

# FYZIKÁLNO - CHEMICKÉ ANALYTICKÉ METÓDY

Fyzikálno-chemické metódy sa delia na:

- a) **optické** - zakladajú sa na interakcii elektromagnetického žiarenia s analyzovanou látkou,
- b) **chromatografické** – separačné metódy, pri ktorých sa látky delia medzi stacionárnu a mobilnú fázu na základe rôznych afinít k týmto fázam,
- c) **elektroforetické** - separačné metódy, pri ktorých sa látky, ktoré nesú elektrický náboj, delia vplyvom jednosmerného elektrického poľa,
- d) **elektrochemické** - zakladajú sa na meraní elektrických veličín (prúd, napätie, elektrický odpor, vodivosť a pod.).

## OPTICKÉ METÓDY

Optické analytické metódy predstavujú rozsiahlu oblasť fyzikálno-chemických metód a zakladajú sa na interakcii elektromagnetického žiarenia s analyzovanou látkou. V dôsledku tejto interakcie dochádza k excitácii atómov, molekúl, iónov alebo radikálov, čo sa spája s absorpciou a spontánnou emisiou žiarenia. Podľa toho, či v priebehu merania dochádza k emisii alebo absorpcii žiarenia, sa jedná o emisnú alebo absorpčnú spektrálnu analýzu. Z optických metód uvádzame nasledovné :

- ✓ spektrofotometria
- ✓ luminiscenčná spektrálna analýza
- ✓ atómová emisná spektrometria (AES) - plameňová fotometria
- ✓ atómová absorpčná spektrometria (AAS)
- ✓ refraktometria
- ✓ nefelometria a turbidimetria
- ✓ polarimetria

## *SPEKTROFOTOMETRIA*

Spektrofotometria je optická analytická metóda. Ide o absorpčnú spektrálnu analýzu vo viditeľnej a UV oblasti spektra (200 - 800 nm), ktorá sa zakladá na sledovaní zmien absorpcie žiarenia skúmaným roztokom.

Ak roztokom prechádza spojité žiarenie (t.j. žiarenie rôznych vlnových dĺžok), dochádza v určitých intervaloch vlnových dĺžok k zníženiu jeho intenzity. Zníženie intenzity svetla môžeme kvantitatívne vyjadriť pomocou:

- a) **absorpcie B** ( $I_0 - I/I_0$ ) – udáva, aká časť vstupujúceho žiarenia bola pohltená
- b) **transparencie T** ( $I/I_0$ ) – priepustnosti, ktorá naopak udáva, aká časť žiarenia prešla roztokom.

Z definície vyplýva, že  $B = 1 - T$  resp.  $B = 100 - T$  (%).

Záporný dekadický logaritmus priepustnosti sa nazýva **absorbancia A**, t.j. logaritmus pomeru intenzity svetla vstupujúceho ( $I_0$ ) k intenzite svetla opúšťajúceho vrstvu roztoku ( $I$ )

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

Vzťah medzi absorpciou žiarenia, hrúbkou vrstvy roztoku a koncentráciou roztoku vyjadruje **Lambertov-Beerov zákon**, ktorý hovorí, že **absorbancia (A) je priamo úmerná hrúbke vrstvy (d) a koncentrácii roztoku** v mol.l<sup>-1</sup> (c)

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

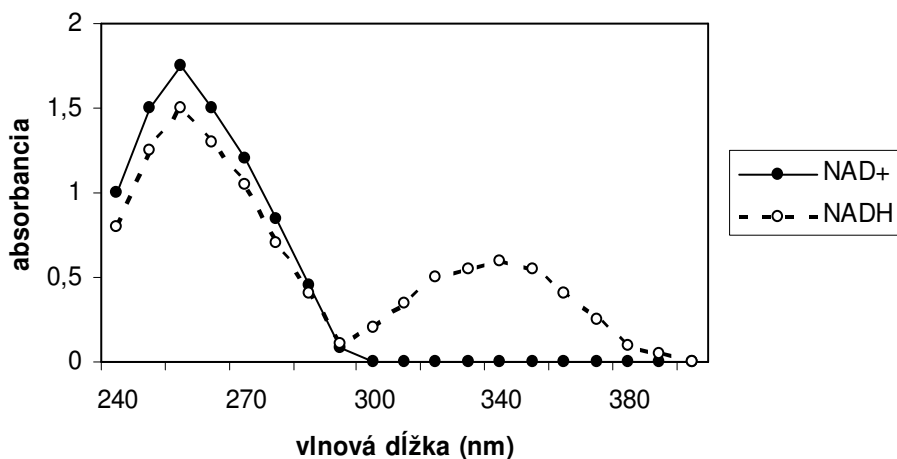
$\varepsilon$  je **molový absorpčný koeficient** (l. mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) a vyjadruje absorbanciu roztoku s koncentráciou 1 mol.l<sup>-1</sup> v kyvete s hrúbkou 1 cm. Jeho hodnota závisí od kvality látky a vlnovej dĺžky. Hodnoty tohto koeficientu obvykle ležia v intervale 10<sup>3</sup> až 10<sup>4</sup>, maximálne 10<sup>5</sup>. Veľkosť  $\varepsilon$  udáva citlivosť príslušnej metódy.

## VYUŽITIE SPEKTROFOTOMETRIE

1. **Meranie absorpčných spektier (kriviek).** Keď zmeriame absorbanciu roztoku s určitou koncentráciou pri rôznych vlnových dĺžkach a závislosť vyjadríme graficky, získame absorpčné spektrum danej látky. **Absorpčné spektrum** teda vyjadruje **závislosť absorbancie od vlnovej dĺžky pri konštantnej koncentrácii a rovnakej hrúbke vrstvy skúmaného roztoku,  $A = f(\lambda)$ .**

V oblasti vlnových dĺžok, pri ktorých dochádza k absorpcii svetla, v tzv. absorpčnom páse, sa na absorpčnej krivke objaví absorpčné maximum. Meranie absorpčných spektier má význam pri **štúdiu štruktúry látok**. Určité charakteristické skupiny v molekule látky tvoria absorpčné pásy s maximami pri určitej vlnovej dĺžke, napr. oxoskupina má absorpčné maximum pri 280 nm, nitroskupina pri 366 nm a pod.

Vzťah štruktúry látok a ich spektrálnych vlastností sa využíva aj pri **sledovaní priebehu chemických reakcií**. V biochémií sa využíva najčastejšie rozdielnosť absorpčných spektier medzi oxidovanou a redukovanou formou tej istej látky pri stanovovaní enzýmových aktivít (tzv. kinetickou metódou). Napr. redukovaný koenzým NADH (jeho hydrogenovaný pyridínový kruh) má široký absorpčný pás s maximom pri 340 nm, kým jeho oxidovaná forma NAD<sup>+</sup> (pyridínový kruh, ktorý má aromatický charakter) neabsorbuje svetlo v tejto oblasti (obr. 1).



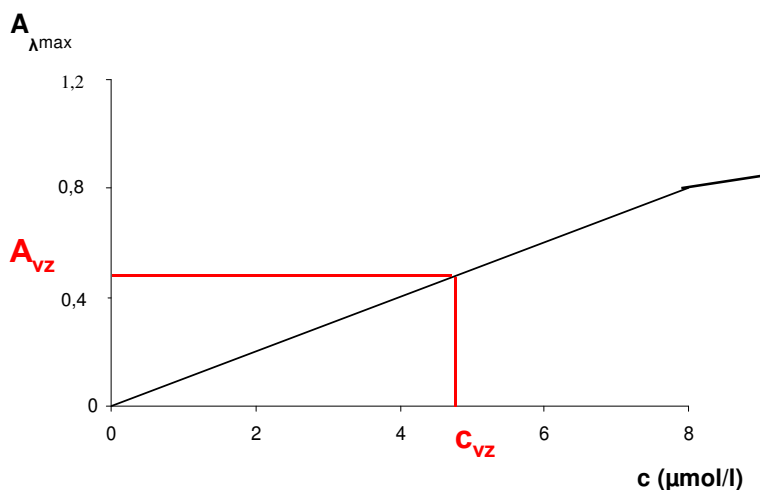
Obr. 1. Absorpčné spektrá oxidovanej a redukovanej formy pyridínových nukleotidov, NAD<sup>+</sup> a NADH ( $c = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ).

Tieto pyridínové nukleotidy sú koenzýmami mnohých dehydrogenáz, enzýmov katalyzujúcich dehydrogenáciu substrátov. Funkcia koenzýmu spočíva v reverzibilnej väzbe vodíka. Ak v enzýmovej reakcii vzniká NADH, zvyšuje sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 340 nm a ak vzniká NAD<sup>+</sup>, absorbancia pri 340 nm sa znižuje. Zmena absorbancie za časovú jednotku je priamo úmerná rýchlosti enzýmovej reakcie, teda aktivite enzýmu. Enzýmové metódy stanovenia, ktoré sa zakladajú na meraní zníženia alebo zvýšenia absorbancie koenzýmu NADH (resp. NADPH), sa využívajú pri biochemických analýzach, napr. stanovení enzýmových aktivít, enzýmovom stanovení koncentrácie látok (produktov metabolizmu, exogénnych látok alebo ich metabolitov) v biologických vzorkách (krv, moč, tkanivá buniek) a pri analýzach potravín.

Z absorpčných spektier roztokov môžeme priamo odčítať hodnotu **mólového absorpčného koeficientu** ( $\epsilon$ ) v prípade, ak má roztok koncentráciu 1 mol/l a hrúbka vrstvy je 1 cm. V takom prípade sa  $\epsilon$  číselne rovná hodnote absorbancie pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima. Pri spektrofotometrickom stanovení koncentrácie látok meriame absorbanciu pri tej vlnovej dĺžke, ktorá zodpovedá maximu na absorpčnej krivke.

2. **Stanovenie nízkych koncentrácií** farebných **látok**, látok poskytujúcich farebnú reakciu, ale aj bezfarebných látok, ktoré absorbujú svetlo v neviditeľnej oblasti spektra. Z hľadiska stanovovania koncentrácie látok sa sleduje závislosť absorbancie od koncentrácie roztoku pri konštantnej vlnovej dĺžke (vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky) a konštantnej hrúbke vrstvy roztoku,  $A = f(c)$ .

**Absorbancia je lineárnou funkciou koncentrácie**, teda pri platnosti Lambertovho-Beerovho zákona dostávame v grafickom vyjadrení priamku. Odklonu od priamkovej závislosti hovoríme odchýlka od Lambertovho-Beerovho zákona (obr. 2). Smernicou priamky, ktorá vyjadruje zákon  $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ , je hodnota molového absorpčného koeficientu.



Obr. 2. Analytická krivka

Platnosť Lambertovho-Beerovho zákona experimentálne overujeme odmeraním absorbancie série štandardných roztokov (so známou koncentráciou). Grafické vyjadrenie **závislosti absorbancie** (os "y") **od koncentrácie** (os "x") predstavuje **analytickú krivku**, ktorá vymedzí koncentračný interval platnosti Lambertovho-Beerovho zákona. Z priebehu analytickej krivky (obr. 2) vidieť, že **zákon platí len pre dostatočne zriedené roztoky** (nízke koncentrácie). Pri vyšších koncentráciách látky dochádza k tzv. negatívnej odchýlke v dôsledku asociácie absorbujúcich molekúl. Závislosť absorbancie od koncentrácie už ďalej nie je lineárna. Preto môžeme pracovať iba v tej oblasti koncentrácií, kde je závislosť  $A$  od  $c$  lineárna.

**KONCENTRÁCIU LÁTKY** vo vzorke v oblasti platnosti Lambertovho-Beerovho zákona môžeme určiť tromi spôsobmi:

- **Odčítaním z analytickej krivky** (obr. 2). Analytická krivka umožňuje zisťovať interpoláciou koncentrácie látok vo vzorkách na základe odmeraných absorbancií štandardných roztokov. Vzhľadom k odchýlkam Lambertovho-Beerovho zákona dávame prednosť určeniu koncentrácie pomocou analytickej krivky danej látky.
- **Výpočtom zo vzťahu** (pri rovnakej hrúbke vrstvy) po odmeraní absorbancie roztoku s neznámou koncentráciou ( $A_{\text{vzorka}}$ ) a absorbancie štandardného roztoku ( $A_{\text{štandard}}$ ), ktorého presnú koncentráciu poznáme ( $C_{\text{štandard}}$ ).

$$C_{\text{vzorka}} = \frac{A_{\text{vzorka}}}{A_{\text{štandard}}} \cdot C_{\text{štandard}}$$

- **Výpočtom na základe znalosti molového absorpčného koeficientu ( $\epsilon$ )**, ktorého hodnotu môžeme odčítať z absorpčných spektier danej látky alebo z chemických tabuliek. Pre výpočet neznámej koncentrácie ( $C_{\text{vzorka}}$ ) musíme odmerať absorbanciu roztoku danej látky ( $A_{\text{vzorka}}$ ) pri tej istej vlnovej dĺžke, pre ktorú je určená hodnota  $\epsilon$  (vlnovej dĺžke absorpčného maxima) a absorbanciu musíme vynásobiť príslušným zriedením vzorky a reakčnej zmesi pri určitom analytickom postupe.

$$C_{\text{vzorka}} = \frac{A_{\text{vzorka}}}{\epsilon \cdot d}$$

Pri stanovovaní neznámej koncentrácie látky meriame vždy absorbanciu roztoku pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky. Meranie uskutočňujeme v rozmedzí absorbancií od 0,1-0,8 (to zodpovedá priepustnosti 10 – 80 %). Pri absorbancii nad 1 už prechádza cez vrstvu vzorky menej ako 10 % svetla, preto pri určení  $A$  môžeme urobiť veľkú chybu. Chyba vlastného fotometrického merania je 0,2-1 %. Potom celková relatívna chyba merania je 0,5-3 %.

Spektrofotometria spolu s ďalšími spektrálnymi metódami, ako IČ, UV, NMR a hmotnostná spektrometria, sa intenzívne využívajú pri štúdiu štruktúry látok, pričom sa tieto metódy často kombinujú navzájom alebo s ďalšími fyzikálnymi metódami.

# METÓDY IZOLÁCIE A SEPARÁCIE LÁTOK

Metódy, ktoré sa používajú na izoláciu alebo separáciu a čistenie látok, sa delia nasledovne:

- pre **homogénne sústavy** - kryštalizácia, destilácia, extrakcia, zrážanie, dialýza, chromatografia a elektroforéza,
- pre **heterogénne sústavy** - filtrácia, sedimentácia, odstred'ovanie a sublimácia.

V nasledujúcom učebnom texte sa venujeme iba základným princípom vybraných metód.

## **SEDIMENTÁCIA**

Sedimentácia, alebo usadzovanie, je fyzikálny dej, pri ktorom dochádza vplyvom gravitácie k ukladaniu tuhých častí suspenzií. Rýchlosť usadzovania závisí od veľkosti, tvaru a hustoty častíc, ako aj od viskozity a hustoty kvapalnej fázy suspenzie.

V klinickej praxi sa využíva stanovenie sedimentácie erytrocytov. Ide o jednoduché vyšetrenie na potvrdenie alebo vylúčenie zápalu v organizme. Ak sú v tele prítomné bielkoviny typické pre zápal, menia rýchlosť sedimentácie erytrocytov

## **ODSTREĎOVANIE (CETRIFUGÁCIA)**

Odstred'ovanie je fyzikálna metóda oddeľovania pevných alebo kvapalných častíc s rozdielnou hustotou účinkom odstredivej sily, ktorá mnohonásobne prevyšuje gravitačnú silu ( $9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ). Uskutočňuje sa v odstredivkách (centrifúgach).

Podmienky odstred'ovania vystihuje **relatívna odstredivá sila (R)**, ktorá udáva, koľkokrát je dosiahnuté odstredivé zrýchlenie vyššie ako zemské gravitačné zrýchlenie (n.g)

$$R = 1,118 \cdot N^2 \cdot r \cdot 10^{-5}$$

r - polomer otáčania, N - otáčky.min<sup>-1</sup>

Pre reprodukovateľný opis odstred'ovania nestačí len údaj o odstredivom zrýchlení, ale musíme poznať aj polomer otáčania. Potom môžeme relatívnu odstredivú silu odčítať buď z tzv. nomogramu na prevod otáčok na R, alebo vypočítať zo vzorca.

*Napr. V odstredivke je dno kyvety vo vzdialenosti 5 cm od osi otáčania a rýchlosť otáčania je 58 000 otáčok za minútu (rpm). Aká je relatívna odstredivá sila?*

$$R = 1,118 \cdot 58\,000^2 \cdot 5 \cdot 10^{-5} = 188\,000 \text{ g}$$

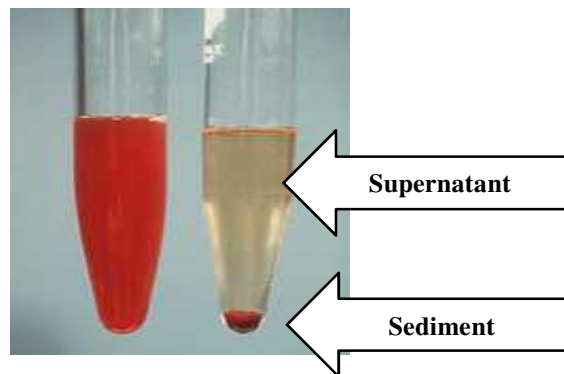
**Diferenciálna centrifugácia** je metóda, ktorá umožňuje frakcionovať zmes častíc s dostatočne odlišným sedimentačným koeficientom, postupným, viacstupňovým zvyšovaním relatívnej odstredivej sily.

Príkladom môže byť diferenciálna centrifugácia homogenátu buniek (po rozbití bunkových membrán), pri ktorej môžeme získať nasledovné frakcie použitím uvedenej odstredivej sily a času centrifugácie :

- jadrá a zvyšky buniek: 600 g, 10 min
- mitochondrie a lyzozómy: 10 000 g, 30 min
- mikrozómy: 100 000 g, 60 min

Na delenie látok s blízkymi hodnotami sedimentačného koeficientu sa využíva **centrifugácia v gradiente hustoty**. Častice, ktorých hustota je vyššia ako hustota gradientu, budú sedimentovať. Na prípravu gradientov sa najčastejšie používa sacharóza.

Frakcia, ktorá sa pri odstreďovaní usadí na dno kyvety sa všeobecne nazýva **sediment** a kvapalina nad sedimentom je **supernatant** (obr. 3). Ako centrifugačné skúmavky možno použiť hrubostenné sklenené skúmavky alebo kyvety, alebo pri vyššej rýchlosti otáčania skúmavky z plastov. Pri odstreďovaní vkladáme centrifugačné skúmavky (kyvety) do odstredivky vždy **vyvážené a oproti sebe**. Centrifúgu otvárame až po úplnom zastavení odstredivky.



Obr. 3. Rozdelenie krvi centrifugáciou na supernatant (plazma/sérum) a sediment (krvné bunky).