraňující dopadu světla na fotonku během výměny vzorku. Ve fotonkové skříňce jsou k dispozici dvě fotonky, které je možno zařadit do dráhy paprsku táhlem. Při zatlačeném táhlu je používána „modrá“ fotonka, která je citlivá na záření o vlnových délkách od 360 do 650 nm. Vytažením táhla bychom zvolili „červenou“ fotonku, která je nad vlnovou délkou 650 nm citlivější než „modrá“ fotonka.



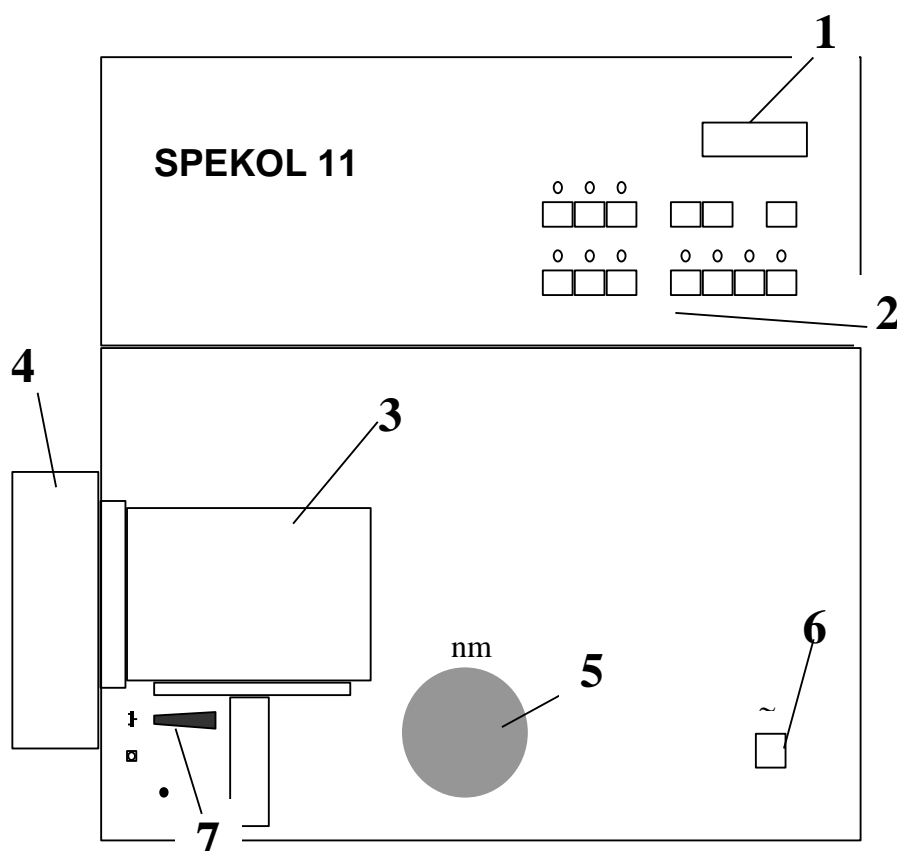
Obr.5: Schéma přístroje SPEKOL 11 s fluorescenčním nástavcem

1-excitační zdroj (halogenová žárovka nebo rtuťová výbojka), 2-kondenzor, 3-odrazné zrcadlo, 4-vstupní štěrbina monochromátoru, 5-kolimátor, 6-odrazová disperzní mřížka, 7-bubínek vlnových délek, 8-objektiv, 9-výstupní štěrbina monochromátoru, 10-objektiv, 11-kyveta se vzorkem, 12-zrcátka, 13-objektiv, 14-vyměnitelný sekundární filtr, 15-objektiv, 16-fotonka, 17-zesilovač a digitální zpracování signálu, 18-displej

Signál fotonky je po zesílení digitalizován a před zobrazením na displeji (18) dále zpracován. Při měření fluorescence je odečtena úroveň předem změřeného slepého pokusu. Pak je signál vydělen předem změřeným signálem srovnávacího vzorku a vynásoben předem zvolenou hodnotou faktoru, který může mít např. hodnotu koncentrace analytu ve srovnávacím vzorku. Bez předchozího proměření srovnávacího vzorku a zadání faktoru přístroj měření fluorescence neumožňuje.

Přístroje v laboratoři používají jako zdroj excitačního záření rtuťovou výbojku. Její poloha je již předem seřizena tak, aby monochromátorem procházel co nejintenzivnější tok excitačního záření. Výbojka se zapálí sama poté, co připojíme tlumivku na síť 230 V~ a zapneme vypínač na tlumivce. Záření výbojky dosáhne stabilizované úrovně asi po 5 minutách.

Na **obr.6** je vyobrazena čelní stěna přístroje SPEKOL 11 se základními ovládacími prvky. Vlastní přístroj uvedeme do chodu následujícím způsobem.



Obr.6: Čelní panel fotometru SPEKOL 11

1-displej, 2-tlačítka pro volbu typu měření, 3-nástavec FK pro měření fluorescence, 4-skříň fotonek, 5-bubínek vlnových délek, 6-síťový vypínač, 7-páčka pro zařazení filtru nebo clony

1. Přístroj zapojíme síťovou šňůrou na síť 230 V~. Zapneme síťový vypínač (6) na čelní stěně přístroje. Po jeho stisknutí se rozsvítí displej (1) a indikační diody nad tlačítka (2) blikají.
2. SPEKOL 11 necháme asi 15 minut temperovat.
3. Bubínkem vlnových délek (5) nastavíme excitační vlnovou délku. Pokud je tato vlnová délka nižší než 390 nm, přepneme páčku (7) do horní (vodorovné) polohy, čímž zařadíme do dráhy excitačního paprsku filtr pro potlačení rozptýleného záření. Pokud nebudeme měřit emisní signály pro vlnové délky nad 650 nm, zkontrolujeme, zda na fotonkové skříňce (4) je táhlo zatlačeno, tj. že je používána „modrá“ fotonka.
4. Pro měření fluorescence stiskneme tlačítko **FL**. Začnou blikat tlačítka **Z-FL** a **FAKT**.
5. Přiřadíme nulovou hodnotu fluorescenci pozadí tak, že necháme kyvetový prostor prázdný a vysuneme stolek směrem dolů asi o 5 mm, aby byla

uzavřena uzávěrka před fotonkou, a stiskneme tlačítko **Z-FL**. Toto tlačítko přestane blikat, začne blikat tlačítko **R**.

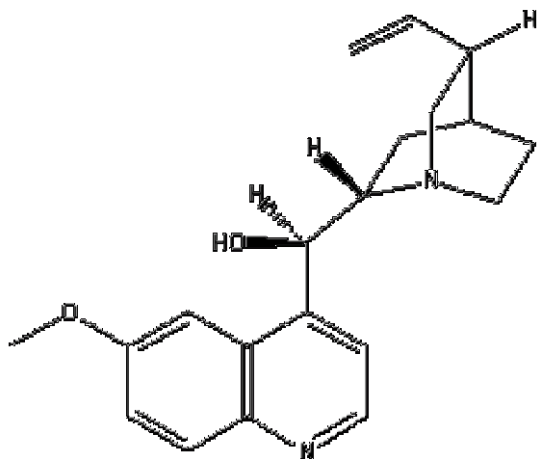
6. Zadáme hodnotu signálu, kterou chceme přiřadit fluorescenci našeho srovnávacího vzorku. Může to být i jeho koncentrace. Stiskneme tlačítko **FAKT**. Na displeji se objeví hodnota 1.000, kterou postupným stiskem tlačítek **POS** a **INC** upravíme na požadovanou hodnotu (včetně polohy desetinné tečky). Pokud srovnávací vzorek má nejintenzivnější fluorescenci z celého měřeného souboru vzorků, volíme hodnotu tak, abychom co nejlépe využili všechna čtyři místa displeje (např. 9.000). Dalším stiskem tlačítka **FAKT** uložíme tuto hodnotu do paměti přístroje. Bliká pouze tlačítko **R**.
7. Změříme signál srovnávacího vzorku. Do kyvetového prostoru umístíme srovnávací vzorek (nejkoncentrovanější roztok kalibrační závislosti nebo fluorescenční standard). Stiskneme tlačítko **R**, přístroj automaticky nastaví optimální zesílení a na displeji se objeví přibližně hodnota zadaná v předchozím kroku.
8. Při měření umístíme vzorek do kyvetového prostoru a na displeji odečteme fluorescenční signál.

UPOZORNĚNÍ! Přístroj obsluhujte přesně podle uvedeného návodu. Poruchu hlasejte ihned asistentovi. Při manipulaci s kyvetou ji držte za horní rohy a zacházejte s ní šetrně. Plňte ji asi 3 mm pod horní okraj. Kyvety **zásadně** uvnitř nevysušujte a nečistěte, snadno se rozlomí nebo rozlejí. Při plnění roztokem stačí, když kyvetu několikrát (min. 3x) vypláchnete měřeným roztokem. Při plnění pokud možno nespočíte vnější stěny kyvety. Pokud budou vnější stěny mokré, jemně vysušte pouze kapky hranou filtračního papíru nebo buničiny. **Kyvety neotírejte a neleštěte**, protože se snadno poškrábou, a tím znehodnotí. Čistotu kontrolujte prohlédnutím kyvety proti světlu. I slabě znečištěná okénka (ulpěné kapky, otisky prstů) zkreslí měření fluorescence. Při vkládání kyvety (nebo fluorescenčního standardu) si všimněte, že **kyveta nemá přesně čtvercový průřez**. Její delší strana musí být při vkládání do držáku a při měření rovnoběžná se stěnou přístroje (tj. kolmá na excitační paprsek). Jinak se může kyveta snadno poškodit. Při manipulaci s držákem pracujte opatrně. Každý prudší pohyb naplněné kyvety způsobí vylití roztoku do přístroje a potřísnění okének kyvety.

Návod laboratorní práce

Fluorimetrické stanovení chininu v nápojích

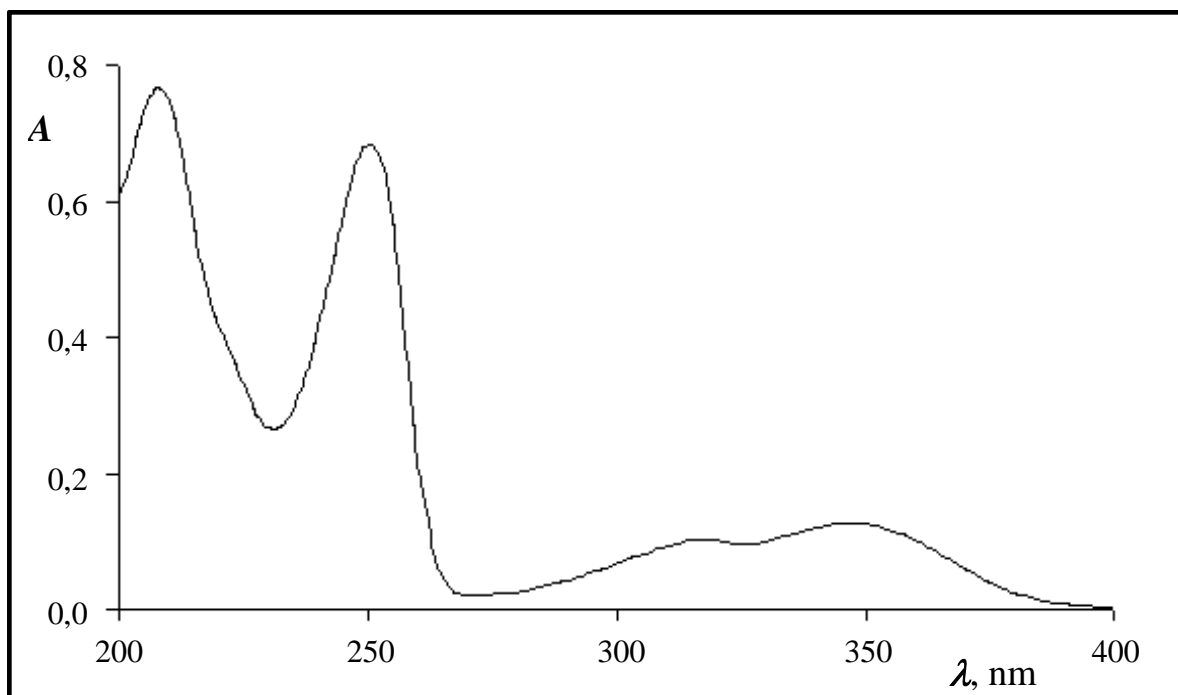
Úkolem práce je stanovit chinin v předloženém kapalném vzorku a ve vzorku nápoje.



Obr.7: Strukturní vzorec chininu

Chinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ($M_r=324,42$) je alkaloid, jehož strukturální vzorec je na **obr. 7**. Chinin se vyskytuje v kůře tropických stromů rodu *Cinchona*. Stále ještě je významným lékem proti malárii. Má výrazně hořkou chuť a je proto přidáván do některých typů nápojů. Oba dusíkové atomy v molekule chininu mohou být protonizovány. Opětná disociace těchto vodíkových iontů je charakterizována disociačními konstantami přibližně $pK_1=4,3$ (chinolinový dusík) a $pK_2=8,3$ (chinuklidinový dusík). S kyselinami tvoří chinin soli. Bývá dodáván ve formě síranu $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ ($M_r=782,96$), který je ale do určité míry hygroskopický, takže obsah vody v různých preparátech může značně kolísat. Jeho roztoky za určitých podmínek jasně modře fluoreskují. Jeho emisní spektrum leží v oblasti vlnových délek nad 400 nm s širokým maximem okolo 460 nm. Fluorescenční vlastnosti chininu jsou poměrně dobře prozkoumány, a proto se často používá při fluorescenčních měřeních jako srovnávací látka. Jeho fluorescence je do určité míry zhasena např. chloridovými či bromidovými ionty.

Absorpční spektrum plně protonizované formy chininu je uvedeno na **obr. 8**. Z tohoto spektra je vidět, že k excitaci fluorescence chininu je celkem dobře použitelná skupina čar rtuťové výbojky okolo vlnové délky 365 nm. Molární absorpční koeficient chininu pro tuto vlnovou délku je $3,62 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Obr.8: Absorpční spektrum roztoku chininu v 0,05 M kyselině sírové
 Koncentrace chininu $2,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, tloušťka kyvety 1 cm.

Úkoly

1. Nastavte excitační monochromátor na vlnovou délku rtuťových čar okolo 365 nm tak, aby fluorescenční signál chininu byl maximální.
2. Proměřte závislost fluorescenčního signálu chininu na kyselosti roztoku přibližně v oblasti pH = 1 až pH = 5.
3. Na základě výsledků z bodu 2 zvolte prostředí vhodné pro přípravu kalibrační závislosti a analýzu vzorků. Pro toto prostředí změřte orientačně fluorescenční signál roztoků analyzovaného vzorku a nápoje.
4. Připravte kalibrační roztoky, naředěné roztoky vzorku, nápoje a nápoje s přidaným standardem a proměřte jejich fluorescenční signály.
5. Zpracujte kalibrační závislost a určete hmotnostní koncentraci chininu ve vzorku a v nápoji.

Pracovní návod

1. *Příprava pracovního roztoku chininu.* Ze základního roztoku chininu o koncentraci $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, který je v laboratoři k dispozici, připravíte do odměrky 250 ml pracovní roztok chininu o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.
2. *Příprava roztoků chininu s různou hodnotou pH.* Do 5 odměrek na 25 ml připravíte řadu pěti roztoků chininu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ s různou hodnotou pH podle **tabulky I.**

Tabulka I: Příprava 25 ml roztoku o přibližném pH

pH	Dávkový objem roztoku, ml		
	0,25 M H ₂ SO ₄	0,0125 M H ₂ SO ₄ ^a	0,4 M octanový tlumič pH=5
1	5,0	-	-
2	-	10,0	-
3	-	1,0	-
4	4,2	-	5,0
5	-	-	5,0

^a Octanový tlumič a 0,25 M kyselina sírová jsou v laboratoři k dispozici. Zředěná 0,0125 M kyselina sírová se připraví naředěním 0,25 M kyseliny. Pro celou práci vystačíte s 50 ml tohoto roztoku.

3. *Spuštění a nastavení fluorimetru.* Fluorimetr zapnete a připravíte k měření způsobem popsaným výše. Monochromátor nastavíte na vlnovou délku 365 nm a zařadíte do excitačního paprsku filtr omezující rozptýlené záření (páčka (7) na **obr.6** v horizontální poloze). Přístroj vynulujete s prázdným kyvetovým prostorem a fluorescenci bezbarvého fluorescenčního standardu přiřadíte hodnotu 9,000.

4. *Nastavení excitačního monochromátoru na maximum intenzity rtuťových čar 365 nm.* Do kyvetového prostoru umístíte kyvetu s roztokem chininu o pH = 1 a proměříte jeho excitační spektrum v rozmezí 335 až 375 nm s krokem 5 nm. V okolí maxima proměříte závislost podrobněji s krokem 1 nm. (Spektrální šířka pásma monochromátoru přístroje SPEKOL 11 činí 11 nm, hlavní složky multipletu rtuťových čar v okolí 365 nm mají vlnové délky 365,01 , 365,48 a 366,33 nm.) Monochromátor nastavíte na vlnovou délku, pro niž bude fluorescence roztoku nejsilnější. S tímto nastavením provedete celé další měření.

5. *Určení vhodného pH pro stanovení chininu.* Po nastavení excitační vlnové délky podle předchozího bodu znovu přiřadíte bílému fluorescenčnímu standardu hodnotu signálu 9,000 a proměříte fluorescenční signál pro všechny roztoky chininu připravené v bodě 2. Prostředí, které je pro fluorimetrické stanovení chininu nejvhodnější, použijete ve všech dalších měřeních.

6. *Orientační proměření signálu vzorků.* Do odměrek na 25 ml odměříte 1 ml zadaného vzorku a analyzovaného nápoje a upravíte prostředí podle závěrů z bodu 5. Změříte fluorescenční signál připravených roztoků.

7. *Příprava kalibračních roztoků.* Pro zvolené prostředí připravíte kromě roztoku bez chininu ještě 5 dalších kalibračních roztoků s **rovnoměrně** rostoucí koncentrací. Ani pro nejkonzentrovanejší roztok kalibrační závislosti by se neměl zřetelně uplatnit efekt vnitřního filtru. Proto jeho koncentraci zvolíte tak, aby jeho absorbance pro excitační vlnovou délku 365 nm byla v kyvetě o tloušťce 1 cm nižší než 0,04. Měla by být ale vyšší než asi 0,03, aby fluorescenční signál nebyl příliš slabý. Molární absorpční koeficient chininu pro vlnovou délku 365 nm je $3,62 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

8. *Naředění vzorků.* Zadaný vzorek naředíte na základě výsledků z bodu 6 tak, aby jeho koncentrace ležela v nejvyšší třetině kalibrační závislosti. Připravíte

paralelně tři stejně naředěné roztoky. Při analýze nápoje budete postupovat metodou přídatku standardu. Do dvou odměrek na 25 ml odměříte takový objem nápoje, aby koncentrace chininu ležela po doplnění po značku zhruba v polovině kalibrační závislosti. Do druhé odměrky pak navíc přidáte 4 ml pracovního roztoku chininu o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Všechny roztoky vzorků naředěné pro měření musejí mít stejně upravené prostředí jako kalibrační roztoky.

9. *Stanovení chininu ve vzorcích.* Změříte fluorescenční signály kalibračních roztoků a všech roztoků vzorků. Pro každý roztok odečtete z displeje náhodně 10 hodnot, které zadáte jako vstupní data do jednoho listu souboru programu Excel, který je k dispozici na počítači v laboratoři. Na tomto předem připraveném listu je spočten průměr těchto signálů a zpracuje se jak lineární, tak i kvadratická kalibrační závislost metodou vážené lineární regrese (viz Dodatek). Posoudíte, zda vaše měření prokazují zakřivení kalibrační závislosti, a zvolíte odpovídající typ kalibrace pro určení koncentrace chininu ve vzorcích. Vypočtete koncentrace chininu v roztocích vzorků a přepočtete je na hmotnostní koncentraci v původních vzorcích. Do protokolu uvedete průměrné hodnoty signálů pro kalibrační závislost a vzorky, parametry použité kalibrační závislosti a provedete kontrolní výpočty koncentrací včetně přepočtu koncentrace na původní vzorek. Posoudíte, zda matrice nápoje ovlivňuje fluorescenci chininu. Výsledky uvedete včetně nejistoty, kterou přenesete z výpočtů v Excelu, rozšířené nejistoty a koeficientu rozšíření s patřičným počtem platných cifer.

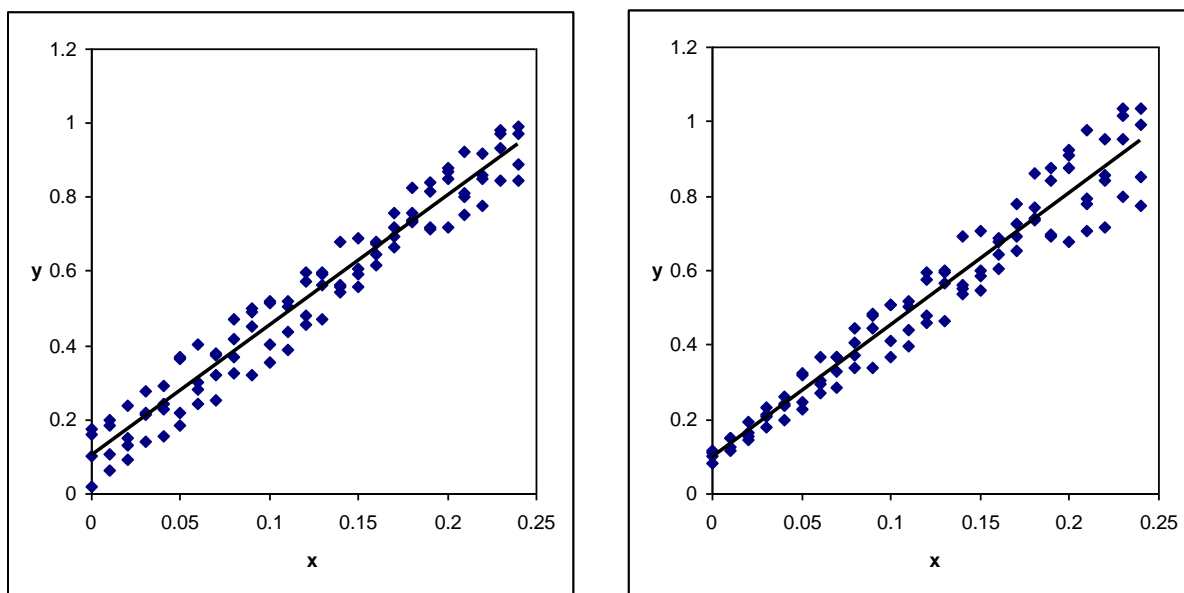
Kontrolní otázky

1. Co je to emisní fluorescenční spektrum?
2. Co je to excitační fluorescenční spektrum a jaký bude postup při měření excitačního a emisního spektra na spektrofluorimetru vybaveném excitačním a emisním monochromátorem?
3. Jaké děje probíhají v molekulách fluoreskující látky při buzení a emisi fluorescenčního záření a jaká nerovnost proto platí mezi vlnovou délkou excitačního a emitovaného záření?
4. Jak závisí tvar emisního spektra na excitační vlnové délce pro jednu fluoreskující látku a pro směs fluoreskujících látek?
5. Jak závisí tvar excitačního spektra na emisní vlnové délce pro jednu fluoreskující látku a pro směs fluoreskujících látek?
6. Co je to pravidlo zrcadlové symetrie?
7. Jak závisí fluorescenční signál na koncentraci fluoreskující látky v roztoku?
8. Jaká je souvislost mezi absorpčním a excitačním spektrem?
9. Co je to efekt vnitřního filtru a reabsorpce?
10. Co je to korekce fluorescenčních spekter a jaké jsou hlavní příčiny zkreslení nekorigovaných excitačních a emisních spekter?

Pro zpracování kapitoly byla použita práce: M Hejtmánek a K. Volka: Emisní fluorescenční spektroskopie ve skriptech Laboratorní cvičení z instrumentální analýzy. (M. Hejtmánek a kol.), str.101. VŠCHT, Praha 1981.

DODATEK: VYHODNOCENÍ KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI V PRÁCI FLUORIMETRIE

V této práci se k vyhodnocení dat metodou kalibrační závislosti příliš nehodí běžná metoda lineární regrese, protože používá předpoklad homoskedasticity, tj. konstantní nejistoty závisle proměnné v celém jejím rozsahu (**obr.9a**). Tento předpoklad ale při fluorimetrickém stanovení není zpravidla splněn a rozložení experimentálních bodů v kalibrační závislosti se více blíží **obr.9b**. V takových (heteroskedastických) případech je obvyklé použít metodu vážené lineární regrese, která bere rozdíly v nejistotě závisle proměnné do úvahy, vyžaduje ale předběžnou znalost nejistot závisle proměnné pro jednotlivé experimentální body. Pokud je k dispozici dostatečně velký počet bodů, jako je tomu na **obr. 9**, můžeme proměnlivost nejistoty odhadnout z těchto dat. V laboratořích je však kalibrační závislost zkonstruována pouze ze 6 bodů. Pak je třeba vycházet z poznatků získaných během validace metody nebo použít pro nejistoty dobře zdůvodněný model.



Obr.9: Lineární závislost s konstantní nejistotou závislé veličiny (a) a s nejistotou úměrnou této veličině (b)

Při fluorimetrickém měření jsou hlavní příspěvky k nejistotě měřeného signálu přibližně přímo úměrné úrovni tohoto signálu. Sem patří faktory jako např. nestabilita zdroje excitačního záření, obsah dalších složek vzorku, které absorbují záření, poloha kyvety, světelné ztráty odrazy na stěně kyvety a na nečistotách a částečně také nejistota fotometru měřícího zářivý tok. Do nejistoty měřeného signálu se promítá také nejistota koncentrace kalibračních roztoků. Ta by podle předpokladů, z nichž metoda lineární regrese vychází, měla být zanedbatelná, ale ve skutečnosti tomu tak nemusí být. Při ředění spíše bývá konstantní relativní nejistota koncentrace

výsledného roztoku, na níž se podílí např. proměnná teplota, doplňování odměrky po značku, nejistota kalibrace odměrného nádobí, u pipet kalibrovaných na vylití podíl kapaliny ulpělý na stěnách a ve špičce pipety, odpařování rozpouštědla nebo odparek a nečistoty, které se opláchnou z hrdla nádoby při vylévání roztoku.

Při nízkých úrovních zářivého toku je nejistota jeho měření úměrná druhé odmocnině zářivého toku. Je tomu tak v případě, kdy signál vzniká zprůměrováním fotoproudu generovaného nízkým počtem fotonů, protože jejich počet se řídí Poissonovou statistikou. Fotometr použitý v této práci ovšem tak nízké úrovně měřit nemůže.

Jen menší část nejistoty měřeného signálu na úrovni tohoto signálu nezávisí. K této části přispívá např. rozptýlené záření, fluorescenční záření nečistot, parazitní světlo z okolí, které se dostane k detektoru, a částečně nejistota fotometru měřícího zářivý tok. Z těchto důvodů se jako přiměřený model nejistoty signálu jeví lineární závislost mezi nejistotou a signálem.

Odhad parametrů závislosti a nejistot metodou lineární regrese

Metoda lineární regrese předpokládá, že platí lineární závislost mezi závisle proměnnou veličinou y a jedním nebo několika členy (proměnnými) x_k ve tvaru

$$y = \sum_{k=1}^p a_k x_k \quad (1)$$

kde a_k jsou konstanty a p je počet členů. Metoda lineární regrese poskytuje odhad koeficientů a_k a případně i dalších parametrů na základě řady n hodnot y_i určených pro n kombinací členů x_{ki} ($i=1..n$). Přitom hodnoty y_i jsou zatíženy nejistotou, o níž běžná metoda lineární regrese předpokládá, že je konstantní v celém rozsahu hodnot y . Nejistota členů x_{ki} se předpokládá nulová. Metoda lineární regrese určuje odhady parametrů \hat{a}_k jako hodnoty, které poskytují minimální hodnotu součtu druhých mocnin residuálních odchylek, tj. rozdílů hodnot y_i a hodnot \hat{y}_i vypočtených ze vztahů

$$\hat{y}_i = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{k,i} \quad i = 1, \dots, n \quad (2)$$

Minimalizace (residuálního) součtu čtverců

$$S_{\text{res}} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n \left(y_i - \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{ki} \right)^2 \quad (3)$$

vyžaduje, aby jeho parciální derivace podle všech koeficientů \hat{a}_i byly nulové, což vede na soustavu lineárních rovnic pro odhady koeficientů \hat{a}_k ve tvaru

$$\sum_{i=1}^n y_i x_{li} = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k \sum_{i=1}^n x_{ki} x_{li} \quad l = 1, \dots, p \quad (4)$$

resp.

$$S_l = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k S_{kl} \quad l = 1, \dots, p \quad (5)$$

Součty

$$S_l = \sum_{i=1}^n y_i x_{li} \quad (6)$$

jsou lineární funkcí y_i , zatímco matice soustavy

$$S_{kl} = \sum_{i=1}^n x_{ki} x_{li} \quad (7)$$

závisí pouze na hodnotách x_{ki} a na hodnotách y_i nezávisí. Znamená to, že ani inverzní matice S^{inv} není na hodnotách y závislá a řešení

$$\hat{a}_k = \sum_{l=1}^p S_l S_{kl}^{\text{inv}} \quad k = 1, \dots, p \quad (8)$$

je prostřednictvím součtů S_l lineární funkcí hodnot y_i . Nejistotu odhadů těchto koeficientů je tak možno určit podle jednoduchých pravidel o šíření nejistot, pokud určíme nejistotu hodnot y . Pokud není známo nic jiného, pokládá se za tuto nejistotu její odhad s_y z residuálního součtu čtverců podle vztahu

$$s_y^2 = \frac{S_{\text{res}}}{n-p} \quad (9)$$

Výše popsáný způsob vyhodnocení je používán i v analytické chemii k vyhodnocení kalibrační závislosti analytického signálu y na obsahu analytu x . Tato závislost na obsahu x bývá často lineární, může být ale popsána např. polynomem vyššího stupně, kdy sčítanci ve funkčním vztahu jsou násobky mocnin $1, x, x^2, \dots, x^s$, kde s je stupeň polynomu. Prvý člen určuje úsek na ose y . Pro lineární závislost y na x vyplývá z tohoto postupu i známý vztah (10) pro nejistotu obsahu \hat{X} odhadnutého z kalibrační závislosti pro průměrnou hodnotu signálu Y získanou z m měření

$$u(\hat{X})^2 = \frac{s_y^2}{\hat{a}_1^2} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(Y - \bar{y})^2}{\hat{a}_1^2 Q_{xx}} \right) \quad (10)$$

kde \hat{a}_1 je (odhadnutá) směrnice závislosti, veličina

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (11)$$

je střední hodnota signálů y a Q_{xx} je rozptyl hodnot x_i okolo střední hodnoty \bar{x} :

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (12)$$

Odhad parametrů závislosti a nejistot metodou vážené lineární regrese

Metoda vážené lineární regrese odhaduje koeficienty a další veličiny minimalizací váženého součtu

$$S_{\text{res},w} = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n w_i \left(y_i - \sum_{k=1}^p \hat{a}_k x_{ki} \right)^2 \quad (13)$$

kde w_i jsou váhy přiřazované jednotlivým bodům. Vyšší váha je přiřazována bodům s menší nejistotou hodnoty y podle vztahu

$$w_i = \frac{K}{u(y_i)^2} \quad (14)$$

a koeficient K se volí tak, aby součet vah byl roven počtu bodů n . Je tedy

$$K = \frac{n}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{u(y_i)^2}} \quad (15)$$

a platí též

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n w_i u(y_i)^2}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i u(y_i)^2}{\sum_{i=1}^n w_i} = w_j u(y_j)^2 \quad (16)$$

To znamená, že koeficient K je roven váženému kvadrátu nejistoty, tj. součinu kvadrátu nejistoty a váhy, pro každý bod i jejich váženému průměru a nahrazuje jednu hodnotu nejistoty při lineární regresi s konstantní hodnotou nejistoty. Stojí za povšimnutí, že váhy a proto ani odhady parametrů závislosti nejsou závislé na absolutní velikosti nejistot pro jednotlivé body, ale pouze na jejich vzájemném poměru. Pokud zvětšíme všechny nejistoty ve stejném poměru, váhy ani odhady samotných parametrů to neovlivní. Nezmění se ani minimalizovaný residuální součet čtverců, změní se ale odhady nejistot některých odvozených parametrů.

Další postup je podobný jako pro metodu lineární regrese s konstantními nejistotami. Parciální derivace vedou na soustavu lineárních rovnic pro koeficienty \hat{a}_k ve tvaru

$$\sum_{i=1}^n w_i y_i x_{li} = \sum_{k=1}^p \hat{a}_k \sum_{i=1}^n w_i x_{ki} x_{li} \quad l = 1, \dots, p \quad (17)$$

tj. ve stejném tvaru jaký má soustava rovnic (5), kde ale nyní vystupují vážené součty

$$S_{l,w} = \sum_{i=1}^n w_i y_i x_{li} \quad (18)$$

kteří jsou opět lineární funkcí y_i , zatímco matice soustavy

$$S_{kl,w} = \sum_{i=1}^n w_i x_{ki} x_{li} \quad (19)$$

závisí pouze na hodnotách x_{ki} a vahách w_i a nezávisí na hodnotách y_i . Znamená to, že výpočet odhadů koeficientů \hat{a}_k je analogický jako při nevážené regresi (rovnice 8). Dokonce i při určování nejistot koeficientů jsou vztahy stejné s tím, že kvadrát nejistoty hodnot y se nahradí váženým kvadrátem nejistoty, tedy konstantou K , a ta se analogicky vztahu (9) odhadne z váženého residuálního součtu čtverců (13)

$$K = s_{y,w}^2 = \frac{S_{\text{res},w}}{n-p} \quad (20)$$

Při určení nejistot hodnot \hat{X} odhadnutých z regresní závislosti je ale třeba použít také nejistotu hodnoty Y odpovídající příslušné oblasti a např. vztah (10) přejde na

$$u(\hat{X})^2 = \frac{1}{\hat{a}_1^2} \left(\frac{u(Y)^2}{m} + \frac{s_{y,w}^2}{n} + \frac{s_{y,w}^2 (Y - \bar{y}_w)^2}{\hat{a}_1^2 Q_{xx,w}} \right) \quad (21)$$

Pro určení nejistoty \hat{X} tedy potřebujeme použít i konkrétní nejistotu hodnoty Y v dané oblasti plynoucí z použitého modelu s určenou hodnotou konstanty K .

Použití souboru pro Excel v laboratoři

V laboratoři je pro zpracování kalibrační závislosti na počítačích k dispozici předem připravený soubor pro Excel. Obsahuje několik stejných listů, z nichž jeden nepoužitý přejmenujete na své jméno. Nebudete zasahovat do jiných listů s daty vašich kolegů. Po úpravách ukládáte vždy celý soubor pod původním jménem.

Vstupní data jsou zadávána do žlutě podbarvených buněk. Kromě koncentrací kalibračních roztoků v oblasti C10:C15 je to pro každý roztok v kalibraci i pro vzorky 10 hodnot odečtených náhodně z kolísajících údajů displeje fluorimetru, které vložíte do oblasti D10:M20. K dalšímu vyhodnocení jsou použity průměry těchto hodnot spočtené v oblasti N10:N20. Pipetované objemy se zadávají do oblasti N21:N26. Odhady koeficientů kalibrační závislosti jsou spočteny v oblasti N33:N34 (N47:N49) pro lineární (kvadratickou) závislost. Z těchto hodnot a ze změřeného signálu pro vzorek je určena koncentrace chininu v měřeném roztoku v buňce N36 (N51) a přepočtena na ředění a na hmotnostní koncentraci v oblasti N37:N38 (N52:N53).

Koncentrace roztoku nápoje a roztoku nápoje s přídavkem standardu je spočtena z kalibrační závislosti v oblasti N39:N40 (N54:N55). Z těchto hodnot je spočtena (zdánlivá) výtěžnost R v buňce N41 (N56) jako podíl jejich rozdílu ku přidané koncentraci chininu. Touto hodnotou je vydělena koncentrace roztoku samotného nápoje a přepočtena na ředění a hmotnostní koncentraci v oblasti N42:N43 (N57:MN58). V buňce N44 (N59) je pro srovnání přímo přepočtena koncentrace chininu změřená v roztoku nápoje na ředění a hmotnostní koncentraci. Tato hodnota je výsledkem analýzy, pokud matrice nápoje neovlivní fluorescenční signál chininu ($R = 1$).

Při odhadu parametrů kalibrační závislosti se předpokládá lineární závislost nejistoty signálu na hodnotě signálu. V buňce Q2 je možno změnit hodnotu, která udává, kolikrát má být nejistota minimálního signálu nižší oproti nejistotě signálu maximálního. (Pokud se sem zadá hodnota 1, přejde vyhodnocení na běžnou metodu lineární regrese s konstantní nejistotou signálu.) Na základě této závislosti jsou určeny v oblasti Q10:Q20 relativní hodnoty nejistot signálů a z nich jsou v buňkách R10:R15 spočteny váhy jednotlivých kalibračních bodů. Ty jsou použity při vážené lineární regresi a poskytnou kromě odhadů koeficientů kalibrační závislosti také hodnotu $s_{y,w}$ v buňce N35 pro lineární a v buňce N50 pro kvadratickou kalibrační závislost. Na jejich základě je pak v buňce O6 určena konstanta K , a v buňkách O10:O20 je vytvořen model závislosti nejistoty signálu na jeho velikosti. Zda je model vytvořen pro lineární nebo kvadratickou závislost určuje hodnota v buňce O2 (pro 0 je model spočten pro lineární kalibraci, pro nenulovou hodnotu je zvolena kalibrace kvadratická). Z tohoto modelu jsou pak počítány nejistoty koncentrací spočtených ze

signálů pro vzorky v oblasti O36:O44 (O51:O59). Nejistoty objemů jsou zadány v oblasti O21:O26.

V oblasti T36:T59 jsou spočteny nejistoty výsledných hodnot s využitím Kragtenova schématu (T7:AK59) a jsou použity u výsledků získaných metodou přídavku standardu. V oblasti A31:H52 je pro srovnání proveden výpočet parametrů kalibračních závislostí obvyklou metodou nevážené lineární regrese.

V buňkách Q33:Q34 a Q47:Q49 je ověřováno, zda jsou koeficienty kalibrační závislosti statisticky významně odlišné od nuly. Jestliže se pro kvadratickou kalibrační závislost (buňka O2≠0) objeví v buňce Q49 "NEPRAVDA", není kvadratický koeficient statisticky významný a použijeme výsledky z lineární kalibrace poté, co v buňce O2 nastavíme nulovou hodnotu.