

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2018

**PETR
ADÁMEK**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin

Spectroscopic determination of protein concentration

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Mgr. Petr Adámek

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zuzana Fílová

Kladno 2018

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2017/2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Mgr. Petr Adámek**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin**
Téma anglicky: Spectroscopic determination of protein concentration

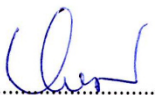
Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

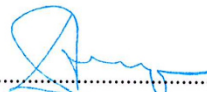
Realizujte sadu experimentů zaměřených na využití spektrofotometrie pro stanovení obsahu bílkovin v reálném vzorku. Pro stanovení použijte metodu podle Bradfordové. K měření využijte tyto tři přístroje: vertikální fotometr SUNRISE, UV-VIS spektrofotometr Libra S22 a UV-VIS spektrofotometr SPECORD. Navrhněte vhodný standard pro zpracování experimentálních dat získaných touto metodou. Vytvořte algoritmus na zpracování dat v prostředí MATLAB. Výsledky pro různé spektrofotometry porovnejte.

Seznam odborné literatury:

- [1] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O., Laboratorní techniky biochemie , ed. 1. vydání, VŠCHT Praha , 2006, ISBN 80-7080-586-2
- [2] František Opekar, Základní analytická chemie, ed. 1. vydání, Karolinum, Praha, 2005, ISBN 80-246-0553-8
- [3] ECKSCHLAGER, Karel, Chemometrie, ed. 1. vydání, Praha : Univerzita Karlova, 1991, 156 s.

Zadání platné do: 20.09.2019
Vedoucí: Ing. Zuzana Fílová
Konzultant: Mgr. Iveta Horáčková


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 19.02.2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 12. 5. 2018

.....
Mgr. Petr Adámek

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucí své bakalářské práce, paní Ing. Zuzaně Fílové, za její odbornou pomoc při řešení práce. Další poděkování patří paní Mgr. Ivetě Horáčkové jako konzultantce. Dále též panu RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D. jako externímu konzultantovi za pomoc s navržením statistického zpracování dat.

ABSTRAKT

Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin

Bakalářská práce se zabývá využitím spektrofotometrie metodou dle Bradfordové pro stanovení koncentrace bílkovin (metoda je využívána od roku 1976). Vzorek bílkoviny pro měření je získán z vaječného bílku. Vzhledem k tomu, že se jedná o nepřímou metodu, je jako standard použit roztok bovinního sérového albuminu. Využívá se zde měření na třech různých spektrofotometrech (značky: SUNRISE, Libra S22 a SPECORD®). K těmto přístrojům je v práci vytvořen standard pro zpracování dat včetně skriptu v MATLABu. Dále jsou v práci diskutovány a porovnány výsledky pro uvedené tři přístroje.

Klíčová slova:

spektrofotometrie, spektrofotometry, stanovení bílkoviny, metoda Bradfordové, standard zpracování dat, MATLAB

ABSTRACT

Spectroscopic determination of protein concentration

The bachelor thesis is focused on application of spectrophotometry using the Bradford method to determine protein concentration. The method has been used since 1976. A sample of the protein for measurement is obtained from egg white. Because it is an indirect method, a solution of bovine serum albumen is used as a standard. Measurements are made on three different spectrophotometers (brand names: SUNRISE, Libra S22 and SPECORD®). A standard for data processing, including a MATLAB script, is created for these devices. Furthermore, the results for the three instruments are discussed and compared.

Keywords:

spectrophotometry, spectrophotometers, determination of protein concentration, Bradford method, standard of data processing, MATLAB

Obsah:

1 Úvod.....	9
1.1 Přehled současného stavu.....	10
1.1.1 Spektrofotometrie a spektrofotometry.....	10
1.1.2 Bílkoviny, jejich vlastnosti a funkce v organismu	14
1.1.3 Vyšetření celkové bílkoviny a základní poruchy	15
1.1.4 Metody stanovení celkové bílkoviny.....	16
1.2 Cíle práce.....	20
2 Metody	21
2.1 Měřicí přístroje.....	21
2.1.1 vertikální fotometr SUNRISE	21
2.1.2 UV-VIS spektrofotometr Libra S22	24
2.1.3 UV-VIS spektrofotometr SPECORD®	25
2.2 Chemikálie.....	29
2.3 Použitá metoda měření v laboratoři.....	30
2.4 Popis funkce použitého skriptu v MATLABu.....	31
3 Výsledky.....	34
3.1 První sada výsledků.....	35
3.1.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE	35
3.1.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE	39
3.1.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	44
3.1.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	45
3.2 Druhá sada výsledků	50
3.2.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE	50
3.2.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE	51
3.2.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	56
3.2.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	57
3.3 Třetí sada výsledků.....	62
3.3.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE	63
3.3.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE.....	64
3.3.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	70
3.3.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	71
3.3.3 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE	76
3.3.3.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE.....	77

3.3.4 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22	81
3.3.4.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22.	82
3.4 Měření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD.....	87
4 Diskuze.....	88
5 Závěr.....	97
Seznam použité literatury	98
Příloha A: Pokyny k vyplňování dialogového okna v MATLABu.....	100
Příloha B: Použitý skript v MATLABu.....	102
Příloha C: Obsah přiloženého DVD	116

1 Úvod

Stanovení celkové bílkoviny je jedním z nejčastějších a nejzákladnějších úkolů v biochemické laboratoři. Bývá důležitou součástí postupu pro určování řady diagnóz. Výsledky analýz složení těla u dospělého muže ukazují výrazný podíl bílkovin na stavbě lidského organismu: 18 hmotnostních procent zde tvoří bílkoviny, což je nejvyšší podíl (hned po vodě – 60 %), další v pořadí jsou lipidy (15 %), dále minerální látky (5 %), sacharidy a nukleové kyseliny (po 1 %). [15]

V rámci bakalářské práce byla provedena sada experimentů zaměřených na využití spektrofotometrie pro stanovení bílkovin. V této práci bylo prováděno spektrofotometrické stanovení koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku [2,5]. Byla použita metoda podle Bradfordové, což je již poměrně dlouhou dobu všeobecně využívaná metoda (od roku 1976) [12] pro stanovení koncentrace bílkovin.

Stanovení koncentrace bílkovin ve vaječném bílku je jedna z úloh předmětu Laboratorní technika (pro studijní program Biomedicínská a klinická technika, studijní obor Biomedicínský technik). V této úloze studenti nemívají problém aplikovat metodu během měření koncentrace bílkovin v laboratoři, ale zásadním problémem bývá zpracování naměřených dat a správná prezentace výsledků. Postup zpracování výsledků v této úloze (standard) dosud nebyl jednoznačně stanoven. Vytvořením takového standardu budou dána jasná pravidla pro zpracování získaných hodnot a usnadní porovnávání výsledků měření od různých studentů.

Podle zadání práce byl navržen postup pro zpracování dat a porovnání výsledků pro tři různé spektrofotometry a byl navržen skript ve výpočetním prostředí MATLAB pro statistické zpracování dat. Tím byl vytvořen standard pro zpracování dat získaných touto metodou pro tři různé spektrofotometry. Měření bylo prováděno na vertikálním fotometru SUNRISE, UV-VIS spektrofotometru Libra S22 a UV-VIS spektrofotometru SPECORD, výsledky pro různé spektrofotometry byly porovnány.

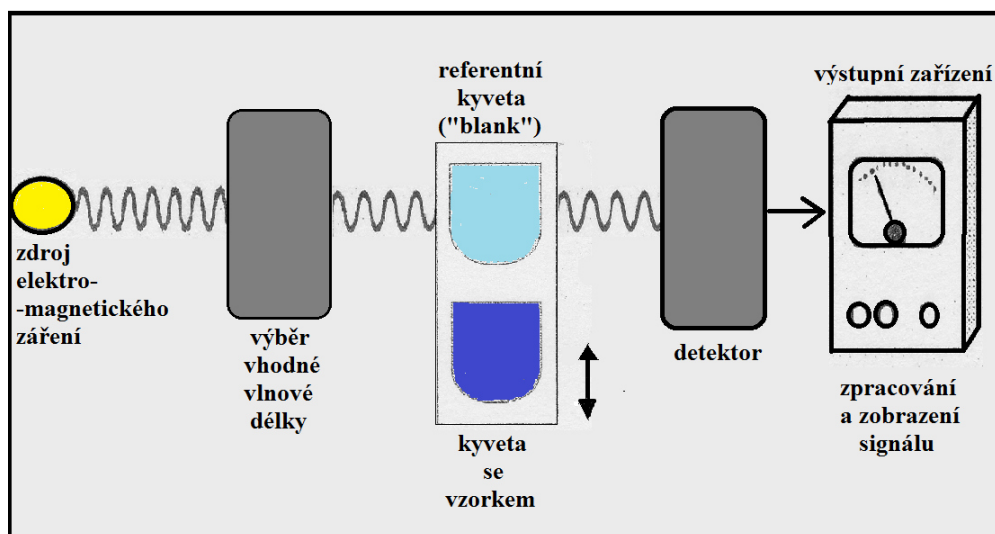
1.1 Přehled současného stavu

1.1.1 Spektrofotometrie a spektrofotometry

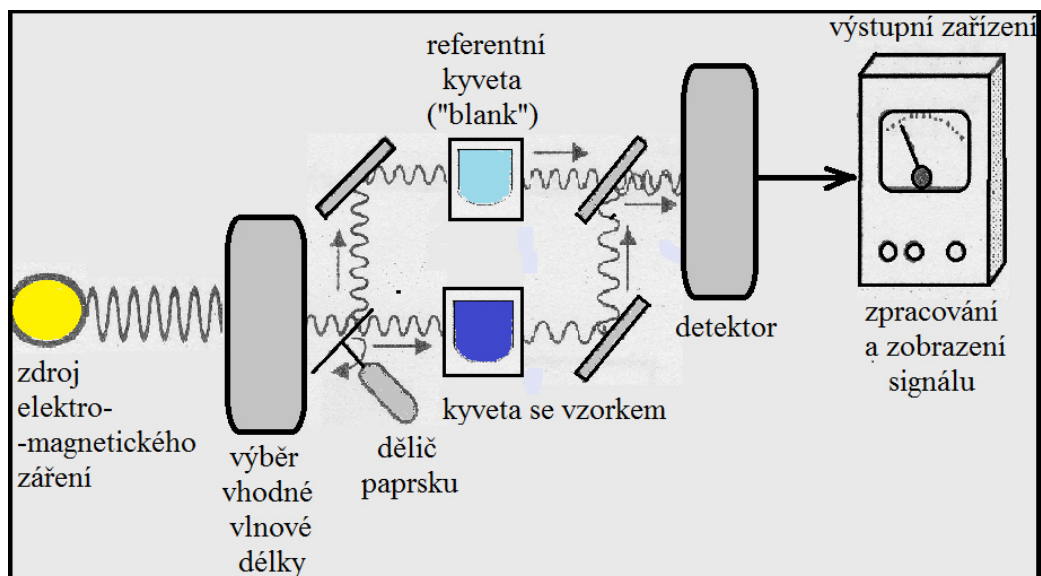
Spektroskopie patří mezi optické metody. Ty jsou založeny buďto na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením nebo na jeho produkci vzorkem. Optické metody můžeme dělit na nespektrální (nedochází k výměně energie mezi zářením a látkou) a spektrální (dochází k výměně energie mezi zářením a látkou). Spektrum je závislost veličiny, jež je mírou intenzity záření prošlého nebo vyslaného vzorkem, na vlnové délce záření. Spektrální metody lze dělit na emisní (po excitaci produkuje elektromagnetické záření sám vzorek) a absorpční (dochází k pohlcování elektromagnetického záření v různé míře v závislosti na vlnové délce), což je případ spektroskopie. [2]

V případě spektroskopie se používají tzv. spektrofotometry, což jsou optické přístroje, kterými se objektivně měří emisní nebo absorpční spektra látek [2,5]. Tyto přístroje mají určitou obecnou stavbu, která se de facto opakuje u každého přístroje. V dalším budeme popisovat přístroj pro detekci absorpčních spekter látek. Spektrofotometr obsahuje zdroj záření, optické prvky pro vedení paprsku přístrojem, prvek pro výběr vhodné vlnové délky, zařízení pro vzorek (obvykle kyveta), detektor elektromagnetického záření a vyhodnocovací/zobrazovací zařízení [2,5].

Základní je rozdělení na přístroje jednopaprskové a dvoupaprskové. Přístroj musí být nastaven na nulovou koncentraci analytu pomocí tzv. slepého vzorku, což se u jednopaprskového přístroje provádí proměřením kyvety s čistým rozpouštědlem (tzv. "blank") před měřením na kyvetě s obsahem analytu. U dvoupaprskového přístroje jsou kyveta se vzorkem a kyveta s blankem proměřovány v podstatě současně – paprsek je zde dělen v pravidelných časových intervalech k prosvěcování kyvety se slepým vzorkem a kyvety s analytem [2,5].



Obr. 1.1.: Schéma jednopaprskového spektrometru (dle: [1,2])



Obr. 1.2.: Schéma dvoupráskového spektrometru (dle: [1,2])

Nejvíce variant ohledně samotné stavby přístroje je u zdroje záření, prvku pro výběr vhodné vlnové délky a prvku pro detekci prošlého záření vzorkem.

Základními typy zdrojů pro absorpční metody jsou rozžhavené látky emitující spojitě polychromatické spektrum nebo může být zdrojem elektrický výboj v plynech či parách kovů, které poskytují spojitě nebo čárové spektrum záření anebo také mohou být zdrojem lasery, které poskytují dokonale monochromatické světlo. Čili zdrojem spojitěho spektra může být xenonová lampa, vodíková nebo deuteriová výbojka nebo „obyčejná“ žárovka s wolframovým vláknem. Zdrojem čárového spektra výbojka s dutou katodou, rtuťová výbojka nebo laser [2,5].

Nejvíce užívaným zdrojem světla je deuteriová lampa pro oblast od 180 do 350 nm, žárovka s wolframovým vláknem a halogenová lampa pro oblast 350 až 900 nm. Obloukový výboj v xenonové atmosféře poskytuje zdroj světla v rozsahu 175 až 1000 nm. Pro speciální aplikace, např. pro vysoce přesná měření, může být použit i laser [7].

Tradičně jsou spektrofotometry pro měření absorbance optimalizovány na určitá pásma elektromagnetického záření: buďto pro ultrafialové/viditelné záření (UV/VIS, 175 až 750 nm), nebo blízkou infračervenou oblast (NIR, near-infrared, 0,8 až 2,5 μm), střední infračervenou oblast (MIR, mid-infrared, 2,5 až 25 μm) a vzdálenou infračervenou oblast (FIR, far-infrared, 25 až 1000 μm). Některé vyráběné spektrometry jsou schopny pokrýt několik takovýchto oblastí (např. UV/VIS/NIR nebo MIR/FIR). [7]

K výběru vlnové délky se obecně mohou použít buďto levnější filtry nebo nákladnější monochromátory. Filtry se používají k výběru jen jednoho nebo dvou rozsahů vlnové délky. Je-li třeba měřit na více vlnových délkách nebo v širokém rozsahu spektra, použijí se monochromátory [2,5].

Filtry mohou být absorpční nebo interferenční. Absorpční filtr je vrstva barevného prostředí ve formě skla, želatiny, plastu nebo i kapaliny. Šířka pásma elektromagnetického záření zde bývá asi 100 nm. Interferenční filtr je tenká vrstva materiálu o určitém indexu lomu, pokrytá reflexním filmem (obvykle stříbrným). Záření se po vniku do této vrstvy mnohokrát odráží a interferuje – vhodnou vlnovou délku lze volit natáčením filtru. Šířka pásma vymezeného záření je zde asi 10 nm [2,5].

Monochromátor může pro výběr vhodné vlnové délky obsahovat jako hlavní prvek hranol nebo reflexní mřížku. V případě hranolu se využívá disperze světla, kdy rychlost světla v prostředí o indexu lomu větším nežli 1 je závislá na frekvenci procházejícího elektromagnetického záření. Záření s vyšším kmitočtem/menší vlnovou délkou je více zpomalováno a vykazuje větší ohyb v daném prostředí nežli záření s nižším kmitočtem/větší vlnovou délkou [2,5].

V modernějších přístrojích bývá umístěn hranol před reflexní mřížkou.

Mřížka je tvořena vrstvou z průhledného materiálu opatřenou řadou čar/vrypů. Využívá se zde jevu odrazu a ohybu záření. Ohybem se vytvářejí střídající se maxima a minima. Nejintenzivnější je maximum nultého řádu. Pokud je původní světlo bílé, je takováto barva maxima nultého řádu, v dalších maximech již dominuje některá z barev spektra. Aby mohl ohyb nastat, musí být vzdálenost čar/vrypů na desce podobná vlnové délce záření. Mřížka tudíž bývá charakterizována hustotou, počtem čar na jeden milimetr [2,5].

Monochromátor v případě použití mřížky dovoluje vymezení světla v rozsahu vlnových délek maximálně 5 nm, užší rozsah spektra již nikoliv. Při použití dvou za sebou uspořádaných takovýchto prvků pro výběr vlnové délky záření získáme záření v rozsahu spektra cca 1 nm. [7]

Spektrofotometry obsahují také prvek pro detekci elektromagnetického záření, v našem případě prošlého vzorkem.

Hlavní typy detektorů jsou:

- fotonka
- fotonásobič
- fotodioda
- diodové pole
- CCD detektor
- dříve též fotografická detekce nebo jen detekce prostým, neozbrojeným okem [2,5]

Fotonka a fotonásobič jsou tzv. emisní fotoelektrické články. Hlavním principem je zde využití vnějšího fotoelektrického jevu – dopadající elektromagnetické záření vyrazí z fotokatody elektrony, které směřují k anodě. U fotonásobiče je proud elektronů zesilován využitím dynod zařazených mezi katodu a anodu. Každá z následujících dynod mívá potenciál asi o 90 V pozitivnější a dopadem elektronu zde dochází k vyražení několika dalších elektronů, čili ve výsledku může být proud elektronů dopadající na anodu zesílen 10^6 až 10^7 krát [2,5].

Fotodiody, diodové pole a CCD detektory jsou příklady polovodičových fotoelektrických článků, u nichž je podstatou vzniku signálu vnitřní fotoelektrický jev [2,5].

Fotodioda bývá zapojena v závěrném směru a dopadající záření vygeneruje páry elektron-díra, dojde ke vzniku proudového pulzu. (Např. v případě křemíku je minimální potřebná energie světelného kvanta 1,14 eV, fotony s vlnovou délkou nad 1,1 μm nemohou být detekovány.) Diodové pole je seskupení stovek až tisíců diod, jež plně pokrývají příslušný rozsah vlnových délek.

CCD detektor je křemíkový čip obsahující diskrétní čtvercové prvky, pixely o velikosti max. asi 30 μm , každý o citlivosti fotonásobiče, kdy dopadající foton uvolní v materiálu pixelu jeden nebo několik elektronů, ty jsou zachycovány v potenciálové jámě každého pixelu, množství náboje narůstá s dále dopadajícími fotony a poté je elektrický náboj přenášen polem k výstupní části, kde elektrony procházejí na zesilovač čipu a ve výsledku jsou detekovány jako změny výstupního napětí [2,5].

Standardními detektory pro UV/VIS oblast jsou fotonásobiče a křemíkové diody. Křemíkové diody jsou menší, levnější ale fotonásobiče mají vyšší senzitivitu. Většina spektrofotometrů ve výzkumu spoléhá na fotonásobiče. V současnosti se využívají sady fotonásobičů nebo CCD čipy. [7]

Ohledně umístění vzorků v případě spektrálních absorpčních metod se jedná o kyvetu, obvykle hranatou, která zajišťuje konstantní, definovanou délku optického prostředí. Stěna kyvety musí být pro dané záření propustná (obdobně jako další optické prvky pro vedení záření přístrojem). Pro ultrafialové záření se používají buďto relativně drahé křemenné kyvety, nebo kyvety z vhodného plastu, pro viditelné záření se užívají plastové kyvety nebo kyvety z běžného draselného skla, pro infračervenou oblast kyvety z halogenidů některých kovů (např. chlorid sodný, bromid thalný) [2,5].

Vyhodnocovací/zobrazovací zařízení je dáno počítačem, externím nebo vestavěným ve spektrofotometru, a jeho softwarem. U levnějších typů přístrojů se hodnota absorbance zobrazuje na displeji, u dražších přístrojů se zobrazuje na monitoru celé spektrum. Využívání spektrálních metod na identifikaci látek bývá zcela závislé na asistenci počítače [2,5].

1.1.2 Bílkoviny, jejich vlastnosti a funkce v organismu

Určování koncentrace bílkovin je jedním z nejzákladnějších úkolů biochemika a bývá důležitou součástí postupu ke stanovení řady diagnóz. „Svět bílkovin“ je obecně velmi rozmanitý, což často sťažuje jejich stanovování. Nebývá zcela triviální se rozhodnout pro vhodnou metodu a často doporučovanou strategií je kombinovat dvě různé metody. Látky, které neabsorbují přirozeně v oblasti ultrafialového nebo optického záření, bývají často derivatizovány neboli chemicky pozměněny na látky, které ve zmíněné oblasti elektromagnetického spektra absorbují. V oblasti UV-VIS ochotně absorbují molekuly, jež buďto obsahují systém konjugovaných vazeb (v řetězci se střídá jednoduchá a dvojná vazba) anebo obsahují aromatická jádra. Barva roztoku s danou látkou je doplňkovou barvou k barvě odpovídající vlnové délce absorbovaného elektromagnetického záření. Bez derivatizace v případě bílkovin na vlnové délce 280 nm absorbují postranní řetězce s obsahem aromatických jader, tj. aminokyseliny: fenylalanin, tyrozin a tryptofan. Na vlnové délce 200 až 215 nm v případě bílkovin bez derivatizace absorbují peptidové vazby. [1,3,4]

Bílkoviny jsou lineární polymery vzniklé zřetěžením aminokyselin pomocí peptidových vazeb (zařazením aminokyseliny z ní vytváří v rámci řetězce tzv. aminokyselinový zbytek). Peptidová vazba vzniká tzv. kondenzací, při které je uvolněna molekula vody. Opačný proces, zakomponování molekuly vody a rozpad vazby, je tzv. hydrolýza [8]. Peptidová vazba je rigidní, planární struktura, kolem které se ale postranní řetězec aminokyselinového zbytku může volně natáčet. Lineárním zřetěžením aminokyselin vzniká tzv. primární, nejzákladnější struktura bílkoviny. Tato struktura je v buňce (a je nyní pro nás nyní celkem jedno zda v prokaryotní nebo eukaryotní buňce) vytvářena na ribosomu postupně, lineárně, přičemž bílkovina hned po opouštění ribosomu se začíná „skládat“ do prostorového útvaru v závislosti na interakci v rámci samotné primární struktury a také v rámci její interakce s vodným rozpouštědlem s obsahem řady solí reprezentovaného cytolem. Struktura tohoto prostorového útvaru se dále též popisuje pomocí tzv. sekundární, terciální a kvartérní struktury. Sekundární struktura je dána tím, jak původně různě vzdálené zbytky aminokyselin v primární struktuře jsou v prostoru přiblíženy a vytvářejí méně nebo více uspořádanou strukturu (typickým příkladem je α -helix a β -skládaný list nebo různé smyčky fyzicky vázající právě obě dvě zmíněné struktury). Terciální struktura udává, v jakém prostorovém vztahu jsou útvary vytvořené v rámci sekundární struktury. Kvartérní strukturu lze uvažovat jen u útvarů, kde se shlukují samostatné molekuly bílkovin do vyšších struktur (příkladem může být hemoglobin, laktátdehydrogenáza nebo třeba synthaza vyšších mastných kyselin – uspořádáním bílkovin v kvartérní struktuře lze docílit vytvoření jakési „výrobní linky“ nebo naopak „linky pro odbourávání“ konkrétních substrátů, např. při tvorbě mastných kyselin v případě synthazy mastných kyselin) [9].

V naprosté většině případů se u hotové bílkoviny nejedná čistě jen o polymer z aminokyselin, ale bývá připojena zpravidla i cukerná složka (tzv. glykoproteiny), která může být i největší částí molekuly (tzv. proteoglykany). Případně bývá připojena i

lipidová složka (tzv. lipoproteiny). K tomu bývá polymer bílkovin pozměňován např. fosforylací, hydroxylací, či případně navázání jiné hydrofilní či hydrofobní skupiny.

Bílkoviny dle funkce lze v organismu rozdělit na strukturní, signální/regulační a enzymatické, přičemž signální funkce se částečně překrývá s enzymatickou funkcí.

Typickými představiteli strukturních bílkovin jsou bílkoviny tvořící cytoskelet jako je aktin a alfa, beta a gama tubulin a kadheriny jako reprezentant bílkovin vytvářející adhezní spoje, desmosomy a hemidesmosomy v případě buněk epitelů [8].

Typickými enzymy jsou enzymy trávicích šťáv (např. pepsiny, trypsin, chymotrypsin, obecně proteázy, dále např. lipázy, nukleázy, membránově vázané v kartáčovém lemu enterocytů jsou např.: dipeptidasa, maltasa, izomaltasa, laktasa, fosfolipasa či polynukleotidasy) [9]. Existují obdobné enzymy určené pro práci v rámci vnitřku buňky. I samotný ribosom je „shlukem“ bílkovin a rRNA, kdy bílkovinná složka je zde výrazně zastoupena.

Typickou signální molekulou v rámci buňky je GTP-vázající protein, kalmodulin, různé receptory, např. s thyrozin-kinázovou aktivitou a různé druhy (např. cyklin-dependentních) kináz. Dále různé peptidové hormony, jako je např. známý inzulin.

Absorbanci v případě bílkovin, především na vlnové délce kolem 280 nm, zajišťují postranní řetězce aminokyselinových zbytků s aromatickými jádry, jež obsahují aminokyseliny: fenylalanin, tyrozin a tryptofan. (Jedná se o něco podobného, jako je systém konjugovaných dvojných vazeb, jako např. u beta-karotenu a retinolu).

Na kratších vlnových délkách 200 až 215 nm, jsou hlavním chromoforem peptidové vazby.

1.1.3 Vyšetření celkové bílkoviny a základní poruchy

Z hlediska bílkovin se nejvíce provádí vyšetření celkové bílkoviny v séru a moči. Existují také stanovení např. v plodové vodě nebo v mozkomíšním moku, kde se však hodnotí spíše jejich specifické zastoupení nežli jejich množství.

Sérum bývá výhodnější pro zpracování a měření z toho důvodu, že je zde odstraněn fibrinogen a další koagulační faktory, které při stanovování dalších látek interferují. Proto se obvykle před dalším zpracováním a měřením provádí koagulace krevní plasmy, tím vznikne z plasmy sérum [3].

V zastoupení různých bílkovin séra tvoří albumin více než polovinu, fyziologická hodnota je 35 až 53 g/l. Globuliny (α_1 , α_2 , β , γ globuliny) 20 až 36 g/l [5, 9].

Hladina bílkovin je za fyziologického stavu přibližně konstantní, je ve stavu dynamické rovnováhy mezi jejich tvorbou a odbouráváním. Tato rovnováha se může za patologických stavů narušit jedním nebo druhým směrem.

Základní poruchy můžeme rozdělit na hypoproteinémie, hyperproteinémie a dyslipoproteinémie [3].

Hypoproteinémie je stav, při kterém je koncentrace celkové bílkoviny pod 40 g/l. Příčinou může být nízký přívod bílkovin dietou, malabsorbční syndrom, zvýšené ztráty bílkovin močí při nefrotickém syndromu, při popáleninách, nebo nadměrnou ztrátou bílkovin trávicím traktem (např. při Crohnově chorobě) [3].

Hyperproteinémie – za patologických stavů dochází k zvýšení hladiny jen jedné z bílkovin. Často se jedná o protilátky, tj. gamaglobuliny. Ty mohou polyklonální při infekcích nebo monoklonální při nádorovém onemocnění [3].

Hyperproteinémie se může též objevit při dehydrataci. Ta obecně může být dána nedostatečným příjmem tekutin, těžkým zvracením nebo průjmy.

Dyslipoproteinémie je charakterizována patologicky zvýšenou nebo sníženou hladinou jedné nebo více složek plazmatického lipidového spektra. V naprosté většině případů se jedná o hyperlipoproteinemii, kdy je zvýšená koncentrace cholesterolů a triacylglycerolů [3]. Obvykle nedostatek tzv. „hodného“ (HDL částice) a nadbytek „zlého cholesterolu“ (VLDL, LDL a IDL částice).

1.1.4 Metody stanovení celkové bílkoviny

Metody stanovení celkové bílkoviny lze rozdělit do pěti skupin [1]:

1) metody využívající interakce bílkovin s ionty mědi

- biuretová metoda
- Hartree-Lowryho metoda
- bicinchoninová metoda

2) ninhydrinová metoda po kyselé hydrolýze bílkovin

3) stanovení z UV spektra

4) stanovení celkové bílkoviny ze sušiny

5) metoda dle Bradfordové (barvivo Coomassie blue)

Ad 1)

biuretová metoda [1]:

Měďnatý iont vytváří chelát s imidovými skupinami bílkoviny, jež jsou výrazně ionizovány díky silně alkalickému pH, tj. je vytvořen z polypeptidu polyaniont, na který se pak váží měďnaté kationty. Vzniká pak modrofialově zbarvený produkt, jehož absorpance se měří při 550 nm.

Hartree-Lowryho metoda [1]:

Činidlo zde má dvě složky. Jednak biuretové činidlo a dále Folin-Ciocalteu činidlo na fenoly – jedná se o polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se reakcí s tyrozinovými zbytky v řetězci polypeptidu redukují na modře zbarvený produkt.

V roce 1972 byla vypracována modifikace metody využitím tří činidel, z nichž dvě jsou pro biuretové stanovení – dochází zde k daleko intenzivnějšímu zbarvení roztoku, zvyšuje se tak citlivost metody a také je stanovení lineární v daleko větším rozsahu měřených koncentrací (také činidla jsou stabilnější a metoda je méně pracná).

Bicinchoninová (BCA) metoda [1]:

Jedná se o využití kyseliny bicinchoninové ke stanovení celkové bílkoviny. Dochází zde k redukci měďnatého kationtu bílkovinou na měďný kationt a následně vytvoření chelátu tohoto iontu s kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeně zbarveného produktu.

Ad 2)

Ninhydrinová metoda [1]:

Bílkoviny jsou hydrolyzovány 6% kyselinou sírovou při 100°C. Hydrolyzát je následně neutralizován a aminokyseliny derivatizovány ninhydrinem. Absorpance je pak měřena při 570 nm. Jednotlivé aminokyseliny mají jiný barevný produkt. Platí, že pokud má bílkovina relativně běžné aminokyselinové složení, pak lze použít např. jako standard roztok leucinu. Metoda je ale poměrně časově náročná. Výhodu má tato metoda v tom, že s ní neinterferují báze nukleových kyselin. [1]

Ad 3)

Stanovení z UV spektra [1]:

V proteinech absorbují UV záření postranní řetězce aminokyselin s aromatickými jádry, tj. postranní zbytky tryptofanu a tyrozinu (fenylalaninu, ačkoliv má podobný postranní řetězec, již jen zanedbatelně). Maximální absorpce je v rozmezí vlnových délek 275 až 280 nm. Při vhodném ředění roztoku bílkoviny lze optimálně stanovit koncentrace naprosté většiny proteinů. [1]

Proteiny také absorbují ochotně i při nižších vlnových délkách pod 240 nm díky dalším aminokyselinám a zejména kvůli peptidové vazbě. Atraktivní je stanovování pod 205 nm. Zde je maximum absorpce peptidové vazby, bohužel ale také např. molekul kyslíku, který je tak potřeba z roztoku odstranit. [1]

Ad 4)

Stanovení celkové bílkoviny ze sušiny:

Provádí se sušením v sušárně do dosažení konstantní váhy při 104 až 106 °C po dobu několika hodin, kdy se odstraní voda a těkavé látky. Vzorek je pak vážen na vahách – zjistí se tak hmotnost bílkovin s látkami k nim přidružených jako např. solí.

Tato metoda jako jediná nevyžaduje standard. Jejím značným problémem je, že vysoký detekční limit a nutnost odstranit co nejvíce solí z izoelektrického roztoku. [1]

Ad 5)

Metoda dle Bradfordové s využitím vazby barviva Coomassie blue na bílkoviny (anglicky: Coomassie brilliant blue G) [1]:

Barvivem je Coomassie blue G250 (organické barvivo). Činidlo Bradfordové je: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol, 8,5% (w/v) kyselina fosforečná v deionizované / destilované vodě) [12]

Vazba probíhá v kyselém prostředí dvěma mechanismy, kdy dochází k fyzikální adsorbci na proteiny za vzniku stabilního komplexu s absorbcí mezi 465 nm až 595 nm. Jednak se na nepolární skupiny váže trifenylmetanová skupina a dále na bazické postranní zbytky aminokyselin v řetězci (arginin a lysin) se vážou anionty sulfoskupin. Po těchto vazbách dochází k barevné změně, jež odpovídá koncentraci proteinu. Metoda je především citlivá na albumin a řadu dalších globulinů. Stanovení je však rušeno řadou známých interferujících látek.

Interferujícími látkami jsou (především) [1]:

- Triton X – 100, polyoxyethylenový detergent s alkylfenylovými skupinami (více jak 0,5%)
- SDS (sodiumdodecylsulfát) - (více jak 0,1%)
- deoxyholan sodný

Pro kalibraci se používá roztok hovězího sérového albuminu. Metoda je třikrát až čtyřikrát citlivější nežli metoda Hartree-Lowryho a BCA metoda. [1]

Metoda dle Bradfordové je nejsenzitivnější z výše uvedených metod (metoda BCA, tj. užití bicinchoninové kyseliny, biuretové stanovení, metoda dle Bradfordové, Lowryho a ninhydrinová metoda). Detekční limit je zde 0,006 mg/ml a má nejširší oblast stanovitelnosti od 0,006 až po 100 mg/ml (pro purifikovaný protein (purifikovaný BSA) i pro komplexní směs bílkovin).

Biuretová metoda je vhodná pro vysoké koncentrace bílkoviny ve vzorku (5-160 mg/ml) zatímco metoda dle Bradfordové, BCA a Lowryho metoda jsou vhodné pro nízkou koncentraci bílkovin ve vzorku (1-2000 µg/ml). Metoda dle Bradfordové se ukazuje jako nepříhodnější pro vzorky s nízkým obsahem bílkovin, jako je např. moč. [6]

Bradfordové metoda mezi pěti uváděnými spektrofotometrickými metodami stanovení spotřebovává minimum vzorku (2 µl/reakce), což je 50-krát méně nežli u BCA, 10-krát méně nežli u biuretové, 100-krát méně nežli u Lowryho a 1000-krát méně nežli u ninhydrinové metody. [6]

Metoda dle Bradfordové také nejméně interferuje s nejpoužívanějšími pufrů pro práci s bílkovinami, což je Laemmliův a 2-D lytický pufr (při měření purifikovaného BSA nebo extraktu z prasečí ledviny). [6]

Časová náročnost jednotlivých metod [1]:

- metoda biuretová, Hartree-Lowryho metoda a BCA metoda: 1 hodina
- ninhydrinová metoda: první den 1 hodinu, poté přes noc probíhající hydrolýzu a následný den 1 až 2 hodiny vlastní měření.
- měření v UV oblasti: 30 minut
- stanovení celkových proteinů ze sušiny: 4 hodiny až přes noc a další den poté 10 až 20 minut na vážení
- metoda dle Bradfordové: 20 až 30 minut

Mezi kolorimetrickými stanoveními má metoda dle Bradfordové nejnížší spotřebu vzorku a nejkratší dobu stanovení a zároveň nejnížší finanční náklady. [6]

1.2 Cíle práce

Cílem této práce je vytvořit standard pro zpracování experimentálních dat pro potřeby výuky předmětu Laboratorní technika a to konkrétně pro úlohu „Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin“.

Nejprve bude třeba provést spektrofotometrické měření koncentrací bílkovin ve vaječném bílku. Pro stanovení byla vybrána metoda podle Bradfordové. Měření probíhalo na třech různých spektrofotometrech (vertikální fotometr SUNRISE, UV-VIS spektrofotometr Libra S22 a UV-VIS spektrofotometr SPECORD). Po ukončení naplánovaných experimentů a zpracování naměřených dat bude provedeno porovnání výsledků z jednotlivých přístrojů.

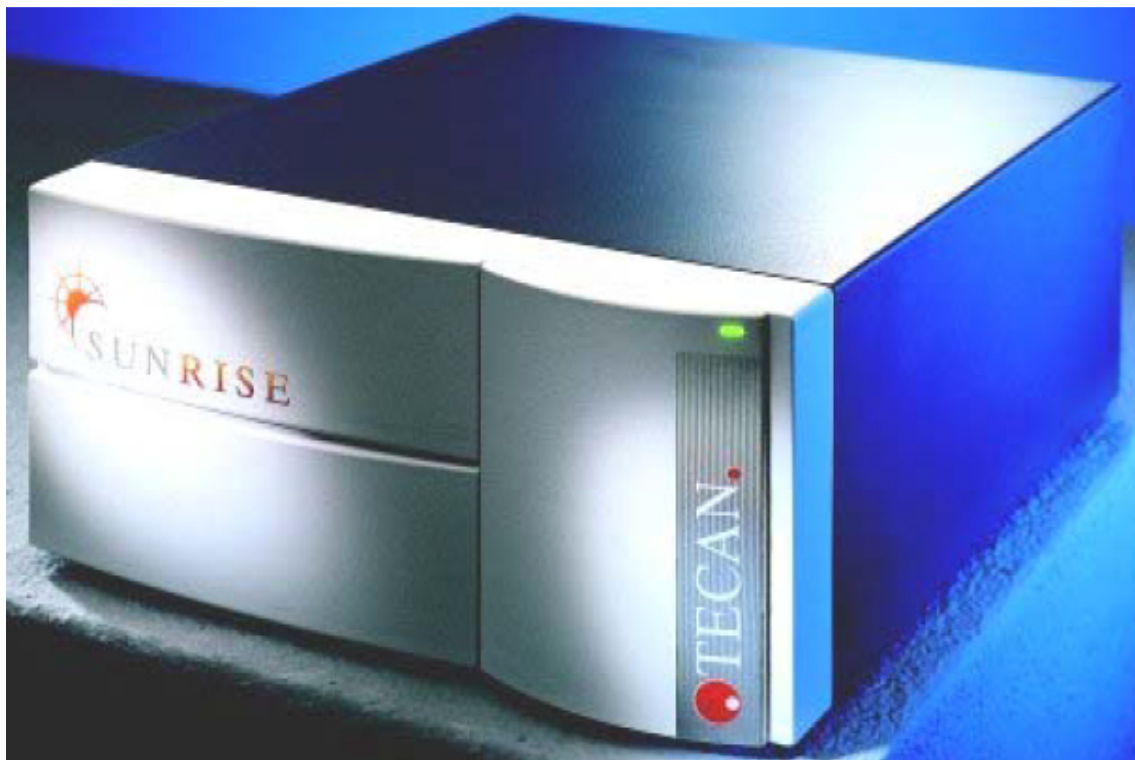
Pro usnadnění statistického zpracování dat bude vytvořen skript ve výpočetním prostředí MATLAB, který po zadání naměřených experimentálních dat vypíše vybrané statistické parametry.

Součástí bakalářské práce je diskuze možností zpracování naměřených hodnot a postupu vhodného vyhodnocení získaných dat. Navržený standard pro zpracování dat je v kapitole 3.

2 Metody

2.1 Měřicí přístroje

2.1.1 vertikální fotometr SUNRISE



Obr. 2.1: zevní vzhled fotometru SUNRISE [19]

Vertikální fotometr SUNRISE (Sunrise™ Absorbance Reader) od firmy Tecan Austria GmbH (Rakousko) – dále obvykle jen (vertikální) fotometr SUNRISE – je přístroj, který dokáže měřit rychle až na 96 pozicích mikrotitrační destičky. Je vhodný pro diagnostiku, farmacii i pro výzkumné laboratoře. [18,19]

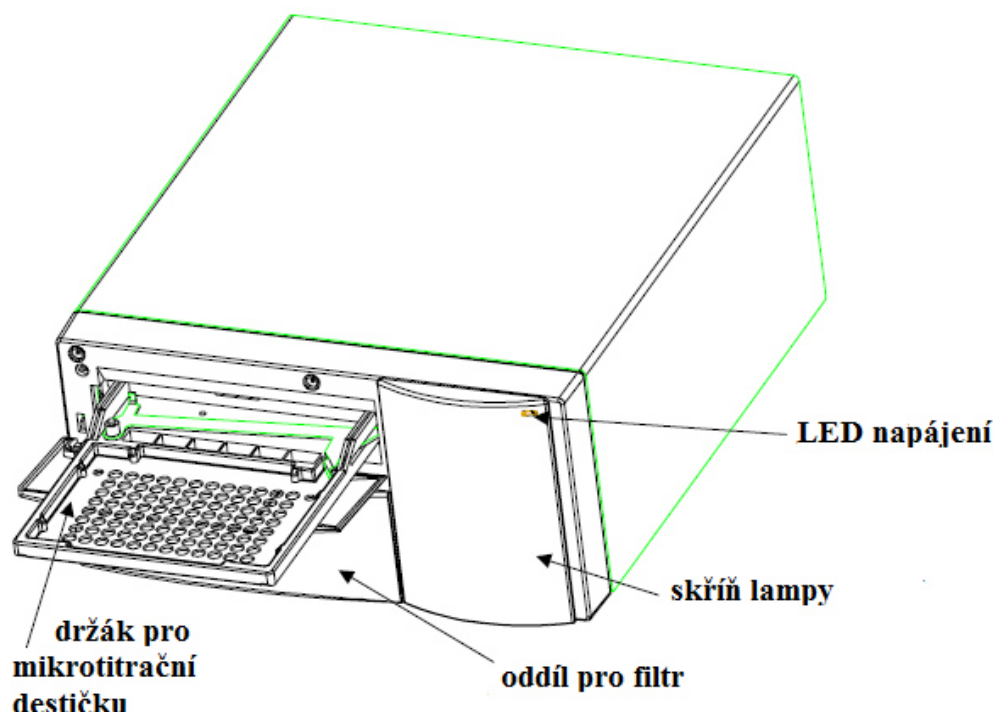
Srdcem přístroje je dvanácti-kanálový optický modul. Těchto dvanáct optických vláken vede simultánně paprsek světla přes řadu 12 jamek mikrotitrační destičky (mikrotitrační destička má 8x12 pozic). K těmto vláknům je dále přiřazen referenční optický kanál, který monitoruje a reguluje intenzitu světla pro optimální výsledek při různé sytosti světla. Jeden měřicí cyklus trvá cca 5 sekund, což činí fotometr SUNRISE vhodný i pro rychlá kinetická měření. K výběru při koupi přístroje je mezi filtrem pro 4 nebo 6 vlnových délek, případně je možné zakoupit speciální gradientový filtr umožňující měření v rozsahu 400 až 700 nm (tj. 301 různých vlnových délek). Speciální gradientový filtr umožňuje vybrat vlnovou délku mezi 400 až 700 nm s krokem 1 nm. [18,19]

Některé obecné technické specifikace fotometru SUNRISE [18]:

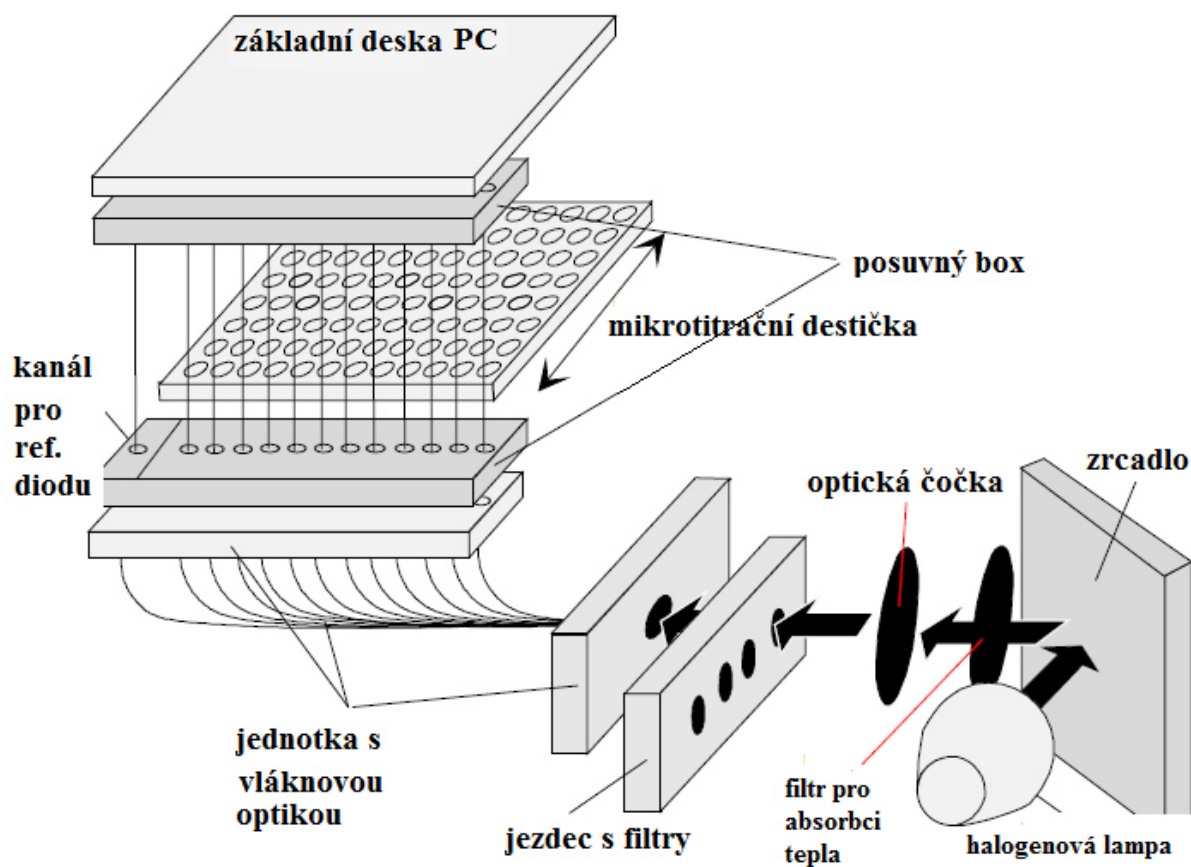
- optický systém: 12 měřících kanálů, 1 referenční kanál,
- filtry: 4 až 6, nebo speciální gradientový filtr,
- rozmezí vlnových délek při použití běžného filtru: 340 až 750 nm,
- rozmezí vlnových délek při použití gradientového filtru: 400 až 700 nm,
- šířka pásma vlnových délek při měření: $10 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$,
- čas měření:
 - 6 sekund při jedné vlnové délce,
 - 8 sekund při dvou vlnových délkách,
 - 5 sekund při kinetickém měření,
- měřicí rozsah: 400 až 750 nm při 0 A až 4 A,
- linearita: 340 až 399 nm, při 0 až 2 A: lepší než $\pm 2 \%$,
- linearita: 400 až 750 nm, při 0 až 2 A: lepší než $\pm 1 \%$,
- linearita: 400 až 750 nm, při 2 až 3 A: lepší než $\pm 1,5 \%$,
- přesnost: při 0 až 2 A, při 492 nm lepší než $\pm (1 \% + 0,010 \text{ A})$,
- přesnost: při 2 až 3 A, při 492 nm lepší než $\pm (1,5 \% + 0,010 \text{ A})$.

Technické specifikace fotometru SUNRISE při laditelné vlnové délce [18]:

- rozmezí vlnových délek: 400 až 700 nm,
- linearita: při 0 až 2,5 A, při 492 nm lepší než $\pm 2 \%$,
- přesnost: při 0 až 2 A, při 492 nm lepší než $\pm (1,5 \% + 0,010 \text{ A})$.



Obr. 2.2: úvod k obrázku 2.3 [dle: 19]



Obr. 2.3: přístroj SUNRISE se standardní optikou [dle: 19]

2.1.2 UV-VIS spektrofotometr Libra S22



Obr. 2.4: UV-VIS spektrofotometr Libra S22 - zevní vzhled přístroje [21]

UV-VIS spektrofotometr Libra S22 od firmy Biochrom (Spojené království Velké Británie a Severního Irska) - dále často jen Libra S22 – je přístroj s jednoduchou obsluhou a vysokou výkonností. Využívá jako zdroj světla xenonovou lampu, která má delší životnost a umožňuje redukovat náklady na údržbu. Obsahuje i kompenzaci optického šumu, což zvyšuje odstup signál/šum. Umožňuje měřit absorbanci, transmitanci, koncentraci a umožňuje též posouzení spektrálních křivek k determinaci analytu. [20,22]

Mohou být vloženy uživatelem definované rovnice a až 18 takovýchto metod může být uloženo v jednotlivých složkách softwaru v přístroji. Přístroj může být upgradován pro sofistikovanější použití včetně nakládání s daty pomocí softwaru Acquire Software a PC. [20,22]

Obsahuje rozsáhlý kompartment pro vzorky, k přístroji lze připojit řadu dalších příslušenství. Díky tomu je Libra S22 všestranný a spolehlivý přístroj k použití pro běžná laboratorní měření. [20,22]

Některé podrobnější specifikace přístroje [20,22]

- otočný karusel s 8 pozicemi pro vzorky,
- zdroj světla: xenonová lampa,
- šířka vlnového pásma: 3 nm nebo lepší,
- rozpětí vlnových délek pro měření: 190 až 1100 nm,
- přesnost nastavení na vlnovou délku: ± 1 nm,
- možný rozsah absorbancí: ± 3 A,
- přesnost: $\pm 0,5\%$ nebo $\pm 0,003$ A do 3,000 A při 546 nm, (dle toho, která hodnota je vyšší),
- monochromátor: 1200 čar / mm (aberrace korigována konkávní mřížkou),
- maximální rychlost skenování: 3000 nm / minuta,
- reprodukovatelnost vlnové délky: $\pm 0,5$ nm,
- detektor: dvě křemenné fotodiody,
- stabilita: $\pm 0,001$ A / hodina (při 340 nm a 0 A),
- grafický LCD displej,
- úroveň šumu: ± 0.001 A při 0 A, ± 0.002 A při 2 A (oboje při 600 nm).

2.1.3 UV-VIS spektrofotometr SPECORD®

UV-VIS spektrofotometr SPECORD® od firmy Analytik Jena AG (BRD) – dále často jen SPECORD - je výkonný, počítačem kontrolovaný, dvoupaprskový spektrofotometr pro měření mj. i absorbance. Sestrojen je pro měření ve velkém rozsahu spektra od 190 nm až 1100 nm. Rozlišení spektra se zde pohybuje od 4 po 0,5 nm. Vnitřní kalibrace vlnové délky pomocí filtru s kysličníkem holmitým poskytuje vysokou přesnost ve vymezení vlnové délky a výbornou opakovatelnost. V kombinaci s výkonným softwarem WinASPECT® je především vhodný pro rutinní užití v laboratořích. Stejně tak poskytuje možnost speciálních aplikací s využitím různých dostupných příslušenství. [16,17]

Obsahuje monochromátor s konkávní mřížkou. Paprsek je dělen ve dva pomocí děliče paprsku. Zobrazitelný rozsah přístroje je ± 8 A, měřicí rozsah činí ± 3 A (A...absorbance). Vymezení vlnové délky je rovno nebo menší nežli 0,5 nm, opakovatelnost vymezení vlnové délky je rovna nebo menší nežli 0,05 nm. Podíl zbloudilého světla na transmitanci je až pod 0,05 %. Skenovací rychlost činí až 6000nm/min. [16,17]

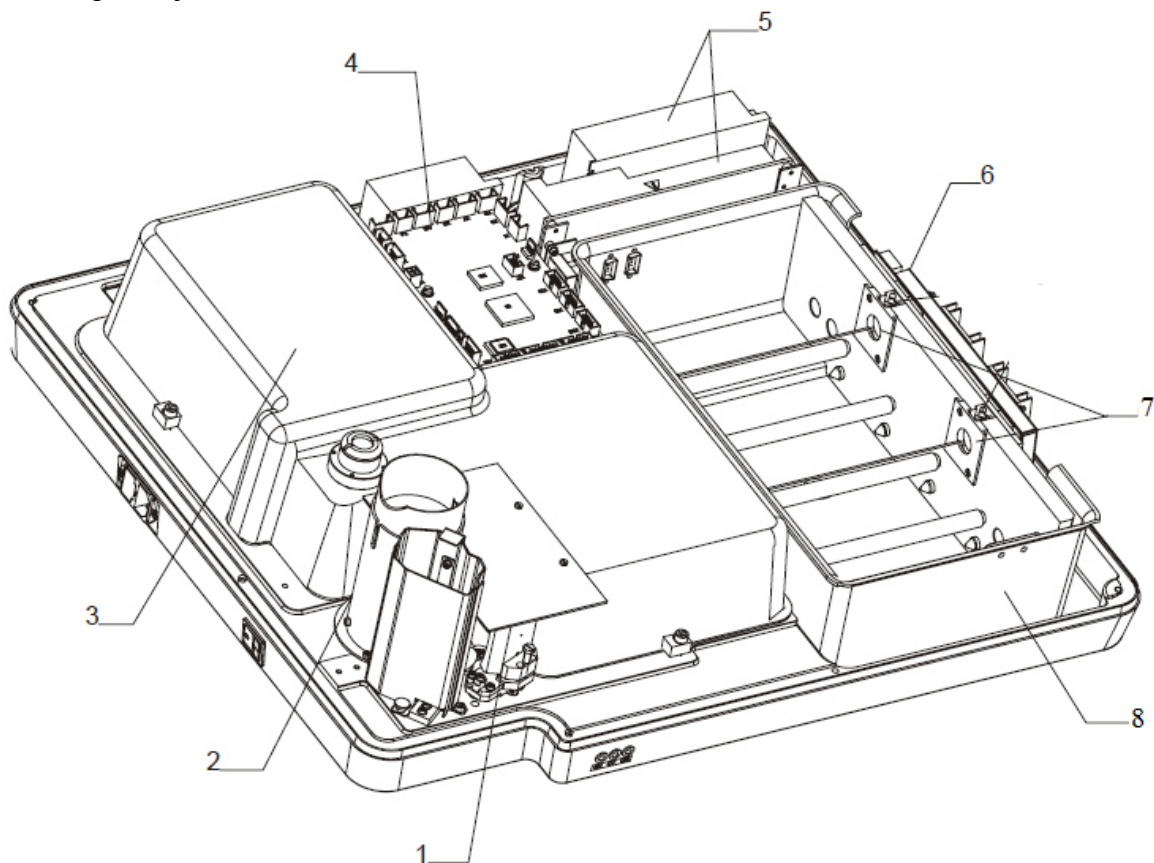


Obr. 2.5: zevní vzhled přístroje (přední strana) [16]

Na obr. 2.5:

- 1... kryt prostoru se vzorky
- 2... konektory pro hadičky nasávacího systému (případný doplněk přístroje)
- 3 ... indikační LED pro napájení, halogenovou a deuteriovou lampu
- 4 ... kryt skříně s halogenovou a deuteriovou lampou

Stavba přístroje viz obr. 2.6 a 2.7:



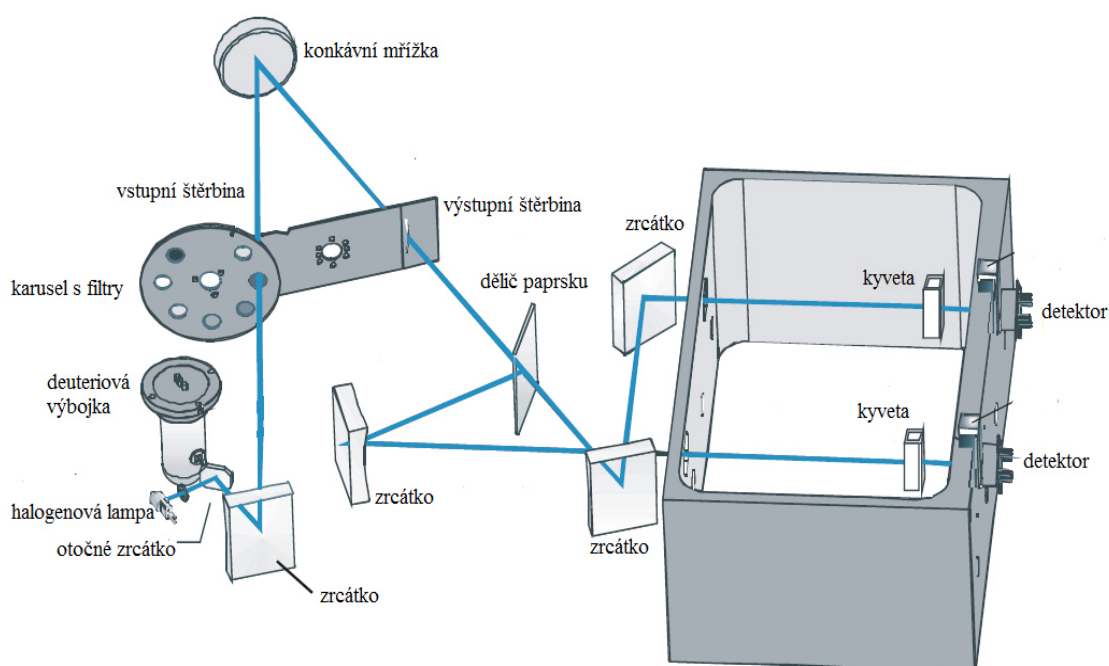
Obr 2.6: obecná stavba přístroje [16]

Na obr. 2.6:

- 1... soustava osvětlovacích zrcátek
- 2... zdroje světla
- 3... kryt spektrometru a fotometru
- 4... řídicí elektronika
- 5... napájecí modul
- 6... deska s detektory
- 7... držadlo pro kyvety se vzorky
- 8... oddíl pro vzorky

Hlavní části spektrofotometru SPECORD jsou především [16,17]:

- zdroj světla: jedná se o halogenovou a deuteriovou lampu, jejichž světlo je převedeno na monochromatické a následně prochází přes vzorek
- samotný spektrometr a fotometr (část 3 na obr. 2.6) je chráněn před zevním světlem a prachem, obsahuje desikátor, který reguluje vlhkost
- detektorová deska: obsahuje dvě fotodiody jako detektory záření, tepelně jsou kontrolovány pomocí Peltierova článku
- napájecí modul: je zdrojem napětí především pro elektroniku a chladicí větráky
- řídicí elektronika: obsahuje počítač, jenž koordinuje interakci všech součástí spektrofotometru



Obr. 2.7: Optický systém spektrofotometru SPECORD® [dle: 16]

Některé technické specifikace spektrofotometru SPECORD® [16]:

- rozmezí vlnových délek: 190 až 1100 nm,
- zobrazitelný rozsah: ± 8 A,
- měřitelný rozsah: ± 3 A,
- přesnost nastavení vlnové délky: $\leq \pm 0,5$ nm,
- reprodukovatelnost vlnové délky: $\leq \pm 0,05$ nm,
- dlouhodobá stabilita na 500 nm: $\leq \pm 0,001$,
- skenovací rychlost: až 6000 nm / min.,
- optický princip: dvoupraskový spektrofotometr, dvě diody jako detektor,
- optika: premonochromátor a monochromátor s konkávní mřížkou,
- přesnost: $\leq \pm 0,005$, při 546 nm, (s Hellma F4 neutral-density filtrem)
- přesnost: $\leq \pm 0,01$, (filtr s dichromanem draselným, dle evropské normy) [16].

2.2 Chemikálie

Během práce v laboratoři byly použity tyto chemikálie:

- destilovaná voda
- fyziologický roztok (0,9% (w/v) roztok NaCl v destilované vodě)
- činidlo Bradfordové (tj.:0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol, 8,5% (w/v) kyselina fosforečná; v deionizované / destilované vodě) [12]
- koncentrační řada:

Pro vytvoření koncentrační řady byly použity roztoky BSA (bovinního sérového albuminu) o původní koncentraci 0,25 mg/ml nebo 0,30 mg/ml. Byly tedy použity tyto koncentrační řady:

0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 a 0,25 mg BSA /ml

nebo

0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 a 0,30 mg BSA /ml.

Vzorek s nulovou koncentrací byl použit jako tzv. slepý vzorek („blank“).

- vzorek vaječného bílku:

Vaječný bílek byl ředěn fyziologickým roztokem 500krát.

- 0,05M fosfátový pufr o pH 7,5.

2.3 Použitá metoda měření v laboratoři

V rámci práce bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace bílkoviny v roztoku. Jako zdroj bílkoviny byl použit vaječný bílek. Stanovení proběhlo metodou dle Bradfordové. Jako standard byl použit roztok hovězího sérového albuminu, BSA (bovinní sérový albumin). Pro měření byl použit zejména vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22. Dále bylo získáno „spektrum“ tj. závislost absorbance na vlnové délce v oblasti viditelného záření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD v rozsahu 400 až 700 nm. Absorbance byla vyhodnocována na vlnové délce 620 nm.

Koncentrační řada pro kalibraci obsahovala šest (0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 a 0,25 mg (BSA) /ml).nebo sedm hodnot (0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 a 0,30 mg(BSA)/ml).

Počet vzorků naředěného vaječného bílku byl stanoven na třicet. Třicet vzorků tedy bylo pipetováno do mikrotitrační destičky pro vertikální fotometr SUNRISE a také bylo připraveno třicet vzorků do kyvet pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22. Uvedený počet třiceti měření byl považován za minimální vstupní počet vzorků pro další statistické zpracování, přičemž bylo bráno v úvahu, že některé hodnoty mohou být vyloučeny z dalších zpracování. Bylo bráno též v úvahu, že uvedený vzorek bílkoviny je poměrně obtížné homogenizovat.

2.4 Popis funkce použitého skriptu v MATLABu

Příslušný skript je uveden v příloze B této práce.

Skript byl vytvářen pro tuto verzi MATLABu: 8.5.0.197613 (R2015a).

Bylo vytvořeno grafické uživatelské rozhraní skriptu v MATLABu (dále obvykle jen „dialogové okno“), do kterého uživatel zadává tyto hodnoty:

- použité ředění reálného vzorku (typicky např. 500x),
- nezáporné celé číslo pro přizpůsobení počtu schránek histogramu (typicky 0 až 3),
- až třikrát získané absorbance pro koncentrační řadu,
- použitou koncentraci bílkoviny (BSA) v koncentrační řadě,
- změřené absorbance pro reálné vzorky bílkoviny (zředěný roztok vaječného bílku).

Tyto hodnoty MATLAB převezme z dialogového okna a dále s nimi pracuje.

Následně skript provede „zprůměrování absorbancí koncentrační řady“, tzn., že můžeme mít až tři řady absorbancí změřené pro koncentrační řadu, čili pro jednu hodnotu koncentrace koncentrační řady až tři hodnoty, které dle [24] lze přímo zde „na místě“ zprůměrovat, tj. ze stejnohlých hodnot (tři pro jednu použitou koncentraci v koncentrační řadě) vytvořit průměr.

Dále skript provádí „korekci na slepý vzorek“, tzn., že ode všech zprůměrovaných hodnot absorbancí odečte zprůměrovanou absorbanci pro slepý vzorek z koncentrační řady (tj. vzorek s nulovou koncentrací BSA).

Poté skript vytváří kalibrační přímkou a získává její směrnici.

Následně skript provádí „korekci na slepý vzorek“ i pro absorbance změřené pro reálné vzorky bílkoviny a vyřazuje nesmyslné hodnoty. Za nesmyslné hodnoty jsou po této korekci považovány záporné hodnoty absorbancí a též přesně nulová hodnota absorbance (vzorek obsahuje nenulové množství analytu, bílkoviny, čili absorbance by měla být vyšší jak 0). A dále vyřazuje vyšší absorbance u reálného vzorku bílkoviny, které jsou vyšší nežli nejvyšší hodnota absorbance, změřená pro koncentrační řadu (po zprůměrování absorbancí koncentrační řady). Není zde dovoleno extrapolovat kalibrační přímkou za rozsah dat, která byla změřena – neboť nelze předpokládat dále lineární průběh závislosti absorbance na koncentraci BSA v koncentrační řadě.

Dále skript dopočte koncentrace v reálných vzorcích pomocí získané směrnice, změřených absorbancí pro tyto reálné vzorky a použitého ředění reálného vzorku. Z těchto hodnot skript spočte následně statistické charakteristiky polohy a statistické charakteristiky variability.

Následně je zde prováděn Adersonův-Darlingův test na normální rozložení dat. Poté jsou vylučovány případné odlehle hodnoty koncentrací. Pokud se jedná o normální

rozložení dat, je pro vyloučení odlehlých hodnot použit Dixonův Q-test. Pokud se nejedná o normální rozložení dat, je jejich vyřazení provedeno dle „Tukeyho kritéria“ na odlehlé hodnoty (dle [23]).

Uvedený Dixonův Q-test skript počítá s použitím hladiny významnosti $\alpha = 0,05$ = 5 %.

„Tukeyho kritérium“ pochází od význačného amerického statistika John Wilder Tukeyho. Ten po rozsáhlých zkušenostech se zpracováním přírodních dat stanovil, že lze případně pro vylučování odlehlých hodnot použít následující kritérium:

Mezikvartilové rozpětí (rozdíl hodnoty třetího a prvního kvartilu) se násobí vhodnou konstantou (obvykle – a také i v našem případě: 1,5) a odečítá se od prvního kvartilu a přičítá ke třetímu kvartilu. Tímto se získá tzv. dolní a horní hradba. Pokud leží některé hodnoty pod dolní hradbou nebo nad horní hradbou, lze je považovat za odlehlé. (Pokud např. dolní hradba vychází záporná nebo nulová a data mají smysl jen pro kladné hodnoty, znamená to, že se tímto směrem nemohou nacházet odlehlé hodnoty.)

Dokud skript nalézá odlehlé hodnoty, prochází soubor s vypočtenými hodnotami koncentrací pro reálné vzorky do té doby, dokud nachází takovéto odlehlé hodnoty.

Jsou možné tyto tři varianty:

Skript stále nachází nenormální rozložení těchto dat a stále provádí „Tukeyho kritérium“ na odlehlé hodnoty.

Skript stále nachází jen normální rozložení dat a stále provádí Dixonův Q-test na odlehlé hodnoty.

Skript může najít nejprve (i několikrát) nenormální rozložení dat a provádět „Tukeyho kritérium“ na odlehlé hodnoty. Následně může detekovat již normální rozložení a dále (opět i několikrát) provést Dixonův Q-test na odlehlé hodnoty.

(Pokud skript nalezne zprvu normální rozložení dat, nemůže z něj již vytvořit následně po vylučování odlehlých hodnot soubor dat s nenormálním rozložením.)

Ve výsledku, pokud skript nalezne odlehlé hodnoty, v případě použití Dixonova Q-testu vypíše kolik a jaké hodnoty vyřadil. V případě použití „Tukeyho kritéria“ bohužel nevypisuje, kolik a jaké hodnoty dopočtené koncentrace reálného vzorku bílkoviny vyřadil.

Ke konci skript vypíše seznam dopočtených koncentrací pro reálné vzorky bílkoviny (vaječný bílek před ředěním) a jako hlavní výsledek vypíše aritmetický průměr a směrodatnou odchylku pro tyto reálné vzorky bílkoviny. Skript vypíše veškerý výstup (kalibrační přímku, vyřazené absorbance u reálného vzorku, histogram, statistické charakteristiky polohy a variability, výsledek Dixonova Q-testu, příp. dolní a

horní hranici, výsledné koncentrace bílkoviny, aritmetický průměr a směrodatnou odchylku) až po vyloučení všech odlehlých hodnot koncentrací bílkoviny v reálném vzorku.

(Nakonec skript vypisuje pod jakým názvem a do jakého umístění uložil obrázky s kalibrační přímkou a histogramem rozložení hodnot koncentrací pro reálné vzorky bílkoviny.)

3 Výsledky

Tato kapitola obsahuje výsledky získané z měření koncentrace bílkovin ve vaječném bílku metodou dle Bradfordové. Experimentální data je nutné statisticky zpracovat. Při prezentaci konečného výsledku je důležité získané hodnoty přepočítat na neřaděný vzorek.

Pro statistické zpracování získaných hodnot koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku byl navržen tento postup, kdy je zjišťován:

- histogram rozložení hodnot koncentrací,
- počet měření,
- minimální hodnota,
- maximální hodnota,
- rozpětí (rozdíl maximální a minimální hodnoty),
- aritmetický průměr,
- medián,
- první kvartil,
- třetí kvartil,
- (minimální hodnota je nultý kvartil, medián je druhý kvartil, maximální hodnota je čtvrtý kvartil),
- směrodatná odchylka,
- variační koeficient (směrodatná odchylka / aritmetický průměr),
- šikmost,
- špičatost,
- minimální a maximální Z-skór,
- hodnota Q-testu pro minimální hodnotu (pro vyloučení případných odlehlých hodnot),
- hodnota Q-testu pro maximální hodnotu (pro vyloučení případných odlehlých hodnot),
- alternativně ke Q-testu:
- dolní hradba (pro vyloučení případných odlehlých hodnot),
- horní hradba (pro vyloučení případných odlehlých hodnot).

(Výsledná hodnota Q-testu je pro daný počet zpracovávaných měření porovnávána s kritickou hodnotou na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$.)

3.1 První sada výsledků

V této první sadě výsledků je uvedeno zpracování výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22, které byly získány během prvního měření. Jsou zde uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána a následně je zde uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu. Celý vytvořený skript je uveden v příloze.

3.1.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE

V následujících tabulkách (tab. 3.1, 3.2 a 3.3) v řádcích A až C, v sloupci 1 až 7 jsou hodnoty absorbancí (bezrozměrné) pro koncentrační řadu včetně slepého vzorku. Slepý vzorek je na pozicích A až C, první sloupec. Absorbance pro roztoky vzorků bílkoviny jsou v řádku F ve sloupcích 1 až 6 a v řádcích G a H ve všech sloupcích.

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byly během prvního měření při 620 nm změřeny následující hodnoty absorpance (bezrozměrná) v mikrotitrační destičce (8x12 tj. 96 jamek), tab. 3.1:

Tab. 3.1: syrová data – absorpance (bezrozměrné) vertikálního fotometru SUNRISE pro reálné vzorky, první měření:

<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2050	0,2120	0,2370	0,2490	0,2670	0,2820	0,2890	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470	0,0580
B	0,2010	0,2220	0,2420	0,2470	0,2760	0,2860	0,3070	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0480
C	0,1980	0,2190	0,2340	0,2310	0,2540	0,2800	0,3710	0,0460	0,0470	0,0460	0,0460	0,0470
D	0,0440	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0450	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470
E	0,0450	0,0460	0,0460	0,0450	0,0460	0,0440	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460
F	0,4410	0,2330	0,2130	0,5060	0,2320	0,2590	0,1680	0,1780	0,1920	0,1890	0,1910	0,1910
G	0,2410	0,2310	0,5690	0,2530	0,2440	0,2370	0,7670	0,7620	0,2400	0,5470	0,2470	0,2170
H	0,2570	0,2340	0,2480	0,2480	0,2340	0,2420	0,2490	0,1770	0,2650	0,2410	0,3530	0,2240

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byly během druhého měření při 620 nm změřeny následující hodnoty absorpance (bezrozměrná) v mikrotitrační destičce (8x12 tj. 96 jamek). Jedná se o stejné vzorky jako v případě prvního měření, tab. 3.2:

Tab. 3.2: syrová data – absorpance (bezrozměrné) vertikálního fotometru SUNRISE pro reálné vzorky, druhé měření:

<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2100	0,2120	0,2390	0,2480	0,2700	0,2840	0,2920	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470	0,0580
B	0,2000	0,2210	0,2430	0,2490	0,2760	0,2860	0,3100	0,0460	0,0460	0,0470	0,0460	0,0480
C	0,1970	0,2190	0,2340	0,2310	0,2550	0,2810	0,3820	0,0460	0,0470	0,0460	0,0460	0,0470
D	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0450	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470
E	0,0450	0,0460	0,0460	0,0450	0,0460	0,0440	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460
F	0,4530	0,2360	0,2140	0,5110	0,2330	0,2680	0,1670	0,1780	0,1920	0,1890	0,1900	0,1910
G	0,2420	0,2340	0,5700	0,2610	0,2490	0,2390	0,7580	0,7520	0,2420	0,2590	0,2520	0,2150
H	0,2540	0,2390	0,2520	0,2500	0,2350	0,2450	0,2490	0,1760	0,2680	0,2450	0,3470	0,2230

Tab. 3.3, zprůměrovaná data z tabulek 3.1 a 3.2:

<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2075	0,2120	0,2380	0,2485	0,2685	0,2830	0,2905	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470	0,0580
B	0,2005	0,2215	0,2425	0,2480	0,2760	0,2860	0,3085	0,0460	0,0460	0,0465	0,0460	0,0480
C	0,1975	0,2190	0,2340	0,2310	0,2545	0,2805	0,3765	0,0460	0,0470	0,0460	0,0460	0,0470
D	0,0445	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0450	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470
E	0,0450	0,0460	0,0460	0,0450	0,0460	0,0440	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460
F	0,4470	0,2345	0,2135	0,5085	0,2325	0,2635	0,1675	0,1780	0,1920	0,1890	0,1905	0,1910
G	0,2415	0,2325	0,5695	0,2570	0,2465	0,2380	0,7625	0,7570	0,2410	0,4030	0,2495	0,2160
H	0,2555	0,2365	0,2500	0,2490	0,2345	0,2435	0,2490	0,1765	0,2665	0,2430	0,3500	0,2235

Tab. 3.4: Absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady (řádky A, B a C) a použitá koncentrace BSA v koncentrační řadě (řádek „c (mg/ml)“):

<	1	2	3	4	5	6	7
A	0,2075	0,2120	0,2380	0,2485	0,2685	0,2830	0,2905
B	0,2005	0,2215	0,2425	0,2480	0,2760	0,2860	0,3085
C	0,1975	0,2190	0,2340	0,2310	0,2545	0,2805	0,3765
c (mg/ml):	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

V tabulce 3.4: V řádcích A, B a C jsou uvedeny bezrozměrné absorbance pro koncentrační řadu. Absorbanci na pozici C7 vypouštíme z dalšího zpracování, neboť se jedná o vzorek zatížený hrubou chybou při pipetování. Do dialogového okna v MATLABu byly použity všechny řádky (A, B a C) s absorbancemi s tím, že místo hodnoty z pozice C7 bylo zadáno „NaN“. Dále do dialogového okna MATLABu byla zadána koncentrace BSA koncentrační řady (řádek „c (mg/ml)“).

V následující tabulce (tab. 3.5) jsou žlutě zvýrazněna ta data, ze kterých bylo možné dále vycházet a zpracovat je v příslušném skriptu v MATLABu. (Je použita tabulka 3.3, kde jsou již data po zprůměrování.):

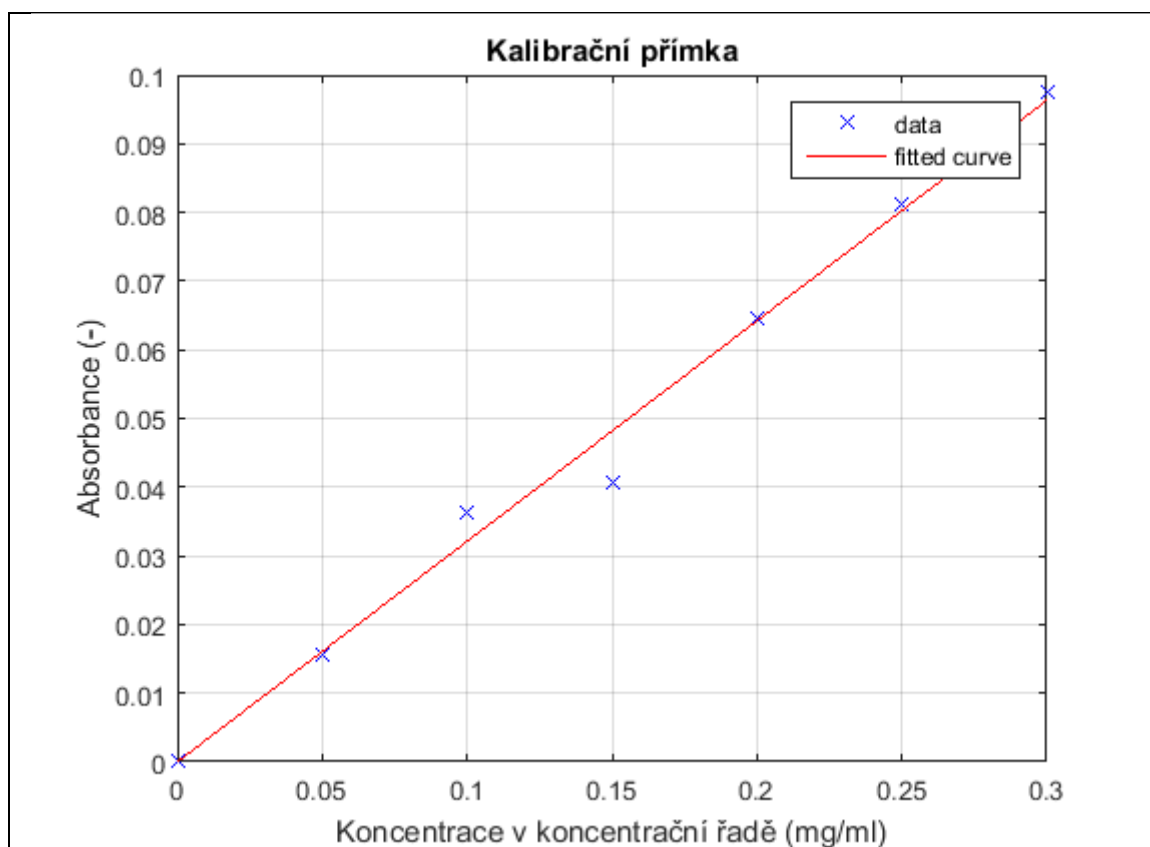
Tab. 3.5, zprůměrovaná data z tabulek 3.1 a 3.2, žlutě jsou zvýrazněna data, jež lze dále použít – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2075	0,2120	0,2380	0,2485	0,2685	0,2830	0,2905	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470	0,0580
B	0,2005	0,2215	0,2425	0,2480	0,2760	0,2860	0,3085	0,0460	0,0460	0,0465	0,0460	0,0480
C	0,1975	0,2190	0,2340	0,2310	0,2545	0,2805	0,3765	0,0460	0,0470	0,0460	0,0460	0,0470
D	0,0445	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0450	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0470
E	0,0450	0,0460	0,0460	0,0450	0,0460	0,0440	0,0450	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460	0,0460
F	0,4470	0,2345	0,2135	0,5085	0,2325	0,2635	0,1675	0,1780	0,1920	0,1890	0,1905	0,1910
G	0,2415	0,2325	0,5695	0,2570	0,2465	0,2380	0,7625	0,7570	0,2410	0,4030	0,2495	0,2160
H	0,2555	0,2365	0,2500	0,2490	0,2345	0,2435	0,2490	0,1765	0,2665	0,2430	0,3500	0,2235

V rámci původních dat musela být vynechána ze zpracování hodnota v řádku C, sloupci 7 - tj. jedna z hodnot změřených absorbancí pro koncentrační řadu. U této vynechané hodnoty předpokládáme, že byla zatížena hrubou chybou při pipetování.

3.1.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Bylo zde zadáno 30 vstupních hodnot absorbancí pro reálný vzorek roztoku bílkoviny.



Obr. 3.1: Závislost absorpance na koncentraci v rámci koncentrační řady (vertikální fotometr SUNRISE)

směrnice kalibrační přímky = 0.321

Vyřadil jsem těchto 8 změřených absorbancí (bezrozměrné) zředěného vzorku bílku:

0.1765

0.3500

0.4030

0.4470

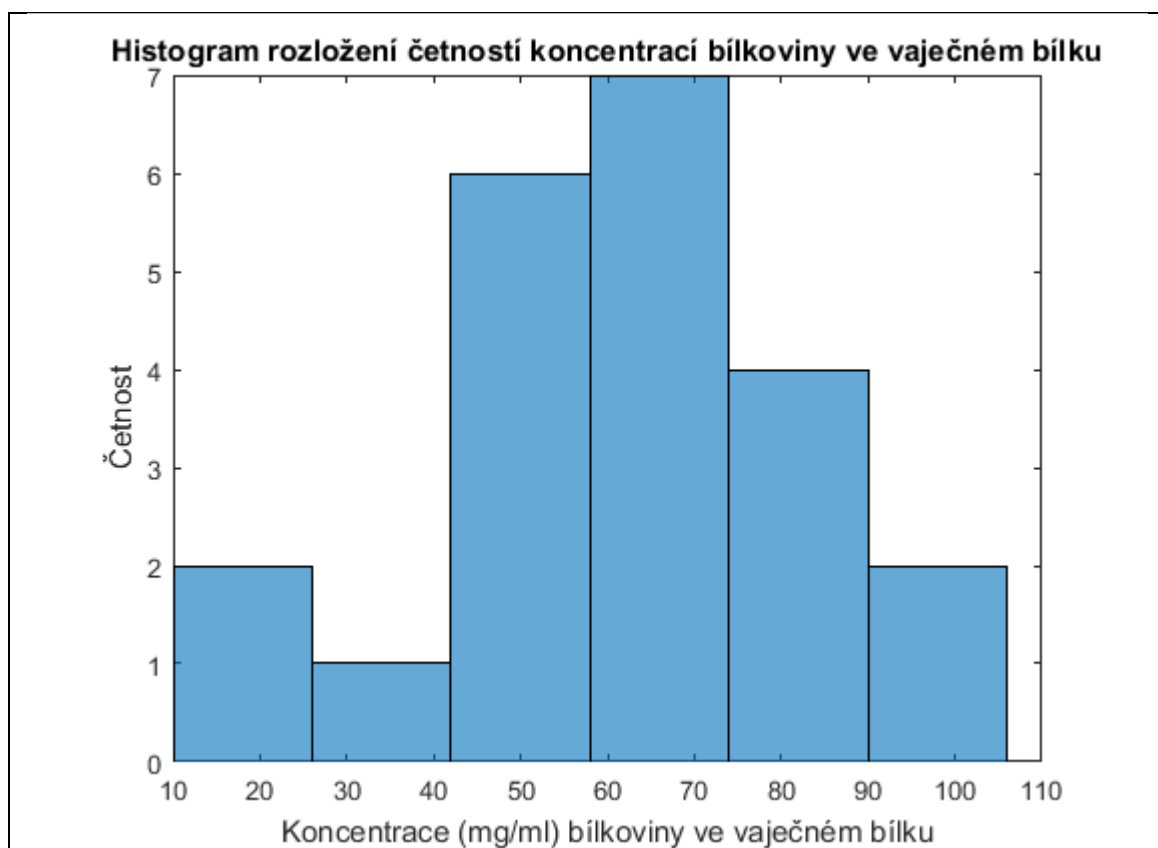
0.5085

0.5695

0.7570

0.7625

Tyto absorbance jsou po korekci na slepý vzorek záporné, nulové nebo vyšší nežli je nejvyšší absorbance pro koncentrační řadu.



Obr. 3.2: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

h =

Histogram with properties:

Data: [1x22 double]

Values: [2 1 6 7 4 2]

NumBins: 6

BinEdges: [10 26 42 58 74 90 106]

BinWidth: 16

BinLimits: [10 106]

schránek histogramu = 6

počet měření = 22

minimální hodnota = 18.17 mg/ml

maximální hodnota = 100.70 mg/ml

aritmetický průměr = 62.05 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 82.53 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 1.330

medián = 62.93 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 50.87 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 74.22 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 23.36 mg/ml

směrodatná odchylka = 21.17 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.34

šikmost = -0.27

špičatost = 2.79

minimální z-skór = -2.07

maximální z-skór = 1.83

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 0 --> JE normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

22. řádek tabulky Dixonova testu:

22 hodnot; kritická hodnota, ($\alpha = 5 \%$): 0.2900; kritická hodnota, ($\alpha = 10 \%$): 0.3780

Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_1 = 0.0472$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2900$$

Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_n = 0.0566$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2900$$

Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$c = 18.17 \text{ mg/ml}$

$c = 22.06 \text{ mg/ml}$

$c = 33.74 \text{ mg/ml}$

$c = 47.75 \text{ mg/ml}$

$c = 47.75 \text{ mg/ml}$

$c = 50.87 \text{ mg/ml}$

$c = 50.87 \text{ mg/ml}$

$c = 53.98 \text{ mg/ml}$

$c = 56.32 \text{ mg/ml}$

$c = 60.99 \text{ mg/ml}$

$c = 61.77 \text{ mg/ml}$

$c = 64.10 \text{ mg/ml}$

$c = 64.88 \text{ mg/ml}$

$c = 69.55 \text{ mg/ml}$

$c = 73.45 \text{ mg/ml}$

$c = 73.45 \text{ mg/ml}$

$c = 74.22 \text{ mg/ml}$

$c = 75.00 \text{ mg/ml}$

$c = 83.57 \text{ mg/ml}$

$c = 85.90 \text{ mg/ml}$

$c = 96.02 \text{ mg/ml}$

$c = 100.70 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 62.05 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 21.17 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vaječnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.1.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 byla koncentrační řada změřena dvakrát. Tyto dvě řady po sedmi absorbancích byly použity pro dialogové okno v MATLABu. Do třetí kolonky dialogového okna pro změřené absorbance byla zadána sedmkrát zkratka „NaN“. Hodnot pro stanovované vzorky bílkoviny (z vaječného bílku) bylo naměřeno 30. Přístroj automaticky odečítá při každém měření hodnotu absorbance změřené pro blank, slepý vzorek od všech ostatních naměřených hodnot – viz tabulka 3.6 a 3.7:

Tab. 3. 6: koncentrace a absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

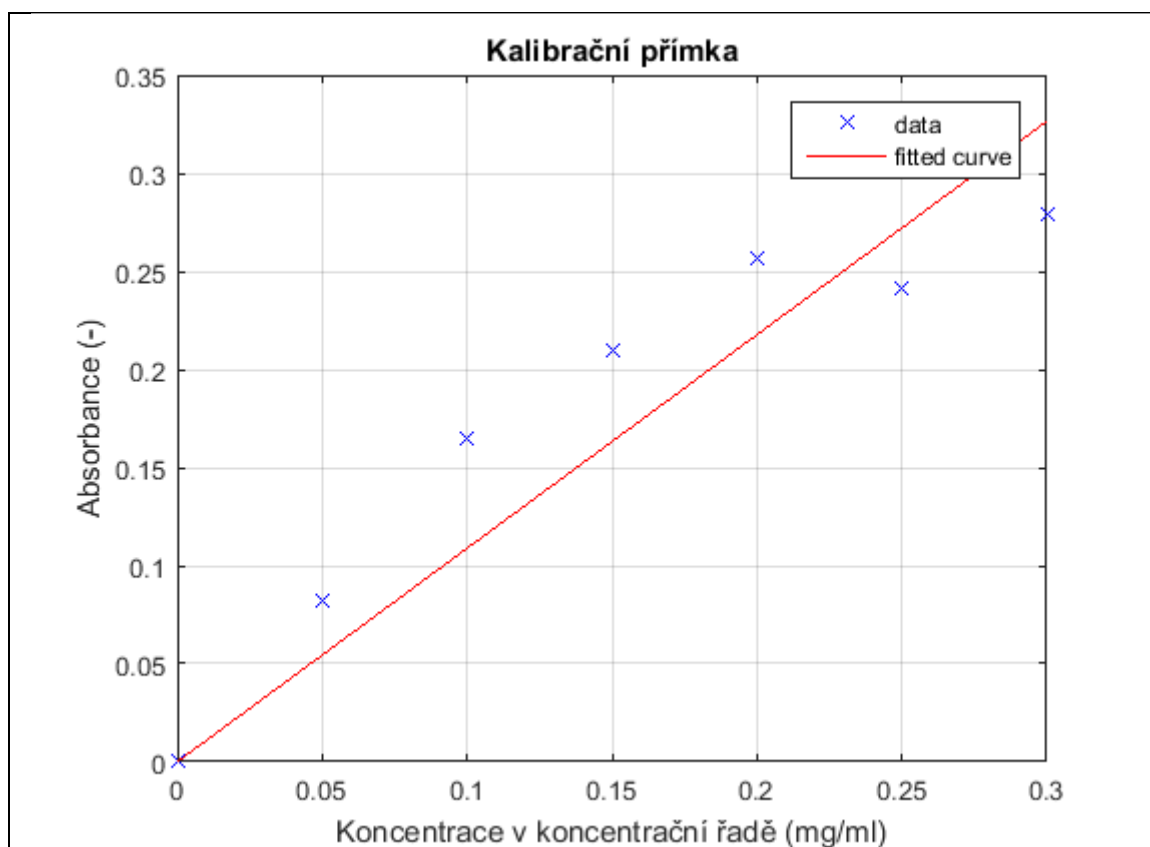
absorbance	0,000	0,081	0,166	0,222	0,260	0,250	0,274
absorbance	0,000	0,084	0,163	0,198	0,253	0,233	0,285
c (mg/ml)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

Tab. 3.7: hodnoty absorbancí (korigované na slepý vzorek již samotným přístrojem) pro reálné vzorky bílkoviny ze zředěného a homogenizovaného vzorku bílku – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,119	0,136	0,151	0,157	0,169	0,175
0,121	0,137	0,151	0,159	0,171	0,177
0,126	0,138	0,153	0,161	0,172	0,177
0,128	0,143	0,154	0,162	0,173	0,177
0,135	0,147	0,154	0,167	0,174	0,182

3.1.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

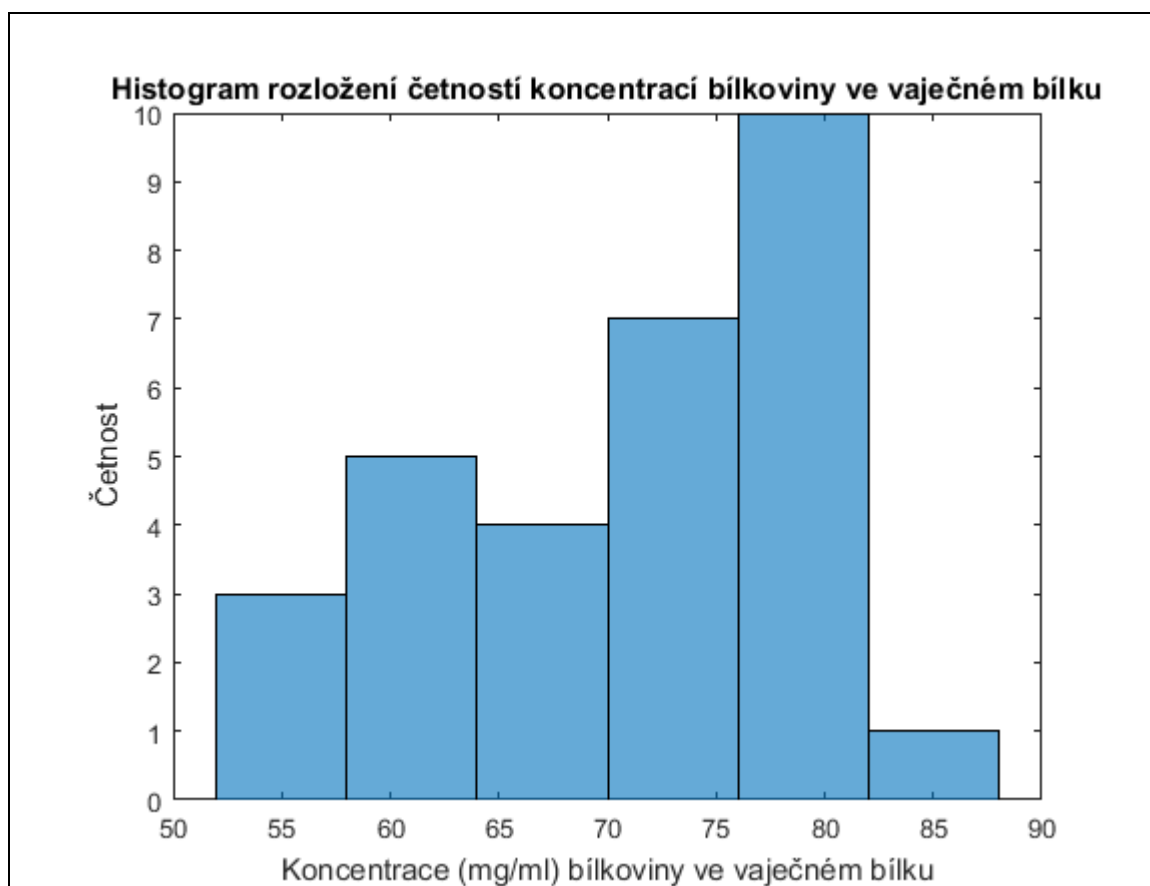
Bylo zde zadáno 30 vstupních hodnot absorbancí pro reálný vzorek roztoku bílkoviny.



Obr. 3.3: Závislost absorbane na koncentraci v rámci koncentrační řady (UV-VIS spektrofotometr Libra S22)

směrnice kalibrační přímky = 1.088

Nevyřadil jsem žádné změřené absorbane (zředěného) vzorku bílku.



Obr. 3.4: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na UV-VIS spektrofotometru
Libra S22

h =

Histogram with properties:

Data: [1x30 double]

Values: [3 5 4 7 10 1]

NumBins: 6

BinEdges: [52 58 64 70 76 82 88]

BinWidth: 6

BinLimits: [52 88]

schránek histogramu = 6

počet měření = 30

minimální hodnota = 54.67 mg/ml

maximální hodnota = 83.61 mg/ml

aritmetický průměr = 71.15 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 28.94 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.407

medián = 71.44 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 63.40 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 79.02 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 15.62 mg/ml

směrodatná odchylka = 8.49 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.12

šikmost = -0.38

špičatost = 2.01

minimální z-skór = -1.94

maximální z-skór = 1.47

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 0 --> JE normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

30. řádek tabulky Dixonova testu:

30 hodnot; kritická hodnota, ($\alpha = 5 \%$): 0.2600; kritická hodnota, ($\alpha = 10 \%$): 0.3410

Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_1 = 0.0317$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2600$$

Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_n = 0.0794$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2600$$

Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$$c = 54.67 \text{ mg/ml}$$

$$c = 55.59 \text{ mg/ml}$$

$$c = 57.89 \text{ mg/ml}$$

$$c = 58.80 \text{ mg/ml}$$

$$c = 62.02 \text{ mg/ml}$$

$$c = 62.48 \text{ mg/ml}$$

$$c = 62.94 \text{ mg/ml}$$

$$c = 63.40 \text{ mg/ml}$$

$$c = 65.70 \text{ mg/ml}$$

$$c = 67.53 \text{ mg/ml}$$

$c = 69.37 \text{ mg/ml}$

$c = 69.37 \text{ mg/ml}$

$c = 70.29 \text{ mg/ml}$

$c = 70.75 \text{ mg/ml}$

$c = 70.75 \text{ mg/ml}$

$c = 72.13 \text{ mg/ml}$

$c = 73.05 \text{ mg/ml}$

$c = 73.97 \text{ mg/ml}$

$c = 74.42 \text{ mg/ml}$

$c = 76.72 \text{ mg/ml}$

$c = 77.64 \text{ mg/ml}$

$c = 78.56 \text{ mg/ml}$

$c = 79.02 \text{ mg/ml}$

$c = 79.48 \text{ mg/ml}$

$c = 79.94 \text{ mg/ml}$

$c = 80.40 \text{ mg/ml}$

$c = 81.32 \text{ mg/ml}$

$c = 81.32 \text{ mg/ml}$

$c = 81.32 \text{ mg/ml}$

$c = 83.61 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 71.15 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 8.49 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.2 Druhá sada výsledků

V této druhé sadě výsledků je uvedeno zpracování výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jež byly získány během druhého měření. Jsou zde uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána - následně je zde uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu.

3.2.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Tab. 3.8: Absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady (řádky A, B a C) a použitá koncentrace BSA v koncentrační řadě (řádek: „c (mg/ml)“) – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

<	1	2	3	4	5	6
A	0,5160	0,6120	0,6680	1,0510	0,8080	0,8680
B	0,5010	0,6190	0,6700	0,7440	0,8170	0,8590
C	0,5180	0,6260	0,6810	0,7520	0,7710	0,8580
c (mg/ml):	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

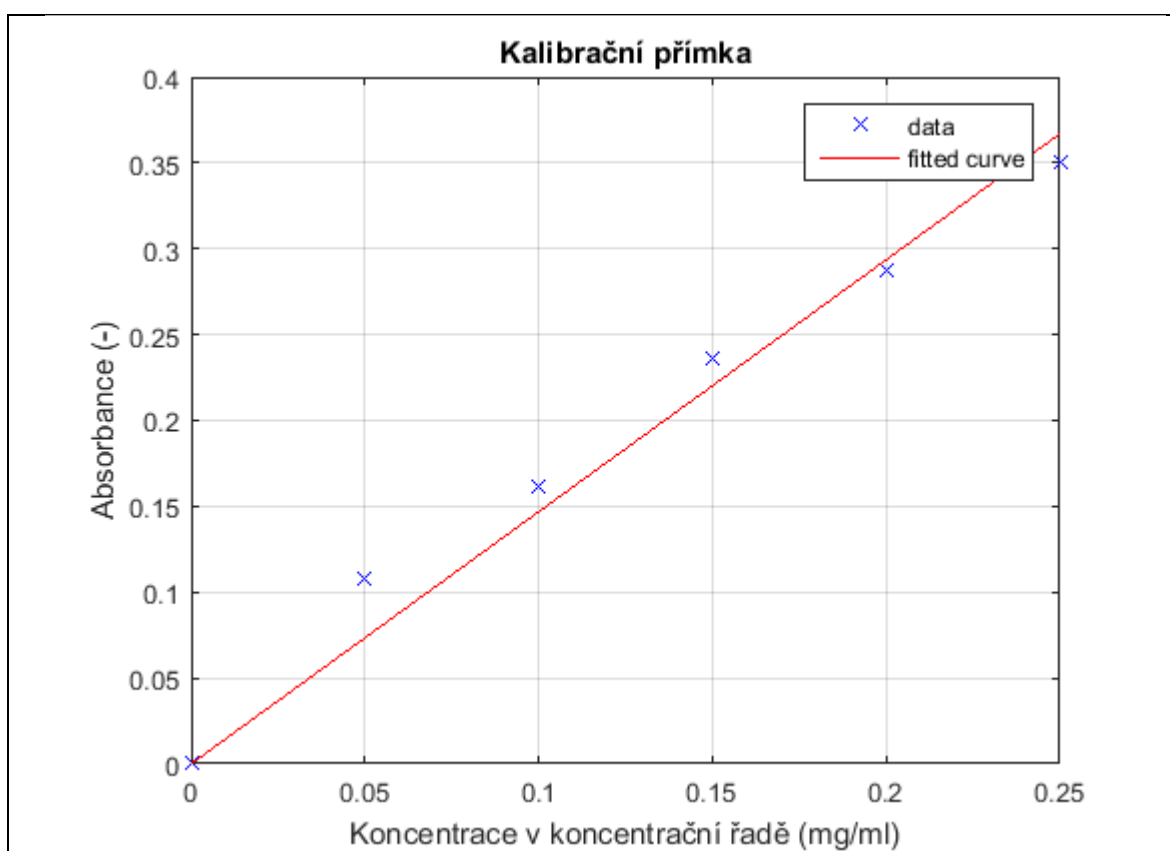
V tabulce 3.8, v řádcích A, B a C jsou uvedeny absorbance (bezrozměrné) změřené pro koncentrační řadu. Tyto tři řady absorbancí byly zadány do dialogového okna v MATLABu s tím, že byla vynechána hodnota z pozice A4. Tato hodnota je považována za zatíženou hrubou chybou během pipetování. Místo této hodnoty byla zadána zkratka „NaN“. Dále byly do dialogového okna zadány hodnoty z řádku „c (mg/ml)“, tj. hodnoty koncentrací BSA v koncentrační řadě.

Tab. 3.9: syrová data (bezrozměrné absorbance) pro vertikální fotometr SUNRISE – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

<	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	0,6740	0,5830	0,6890	0,6970	0,6880	0,6870	0,6870	0,6980	0,6060	0,6370	0,6460	0,6570
G	0,6760	0,6840	0,6990	0,7000	0,6990	0,6980	0,6730	0,7020	0,6980	0,6800	0,6880	0,6870
H	0,6870	0,6920	0,6790	0,6830	0,6900	0,4800	0,6570	0,6530	0,4790	0,5290	0,6750	0,6930

3.2.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Zde bylo zadáno 36 hodnot. Skript je tvořen s ohledem na to, že zadávaných hodnot je maximálně jen 30 – kvůli rozsahu hodnot, které umí zpracovat Dixonův Q-test. Nicméně zde bylo testováno zmíněných 36 hodnot, neboť bylo zjištěno, že zde rozložení dat neodpovídá normálnímu rozložení a používáme zde pouze „Tukeyho kritérium“, které není závislé na počtu zadaných hodnot.



Obr. 3.5: Závislost absorbance na koncentraci v rámci koncentrační řady (vertikální fotometr SUNRISE)

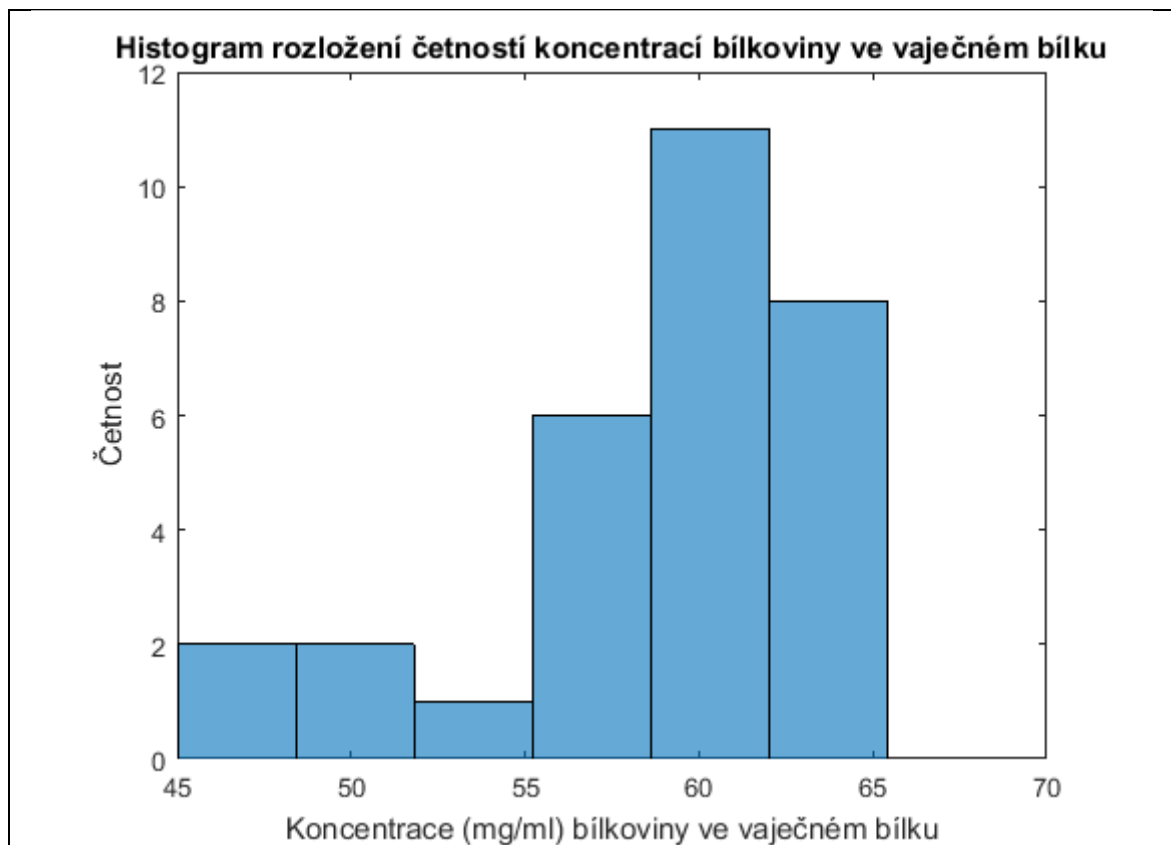
směrnice kalibrační přímky = 1.468

Vyřadil jsem těchto 2 změřených absorbancí (bezrozměrné) zředěného vzorku bílku:

0.4790

0.4800

Tyto absorbance jsou po korekci na slepý vzorek záporné, nulové nebo vyšší nežli je nejvyšší absorbance pro koncentrační řadu.



Obr. 3.6: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

h =

Histogram with properties:

Data: [1x30 double]

Values: [2 2 1 6 11 8]

NumBins: 6

BinEdges: [45 48.4000 51.8000 55.2000 58.6000 62 65.4000]

BinWidth: 3.4000

BinLimits: [45 65.4000]

schránek histogramu = 6

počet měření = 30

minimální hodnota = 45.74 mg/ml

maximální hodnota = 64.82 mg/ml

aritmetický průměr = 58.64 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 19.07 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.325

medián = 59.71 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 55.96 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 63.12 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 7.15 mg/ml

směrodatná odchylka = 5.03 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.09

šikmost = -1.05

špičatost = 3.36

minimální z-skór = -2.56

maximální z-skór = 1.23

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 1 --> NENÍ normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Dle [23] vymežíme dolní a horní hranici pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

dolní hranice = 45.23 mg/ml

horní hranice = 73.85 mg/ml

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$c = 45.74 \text{ mg/ml}$

$c = 48.13 \text{ mg/ml}$

$c = 49.49 \text{ mg/ml}$

$c = 49.49 \text{ mg/ml}$

$c = 54.94 \text{ mg/ml}$

$c = 55.28 \text{ mg/ml}$

$c = 55.62 \text{ mg/ml}$

$c = 55.96 \text{ mg/ml}$

$c = 56.99 \text{ mg/ml}$

$c = 57.33 \text{ mg/ml}$

$c = 58.35 \text{ mg/ml}$

$c = 58.69 \text{ mg/ml}$

$c = 59.71 \text{ mg/ml}$

$c = 59.71 \text{ mg/ml}$

$c = 59.71 \text{ mg/ml}$

$c = 59.71 \text{ mg/ml}$

$c = 60.05 \text{ mg/ml}$

$c = 60.05 \text{ mg/ml}$

$c = 60.39 \text{ mg/ml}$

$c = 60.73 \text{ mg/ml}$

$c = 61.41 \text{ mg/ml}$

$c = 61.75 \text{ mg/ml}$

$c = 63.12 \text{ mg/ml}$

$c = 63.46 \text{ mg/ml}$

$c = 63.46 \text{ mg/ml}$

$c = 63.46 \text{ mg/ml}$

$c = 63.80 \text{ mg/ml}$

$c = 63.80 \text{ mg/ml}$

$c = 64.14 \text{ mg/ml}$

$c = 64.82 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 58.64 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 5.03 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.2.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

Tab. 3.10: koncentrace a absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

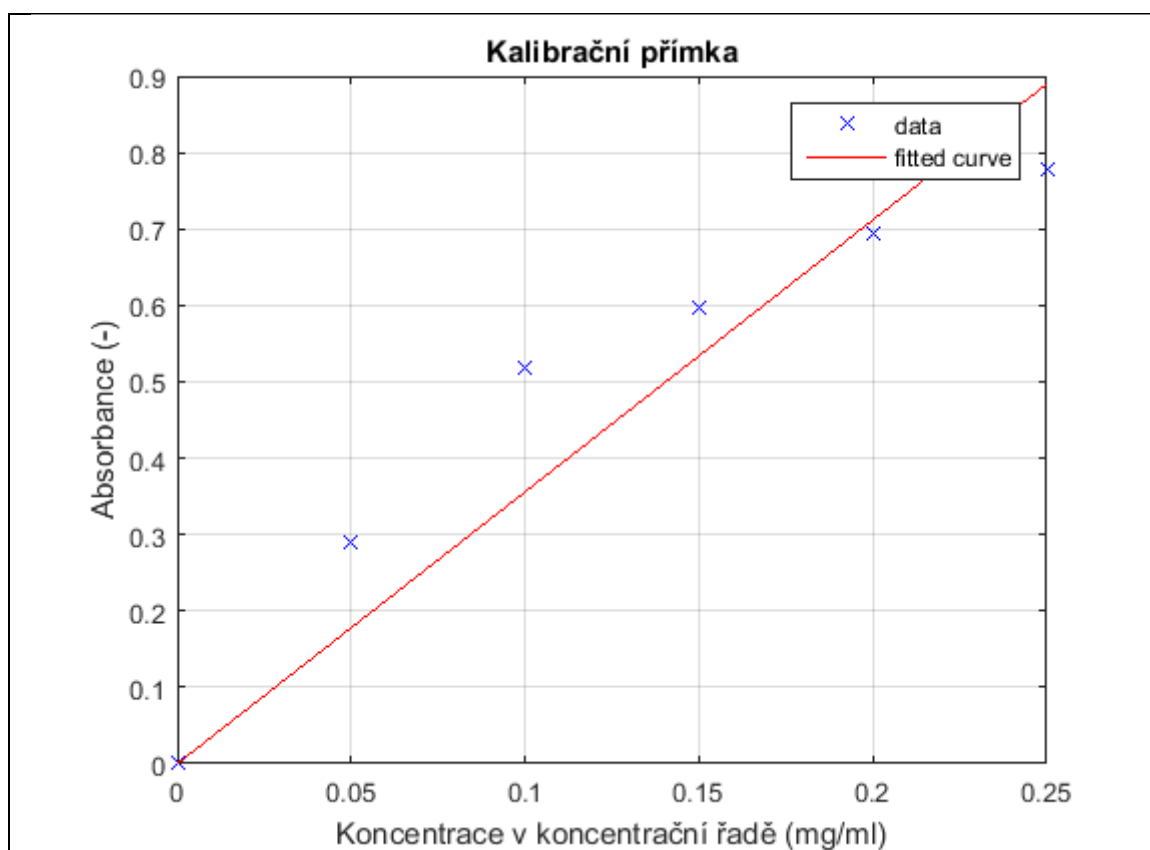
absorbance	0,000	0,281	0,533	0,591	0,704	0,768
absorbance	0,000	0,301	0,506	0,602	0,682	0,79
koncentrace mg/ml	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Tab. 3.11: hodnoty absorbancí (bezrozměrné, korigované na slepý vzorek již samotným přístrojem) pro reálné vzorky bílkoviny ze zředěného a homogenizovaného vzorku bílku – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,490	0,444	0,527	0,527	0,539	0,531
0,464	0,409	0,506	0,505	0,521	0,508
0,391	0,500	0,494	0,523	0,532	0,507
0,453	0,510	0,547	0,564	0,539	0,548
0,480	0,514	0,517	0,545	0,505	0,548

3.2.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

Bylo zde zadáno 30 vstupních hodnot absorbancí pro reálný vzorek roztoku bílkoviny.



Obr. 3.7: Závislost absorbance na koncentraci v rámci koncentrační řady (UV-VIS spektrofotometr Libra S22)

směrnice kalibrační přímky = 3.559

Nevyřadil jsem žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.

Pozn.: Zde došlo k prvnímu běhu programu, kdy po výpočtu koncentrací dospěl k výsledku, že se nejedná o normální rozložení a dále vyřadil jednu hodnotu koncentrace jako odlehlou:

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 1 --> NENÍ normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

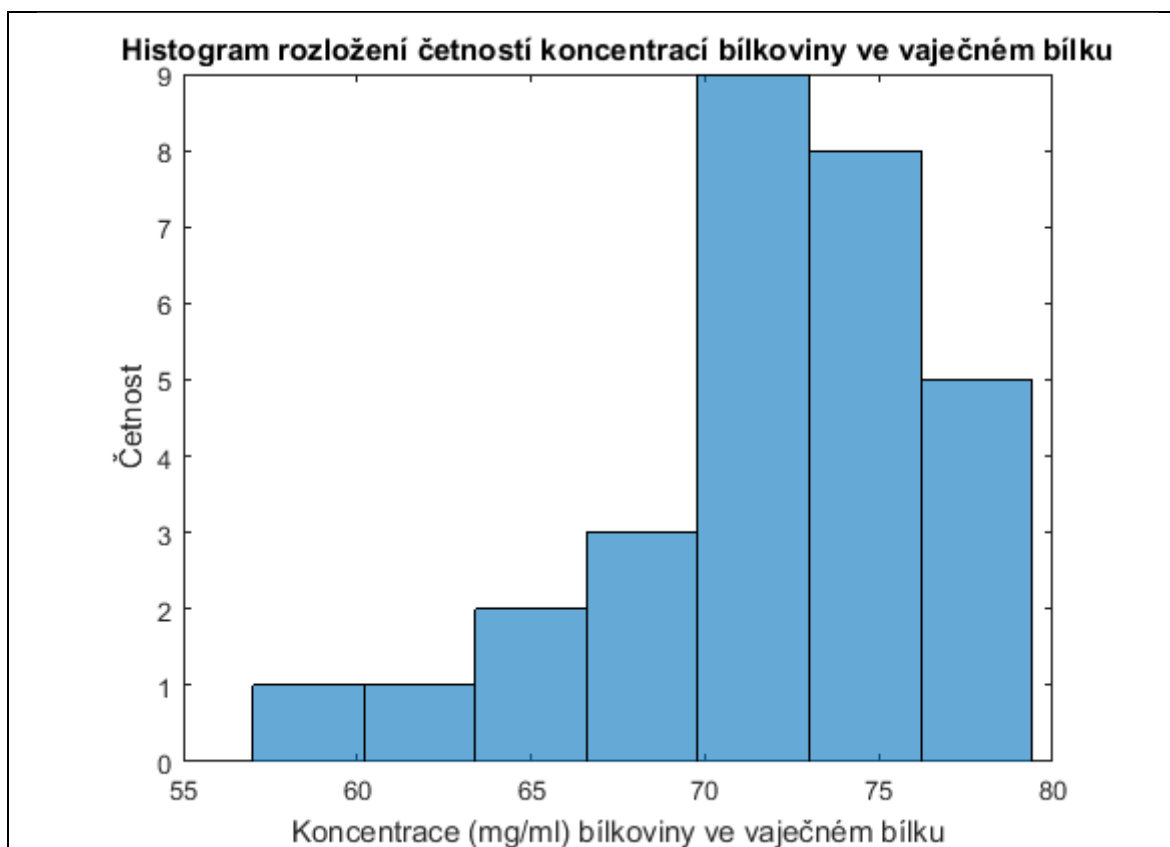
Dle [23] vymezíme dolní a horní hranici pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

dolní hranice = 61.40 mg/ml

horní hranice = 82.75 mg/ml

Pozn.: Skript vyřadil 1 hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Pozn.: Zde již došlo ke druhému běhu programu (včetně vykreslení histogramu), kdy již program detekoval normální rozložení dat a zpracoval zbylých 29 hodnot:



Obr. 3.8: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na UV-VIS spektrofotometru
Libra

h =

Histogram with properties:

Data: [1x29 double]

Values: [1 1 2 3 9 8 5]

NumBins: 7

BinEdges: [57 60.2000 63.4000 66.6000 69.8000 73 76.2000 79.4000]

BinWidth: 3.2000

BinLimits: [57 79.4000]

schránek histogramu = 7

počet měření = 29

minimální hodnota = 57.46 mg/ml

maximální hodnota = 79.24 mg/ml

aritmetický průměr = 71.69 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 21.78 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.304

medián = 72.22 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 70.04 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 74.99 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 4.95 mg/ml

směrodatná odchylka = 4.87 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.07

šikmost = -1.07

špičatost = 4.07

minimální z-skór = -2.92

maximální z-skór = 1.55

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 0 --> JE normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

29. řádek tabulky Dixonova testu:

29 hodnot; kritická hodnota, (alfa = 5 %): 0.2630; kritická hodnota, (alfa = 10 %): 0.3450

Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_1 = 0.2258$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2630$$

Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_n = 0.1032$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

$$0.2630$$

Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$$c = 57.46 \text{ mg/ml}$$

$$c = 62.38 \text{ mg/ml}$$

$$c = 63.65 \text{ mg/ml}$$

$$c = 65.19 \text{ mg/ml}$$

$$c = 67.44 \text{ mg/ml}$$

$$c = 68.84 \text{ mg/ml}$$

$$c = 69.41 \text{ mg/ml}$$

$c = 70.25 \text{ mg/ml}$

$c = 70.95 \text{ mg/ml}$

$c = 70.95 \text{ mg/ml}$

$c = 71.09 \text{ mg/ml}$

$c = 71.23 \text{ mg/ml}$

$c = 71.37 \text{ mg/ml}$

$c = 71.65 \text{ mg/ml}$

$c = 72.22 \text{ mg/ml}$

$c = 72.64 \text{ mg/ml}$

$c = 73.20 \text{ mg/ml}$

$c = 73.48 \text{ mg/ml}$

$c = 74.04 \text{ mg/ml}$

$c = 74.04 \text{ mg/ml}$

$c = 74.61 \text{ mg/ml}$

$c = 74.75 \text{ mg/ml}$

$c = 75.73 \text{ mg/ml}$

$c = 75.73 \text{ mg/ml}$

$c = 76.57 \text{ mg/ml}$

$c = 76.85 \text{ mg/ml}$

$c = 76.99 \text{ mg/ml}$

$c = 76.99 \text{ mg/ml}$

$c = 79.24 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 71.69 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 4.87 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.3 Třetí sada výsledků

V této třetí sadě výsledků je uvedeno zpracování anonymizovaných výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22, které byly získány během měření studentů v předmětu Laboratorní technika, cvičení „Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin“. Jsou zde uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána - následně je zde uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu.

Pro vertikální fotometr SUNRISE i UV-VIS spektrofotometr Libra S22 bylo obdrženo nejprve 25 naměřených hodnot absorbance pro reálné vzorky bílkoviny a následně dalších 15 hodnot, které musely být zpracovány samostatně.

Pro zmiňovaný soubor 25 hodnot (jak u vertikálního fotometru SUNRISE, tak u UV-VIS spektrofotometru Liba S22) bylo též obdrženo pět řad absorbancí pro koncentrační řadu. Průměrné hodnoty pro kalibrační řadu byly spočítány v aplikaci MS Excel a poté zadány v dialogovém okně MATLABu.

Pro soubor 15 měření byly získány 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.

Koncentrace v koncentrační řadě byla u všech měření použita v tomto rozsahu:

- 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 a 0,25 mg BSA / ml.

3.3.1 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE

V následujících dvou tabulkách (tab. 3.12 a 3.13) jsou naměřená data pro koncentrační řady i vzorky bílku.

Tab. 3.12: : Absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady, jejich průměr a použitá koncentrace BSA v koncentrační řadě (řádek: „c (mg/ml)“) – do dialogového okna MATLABu byl zadán průměr absorbancí a řádek „c (mg/ml)“ s koncentracemi BSA:

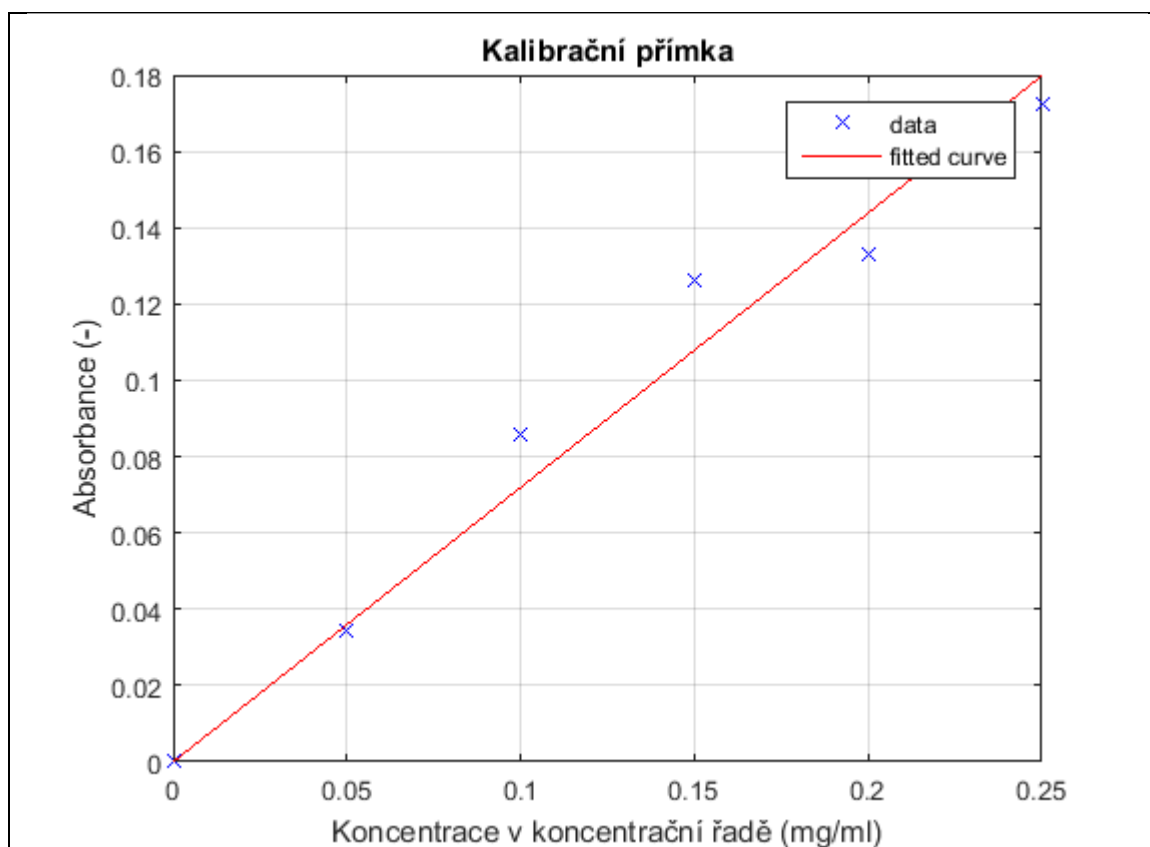
absorbance	0,226	0,238	0,332	0,370	0,336	0,415
absorbance	0,235	0,256	0,312	0,362	0,371	0,359
absorbance	0,252	0,296	0,324	0,378	0,380	0,434
absorbance	0,226	0,281	0,311	0,340	0,393	0,417
absorbance	0,257	0,297	0,346	0,376	0,381	0,433
průměr absorbancí	0,2392	0,2736	0,3250	0,3652	0,3722	0,4116
c (mg/ml)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Tab. 3.13: syrová data – absorbance (bezrozměrné) vertikálního fotometru SUNRISE pro reálné vzorky – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,310	0,284	0,534	0,304	0,422
0,330	0,278	0,534	0,300	0,418
0,319	0,296	0,551	0,291	0,414
0,331	0,297	0,502	0,295	0,418
0,336	0,270	0,524	0,296	0,410

3.3.1.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Zde bylo zpracovááno výše zmíněných 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu.



Obr. 3.9: Závislost absorbance na koncentraci v rámci koncentrační řady (vertikální fotometr SUNRISE)

směrnice kalibrační přímky = 0.719

Vyřadil jsem těchto 9 změřených absorbancí (bezrozměrné) zředěného vzorku bílku:

0.4140

0.4180

0.4180

0.4220

0.5020

0.5240

0.5340

0.5340

0.5510

Tyto absorbance jsou po korekci na slepý vzorek záporné, nulové nebo vyšší nežli je nejvyšší absorbance pro koncentrační řadu.

Pozn.: Zde došlo k prvnímu běhu programu, kdy po výpočtu koncentrací dospěl k výsledku, že se nejedná o normální rozložení a dále vyřadil jednu hodnotu koncentrace jako odlehlou:

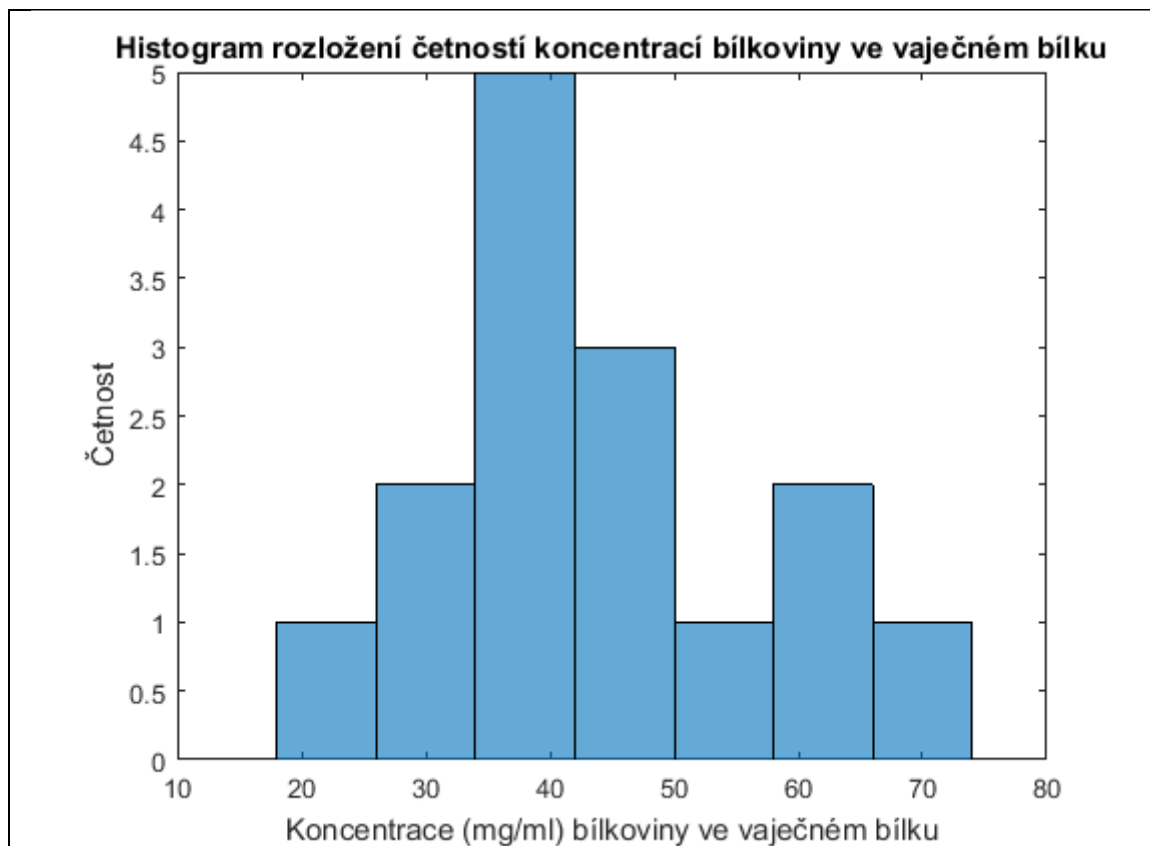
Andersonův-Darlingův test normality vyšel = 1 --> NENÍ normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Dle [23] vymežíme dolní a horní hradbu pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

dolní hradba = 4.55 mg/ml

horní hradba = 92.14 mg/ml

Pozn.: Zde již došlo ke druhému běhu programu (včetně vykreslení histogramu), kdy již program detekoval normální rozložení dat a zpracoval zbylých 15 hodnot:



Obr. 3.10: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

h =

Histogram with properties:

Data: [1x15 double]

Values: [1 2 5 3 1 2 1]

NumBins: 7

BinEdges: [18 26 34 42 50 58 66 74]

BinWidth: 8

BinLimits: [18 74]

schránek histogramu = 7

počet měření = 15

minimální hodnota = 21.41 mg/ml

maximální hodnota = 67.29 mg/ml

aritmetický průměr = 43.98 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 45.88 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 1.043

medián = 40.18 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 36.70 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 53.91 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 17.20 mg/ml

směrodatná odchylka = 13.56 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.31

šikmost = 0.29

špičatost = 2.21

minimální z-skór = -1.66

maximální z-skór = 1.72

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 0 --> JE normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

15. řádek tabulky Dixonova testu:

15 hodnot; kritická hodnota, (alfa = 5 %): 0.3380; kritická hodnota, (alfa = 10 %): 0.4380

Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_1 = 0.1212$$

kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %:

0.3380

Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_n = 0.0758$$

kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %:

0.3380

Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$$c = 21.41 \text{ mg/ml}$$

$$c = 26.97 \text{ mg/ml}$$

$$c = 31.14 \text{ mg/ml}$$

$$c = 36.01 \text{ mg/ml}$$

$$c = 38.79 \text{ mg/ml}$$

$$c = 39.48 \text{ mg/ml}$$

$$c = 39.48 \text{ mg/ml}$$

$c = 40.18 \text{ mg/ml}$

$c = 42.26 \text{ mg/ml}$

$c = 45.05 \text{ mg/ml}$

$c = 49.22 \text{ mg/ml}$

$c = 55.47 \text{ mg/ml}$

$c = 63.12 \text{ mg/ml}$

$c = 63.81 \text{ mg/ml}$

$c = 67.29 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 43.98 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 13.56 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Textový soubor: "LabTech.txt", s výpisem výsledků je ve složce: "C:\Users\Public".

3.3.2 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

Zde bylo zpracováváno výše zmíněných 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu.

Tab. 3.14: Absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady, jejich průměr a použitá koncentrace BSA v koncentrační řadě (řádek: „c (mg/ml)“) – do dialogového okna MATLABu byl zadán průměr absorbancí a řádek „koncentrace mg/ml“ s koncentracemi BSA:

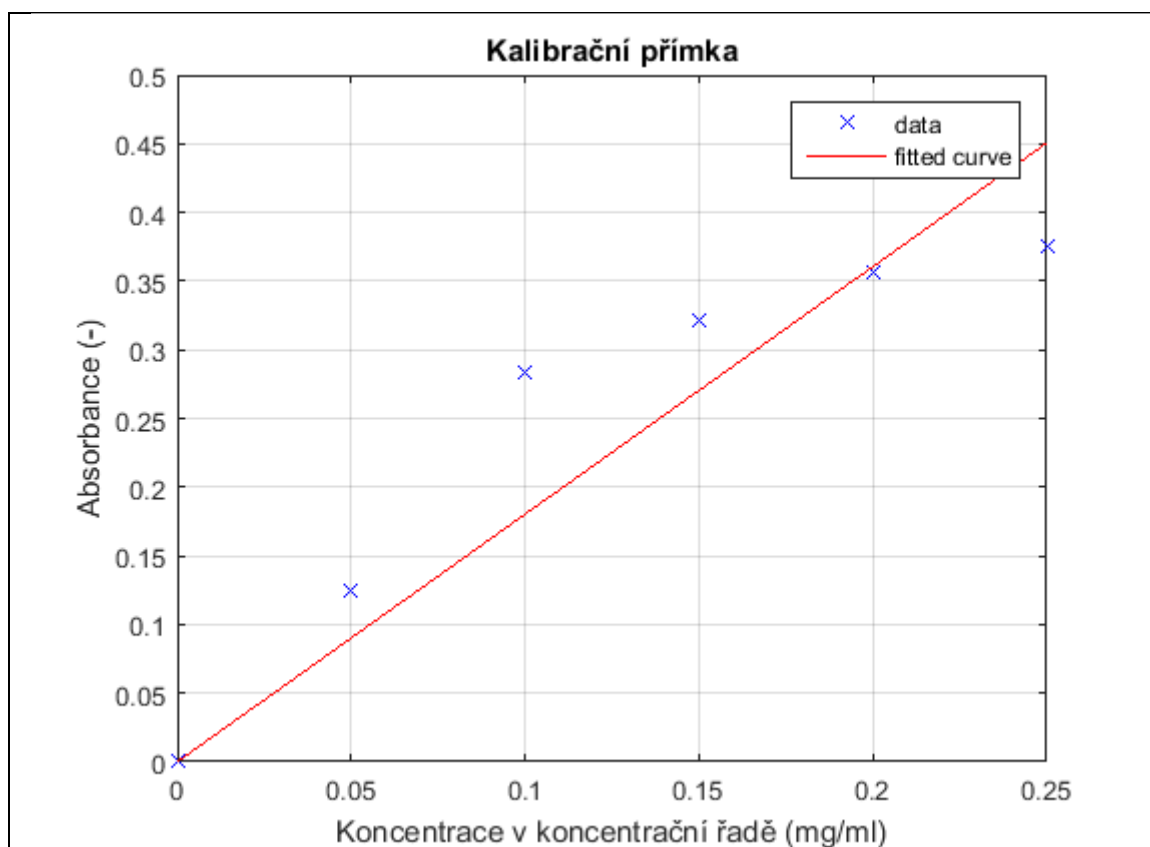
absorbance	0,000	0,018	0,267	0,305	0,357	0,361
absorbance	0,000	0,128	0,270	0,294	0,325	0,330
absorbance	0,000	0,249	0,265	0,291	0,295	0,308
absorbance	0,000	0,147	0,234	0,282	0,342	0,415
absorbance	0,000	0,080	0,384	0,432	0,462	0,464
průměr absorbancí	0,0000	0,1244	0,2840	0,3208	0,3562	0,3756
koncentrace mg/ml	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Tab. 3.15: syrová data – absorbance (bezrozměrné) UV-VIS spektrofotometru Libra S22 pro reálné vzorky – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,263	0,173	0,158	0,157	0,288
0,280	0,165	0,147	0,189	0,318
0,245	0,185	0,225	0,183	0,306
0,257	0,181	0,196	0,189	0,303
0,249	0,188	0,158	0,171	0,304

3.3.2.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

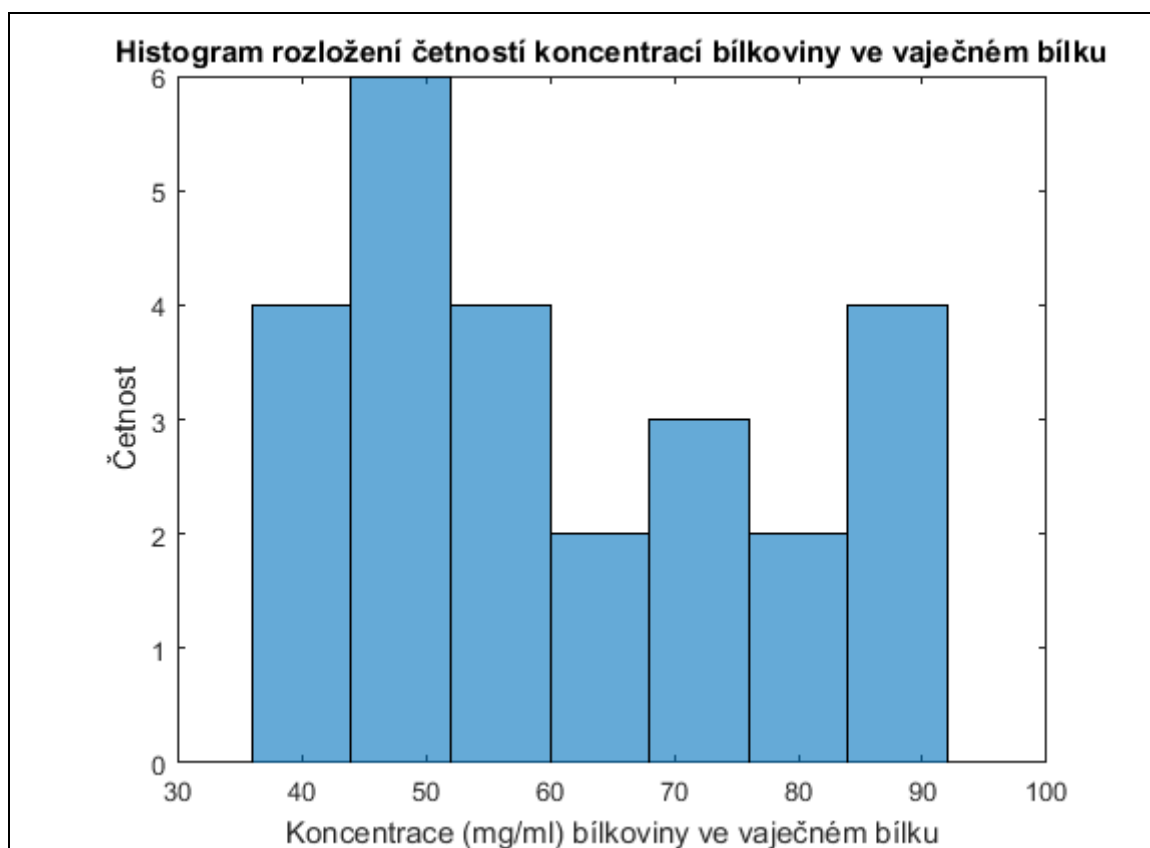
Zde bylo zpracovááno výše zmíněných 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu.



Obr. 3.11: Závislost absorbance na koncentraci v rámci koncentrační řady (UV-VIS spektrofotometr Libra S22)

směrnice kalibrační přímky = 1.803

Nevyřadil jsem žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.



Obr. 3.12: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

h =

Histogram with properties:

Data: [1x25 double]

Values: [4 6 4 2 3 2 4]

NumBins: 7

BinEdges: [36 44 52 60 68 76 84 92]

BinWidth: 8

BinLimits: [36 92]

schránek histogramu = 7

počet měření = 25

minimální hodnota = 40.77 mg/ml

maximální hodnota = 88.20 mg/ml

aritmetický průměr = 60.77 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 47.43 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.780

medián = 52.42 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 47.84 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 74.12 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 26.28 mg/ml

směrodatná odchylka = 15.62 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.26

šikmost = 0.45

špičatost = 1.70

minimální z-skór = -1.28

maximální z-skór = 1.76

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 1 --> NENÍ normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Dle [23] vymezíme dolní a horní hradbu pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

dolní hradba = 8.42 mg/ml

horní hradba = 113.54 mg/ml

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$c = 40.77 \text{ mg/ml}$

$c = 43.54 \text{ mg/ml}$

$c = 43.82 \text{ mg/ml}$

$c = 43.82 \text{ mg/ml}$

$c = 45.76 \text{ mg/ml}$

$c = 47.43 \text{ mg/ml}$

$c = 47.98 \text{ mg/ml}$

$c = 50.20 \text{ mg/ml}$

$c = 50.76 \text{ mg/ml}$

$c = 51.31 \text{ mg/ml}$

$c = 52.14 \text{ mg/ml}$

$c = 52.42 \text{ mg/ml}$

$c = 52.42 \text{ mg/ml}$

$c = 54.36 \text{ mg/ml}$

$c = 62.40 \text{ mg/ml}$

$c = 67.95 \text{ mg/ml}$

$c = 69.06 \text{ mg/ml}$

$c = 71.28 \text{ mg/ml}$

$c = 72.94 \text{ mg/ml}$

$c = 77.66 \text{ mg/ml}$

$c = 79.88 \text{ mg/ml}$

$c = 84.04 \text{ mg/ml}$

$c = 84.31 \text{ mg/ml}$

$c = 84.87 \text{ mg/ml}$

$c = 88.20 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 60.77 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 15.62 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.3.3 Výsledky měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Zde bylo zpracováváno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.

Tab. 3.16: koncentrace a absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

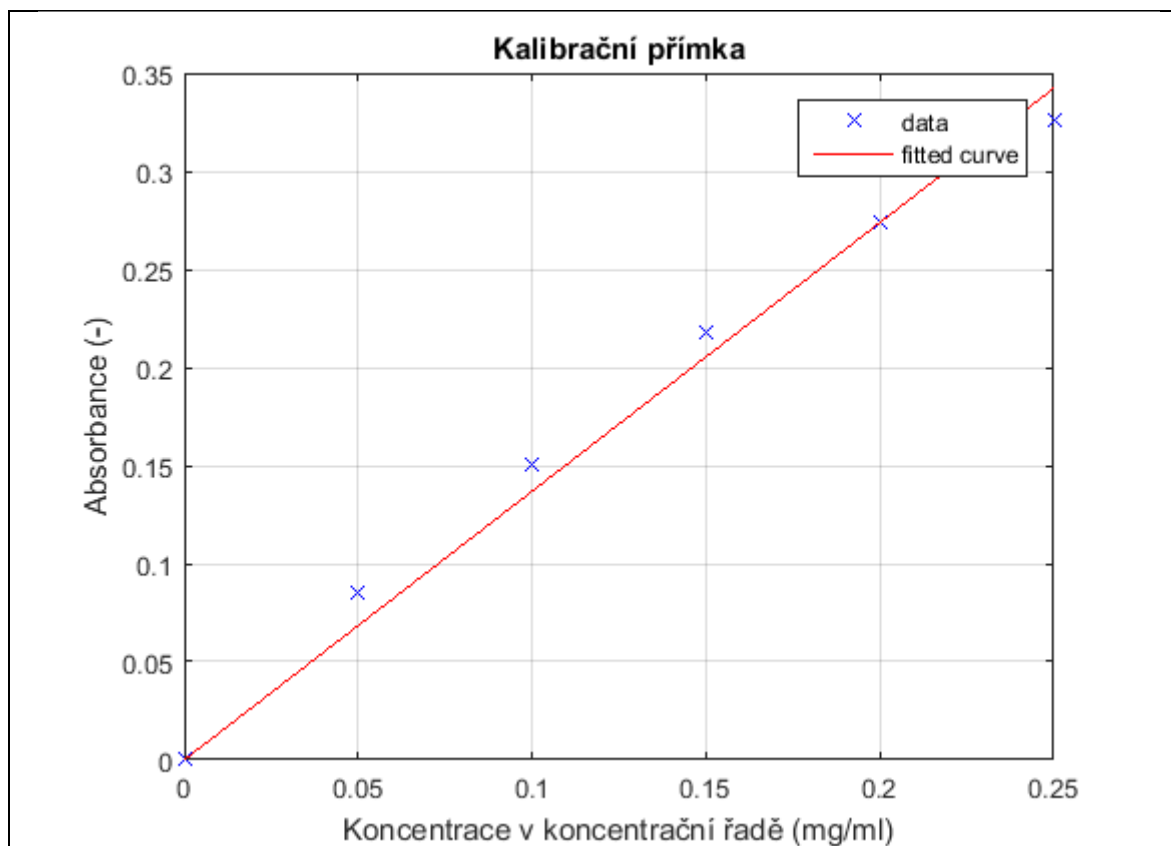
absorbance	0,490	0,556	0,580	0,638	0,655	0,696
absorbance	0,533	0,620	0,690	0,761	0,846	0,889
absorbance	0,489	0,591	0,695	0,766	0,832	0,905
koncentrace mg/ml	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Tab. 3.17: syrová data – absorbance (bezrozměrné) vertikálního fotometru SUNRISE pro reálné vzorky – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,619	0,740	0,755
0,618	0,799	0,753
0,603	0,799	0,738
0,605	0,724	0,749
0,615	0,834	0,748

3.3.3.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

Zde bylo zpracováváno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.



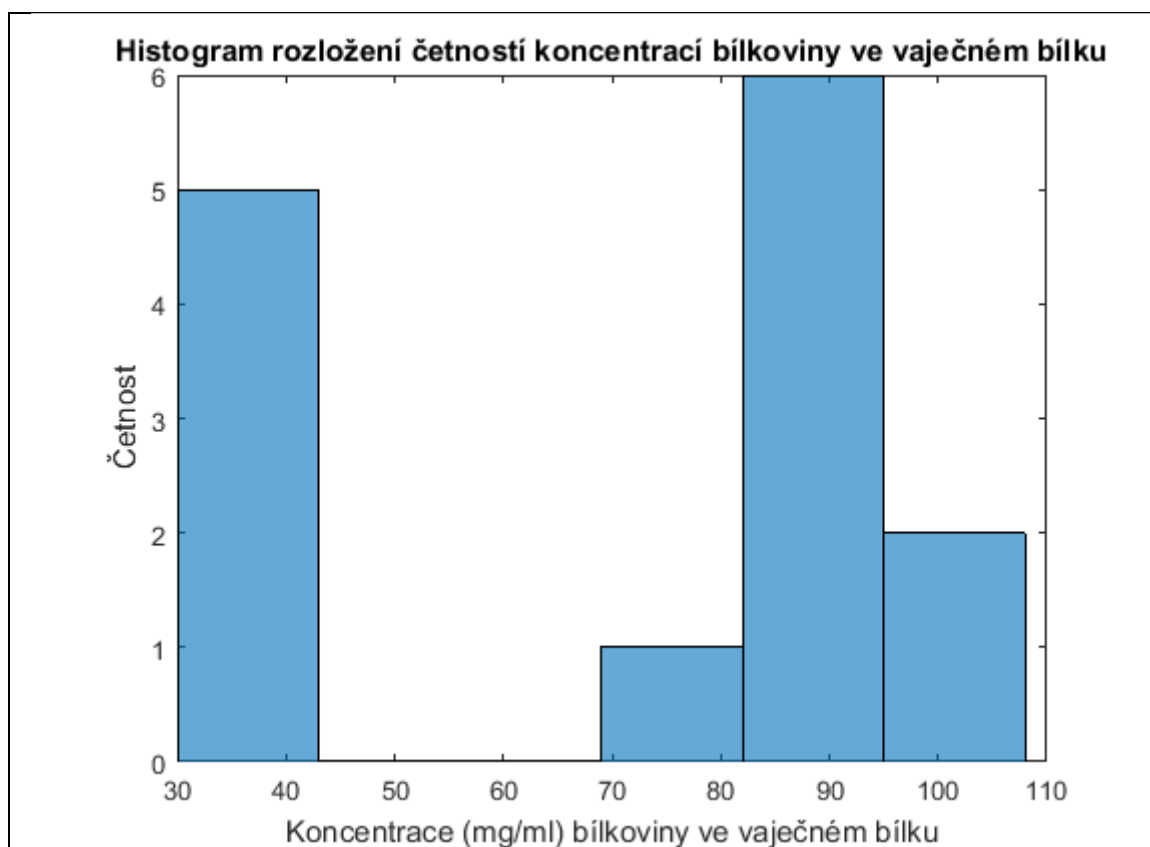
Obr. 3.13: Závislost absorbance na koncentraci v rámci koncentrační řady (vertikální fotometr SUNRISE)

směrnice kalibrační přímky = 1.369

Vyřadil jsem těchto 1 změřených absorbancí (bezrozměrné) zředěného vzorku bílku:
0.8340

Tyto absorbance jsou po korekci na slepý vzorek záporné, nulové
nebo vyšší nežli je nejvyšší absorbance pro koncentrační řadu.

Pozn.: Program dále zpracovává již jen zbylých 14 hodnot:



Obr. 3.14: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na vertikálním fotometru SUNRISE

h =

Histogram with properties:

Data: [1x14 double]

Values: [5 0 0 1 6 2]

NumBins: 6

BinEdges: [30 43 56 69 82 95 108]

BinWidth: 13

BinLimits: [30 108]

schránek histogramu = 6

počet měření = 14

minimální hodnota = 36.16 mg/ml

maximální hodnota = 107.74 mg/ml

aritmetický průměr = 73.28 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 71.58 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.977

medián = 85.83 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 41.63 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 90.94 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 49.30 mg/ml

směrodatná odchylka = 27.26 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.37

šikmost = -0.36

špičatost = 1.50

minimální z-skór = -1.36

maximální z-skór = 1.26

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 1 --> NENÍ normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Dle [23] vymežíme dolní a horní hradbu pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

dolní hradba = -32.32 mg/ml

horní hradba = 164.89 mg/ml

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$c = 36.16 \text{ mg/ml}$

$c = 36.89 \text{ mg/ml}$

$c = 40.54 \text{ mg/ml}$

$c = 41.63 \text{ mg/ml}$

$c = 42.00 \text{ mg/ml}$

$c = 80.35 \text{ mg/ml}$

$c = 85.46 \text{ mg/ml}$

$c = 86.19 \text{ mg/ml}$

$c = 89.11 \text{ mg/ml}$

$c = 89.48 \text{ mg/ml}$

$c = 90.94 \text{ mg/ml}$

$c = 91.67 \text{ mg/ml}$

$c = 107.74 \text{ mg/ml}$

$c = 107.74 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 73.28 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 27.26 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.3.4 Výsledky měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

Zde bylo zpracováváno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.

Tab. 3.18: koncentrace a absorbance (bezrozměrné) koncentrační řady – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

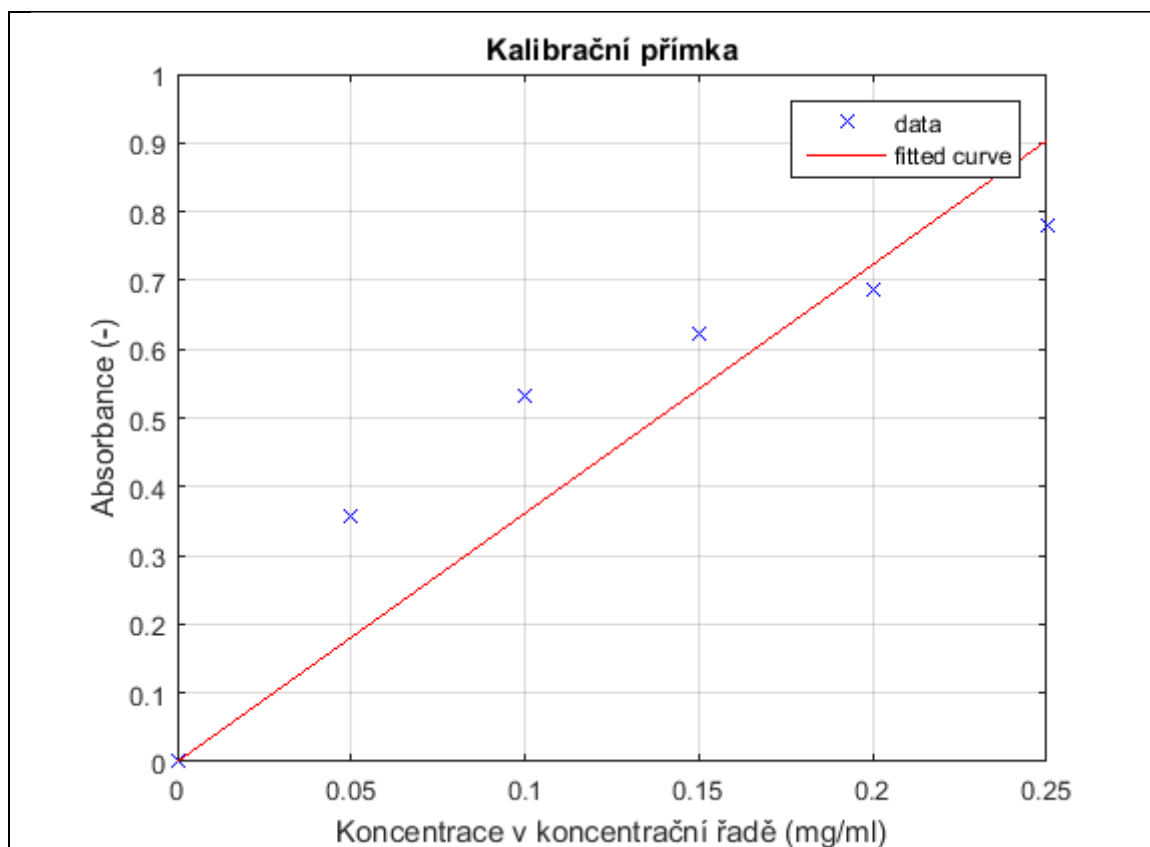
absorbance	0,000	0,391	0,510	0,587	0,590	0,647
absorbance	0,000	0,302	0,483	0,535	0,619	0,761
absorbance	0,000	0,382	0,600	0,749	0,852	0,932
koncentrace mg/ml	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Tab. 3.19: syrová data – absorbance (bezrozměrné) UV-VIS spektrofotometru Libra S22 pro reálné vzorky – tyto hodnoty byly zadány do dialogového okna MATLABu:

0,568	0,649	0,684
0,545	0,624	0,657
0,640	0,548	0,645
0,575	0,537	0,656
0,494	0,625	0,601

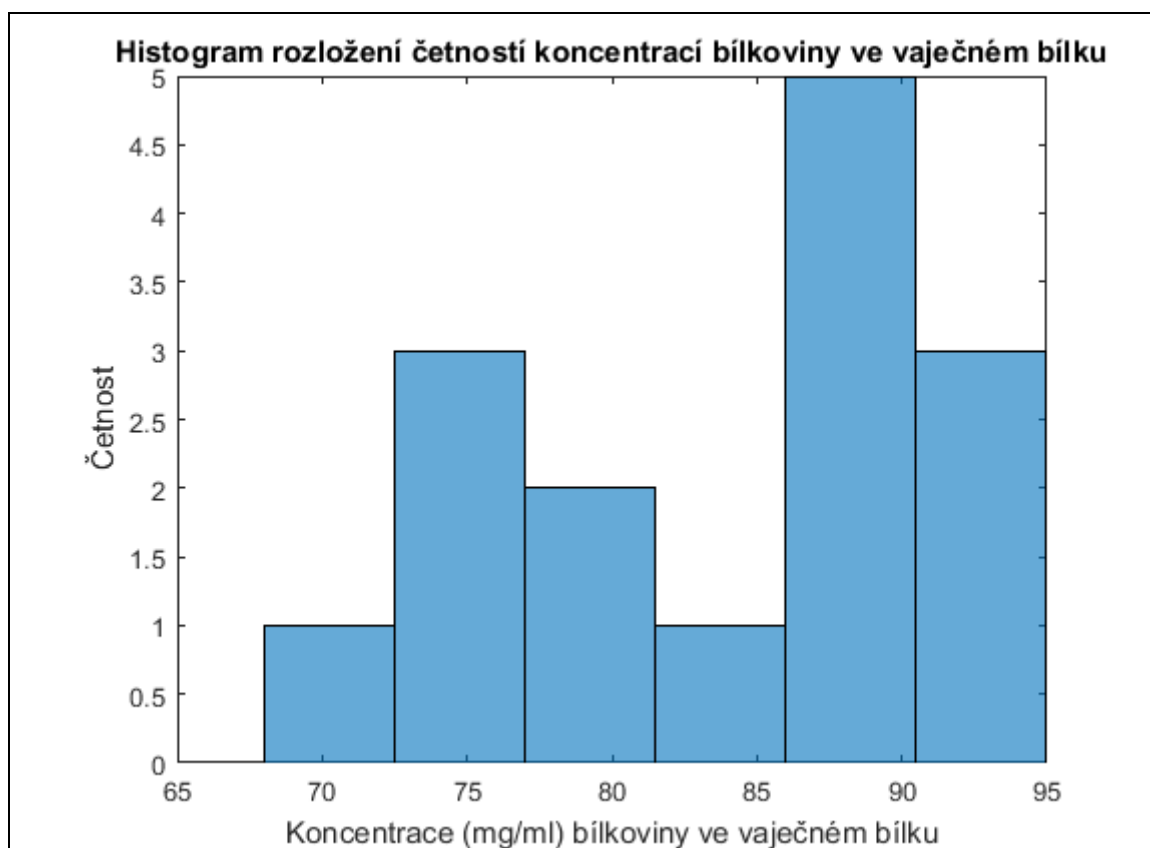
3.3.4.1 Výpis z použití skriptu v MATLABu pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

Zde bylo zpracováváno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.



směrnice kalibrační přímky = 3.614

Nevyřadil jsem žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.



Obr. 3.15: Histogram rozložení hodnot koncentrací pro měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22

h =

Histogram with properties:

Data: [1x15 double]

Values: [1 3 2 1 5 3]

NumBins: 6

BinEdges: [68 72.5000 77 81.5000 86 90.5000 95]

BinWidth: 4.5000

BinLimits: [68 95]

schránek histogramu = 6

počet měření = 15

minimální hodnota = 68.34 mg/ml

maximální hodnota = 94.62 mg/ml

aritmetický průměr = 83.45 mg/ml

(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty:)

rozpětí = 26.28 mg/ml

(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru:)

poměr: rozpětí/průměr = 0.315

medián = 86.32 mg/ml

Q1 tj. první kvartil = 76.50 mg/ml

Q3 tj. třetí kvartil = 89.64 mg/ml

(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první kvartil:)

mezikvartilové rozpětí = 13.14 mg/ml

směrodatná odchylka = 7.68 mg/ml

(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický průměr:)

variační koeficient = 0.09

šikmost = -0.41

špičatost = 2.04

minimální z-skór = -1.97

maximální z-skór = 1.46

Adersonův-Darlingův test normality vyšel = 0 --> JE normální rozložení (na hladině významnosti $\alpha = 0,05 = 5 \%$).

Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých hodnot.

15. řádek tabulky Dixonova testu:

15 hodnot; kritická hodnota, (alfa = 5 %): 0.3380; kritická hodnota, (alfa = 10 %): 0.4380

Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_1 = 0.2263$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

0.3380

Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.

Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$,

jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího zpracování.

$$Q_n = 0.1421$$

kritická hodnota, při $\alpha = 0.05 = 5 \%$:

0.3380

Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku:

$$c = 68.34 \text{ mg/ml}$$

$$c = 74.29 \text{ mg/ml}$$

$$c = 75.39 \text{ mg/ml}$$

$$c = 75.81 \text{ mg/ml}$$

$$c = 78.58 \text{ mg/ml}$$

$$c = 79.54 \text{ mg/ml}$$

$$c = 83.14 \text{ mg/ml}$$

$c = 86.32 \text{ mg/ml}$

$c = 86.46 \text{ mg/ml}$

$c = 88.54 \text{ mg/ml}$

$c = 89.23 \text{ mg/ml}$

$c = 89.78 \text{ mg/ml}$

$c = 90.75 \text{ mg/ml}$

$c = 90.89 \text{ mg/ml}$

$c = 94.62 \text{ mg/ml}$

Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bílku (aritmetický průměr) = 83.45 mg/ml.

Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny ve vaječném bílku = 7.68 mg/ml.

Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

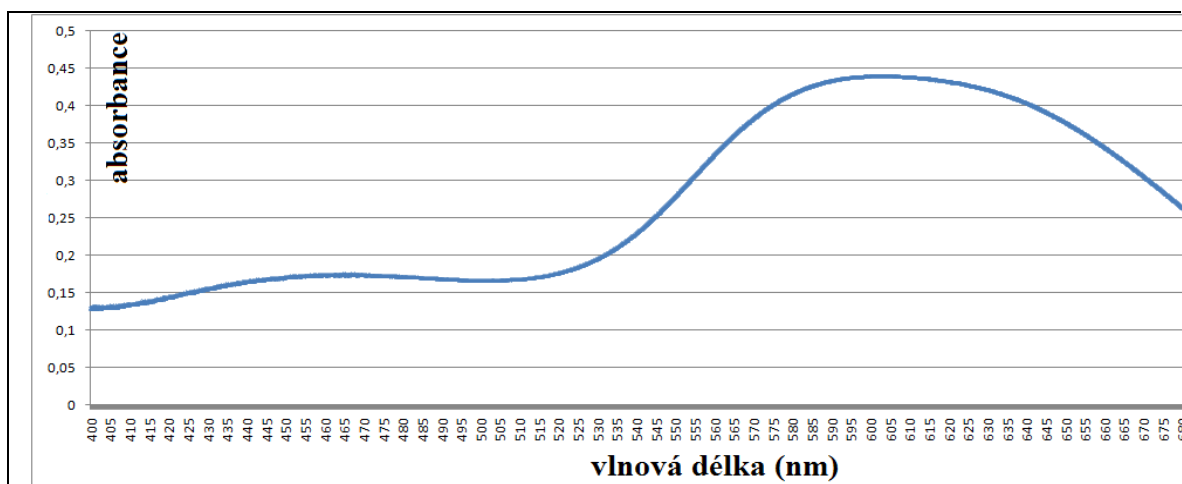
Histogram:

"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.png" je ve složce: "C:\Users\Public".

3.4 Měření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD

UV-VIS spektrofotometr SPECORD je určen pro proměření celého spektra neboli absorbancí na velkém rozsahu vlnových délek. Získáme tak názorný přehled, na jakých vlnových délkách je např. nejnižší nebo nejvyšší absorbance. V tomto dvoupraprskovém spektrofotometru probíhá vždy najednou proměření jedné kyvety se slepým vzorkem a jedné kyvety se stanovovaným analytem a bývá získáno spektrum absorbancí pro velké rozmezí vlnových délek pro vzorek v jedné kyvetě. Čili nelze současně měřit více než jeden vzorek s analytem a měření na velkém množství kyvet je velmi nepraktické.

Proměření spektra je součástí navrženého standardu. Bylo proměřeno spektrum v rozsahu 400 až 700 nm. Z průběhu proměřeného spektra vyplývá, že zvolená vlnová délka pro měření absorbancí 620 nm pro vertikální fotometr SUNRISE i pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 leží v oblasti maximální absorbance. V původní práci Bradfordové je používána absorbance měřená na 595 nm. [12]



Obr. 3.16: průběh absorbance - roztok bílkoviny vs. destilovaná voda

Při měření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD byl z přístroje získán csv (comma separated values) soubor, ze kterého lze vyčíst na vlnové délce 620 nm absorbanci 0,4314.

4 Diskuze

V první sadě výsledků je uvedeno zpracování výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jež byly získány během prvního měření. Jsou uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána. Následně je uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu. Pro vertikální fotometr SUNRISE jsou v kapitole 3.1.1 uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána v MATLABu a výsledek je ukázán v kapitole 3.1.1.1. Pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jsou uvedena syrová data v kapitole 3.1.2 a výsledek jejich zpracování v MATLABu je uveden v kapitole 3.1.2.1.

Skript vyřazoval případné nevhodné absorbance změřené u reálného vzorku bílku. V případě vertikálního fotometru SUNRISE vyřadil zde osm (ze třiceti, tj. 26,7 %) změřených absorbancí. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 zde nevyřadil žádnou ze změřených absorbancí.

Následně byly vypočteny statistické charakteristiky polohy a variability. Byl proveden Adersonův-Darlingův test normality rozložení dat. U měření na obou přístrojích zde již zprvu bylo detekováno normální rozložení. Následně byl proveden u měření na obou přístrojích Dixonův Q-test na odlehlé hodnoty. V obou případech nebyly vyloučeny žádné výsledné hodnoty koncentrací jako odlehlé. Dále byly jednotlivé vypočtené výsledné hodnoty koncentrací bílkoviny v reálném vzorku vypsány a jako hlavní výsledek vypsány tyto charakteristiky polohy a variability: aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 62,05 mg/ml,

směrodatná odchylka: 21,17 mg/ml.

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 71,15 mg/ml,

směrodatná odchylka: 8,49 mg/ml.

Dle výpisu MATLABu zde vychází v případě vertikálního fotometru SUNRISE variační koeficient (bezrozměrný) roven 0,34. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 roven 0,12.

Značné rozdíly výsledků u obou zkoumaných přístrojů mohou být způsobeny takto: V případě přípravy vzorků pro vertikální fotometr SUNRISE dochází během pipetování k následující systematické chybě v množství zkoumaného vzorku. Správně mělo být pipetováno 20 μ l roztoku BSA a ředěného reálného vzorku, ve skutečnosti bylo dodávané množství systematicky nižší cca o 8,1 % (to bylo zjištěno vážením mikrotitrační destičky). Po jednoduchém přepočtu by pak aritmetický průměr pro vertikální fotometr SUNRISE měl vycházet 67,55 mg/ml, tj. blíže k výsledku pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22. Bohužel přepočet nemůže být tak jednoduchý, neboť může být podhodnoceno množství nejen ředěného reálného vzorku bílkoviny, ale též roztoku BSA pro kalibraci, čímž by chyba měla být do určité míry korigována.

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 je nejmenší pipetované množství u BSA a reálného vzorku bílkoviny 200 μ l. Dále pipetování je zde prováděno do kyvety a kyveta je prosvěcována přibližně v polovině své výšky, čili zde nedochází ani k odchylkám danými různou výškou hladiny (dle nepipetovaného množství) jako je tomu v případě vertikálního fotometru SUNRISE (používá mikrotitrační destičku) a může zde docházet jen k minimálním chybám.

Dle výše uvedeného je měření na UV-VIS spektrofotometru Libra S22 přesnější (viz variační koeficient) a nedochází zde zřejmě k výraznějším chybám během přípravy vzorků a měření.

Ve druhé sadě výsledků je uvedeno zpracování výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jež byly získány během druhého měření. Jsou uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána. Následně je uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu. Pro vertikální fotometr SUNRISE jsou v kapitole 3.2.1 uvedena syrová data, jež byla dále zpracována v MATLABu a výsledek je ukázán v kapitole 3.2.1.1. Pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jsou uvedena syrová data v kapitole 3.2.2 a výsledek jejich zpracování v MATLABu je uveden v kapitole 3.2.2.1.

V případě vertikálního fotometru SUNRISE bylo zadáno 36 změřených hodnot absorbancí pro reálné vzorky bílkoviny. Skript je tvořen s ohledem na to, že těchto hodnot je zadávaných maximálně jen 30 – kvůli rozsahu hodnot, které umí zpracovat Dixonův Q-test. Nicméně zde bylo testováno zmíněných 36 hodnot, neboť bylo zjištěno, že zde rozložení dat neodpovídá normálnímu rozložení a bylo zde používáno pouze „Tukeyho kritérium“, které není závislé na počtu zadaných hodnot.

Následně skript vyřazoval případné nevhodné absorbance změřené u reálného vzorku bílku. V tomto případě není na závadu vyšší počet změřených absorbancí u reálného vzorku, neboť v tomto případě zatím skript pouze vyřazuje nevhodné absorbance po korekci na slepý vzorek – tj. ty, které po této korekci vycházejí záporné, nulové nebo vyšší nežli je nejvyšší změřená absorbance pro příslušnou koncentraci

řadu po korekci (podrobněji viz kapitola „2.4 Popis funkce použitého skriptu v MATLABu“).

V případě vertikálního fotometru SUNRISE vyřadil zde dvě (z 36, tj. 5,6 %) změřené absorbance. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 posuzoval již jen 30 změřených absorbancí pro reálný vzorek a nevyřadil zde žádnou ze změřených absorbancí.

Následně byly vypočteny statistické charakteristiky polohy a variability. Byl proveden Adersonův-Darlingův test normality rozložení dat.

V případě výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE bylo detekováno nenormální rozložení dat. Byla vymezena „Tukeyho kritériem“ dolní a horní hradba pro vyloučení odlehlých hodnot. Po vyloučení dvou hodnot absorbancí pro reálné vzorky byly ještě vyloučeny čtyři hodnoty výsledných koncentrací pro reálné vzorky jako odlehlé.

Následně skript vypsál výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku a hlavní výsledek ve formě aritmetického průměru a směrodatné odchylky (viz níže).

V případě výsledků pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 zde nejprve bylo detekováno nenormální rozložení dat a skript vyřadil jednu hodnotu výsledné koncentrace pro reálný vzorek jako odlehlou. Následně při druhé běhu skriptu bylo detekováno normální rozložení dat a skript zde nevyřadil žádnou hodnotu výsledné koncentrace reálného vzorku jako odlehlou. Byly též vypsány statistické charakteristiky polohy a variability. Následně skript vypsál výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku a vypsál hlavní výsledek ve formě aritmetického průměru a směrodatné odchylky (viz níže).

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 58,64 mg/ml,

směrodatná odchylka: 5,03 mg/ml.

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 71,69 mg/ml,

směrodatná odchylka: 4,87 mg/ml.

Dle výpisu MATLABu zde vychází v případě vertikálního fotometru SUNRISE variační koeficient (bezrozměrný) roven 0,09. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 roven 0,07.

Dle výše uvedeného druhého měření je UV-VIS spektrofotometr Libra S22 je zřejmě o něco málo přesnější (viz variační koeficient) nežli vertikální fotometr SUNRISE. Také též znovu dochází k systematické chybě při pipetování roztoků s BSA a reálných vzorků do mikrotitračních destiček pro vertikální fotometr SUNRISE.

Ve třetí části výsledků je uvedeno zpracování anonymizovaných výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jež byly získány během měření studentů 3. ročníku v předmětu Laboratorní technika, cvičení „Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin“. Důvodem tohoto postupu bylo ověření, jak bude skript fungovat v běžné praxi. Jsou uvedena syrová data, jež byla dále zpracovávána. Následně je uveden výstup ze zpracování těchto dat v MATLABu.

Tato třetí sada výsledků se rozpadá na dva pododdíly:

V prvním pododdílu byl použit skript pro soubor 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu a to pro vertikální fotometr SUNRISE zvlášť a dále soubor dalších 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a dalších 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22. V případě 5 řad absorbancí musel být vypočten průměr vždy z 5 stejnohlých hodnot absorbancí zvlášť v tabulce MS Excel (ve které byla daná data od studentů získána) a následně do dialogového okna MATLABu musel být zadána jen tato řada zprůměrovaných hodnot.

Zde jsou pro vertikální fotometr SUNRISE v kapitole 3.3.1 uvedena syrová data, jež byla dále zpracována v MATLABu a výsledek je ukázán v kapitole 3.3.1.1. Pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jsou uvedena syrová data v kapitole 3.3.2 a výsledek jejich zpracování v MATLABu je uveden v kapitole 3.3.2.1.

Ve druhém pododdílu bylo zpracováno 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu. (Zmíněné 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu mohly být přímo zadány do dialogového okna MATLABu.) Vždy bylo zvlášť ke každému přístroji k dispozici 15 hodnot absorbancí pro reálné vzorky a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu.

Zde jsou pro vertikální fotometr SUNRISE jsou v kapitole 3.3.3 uvedena syrová data, jež byla dále zpracována v MATLABu a výsledek je ukázán v kapitole 3.3.3.1. Pro UV-VIS spektrofotometr Libra S22 jsou uvedena syrová data v kapitole 3.3.4 a výsledek jejich zpracování v MATLABu je uveden v kapitole 3.3.4.1.

V prvním pododdílu v případě vertikálního fotometru SUNRISE bylo zpracováno výše zmíněných 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu:

Skript zde vyřadil 9 změřených absorbancí zředěného reálného vzorku bílkoviny.

Adersonův-Darlingův test normality zde detekoval, že se nejedná o normální rozložení dat a vyřadil jednu hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Následně v dalším běhu skriptu bylo zpracovááno již jen 15 hodnot absorbancí pro reálné vzorky bílkoviny a bylo zde detekováno normální rozložení dat, proveden Dioxnův Q-test na odlehlé hodnoty, kdy skript již nevyřadil žádnou hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Též byly vypsány statistické charakteristiky polohy a variability a výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku.

Na závěr, pro tuto část, byl vypsán hlavní výsledek ve formě aritmetického průměru a směrodatné odchylky (konkrétní hodnoty viz níže).

V prvním pododdílu v případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 bylo též zpracovááno výše zmíněných 25 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 5 řad absorbancí pro koncentrační řadu:

Skript zde nevyřadil žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.

Dále skript detekoval, že se nejedná o normální rozložení dat a provedl „Tukeyho kritérium“ na odlehlé hodnoty s tím, že nevyloučil ani jednu hodnotu výsledné koncentrace reálného vzorku bílkoviny.

Též byly vypsány statistické charakteristiky polohy a variability a výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku.

Jako hlavní výsledek byla vypsána hodnota aritmetického průměru a směrodatné odchylky (viz níže).

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 43,98 mg/ml,

směrodatná odchylka: 13,56 mg/ml.

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 60,77 mg/ml,

směrodatná odchylka: 15,62 mg/ml.

Dle výpisu MATLABu zde vychází v případě vertikálního fotometru SUNRISE variační koeficient (bezrozměrný) roven 0,31. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 roven 0,26.

Dle výše uvedeného druhého měření je UV-VIS spektrofotometr Libra S22 je zřejmě o něco málo přesnější (viz variační koeficient) nežli vertikální fotometr SUNRISE. Také též znovu dochází k systematické chybě při pipetování roztoků s BSA a reálných vzorků do mikrotitračních destiček pro vertikální fotometr SUNRISE. Daná systematická chyba byla zjištěna díky převažování mikrotitrační destičky na analytických vahách. Po pipetování osmnácti vzorků roztoku koncentrační řady po 20 μ l a po pipetování třiceti šesti vzorků ředěného roztoku vaječného bílku po 20 μ l by mělo být naváženo cca 1,0800 g. Ve skutečnosti bylo naváženo cca 0,9920 g, tj. o cca 8,1 % méně.

Z těchto získaných výsledků z anonymizovaných dat od studentů je znatelné, že se nejedná o dobře naměřená data a ukazuje se též přínos zde uváděného standardu pro zpracování dat (viz výše) a strojového zpracování dat v MATLABu.

Ve druhém pododdílu v případě vertikálního fotometru SUNRISE bylo zpracovááno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu:

Skript zde vyřadil jednu ze změřených absorbancí zředěného reálného vzorku bílkoviny.

Adersonův-Darlingův test normality zde detekoval, že se nejedná o normální rozložení dat, ale nevyřadil ani jednu hodnotu koncentrace jako odlehlou.

Též byly vypsány statistické charakteristiky polohy a variability a výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku. Tímto bylo vypsáno čtrnáct výsledných koncentrací bílkoviny v reálném vzorku.

Na závěr, pro tuto část, byl vypsán hlavní výsledek ve formě aritmetického průměru a směrodatné odchylky (konkrétní hodnoty viz níže).

Ve druhém pododdílu v případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 bylo též zpracovááno výše zmíněných 15 hodnot absorbancí pro reálný vzorek a 3 řady absorbancí pro koncentrační řadu:

Skript zde nevyřadil žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.

Dále skript detekoval, že se jedná o normální rozložení dat a provedl Dixonův Q-test na odlehlé hodnoty s tím, že nevyhloučil ani jednu hodnotu výsledné koncentrace reálného vzorku bílkoviny jako odlehlou.

Též byly vypsány statistické charakteristiky polohy a variability a výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného bílku. Tímto bylo vypsáno patnáct výsledných koncentrací bílkoviny v reálném vzorku.

Jako hlavní výsledek byla vypsána hodnota aritmetického průměru a směrodatné odchylky (viz níže).

V případě vertikálního fotometru SUNRISE byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 73,28 mg/ml,

směrodatná odchylka: 27,26 mg/ml.

V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 byl získán tento výsledek:

aritmetický průměr: 83,45 mg/ml,

směrodatná odchylka: 7,68 mg/ml.

Dle výpisu MATLABu zde vychází v případě vertikálního fotometru SUNRISE variační koeficient (bezrozměrný) roven 0,37. V případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 roven 0,09.

Dle výše uvedeného druhého měření je UV-VIS spektrofotometr Libra S22 je přesnější (viz variační koeficient) nežli vertikální fotometr SUNRISE. Také též zřejmě znovu dochází k systematické chybě při pipetování roztoků s BSA a reálných vzorků do mikrotitračních destiček pro vertikální fotometr SUNRISE.

Z těchto získaných výsledků určených z anonymizovaných dat od studentů je znatelné, že se nejedná o dobře naměřená data a ukazuje se též přínos v této práci uváděného standardu pro zpracování dat (viz výše) a strojového zpracování dat v MATLABu.

K měření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD:

UV-VIS spektrofotometr SPECORD je nevhodný pro zpracování velkého množství vzorků. Tento přístroj slouží pro proměření absorbance na rozsáhlém spektru vlnových délek na jednom vzorku tak, aby bylo okem přehlédnutelné, na jakých vlnových délkách je např. nejnižší a nejvyšší absorbance. V tomto spektrofotometru probíhá vždy proměření jedné kyvety se slepým vzorkem a jedné kyvety se stanovovaným analytem a bývá získáno spektrum absorbancí pro velké rozmezí vlnových délek pro vzorek v jedné kyvetě.

Při tomto měření na UV-VIS spektrofotometru SPECORD byl z přístroje získán csv (comma separated values) soubor, ze kterého byla vyčtena na vlnové délce 620 nm absorbance 0,4314.

Pro zjišťování koncentrací bílkoviny v reálném vzorku by zde bylo potřeba zvlášť proměřit šest nebo sedm kyvet postupně s koncentrační řadou tak, aby mohla být získána kalibrační přímka, z ní získána směrnice a ta použita pro výpočty koncentrací bílkoviny v reálném vzorku. Čili po změření koncentrační řady by muselo být proměřeno dále 30 kyvet s reálnými vzorky bílkoviny. Toto provedeno v této práci nebylo, protože to z časových důvodů při běžných měřeních studenty v laboratoři nemůže být prováděno. Studenti dosud provádějí na tomto přístroji pouze proměření celého spektra vzorku čisté bílkoviny a vzorku bílkoviny po derivatizaci, která porovnávají. V rámci práce bylo provedeno jedno měření spektra jen u jednoho reálného vzorku bílkoviny, z čehož jak uvedeno výše nelze stanovit koncentraci bílkoviny.

Tab. 4.1: porovnání výsledků pro vertikální fotometr SUNRISE a UV-VIS spektrofotometr Libra S22:

	SUNRISE: aritmetický průměr (mg/ml)
První sada výsledků:	62,1
Druhá sada výsledků:	58,6
Třetí sada výsledků, 1. část:	44,0
Třetí sada výsledků, 2. část:	73,3
průměr:	59,5
	SUNRISE: směrodatná odchylka (mg/ml)
První sada výsledků:	21,2
Druhá sada výsledků:	5,0
Třetí sada výsledků, 1. část:	13,6
Třetí sada výsledků, 2. část:	27,3
průměr:	16,8
	SUNRISE: variační koeficient (-)
První sada výsledků:	0,34
Druhá sada výsledků:	0,09
Třetí sada výsledků, 1. část:	0,31
Třetí sada výsledků, 2. část:	0,37
průměr:	0,28
	Libra S22: aritmetický průměr (mg/ml)
První sada výsledků:	71,2
Druhá sada výsledků:	71,7
Třetí sada výsledků, 1. část:	60,8
Třetí sada výsledků, 2. část:	83,5
průměr:	71,8
	Libra S22: směrodatná odchylka (mg/ml)
První sada výsledků:	8,5
Druhá sada výsledků:	4,9
Třetí sada výsledků, 1. část:	15,6
Třetí sada výsledků, 2. část:	7,7
průměr:	9,2
	Libra S22: variační koeficient (-)
První sada výsledků:	0,12
Druhá sada výsledků:	0,07
Třetí sada výsledků, 1. část:	0,26
Třetí sada výsledků, 2. část:	0,09
průměr:	0,14

5 Závěr

V rámci bakalářské práce byla provedena rešerše týkající se spektrofotometrie a spektrofotometrů. Byla též zařazena kapitola o bílkovinách, jejich vlastnostech, funkcích i základních narušeních proteinémie a kapitola, kde byly diskutovány různé metody stanovení celkové bílkoviny.

Byly provedeny dvě sady měření koncentrace bílkovin v roztoku metodou dle Bradfordové. Měření probíhala na třech přístrojích (vertikální fotometr SUNRISE, UV-VIS spektrofotometr Libra S22 a UV-VIS spektrofotometr SPECORD).

Byl vytvořen standard pro účely výuky předmětu Laboratorní technika a to konkrétně pro úlohu „Spektroskopická stanovení koncentrace bílkovin“, který je podrobně dokumentován v kapitole „3. Výsledky“.

Přínosem práce je vytvoření skriptu ve výpočetním prostředí MATLAB, který výrazně zjednodušuje zpracování získaných experimentálních dat a je vhodný pro rozsáhlejší zpracování většího souboru dat. Skript řeší mj. vytvoření kalibrační přímky, vyřazování nevhodných absorbancí reálného vzorku, dopočtení a zobrazení statistických charakteristik polohy a variability, provádění testu na normální rozložení dat, vyřazování odlehlých hodnot dopočtených koncentrací bílkoviny v reálném vzorku a především výpis vypočtených koncentrací v reálném vzorku, jejich aritmetického průměru a směrodatné odchylky. Jako zkušební data pro ověření fungování skriptu byly použity dvě sady naměřených dat z anonymizovaných výsledků měření studenty.

Byla zjištěna diskrepance mezi měřením na vertikálním fotometru SUNRISE a UV-VIS spektrofotometru Libra S22. V případě měření na vertikálním fotometru SUNRISE byla zjištěna průměrná koncentrace cca 60 mg/ml (přesněji 59,49 mg/ml), v případě UV-VIS spektrofotometru Libra S22 cca 70 mg/ml (přesněji 71,77 mg/ml). Příslušný rozdíl je patrně dán nedostatečností pipetování malých objemů v případě přípravy vzorků pro vertikální fotometr SUNRISE, kdy je dodávané množství BSA a reálného vzorku bílkoviny systematicky podhodnocováno.

Seznam použité literatury

- [1] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [2] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [3] Zimmermannová J. *STANOVENÍ PROTEINŮ – POROVNÁNÍ RŮZNÝCH METOD*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Hudeček J.
- [4] 17PBBLT - Laboratorní technika | predmety.fbmi.cvut.cz [online]. Kladno: ČVUT v Praze – FBMI, 2017 [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: <https://predmety.fbmi.cvut.cz/cs/17PBBLT>
- [5] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [6] Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta* [online]. 2012, (Volume 98), 7 [cit. 2017-10-29]. Dostupné z: <https://sci-hub.cc/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.058>
- [7] VO-DINH, Tuan. a G. GAUGLITZ. *Handbook of spectroscopy*. Cambridge: Wiley-VCH, c2003. ISBN 3-527-29782-0.
- [8] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [9] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Praha: H & H, 1998. Lange medical book. ISBN 80-85787-38-5.
- [10] PYTELA, Oldřich. *Chemometrie pro organické chemiky*. Vyd. 5. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-422-2.
- [11] ECKSCHLAGER, Karel. *Chemometrie*. Praha: Karolinum, 1991. ISBN 80-7066-487-8.
- [12] BRADFORD, MARION M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* [online]. 1976, January 29, 1976, 72(1), 7 [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf

- [13] HENDL, Jan a Věra KUBÁNKOVÁ. *Statistika pro zdravotníky*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1987.
- [14] OTTO, Matthias. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. 2., completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH-Verl, 2007. ISBN 9783527314188.
- [15] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMÁN. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0849-9.
- [16] Analytikjena_Specord_200-250_-_Manual. In: *Frank's Hospital Workshop* [online]. Tanzania: Frank's Hospital Workshop, 2017 [cit. 2018-01-06]. Dostupné z: http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/photometer/service_manuals/Analytikjena_Specord_200-250_-_Manual.pdf
- [17] Td_SPECORD_PLUS_en_1. In: *Analytik Jena România* [online]. România: Analytik Jena, 2016 [cit. 2018-01-06]. Dostupné z: http://www.analytikjenaromania.ro/sites/default/files/td_SPECORD_PLUS_en_1.pdf
- [18] 35094_392347_Sunrise_4s – 11329-4515.pdf. In: *LabWrench* [online]. Kanada: LabX Media Group, 2011 [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: <http://photos.labwrench.com/equipmentManuals/11329-4515.pdf>
- [19] Tecan Sunrise Analyser - Service manual.pdf. In: *Frank's Hospital Workshop* [online]. Tanzania: Frank's Hospital Workshop, 2017 [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/service_manuals/Tecan%20Sunrise%20Analyser%20-%20Service%20manual.pdf
- [20] BIOCHROM - biochrom.pdf. In: *Biochrom* [online]. Biochrom Ltd. UK, 2017 [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: www.biochrom.co.uk/download/biochrom-libra-s21-and-s22-user-manual-english-iss02.html
- [21] Biochrom_Libra_S22_Datasheet.pdf. In: *BioPioneer CO., Ltd.* [online]. Taiwan: BioPioneer CO., 2015 [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: http://biopioneer.com.tw/wp-content/uploads/downloads/2014/03/Biochrom_Libra_S22_Datasheet.pdf
- [22] Equipos_enologia_espectrofotometro_uv_vis_libra_s22.pdf. In: *Lin Lab Rioja* [online]. Logroño, Spain: Lin Lab Rioja SL, 2015 [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: <http://www.linlabrioja.com/>
- [23] TUKEY, John Wilder. *Exploratory data analysis*. Reading, Mass.: Addison-Wesley Pub. Co., c1977. ISBN 978-0201076165.
- [24] Anděl, Jiří, ed. *Matematická statistika*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1985. 346 s. ISBN 04-017-78.

Příloha A: Pokyny k vyplňování dialogového okna v MATLABu

Do kolonky „Použité ředění (reálného vzorku)“ je třeba zadat hodnotu použitého ředění (typicky např. 500). Smysl zde má hodnota 1 a více. (Hodnota 1 znamená, že vzorek nebyl vůbec ředěn.)

Do kolonky „Upravení počtu schránek histogramu“ je třeba zadat celé číslo. Doporučené je malé celé nezáporné číslo (typicky 0 až 3). (Ve skriptu je nastaven doporučený počet schránek histogramu. Počet lze takto upravit.)

Do všech následujících kolonek je třeba zadat sadu hodnot oddělených čárkou (,), nebo čárkou s mezerou, mezerou nebo několika mezerami (pro přehlednost je doporučeno zadávat hodnoty oddělené třemi mezerami). U všech hodnot se musí používat desetinná tečka!

U kolonky „Koncentrace bílkoviny v koncentrační řadě“ a u všech třech následujících stejných kolonek „Naměřené absorbance u koncentrační řady“ jsou tato omezení:

Pokud musíte např. vyplnit šest hodnot absorbancí v kolonkách „Naměřené absorbance u koncentrační řady“ a hodnotu některé z nich neznáte nebo ji musíte vyloučit (např. pro hrubou chybu během pipetování), zadejte místo ní zkratku „NaN“ (non-a-number). Pokud byste např. museli pro stejnohlou hodnotu absorbance ve všech třech těchto kolonkách vyplnit zkratku „NaN“, zcela ji vynechejte a stejně tak musíte vynechat i stejnohlou hodnotu koncentrace v kolonce „Koncentrace bílkoviny v koncentrační řadě“. Stejně tak, pokud vyplňujete jen jednu kolonku „Naměřené absorbance u koncentrační řady“ a musíte-li nějakou hodnotu vynechat, vypusťte ji a stejně tak vypusťte stejnohlou hodnotu koncentrace v kolonce „Naměřené absorbance u koncentrační řady“. Pokud vyplňujete jen jednu nebo dvě kolonky „Naměřené absorbance u koncentrační řady“ hodnotami absorbancí, musíte ve zbylých kolonkách vyplnit stejný počet zkratek „NaN“ jako je uváděných hodnot absorbancí.

Ukázka vzhledu grafického uživatelského rozhraní skriptu (dialogového okna) je uvedena na následující stránce (obr. A.1):

Obr. A.1: Grafické uživatelské rozhraní (dialogové okno) pro skript v MATLABu

Příloha B: Použitý skript v MATLABu

```
function varargout = LT(varargin)
% LT MATLAB code for LT.fig
%     LT, by itself, creates a new LT or raises the existing
%     singleton*.
%
%     H = LT returns the handle to a new LT or the handle to
%     the existing singleton*.
%
%     LT('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%     function named CALLBACK in LT.M with the given input arguments.
%
%     LT('Property','Value',...) creates a new LT or raises the
%     existing singleton*. Starting from the left, property value
%     pairs are
%     applied to the GUI before LT_OpeningFcn gets called. An
%     unrecognized property name or invalid value makes property
%     application
%     stop. All inputs are passed to LT_OpeningFcn via varargin.
%
%     *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows
%     only one
%     instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help LT

% Last Modified by GUIDE v2.5 29-Apr-2018 09:25:25

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',   gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @LT_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @LT_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',   [] , ...
                  'gui_Callback',    []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before LT is made visible.
function LT_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```

% varargin    command line arguments to LT (see VARARGIN)

% Choose default command line output for LT
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes LT wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = LT_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout    cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject     handle to figure
% eventdata   reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

function redeni_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject     handle to redeni (see GCBO)
% eventdata   reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of redeni as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of redeni
%         as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function redeni_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject     handle to redeni (see GCBO)
% eventdata   reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     empty - handles not created until after all CreateFcns
%             called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function akr1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject     handle to akr1 (see GCBO)
% eventdata   reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of akr1 as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of akr1 as
%         a double

```



```

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function akr1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to akr1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function c_konc_rada_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to c_konc_rada (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of c_konc_rada as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of
c_konc_rada as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function c_konc_rada_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to c_konc_rada (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function AbsReal_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to AbsReal (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of AbsReal as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of AbsReal
as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function AbsReal_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to AbsReal (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB

```

```

% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%      See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function koef_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to koef (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of koef as text
%      str2double(get(hObject,'String')) returns contents of koef as
a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function koef_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to koef (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%      See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on button press in patlab.
function patlab_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to patlab (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% zadavam pouzite redeni realneho vzorku:
vstup_redeni = get(handles.redeni, 'String');
redeni = str2num(vstup_redeni);

% zadavam koeficient pro prizpusobeni poctu schranek histogramu:
vstup_koef = get(handles.koef, 'String');
koef = str2num(vstup_koef);

% 3-krat zadavam absorbanci koncentracni rady:
% (pro vytvoreni kalibracni primky)

% zadavam absorbanci koncentracni rady:
% (pro vytvoreni kalibracni primky)
vstup_akr1 = get(handles.akr1, 'String');
akr1 = str2num(vstup_akr1);

```

```

% zadavam absorbanci koncentracni rady:
% (pro vytvoreni kalibracni primky)
vstup_akr2 = get(handles.ahr2, 'String');
ahr2 = str2num(vstup_ahr2);

% zadavam absorbanci koncentracni rady:
% (pro vytvoreni kalibracni primky)
vstup_ahr3 = get(handles.ahr3, 'String');
ahr3 = str2num(vstup_ahr3);

% zadavam pouzitou radu redeni koncentracni rady:
% (pro vytvoreni kalibracni primky)
vstup_c_konc_rada = get(handles.c_konc_rada, 'String');
c_konc_rada = str2num(vstup_c_konc_rada);

% zadavam absorbance zmerene u realneho vzorku:
vstup_AbsReal = get(handles.AbsReal, 'String');
AbsReal = str2num(vstup_AbsReal);

ahr = [ahr1;ahr2;ahr3];

zprumerovani_konc_rady = mean(ahr,1,'omitnan');

% Odecteni absorbance pro slepy vzorek ("blank") od vseh ostatnich:
% (dale tzv. "korekce na slepy vzorek")
korekce_konc_rady = zprumerovani_konc_rady -
zprumerovani_konc_rady(1,1);

% Koncentrace bilkoviny v koncentracni rade (mg/ml):
% c_konc_rada = [0.00 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30];

LinearModelTerms = {'x'};
linearfittype = fittype({'x'});

fprintf('\n')

% % Vytvarim popis ke kalibracni primce:
% fprintf('Rovnice pro kalibrační přímku,\n');
% fprintf('kde:\n');
% fprintf('x...koncentrace v koncentrační řadě,\n');
% fprintf('a...směrnice přímky,\n');
% fprintf('(s 95% mezemi spolehlivosti)..\n');

f = fit(c_konc_rada',korekce_konc_rady',linearfittype);

% Vytvarim obrazek s kalibracni primkou:
figure(1)
plot(f,c_konc_rada,korekce_konc_rady,'bx')
title('Kalibrační přímka')
xlabel('Koncentrace v koncentrační řadě (mg/ml)')
ylabel('Absorbance (-)')
grid on

% Ukladam obrazek s kalibracni primkou:
f1 = figure(1);
saveas(f1,'C:\Users\Public\Kalibracni_primka.png');

```

```

% Ziskavam smernici:
xp = c_konc_rada;
xz = rot90(rot90(-c_konc_rada(2:end)));
yp = korekce_konc_rady;
yz = rot90(rot90(-korekce_konc_rady(2:end)));
x = [xz,xp];
y = [yz,yp];
% Mam smernici ("sm"):
p = polyfit(x,y,1);
sm = p(1,1);
%sm = round(sm,2);%
fprintf('\n')
fprintf('směrnice kalibrační přímky = %.3f\n',sm);

AbsReal;
AbsReal = AbsReal - zprumerovani_konc_rady(1,1);

% serazuji zmerene absorbance pro zredene vzorky bilku:
AbsReal = sort(AbsReal);

Abs_down = AbsReal;
Abs_up = AbsReal;

% Ziskavam absorbance, které nesplnuji podminku,
% ze jsou vetsi nez 0 (nula), (po korekci na slepy vzorek),
% a ze jsou mensi nebo rovny maximalni absorbanci,
% (po korekci na slepy vzorek) u koncentraci rady:

for ei=1:length(Abs_down)

    if Abs_down(end) > 0
        Abs_down = Abs_down(1:end-1);
    end

end

for fi=1:length(Abs_up)

    if Abs_up(1) <= korekce_konc_rady(end)
        Abs_up = Abs_up(2:end);
    end

end

Abs_down = Abs_down + zprumerovani_konc_rady(1,1);
Abs_up = Abs_up + zprumerovani_konc_rady(1,1);
% "Seznam" absorbanci nesplnujících podmiky:
% - ze jsou vyssi nezli nula
% - ze jsou maximalne rovny maximalni absorbanci pro koncentracni radu
% (oboje po korekci na slepy vzorek), u koncentraci rady.:
Abs_down_up = [Abs_down,Abs_up];

fprintf('\n')

if isempty(Abs_down_up) == 1
    fprintf('\n')
    fprintf('Nevyřadil jsem žádné změřené absorbance (zředěného) vzorku bílku.\n\n');
else
    fprintf('\n')

```

```

fprintf('Vyřadil jsem těchto %.0f změřených absorbancí (bezrozměrné)
zředitého vzorku bílku:\n\n',length(Abs_down_up));
% fprintf('Vyřadil jsem tyto zmerene absorbance (zredeneho) vzorku
bílku:\n\n');
fprintf('%.4f\n',Abs_down_up);
fprintf('\n')
fprintf('Tyto absorbance jsou po korekci na slepý vzorek záporné,
nulové \n');
fprintf('nebo vyšší nežli je nejvyšší absorbance pro koncentrační
řadu.\n\n');
end

% Ziskavam absorbance vyssi nezli nulova absorbance
% a maximalne rovny maximalni absorbanci pro koncentracni radu
% (oboje po korekci na slepy vzorek).:
for di=1:length(AbsReal)

    if AbsReal(1) <= 0
        AbsReal = AbsReal(2:end);

        elseif AbsReal(end) > korekce_konc_rady(end)
            AbsReal = AbsReal(1:end-1);

        else
            AbsReal = AbsReal; break

    end

end

% Dopocitavam vysledek, tj. koncentrace bilkoviny ve vajecnem bilku
pred
% redenim.:
cReal = (AbsReal./sm).*redeni;
%cReal = round(cReal,2);%

% Serazuji koncentrace bilkoviny ve vajecnem bilku pred redenim.:
c = sort(cReal);

for ai=1:(length(c)-2)

    sc = size(c,2);
    N = sc; % pocet hodnot
    % koef = 1; % korekce pro adjustaci poctu binu v histogramu
    b = ceil(log(N)/log(2) + 1) + koef; % pocet binu/"schranekek" histogramu

    % Zjistuji vlastnosti histogramu:
    figure(2)
    h = histogram(c,b);
    h

    % Vytvarim histogram pro rozlozeni cetnosti koncentraci bilkoviny
    % ve vajecnem bilku.:
    figure(2)
    histogram(c,b)
    title('Histogram rozložení četností koncentrací bílkoviny ve vaječném
bílku')
    xlabel('Koncentrace (mg/ml) bílkoviny ve vaječném bílku')
    ylabel('Četnost')

```

```

% Ukladam histogram pro rozlozeni cetnosti koncentraci bilkoviny
% ve vajecnem bilku (jako png soubor).:
f2 = figure(2);
saveas(f2, 'C:\Users\Public\Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bi
lkoviny_ve_vajecnem_bilku.png');

fprintf('\n')

binu_histogramu = b;
binu_histogramu = fprintf('schránek histogramu =
%.0f\n\n', binu_histogramu);

pocet_mereni = N;
pocet_mereni = fprintf('počet měření = %.0f\n\n', pocet_mereni);

fprintf('\n')

% fprintf('_ v mg/ml _:\n\n');

% Zjistuji statisticke ukazatele polohy:
minimalni_hodnota = min(c);
minimalni_hodnota = fprintf('minimální hodnota = %.2f
mg/ml\n\n', minimalni_hodnota);

maximalni_hodnota = max(c);
maximalni_hodnota = fprintf('maximální hodnota = %.2f
mg/ml\n\n', maximalni_hodnota);

aritmeticky_prumer = mean(c);
aritmeticky_prumer = fprintf('aritmetický průměr = %.2f
mg/ml\n\n', aritmeticky_prumer);
aritmeticky_prumer = mean(c);

minimalni_hodnota = min(c);
maximalni_hodnota = max(c);
fprintf('(rozpětí = rozdíl maximální a minimální hodnoty):\n');
rozpeti = maximalni_hodnota - minimalni_hodnota;
rozpeti = fprintf('rozpětí = %.2f mg/ml\n\n', rozpeti);
rozpeti = maximalni_hodnota - minimalni_hodnota;

fprintf('(poměr rozpětí vůči aritmetickému průměru):\n');
pomer_rozpeti_prumer = rozpeti/aritmeticky_prumer;
pomer_rozpeti_prumer = fprintf('poměr: rozpětí/průměr =
%.3f\n\n', pomer_rozpeti_prumer);

median_c = median(c);
median_c = fprintf('medián = %.2f mg/ml\n\n', median_c);

Q1_prvni_kvartil = quantile(c, 0.25);
Q1_prvni_kvartil = fprintf('Q1 tj. první kvartil = %.2f
mg/ml\n\n', Q1_prvni_kvartil);
Q1_prvni_kvartil = quantile(c, 0.25);

Q3_treti_kvartil = quantile(c, 0.75);
Q3_treti_kvartil = fprintf('Q3 tj. třetí kvartil = %.2f
mg/ml\n\n', Q3_treti_kvartil);
Q3_treti_kvartil = quantile(c, 0.75);

```

```

fprintf('(mezikvartilové rozpětí = třetí kvartil - první
kvartil:)\n');
mezikvartilove_rozpeti = Q3_treti_kvartil - Q1_prvni_kvartil;
fprintf('mezikvartilové rozpětí = %.2f
mg/ml\n\n',mezikvartilove_rozpeti);

% Zjistuji statistické ukazatele variability:
smerodatna_odchylka = std(c);
smerodatna_odchylka = fprintf('směrodatná odchylka = %.2f
mg/ml\n\n',smerodatna_odchylka);
smerodatna_odchylka = std(c);

s = smerodatna_odchylka; % pro výpočty šikmosti a Z-skór
EX = aritmeticky_prumer; % pro výpočty šikmosti a Z-skór

fprintf('\n')
% fprintf('_bezrozměrne_:\n\n');

fprintf('(variační koeficient = směrodatná odchylka / aritmetický
průměr:)\n');
variacni_koeficient = s/EX;
variacni_koeficient = fprintf('variační koeficient =
%.2f\n\n',variacni_koeficient);

G1 = skewness(c);
sikmost = G1;
sikmost = fprintf('šikmost = %.2f\n\n',sikmost);

spicatost = kurtosis(c);
spicatost = fprintf('špičatost = %.2f\n\n',spicatost);

Z_score_min = (min(c)-EX)/s; % minimální z-skór
Z_score_max = (max(c)-EX)/s; % maximální z-skór

Z_score_min = fprintf('minimální z-skór = %.2f\n\n',Z_score_min);

Z_score_max = fprintf('maximální z-skór = %.2f\n\n',Z_score_max);

% Dixonův Q-test % kritické hodnoty do 30 měření včetně
% 1. sloupec Q_tab: n --- tj. počet hodnot
% 2. sloupec Q_tab: alfa = 0,050 = 5 %
% 3. sloupec Q_tab: alfa = 0,010 = 10 %

% tabulka Dixonova Q-testu (začíná se od počtu měření 3 včetně):
Q_tab1 = [1 0 0;2 0 0;3 0.941 0.988;4 0.765 0.889;5 0.642 0.780];
Q_tab2 = [6 0.560 0.698;7 0.507 0.637;8 0.468 0.590;9 0.437 0.555;10
0.412 0.527];
Q_tab3 = [11 0.392 0.502;12 0.376 0.482;13 0.361 0.465;14 0.349
0.450;15 0.338 0.438];
Q_tab4 = [16 0.329 0.426;17 0.320 0.416;18 0.313 0.407;19 0.306
0.398;20 0.300 0.391];
Q_tab5 = [21 0.295 0.384;22 0.290 0.378;23 0.285 0.372;24 0.281
0.367;25 0.277 0.362];
Q_tab6 = [26 0.273 0.357;27 0.269 0.353;28 0.266 0.349;29 0.263
0.345;30 0.260 0.341];
Q_tab = [Q_tab1;Q_tab2;Q_tab3;Q_tab4;Q_tab5;Q_tab6];
Q_tab;

```

```

% Provadim Adersonuv-Darlinguv test normality:
[ad_test,ph] = adtest(c);

if ad_test == 0
fprintf('Adersonův-Darlingův test normality vyšel = %.0f --> JE
normální rozložení (na hladině významnosti alfa = 0,05 = 5
%%).\n',ad_test);
fprintf('Použijeme Dixonův Q-test pro vyloučení případných odlehlých
hodnot.\n\n');
else
fprintf('Adersonův-Darlingův test normality vyšel = %.0f --> NENÍ
normální rozložení (na hladině významnosti alfa = 0,05 = 5
%%).\n',ad_test);
fprintf('Dle [23] vymezíme dolní a horní hradbu pro vyloučení
případných odlehlých hodnot.\n\n');
end
%
% fprintf(' (p-hodnota = %.4f)\n\n',ph);
%
% Provadim test na odlehle hodnoty pri NESPLNENI normalniho rozlozeni
% hodnot vysledne koncentrace (koncentrace pred redenim),
% zjistene Adersonovym-Darlingovym testem normality:
if ad_test == 1

    mezikvartilove_rozpeti = Q3_treti_kvartil - Q1_prvni_kvartil;
%     fprintf('mezikvartilové rozpětí = %.2f
mg/ml\n\n',mezikvartilove_rozpeti);
%     mezikvartilove_rozpeti = Q3_treti_kvartil - Q1_prvni_kvartil;

    k = 1.5; % koeficient pro dosazeni dolni a horni hradby
    hradba = k*mezikvartilove_rozpeti;

    dolni_hradba = Q1_prvni_kvartil - hradba;
    fprintf('dolní hradba = %.2f mg/ml\n',dolni_hradba);
    dolni_hradba = Q1_prvni_kvartil - hradba;

    horni_hradba = Q3_treti_kvartil + hradba;
    fprintf('horní hradba = %.2f mg/ml\n\n',horni_hradba);
    horni_hradba = Q3_treti_kvartil + hradba;

    if c(1,1) < dolni_hradba
        c = c(2:end);

        elseif c(1,end) > horni_hradba
            c = c(1:end-1);

            else
                c = c; break

    end

else

% Provadim test na odlehle hodnoty pri SPLNENI normalniho rozlozeni
% hodnot vysledne koncentrace (koncentrace pred redenim),
% zjistene Adersonovym-Darlingovym testem normality.
% Testem na odlehle hodnoty je zde Dixonuv Q-test.:

```



```

Q_1 = abs(c(2)-c(1))/abs(c(end)-c(1)); % nejspodnejši (odlehla ?)
hodnota
% fprintf('Koeficient Q_1 pro nejspodnejši hodnotu.\n');
% fprintf('Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5
%%,\n');
% fprintf('jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího
zpracování.\n');
% Q_1 = fprintf('Q_1 = %.4f\n\n',Q_1);
% Q_1 = abs(c(2)-c(1))/abs(c(end)-c(1));

Q_n = abs(c(end)-c(end-1))/abs(c(end)-c(1)); % nejvyšší (odlehla ?)
hodnota
% fprintf('Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.\n');
% fprintf('Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5
%%,\n');
% fprintf('jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího
zpracování.\n');
% Q_n = fprintf('Q_n = %.4f\n\n',Q_n);
% Q_n = abs(c(end)-c(end-1))/abs(c(end)-c(1));

N = size(c,2); % počet měření
i = N;
R = Q_tab(i);

fprintf('%.0f. řádek tabulky Dixonova testu:\n',R);
Q_tabR = Q_tab(R, :, :); % R-ty řádek tabulky Dixonova Q-testu
fprintf('%.0f hodnot; kritická hodnota, (alfa = 5 %%): %.4f; kritická
hodnota, (alfa = 10 %%): %.4f\n',Q_tabR);
fprintf('\n')

fprintf('Koeficient Q_1 pro nejspodnější hodnotu.\n');
fprintf('Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5
%%,\n');
fprintf('jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího
zpracování.\n');
Q_1 = fprintf('Q_1 = %.4f\n',Q_1);
Q_1 = abs(c(2)-c(1))/abs(c(end)-c(1));

fprintf('kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %:\n');
Q_tabRa05 = Q_tabR(2); % kritická hodnota , alfa = 0.05 = 5 %
Q_tabRa05 = fprintf('%.4f\n\n',Q_tabRa05);

fprintf('Koeficient Q_n pro nejvyšší hodnotu.\n');
fprintf('Je-li vyšší nežli kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5
%%,\n');
fprintf('jedná se o odlehlou hodnotu - vyřazujeme ji z dalšího
zpracování.\n');
Q_n = fprintf('Q_n = %.4f\n',Q_n);
Q_n = abs(c(end)-c(end-1))/abs(c(end)-c(1));

fprintf('kritická hodnota, při alfa = 0.05 = 5 %:\n');
Q_tabRa05 = Q_tabR(2); % kritická hodnota , alfa = 0.05 = 5 %
Q_tabRa05 = fprintf('%.4f\n\n',Q_tabRa05);

% fprintf('(kritická hodnota, při alfa = 0.10 = 10 %:\n');
% Q_tabRa10 = Q_tabR(3); % kritická hodnota , alfa = 0.10 = 10 %
% Q_tabRa10 = fprintf('%.4f)\n\n',Q_tabRa10);

if (Q_1<Q_tabRa05) && (Q_n<Q_tabRa05)

```

```

        fprintf('Nevyřadil jsem žádnou hodnotu koncentrace jako
odlehlou.\n');
        fprintf('\n')
        c = c; break

        elseif (Q_1>Q_tabRa05) && (Q_n<Q_tabRa05)
        fprintf('Vyřadil jsem tuto hodnotu koncentrace jako odlehlou:
%.2f mg/ml.\n',c(1));
        fprintf('\n')
        c = c(2:end);

        elseif (Q_1<Q_tabRa05) && (Q_n>Q_tabRa05)
        fprintf('Vyřadil jsem tuto hodnotu koncentrace jako odlehlou:
%.2f mg/ml.\n',c(end));
        fprintf('\n')
        c = c(1:end-1);

        elseif (Q_1>Q_tabRa05) && (Q_n>Q_tabRa05)
        fprintf('Vyřadil jsem tyto hodnoty koncentrace jako odlehlé:
%.2f mg/ml a %.2f mg/ml.\n',c(1),c(end));
        fprintf('\n')
        c = c(2:end-1);

    else c = c; break

end

end

end

% Vypisuji vysledne koncentrace bilkoviny ve vzorcich vajecneho bilku
% hodnotu aritmetického prumeru a smerodatne odchylky
% jako hlavni vysledky:
fprintf('Výsledné koncentrace bílkoviny ve vzorcích vaječného
bítku:\n\n');
% c = fprintf('c = %.2f mg/ml\n',c);
fprintf('c = %.2f mg/ml\n',c);
fprintf('\n')
aritmeticky_prumer = mean(c);
smerodatna_odchylka = std(c);
fprintf('Výsledná koncentrace bílkoviny ve vaječném bítku (aritmetický
průměr) = %.1f mg/ml.\n',aritmeticky_prumer);
fprintf('Směrodatná odchylka pro výsledný soubor koncentrací bílkoviny
ve vaječném bítku = %.1f mg/ml.\n\n',smerodatna_odchylka);

% % pripadne: Ukladam zjistene hodnoty do txt souboru:
% A=[binu_histogramu,pocet_mereni];
% fileID = fopen('C:\Users\Public\LabTech.txt','at');
% fprintf(fileID,['\n\n binu_histogramu = %.0f \n\n pocet_mereni =
%.0f'],A);
% fclose(fileID);

% Informuji kde se nachazi obrazek, histogram
% a pripadne textovy soubor:
fprintf('Obrázek: "Kalibracni_primka.png" je ve složce:
"C:\\Users\\Public".\n');

```

```
fprintf('Histogram:
"Histogram_rozlozeni_cetnosti_koncentraci_bilkoviny_ve_vajecnem_bilku.
png" je ve složce: "C:\\Users\\Public".\\n');
% fprintf('Textový soubor: "LabTech.txt", s výpisem výsledků je ve
složce: "C:\\Users\\Public".\\n\\n');
```

```
% --- If Enable == 'on', executes on mouse press in 5 pixel border.
% --- Otherwise, executes on mouse press in 5 pixel border or over
redeni.
```

```
function redení_ButtonDownFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to redení (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
```

```
function patlab_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to patlab (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called
```

```
% --- Executes on selection change in popupmenu1.
```

```
function popupmenu1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to popupmenu1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% Hints: contents = cellstr(get(hObject,'String')) returns popupmenu1
contents as cell array
```

```
%          contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from
popupmenu1
```

```
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
```

```
function popupmenu1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to popupmenu1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called
```

```
% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
```

```
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end
```

```
function akr2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to akr2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of akr2 as text
```

```
%      str2double(get(hObject,'String')) returns contents of akr2 as  
a double
```

```
% --- Executes during object creation, after setting all properties.  
function akr2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)  
% hObject      handle to akr2 (see GCBO)  
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB  
% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns  
called
```

```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.  
%      See ISPC and COMPUTER.  
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),  
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))  
    set(hObject,'BackgroundColor','white');  
end
```

```
function akr3_Callback(hObject, eventdata, handles)  
% hObject      handle to akr3 (see GCBO)  
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB  
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of akr3 as text  
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of akr3 as a  
double
```

```
% --- Executes during object creation, after setting all properties.  
function akr3_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)  
% hObject      handle to akr3 (see GCBO)  
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB  
% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns  
called
```

```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.  
%      See ISPC and COMPUTER.  
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),  
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))  
    set(hObject,'BackgroundColor','white');  
end
```

Příloha C: Obsah přiloženého DVD

- Klíčová slova (čj i aj)
- Abstrakt česky
- Abstrakt anglicky
- Naskenované zadání bakalářské práce
- Kompletní bakalářská práce
- Kód ve výpočetním prostředí MATLAB (m soubor: „LT.m“)
- Grafické uživatelské rozhraní skriptu („dialogové okno“) ve výpočetním prostředí MATLAB (fig soubor: „LT.fig“)