

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**PRACOVNÍ SEŠIT PRO VYBRANÉ LABORATORNÍ
METODY**

Diplomová práce

Bc. Tereza Kamišová

Školitel: prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.

České Budějovice 2017

Kamišová T., 2017: Pracovní sešit pro Vybrané laboratorní metody. [Workbook for Specific laboratory methods. Mgr. Thesis, in Czech.] – 89 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Práce se zabývá vypracováním vhodného pracovního sešitu pro předmět Vybrané laboratorní metody, který se vyučuje na středních zdravotnických školách v oboru Laboratorní asistent.

Anotation

This master thesis focuses on proper workbook elaboration regarding to the subject Specific laboratory methods, which is taught on medical high school, program Laboratory assistant.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 17. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé práce prof. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. za velkou trpělivost a shovívavost během celého vzniku této práce. Za cenné rady a připomínky patří velký dík doc. RNDr. Šárce Klementové, Csc.

Obsah

Úvod.....	2
Teoretický základ k předmětu Vybrané laboratorní metody.....	3
1. Optické metody	3
1.1. Elektromagnetické záření.....	3
1.2. UV-VIS spektrofotometrie.....	5
1.2.1. UV- VIS spektrofotometrie – použitá a doporučená literatura	12
1.2.2. UV- VIS spektrofotometrie – vzorová úloha	12
1.3. Polarimetrie.....	14
1.3.1. Polarimetrie – použitá a doporučená literatura.....	16
1.3.2. Polarimetrie – vzorová úloha	16
1.4. Refraktometrie.....	18
1.4.1. Refraktometrie – použitá a doporučená literatura	21
1.4.2. Refraktometrie – vzorová úloha.....	22
1.5. Turbidimetrie, nefelometrie	23
1.5.1. Turbidimetrie, nefelometrie – použitá a doporučená literatura	24
1.5.2. Turbidimetrie, nefelometrie – vzorová úloha.....	24
2. Elektrochemické metody.....	25
2.1. Potenciometrie.....	26
2.1.1. Potenciometrie – použitá a doporučená literatura	28
2.1.2. Potenciometrie – vzorová úloha.....	28
2.2. Konduktometrie.....	29
2.2.1. Konduktometrie – použitá a doporučená literatura	31
2.2.2. Konduktometrie – vzorová úloha.....	31
2.3. Elektroforéza	32
2.3.1. Elektroforéza – použitá a doporučená literatura.....	36
2.3.2. Elektroforéza – vzorová úloha	36
3. Chromatografické metody.....	38
3.1. Adsorpční chromatografie.....	39
3.2. Iontoměničová chromatografie – chromatografie na iontoměničích.....	41
3.3. Gelová chromatografie.....	42
3.4. Chromatografie – použitá a doporučená literatura	44
3.5. Chromatografie – vzorová úloha.....	45
Pracovní sešit	46
Závěr	89

Úvod

Předmět vybrané laboratorní metody je zařazen do třetího ročníku oboru Laboratorní asistent středních zdravotnických škol. Tento teoreticko-praktický předmět doplňuje ostatní odborné předměty oboru, využívá znalostí v odborných předmětech získaných a rozšiřuje odborné dovednosti v oblasti principů laboratorních přístrojových metod.

Předmět Vybrané laboratorní metody, dále jen VLM, dává žákům znalosti a orientaci v základních instrumentálních analytických metodách. A to jak ve fyzikálních zákonitostech a chemických jevech, na nichž jsou metody založeny, tak i v získání nezbytné manuální dovednosti využitelné v odborné praxi. Strukturu předmětu tvoří teoretické hodiny, v nichž se žáci seznamují s principy metod a důležitými souvisejícími fakty, a praktická cvičení, kde si žáci ověřují získané vědomosti prováděním praktických úloh. Práce v laboratoři je přínosná nejen pro zvládnutí odborných dovedností, ale též pro rozvoj schopnosti komunikace a respektu při týmové spolupráci. Předmět vede k rozvoji klíčových kompetencí dle aktuálního platného školního vzdělávacího programu.

Předkládaná práce obsahuje dvě části.

První část je tvořena teoretickým úvodem k jednotlivým metodám používaným při výuce předmětu a vzorovými úlohami ke každé probírané části. Tato část je vystavěna jako pomůcka pro vyučujícího.

Druhou část práce tvoří samostatný pracovní sešit určený pro žáky. Tento pracovní sešit je koncipován tak, že umožňuje šetření časem při teoretických hodinách – žáci mají předpřipravené části teorie, do kterých doplňují důležité informace z výkladu učitele. Na probrání teoretických základů ke každé metodě navazuje pak návod k provedení praktické laboratorní úlohy. Volby vzorových úloh jsou zaměřeny na klinickou biochemii.

Vybrané vzorové úlohy u každé metody jsou navrženy jednoduše, aby byly proveditelné v krátkém časovém úseku, neboť určitou část časové dotace praktika je potřeba využít na vysvětlení obsluhy přístrojového vybavení. Jednoduchost úloh též umožňuje další rozšiřování či případnou obměnu. Nutným aspektem, který je třeba zohlednit s vyhlídkou na provádění úloh i na jiných školách, kde je tento předmět vyučován, je rozdílné přístrojové vybavení. Z tohoto důvodu nejsou ve vzorových úlohách vysvětlovány postupy měření na určitých značkách přístrojů dle pokynů výrobce.

Literatura použitá k přípravě teoretické části není vzhledem k charakteru této práce uváděna až na konci práce v jednom souboru, ale – pro větší pohodlí učitele, který by doporučenou literaturu chtěl využít – za každým oddílem s určitým typem metod.

Teoretický základ k předmětu Vybrané laboratorní metody

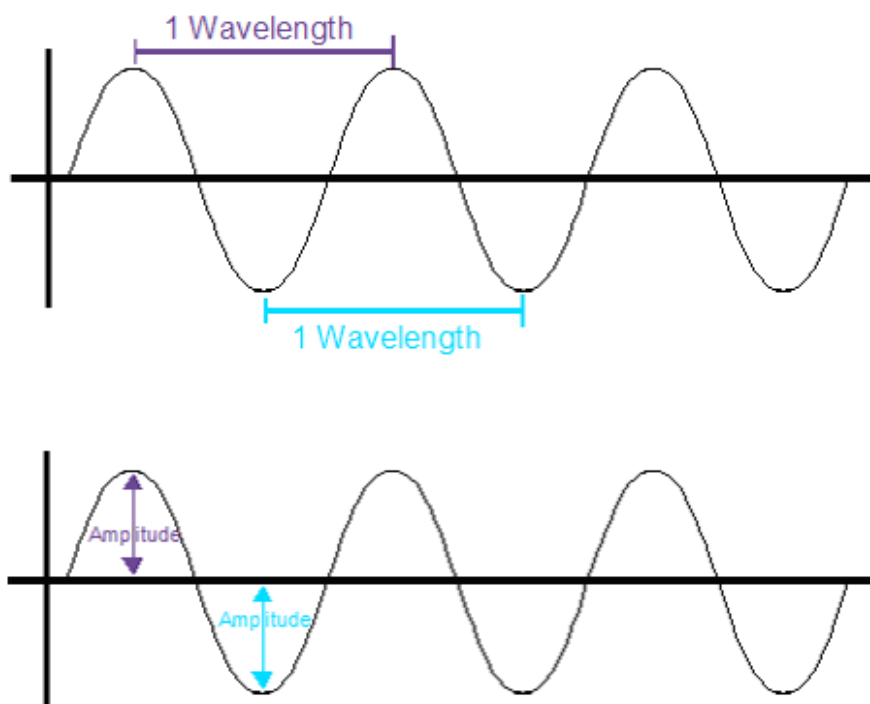
1. Optické metody

Optické metody jsou všechny metody založené na interakci elektromagnetického záření s hmotným prostředím (molekulami, atomy).

1.1. Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření má tzv. duální charakter, což znamená, že se chová jednak jako vlnění jednak jako proud částic (fotonů).

Vlnu elektromagnetického záření charakterizujeme vlnovou délkou, která je úzce svázána s frekvencí, a amplitudou. Znázornění vlnové délky a amplitudy ukazuje Obr. 1.



Obr. 1: Znázornění vlnové délky (Wavelength) a amplitudy (Amplitude).

Vlnová délka je vzdálenost dvou stejných bodů na sousedních vlnách (nejčastěji znázorňovaná jako vzdálenost vrcholů v maximu nebo v minimu). Jednotkou vlnové délky je m, ale z praktických důvodů se u různých typů záření používají jednotky odvozené (nm, μm , cm). Frekvence je počet vln, které projdou daným místem za jednotku času. Čím je vlnová délka větší, tím je frekvence nižší. Jednotkou frekvence záření je s^{-1} nebo Hz (hertz).

Amplituda je výška vlny. Amplituda u světla udává intenzitu (jas) světla vysílaného určitým zdrojem ve srovnání se světlem stejné vlnové délky z jiného zdroje.

Elektromagnetické záření (vlnění) se šíří ve vakuu rychlostí přibližně 3×10^8 m/s (300 000 km/s)¹.

V jiných prostředích (ve vzduchu, ve vodě, v roztocích) se šíří rychlostí menší než je jeho rychlost ve vakuu.

Elektromagnetické záření se může chovat při některých interakcích s hmotným prostředím jako proud fotonů. Fotonům záření určité vlnové délky lze přiřadit určitou energii, která souvisí s frekvencí záření. Tento vztah udává Planckův zákon (rov. 1).

$$E = h\nu \quad [1]$$

kde E je energie záření jednoho fotonu v joulech, ν je frekvence záření v Hz, h je tzv. Planckova konstanta, její hodnota je $6,625 \cdot 10^{-34}$ J·s.

Rovnici pro energii záření lze vyjádřit pomocí vlnové délky:

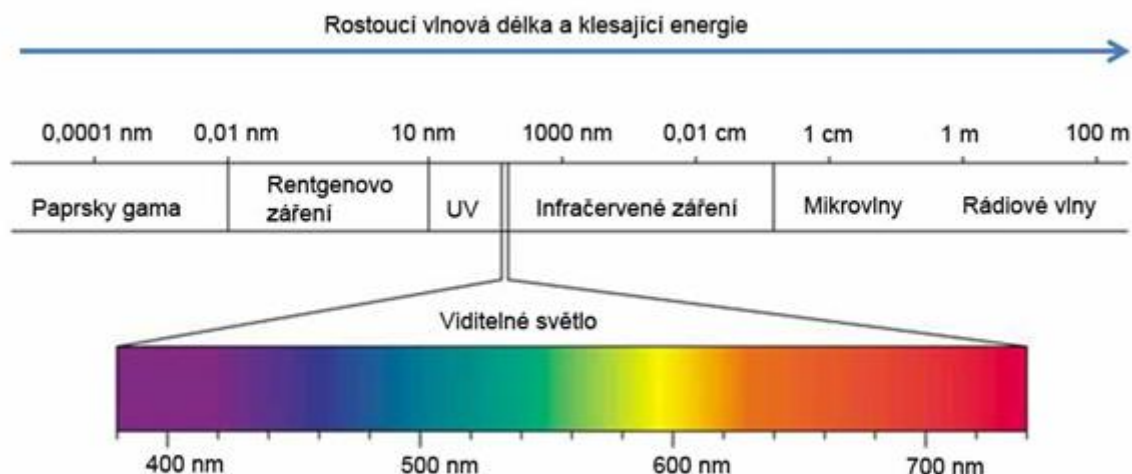
$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad [2]$$

kde E je energie záření jednoho fotonu v joulech, h je tzv. Planckova konstanta, c je rychlost světla ve vakuu a λ vlnová délka v nm.

Elektromagnetické záření má velmi široký rozsah vlnových délek, zahrnuje oblast od 10^{-13} metru až do stovek metru, tedy cca patnáct řádů.

Na Obr. 2 je znázorněny jednotlivé oblasti elektromagnetického záření, tedy jednotlivé oblasti spektra elektromagnetického záření, a ve výseku barvy viditelné části spektra.

¹ Přesná hodnota rychlosti světla je 299 792 458 m/s.



Obr. 2: Jednotlivé oblasti spektra elektromagnetického záření².

Jen nepatrná část elektromagnetického záření je vnímána lidským okem (viditelná část spektra, tzv. viditelné záření); část záření vnímáme jako teplo (infračervená část). Pro zbývající část elektromagnetického záření nemá lidské tělo odpovídající receptory, což ale neznamená, že nemůže docházet k interakci. Je-li např. kůže vystavena UV záření, dochází ke zčervenání, případně zhnědnutí kůže; je-li tělo vystaveno rtg záření nebo gama záření, může dojít k interakci s nukleovými kyselinami a vzniku mutací.

V laboratorní zdravotnické praxi se nejvíce využívá viditelná část spektra a část ultrafialové (UV) části. V klinické praxi se využívají též další oblasti elektromagnetického záření, např. rádiové vlny při zobrazovací technice využívající magnetickou rezonanci (MRI – magnetic resonance imaging) nebo gama záření při pozitronové emisní tomografii (PET).

1.2. UV-VIS spektrofotometrie

Nejčastěji využívanou laboratorní optickou metodou je UV-VIS spektrofotometrie, tedy optická metoda využívající pohlcování světla celé viditelné a části ultrafialové oblasti (200 – 400 nm) spektra v roztocích látek.

Aby látka pohlcovala záření těchto vlnových délek, musí obsahovat tzv. chromofor, což je látka za pohlcování světla zodpovědná.

² Zdroj obrázku:
<http://labguide.cz/fluorochromy/> Staženo: 1. 4. 2017.

Pohlčení světla znamená, že dojde k interakci fotonu záření s elektronem v látce a elektron je excitován ze základního stavu do stavu s vyšší energií, excitovaného stavu.

Chromoforem pro viditelnou oblast spektra jsou jednak organická barviva obsahující velký počet dvojných vazeb a případně i aromatické struktury. Příkladem takových chromoforů jsou hemoglobin, bilirubin, biliverdin, karoteny, chlorofyl. Chromoforem pro viditelnou oblast mohou být též komplexy kovů, např. komplex železitého kationtu s thiokyanatanovým aniontem (SCN^-) má červenou barvu, komplex měďnatého kationtu s amoniakem má intenzivní modrou barvu.

Chromoforem v UV oblasti například aminokyseliny tyrosin a tryptofan, které způsobují pohlcování světla v roztocích obsahujících proteiny, a báze nukleotidů, které jsou zodpovědné za pohlcování světla v roztocích nukleových kyselin.

Pohlcování světla chromoforem lze kvantitativně vyjádřit pomocí veličiny zvané absorbance, která je definována pomocí veličiny transmitance. Obě veličiny se používají zejména u roztoků látek.

Transmitance popisuje množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem. Je definována vztahem:

$$T_{\lambda} = \frac{I}{I_0}$$

[3]

kde T_{λ} je transmitance při vlnové délce λ , I je intenzita světla dané vlnové délky, které prošlo vzorkem, I_0 je intenzita světla dané vlnové délky, které na vzorek dopadlo.

Transmitance je tedy rovna jedné, jestliže žádné světlo nebylo pohlceno a tedy intenzita světla prošlého se rovná intenzitě světla dopadajícího.

Je-li veškeré světlo dané vlnové délky pohlceno v roztoku, je intenzita prošlého světla rovna nule a transmitance pro danou vlnovou délku je též rovna nule.

Velmi často se transmitance udává v procentech – hodnota transmitance vypočtené dle rov. 3 se vynásobí stem. Hodnota transmitance se pak pohybuje mezi 0 – 100 %.

Častěji používanou jednotkou je absorbance, která je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance, jak ukazuje rov. 4.

$$A_{\lambda} = \log \frac{1}{T_{\lambda}}$$

[4]

Absorbance roztoku závisí přímo úměrně jednak na velikosti (tloušťce) vrstvy, kterou světlo v roztoku urazí, jednak na koncentraci roztoku. Tato závislost je vyjádřena Lambert-Beerovým³ zákonem – viz rov. 5.

$$A_{\lambda} = \varepsilon c l$$

[5]

kde A je absorbance (je to bezrozměrná veličina, protože je definována jako logaritmus jiné veličiny), c je koncentrace roztoku a l je tloušťka absorbující vrstvy, která se udává v cm a obvykle činí 1 cm.

Veličina ε charakterizuje daný chromofor a je tedy pro roztok určité látky konstantou úměrnosti. Nazývá se buď molární absorpční koeficient nebo specifický absorpční koeficient podle toho, zda koncentrace roztoku je udána v jednotkách mol/l nebo v jiných jednotkách, např. v zdravotnické praxi často užívaných jednotkách g/cm³ nebo mg/cm³.

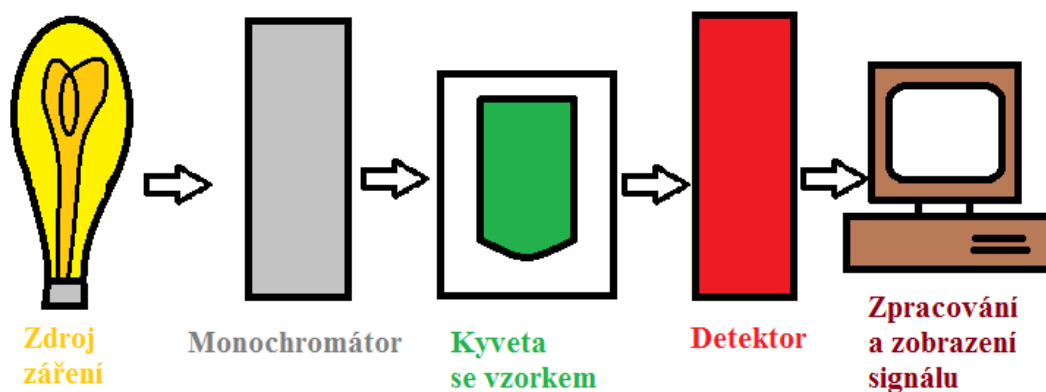
Je-li koncentrace udána v jednotce mol/l, pak ε udává, jaká by byla absorbance roztoku, který by měl koncentraci 1 mol/l a u něhož by světlo procházelo vrstvou o tloušťce 1 cm.

Hodnoty molárního absorpčního koeficientu se pohybují v desítkách tisíc až stovkách tisíc, jednotkou je mol⁻¹ dm³ cm⁻¹ (jak lze odvodit z rov. 5 tím, že si vyjádříme z rovnice ε).

Absorbance v UV a VIS oblasti se měří na přístrojích zvaných spektrofotometry. Moderní přístroje zahrnují obvykle oblast vlnových délek 200 – 900 nm a umožňují tak měření při různých vlnových délkách. Hodnota absorbance, kterou je na spektrofotometrech možné měřit, se liší podle typu přístroje, obvyklá je maximální hodnota $A = 2$. Z tohoto údaje a z hodnot molárních absorpčních koeficientů obvyklých chromoforů pak plyne, že můžeme měřit koncentrace řádově 10⁻⁴ – 10⁻⁵ mol/l.

³ Závislost množství pohlceného světla na délce absorbující vrstvy objevil v roce 1729 francouzský přírodovědec Pierre Bouguer, ale objev je připisován Jonannu Heinrichu Lambertovi, který citoval z Bouguerovi eseje o optice ve svém díle Photometria v roce 1760. Závislost na koncentraci byla objevena až o mnoho později, v roce 1852 německým fyzikem, chemikem a matematikem Augustem Beerem.

Spektrofotometr sestává z několika základních komponent: zdroje světla, zařízení poskytující monochromatické záření, měřené kyvety se vzorkem, detekčního zařízení a záznamového zařízení. Schéma spektrofotometru je znázorněno na Obr. 3.



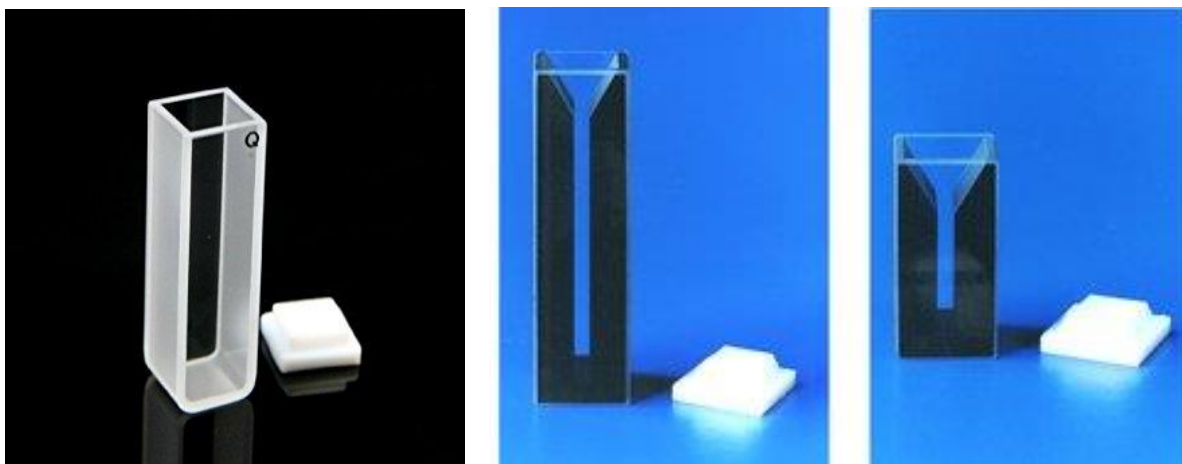
Obr. 3: Schéma základních součástí UV-VIS spektrofotometru.

Zdrojem světla pro VIS oblast je obvykle halogenová žárovka. Je to vlastně wolframová žárovka obsahující páry halogenu; ten tvoří komplex s wolframem odpařeným z vlákna a zabraňuje tak usazování wolframu na stěnách baňky a zároveň v důsledku proudění uvnitř a též rozvrstvení teplot v baňce zajišťuje zpětnou depozici wolframu na vlákno; toto vše zvyšuje životnost zdroje světla.

Jako monochromátor se používá hranol nebo mřížka, v nových přístrojích prakticky výlučně mřížka. Systém natáčecího zařízení a zrcadel umožňuje postupně měnit vlnové délky dopadající na vzorek buď ručně (nastavováním jednotlivých vlnových délek v určitých intervalech) nebo automaticky kontinuálně ve zvoleném rozsahu vlnových délek.

Kyvety používané v současné době mají standardně optickou dráhu (tedy tloušťku absorbujícího roztoku) 1 cm, které vyžadují přibližně 3 ml roztoku pro měření – Obr. 4 vlevo. Pro některé účely, kdy vzorku k měření je malé množství, se používají speciální kyvety, které také mají optickou dráhu 1 cm, ale potřebný objem k měření je kolem 70 - 850 μl^4 . Příklad kyvety pro malé objemy je na Obr. 4 uprostřed a vpravo.

⁴ Dle údajů firmy Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=104902966> Staženo 23. 12. 2016.



Obr. 4: Vlevo – kyveta pro spektrofotometrické měření s optickou dráhou 1 cm⁵, uprostřed a vpravo - kyvety pro spektrofotometrické měření malých objemů vzorků⁶.

Pro měření ve viditelné oblasti spektra používáme skleněné kyvety z optického skla, pro měření v ultrafialové oblasti je nutné použít křemenné kyvety, protože skleněné kyvety absorbují veškeré záření o vlnové délce kratší než 300 nm.

V současnosti se uplatňují čím dál více plastové kyvety pro jednorázové použití a to jak pro oblast viditelného (polystyrénové kyvety) tak i pro oblast ultrafialového záření (kyvety z polymethylmethakrylátu).

Aplikace spektrofotometrie na kvantitativní biochemickou analytiku

Stanovení koncentrace látky je založeno na Lambert-Beerově zákoně, tj. lineární závislosti absorbance na koncentraci.

Absorbance je definována vždy pro určitou vlnovou délku, proto musíme nejdříve zjistit, při jaké vlnové délce absorbanci roztoku stanovovat. K tomu musíme proměřit tzv. absorpční

⁵ Zdroj obrázku:

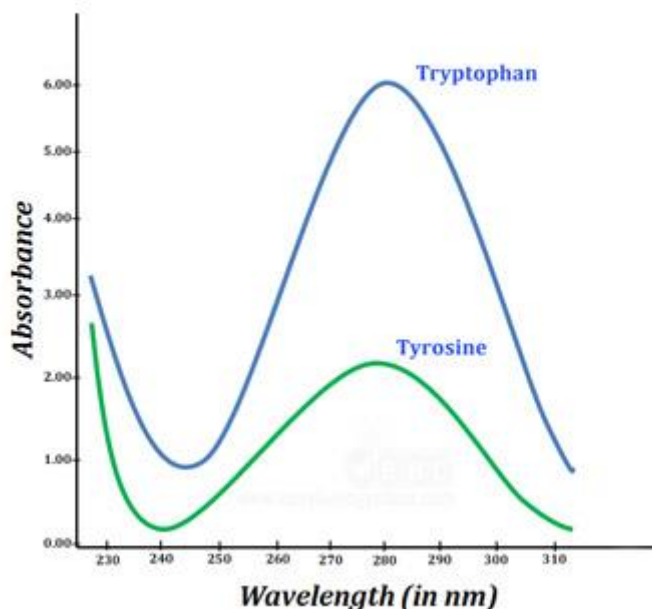
https://www.google.cz/search?q=spectrophotometer+cuvettes+images&biw=1670&bih=757&tbm=isch&imgil=AMtghBWIVmoigM%253A%253BerXn2bBJllcOcM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.ansci.wisc.edu%25252Ffjip1%25252Ffansci_repro%25252Fflab%25252Fprocedures%25252Fspectrophotometer%25252Fgray_beckman_spec_use.html&source=iu&pf=m&fir=AMtghBWIVmoigM%253A%252CerXn2bBJllcOcM%252C_&u sg=_xWTaLzG2oLVjyJ5SfBWpbHT4Gro%3D&ved=0ahUKEwjn8PS3mYrRAhUI7hoKHx8qCFwQyjcIOA&ei=wwhdWKeDL4jca_UoOAF#imgsrc=WelmDM4ZC1L7rM%3A Staženo 23. 12. 2016.

⁶ Zdroj obrázku – jako u³.

spektrum, tedy závislost absorpce na vlnové délce. Příklad absorpčního spektra pro aminokyseliny tyrosin a tryptofan je na Obr. 5.

Ke stanovení koncentrací pak používáme měření absorpce v oblasti maxima v absorpčním spektru, kde je závislost na koncentraci nejvýraznější.

Absorption Peak of Amino Acids at 280 nm



Obr. 5: Příklad absorpčního spektra⁷ – závislost absorpce na vlnové délce v nm (Wavelength in nm) aminokyselin tryptofanu (Tryptophan) a tyrosinu (Tyrosine).

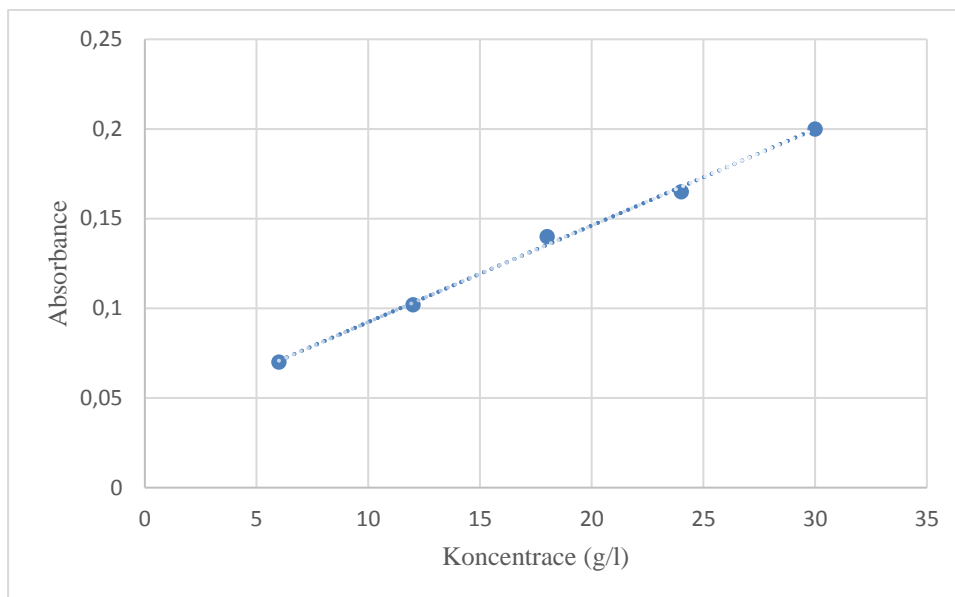
Teoreticky je možné vypočítat koncentraci přímo z Lambert-Beerova zákona, známe-li z literatury molární absorpční koeficient a máme-li změřenou absorpenci roztoku měřené látky o neznámé koncentraci. Z praktických důvodů se ale používá metoda sestavení kalibrační křivky pomocí standardů měřené látky a odečtení koncentrace u roztoku s neznámou koncentrací měřené látky z této kalibrační křivky.

Spektrofotometrická kalibrační křivka je grafickým znázorněním závislosti absorpce na koncentraci měřené látky (chromoforu). Koncentrace je tedy nezávisle proměnná a vynáší se na osu x, absorpce je závisle proměnná a vynáší se proto na osu y.

⁷ Zdroj:

<https://www.google.cz/search?q=absorption+spectrum+tryptophan&biw=1670&bih=757&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwixionyporRAhWJvRoKHWNMCAmQsAQIjg#imgsrc=YkTiNVtAnF9GbM%3A>
Staženo 23. 12. 2016.

Pro sestavení kalibrační křivky je potřeba připravit sadu roztoků o různé koncentraci; koncentrace roztoků by měly rovnoměrně pokrývat měřený rozsah, jak je ukázáno v Obr. 6.



Obr. 6: Příklad spektrofotometrické kalibrační křivky.

VARIANTOU metody kalibrační křivky je metoda jednoho standardu a využívá se u spolehlivých prověřených analytických metod. První bod odpovídá slepému pokusu tzv. blanku, který má nulovou koncentraci stanovované látky. Druhý bod je naměřená hodnota absorbance standardního roztoku. Při předpokladu platnosti Lambert-Beerova zákona a provedení měření za konstantních podmínek pro vzorek i standardní roztok tedy platí, že poměr absorbance standardu a vzorku je roven poměru jejich koncentrací:

$$\frac{A_{st}}{A_{vz}} = \frac{C_{st}}{C_{vz}}$$

[6]

kde A_{st} je absorbance standardu, A_{vz} absorbance vzorku, C_{st} koncentrace standard a C_{vz} koncentrace vzorku. Úpravou dostaneme vzorec pro výpočet koncentrace vzorku:

$$C_{vz} = \frac{A_{vz} \cdot C_{st}}{A_{st}}$$

[7]

1.2.1. UV- VIS spektrofotometrie – použitá a doporučená literatura

1. Hammes G.G. (Hoboken, New Jersey 2005), Spectroscopy for the biological sciences
2. Lajunen L.H.J. (The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1992), Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission
3. Levková T. (SZŠ a VZŠ Hradec Králové, Hradec Králové 2005), Cvičení z klinické biochemie
4. Moore W.J. (Nakladatelství technické literatury, Praha 1972), Fyzikální chemie
5. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (Thomson, Belmont 2007), Principles of instrumentál analysis

1.2.2. UV- VIS spektrofotometrie – vzorová úloha

Úkol: Stanovte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku séra pomocí metody kalibrační křivky (nejméně na 5 kalibračních roztoků) a metody jednoho standardu pomocí Biuretovy metody s využitím setu Total Protein, Erba Lachema s.r.o. a návodu k němu poskytovaném.

Princip: Bílkoviny v přítomnosti měďnatých solí v alkalickém prostředí poskytují modrofialový komplex, vhodný k fotometrickému stanovení.

Činidla:

- vzorek séra;
- standardní roztok bílkoviny o koncentraci 30 g/l;
- destilovaná voda;
- Biuretovo činidlo.

Postup:

1. Nařed'te kalibrační roztoky dle tabulky:

Číslo standardu	Standard (ml)	Dest.voda (ml)	Koncentrace (g/l)
1.	0,10	0,40	6,00
2.	0,20	0,30	12,00
3.	0,30	0,20	18,00
4.	0,40	0,10	24,00
5.	0,50	0,00	30,00

2. Zpracujte vzorky dle tabulky:

	Blank	Vzorek	Standard
Biuretovo činidlo (ml)	1,00	1,00	1,00
Sérum – vzorek (ml)		0,01	
Standard (ml)			0,01
Destilovaná voda (ml)	0,01		

3. Po promíchání všechny zkumavky inkubujte po dobu 10 min při 37° C a změřte absorbance vzorku a standardních roztoků proti blanku při vlnové délce 546 nm. Zbarvení je stabilní pod dobu nejméně 30 minut.

Číslo standardu	Standard (ml)	Dest.voda (ml)	Koncentrace g/l	Absorbance
1.	0,100	0,400	6,000	0,070
2.	0,200	0,300	12,000	0,102
3.	0,300	0,200	18,000	0,140
4.	0,400	0,100	24,000	0,165
5.	0,500	0	30,000	0,200

4. Vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku metodou jednoho standardu, sestrojte kalibrační křivku a odečtěte koncentraci vzorku podle naměřené hodnoty absorbance vzorku.

$$A_{vz} = 0,153$$

$$C_{vz} = \frac{A_{vz} \cdot C_{st}}{A_{st}}$$

[7]

$$C_{vz} = \frac{0,153 \cdot 18}{0,140}$$

$$C_{vz} = 19,67 \text{ g/l}$$

Závěr: Koncentrace celkové bílkoviny v séru je dle metody jednoho standardu 19,67 g/l a dle kalibrační křivky je x g/l.

1.3. Polarimetrie

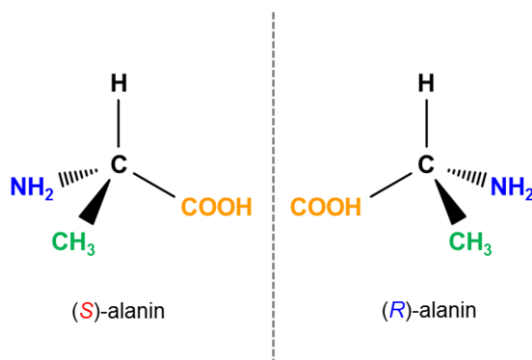
Polarimetrie je optická analytická metoda založená na měření tzv. optické otáčivosti, tedy stočení roviny lineárně polarizovaného světla v určitém prostředí obsahujícím opticky aktivní látky.

Optickou aktivitou se vyznačují některé krystaly nebo látky s tzv. chirální strukturou. U krystalů optická aktivita často zmizí po rozpuštění či roztavení krystalu, protože je důsledkem uspořádání v krystalové struktuře. U látek s chirální strukturou je uchována i v roztocích či taveninách, protože je dána vlastnostmi molekuly dané látky.

Látky s chirální strukturou jsou látky s takovým prostorovým uspořádáním, že danou látku nelze ztotožnit s jejím zrcadlovým obrazem (vztah jako mezi pravou a levou rukou lidského těla). U organických látek je podmínkou tzv. chirální uhlík, tedy uhlík se čtyřmi různými substituenty. U molekuly nesmí být přítomen navíc žádný prvek symetrie (např. rovina symetrie).

Příkladem látky s chirální strukturou je aminokyselina alanin. Její dvě opticky aktivní struktury, tzv. enantiomery, jsou znázorněny na Obr. 7.

K označení enantiomerů se používá buď znamének + / - nebo písmen d- / l- či S- / R-, kdy první symbol v jednotlivých dvojicích označuje enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla doprava, druhý pak enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla doleva⁸.



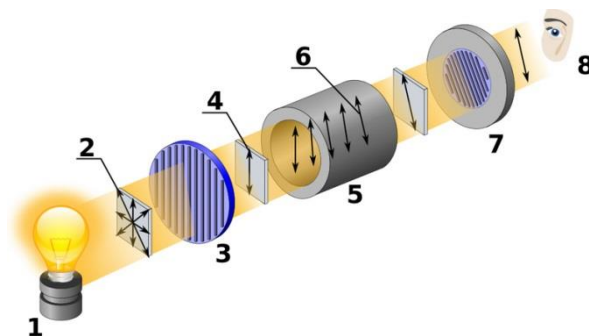
Obr. 7: Enantiomery aminokyseliny alaninu⁹.

⁸ Symboly jsou odvozeny z latinských názvů pro pravý (dexter) a levý (laevus) či správný (rectus) a nesprávný (sinister).

⁹ Zdroj obrázku:

<https://www.prirodovedci.cz/zepetejte-se-prirodovedcu/878> Staženo: 1. 12. 2016.

K měření optické aktivity se využívají přístroje polarimetru. Schéma polarimetru je znázorněno na Obr. 8.



Obr. 8: Schéma základních komponent polarimetru. 1 – zdroj světla, 2 – nepolarizované světlo vycházející ze zdroje, 3 – polarizátor, 4 - polarizované světlo, 5 – kvjeta s opticky aktivním prostředím, 6 – šipky znázorňující postupné stáčení roviny polarizovaného světla, 7 – analyzátor, 8 – detektor¹⁰.

Zdrojem světla je nejčastěji sodíková výbojka, která poskytuje prakticky monochromatické záření u vlnové délky 589 nm. Ze zdroje vychází světlo kmitající ve všech směrech kolmých ke směru šíření. Po průchodu analyzátozem vychází světlo, které kmitá jen v jednom směru kolmo ke směru šíření, protože ostatní složky světla byly v analyzátoru absorbovány. Toto světlo dále prochází optický aktivním prostředím (nejčastěji roztokem s měřenou látkou), tam dochází ke stočení polarizovaného světla. Analyzátor pak je stejný optický prvek jako polarizátor, takže pokud není natočen tak, aby světlo mohlo projít, žádné světlo z něho nevychází. Je tedy potřeba otáčet analyzátozem tak, aby byl nalezen úhel natočení, kdy světlo projde. Analyzátor je umístěn na úhломěru, kterým se měří úhel otočení.

¹⁰ Zdroj obrázku:

https://www.google.cz/search?q=polarimetr+sch%C3%A9ma&biw=1536&bih=697&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKewj--7nWzZnRAhVEfxoKHT_PBoEQsAQIGA#imgrc=7szBqdPH2BgluM%3A Staženo 29. 12. 2016.

Úhel stočení roviny polarizovaného světla závisí na koncentraci opticky aktivní látky v roztoku a na tloušťce vrstvy, kterou paprsek polarizovaného světla prochází. Tuto kvantitativní závislost lze vyjádřit vztahem:

$$\alpha = \alpha_{\lambda}^t \cdot l \cdot c$$

[9]

kde l je tloušťka vrstvy v dm dle užitého polarimetru, c koncentrace v g/ml a α_{λ}^t je měrná otáčivost při dané teplotě a vlnové délce. Se zvyšující se teplotou většinou optická otáčivost klesá, proto se uvádí nejčastěji při 20 °C.

Pro stanovení koncentrace opticky aktivních látek se používá, stejně jako u UV-VIS spektrofotometrie, metoda kalibrační křivky.

Polarimetrie našla uplatnění v potravinářství u analýzy cukrů, ale stejně tak i při stanovení pravotočivé glukózy a levotočivých bílkovin v moči ve zdravotnictví. Dnes je tato metoda v praxi nahrazena fotometrií, která je citlivější a využívá ke stanovení menšího množství vzorku.

1.3.1. Polarimetrie – použitá a doporučená literatura

1. Bilyk I., Nemeč R. (Avicenum, Praha 1988), Vybrané laboratorní metody
2. Cícvárek Z. a kol. (Avicenum, Praha 1970), Biochemické vyšetřovací metody
3. Doležalová V. a kol. (Institut pro vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, Brno 1995), Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii
4. Drbal K., Křížek M. (Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 1999), Analytická chemie
5. Opekar F. a kol. (Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007), Základní analytická chemie

1.3.2. Polarimetrie – vzorová úloha

Úkol: Stanovte polarimetricky koncentraci vzorku glukózy metodou kalibrační křivky a výpočtu.

Princip: Změřením úhlů otáčení u kalibrační řady a vzorku glukózy se stanoví koncentrace vzorku a hodnoty se porovnají s vypočítanými údaji dle vzorce pro výpočet koncentrace.

Činidla:

- Standardní roztok glukózy o koncentraci $c = 100 \text{ g/l}$ (např. 20 g glukózy rozpustit v 200 ml odměrné baňce, přidat cca 10 kapek hydroxidu amonného, doplnit po rysku);
- vzorek o neznáme koncentraci glukózy;
- hydroxid amonný naředěný 1:1;
- destilovaná voda.

Postup:

1. Příprava polarimetru – zapněte sodíkovou výbojku a proveďte korekci nulové polohy.
2. Nařed'te kalibrační roztoky dle tabulky:

Standardní roztok (ml)	Destilovaná voda (ml)	Koncentrace (g/l)
10	40	20
20	30	40
30	20	60
40	10	80
50	0	100

3. Změřte optickou otáčivost kalibračních roztoků a vzorku v 200 mm polarimetrické trubici, odečítání se provádí alespoň třikrát.
4. Zhotovte kalibrační křivku a odečtete koncentraci vzorku. Postup je obdobný jako u vzorové úlohy pro fotometrii, kdy grafem je závislost naměřených úhlů na koncentraci.
5. Porovnejte výsledek z kalibrační křivky s výpočtem dle vzorce, kdy α_{λ}^t pro glukózu při teplotě 20 °C je +52,74:

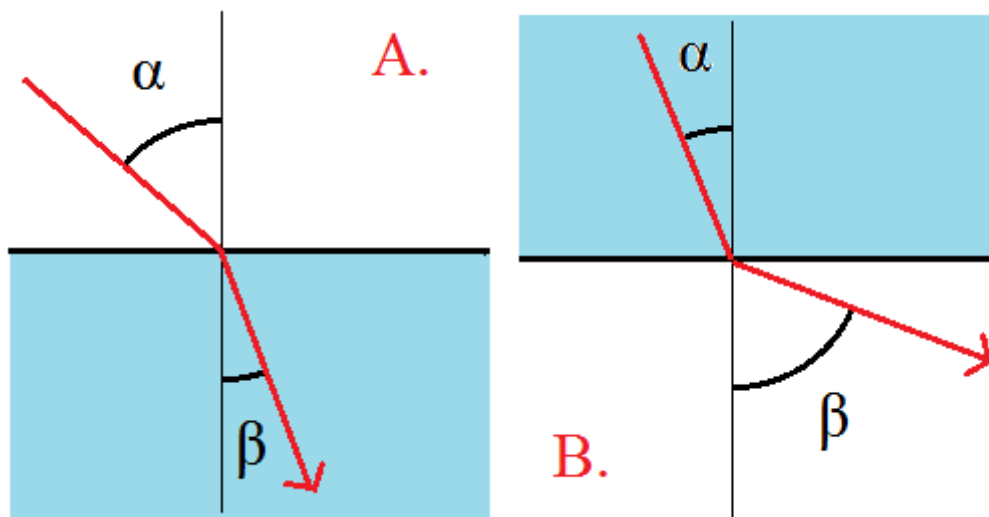
$$c_{VZ} = \frac{\alpha}{\alpha_{\lambda}^t \cdot l}$$

1.4. Refraktometrie

Refraktometrie je metoda měření indexu lomu, tedy změny směru šíření světla na rovinném rozhraní mezi dvěma prostředími. Index lomu se vztahuje k rychlosti šíření světla v daném prostředí.

Prochází-li paprsek určité vlnové délky z jednoho optického prostředí do jiného optického prostředí (prostředí s jinou tzv. optickou hustotou), mění se na rozhraní jeho rychlost, což se projeví jako změna směru šíření.

Prochází-li paprsek z prostředí opticky řidšího do prostředí opticky hustšího (např. ze vzduchu do vody), nastává lom ke kolmici vedené k rovině rozdělující obě prostředí. V opačném případě, kdy paprsek prochází z prostředí opticky hustšího do prostředí opticky řidšího, nastává lom od kolmice k rovině mezi oběma prostředími. Oba tyto případy jsou znázorněny na Obr. 8, úhel dopadu je označen jako úhel alfa, úhel lomu jako úhel beta.



Obr. 8: Znázornění změny šíření paprsku při průchodu z prostředí opticky řidšího do prostředí opticky hustšího (A) a při průchodu z prostředí opticky hustšího do prostředí opticky řidšího (B). α = úhel dopadu, β = úhel lomu.

Tzv. absolutní index lomu udává, jaký je poměr rychlosti šíření světla ve vakuu a v daném prostředí, jak ukazuje rovnice 10.

$$n = \frac{c}{v}$$

[10]

kde n je absolutní index lomu, c je rychlost světla ve vakuu a v je rychlost šíření světla v daném prostředí. Absolutní index lomu je tedy vždy větší než jedna.

Pro přechod z prostředí s indexem lomu n_1 do prostředí s indexem lomu n_2 se používá relativní index lomu n_{21} , který je definován jako poměr indexu lomu druhého a prvního prostředí, jak ukazuje rovnice 11.

$$n_{21} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

[11]

kde n_{21} je relativní index lomu, n_1 a n_2 jsou absolutní indexy lomu v daných prostředích, v_1 a v_2 jsou rychlosti šíření světla v daných prostředích, $\sin \alpha$ je úhel dopadu a $\sin \beta$ úhel lomu. V tabulce 1 je uvedeno několik příkladů relativních indexů lomu pro různé látky.

Tab. 1: Příklady relativních indexů lomu¹¹.

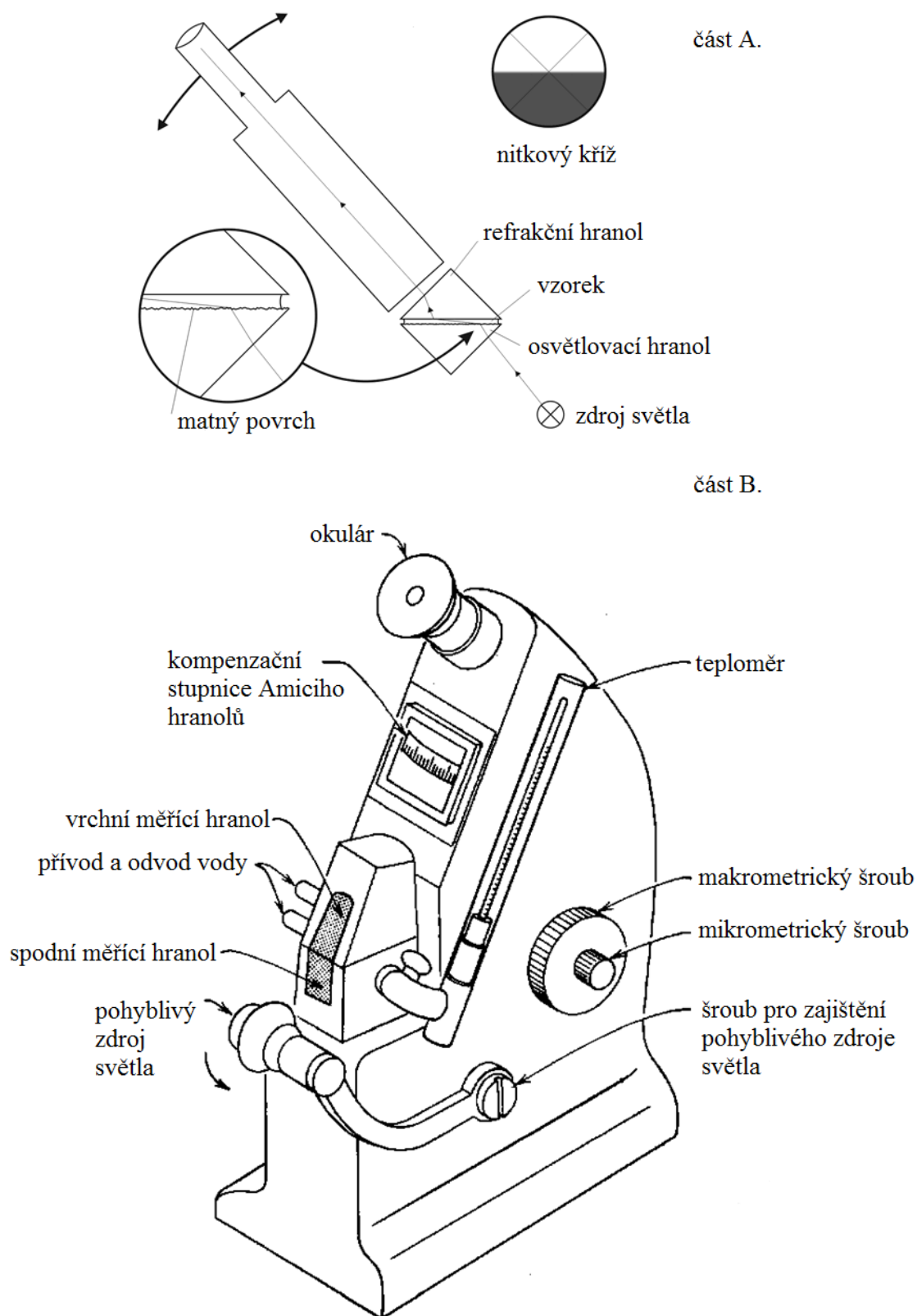
látka	index lomu
vakuum	1
vzduch (normální tlak)	1,00026
led	1,31
voda	1,33
etanol	1,36
glycerol	1,473
sklo	1,5 až 1,9
sůl	1,52
safír	1,77
diamant	2,42

K měření indexu lomu se používají refraktometry. Nejobvykleji používané jsou dva typy refraktometrů, Abbého refraktometr a ruční refraktometr.

V Abbého refraktometru, znázorněném na Obr. 9, je kapalný vzorek (roztok) sevřen v tenké vrstvě mezi osvětlovací a refrakční hranol. Refrakční (lomný) hranol je ze speciálního skla s vysokým indexem lomu, cca 1,75. Refraktometr se používá pro měření vzorků s indexem lomu menším než je index lomu refrakčního hranolu. Světlo ze zdroje prochází osvětlovacím hranolem, jehož spodní část je zmatněna, takže každá část jeho povrchu se chová jako zdroj světla, které odtud vychází do všech směrů. Detektor na zadní straně refrakčního hranolu

¹¹ Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Index_lomu Staženo 29. 12. 2016.

ukazuje světlou a tmavou oblast, na jejíž rozhraní se nastavuje nitkový kříž spojený se stupnicí indexu lomu.

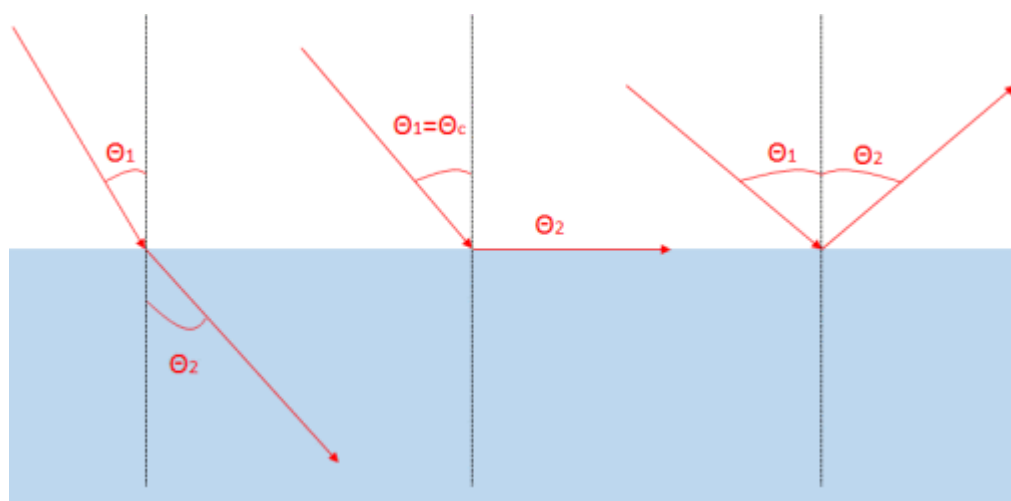


Obr. 9: Popis Abbého refraktometru, část A. – vnitřní uspořádání, část B. vnější uspořádání.

Ruční refraktometry využívají tzv. kritického úhlu totální reflexe. Tento jev, k němuž dochází při přechodu světla z prostředí opticky hustšího do prostředí opticky řidšího, je znázorněn na Obr. 10. Při určitém úhlu dopadu je úhel lomu 90° , při vyšších úhlech dopadu je veškeré světlo odraženo od rozhraní dvou prostředí, žádné neprochází do opticky řidšího prostředí.

Ruční refraktometry jsou používány zejména pěstiteli ovoce (vinná réva, kiwi) k rychlému měření obsahu cukru v plodech, jsou proto kalibrovány přímo v Brixihových stupních obsahu cukru ($^\circ\text{Bx}$), kdy jeden stupeň v Brixihových stupnicích odpovídá jednomu gramu cukru (kalibrováno na sacharózu) ve 100 g roztoku.

Pokud se refraktometri použije ke kvantitativnímu stanovení např. cukru či bílkoviny v roztoku, je potřeba použít metodu sestavení kalibrační křivky.



Obr. 10: Totální reflexe.

1.4.1. Refraktometrie – použitá a doporučená literatura

1. Abbéův refraktometr, staženo 29. 12. 2016, dostupné z https://en.wikipedia.org/wiki/Abbe_refractometer
2. Bilyk I., Nemeč R. (Avicenum, Praha 1988), Vybrané laboratorní metody
3. Brixová stupnice, staženo 29. 12. 2016, dostupné z <https://en.wikipedia.org/wiki/Brix>
4. Drbal K., Křížek M. (Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 1999), Analytická chemie
5. Ioffe B.V. (SNTL, Praha 1983), Refraktometrické metody v chemii

1.4.2. Refraktometrie – vzorová úloha

Úkol: Stanovte refraktometricky koncentraci vzorku bílkoviny v séru metodou kalibrační křivky.

Princip: Změřením indexu lomu u kalibrační řady a vzorku séra se stanoví koncentrace vzorku odečtením z kalibrační křivky.

Činidla:

- Standardní roztok bílkoviny o koncentraci $c = 30 \text{ g/l}$;
- vzorek o neznáme koncentraci bílkoviny;
- destilovaná voda;
- fyziologický roztok.

Postup:

1. Nařed'te kalibrační roztoky dle tabulky:

Číslo standardu	Standard (ml)	Fyz. roztok (ml)	Koncentrace (g/l)
1.	0,1	0,4	6,0
2.	0,2	0,3	12,0
3.	0,3	0,2	18,0
4.	0,4	0,1	24,0
5.	0,5	0	30,0

2. Změřte index lomu kalibračních roztoků a vzorku.

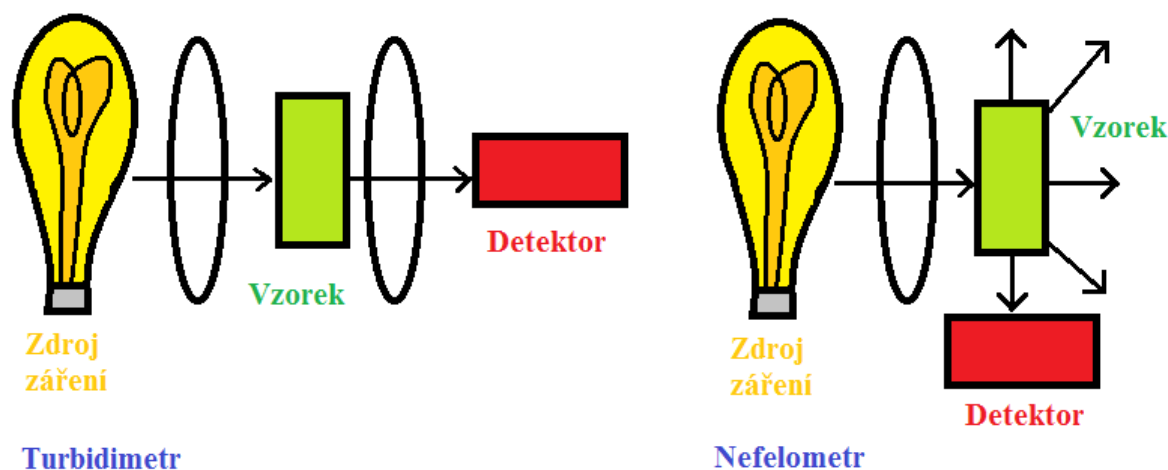
3. Zhotovte kalibrační křivku a odečtete koncentraci vzorku. Postup je obdobný jako u vzorové úlohy pro fotometrii, kdy grafem je závislost naměřených indexů lomu na koncentraci.

1.5. Turbidimetrie, nefelometrie

Obecně mohou být tyto metody nazývány metody měření zákalu, jelikož se u nich využívá rozptylu záření na heterogenních částicích v koloidních roztocích, tedy zakaleném prostředí. K rozptylu – šíření světla, které můžeme pozorovat i v jiných směrech než v procházejícím směru záření, dochází, pokud jsou částice dostatečně velké.

K měření se využívá UV nebo VIS záření, které rozptylují částice menší jak 1 μm . Na Obr. 11 je vidět rozdíl mezi oběma metodami, je dán ve způsobu měření rozptýleného světla. V turbidimetrii je sledována intenzita záření, která roztokem prošla, tj. snížení intenzity záření dopadajícího na detektor. V nefelometrii se měří intenzita záření, které je rozptýleno částicemi, tudíž vychází z roztoku odlišným směrem než záření dopadající. Nejčastěji je používaná detekce pod úhlem 90°.

Obě tyto metody se využívají v biochemické praxi především ke stanovení bílkovin nebo detekci zákalových metod, kde vzniká komplex antigen-protilátka, dříve také ke sledování znečištění ovzduší a vod. Pro vzorky s menší koncentrací stanovované látky je vhodnější metodou nefelometrie.



Obr. 11: Schéma turbidimetru – detekce ve směru záření, nefelometru – detekce ve směru kolmém na směr původní.

1.5.1. Turbidimetrie, nefelometrie – použitá a doporučená literatura

1. Dastych M. (Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno 2010), Instrumentální technika oboru Zdravotní laborant
2. Doležalová V. a kol. (Institut pro vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, Brno 1995), Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii
3. Hacker J. a Kojecká V. (IDV SZP, Brno 1990), Laboratorní přístroje a potřeby
4. Mikkelsen S. R. a kol. (Wiley, New Jersey 2016), Bioanalytical Chemistry
5. Opekar F. a kol. (Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007), Základní analytická chemie
6. Štern P. (Klin. Biochem. Metab., 2006, 14 (35), 146-151), Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie

1.5.2. Turbidimetrie, nefelometrie – vzorová úloha

Úkol: Stanovte C-reaktivní protein z kapilární krve s využitím kitu QuikRead CRP a návodu k němu poskytovaném na přístroji QuikRead 101.

Princip: Turbidimetrickým měřením se stanoví hladina C-reaktivního proteinu.

Činidla:

- Kit QuikRead CRP

Postup:

1. Načtěte kartu, otevřete kyvetu.
2. Sestavete kapiláru, odeberte spolužákovi 20 µl kapilární krve (po bílou zátku) a pístem ji vytlačte do kyvety s pufrem.
3. Kyvetu zavřete víčkem s činidlem, protřepejte a čekejte na čirý roztok v kyvetě.
4. Kyvetu vložte do otvoru pro měření a změřte blank.
5. Přidejte činidlo stlačením vnitřní modré části víčka.
6. Kyvetu vyndejte a důkladně míchejte obrácením dna vzhůru.
7. Po pípnutí přístroje vložte kyvetu do otvoru pro měření a odečtěte výsledek.

2. Elektrochemické metody

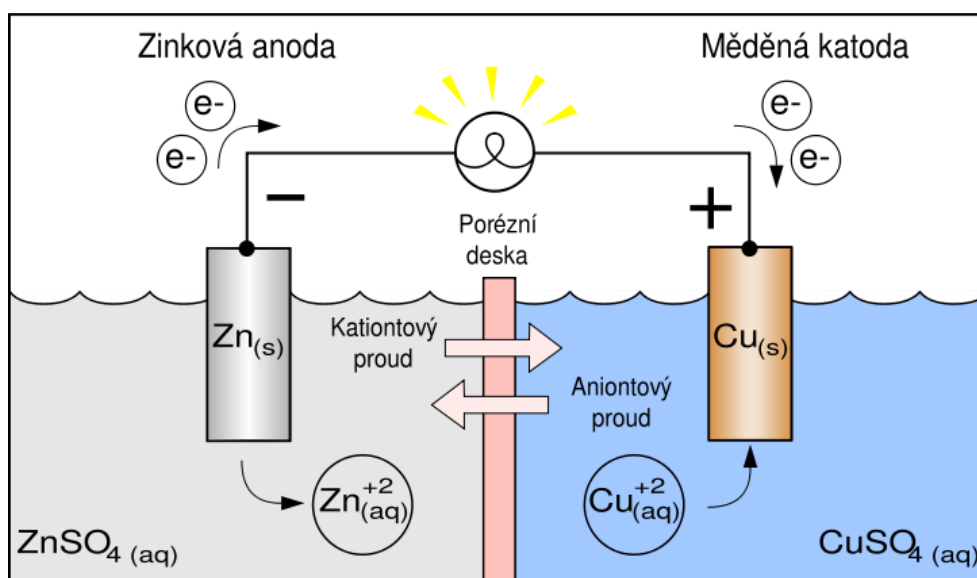
Elektrochemie je nauka o vzájemných vztazích energie chemické a elektrické.

Elektrochemie se zabývá rovnovahami a ději v soustavách, které obsahují elektricky nabitě částice, ionty.

Elektrochemické metody zahrnují kvalitativní a kvantitativní analytické metody, které závisí na elektrických vlastnostech roztoku (roztok musí obsahovat nabitě částice, ionty) a na vlastnostech elektrod.

Základem elektrochemických metod jsou oxidačně redukční procesy.

Soustavu elektrod a roztoku/roztoků, v němž/v nichž jsou elektrody ponořeny, nazýváme elektrochemický (galvanický) článek. Příklad elektrického článku tvořeného zinkovou elektrodou ponořenou do roztoku zinečnatých iontů a měděnou elektrodou ponořenou do roztoku měďnatých iontů je znázorněn na Obr. 12.



Obr. 12: Příklad elektrochemického článku¹².

Která z elektrod bude anoda a která katoda, záleží jednak na typu elektrody jednak na koncentraci iontů v roztoku. Je-li koncentrace zinečnatých a měďnatých iontů stejná, pak zinková elektroda bude anodou a měděná katodou. To vyplývá z tzv. elektrochemické řady

¹² Zdroj:

https://cs.wikipedia.org/wiki/Galvanick%C3%BD_%C4%8DI%C3%A1nek#/media/File:Galvanick%C3%BD_%C4%8DI%C3%A1nek.svg Staženo 1. 4. 2017.

napětí kovů, což je seřazení kovů podle rostoucích hodnot tzv. standardních elektrodoých potenciálů¹³.

V takovém článku z Obr. 12 probíhá redukce měďnatých iontů na kovovou měď a její vylučování na měďěné elektrodě (katodě) a oxidace kovového zinku ze zinkové elektrody (anody) na zinečnaté ionty, které přecházejí do roztoku. Pro zajištění elektroneutality je mezi elektrodami porézní deska, která dovoluje přechod aniontů z katodového prostoru do anodového prostoru, případně i přechod kationtů opačným směrem. Elektrický proud (elektrony) teče vnějším obvodem od anody ke katodě.

Díky dějům probíhajícím v takovém elektrochemickém článku je článek zdrojem elektrického proudu, protože mezi jednotlivými elektrodami je elektrické (přesněji elektromotorické) napětí, nazývané také potenciál článku.

Elektroanalytické metody zahrnují velmi rozsáhlý soubor metod. V některých z nich se měří potenciál článku v závislosti na kvalitě a množství analyzované látky, příkladem takové metody je potenciometrie. V jiných se měří určitá elektrická vlastnost roztoku, příkladem je konduktometrie.

Metodou, která nebývá tradičně zařazována mezi elektroanalytické metody, ale využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli a jejich následné analýze podle velikosti, je elektroforéza.

2.1. Potenciometrie

Potenciometrie je metoda, která slouží k měření koncentrace určitého iontu v roztoku. V potenciometrickém měření nazýváme elektrodu citlivou na koncentraci daných iontů měrnou (indikační) elektrodou, druhá elektroda se nazývá srovnávací (referentní).

Potenciometrie se nejčastěji používá na měření pH, tedy na měření koncentrace H^+ iontů v roztoku. Potenciometricky lze měřit jakékoli ionty, pro které máme elektrodu citlivou na jejich koncentraci, tedy např. fluoridové, chloridové, dusičnanové anionty. Příklady iontů stanovitelných iontově selektivními elektrodami a spolu s materiálem membrány ukazuje Tab. 2.

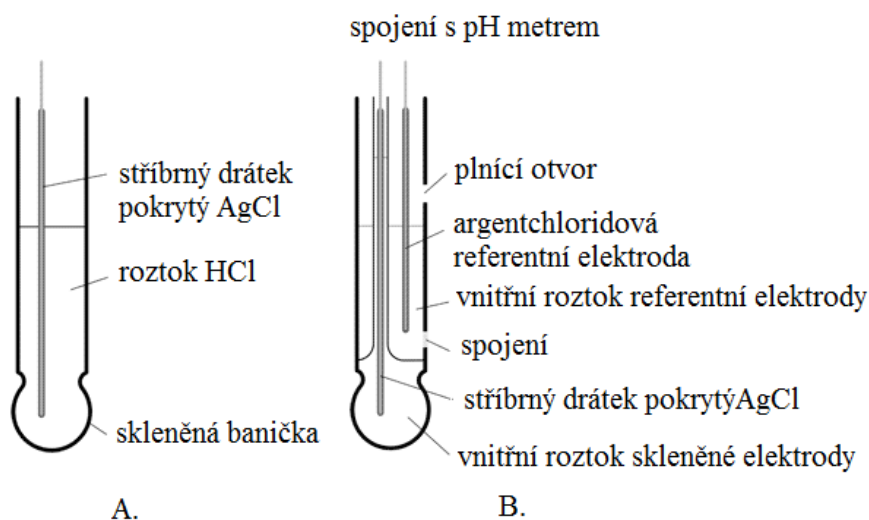
¹³ Standardní elektrodoý potenciál je potenciál článku tvořeného danou elektrodou v roztoku příslušných iontů o koncentraci 1 mol/l a standardní vodíkovou elektrodou, což je platinová elektroda pokrytá platinovou černí (platinou s velkým povrchem), ponořená do roztoku HCl o koncentraci 1 mol/l, do něhož se vhání proud molekulárního vodíku pod tlakem 1 atm (101 325 Pa). Na Pt elektrodě dochází k rozkladu molekulárního vodíku na atomární, ten s H^+ ionty v roztoku tvoří oxidačně redukční pár.

Tab. 2: Příklady iontů stanovitelných iontově selektivními elektrodami a materiálu použité membrány.

Membrána	Stanovovaný ion
sklo	H^+
PVC	Na^+
membrána s valinomycinem	K^+
monokrystal LaF_3	F^-
polykrystal AgI	I^-
polykrystal Ag_2S	Ag^+, S^{2-}
polykrystal $CuS + Ag_2S$	Cu^{2+}
polykrystal $PbS + Ag_2S$	Pb^{2+}
polykrystal $CdSe + Ag_2S$	Cd^{2+}

Při potenciometrickém měření pH je indikační elektrodou nejčastěji skleněná elektroda. Jak je znázorněno na Obr. 13 v části A, skleněná elektroda je tvořena stříbrným drátkem (pokrytým vrstvičkou nerozpustného AgCl), ponořeným do roztoku HCl; ve spodní části elektrody je banička z tenkého skla, jehož vlastnosti se mění podle pH roztoku, do něhož je banička ponořena.

Jako referentní elektroda se při potenciometrickém měření pH používá tzv. argentchloridová elektroda, což je opět stříbrný drátek pokrytý vrstvičkou AgCl, ponořený do roztoku KCl (koncentrace se liší podle výrobce od cca 1 mol/l až po nasycený roztok). Pro větší pohodlí uživatelů se v současné době vyrábějí již pouze tzv. kombinované pH elektrody, v nichž je indikační i referentní elektroda v jednom opláštění – viz Obr. 13 část B.



Obr. 13: Schéma skleněné elektrody (A) a schéma kombinované elektrody (B).

2.1.1. Potenciometrie – použitá a doporučená literatura

1. Bilyk I., Nemeč R. (Avicenum, Praha 1988), Vybrané laboratorní metody
2. Horáková M. a kol. (SNTL, Praha 1989), Chemické a fyzikální metody analýzy vody
3. Karlíček R. a kol. (Karolinum, Praha 2003), Návody do cvičení z kvalitativní anorganické a organické analýzy
4. Ludva J. a kol. (Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, Brno 1990), Laboratorní práce a lékárenství II.
5. Mikkelsen S. R. a kol. (Wiley, New Jersey 2016), Bioanalytical Chemistry
6. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (Thomson, Belmont 2007), Principles of instrumental analysis

2.1.2. Potenciometrie – vzorová úloha

Úkol: Nakalibrujte pH metr a stanovte pH vybraných vzorků.

Princip: Stanovení pH je založeno na měření rozdílu potenciálů referenční a měrné elektrody.

Činidla:

- Pufry o pH 4,0; pH 7,0; pH 10,0;
- destilovaná voda;
- Vzorky k měření např. destilovaná voda, vodovodní voda, sérum.

Postup kalibrace pH metru:

1. Elektrodu vyndejte z ukládacího roztoku, opláchněte destilovanou vodou.
2. Elektrodu ponořte do roztoku pufru o pH 4,0 a na pH metru nastavte hodnotu uvedenou na lahvičce pufru.
3. Elektrodu nakalibrujte stejným postupem na pufru o pH 7,0 a pH 10,0.

Po každém kalibrování či měření elektrodu vždy opláchněte pomocí stříčky destilovanou vodou. (Elektroda nikdy nesmí být ponechána na suchu – mezi jednotlivými měřeními ji necháváme v ukládacím roztoku nebo v kádince s destilovanou vodou.

Postup měření vybranných vzorků:

1. Elektrodu vyndejte z ukládacího roztoku, opláchněte destilovanou vodou.
2. Elektrodu ponořte do vzorku, počkejte na ustálení hodnoty pH metru, odečtěte hodnotu z displeje pH metru a zapište ji do protokolu.

2.2. Konduktometrie

Konduktometrie je měření elektrické vodivosti roztoku, tj. schopnosti roztoku vést elektrický proud.

Aby roztok vedl elektrický proud, musí obsahovat ionty. Elektrická vodivost pak závisí na koncentraci iontů v roztoku, na jejich tzv. pohyblivosti v daném roztoku a množství náboje, který ion nese, a na teplotě.

Odpor kovového (pevného) vodiče je dán Ohmovým zákonem dle rovnice 12.

$$R = \frac{U}{I}$$

[12]

kde R je odpor v ohmech (Ω), U je napětí ve voltech (V) a I je proud v ampérech (A).

Odpor kovového vodiče závisí na materiálu vodiče (typu kovu) a na geometrických parametrech vodiče, tj. průřezu a délce, podle vztahu 13.

$$R = \rho \frac{l}{S}$$

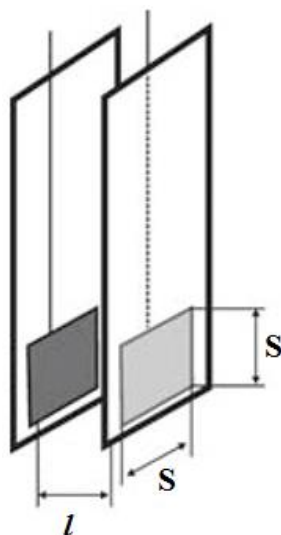
[13]

kde ρ je měrný odpor vodiče, l je délka vodiče (drátu) a S je průřez vodiče.

Pro roztoky nepoužíváme veličinu odpor, ale převrácenou hodnotu odporu nazývanou vodivost. Pro vodivost lze použít jednotku Ω^{-1} (tedy $1/\Omega$), ale častěji se používá jednotka vodivosti siemens (S).

Veličina $1/r$ je nazývána měrná vodivost (specifická vodivost, konduktivita) a značí se κ (kappa).

Při měření vodivosti je používána tzv. vodivostní cela znázorněna na Obr. 14.



Obr. 14: Schéma konduktometrické (vodivostní) cely.

Vztah pro závislost vodivosti roztoku na parametrech elektrod (jejich ploše a vzdálenosti) udává rovnice 14.

$$\frac{1}{R} = G = \kappa \frac{l}{S}$$

[14]

kde R je odpor roztoku, G je vodivost roztoku, κ je měrná vodivost roztoku, l je vzdálenost elektrod a S je plocha elektrod.

Poměr $\frac{l}{S}$ je pro danou vodivostní celu konstantní a nazývá se odporová konstanta vodivostní cely. Odporová konstanta dané vodivostní cely se zjišťuje experimentálně změřením vodivosti roztoku 0,1 M KCl při určité teplotě a porovnáním s tabelovanou hodnotou vodivosti tohoto roztoku při téže teplotě pro celu, která měla elektrody o ploše přesně 1 cm² ve vzdálenosti přesně 1 cm od sebe.

Konduktometrie je snadná a rychlá metoda používaná v laboratořích různého zaměření včetně zdravotnických ke kontrole čistoty deionizované a ultračisté vody.

2.2.1. Konduktometrie – použitá a doporučená literatura

1. Bilyk I., Nemeč R. (Avicenum, Praha 1988), Vybrané laboratorní metody
2. Drbal K., Křížek M. (Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 1999), Analytická chemie
3. Karlíček R. a kol. (Karolinum, Praha 2003), Návody do cvičení z kvalitativní anorganické a organické analýzy
4. Křížek M. a Jirovcová E. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice 2010), Cvičení z anorganické a analytické chemie

2.2.2. Konduktometrie – vzorová úloha

Úkol: Porovnání vodivosti vodovodní vody a destilované vody.

Princip: Stanovení pH je založeno na měření rozdílu potenciálů referenční a měrné elektrody.

Činidla:

- Vodovodní voda;
- destilovaná voda.

Postup:

1. Konduktometrickou celu ponořte do kádinky (25 ml) zpoloviny naplněné vodovodní vodou.
2. Vodu vylijte, napusťte nový podíl a celu znovu na několik vteřin ponořte.
3. Toto zopakujte ještě jednou, odečtěte hodnotu na přístroji.
4. Znovu vypláchněte kádinku vodovodní vodou, ponořte celu a odečtěte hodnotu vodivosti. Je-li hodnota stejná jako u předchozího měření, můžete si ji zapsat. Pokud stejná není, opakujeme tak dlouho, až při dvou po sobě následujících měřeních dostaneme stejnou hodnotu.

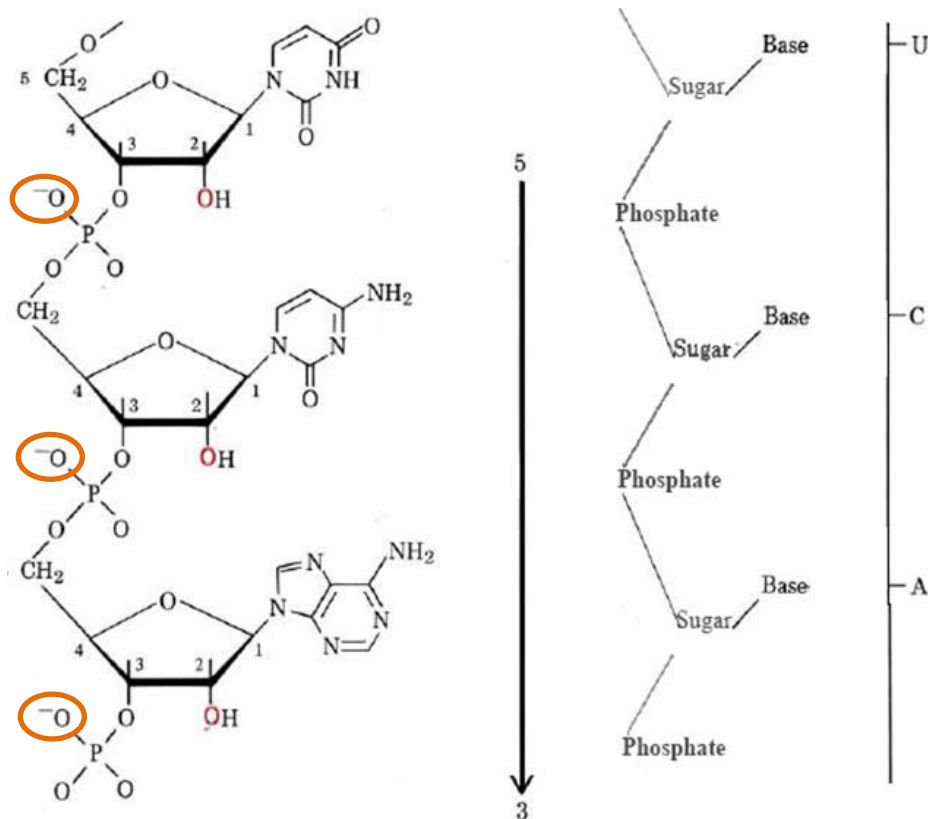
Stejný postup použijte i pro destilovanou vodu.

2.3. Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se používá k dělení směsi látek v elektrickém poli. V medicínských aplikacích je nejčastěji používána k dělení bílkovin, nukleových kyselin a jejich fragmentů.

Aby se látky pohybovaly v elektrickém poli, musí nést náboj. Aby se pohybovaly v daném elektrickém poli jedním směrem (k jedné z elektrod), musí být náboj všech dělených látek stejný.

Nukleové kyseliny jsou díky zbytkům kyseliny fosforečné nabity záporně (viz Obr. 15) a mohou se tedy v elektrickém poli pohybovat k anodě. Rychlost pohybu závisí na velikosti a tvaru molekuly, lze tedy dělit nukleové kyseliny a jejich fragmenty podle velikosti (molekulové hmotnosti, obvykle udávané v daltonech, Da).

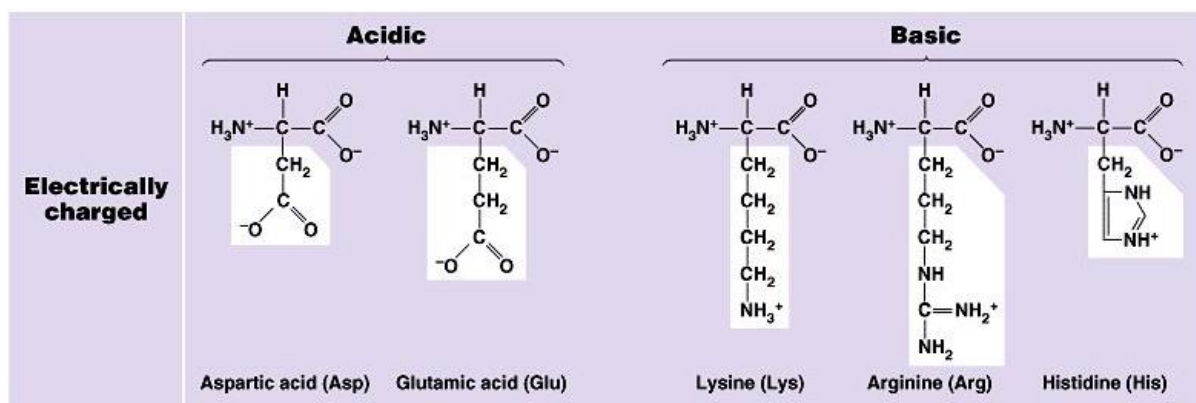


Obr. 15: Struktura nukleové kyseliny s vyznačenými zápornými náboji na zbytku kyseliny fosforečné¹⁴.

¹⁴ Zdroj obrázku:

[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_ChemPRIME_\(Moores_et_al.\)/20Molecules_in_Living_Systems/20.17%3A_Nucleic_Acid_Structure](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_ChemPRIME_(Moores_et_al.)/20Molecules_in_Living_Systems/20.17%3A_Nucleic_Acid_Structure) Staženo 1. 4. 2017.

Bílkoviny jsou tvořeny z aminokyselin. Každá aminokyselina má jednu karboxylovou skupinu a jednu amino skupinu na alfa uhlíku od karboxylové skupiny. Tyto funkční skupiny při tvorbě bílkovinného řetězce reagují za vzniku peptidické vazby, takže nemohou dodat bílkovinnému řetězci náboj. Náboj bílkovinného řetězce může být způsoben pouze nabitými skupinami v postranních řetězcích aminokyselin, jako jsou kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin, arginine a histidine – viz Obr. 16.



Obr. 16: Aminokyseliny nesoucí náboj v postranním řetězci¹⁵ (Electrically charged) rozdělené: se záporným nábojem (Acidic) – kyselina asparagová (Aspartic acid) a kyselina glutamová (Glutamic acid); s kladným nábojem (Basic) – lysin (Lysine), arginine (Arginine) a histidine (Histidine).

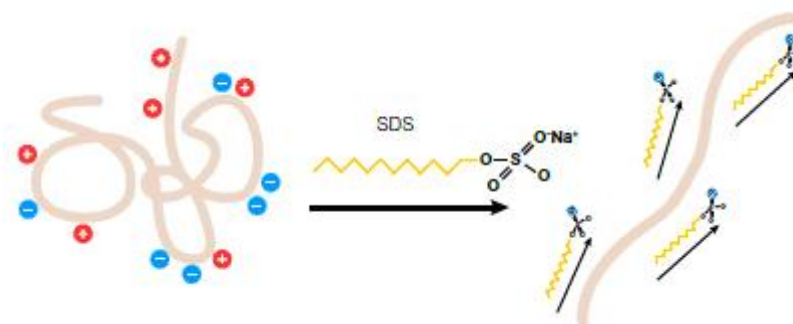
Protože kyselina asparagová a glutamová dodávají peptidickému řetězci záporný náboj a lysin, arginin a histidin dodávají kladný náboj, závisí výsledný čistý náboj řetězce na celkovém počtu jednotlivých nabitých aminokyselin. Aby se bílkoviny při elektroforéze pohybovali jedním směrem (k jedné z elektrod), je potřeba bílkovinnému řetězci dodat jednotný celkový náboj. Toho se obvykle dosahuje pomocí navázání dodecylsírany sodného (SDS = sodium dodecyl sulphate), soli, jejíž anion se nespecificky ve velkém množství váže na molekulu bílkoviny (až stovky molekul na jeden bílkovinný řetězec) a dodá jí tak jednotný záporný náboj. Díky tomu pak lze dělit bílkoviny a peptidické fragmenty na základě velikosti a tvaru molekuly.

¹⁵ Zdroj obrázku:

https://www.google.cz/search?q=elektricky+nabit%C3%A9+aminokyseliny+images&biw=1536&bih=697&tbnisch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwio6smz_JvRAhUDOB0KHYDRA-YQsAQIGA&dpr=1.25#imgsrc=Cgf9kz5I8U45kM%3A

Staženo 1. 4. 2017

Při navázání SDS na bílkovinu dojde k denaturaci bílkovinné molekuly. Navázání SDS na bílkovinu a denaturace peptidického řetězce znázorňuje Obr. 17.



Obr. 17: Schéma nespecifického navázání SDS na peptidický řetězec a následné denaturace molekuly bílkoviny¹⁶.

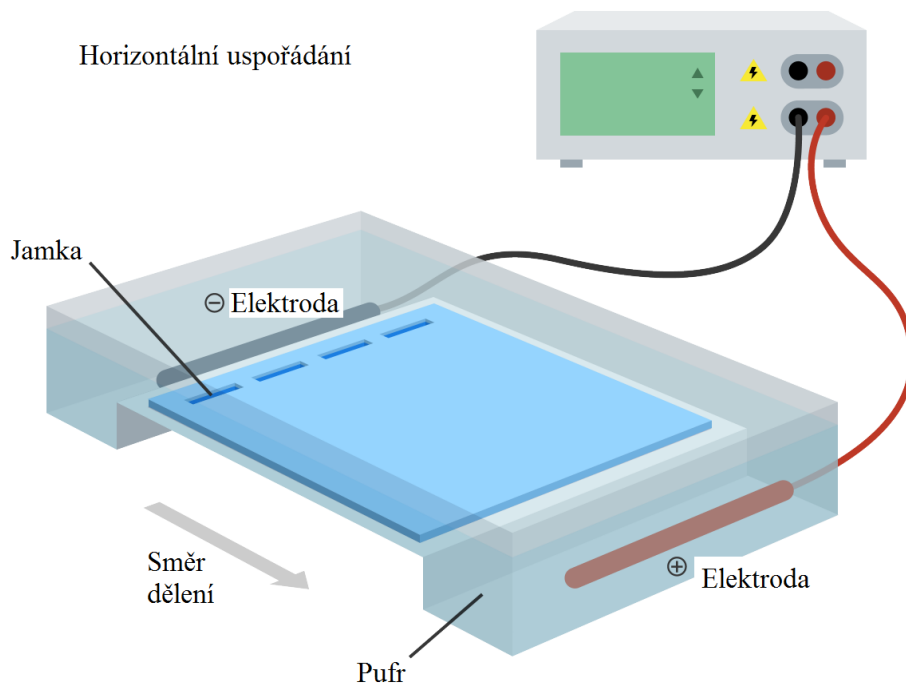
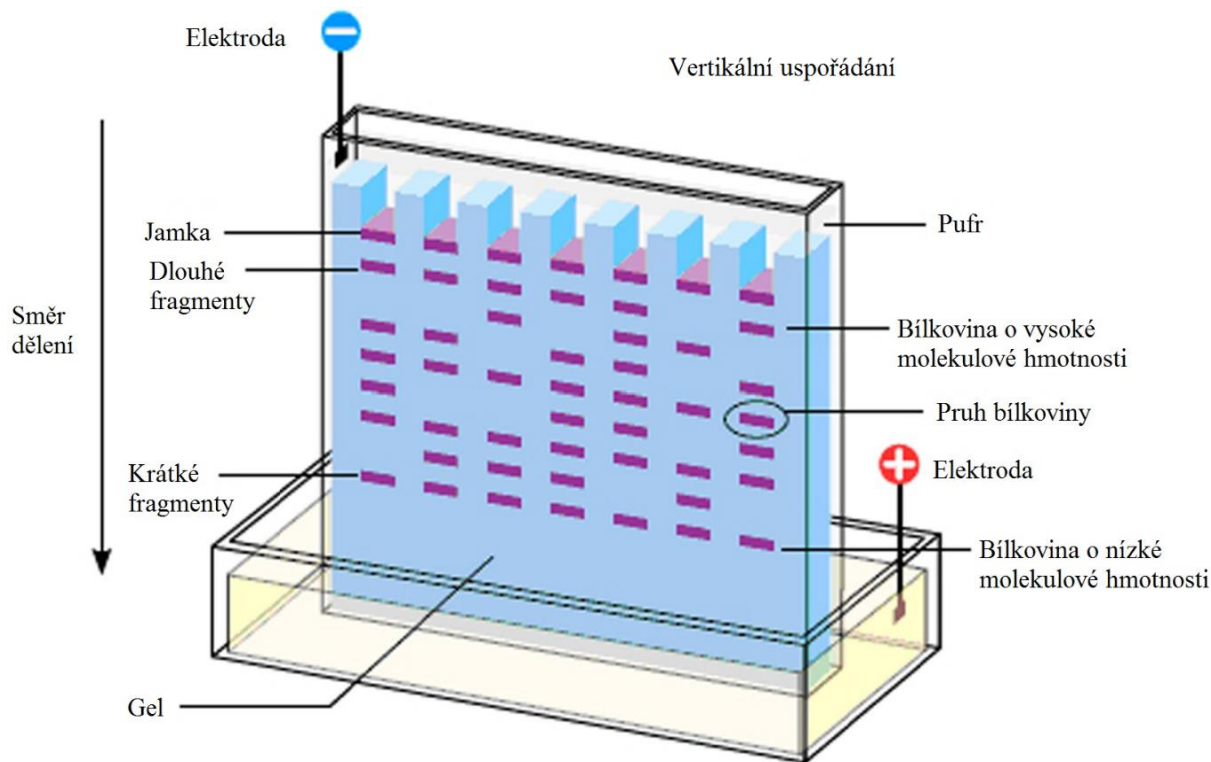
Dělení při elektroforéze se provádí na gelu, buď agarózovém nebo polyakrylamidovém a to buď v horizontálním nebo ve vertikálním uspořádání, jak ukazuje Obr. 18.

Protože ani bílkoviny ani nukleové kyseliny nejsou viditelné pouhým okem, je třeba použít k vizualizaci buď UV záření nebo častěji barvení nespecifickým barvivem, které se na dělené látky v gelu váže. Pro nukleové kyseliny se používá buď fluorescence pod UV světlem po vybarvení ethidium bromidem či jinými podstatně méně toxickými fluorescenčními barvivy jako např. GelRed či SYBR Green, pro bílkoviny pak barvení Coomassie modří nebo barvení koloidním stříbrem.

¹⁶ Zdroj obrázku:

https://www.google.cz/search?q=sds+page+protein+images&biw=1536&bih=697&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwi9_7f5g5zRAhVBXhoKHxfNda8QsAQIHQ#imgrc=NYXzX0SdjfQOsM%3A

Staženo 1. 4. 2017.



Obr. 18: Uspořádání elektroforézy ve vertikálním směru – nahoře a v horizontálním směru – dole.

2.3.1. Elektroforéza – použitá a doporučená literatura

1. Elektroforéza proteinů, staženo 24. 12. 2016, dostupné z <http://portal.med.muni.cz/clanek-425-elektroforeza-proteinu.html>
2. Le Carrer D. (Laboratories Sebia, Paříž 1995), Serum protein electrophoresis and imunofixation
3. Kit Protein(e)K20, staženo 1. 12. 2016, dostupné z http://extranet.sebia.com/sites/site/files/pdfs/13000_cz.pdf
4. Koolman J., Röhm K.H. (Grada, Praha 2012), Barevný atlas biochemie
5. Protein electrophoresis methods, staženo 1. 12. 2016, dostupné z <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>

2.3.2. Elektroforéza – vzorová úloha

Úkol: Proved'te elektroforézu bílkovin krevního séra vzorku s použitím kitu firmy Sebia Hydragel Protein(e) K20 a návodu k němu poskytovaném.

Princip: Elektroforéza bílkovin krevního séra dělí vzorek na šest frakcí dle náboje při určitém pH.

Činidla:

- Kit Hydragel Protein(e) K20, výrobce Sebia;
- fixační roztok (smíchat 60 ml etanolu, 10 ml kyseliny octové a 30 ml destilované vody do uzavíratelné lahve);
- vzorek séra (20 ul zcentrifugovaného séra naředit 100 ul fyziologického roztoku, promíchat).

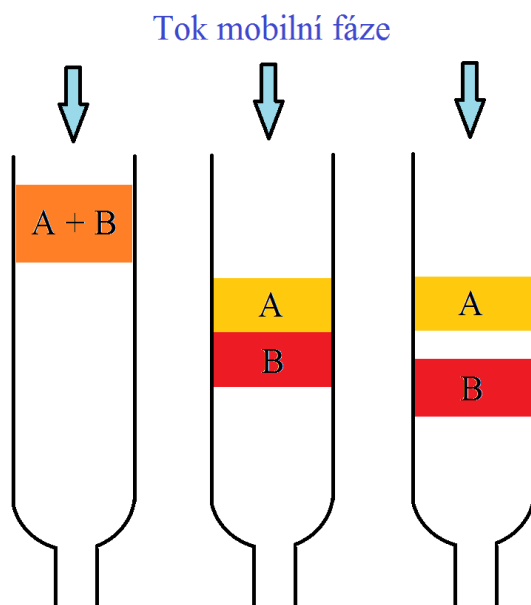
Postup:

1. Připravte pracovní roztoky dle návodu kitu – barvicí roztok a 2 odbarvovací roztoky do skleněných komor.
2. Pracovní roztok pufru na elektroforézu nalijte do elektroforetické vany – 150 ml do každé komory.
3. Nanesení vzorku: opatrně vyndejte agarózovou fólii ze zásobníku, položte na filtrační papír lícem nahoru, proužkem filtračního papíru jemně vysušte místa aplikace vzorku (u katody) a umístěte aplikační šablonu; následně naneste mikropipetou 5 ul vzorku do aplikačních míst šablony, nechte 5 min vsakovat a přebytek odsajte filtračním papírem; sundejte šablonu.
4. Elektroforetická separace: fólii nasad'te do vnitřních zářezek držáku lícem dolů, držák umístěte do elektroforetické vany (dodržet orientaci – vzorky na straně katody), nasad'te víko, připojte zdroj, na zdroji stejnosměrného napětí nastavte: napětí 70 V, proud nenastavujte, čas 30 min a spus'te elektroforézu. Po skončení separace vypněte zdroj, odpojte vanu, vyjměte fólii.
5. Vizualizace: Fólii pinzetou vložte do fixačního roztoku na 15 min, vyndejte, nechte stéct roztok a dokonale vysušte fénem. Suchou a zchlazenou fólii vložte do barvicího roztoku na 5 min, vyndejte, nechte stéct roztok a vložte do odbarvovacího roztoku na 2 min; zopakujte odbarvení, vysušte fénem.
6. Vizualně vyhodnot'te.

3. Chromatografické metody

Chromatografie je separační technika, při níž probíhá dělení složek vzorku mezi dvě fáze – fází stacionární a fází mobilní.

Stacionární fáze je nepohyblivá a je tvořena buď tenkou vrstvou nebo tvoří náplň chromatografické kolony. Fáze mobilní, pohyblivá, prochází kolem částic (povrchu tenké vrstvy nebo zrníček v koloně) fáze stacionární. Jednotlivé složky směsi mají rozdílnou afinitu ke stacionární a mobilní fázi, jsou tedy různě rychle unášeny mobilní fází kolem povrchu stacionární fáze a tím dochází k jejich rozdělení, jak ukazuje Obr. 19.



Obr. 19: Chromatografická kolona znázorňující dělení složek směsi A a B ve směru toku mobilní fáze.

Složka A na Obr. 19 má větší afinitu ke stacionární fázi než složka B, proto její postup kolonou je pomalejší než u složky B, která má větší afinitu k mobilní fázi a je tedy rychleji kolonou unášena.

Mobilní fází může být plyn nebo kapalina. Je-li mobilní fází plyn, používá se termín plynová chromatografie, často ve zkratce GC z anglického termínu gas chromatography. Je-li mobilní fází kapalina (rozpuštědlo, směs rozpouštědel nebo roztok pevné látky v rozpouštědle), používá se pro takovou chromatografii zkratka LC (liquid chromatography). V současné době se běžně setkáváme s metodou HPLC, což je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography).

Stacionární fází je obvykle pevná látka nebo gel, případně kapalina zakotvená na nosiči.

Chromatografické metody se dělí podle různých hledisek:

- podle způsobu provedení (kolonová, na tenké vrstvě),
- podle typu mobilní fáze (plynová, kapalinová),
- podle principu dělení (např. adsorpční, iontoměničová, gelová, afinitní, chromatografie využívající tvorby komplexů, rozdělovací).

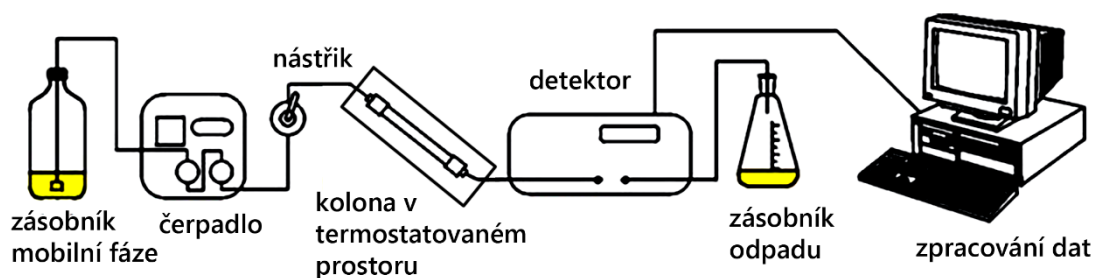
3.1. Adsorpční chromatografie

V adsorpční chromatografii je stacionární fází adsorbent s velkým povrchem a definovanou velikostí částic (obvyklá velikost částic u HPLC je 5 mikrometrů), aby dělení bylo co nejkvalitnější. Dělené látky se na adsorbent poutají různě velkými mezimolekulárními silami. Z kolony se tak mobilní fází nejprve vymývají látky slabě vázané na adsorbent a poté postupně látky s čím dál silnější vazbou na adsorbent.

Adsorpční chromatografii lze jako jednu z mála použít ve dvou provedeních, kolonovém a na tenké vrstvě.

V kolonovém uspořádání se v současnosti adsorpční chromatografie používá jako metoda HPLC s kolonami s nejrůznějšími náplněmi. Velmi rozšířenou variantou jsou kolony s tzv. reverzní fází (RP-HPLC), kdy stacionární fáze má nepolární charakter a mobilní fáze je polární. Tato metoda je nejpoužívanější metodou HPLC v současné době. Umožňuje separaci polárních látek, jako jsou léčiva, biochemické sloučeniny a mnohé další. Jako mobilní fáze se používají nejčastěji směsi vody či pufru s polárními organickými rozpouštědly, zejména methanolem a acetonitrilem. Složky směsi interagují se stacionární fází na základě své polarity, čím polárnější látka tím menší interakce a tedy tím rychlejší postup kolonou (kratší tzv. retenční čas). Velmi často se pracuje v režimu tzv. gradientové eluce, při níž se během analýzy snižuje polarita mobilní fáze zvyšujícím se přidavkem organické fáze, což umožňuje rychlejší eluci nepolárních látek z kolony. Čerpadlo protlačuje mobilní fází kolonou pod tlakem až několik stovek atmosfér (tj. desítek MPa).

Obvyklé množství směsi potřebné pro kvalitativní rozdělení je 10 – 50 mikrolitrů.

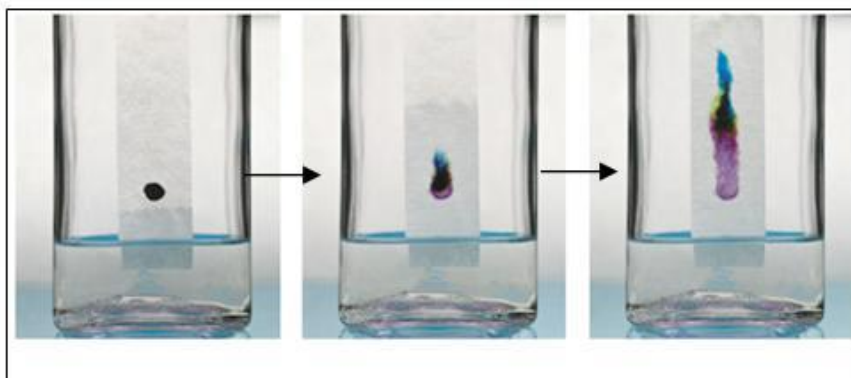


Obr. 20: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Tenkovrstvá chromatografie je svým principem také adsorpční chromatografií. Označuje se TLC (z anglického termínu thin layer chromatography). Pro TLC chromatografii se používá tenká vrstva adsorbentu nanesená na skle nebo na hliníkové fólii; adsorbentem může být silikagel, oxid hlinitý, celulóza. Velikost zrn adsorbentu se pohybuje obvykle v rozmezí 30 – 50 mikrometrů. Komerčně jsou známy např. folie Silufol (silikagel), Alufol (oxid hlinitý), Lucefol (celulóza). Tloušťka adsorpční vrstvy je obvykle v rozmezí 0,1 – 0,25 mm.

Rozdělovací chromatografie je metoda založená na různé rozpustnosti látek v rozpouštědlech s různou polaritou. Stacionární kapalná fáze musí být zakotvena na nosiči. Nejobvyklejším praktickým provedením této metody je papírová chromatografie, kde chromatografický papír je nosičem mobilní fáze, stacionární fází je tedy voda (vzdušná vlhkost nasáklá v papíru) a mobilní fází nepolární rozpouštědlo, např. petroléter.

Při chromatografickém dělení na tenké vrstvě nebo na papíře mobilní fáze vzlíná kapilárními silami vzhůru (Obr. 21). Látky jsou děleny podle síly interakcí s mobilní a stacionární fází – čím slabší interakce se stacionární fází, tím rychleji jsou látky unášeny po tenké vrstvě nebo po papíře.

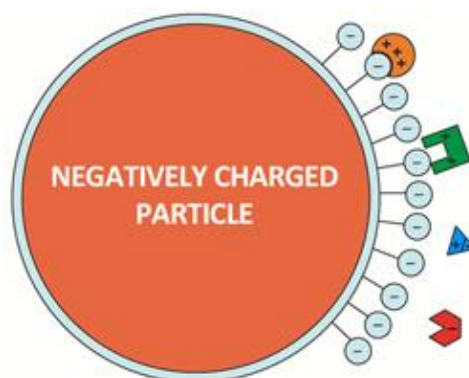


Obr. 21: Chromatografická komora s papírem¹⁷.

Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu spočívá v porovnávání vzdáleností, které za zvolených podmínek urazily jednotlivé složky směsi od startu - totožné látky mají středy skvrn ve stejné vzdálenosti od startu. Při kvantitativní analýze se musí vzorek z tenké vrstvy nebo z papíru vyzkoušeným postupem vymýt a kvantita vzorku ve skvrně se stanoví např. spektrofotometricky z předem připravené kalibrační křivky.

3.2. Iontoměničová chromatografie – chromatografie na iontoměničích

Chromatografie na iontoměničích je založena na separaci iontů z roztoku v závislosti na síle coulombických interakcí mezi stacionární fází a dělenými ionty; zjednodušeně lze říci, že dělení probíhá v závislosti na náboji a velikosti iontů, jak ukazuje Obr. 22.



Obr. 22: Síla interakce iontů s katexem (negatively charged particle) v závislosti na velikosti náboje¹⁸.

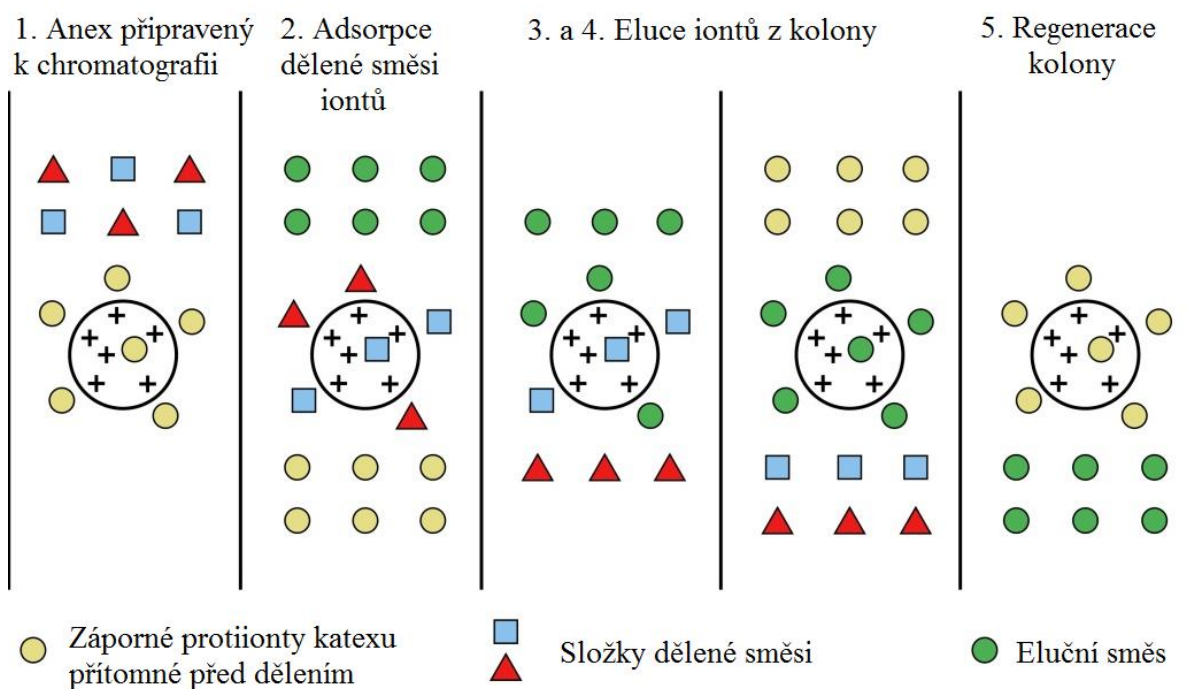
¹⁷ Zdroj obrázku:

<http://chromatographyscience.blogspot.cz/2012/08/procedure-of-paper-chromatography.html#.WPCJGvnyjiU> Staženo 14. 4. 2017.

¹⁸ Zdroj obrázku:

<https://www.google.cz/search?q=cation+exchange+capacity+images&biw=1536&bih=697&tbm=isch&tbo=u>

Stacionární fáze se dělí podle toho, zda jsou děleny kationty či anionty. Pro dělení kationtů se používají katexy, pro dělení aniontů anexy. Jsou to obvykle gely s navázanými nabitými skupinami (záporně nabitě skupiny na katexech a kladně nabitě skupiny na anexech). Kvůli elektroneutralitě musí být v roztoku kolem anexu protiionty s opačným nábojem, které jsou snadno vyměnitelné za jiné ionty v průběhu dělení. Postup chromatografického dělení na anexu ukazuje Obr. 23.



Obr. 23: Dělení směsi aniontů na anexu.

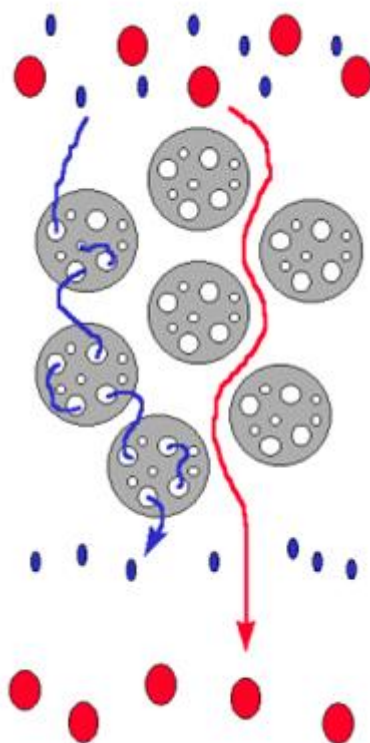
Chromatografie na iontoměníčích má široké použití v mnoha odvětvích vědy a průmyslu, využívá se ke stanovování iontového složení přírodních vod a dalších environmentálních aplikacích, ale též ve farmaceutickém průmyslu a v biotechnologiích.

3.3. Gelová chromatografie

Gelová chromatografie dělí látky na základě velikosti molekul. Gel používaný v gelové chromatografii je molekulové síto s póry v určitém rozmezí velikosti. Jak ukazuje Obr. 24,

<https://www.researchgate.net/publication/312111111> Staženo 1. 4. 2017.

velké molekuly gelové částice s póry obtékají a pohybují se tak kolonou rychle; čím menší částice, tím větší počet pórů, do kterých může zapadnout, a tím větší zdržení v koloně.



Obr. 24: Princip dělení gelové chromatografie¹⁹.

Běžně užívaným gelem pro gelovou chromatografii je Sephadex. Tab. 3. ukazuje výběr typu Sephadex gelů a velikosti molekul, které mohou dělit.

Tab. 3: Typy gelu Sephadex pro gelovou chromatografií²⁰.

typ gelu	rozsah dělení (molekulová hmotnost)
Sephadex G-10	větší než 700
Sephadex G-25	větší než 1500
Sephadex G-30	větší než 30 000
Sephadex G-75	větší než 80 000

¹⁹ Zdroj obrázku:

<http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/lect31/lect31.htm> Staženo 1. 4. 2017.

²⁰ GE Healthcare Life Sciences – Sephadex Chromatography Media:

http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure_17400 Staženo 30. 12. 2016.

Gelová chromatografie má velký význam při frakcionaci proteinů, peptidů a oligonukleotidů a jiných ve vodě rozpustných polymerů.

3.4. Chromatografie – použitá a doporučená literatura

1. Alexander R.R. (Wiley, New Jersey 1985), Basic biochemical methods
2. Hais I.M. a kol. (Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1959),
Papírová chromatografie
3. Ion Exchange chromatography, staženo 28. 12. 2016, dostupné z:
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch06s02.html>
4. Michałski R. (Chemik 2014, 68 (5), 478-485), Industrial application of ion chromatography, staženo 30. 12. 2016, dostupné z
<http://www.chemikinternational.com/wp-content/uploads/2014/05/5.pdf>
5. Olukoga A.O. a kol. (J. R. Soc. Med., 1997, 90: 570 – 577), Laboratory instrumentation in clinical biochemistry an historical perspective
6. Varga F. a kol. (Avicenum, Praha 1989), Klinická biochemie cvičení I.
7. Waters – HPLC separation modes, staženo 30. 12. 2016, dostupné z
http://www.waters.com/waters/en_GB/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_GB

3.5. Chromatografie – vzorová úloha

Úkol: Proved'te TLC chromatografii vzorků aminokyselin.

Princip: Podle rozdělovacích koeficientů aminokyselin dojde k jejich separaci na celulóзовé desce TLC pomocí vhodné mobilní fáze.

Činidla:

- Vyvíjecí směs (smíchat 35 ml n-butanolu, 35 ml acetonu, 10 ml kyseliny octové a 20 ml destilované vody);
- roztok ninhydrinu v n-butanolu a acetonu o koncentraci $c = 0,4 \text{ mol/l}$ (7,126 g ninhydrinu rozpustit ve 100 ml směsi n-butanolu a acetonu v poměru 1:1);
- vzorek aminokyselin;
- standardy aminokyselin.

Postup:

1. Napln'te vanu vyvíjecí směsí do výšky asi 1,5 cm ode dna a nechte nasytit po dobu 1 hodiny.
2. Nanesení vzorků: na TLC desce vyznačte tužkou start a čelo tak, aby byl start nad hladinou vyvíjecí směsi. Vzorky naneste mikropipetou o objemu 5 ul v bodech, dokonale vysušte a vložte do vyvíjecí komory.
3. Vyvíjení ukončete až směs dosáhne čela, vysušte v termostatu při 80 °C.
4. Do vyvíjecí směsi přidejte roztok ninhydrinu v n-butanolu a acetonu a vyvíjení opakujte, vysušte.
5. Vyhodno'te polohu skvrn se stejně zpracovanými standardy.

Pracovní sešit

Obsah

1. Optické metody	2
1.1. Elektromagnetické záření	2
1.2. UV-VIS spektrofotometrie	4
1.2.1. UV- VIS spektrofotometrie – praktická úloha	10
1.3. Polarimetrie	12
1.3.1. Polarimetrie – praktická úloha	14
1.4. Refraktometrie.....	16
1.4.1. Refraktometrie – praktická úloha.....	20
1.5. Turbidimetrie, nefelometrie	21
1.5.1. Turbidimetrie, nefelometrie – praktická úloha.....	22
2. Elektrochemické metody.....	23
2.1. Potenciometrie.....	24
2.1.1. Potenciometrie – praktická úloha.....	26
2.2. Konduktometrie.....	27
2.2.1. Konduktometrie – praktická úloha.....	29
2.3. Elektroforéza	30
2.3.2. Elektroforéza – praktická úloha	34
3. Chromatografické metody	36
3.1. Adsorpční chromatografie.....	37
3.2. Iontoměničová chromatografie – chromatografie na iontoměničích.....	39
3.3. Gelová chromatografie.....	40
3.5. Chromatografie – praktická úloha.....	42

1. Optické metody

Optické metody jsou založené na interakci elektromagnetického záření s hmotným prostředím (molekulami, atomy).

1.1. Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření má tzv. **duální charakter**, to znamená, že:

Vlnu elektromagnetického záření charakterizujeme vlnovou délkou, která je úzce svázána s frekvencí a amplitudou.

Vlnová délka je:

Jednotkou vlnové délky je **m**, ale z praktických důvodů se u různých typů záření používají jednotky odvozené (**nm**, **μm**, **cm**).

Načrtněte znázornění vlnové délky:

Frekvence je:

Čím je vlnová délka větší, tím je frekvence.....

Jednotkou frekvence záření je s^{-1} nebo **Hz** (hertz).

Amplituda je:

Načrtněte znázornění amplitudy:

Elektromagnetické záření (vlnění) se šíří ve vakuu rychlostí:.....

V jiných prostředích (ve vzduchu, ve vodě, v roztocích) se šíří rychlostí:

Elektromagnetické záření se může chovat při některých interakcích s hmotným prostředím jako **proud fotonů**. Fotonům záření určité vlnové délky lze přiřadit určitou energii, která souvisí s frekvencí záření. Tento vztah udává **Planckův zákon**:

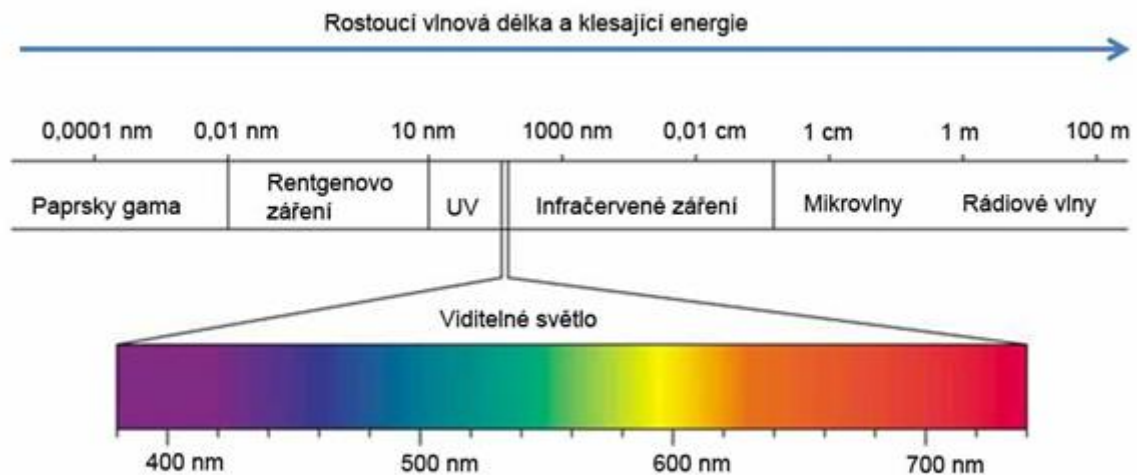
[1]

Rovnici pro energii záření lze vyjádřit pomocí vlnové délky:

[2]

Tab. 1: Jednotlivé oblasti elektromagnetického spektra (od nejkratších k nejdelším vlnovým délkám):

Oblast spektra	Vlnová délka s jednotkami



Obr. 1: Jednotlivé oblasti spektra elektromagnetického záření.

Doplňte odpovídající oblasti elektromagnetického záření:

Jen nepatrná část elektromagnetického záření je vnímána lidským okem (.....); část záření vnímáme jako teplo (.....). Pro zbývající část elektromagnetického záření nemá lidské tělo odpovídající receptory, což ale neznamená, že nemůže docházet k interakci. Je-li např. kůže vystavena, dochází ke zčervenání, případně zhnědnutí kůže; je-li tělo vystaveno nebo, může dojít k interakci s nukleovými kyselinami a vzniku mutací.

V laboratorní zdravotnické praxi se nejvíce využívá:

-
-

V klinické praxi se využívá:

-
-

1.2. UV-VIS spektrofotometrie

Nejčastěji využívanou laboratorní optickou metodou je UV-VIS spektrofotometrie, tedy optická metoda využívající pohlcování světla celé viditelné a části ultrafialové oblasti (200 – 400 nm) spektra v roztocích látek.

Aby látka pohlcovala záření těchto vlnových délek, musí obsahovat tzv. **chromofor**.

Chromofor je:

Například:

-
-
-

Pohlcení světla znamená:

Pohlcování světla chromoforem lze kvantitativně vyjádřit pomocí veličiny zvané **absorbance**, která je definována pomocí veličiny **transmittance**. Obě veličiny se používají zejména u roztoků látek.

Transmittance je:

Je definována vztahem:

$$T_{\lambda} = \frac{I}{I_0}$$

[3]

- T_{λ}
- I
- I_0

Velmi často se transmittance udává **v procentech** – hodnota transmittance vypočtené dle rov. 3 se vynásobí stem. Hodnota transmittance se pak pohybuje mezi 0 – 100 %.

Častěji používanou jednotkou je **absorbance**, která je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance, jak ukazuje rovnice:

$$A_{\lambda} = \log \frac{1}{T_{\lambda}}$$

[4]

Absorbance roztoku závisí **přímo úměrně** na:

-
-

Tato závislost je vyjádřena **Lambert-Beerovým¹ zákonem**:

[5]

Veličina ϵ charakterizuje daný chromofor a je tedy pro roztok určité látky konstantou úměrnosti. Nazývá se:

Je-li koncentrace udána v jednotce mol/l, pak ϵ udává, jaká by byla absorbance roztoku, který by měl koncentraci a u něhož by světlo procházelo vrstvou o tloušťce.....

Odvoďte jednotku ϵ z rov. 5 tím, že si vyjádříme z rovnice ϵ :

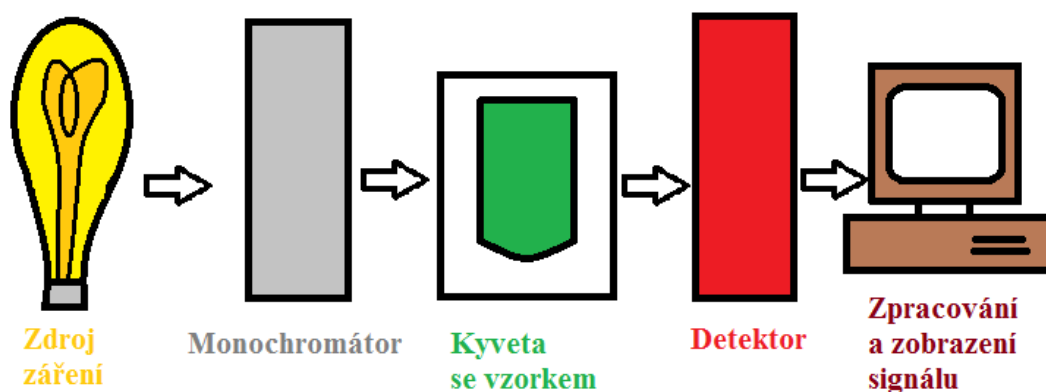
Absorbance v UV a VIS oblasti se měří na přístrojích zvaných **spektrofotometry**. Moderní přístroje zahrnují obvykle oblast vlnových délek a umožňují tak měření při různých vlnových délkách. Hodnota absorbance, kterou je na spektrofotometrech možné měřit, se liší podle typu přístroje, obvyklá je maximální hodnota $A = 2$. Z tohoto údaje a z hodnot molárních absorpčních koeficientů obvyklých chromoforů pak plyne, že můžeme měřit koncentrace řádově $10^{-4} - 10^{-5}$ mol/l.

Spektrofotometr sestává z několika základních komponent:

-
-
-
-
-

¹ Závislost množství pohlceného světla na délce absorbující vrstvy objevil v roce 1729 francouzský přírodovědec Pierre Bouguer, ale objev je připisován Jonannu Heinrichu Lambertovi, který citoval z Bouguerovi eseje o optice ve svém díle Photometria v roce 1760.

Závislost na koncentraci byla objevena až o mnoho později, v roce 1852 německým fyzikem, chemikem a matematikem Augustem Beerem.

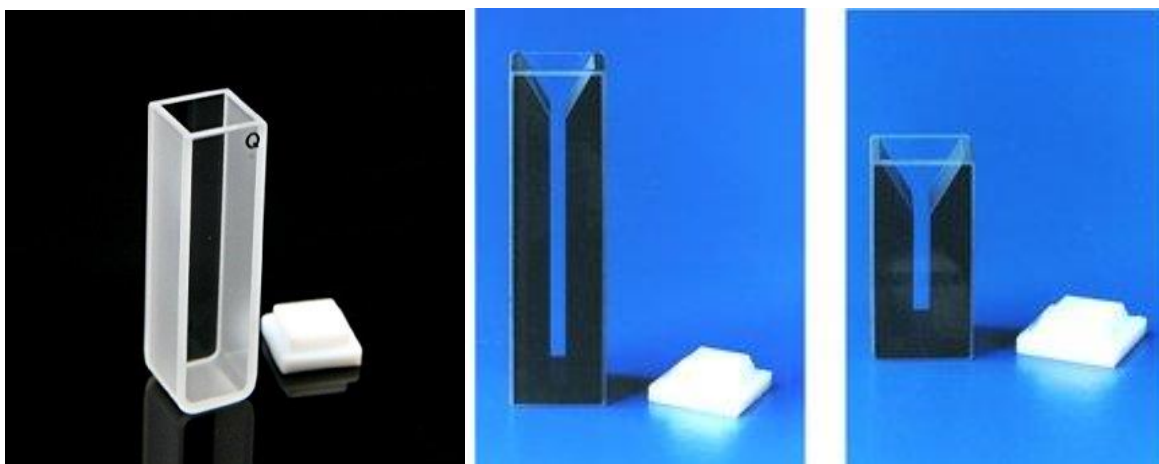


Obr. 2: Schéma základních součástí UV-VIS spektrofotometru.

Zdrojem světla pro VIS oblast je:

Jako monochromátor se používá:

Kyvety používané v současné době mají standardně optickou dráhu 1 cm a vyžadují přibližně 3 ml roztoku pro měření. Pokud je vzorku k měření jen malé množství, používají se speciální kyvety, které také mají optickou dráhu 1 cm, ale potřebný objem k měření je kolem 70 - 850 μ l.



Obr. 3: Vlevo – kyveta pro spektrofotometrické měření s optickou dráhou 1 cm, uprostřed a vpravo - kyvety pro spektrofotometrické měření malých objemů vzorků.

Rozdělení a použití kyvet podle materiálu:

-
-
-

Aplikace spektrofotometrie na kvantitativní biochemickou analytiku

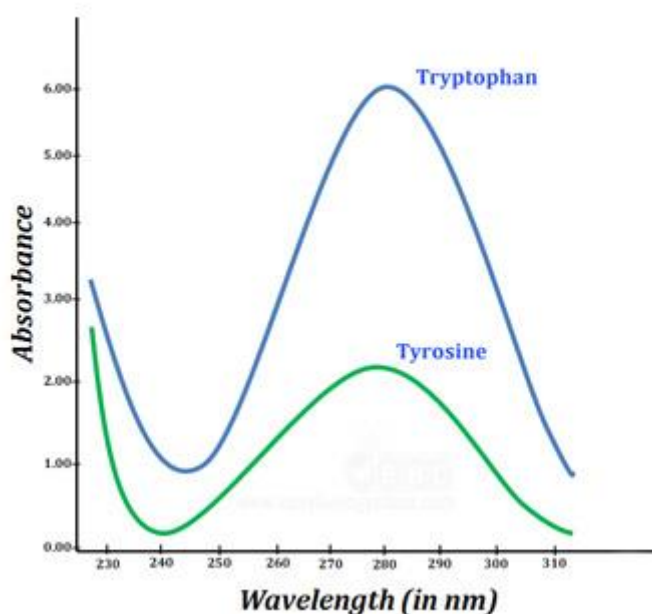
Stanovení koncentrace látky je založeno na Lambert-Beerově zákoně, tj. lineární závislosti

.....
Absorbance je definována vždy pro určitou vlnovou délku, proto musíme nejdříve zjistit, při jaké vlnové délce absorbanci roztoku stanovovat. K tomu musíme proměřit tzv. absorpční spektrum.

Absorpční spektrum (Obr. 4.) je:

Ke stanovení koncentrací pak používáme měření absorbance v oblasti maxima v absorpčního spektra, protože.....

Absorption Peak of Amino Acids at 280 nm



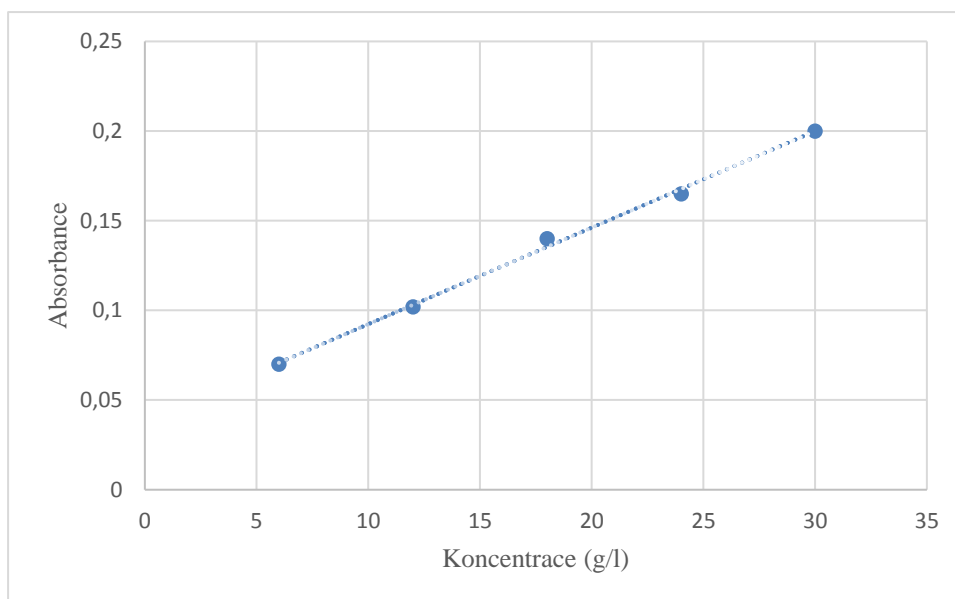
Obr. 4: Příklad absorpčního spektra.

Teoreticky je možné **vypočítat koncentraci přímo z Lambert-Beerova zákona**, známe-li z literatury molární absorpční koeficient a máme-li změřenou absorbanci roztoku měřené látky o neznáme koncentraci.

Z praktických důvodů se ale používá **metoda sestrojení kalibrační křivky** pomocí standardů měřené látky a odečtení koncentrace u roztoku s neznámou koncentrací měřené látky z této kalibrační křivky.

Spektrofotometrická kalibrační křivka je:

Pro sestrojení kalibrační křivky je potřeba připravit sadu roztoků o různé koncentraci; koncentrace roztoků by měly rovnoměrně pokrývat měřený rozsah, jak je ukázáno v Obr. 5.



Obr. 5: Příklad spektrofotometrické kalibrační křivky.

Variantou metody kalibrační křivky je **metoda jednoho standardu** a využívá se u spolehlivých prověřených analytických metod.

První bod odpovídá slepému pokusu tzv. blanku, který.....

Druhý bod je

Při předpokladu platnosti Lambert-Beerova zákona a provedení měření za konstantních podmínek pro vzorek i standardní roztok tedy platí, že **poměr absorbance standardu a vzorku je roven poměru jejich koncentrací:**

$$\frac{A_{st}}{A_{vz}} = \frac{C_{st}}{C_{vz}}$$

[6]

• A_{st}

• A_{vz}

• C_{st}

• C_{vz}

Vyjádřete z rovnice 6. Cvz:

[7]

1.2.1. UV- VIS spektrofotometrie – praktická úloha

Úkol: Stanovte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku séra pomocí metody kalibrační křivky (nejméně na 5 kalibračních roztoků) a metody jednoho standardu pomocí Biuretovy metody s využitím setu Total Protein, Erba Lachema s.r.o. a návodu k němu poskytovaném.

Princip: Bílkoviny v přítomnosti měďnatých solí v alkalickém prostředí poskytují modrofialový komplex, vhodný k fotometrickému stanovení.

Činidla:

- vzorek séra;
- standardní roztok bílkoviny o koncentraci 30 g/l;
- destilovaná voda;
- Biuretovo činidlo.

Postup:

1. Nařed'te kalibrační roztoky podle odpovídající koncentrace v tabulce do výsledného objemu 0,5 ml:

Číslo standardu	Standard (ml)	Dest.voda (ml)	Koncentrace (g/l)
1.			6,00
2.			12,00
3.			18,00
4.			24,00
5.			30,00

2. Zpracujte vzorky dle tabulky:

	Blank	Vzorek	Standard
Biuretovo činidlo (ml)	1,00	1,00	1,00
Sérum – vzorek (ml)		0,01	
Standard (ml)			0,01
Destilovaná voda (ml)	0,01		

3. Po promíchání všechny zkumavky inkubujte po dobu 10 min při 37° C a změřte absorbance vzorku a standardních roztoků proti blanku při vlnové délce 546 nm. Zbarvení je stabilní pod dobu nejméně 30 minut.

Číslo standardu	Standard (ml)	Dest.voda (ml)	Koncentrace g/l	Absorbance
1.			6,000	
2.			12,000	
3.			18,000	
4.			24,000	
5.			30,000	

4. Vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku metodou jednoho standardu, sestrojte kalibrační křivku na milimetrový papír a odečtěte koncentraci vzorku podle naměřené hodnoty absorbance vzorku.

$A_{vz} =$

$$C_{vz} = \frac{A_{vz} \cdot C_{st}}{A_{st}}$$

[7]

Závěr: Koncentrace celkové bílkoviny v séru je dle metody jednoho standardug/l a dle kalibrační křivky je g/l.

1.3. Polarimetrie

Polarimetrie je optická analytická metoda založená na měření tzv. optické otáčivosti.

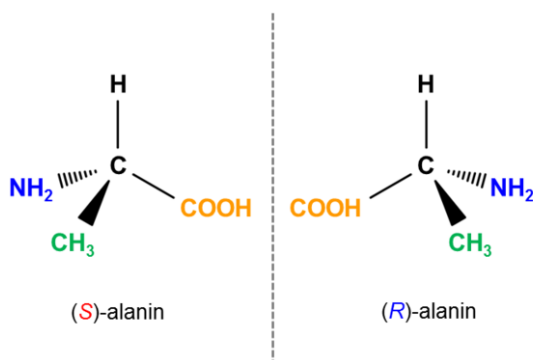
Optická otáčivost je:

Optickou aktivitou se vyznačují některé krystaly nebo látky s tzv. chirální strukturou.

Chirální struktura látky znamená:

Příkladem látky s chirální strukturou je aminokyselina alanin. Její dvě opticky aktivní struktury, tzv. **enantiomery**, jsou znázorněny na Obr. 6.

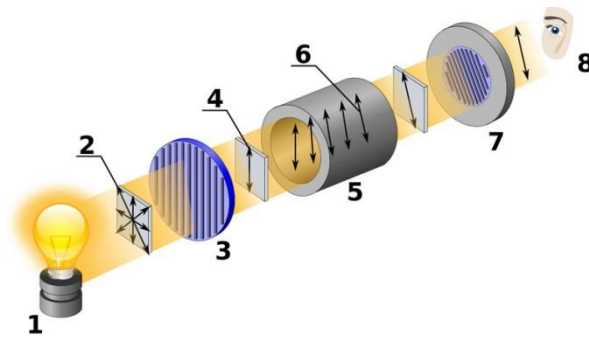
K označení enantiomerů se používá buď znamének + / - nebo písmen d- / l- či S- / R-, kdy první symbol v jednotlivých dvojicích označuje enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla doprava, druhý pak enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla doleva².



Obr. 6: Enantiomery aminokyseliny alaninu.

K měření optické aktivity se využívají přístroje polarimetru. Schéma polarimetru je znázorněno na Obr. 7.

² Symboly jsou odvozeny z latinských názvů pro pravý (dexter) a levý (laevus) či správný (rectus) a nesprávný (sinister).



Obr. 7: Schéma základních komponent polarimetru.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8

Úhel stočení roviny polarizovaného světla závisí na:

-
-

Tuto kvantitativní závislost lze vyjádřit vztahem:

$$\alpha = \alpha_{\lambda}^t \cdot l \cdot c$$

[9]

- l
- c
- α_{λ}^t

Pro stanovení koncentrace opticky aktivních látek se používá, stejně jako u UV-VIS spektrofotometrie, **metoda kalibrační křivky**.

Využití polarimetrie:

1.3.1. Polarimetrie – praktická úloha

Úkol: Stanovte polarimetricky koncentraci vzorku glukózy metodou kalibrační křivky a výpočtu.

Princip: Změřením úhlů otáčení u kalibrační řady a vzorku glukózy se stanoví koncentrace vzorku a hodnoty se porovnají s vypočítanými údaji dle vzorce pro výpočet koncentrace.

Činidla:

- Standardní roztok glukózy o koncentraci $c = 100 \text{ g/l}$ (např. 20 g glukózy rozpustit v 200 ml odměrné baňce, přidat cca 10 kapek hydroxidu amonného, doplnit po rysku);
- vzorek o neznáme koncentraci glukózy;
- hydroxid amonný naředěný 1:1;
- destilovaná voda.

Postup:

1. Příprava polarimetru – zapněte sodíkovou výbojku a proveďte korekci nulové polohy.
2. Nařed'te kalibrační roztoky podle odpovídající koncentrace v tabulce do výsledného objemu 50 ml:

Standardní roztok (ml)	Destilovaná voda (ml)	Koncentrace (g/l)
		20
		40
		60
		80
		100

3. Změřte optickou otáčivost kalibračních roztoků a vzorku v 200 mm polarimetrické trubici, odečítání se provádí alespoň třikrát.
4. Zhotovte kalibrační křivku na milimetrový papír a odečtete koncentraci vzorku. Postup je obdobný jako u vzorové úlohy pro fotometrii, kdy grafem je závislost naměřených úhlů na koncentraci.

5. Porovnejte výsledek z kalibrační křivky s výpočtem dle vzorce, kdy α_{λ}^t pro glukózu při teplotě 20 °C je +52,74:

$$c_{VZ} = \frac{\alpha}{\alpha_{\lambda}^t \cdot l}$$

1.4. Refraktometrie

Refraktometrie je:

Prochází-li paprsek určité vlnové délky z jednoho optického prostředí do jiného optického prostředí (prostředí s jinou tzv. optickou hustotou), mění se na rozhraní jeho **rychlost**, což se projeví jako **změna směru šíření**.

Načrtněte paprsek procházející **z prostředí opticky řidšího do prostředí opticky hustšího** (např. ze vzduchu do vody):

Načrtněte paprsek procházející **z prostředí opticky hustšího do prostředí opticky řidšího**:

Tzv. **absolutní index lomu** udává, jaký je poměr rychlosti šíření světla ve vakuu a v daném prostředí:

[10]

Absolutní index lomu je tedy vždy větší než jedna.

Pro přechod z prostředí s indexem lomu n_1 do prostředí s indexem lomu n_2 se používá **relativní index lomu $n_{2,1}$** , který je definován jako poměr indexu lomu druhého a prvního prostředí, jak ukazuje rovnice 11.

$$n_{2,1} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

[11]

- $n_{2,1}$
- n_1 a n_2
- v_1 a v_2
- $\sin \alpha$
- $\sin \beta$

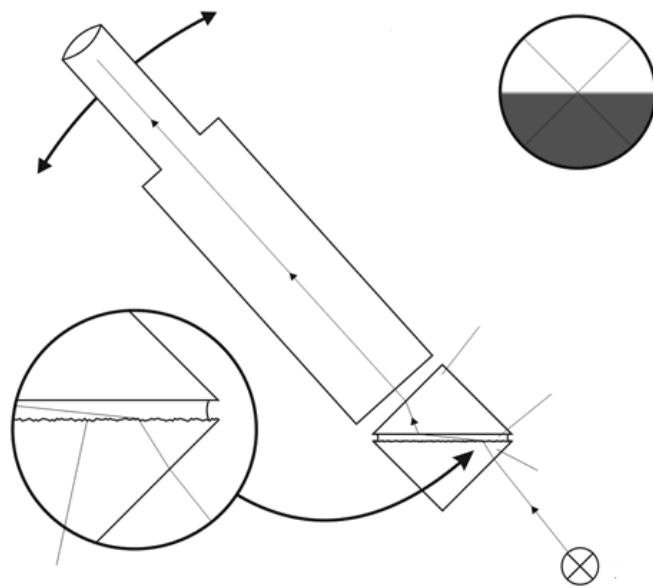
V tabulce 2 je uvedeno několik příkladů relativních indexů lomu pro různé látky:

Tab. 2: Příklady relativních indexů lomu.

látka	index lomu
vakuum	1
vzduch (normální tlak)	1,00026
led	1,31
voda	1,33
etanol	1,36
glycerol	1,473
sklo	1,5 až 1,9
sůl	1,52
safir	1,77
diamant	2,42

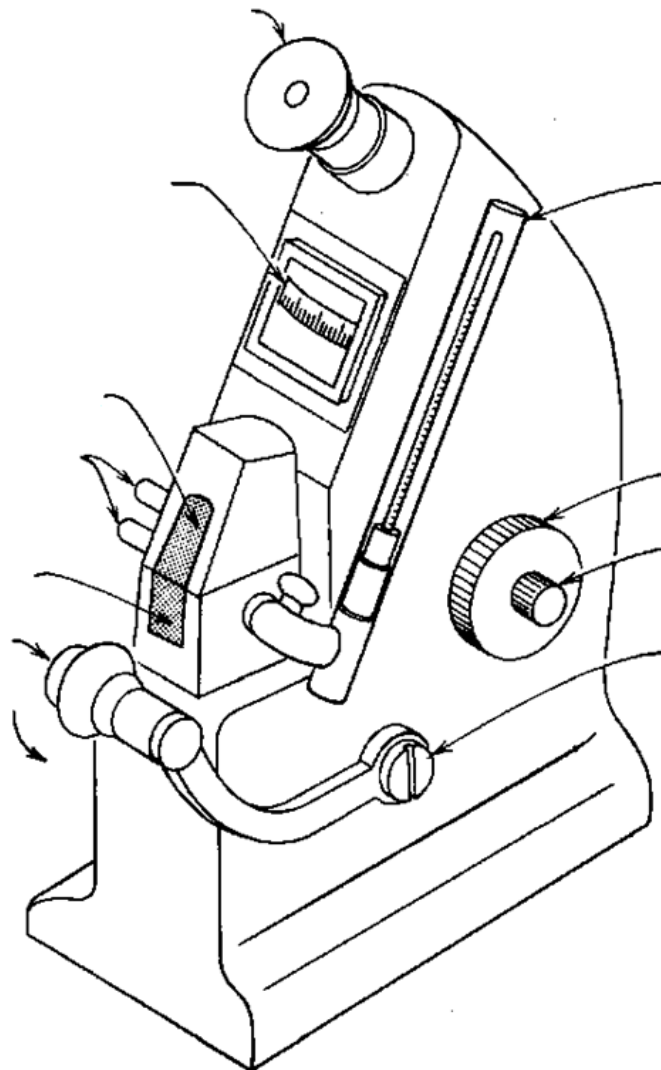
K měření indexu lomu se používají **refraktometry**. Nejobvykleji používané jsou dva typy refraktometrů, Abbého refraktometr a ruční refraktometr.

Popiš stručný princip **Abbého refraktometru** a jeho komponenty na Obr. 8:



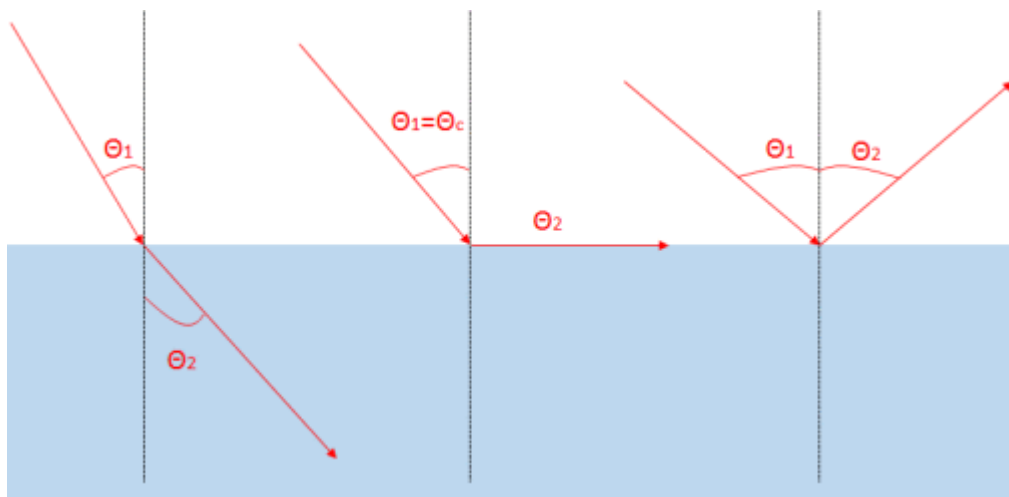
část A.

část B.



Obr. 8: Popis Abbého refraktometru, část A. – vnitřní uspořádání, část B. vnější uspořádání.

Ruční refraktometry využívají tzv. **kritického úhlu totální reflexe**, znázorněném na Obr. 9. Dochází k němu při přechodu světla z prostředí opticky hustšího do prostředí opticky řidšího.



Obr. 9: Totální reflexe.

Popište k čemu na obrázku 9. dochází:

Použití refraktometrie:

1.4.1. Refraktometrie – praktická úloha

Úkol: Stanovte refraktometricky koncentraci vzorku bílkoviny v séru metodou kalibrační křivky.

Princip: Změřením indexu lomu u kalibrační řady a vzorku séra se stanoví koncentrace vzorku odečtením z kalibrační křivky.

Činidla:

- Standardní roztok bílkoviny o koncentraci $c = 30 \text{ g/l}$;
- vzorek o neznáme koncentraci bílkoviny;
- destilovaná voda;
- fyziologický roztok.

Postup:

1. Nařed'te kalibrační roztoky podle odpovídající koncentrace v tabulce do výsledného objemu 0,5 ml:

Číslo standardu	Standard (ml)	Fyz. roztok (ml)	Koncentrace (g/l)
1.			6,0
2.			12,0
3.			18,0
4.			24,0
5.			30,0

2. Změřte index lomu kalibračních roztoků a vzorku.
3. Zhotovte kalibrační křivku na milimetrový papír a odečtete koncentraci vzorku. Postup je obdobný jako u vzorové úlohy pro fotometrii, kdy grafem je závislost naměřených indexů lomu na koncentraci.

1.5. Turbidimetrie, nefelometrie

Obecně mohou být tyto metody nazývány **metody měření zákalu**.

Využívá se u nich:

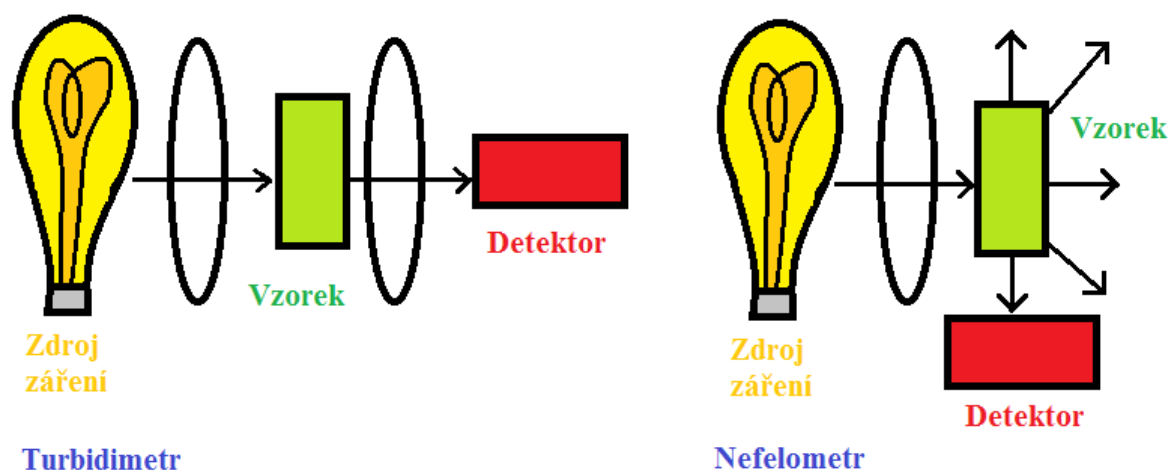
Koloidní roztok je:

K měření se využívá UV nebo VIS záření, které rozptyluje částice menší jak 1 μm .

Na Obr. 10 je vidět rozdíl mezi oběma metodami, který je dán **ve způsobu měření rozptýleného světla**.

V turbidimetrii se měří:

V nefelometrii se měří:



Obr. 10: Schéma turbidimetru a nefelometru.

Využití nefelometrie a turbidimetrie:

Pro vzorky s menší koncentrací stanovované látky je vhodnější metodou nefelometrie.

1.5.1. Turbidimetrie, nefelometrie – praktická úloha

Úkol: Stanovte C-reaktivní protein z kapilární krve s využitím kitu QuikRead CRP a návodu k němu poskytovaném na přístroji QuikRead 101.

Princip: Turbidimetrickým měřením se stanoví hladina C-reaktivního proteinu.

Činidla:

- Kit QuikRead CRP

Postup:

1. Načtete kartu, otevřete kyvetu.
2. Sestavete kapiláru, odeberte spolužákovi 20 μ l kapilární krve (po bílou zátku) a pístem ji vytlačte do kyvety s pufrem.
3. Kyvetu zavřete víčkem s činidlem, protřepejte a čekejte na čirý roztok v kyvetě.
4. Kyvetu vložte do otvoru pro měření a změřte blank.
5. Přidejte činidlo stlačením vnitřní modré části víčka.
6. Kyvetu vyndejte a důkladně míchejte obracením dna vzhůru.
7. Po pípnutí přístroje vložte kyvetu do otvoru pro měření a odečtěte výsledek.

2. Elektrochemické metody

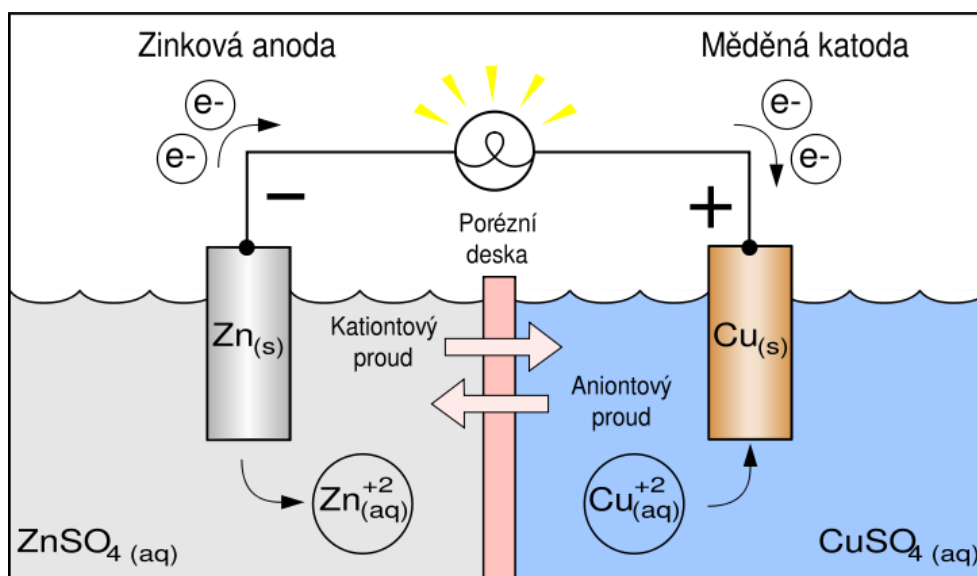
Elektrochemie je nauka o vzájemných vztazích energie a
Elektrochemie se zabývá rovnováhami a ději v soustavách, které obsahují **elektricky nabitě částice, ionty**.

Elektrochemické metody zahrnují kvalitativní a kvantitativní analytické metody, které závisí na:

-
-

Základem elektrochemických metod jsou **oxidačně redukční procesy**.

Soustavu elektrod a roztoku/roztoků, v němž/v nichž jsou elektrody ponořeny, nazýváme **elektrochemický (galvanický) článek**. Příklad elektrického článku tvořeného zinkovou elektrodou ponořenou do roztoku zinečnatých iontů a měděnou elektrodou ponořenou do roztoku měďnatých iontů je znázorněn na Obr. 11.



Obr. 11: Příklad elektrochemického článku.

Která z elektrod bude anoda a která katoda, záleží na:

-
-

Je-li koncentrace zinečnatých a měďnatých iontů stejná, pak dle elektrochemické řady napětí kovů (což je seřazení kovů podle rostoucích hodnot tzv. standardních elektrodových potenciálů³) v takovémto článku:

1. <u>Měděná elektroda</u> bude:	katoda	/	anoda.
Budou k ní putovat:	kationty	/	anionty.
Počet elektronů bude:	nižší	/	vyšší.
Probíhat zde bude:	redukce	/	oxidace.
2. <u>Zinková elektroda</u> bude:	katoda	/	anoda.
Budou k ní putovat:	kationty	/	anionty.
Počet elektronů bude:	nižší	/	vyšší.
Probíhat zde bude:	redukce	/	oxidace.

2.1. Potenciometrie

Potenciometrie je metoda, která slouží k měření koncentrace určitého iontu v roztoku.

Elektrochemický článek je tvořen elektrodami:

-
-

Potenciometrie se nejčastěji používá na **měření pH**.

pH je:

³ Standardní elektrodový potenciál je potenciál článku tvořeného danou elektrodou v roztoku příslušných iontů o koncentraci 1 mol/l a standardní vodíkovou elektrodou, což je platinová elektroda pokrytá platinovou černí (platinou s velkým povrchem), ponořená do roztoku HCl o koncentraci 1 mol/l, do něhož se vhání proud molekulárního vodíku pod tlakem 1 atm (101 325 Pa). Na Pt elektrodě dochází k rozkladu molekulárního vodíku na atomární, ten s H⁺ ionty v roztoku tvoří oxidačně redukční pár.

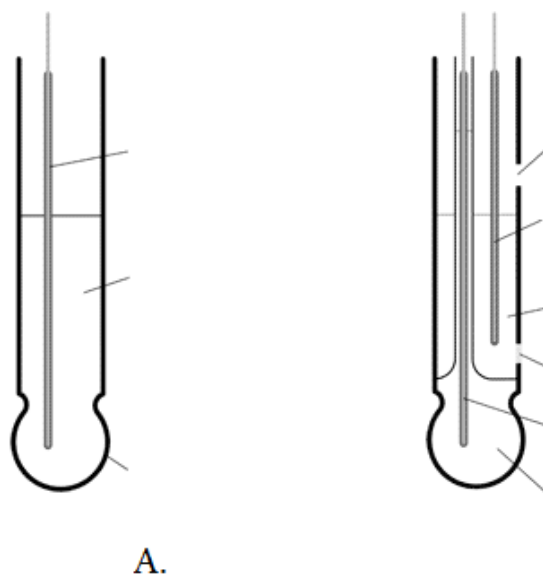
Tab. 3: Příklady iontů stanovitelných iontově selektivními elektrodami a materiálu použité membrány.

Membrána	Stanovovaný ion
sklo	H^+
PVC	Na^+
membrána s valinomycinem	K^+
monokrystal LaF_3	F^-
polykrystal AgI	I^-
polykrystal Ag_2S	Ag^+, S^{2-}
polykrystal $CuS + Ag_2S$	Cu^{2+}
polykrystal $PbS + Ag_2S$	Pb^{2+}
polykrystal $CdSe + Ag_2S$	Cd^{2+}

Při potenciometrickém měření pH:

- indikační elektrodou je nejčastěji **skleněná elektroda** (popište ji na Obr. 12 část A);
- se jako referentní elektroda používá tzv. **argentchloridová elektroda**.

Pro větší pohodlí uživatelů se v současné době vyrábějí již pouze tzv. **kombinované pH elektrody**, v nichž je indikační i referentní elektroda v jednom opláštění – viz Obr. 12 část B.



Obr. 12: Schéma skleněné elektrody (A) a schéma kombinované elektrody (B) – doplňte.

2.1.1. Potenciometrie – praktická úloha

Úkol: Nakalibrujte pH metr a stanovte pH vybraných vzorků.

Princip: Stanovení pH je založeno na měření rozdílu potenciálů referenční a měrné elektrody.

Činidla:

- Pufry o pH 4,0; pH 7,0; pH 10,0;
- destilovaná voda;
- vzorky k měření např. destilovaná voda, vodovodní voda, sérum.

Postup kalibrace pH metru:

1. Elektrodu vyndejte z ukládacího roztoku, opláchněte destilovanou vodou.
2. Elektrodu ponořte do roztoku pufru o pH 4,0 a na pH metru nastavte hodnotu uvedenou na lahvičce pufru.
3. Elektrodu nakalibrujte stejným postupem na pufr o pH 7,0 a pH 10,0.

Po každém kalibrování či měření elektrodu vždy opláchněte pomocí stříčky destilovanou vodou. (Elektroda nikdy nesmí být ponechána na suchu – mezi jednotlivými měřeními ji necháváme v ukládacím roztoku nebo v kádince s destilovanou vodou.)

Postup měření vybraných vzorků:

1. Elektrodu vyndejte z ukládacího roztoku, opláchněte destilovanou vodou.
2. Elektrodu ponořte do vzorku, počkejte na ustálení hodnoty pH metru, odečtěte hodnotu z displeje pH metru a zapište ji do protokolu.

2.2. Konduktometrie

Konduktometrie je měření elektrické vodivosti roztoku.

Elektrická vodivost je:

Elektrická vodivost pak závisí na:

-
-
-
-

Odpor kovového (pevného) vodiče je dán **Ohmovým zákonem** dle rovnice 12:

[12]

Odpor kovového vodiče závisí na materiálu vodiče (typu kovu) a na geometrických parametrech vodiče, tj. průřezu a délce, podle vztahu 13.

$$R = \rho \frac{l}{S}$$

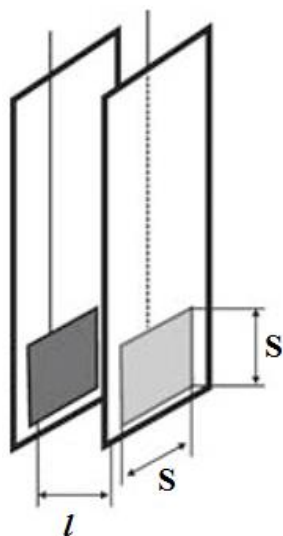
[13]

- ρ
- l
- S

Pro roztoky nepoužíváme veličinu odpor, ale převrácenou hodnotu odporu nazývanou **vodivost**. Pro vodivost lze použít jednotku Ω^{-1} (tedy $1/\Omega$), ale častěji se používá jednotka vodivosti **siemens (S)**.

Veličina $1/r$ je nazývána **měrná vodivost** (specifická vodivost, konduktivita) a značí se κ (kappa).

Při měření vodivosti je používána tzv. **vodivostní cela** znázorněna na Obr. 13.



Obr. 13: Schéma konduktometrické (vodivostní) cely.

Vztah pro závislost vodivosti roztoku na parametrech elektrod (jejich ploše a vzdálenosti) udává rovnice 14.

$$\frac{1}{R} = G = \kappa \frac{l}{S}$$

[14]

- R
- G
- κ
- l
- S

Poměr $\frac{l}{S}$ je pro danou vodivostní celu konstantní a nazývá se

Využití konduktometrie:

2.2.1. Konduktometrie – praktická úloha

Úkol: Porovnání vodivosti vodovodní vody a destilované vody.

Princip: Stanovení pH je založeno na měření rozdílu potenciálů referenční a měrné elektrody.

Činidla:

- Vodovodní voda;
- destilovaná voda.

Postup:

1. Konduktometrickou celu ponořte do kádinky (25 ml) zpoloviny naplněné vodovodní vodou.
2. Vodu vylijte, napusťte nový podíl a celu znovu na několik vteřin ponořte.
3. Toto zopakujte ještě jednou, odečtěte hodnotu na přístroji.
4. Znovu vypláchněte kádinku vodovodní vodou, ponořte celu a odečtěte hodnotu vodivosti. Je-li hodnota stejná jako u předchozího měření, můžete si ji zapsat. Pokud stejná není, opakujeme tak dlouho, až při dvou po sobě následujících měřeních dostaneme stejnou hodnotu.

Stejný postup použijte i pro destilovanou vodu.

2.3. Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se používá k dělení směsi látek v elektrickém poli.

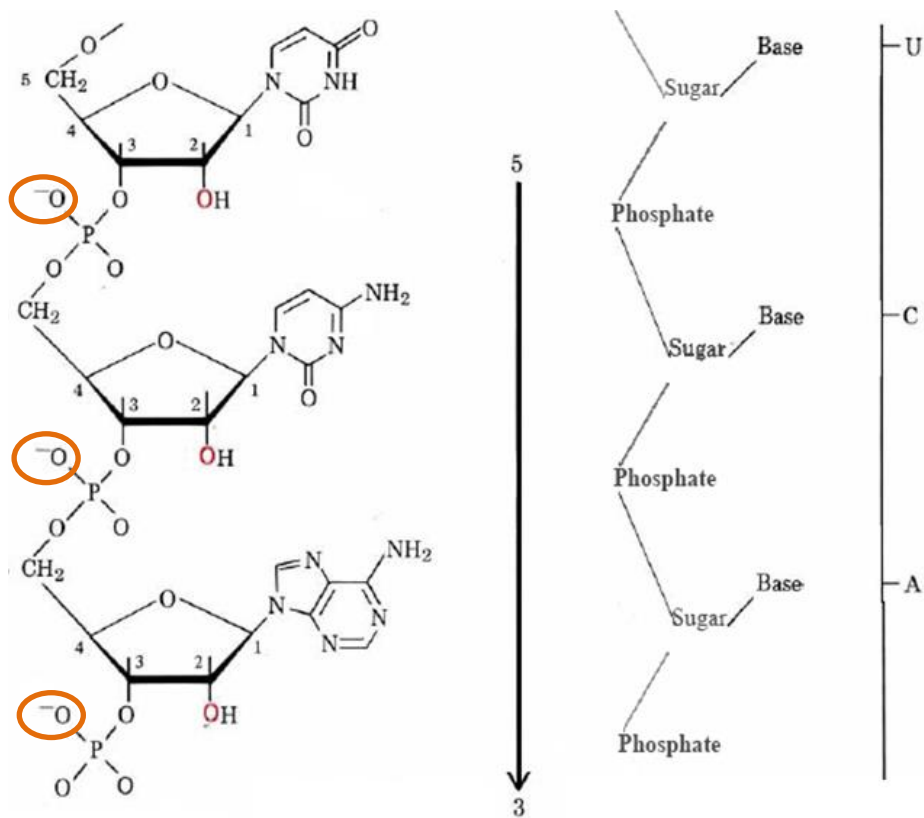
V medicínských aplikacích je nejčastěji používána k dělení:.....
.....

Aby se látky pohybovaly v elektrickém poli, musí Aby se pohybovaly v daném elektrickém poli jedním směrem (k jedné z elektrod), musí

Nukleové kyseliny jsou díky zbytkům kyseliny fosforečné nabity **záporně** (viz Obr. 14) a mohou se tedy v elektrickém poli pohybovat k anodě / katodě.

Rychlost pohybu závisí na:

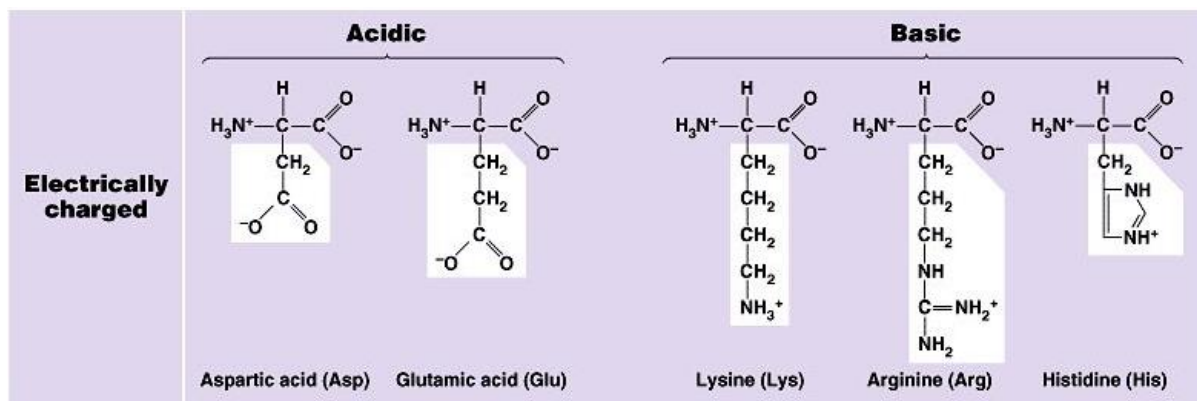
-
-



Obr. 14: Struktura nukleové kyseliny s vyznačenými zápornými náboji na zbytku kyseliny fosforečné.

Bílkoviny jsou tvořeny z Každá aminokyselina má jednu skupinu a jednu skupinu na alfa uhlíku od karboxylové skupiny. Tyto funkční skupiny při tvorbě bílkovinného řetězce reagují za vzniku, takže nemohou dodat bílkovinnému řetězci náboj.

Náboj bílkovinného řetězce může být způsoben pouze nabitými skupinami v postranních řetězcích aminokyselin – viz Obr. 15.

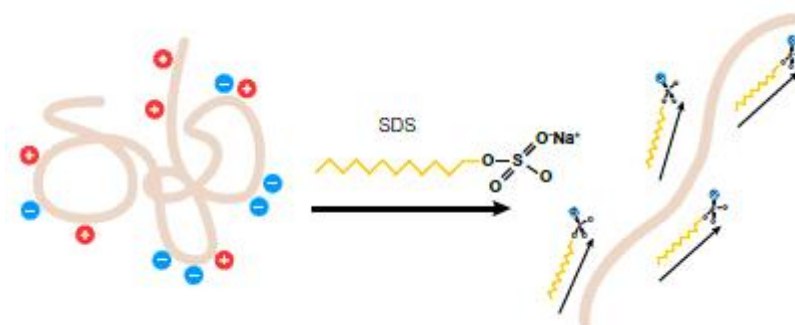


Obr. 15: Aminokyseliny nesoucí náboj v postranním řetězci.

Na čem tedy závisí výsledný čistý náboj?.....

Aby se bílkoviny při elektroforéze pohybovali jedním směrem (k jedné z elektrod), je potřeba bílkovinnému řetězci dodat **jednotný celkový náboj**. Toho se obvykle dosahuje pomocí navázání **dodecylsíranu sodného** (SDS = sodium dodecyl sulphate).

Při navázání SDS na bílkovinu dojde k **denaturaci** bílkovinné molekuly, jak znázorňuje Obr. 16.



Obr. 16: Schéma nespecifického navázání SDS na peptidický řetězec a následné denaturace molekuly bílkoviny.

Dělení při elektroforéze se provádí na gelu, který může být dvojího typu:

-
-

Uspořádání elektroforézy:

-
-

Elektroforeogram je:

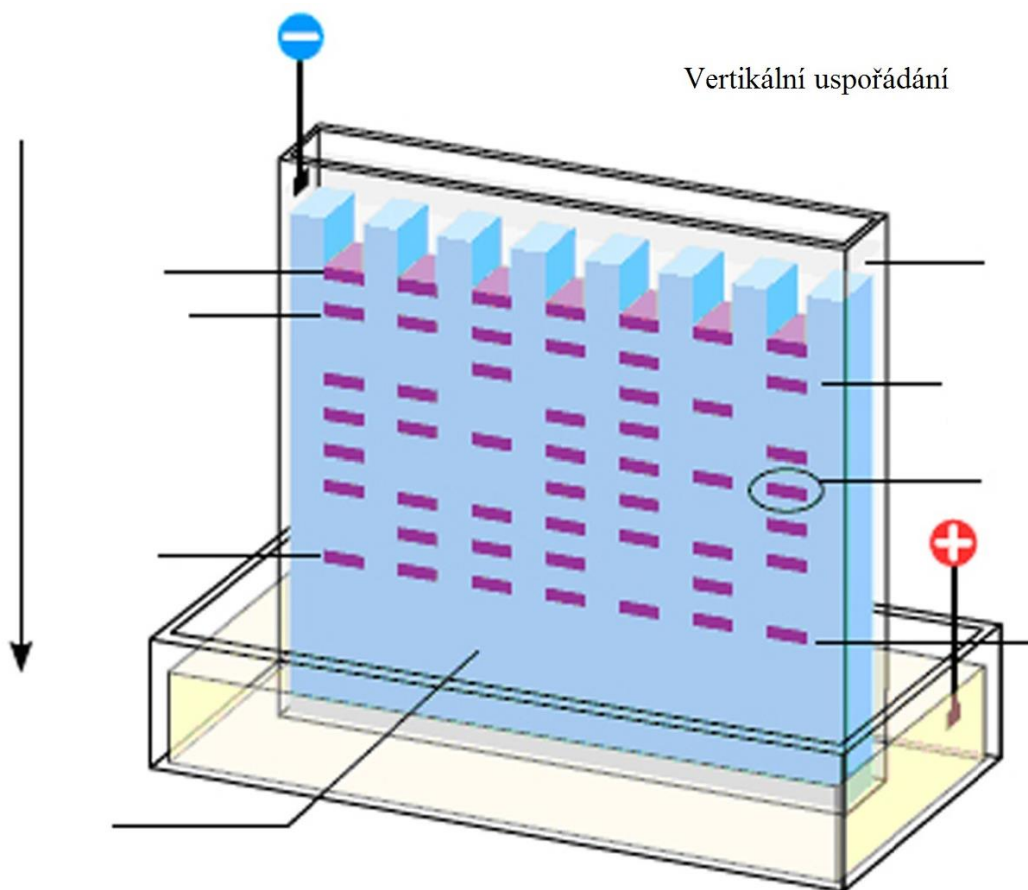
Protože ani bílkoviny ani nukleové kyseliny nejsou viditelné pouhým okem, je třeba použít k vizualizaci buď **UV záření** nebo častěji **barvení nespecifickým barvivem**, které se na dělené látky v gelu váže.

Pro nukleové kyseliny se k vizualizaci a barvení používá:

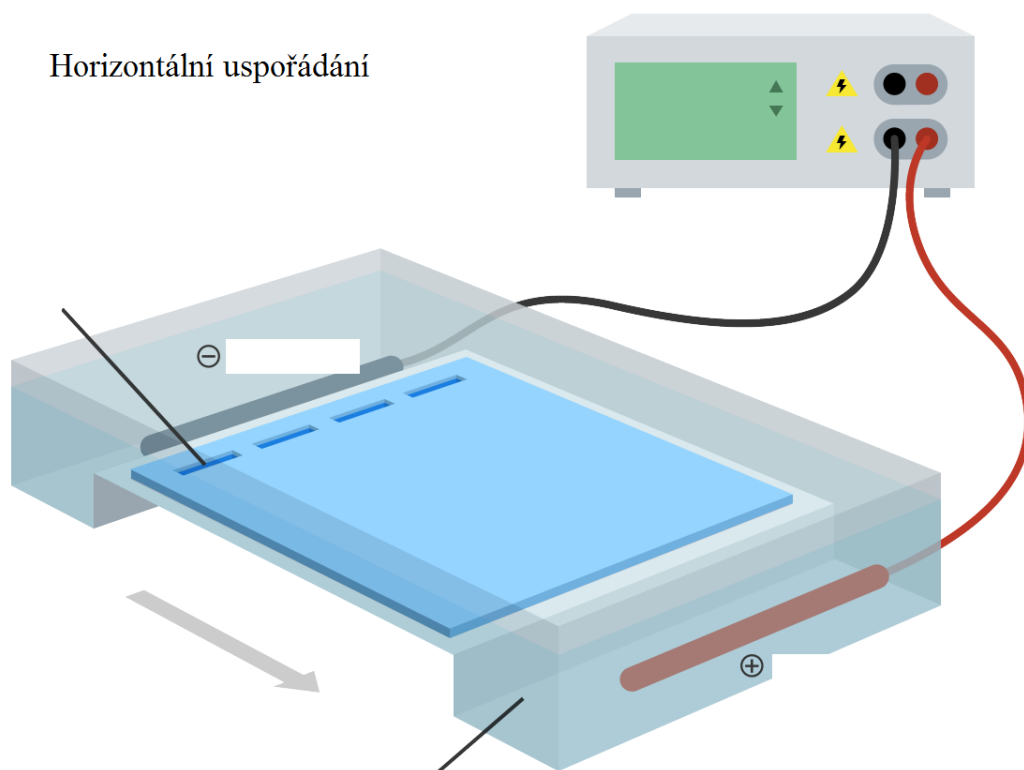
-
-

Bílkoviny se barví:

-
-



Horizontální uspořádání



Obr. 17: Uspořádání elektroforézy ve vertikálním směru – nahoře a v horizontálním směru – dole. Doplňtě.

2.3.2. Elektroforéza – praktická úloha

Úkol: Proved'te elektroforézu bílkovin krevního séra vzorku s použitím kitu firmy Sebia Hydragel Protein(e) K20 a návodu k němu poskytovaném.

Princip: Elektroforéza bílkovin krevního séra dělí vzorek na šest frakcí dle náboje při určitém pH.

Činidla:

- Kit Hydragel Protein(e) K20, výrobce Sebia;
- fixační roztok (smíchat 60 ml etanolu, 10 ml kyseliny octové a 30 ml destilované vody do uzavíratelné lahve);
- vzorek séra (20 ul zcentrifugovaného séra naředit 100 ul fyziologického roztoku, promíchat).

Postup:

1. Připravte pracovní roztoky dle návodu kitu – barvicí roztok a 2 odbarvovací roztoky do skleněných komor.
2. Pracovní roztok pufru na elektroforézu nalijte do elektroforetické vany – 150 ml do každé komory.
3. Nanesení vzorku: opatrně vyndejte agarózovou fólii ze zásobníku, položte na filtrační papír lícem nahoru, proužkem filtračního papíru jemně vysušte místa aplikace vzorku (u katody) a umístěte aplikační šablonu; následně naneste mikropipetou 5 ul vzorku do aplikačních míst šablony, nechte 5 min vsakovat a přebytek odsajte filtračním papírem; sundejte šablonu.
4. Elektroforetická separace: fólii nasad'te do vnitřních zářezů držáku lícem dolů, držák umístěte do elektroforetické vany (dodržet orientaci – vzorky na straně katody), nasad'te víko, připojte zdroj, na zdroji stejnosměrného napětí nastavte: napětí 70 V, proud nenastavujte, čas 30 min a spus'te elektroforézu. Po skončení separace vypněte zdroj, odpojte vanu, vyjměte fólii.

5. Vizualizace: Fólíi pinzetou vložte do fixačního roztoku na 15 min, vyndejte, nechte stéct roztok a dokonale vysušte fénem. Suchou a zchladlou fólii vložte do barvicího roztoku na 5 min, vyndejte, nechte stéct roztok a vložte do odbarvovacího roztoku na 2 min; zopakujte odbarvení, vysušte fénem.

6. Vizualně vyhodnoťte.

3. Chromatografické metody

Chromatografie je separační technika, při níž probíhá dělení složek vzorku mezi dvě fáze – fází stacionární a fází mobilní.

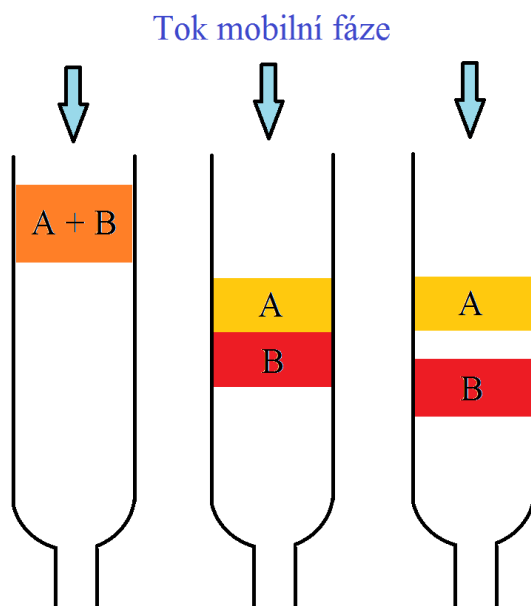
Fáze stacionární je: nepohyblivá / pohyblivá.

Je tvořena:

Fáze mobilní je: nepohyblivá / pohyblivá.

- Je-li mobilní fází **plyn**, používá se název
Často ve zkratce z anglického termínu *gas chromatography*.
- Je-li mobilní fází **kapalina** (rozpouštědlo, směs rozpouštědel nebo roztok pevné látky v rozpouštědle), používá se název.....
Často ve zkratce z anglického termínu *liquid chromatography*.

Popište s využitím Obr. 18 **princip chromatografického dělení**:



Obr. 18: Chromatografická kolona znázorňující dělení složek směsi A a B ve směru toku mobilní fáze.

V současné době se běžně setkáváme s metodou HPLC, což je **vysokoučinná kapalinová chromatografie** (high performance liquid chromatography).

Stacionární fází je obvykle pevná látka nebo gel, případně kapalina zakotvená na nosiči.

Chromatografické metody se dělí podle různých hledisek:

- podle způsobu provedení na:
- podle typu mobilní fáze na:
- podle principu dělení na:

3.1. Adsorpční chromatografie

V adsorpční chromatografii je stacionární fází **adsorbent**.

Charakteristika adsorbentu:

Z kolony se tak mobilní fází nejprve vymývají látky..... a poté

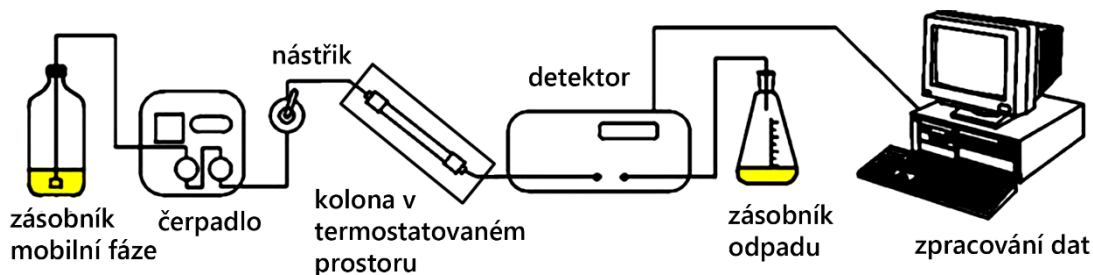
Adsorpční chromatografii lze jako jednu z mála použít ve dvou provedeních:

-
-

V kolonovém uspořádání se v současnosti adsorpční chromatografie používá jako metoda **HPLC** s kolonami s nejrůznějšími náplněmi. Velmi rozšířenou variantou jsou kolony s tzv. **reverzní fází** (RP-HPLC), kdy stacionární fáze má nepolární charakter a mobilní fáze je polární. Tato metoda je nejpoužívanější metodou HPLC v současné době.

Jako **mobilní fáze** se používá:

Gradientová eluce znamená:



Obr. 19: Schéma vysokoučinné kapalinové chromatografie.

Tenkovrstvá chromatografie je svým principem také adsorpční chromatografií. Označuje se **TLC** (z anglického termínu thin layer chromatography). Pro TLC chromatografii se používá tenká vrstva adsorbentu nanesená na skle nebo na hliníkové fólii.

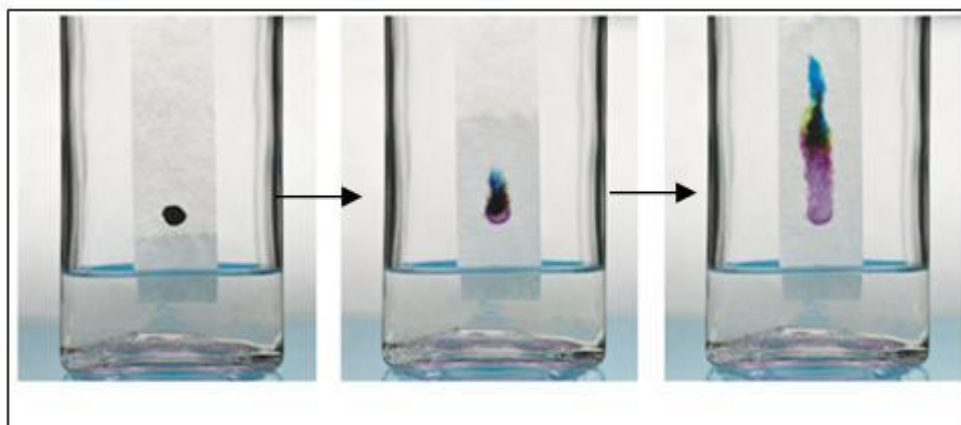
Jako adsorbent se používá:

Rozdělovací chromatografie je metoda založená na:

Stacionární fázi tvoří:

Mobilní fázi tvoří:

Při chromatografickém dělení na tenké vrstvě nebo na papíře mobilní fáze vzlíná kapilárními silami vzhůru (Obr. 20). Látky jsou tedy děleny podle:



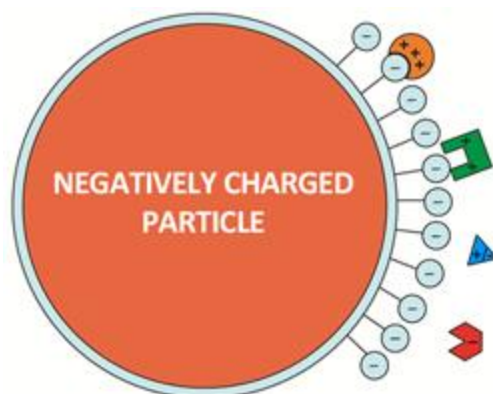
Obr. 20: Chromatografická komora s papírem.

Popiš provedení **vyhodnocení chromatogramu**:

3.2. Iontoměničová chromatografie – chromatografie na iontoměničích

Chromatografie na iontoměničích je založena na:.....

.....



Obr. 21: Síla interakce iontů s katexem v závislosti na velikosti náboje.

Stacionární fáze se dělí podle toho, zda jsou děleny kationty či anionty. Pro dělení kationtů se používají katexy, pro dělení aniontů anexy. Jsou to obvykle gely s navázanými nabitými skupinami.

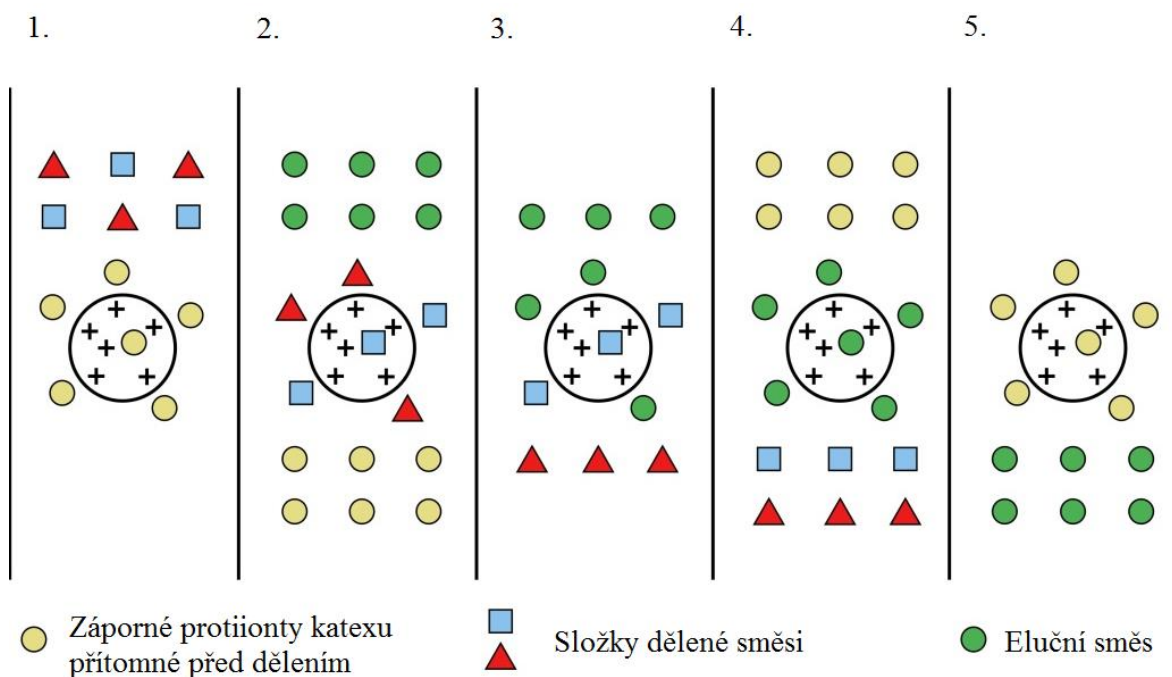
Katex:

vyměňuje:	vodíkové ionty	/	hydroxylové ionty,
za:	kationty	/	anionty.
Funkční skupina je nabitá:	kladně	/	záporně.
Charakter je:	kyselý	/	zásaditý.

Anex:

vyměňuje:	vodíkové ionty	/	hydroxylové ionty,
za:	kationty	/	anionty.
Funkční skupina je nabitá:	kladně	/	záporně.
Charakter je:	kyselý	/	zásaditý.

Kvůli elektroneutralitě musí být v roztoku kolem anexu protiionty s opačným nábojem, které jsou snadno vyměnitelné za jiné ionty v průběhu dělení. Postup chromatografického dělení na anexu si popište na Obr. 22.



Obr. 22: Dělení směsi aniontů na anexu.

Využití chromatografie na iontoměničích:

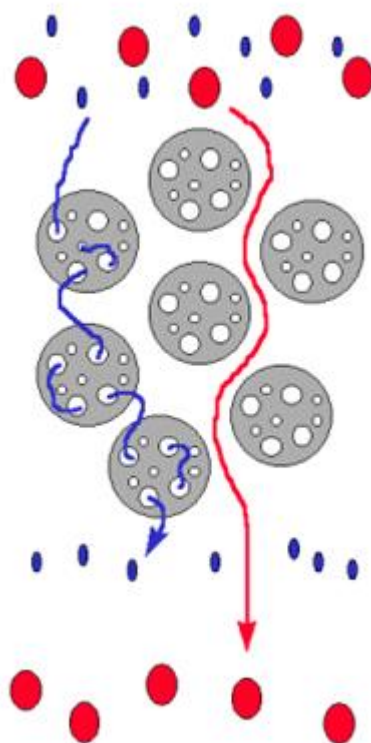
3.3. Gelová chromatografie

Pórovitá struktura gelu umožňuje dělení látek podle:

Jak ukazuje Obr. 23, velké molekuly gelové částice s póry obtékají a pohybují se tak kolonou **rychle**; čím menší částice, tím větší počet pórů, do kterých může zapadnout, a tím **větší zdržení v koloně**. Běžně užívaným gelem pro gelovou chromatografii je Sephadex.

Tab. 4: Typy gelu Sephadex pro gelovou chromatografii.

typ gelu	rozsah dělení (molekulová hmotnost)
Sephadex G-10	větší než 700
Sephadex G-25	větší než 1500
Sephadex G-30	větší než 30 000
Sephadex G-75	větší než 80 000



Obr. 23: Princip dělení gelové chromatografie.

Využití gelové chromatografie:

3.5. Chromatografie – praktická úloha

Úkol: Proved'te TLC chromatografii vzorků aminokyselin.

Princip: Podle rozdělovacích koeficientů aminokyselin dojde k jejich separaci na celulóзовé desce TLC pomocí vhodné mobilní fáze.

Činidla:

- Vyvíjecí směs (smíchat 35 ml n-butanolu, 35 ml acetonu, 10 ml kyseliny octové a 20 ml destilované vody);
- roztok ninhydrinu v n-butanolu a acetonu o koncentraci $c = 0,4 \text{ mol/l}$ (7,126 g ninhydrinu rozpustit ve 100 ml směsi n-butanolu a acetonu v poměru 1:1);
- vzorek aminokyselin;
- standardy aminokyselin.

Postup:

1. Naplňte vanu vyvíjecí směsí do výšky asi 1,5 cm ode dna a nechte nasytit po dobu 1 hodiny.
2. Nanesení vzorků: na TLC desce vyznačte tužkou start a čelo tak, aby byl start nad hladinou vyvíjecí směsi. Vzorky naneste mikropipetou o objemu 5 ul v bodech, dokonale vysušte a vložte do vyvíjecí komory.
3. Vyvíjení ukončete až směs dosáhne čela, vysušte v termostatu při 80 °C.
4. Do vyvíjecí směsi přidejte roztok ninhydrinu v n-butanolu a acetonu a vyvíjení opakujte, vysušte.
5. Vyhodnoťte polohu skvrn se stejně zpracovanými standardy.

Závěr

Teoretické znalosti předmětu VLM obsažené v první části práce jsou výchozím stupněm pro zhotovený pracovní sešit, který je připojen jako druhá část a pokrývají nezbytnou úroveň nutnou k výkonu práce v laboratoři na úrovni Laboratorního asistenta.

V praxi učitele předmětu VLM se ukazuje, že velkým úskalím je vybrání klíčových znalostí v takovém rozsahu, aby bylo umožněno dostatečné pochopení principů a jevů spojených s jednotlivými metodami a nedošlo přitom k zahlcení žáka nadbytečnými informacemi. Toto bylo zohledňováno při zpracování sešitu, jelikož základní znalosti chemie a fyziky, ze kterých by se mělo při vyučování VLM vycházet, nejsou vždy optimální.

Práce může být rozšířena o metody nové, neuvedené ve školním vzdělávacím programu v roce vzniku práce, jako je například hmotnostní spektrometrie či průtoková cytometrie.