

# **Chemie a biochemie**

## **Teorie k praktickým cvičením**

**1. ročník, zubní lékařství**

**ZIMNÍ SEMESTR**

**2021/2022**



**Ústav lékařské chemie a biochemie**

**Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova**

## OBSAH

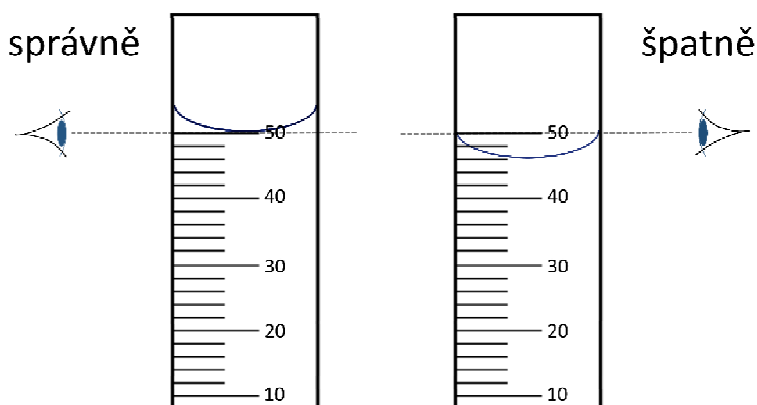
<u>Základní dovednosti potřebné pro práci v laboratoři</u>	strana 3
- Odměrování objemů	
- Vážení	
- Centrifugace (odstředování)	
- Filtrace	
- Grafické vyhodnocování experimentálních dat	
<u>Osmóza, osmotický tlak, osmolalita</u>	strana 11
- Stanovení osmolality na principu kryoskopického efektu	
<u>Odměrná analýza</u>	strana 14
- Neutralizační titrace	
- Komplexotvorné titrace	
<u>Chromatografie</u>	strana 21
- Základní rozdělení chromatografických metod	
- A) podle způsobu provedení	
- B) podle skupenství fází	
- C) podle fyzikálně-chemického principu dělení	
- Vyhodnocení chromatografických metod	
<u>Acidobazické rovnováhy</u>	strana 28
- Vodíkový exponent (pH)	
- Výpočet pH roztoků silných kyselin a hydroxidů	
- Výpočet pH roztoků slabých kyselin a hydroxidů	
<u>Měření pH</u>	strana 31
- Kolorimetrické měření pH	
- Potenciometrie	
- Potenciometrické měření pH	
<u>Tlumivé soustavy</u>	strana 40
- Henderson-Hasselbalchova rovnice	
- Funkce tlumivých soustav	
<u>Optické metody</u>	strana 44
- Vlastnosti elektromagnetického záření	
- Absorpce a emise záření, barevnost látek	
- Interference	
- Difrakce (ohyb)	
- Fotoelektrický jev	
- Absorpční spektroskopie	
- Stanovení koncentrace	
- Plamenová fotometrie	
<u>Enzymologie</u>	strana 60
- Obecné vlastnosti enzymů	
- Kinetika enzymové reakce	
- Inhibice enzymových reakcí	
- Enzymová aktivita séra	
- Stanovení enzymové aktivity a její vyjadřování	
- Názvosloví a klinický význam rutinně vyšetřovaných enzymů	

# Základní dovednosti potřebné pro práci v laboratoři

## Odměrování objemů

V laboratořích k odměrování objemů kapalin slouží odměrné sklo. Každé odměrné sklo má rysku, vyznačující objem. Existují 2 typy kalibrace odměrného skla - na dolítí (označeno D / In) a na vylití (označeno V / Ex). Protože kapaliny vykazují teplotní roztažnost, je proto na odměrném skle vyznačena také teplota, pro niž je kalibrace provedena.

Při odečítání objemu je nutno brát v úvahu fakt, že kapaliny v závislosti na svém povrchovém napětí smáčí stěny nádoby, hladina není rovná, ale vytváří tzv. meniskus. Objem měříme tak, že dolní okraj menisku se dotýká rysky. Pro odměrování objemů v řádu desítek mililitrů až litrů používáme odměrné válce, pro odměrování menších objemů jsou vhodnější pipety. K velmi přesnému odměrování nejmenších objemů, v řádu mikrolitrů, se používají automatické pipety.



*Správné odečítání objemu kapaliny*

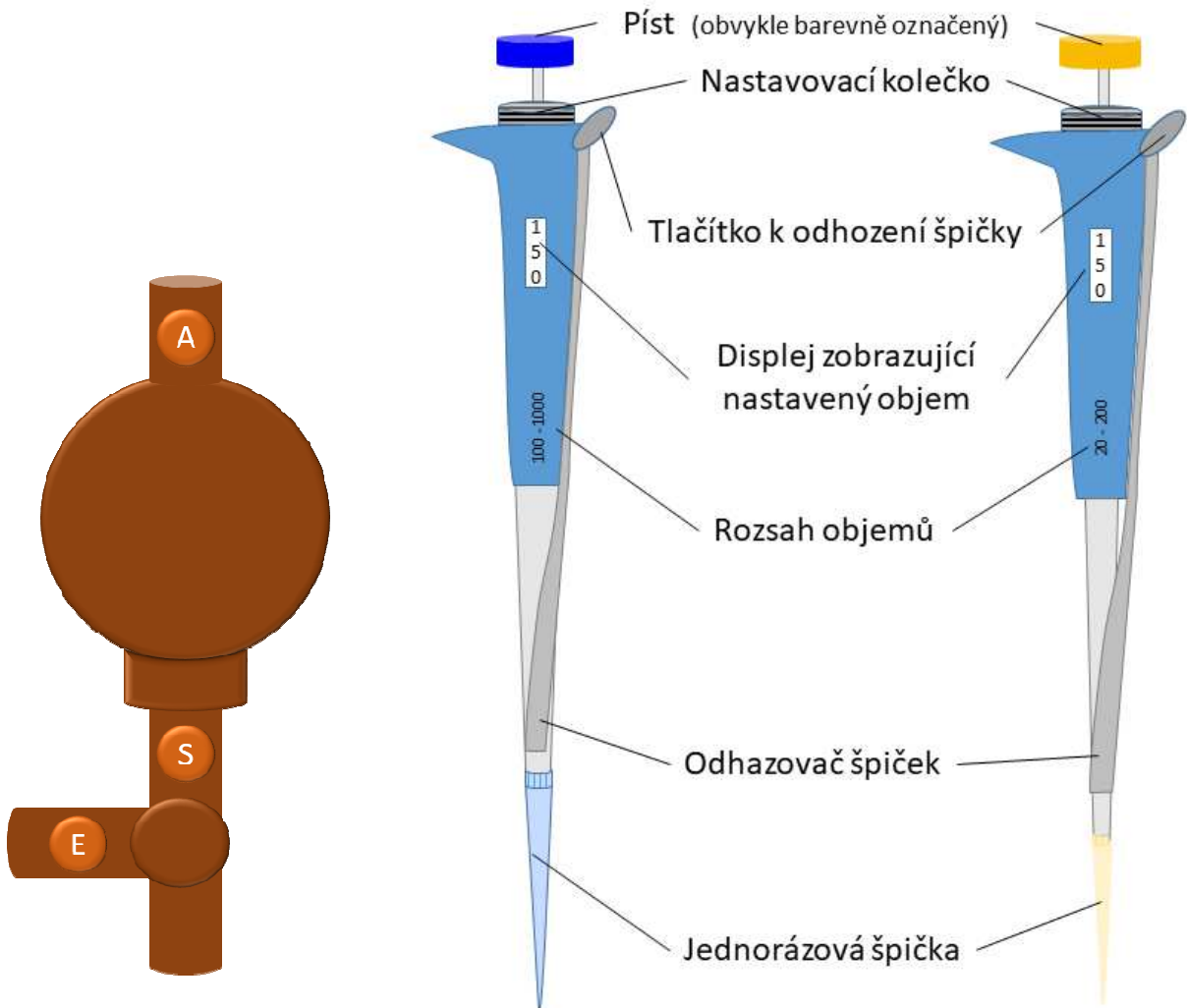
Příkladem odměrného skla kalibrovaného na dolítí je **odměrná baňka**. Odměrné baňky se používají při přípravě roztoků přesné koncentrace. Jedná se o baňku s dlouhým úzkým hrdlem opatřeným ryskou.

Typickým zástupcem odměrného skla kalibrovaného na vylití jsou **pipety**. Při jejich kalibraci je počítáno s ulpěním roztoku na stěnách nebo s jeho zadržením kapilárními silami. Pipety se vyrábějí v různých velikostech. Jsou buď jednorázové, určené k měření jednoho objemu (např. na objem 1, 2, 5, 10 nebo 25 ml) nebo dělené (stupnice dělí udané objemy na menší jednotky). Velikost pipety a její dělení je na ní uvedeno. Např. označení 2 IN 1/50 ml znamená: celkový objem pipety je 2 ml, 1 dílek = 1/50 ml. Dále je uvedena i teplota, při níž má být objem měřen (20°C). Odečítá se poloha dolního menisku kapaliny při poloze pipety ve výšce oka.

Dříve se neškodné roztoky nasávaly do pipety ústy. Dnes je to z důvodu bezpečnosti zakázáno. Používají se speciální nástavce či pipetovací balónky. Nasáváme roztok 2 – 3 cm nad rysku, pak opatrně upouštíme na požadovaný objem.

### **Pipetování s balonkem:**

Stiskem ventilu "A" (*air*) se vytlačí vzduch a balonek se nasadí na horní konec pipety. Pak se pipeta ponoří do roztoku a stiskem ventilu "S" (*suction*) se nasaje roztok po potřebnou značku. Přesná hodnota se upraví ventilem "E" (*empty*), pipeta se přenesse do nádobky, kam potřebujeme roztok přenést a stiskem "E" se obsah vypustí.



*Pipetovací balónek*

*Schéma automatické pipety*

Pro velmi malé objemy se používají **mechanické dávkovací pipety** (často označované jako „automatické pipety“). Vyrábí se pipety s fixním objemem (jednoobjemové) nebo s nastavitelným objemem (rozsah uveden na pístovém tlačítku). Skládají se z vlastního dávkovače a vyměnitelné plastové špičky na jedno použití. Píst se ovládá palcem. Objem je na pipetě uveden v mikrolitrech (např. 100, 200, 500, 1000 apod.). Špičky jsou vyráběny z chemicky i mechanicky odolného nesmáčivého plastu, a to ve čtyřech základních objemových typech – bílý (0,2 – 10  $\mu\text{l}$ ), žlutý (10 – 250  $\mu\text{l}$ ), modrý (200 – 1000  $\mu\text{l}$ ) a velký bílý (5000  $\mu\text{l}$  a 10 000  $\mu\text{l}$ ). Barva špičky většinou odpovídá barvě na pístovém tlačítku.

### Práce s automatickou pipetou:

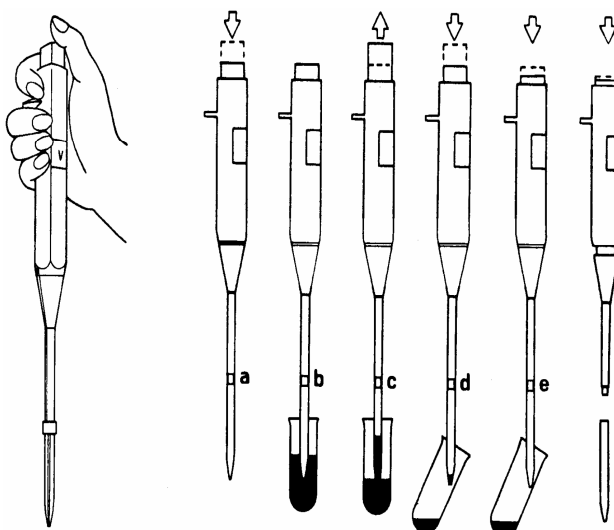
- Podle požadovaného objemu pipetovaného roztoku zvolíte příslušnou pipetu: fixní pipetu s daným objemem nebo nastavitelnou pipetu s vhodným rozsahem (uveden na tlačítku pístu pipety).
- U nastavitelné pipety nastavíte požadovaný objem na stupnici otáčením šroubu:

Údaj na pístu:	2 / 20	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 2 $\mu$ l	0	2	0	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 15 $\mu$ l	1	5	0	<table border="1"><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 20 $\mu$ l	2	0	0
0													
2													
0													
1													
5													
0													
2													
0													
0													
Minimální objem:	2 $\mu$ l												
Maximální objem:	20 $\mu$ l												

Údaj na pístu:	20 / 200	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 20 $\mu$ l	0	2	0	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 150 $\mu$ l	1	5	0	<table border="1"><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 200 $\mu$ l	2	0	0
0													
2													
0													
1													
5													
0													
2													
0													
0													
Minimální objem:	20 $\mu$ l												
Maximální objem:	200 $\mu$ l												

Údaj na pístu:	200 / 1000	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 200 $\mu$ l	0	2	0	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>5</td></tr></table> 550 $\mu$ l	0	5	5	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 1000 $\mu$ l	1	0	0
0													
2													
0													
0													
5													
5													
1													
0													
0													
Minimální objem:	200 $\mu$ l												
Maximální objem:	1000 $\mu$ l												

- Před pipetováním nasadíte na pipetu vhodnou špičku (barva odpovídá barvě na pístovém tlačítku).
- Při pipetování stlačíte pístové tlačítko k první zarážce, ponoříte pipetu do roztoku a pomalým uvolňováním pístového tlačítka nasajete roztok do špičky. Po přenesení do příslušné nádoby obsah špičky vypustíte stlačením pístového tlačítka do druhé polohy. Roztok se pipetuje na dno nádoby, přičemž špička nesmí být při vypouštění v roztoku ponořená. Pipetu je nutno držet ve svislé poloze špičkou dolů po celou dobu manipulace!
- Po pipetování odstraníte špičku stlačením pístového tlačítka do třetí polohy a odložíte ji svisle do stojánku.
- Pro pipetování nového roztoku použijete vždy novou špičku.



*Držení a práce s mechanickou dávkovací pipetou*

## Vážení

Váženou látku nikdy nesypte přímo na misku vah!!! Vždy je nutné použít vhodnou nádobku (váženku, kádinku, hodinové sklo...), případně čtverec papíru s hladkým povrchem, celofánu nebo alobalu. V případě rozsypaní navažované látky je nutné váhy ihned očistit.

Budete pracovat s digitálními váhami, které umožňují nastavit nulovou hmotnost tzv. tárování. Váženku umístíte na plochu vah a stisknete tlačítko „TARE“. Tím se překalibruje nulová hmotnost a lze navažovat bez nutnosti odečítat hmotnost váženky.

Váživost = maximální hmotnost, kterou lze na vahách zvážit

Citlivost = přesnost vah

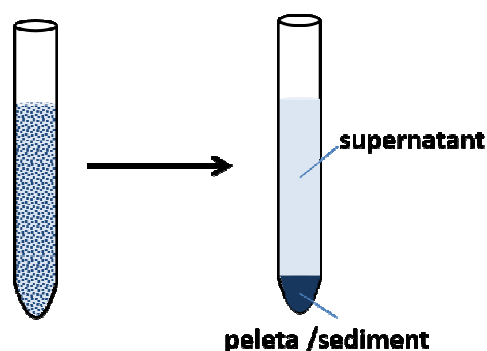
## Centrifugace (odstředování)

Centrifugace (odstředování) je separační metoda oddělující složky ze suspenze na základě rozdílných hustot pomocí odstředivé síly. Působením odstředivé síly se urychlí sedimentace jednotlivých složek. V biochemické laboratoři se využívá např. k odstranění krvinek při přípravě plazmy nebo séra, k odstranění sraženiny z roztoku nebo k zakoncentrování částic z tělních tekutin pro mikroskopické stanovení.

Podmínky centrifugace se vyjadřují dvěma způsoby:

- relativním odstředivým zrychlením (=RCF), které udává, kolikrát je odstředivé zrychlení větší než zemské gravitační zrychlení  $g$
- pomocí počtu otáček za minutu (RPM = revolutions per minute)

a dále dobou, po kterou centrifugace probíhá.



*Výsledek centrifugace*

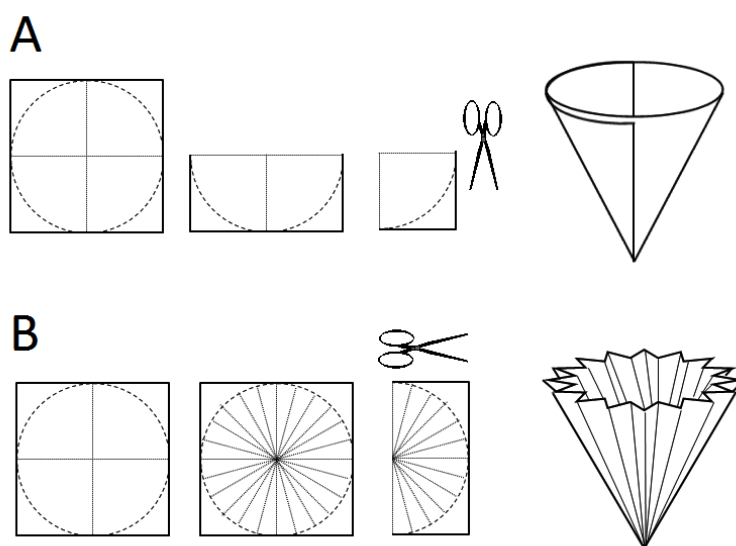
## Filtrace

Filtrace je separační metoda, která umožňuje oddělení pevné látky od kapaliny či plynu. Využívá filtrační přepážky vyrobené z různých materiálů - filtrační papíry s různou velikostí pórů, pórovitá skleněná nebo porcelánová fritra (speciální filtrační zařízení), skelná vata, textilní filtry, pískové filtry atd. Filtrovaná směs se nalije na filtr. Částice, které jsou menší než póry, filtrem procházejí a dostávají se do filtrátu, zatímco větší částice zůstanou na povrchu filtru a vytvoří tzv. filtrační koláč. Filtrační materiál je určován chemickým charakterem filtrovaného roztoku. Rychlost filtrace závisí na ploše a vlastnostech filtračního prostředí, na počtu a velikosti pórů, na tlaku a teplotě při filtraci, na povaze sraženiny i na viskozitě filtrované kapaliny.

Nejběžnějším materiálem pro laboratorní filtraci je filtrační papír. Vyrábí se z vláken celulózy a podle volby vláken lze připravit papír s různou velikostí pórů. Největší póry má měkký papír, zatímco nejmenší póry má tvrdý filtrační papír. Nejčastěji se využívá středně tvrdý papír se středními póry, který dokáže zachytit většinu sraženin a nečistot. Filtrační papír se nehodí pro filtraci silně kyselých nebo zásaditých látek ani silných oxidačních činidel. Pro filtraci těchto látek je vhodné použít pórovitou skleněnou nebo porcelánovou fritu.

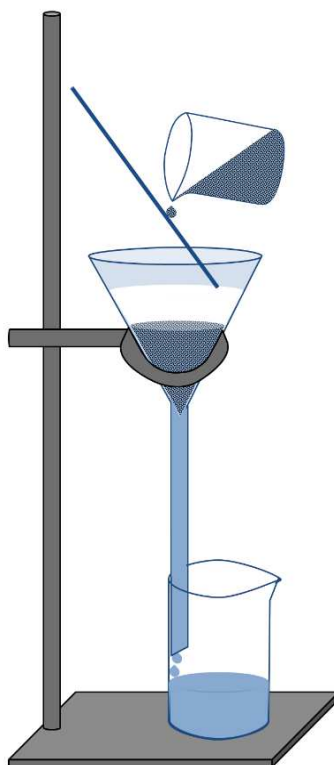
Podle filtračního tlaku se postupy dělí na filtraci za atmosférického tlaku, podtlakovou a přetlakovou filtraci. Nejjednodušším typem je prostá filtrace prováděná za atmosférického tlaku. Základní pomůckou při tomto typu filtrace je filtrační nálevka, do níž se vkládá vhodně složený papírový filtr. V některých jednoduchých případech lze jako filtr použít chomáček vaty. Filtrace přes vatu je vhodná u těkavých látek, které by se na velké ploše filtru odpařovaly.

Filtrační nálevka (hladká nebo žebrovaná) s dlouhým stonkem se umístí do filtračního kruhu tak, aby se stonek dotýkal stěny nádoby na zachycení filtrátu. Velikost filtru je nutné přizpůsobit velikosti nálevky - filtr by měl dosahovat cca 0,5 cm pod okraj nálevky. Používají se dva typy papírového filtru - hladký nebo skládaný (tzv. francouzský). Jejich přípravu ukazuje obrázek.



*Schéma přípravy hladkého filtru (A)  
a skládaného filtru (B)*

Hladký filtr se zhotovuje ze čtverce filtračního papíru, který se přeloží na polovinu a dále na čtvrtinu. Nůžkami se zastříhnou volné rohy dokulata. Jedna vrstva přeloženého papíru se odtáhne od ostatních a vzniká kuželový filtr. Ten se před umístěním do nálevky navlhčí, aby filtr dobře přilnul k jejím stěnám, a tím byla filtrace urychlena pomocí kapilárních sil mezi povrchem papíru a sklem nálevky. Tento filtr totiž filtruje pouze špičkou a poměrně pomalu. Filtr nikdy nenavlhčujeme, pokud filtrujeme organické s vodou nemísitelné roztoky nebo slouží-li filtrace pro analytické účely. Rychleji než hladký filtr pracuje filtr skládaný. Opírá se totiž o stěny nálevky jen hranami, a proto filtruje téměř celou svou plochou. Skládané filtry jsou dostupné hotové nebo se skládají z kruhové výseče, která je vějířovitě překládána směrem od středu k obvodu. Při skládání francouzského filtru je nutno dbát, aby při několikerém překládání nedošlo k poškození filtru ve špičce. Skládaný filtr se vkládá jen do hladké nálevky. Při filtraci se nalévá filtrovaná směs na filtr opatrně po skleněné tyčince (viz obrázek), aby se papír nepoškodil. V žádném případě se jej tyčinkou nedotýkáme, vlhký filtrační papír je totiž velmi málo mechanicky odolný a hrozí jeho protržení. Proud kapaliny je třeba směřovat proti místu, kde je papírová vrstva trojitá. Filtr se plní vždy několik milimetrů pod okraj.



*Schéma filtrace za atmosférického tlaku*



## Grafické vyhodnocování experimentálních dat

V analytických metodách, v nichž jsou sledovány různé fyzikálně-chemické veličiny a vztahy mezi nimi, se často používá grafické zobrazení sledované závislosti.

Tyto grafy se používají:

- k ověření platnosti sledované zákonitosti v daných podmínkách
- k posouzení přesnosti zvolené metody
- jako kalibrační křivka pro sériová měření
- k numerickému vyhodnocení hledané veličiny

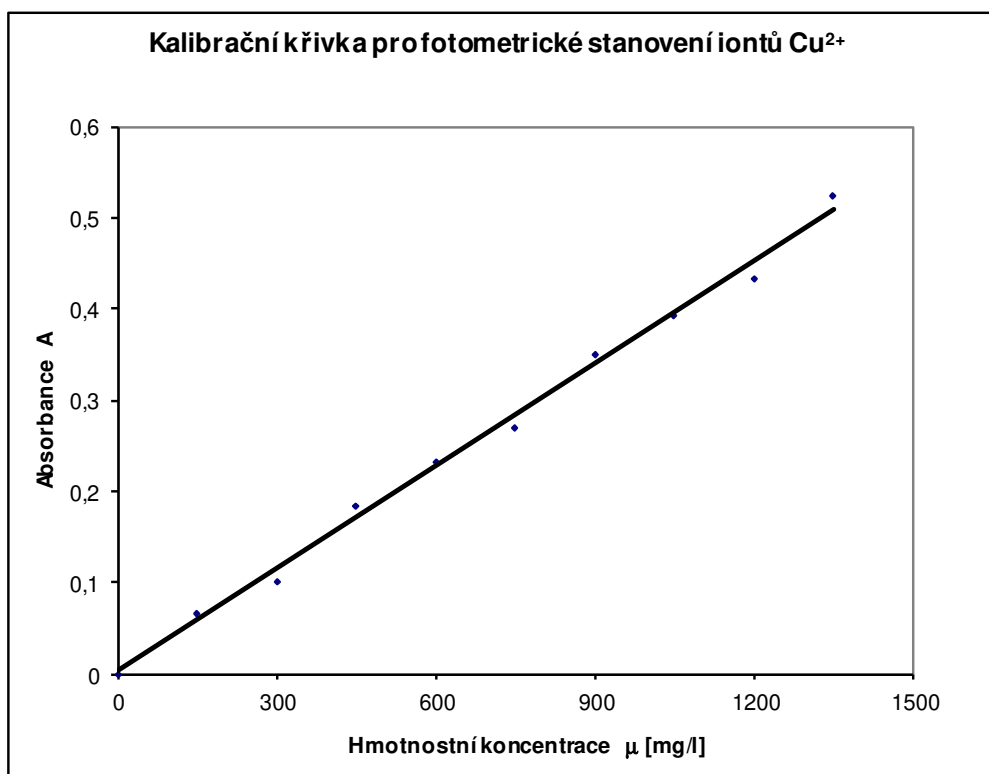
Grafy se rýsují na rastrovaný papír nejčastěji s milimetrovým dělením. Sledujeme-li průběh spojitě funkce  $y = f(x)$ , pak se **nezávisle proměnná** veličina nanáší na **osu x**. U této veličiny lze zvolit a podle vlastního uvážení měnit měřené intervaly (např. čas, vlnová délka, koncentrace apod.). **Závisle proměnná** veličina se nanáší na **osu y**. Tuto veličinu v průběhu měření odečítáme na škále přístroje nebo jiného kalibrovaného zařízení (např. byrety) nebo ji z naměřených hodnot vypočítáme (např. absorbance, napětí, objem titračního roztoku, rychlost apod.).

Na každé ose se označí nanášená veličina pomocí dohodnutého, běžně používaného symbolu a rovněž jednotka, v níž je veličina udávána. Úsek na ose se rozdělí na vhodný počet celistvých dílků v maximálním rozsahu volených či měřených veličin. Měřítka se volí tak, aby výsledný graf bylo možno narýsovat do plochy přibližného čtverce. Je-li sledovaná závislost lineární, pak by měla výsledná přímka svírat s osou x úhel přibližně  $45^\circ$ .

Jednotlivé experimentálně nalezené body se v grafu označí pomocí křížků nebo malých kroužků s vyznačeným středem. Jimi se pak proloží ideální křivka tak, aby většina bodů ležela na ní, případně stejný počet nad ní a pod ní. Touto grafickou metodou je možno do jisté míry eliminovat odchylky způsobené subjektivními vlivy. Kalibrační křivku je možno rýsovat jen v oblasti měřených hodnot, tzn. že křivka začíná první a končí poslední změřenou hodnotou a nemá být prodlužována do oblasti, která nebyla experimentálně prověřena. Ke grafu se obvykle připojují i základní údaje o podmínkách měření a datum, případně i jméno pracovníka.

Někdy je vhodné sledovat průběh funkce v její první derivaci, kterou získáme tzv. metodou přírůstků hodnot. V těchto případech se na osu y nanášejí hodnoty  $y_1 - y_0 / x_1 - x_0$ ,  $y_2 - y_1 / x_2 - x_1$ ,  $y_3 - y_2 / x_3 - x_2$ , ... proti hodnotám  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ , ... na ose x. Jindy je vhodná metoda logaritmická, při níž se nanáší jedna nebo obě veličiny v logaritmické stupnici. Pro tyto účely se vyrábějí rastrované semilogaritmické nebo logaritmické papíry. Derivační a logaritmické křivky se používají u složitějších závislostí, jejichž průběh se touto úpravou linearizuje.

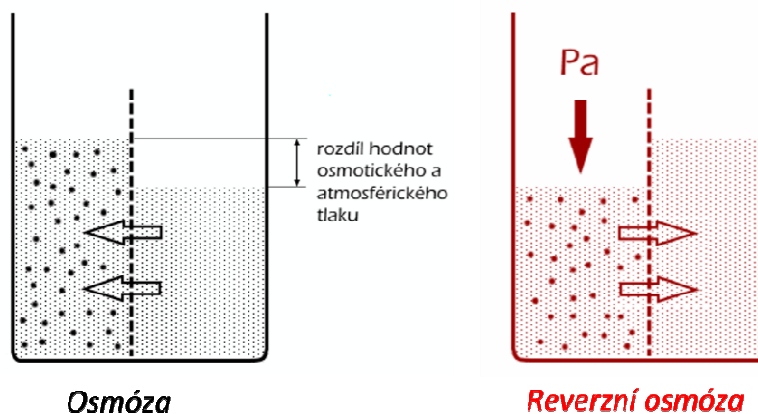
Pečlivému sestrojení grafu je třeba věnovat stejnou pozornost jako vlastnímu experimentu. Při nedbalém provedení mohou být všechny předchozí výsledky experimentu znehodnoceny. Na druhé straně nepřesnosti v práci se odrazí velkým rozptylem bodů kolem ideální křivky. V takových případech je nezbytné odhalit zdroj chyb a pokus zopakovat.



*Příklad grafického zobrazení dat*

## Osmóza, osmotický tlak, osmolalita

Jsou-li dva roztoky, o rozdílných koncentracích rozpuštěných látek, od sebe odděleny membránou propustnou pouze pro molekuly rozpouštědla, dochází k tomu, že část rozpouštědla přejde z místa s nižší koncentrací do místa koncentrace vyšší. Tak se rozdíl koncentrací na obou stranách membrány vyrovná. Tento jev se nazývá **osmóza**. V biologických soustavách má zásadní význam při transportu vody mezi buňkou a extracelulární tekutinou i naopak.



Osmózu lze kvantifikovat pomocí tlaku, který je nutno vyvinout na koncentrovanější roztok, aby se zabránilo osmóze, nebo naopak podtlaku, vyvinutém na straně roztoku méně koncentrovaného. Mechanismus vzniku osmotického tlaku není zatím zcela jasný. Není však vyvolán přímo rozpuštěnou látkou, ale snížením aktivity rozpouštědla vlivem látek v něm rozpuštěných.

Velikost osmotického tlaku závisí na počtu částic rozpuštěných v roztoku, přičemž nezávisí na jejich druhu, velikosti, případně náboji. Pro vyjádření osmotických poměrů v roztoku se užívá pojmu **osmolalita**; druh koncentrace nezávislý na teplotě a na vlastnostech rozpuštěných látek. Osmolalita tudíž vyjadřuje celkové **látkové množství všech osmoticky aktivních částic**, přítomných v jednotkové hmotnosti rozpouštědla ( mol/kg, resp. mmol/kg, dříve označení Osmol/kg, resp. mOsmol/kg).

1 mol látky v 1 kg vody představuje roztok s osmolalitou:

glukosa	1 mol/kg
NaCl (při 100% disociaci)	2 mol/kg
NaCl (při 86% disociaci v krevní plasmě)	1,86 mol/kg
AgCl (nerozpustný ve vodě)	0 mol/kg

Osmolalitě 1 mol/kg odpovídá osmotický tlak 2,7 MPa. Velikost osmotického tlaku jednotlivých oddílů biologických systémů (a roztoků, které se do nich aplikují), se vztahuje ke „standardu“, jímž je v lidské fyziologii krevní plasma.

K obecnému vyjádření rozdílů osmotických tlaků na rozhraní se používá termínu **tonicita**. Roztok, který má stejný osmotický tlak jako plasma, se označuje jako **izotonický**. Roztok s nižším osmotickým tlakem jako **hypotonický** a naopak s osmotickým tlakem vyšším jako **hypertonický**.

U biomembrán jsou osmotické procesy složitě ovlivňovány výběrovými transportními mechanismy. Některé z látek sice prostupují volně, jiné jsou však přenášeny aktivním transportem, symportem či antiportem, atd.

Osmotické poměry v plasmě a v moči jsou (s dalšími parametry) významným diagnostickým ukazatelem. Fyziologická osmolalita plasmy se pohybuje okolo  $285 \pm 10$  mmol/kg vody, čemuž odpovídá osmotický tlak 0,78 MPa.

Osmotický tlak připadající na bílkoviny plasmy se nazývá **onkotický tlak** a činí cca 0,3 % celkového. Osmolalita moči se pohybuje v podstatně širším rozmezí (50 – 1400 mmol/kg vody). Rozdíl možných osmolalit v hodnotě dvou řádů, dokládá klíčovou úlohu ledvin při udržování homeostatických poměrů v organismu.

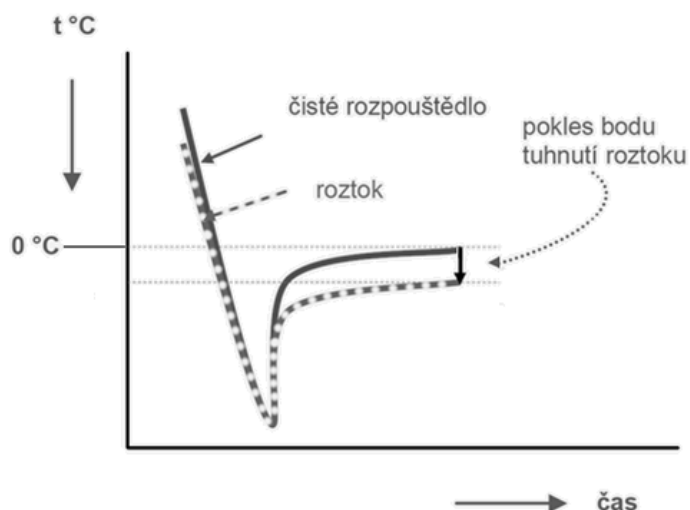
V technologii úpravy vody se využívá **reverzní osmózy**. Při tomto ději se působí tlakem na roztok, ze kterého přes polopropustnou membránu projde pouze rozpouštědlo; v tomto případě „čistá“ voda. Jde vlastně o opak prosté osmózy. Tímto způsobem je možno nahradit destilaci a získat deionizovanou vodu.

Osmoticky aktivní látky v roztoku mění tzv. koligativní vlastnosti (vlastnosti závislé pouze na počtu částic) oproti vlastnostem čistého rozpouštědla. Jde např. o snížení tenze par nad roztokem, zvýšení bodu varu roztoku (ebulioskopický efekt), snížení bodu tuhnutí (kryoskopický efekt).

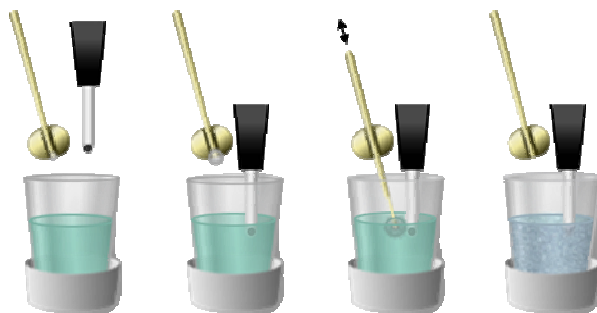
## Stanovení osmolality na principu kryoskopického efektu

V současné době je většina osmometrů založena na principu měření kryoskopického efektu. Jeho pojmenování pochází od starořeckých slov *kryos*, znamená ‚led, mráz, zima‘, ale také hrůza a *skopeo*, které znamená ‚pozoruji‘. Kryoskopický efekt popsal francouzský fyzikální chemik **François-Marie Raoult** (1830 –1901), který se zabýval studiem, vícesložkových soustav. Podle třetího Raultova zákona platí, že teplota tuhnutí roztoku klesá v závislosti na koncentraci, v něm rozpuštěné látky. Osmometr (kryoskop) je tedy v principu velmi citlivý teploměr (1 mmol/kg odpovídá 0,001858 °C).

Měřicí komůrka osmometru se naplní rozpouštědlem (destilovanou vodou) a termoelektricky pomocí Peltierova článku se rychle podchladí. Potom se, zevním zásahem, přivodí okamžité promrznutí vzorku v celém jeho objemu. V okamžiku, kdy vyšetřovaná voda začne tuhnout, vystoupí přesně sledovaná teplota k jejímu bodu tuhnutí (uvolňuje se skupenské teplo tuhnutí) a teprve pak pokračuje ochlazování zmrzlé vody. Stejný postup se opakuje s vyšetřovaným roztokem. Pokles bodu tuhnutí roztoku proti bodu tuhnutí čistého rozpouštědla je přímo úměrný osmolalitě. Jedná se o koligativní vlastnost, tzn. **závisí na počtu částic**, nikoli na jejich identitě.



*Grafické vyjádření průběhu teplotních změn při kryoskopii*



*Iniciace promrznutí vzorku, kapkou zledovatělou na jehle*

## Odměrná analýza

Odměrná analýza využívá v praxi vztahu vzájemné ekvivalence:  $n_A = \frac{a}{b} \cdot n_B$

Mezi oběma reaktanty musí probíhat rychle a bez vedlejších reakcí definovaný chemický děj (neutralizace, oxidace a redukce či iontová výměna), který lze jednoznačně popsat stechiometrickou rovnicí. Při vlastním provádění odměrné analýzy (tzv. titraci) se měří objemy (odtud odměrná analýza) a porovnávají koncentrace obou reaktantů:

$$c_A \cdot V_A = \frac{a}{b} \cdot c_B \cdot V_B$$

Látkou A je vždy zkoumaný vzorek nebo standardní roztok a pro lepší přehlednost budeme všechny údaje s nimi spojené označovat indexem -v- (pro vzorek) nebo -st- (pro standard). Látku B budeme označovat jako titrační roztok (TR) a u všech symbolů použijeme index -t-. (Titrační roztok se rovněž označuje jako titrační činidlo nebo odměrný roztok či odměrné činidlo.) Stechiometrický poměr reaktantů a / b budeme označovat jako titrační faktor (symbol - f -) a odvodíme jej z průběhu titrační reakce. Tedy:

$$\begin{aligned} c_v \cdot V_v &= c_t \cdot V_t \cdot f_v & f_v &= \frac{n_v}{n_t} \\ c_{st} \cdot V_{st} &= c_t \cdot V_t \cdot f_{st} & f_{st} &= \frac{n_{st}}{n_t} \end{aligned}$$

Objemy  $V_v$ ,  $V_{st}$ ,  $V_t$  dosazujeme vždy v mililitrech, pro objem  $V_t$  se používá označení spotřeba (symbol - sp -). Koncentraci titračního roztoku ( $c_t$ ) dosazujeme v jednotkách, které jsou žádány u vzorku, tj. v mol/l (pokud jsou koncentrace velmi malé, pak v mmol/l).

Základem každé titrace je průběh příslušné chemické reakce. Při vzájemné rekombinaci iontů probíhají titrace:

- |                   |   |
|-------------------|---|
| a) neutralizační  | $H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$ (vzniká voda)                   |
| b) srážecí        | $Me^+ + X^- \rightarrow MeX$ (vzniká nerozpustná sraženina)   |
| c) komplexotvorné | $Me^+ + X^- \rightarrow [MeX]$ (vzniká nedisociovaný komplex) |

Při elektronové výměně provádíme:

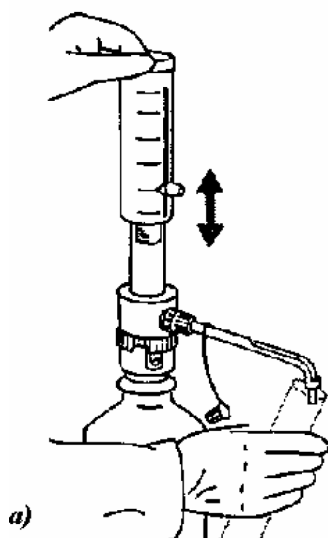
- |                  |   |
|------------------|---|
| a) oxidimetrii   | $X \rightarrow X^{n+} + n e^-$ (vzorek se oxiduje)  |
| b) reduktometrii | $Y^{n+} + n e^- \rightarrow Y$ (vzorek se redukuje) |

Název titrační metody se odvozuje od titračního roztoku. Je buď obecný (alkalimetrie, acidimetrie, oxidimetrie) nebo speciální, odvozený od použitého titračního činidla (manganometrie, jodometrie, argentometrie).

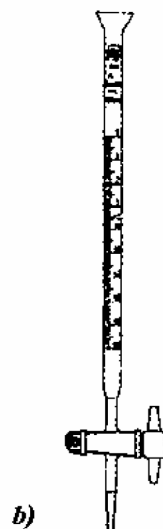
Na začátku každé titrace je třeba věnovat velkou pozornost kvantifikaci vzorku. Vychází-li se z pevné látky, pak se na analytických vahách přesně odváží potřebné množství vzorku, beze zbytku rozpustí v destilované vodě a ztitruje. Vychází-li se z roztoku, pak jej lze rovněž odvážit, ale častěji se odměřuje vhodný objem. Pro tyto účely se používají pipety. Jsou to

odměrné nádoby kalibrované na vylití, tzn. že požadovanému objemu odpovídá množství roztoku, které z pipety vyteklo.

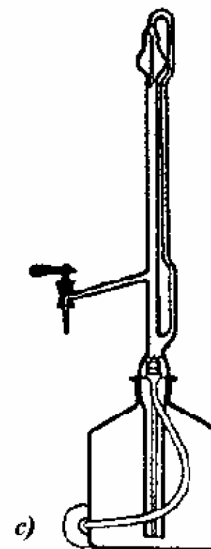
Vzorek se titruje v titrační baňce. Je zhotovena ze skla a její velikost je volena s ohledem na objem vzorku. Při titraci malých objemů je vhodné přidat destilovanou vodu, aby bylo možno průběh titrace bez problémů sledovat. Má-li se ke vzorku přidat určité množství dalšího roztoku (např. k dosažení vhodných reakčních podmínek), lze s výhodou použít stolní píستový dávkovač. Při titraci je nutno obsah baňky neustále promíchávat. Vhodné je použití elektromagnetické míchačky. Vzorek je automaticky míchán a pracovník se může plně soustředit na sledování průběhu titrace.



a) stolní píستový dávkovač



b) byreta



c) automatická byreta

Titrační roztok se ke vzorku přidává z byrety a jeho výběr závisí na druhu titrační metody. Přípravuje se z chemikálií nejvyšší chemické čistoty v koncentraci, která řádově odpovídá koncentraci vzorku. Přesná koncentrace titračního roztoku se zjistí tzv. standardizací. Pro tyto účely jsou doporučeny vhodné látky, tzv. **standardy**, z nichž je možno přesnou navázkou připravit definované roztoky. Jsou to např. kyselina šřavelová pro alkalimetrii a manganometrii, tetraboritan sodný pro acidimetrii, chlorid sodný pro argentometrii apod. Standardizační titrací se zjistí přesná koncentrace titračního roztoku.

$$c_t = \frac{c_{st} \cdot V_{st}}{V_t \cdot f_{st}}$$

Koncentrace udaná v mol/l se počítá na tři platné číslice (např. 0,105 mol/l nebo 0,0508 mol/l), u koncentrací v mmol/l na jedno desetinné místo (např. 105,1 mmol/l nebo 50,8 mmol/l).

Dále se postupuje tak, že vypočítaná koncentrace ( $c_t$ ) se dosadí do vztahu pro výpočet koncentrace vzorku:

$$c_v = \frac{c_t \cdot V_t \cdot f_v}{V_v}$$

Rozhodujícím momentem při provádění titrací je naprosto přesné a jednoznačné rozeznání konce titrace, zjištění tzv. **ekvivalentního bodu**. Ten může být určen subjektivně (při vizuální titraci) nebo objektivně (při titraci prováděné pomocí přístrojů).

Při subjektivním hodnocení je nutno s nejvyšší možnou přesností určit vizuální změnu vzorku v ekvivalentním bodě. Tou může být:

1. Změna zbarvení: a) přechod bezbarvého roztoku v barevný  
b) výrazná změna jedné barvy v druhou  
c) odbarvení roztoku
2. Vznik sraženiny (roztok se na konci titrace zakalí)
3. Vznik nebo zánik fluorescence

Tyto změny lze pozorovat u některých titračních metod přímo (tzv. autoindikační titrace). V takových případech je titrační roztok barevný a v průběhu titrace se odbarvuje přeměnou na bezbarvý produkt. Příkladem je manganometrie (červenofialový  $\text{KMnO}_4$  se redukuje na bezbarvé ionty  $\text{Mn}^{2+}$ ) nebo jodometrie (červenohnědý roztok jodu se redukuje na bezbarvý jodid).

V ostatních případech musí být použity indikátory. Ty se přidávají ke vzorku na začátku titrace. V ekvivalentním bodě dojde k barevné změně způsobené indikátorem, který reaguje s první přebytečnou kapkou titračního roztoku. Volba indikátoru má pro titraci zásadní význam a vždy je třeba si uvědomit, že každá takováto titrace je zatížena jistou indikátorovou chybou. Vhodný indikátor může tuto chybu minimalizovat.

Při objektivní titraci problémy s indikátory odpadají. Průběh titrace se sleduje měřením vhodné fyzikální veličiny (elektrodového potenciálu u potenciometrické titrace či vodivosti u konduktometrie). Vyhodnocení se provádí pomocí tzv. titračních křivek.

Většina titrací se provádí přímo. Pokud ale reakce probíhá pomalu, lze u nich využít tzv. nepřímé stanovení. Provádí se tak, že se ke stanovované látce přidá nadbytek činidla R, který se poté titruje vhodným titračním činidlem.

$$n_v = n_R - n_t$$

$$c_v = \frac{(c_R \cdot V_R) - (c_t \cdot V_t)}{V_v}$$



## Neutralizační titrace

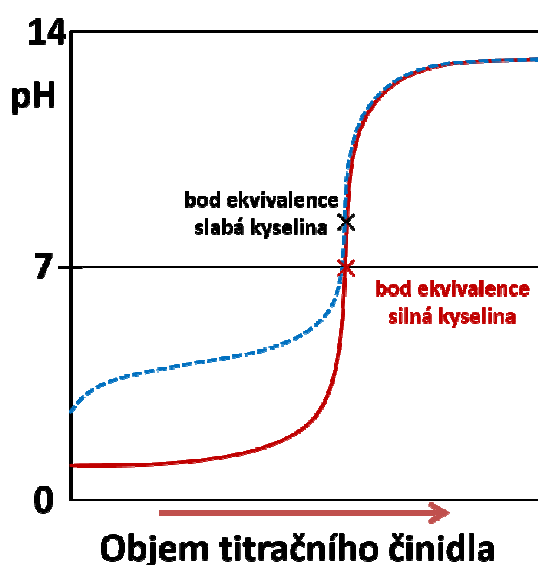
Jako neutralizační titrace se označují dvě odměrné metody: alkalimetrie a acidimetrie. Alkalimetricky se stanovují koncentrace kyselých reagujících roztoků, acidimetricky se zjišťuje koncentrace roztoků zásaditých. Jako titrační činidla se používají zásadně roztoky silných protolytů. Pro alkalimetrii nejčastěji hydroxid sodný, pro acidimetrii kyselina chlorovodíková.

Konec titrace určují acidobazické indikátory. Jsou to zředěné (přibližně 0,1%) vodné nebo ethanolové roztoky organických sloučenin ze skupiny ftaleinů, sulfoftaleinů a azobarviv, jejichž zbarvení je závislé na pH. Volba indikátoru se řídí průběhem titrační křivky, která vyjadřuje závislost pH na objemu přidaného titračního roztoku. Tyto křivky mají charakteristický esovitý tvar. Indikátor se zvolí tak, aby se oblast pH jeho barevného přechodu nacházela ve strmé části titrační křivky.

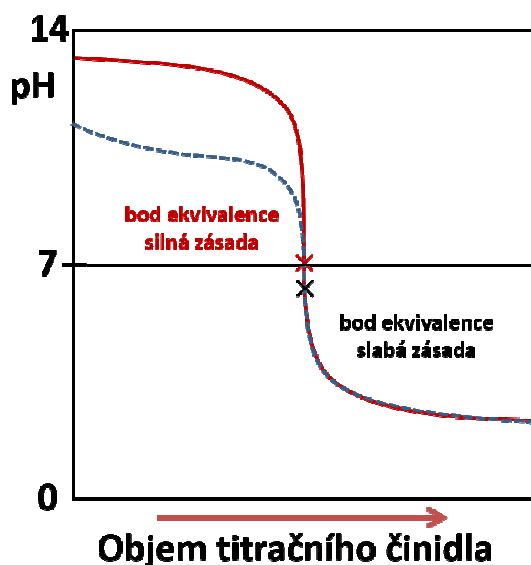
U silných protolytů (silné kyseliny a zásady) dochází v oblasti ekvivalentního bodu k prudké změně pH, což se projeví „skokem“ na titrační křivce. Proto lze vybírat z řady indikátorů, které splňují výše uvedenou podmínku. U slabých protolytů (slabé kyseliny a zásady) je změna pH podstatně menší a výběr indikátorů je tedy omezen. U velmi slabých protolytů je skok nevýrazný a vhodný indikátor pro vizuální titraci se hledá jen obtížně. Ty nejslabší vizuálně titrovat nelze.

### Acidobazické indikátory

Název	Kyselé prostředí.	Zásadité prostředí.	Oblast pH
Methylová oranž	červená	oranžová	3,0 - 4,4
Methylová červen	červená	žlutá	4,4 - 6,2
Neutrální červen	červená	žlutá	6,0 - 8,0
Thymolová modř	žlutá	modrá	8,0 - 9,6
Fenolftalein	bezbarvá	fialová	8,2 - 9,9



Titrační křivka alkalimetrické titrace  
silné a slabé (čárkované) kyseliny



Titrační křivka acidimetrické titrace  
silné a slabé (čárkované) zásady

Z průběhu titračních křivek a barevných přechodů indikátorů je zřejmé, že při vhodné volbě dvojice indikátorů lze titrovat silný a slabý protolyt vedle sebe. Toho se lze využít např. při stanovení acidity žaludeční šťávy, při titraci uhličitanů vedle NaOH, silné kyseliny vedle slabé, vícesytné kyseliny do několika stupňů apod.

Všechny titrace se provádějí dvakrát. První stanovení má orientační charakter, při druhé titraci se pečlivě sleduje oblast ekvivalentního bodu. Nalezené spotřeby se nesmí lišit o více než 0,2 ml. Jsou-li rozdíly větší, je nutné titraci ještě jednou zopakovat.

### ***Alkalimetrie***

Nejčastěji se používá titrační roztok NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ), který se připravuje z vypočítané navážky chemikálie nejvyšší analytické čistoty (p.a.). Musí se však počítat s tím, že NaOH se na vzduchu slučuje s vodou i s  $\text{CO}_2$ , proto se přesná koncentrace zjišťuje standardizací. U déle skladovaných roztoků se musí kontrola pravidelně opakovat.

Jako standard se používá kyselina šřavelová  $(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ . Kyselina šřavelová je krystalická látka, standardní roztok se připraví z vypočítané navážky. Výběr indikátoru se řídí průběhem titrační křivky. Většinou se vystačí s methylovou oranží (pro silné kyseliny) a fenolftaleinem (pro slabé kyseliny). Titrují se silné a slabé kyseliny a kyselí reagující soli.

## Komplexotvorné titrace

Podstatou těchto titračních metod je tvorba nedisociovaných, ale ve vodě rozpustných komplexů kovových kationtů s komplexotvorným činidlem. K titračním účelům se využívá:

- reakce kationtů s aminopolykarboxylovými kyselinami (chelatometrie)
- tvorby rtuťnatých komplexních solí (merkurimetrie)

V chelatometrii je titrační činidlo ligandem vznikajícího komplexu. U merkurimetrie je tomu obráceně, titrační roztok poskytuje centrální kationt, ligandem je aniont vzorku.

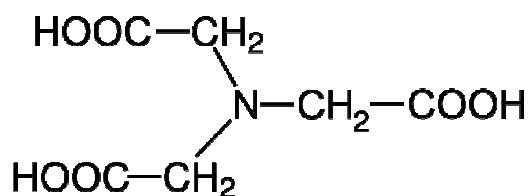
### Chelatometrie

Chelatometrická titrační činidla se označují jako chelatony (komplexony). Jsou to aminopolykarboxylové kyseliny odvozené od kyseliny iminodiacetové:

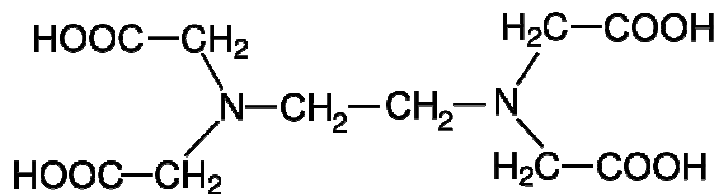


Konkrétně je to:

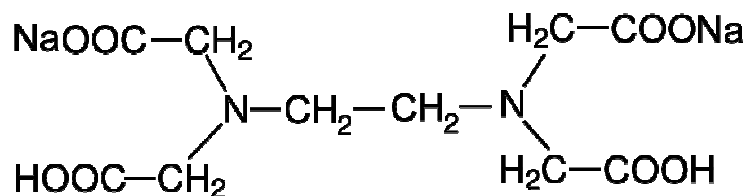
- kyselina nitrilotrioctová (NTA) - Chelaton 1



- kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) - Chelaton 2

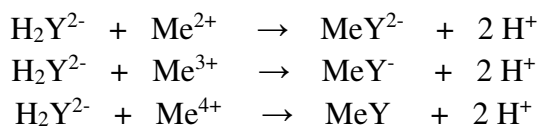


- disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové - Chelaton 3



Z komplexonů má největší využití Chelaton 3, protože je z uvedených sloučenin nejlépe rozpustný. Používá se jako titrační činidlo v chelatometrii, jako změkčovač vody (váže do komplexu vápenaté a hořečnaté ionty, které způsobují tvrdost vody), v medicíně jako detoxikační přípravek při otravách těžkými kovy (léčivo EDTACAL), aj.

Chelaton 3 (zkracuje se  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ ) ve vodě disociuje na iont  $\text{H}_2\text{Y}^{2-}$ , který reaguje s vícemocnými kationty ( $\text{Me}^{2+}$ ,  $\text{Me}^{3+}$  nebo  $\text{Me}^{4+}$ ) vždy v poměru 1:1 a přitom se uvolňují dva protony.



Z uvedených rovnic vyplývá, že v komplexu je vázán vždy jen jeden vícesytný kationt bez ohledu na jeho iontový náboj. Proto bude mít stechiometrický faktor všech chelatometrických stanovení hodnotu 1.

Nejsložitější otázkou chelatometrických titrací je způsob indikace ekvivalentního bodu, protože jak činidlo, tak vznikající komplexy jsou bezbarvé. Používají se tzv. metalochromní indikátory, které jsou vhodné vždy pro určitou skupinu kationtů. Jsou to výrazně zbarvené sloučeniny (vesměs ze skupiny azobarviv a sulfoftaleinů), které tvoří s kationty sloučeniny barevně se lišící od vlastního volného indikátoru. Důležité je, že komplex [indikátor - kov] je méně stálý než komplex [chelaton - kov]. Prakticky to znamená, že na začátku titrace je roztok zbarven komplexem [indikátor - kationt]. Na konci titrace přejde veškerý kov do bezbarvého komplexu [chelaton - kationt] a uvolněný indikátor se projeví změnou barvy. Protože zbarvení indikátoru je závislé na pH, musí se titrovat v pufovaném prostředí, aby se eliminoval vliv iontů  $\text{H}^+$  uvolňovaných v průběhu titrace.

Chelaton 3 (disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové) existuje ve velmi čistém stavu, a proto není nutné pro běžná stanovení provádět standardizaci. Pro některá speciální stanovení se připravují standardní roztoky o známé koncentraci, které obsahují stejný kationt jako vzorek. Titruje se pak paralelně se standardem, tzn. že vedle vzorku (nebo série vzorků) se vždy provede i standardizační titrace. Tento způsob se volí zejména při titraci velmi zředěným chelatonem (např. při stanovení vápníku v séru). Pro běžná stanovení se připravuje titrační roztok v koncentraci 0,050 mol/l rozpuštěním přesné navážky v redestilované vodě a přechovává se v nádobách z plastu, aby se zabránilo nežádoucímu vyluhování vápníku ze skla.

Z doporučených indikátorů se nejčastěji titruje na murexid (v alkalickém prostředí fialový), dále se používá eriochromová čerň T (v alkalickém prostředí modrá) a pyrokatechinová violeť (v alkalickém prostředí červenofialová). Pro stanovení vápníku se doporučuje fluorexon, který je v silně alkalickém prostředí zbarven růžově, jeho komplex s vápenatými kationty žlutozeleně fluoreskuje. Vodné roztoky uvedených indikátorů nejsou příliš stálé, proto se raději připravují pevné směsi s NaCl v poměru 1:100.

Použití této titrační metody je široké. Nejčastěji se stanovují:

na murexid:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  aj.

na Erio T:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  aj.

na pyrokatechinovou violeť:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$  aj.

na fluorexon:  $\text{Ca}^{2+}$

# Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při níž se distribuují složky směsi mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. **Stacionární fází** může být pevná látka nebo kapalina zakotvená na nosiči, **mobilní fází** kapalina nebo plyn. Složky směsi, které mají větší afinitu ke stacionární fázi, se v proudu mobilní fáze zpožďují za pohyblivějšími složkami s větší afinitou k fázi mobilní, čímž dochází k jejich dělení. Látka se rozdělí mezi obě fáze ve smyslu své **distribuční (rozdělovací) konstanty** ( $K_D$ ), která udává poměr koncentrací látky přítomné ve složce stacionární ( $[A]_s$ ) a ve složce mobilní ( $[A]_m$ ).

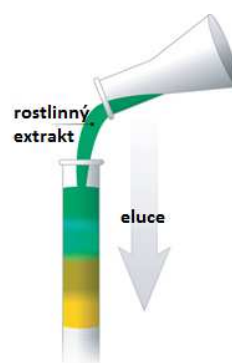
$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$  Složka, jejíž distribuční konstanta je velká, se bude vyskytovat převážně ve fázi stacionární a bude se pohybovat pomaleji než látka, jejíž konstanta je malá a jež se vyskytuje převážně ve fázi mobilní.

Chromatografii lze využít jak k identifikaci látek v dělené směsi (kvalitativní chromatografická analýza) nebo stanovení množství jednotlivých složek (kvantitativní chromatografická analýza), tak k získání čisté složky směsi (preparativní chromatografie).

*První chromatografii provedl v roce 1906 Michail Semjonovič Cvět (rusky Михаил Семёнович Цвет; 1872-1919; ruský botanik, fyziolog a*



*biochemik), za účelem rozdělení barviv vyskytujících se v listech rostlin. Na koloně uhličitanu vápenatého získal dva zelené pruhy (listová barviva chlorofyl a a chlorofyl b) a několik žlutých pruhů (karotenoidy). Teprve za deset let byl Cvětův objev uznán za velký technický přínos tomuto způsobu separace. Podle řeckého chroma - barva - byl odvozen název chromatografie.*



## Základní rozdělení chromatografických metod

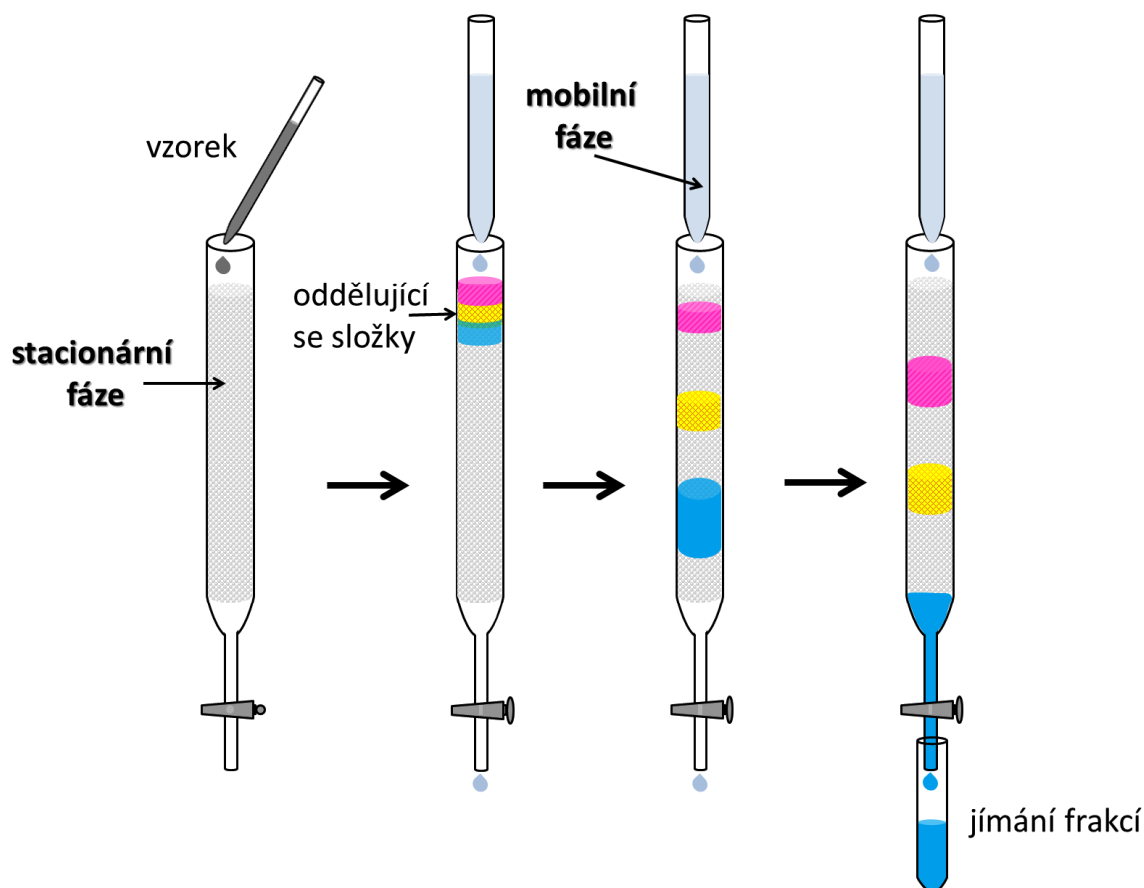
### A) podle způsobu provedení:

- **sloupcová chromatografie (chromatografie na koloně)**

Základem je kolona, tvořená trubicí, ve spodu opatřená fritou a kohoutem (viz obrázek). Trubice se naplnění chromatograficky aktivním materiálem, který vytvoří sloupec. Sloupec nesmí vyschnout, jinak se v něm objeví trhliny a nedojde k rozdělení. Zakotvení stacionární fáze na nosič se označuje jako impregnace. Pak následuje nanesení vzorku a vyvíjení. Rychlost toku mobilní fáze se obvykle udává v ml/min. Mobilní fáze vytékající z kolony se nazývá eluát. Dělení lze urychlit zvýšeným tlakem na hladinu mobilní fáze.

Speciálním typem sloupcové chromatografie je vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie (HPLC). Základem je čerpadlo s vysokým tlakem mobilní fáze, vysoce účinná kolona a detektor. Čerpadlo tlačí mobilní fázi pod tlakem až 30MPa do kolony, kde dojde k rozdělení vzorku a jednotlivé části pak postupně protékají detektorem. Detektor měří jak

koncentraci protékající látky, tak čas uplynulý od chvíle startu. Jednotlivé složky se ukazují jako píky, jejich koncentrace je zobrazena jako plocha pod píkem (z angl. peak = vrchol).



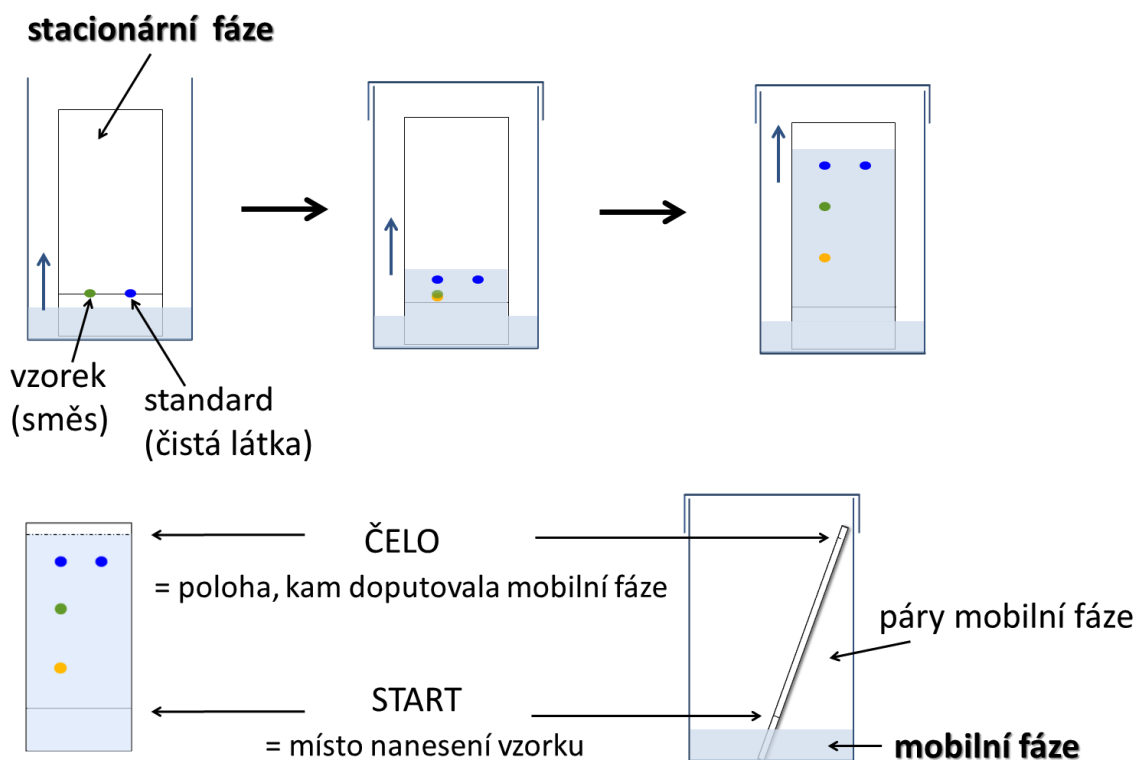
*Sloupcová chromatografie – průběh dělení směsi tří látek na chromatografické koloně.*

- **chromatografie v plošném uspořádání**

Stacionární fázi představuje kapalina zakotvená v archu chromatografického papíru (papírová chromatografie) nebo tenká vrstva adsorbentu nanesená na pevné podložce (chromatografie na tenké vrstvě). Pohyb mobilní fáze je způsoben nejčastěji jejím vzlínáním.

Podle směru pohybu mobilní fáze se papírová chromatografie dělí na:

- |                   |   |
|-------------------|---|
| <b>vzestupnou</b> | (rozpouštědlo se pohybuje směrem zdola nahoru, viz obrázek)                                   |
| <b>sestupnou</b>  | (rozpouštědlo postupuje shora dolů)   |
| <b>kruhovou</b>   | (rozpouštědlo se rozšiřuje radiálně od středu papíru)   |
| <b>dvojměrnou</b> | (dělení se provede nejprve v jednom směru a potom s jinou vyvíjecí soustavou ve směru kolmém) |



*Chromatografie v plošném uspořádání – průběh dělení směsi tří látek v chromatografické komoře.*

## B) podle skupenství fází:

- *plynová chromatografie*

Dělení může probíhat v soustavě plyn - kapalina nebo plyn - pevná látka. V prvním případě jde o chromatografii rozdělovací, v druhém o chromatografii adsorpční.

- *kapalinová chromatografie*

Dělení směsi může probíhat v soustavě kapalina - kapalina (chromatografie rozdělovací) nebo v soustavě kapalina - pevná látka (chromatografie adsorpční, gelová nebo iontově výměnná).

## C) podle fyzikálně-chemického principu dělení:

- *rozdělovací chromatografie*

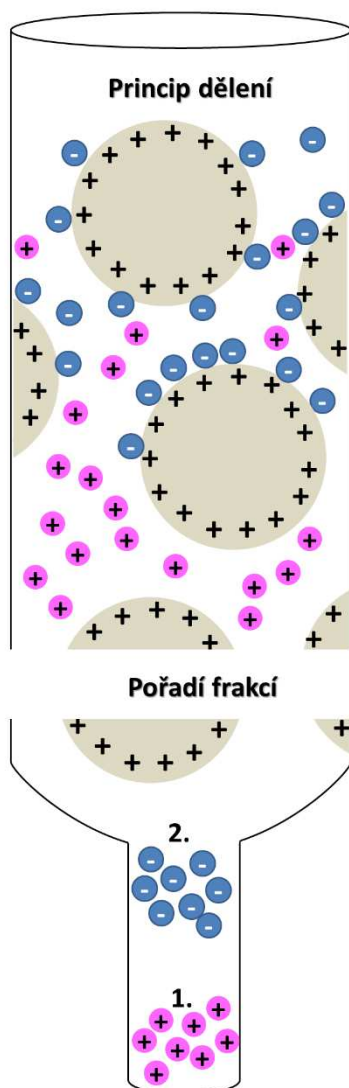
Stacionární fází je kapalina (zakotvená na vhodném nosiči), která se nemísí s kapalinou mobilní fáze. K dělení dochází, mají-li látky rozdílné rozdělovací konstanty. Podmínkou pro úspěšné dělení je vyšší rozpustnost látky ve stacionární fázi, než ve fázi mobilní.

- *adsorpční chromatografie*

Stacionární fází je pevná látka s adsorpčními vlastnostmi (sorbent), mobilní fází je kapalina nebo plyn. Sorbent je látka, která má velký povrch, na němž obsahuje skupiny, které vytváří slabé vazby s dělenými látkami. Tyto slabé vazby zadržují molekuly látek, které jsou rozpuštěny v mobilní fázi. Směsi se dělí na základě rozdílné adsorpční afinity jednotlivých složek ke stacionární fázi. Nejběžnějšími sorbenty používanými v chromatografii jsou silikagel, oxid hlinitý a křemelina.

- **iontově výměnná chromatografie**

Stacionární fází je látka specifických vlastností (iontoměnič), mobilní fází je kapalina. Iontoměnič je polymerní látka, která na svém povrchu obsahuje skupiny schopné disociace v roztoku. Mezi stacionární a mobilní fází se dělí látky iontové povahy a to působením elektrostatických sil mezi ionty rozpuštěnými v mobilní fázi a disociovanými funkčními skupinami iontoměniče (např.  $\sim\text{COO}^-$ ,  $\sim\text{SO}_3^-$ ,  $\sim\text{NH}_3^+$ ,  $\sim\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ). Iontoměniče lze dělit podle náboje na katexy a anexy. Katex (zkrácením anglického *kation exchanger*) obsahuje záporně nabitě skupiny a dělí kationty. Anex (*anion exchanger*) naopak obsahuje kladně nabitě skupiny a dělí anionty (viz obrázek). Ionexy lze regenerovat za použití roztoků obsahujících původní ionty. Jako regenerační roztoky lze použít kyseliny, zásady, nebo i NaCl, záleží na konkrétním použití a ionexu. Metoda má široké využití např. pro přípravu deionizované vody, k identifikaci izoenzymů, k separaci proteinů a k odstranění nežádoucích iontů ze vzorku před jeho analýzou.

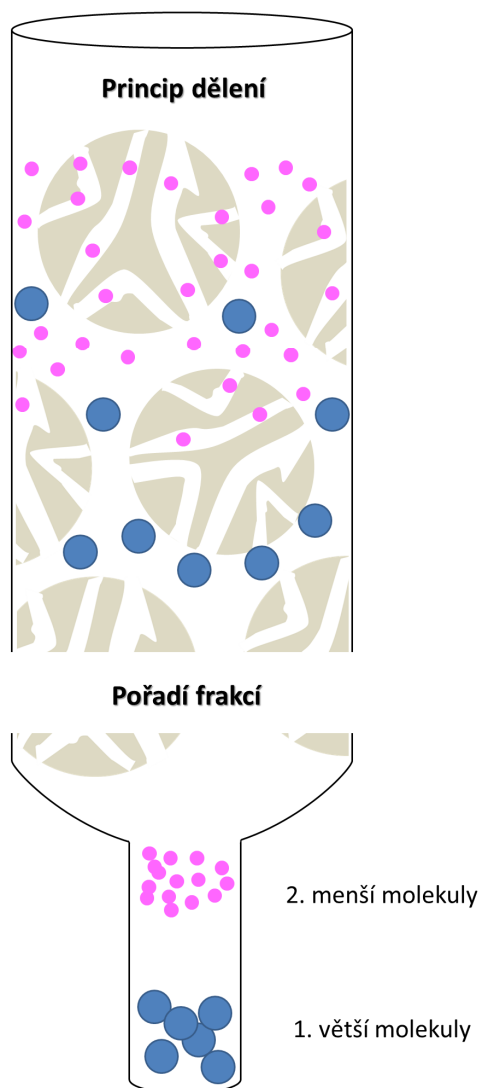


**Princip iontově výměnné chromatografie.** Disociací funkčních skupin se vytvoří na povrchu ionexu náboj, který poutá opačně nabitě ionty. Jednotlivé ionty přítomné ve vzorku se vážou na iontoměnič různou silou, čímž dochází k jejich dělení.



- **gelová chromatografie („molekulová síta“)**

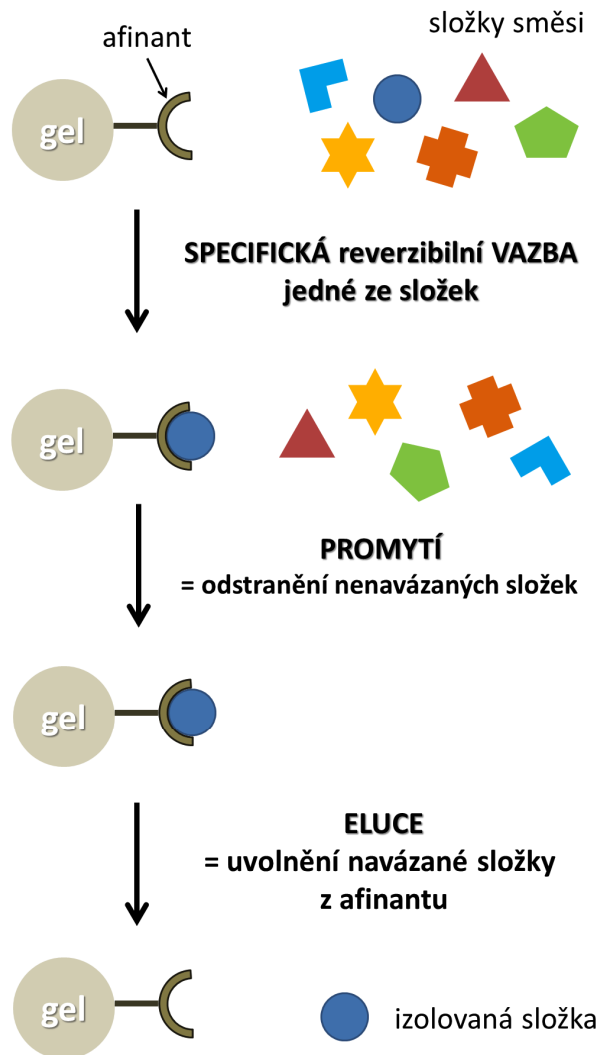
Stacionární fází je polymerní gel pravidelného prostorového uspořádání, mobilní fází je kapalina. Složky směsi se dělí na základě rozdílné velikosti molekul. Látky, jejichž molekuly jsou větší než průměr pórů v gelu, nemohou do něj proniknout a postupují vpřed s mobilní fází. Menší molekuly pronikají do prostorových „ok“ a jejich pohyb se zpomaluje (viz obrázek). Metoda se využívá především u dělení makromolekulárních látek, proteinů, enzymů, polysacharidů apod.



**Princip gelové chromatografie.** Malé molekuly vstupují do „chodbiček“ v gelu, čímž jsou zpoždovány oproti molekulám, které se do pórů v gelu nevejdou. Tyto velké molekuly „bludiště“ v gelových částicích obejdou, jsou unášeny spolu s mobilní fází a opouštějí kolonu jako první.

- **afinitní chromatografie**

Stacionární fází je polymerní gel, který má na svém povrchu kovalentně navázanu určitou látku (afinant), např. protilátku, se schopností interakce se zkoumaným vzorkem (viz obrázek), v případě protilátky jako afinantu s příslušným antigenem. Mobilní fází jsou většinou pufrů s různou iontovou silou. Metoda se používá pro separaci a izolaci bioaktivních látek (proteiny, nukleové kyseliny).

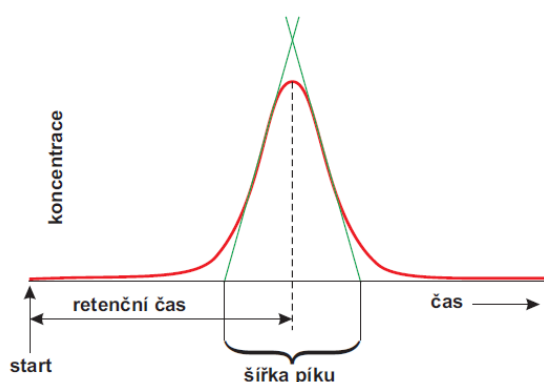


**Princip afinitní chromatografie.** Afinant na sebe specificky naváže jednu složku směsi, ostatní složky jsou odstraněny promytím. Změnou mobilní fáze dojde k uvolnění složky navázané na afinant a získáme tak eluát obsahující pouze tuto izolovanou složku.

V chromatografii se užívají zkratky odvozené z anglických názvů jednotlivých metod.

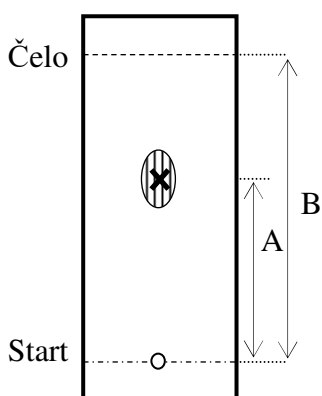
Zkratka	Anglický název metody	Druh chromatografické metody
GC	gas chromatography	plynová chromatografie
LC	liquid chromatography	kapalinová chromatografie
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoučinná kapalinová chromatografie
PC	paper chromatography	papírová chromatografie
TLC	thin layer chromatography	chromatografie na tenké vrstvě
GPC	gel permeation chromatography	gelová chromatografie
IEC	ion exchange chromatography	iontově výměnná chromatografie

## Vyhodnocení chromatografických metod



**Sloupcová chromatografie** - v průběhu eluce se postupně sbírají frakce a to buď pomocí časového spínače ve stejných časových intervalech, nebo se vhodným zařízením odebírají frakce stejného objemu. Vyhodnocují se nejčastěji fotometricky. Grafickým znázorněním průběhu eluce je tzv. **eluční křivka**. Na osu  $x$  se nanáší eluční čas nebo eluční objem, na osu  $y$  naměřená absorbance. Eluce izolované složky má tvar křivky, která se svým rozložením podobá *Gaussově křivce*. Její výška charakterizuje množství látky, její poloha (eluční čas nebo objem odpovídající poloze maxima) může sloužit k její identifikaci. Porovnání se provádí pomocí známých standardů.

Eluce izolované složky má tvar křivky, která se svým rozložením podobá *Gaussově křivce*. Její výška charakterizuje množství látky, její poloha (eluční čas nebo objem odpovídající poloze maxima) může sloužit k její identifikaci. Porovnání se provádí pomocí známých standardů.



**Chromatografie v plošném uspořádání** - látky se v tomto uspořádání obvykle pouze identifikují. Místo, kam se nanáší vzorek, se označuje jako **start**, poloha mobilní fáze v okamžiku přerušení vyvíjení je **čelo**.

Identifikace se provádí pomocí **retardačního faktoru** ( $R_f$ ). Retardační faktor je **poměr vzdálenosti start - těžiště skvrny vzorku (A) ku vzdálenosti start - čelo (B)**.

$$R_f = \frac{A}{B}$$

Hodnoty  $R_f$  se udávají v tabulkách, ale spolehlivější je srovnávat vzorek se standardy, které se nanášejí paralelně se zkoumanou látkou a vyhodnocují stejným způsobem.

## Acidobazické rovnováhy

Problematiku acidobazických rovnováh je nutno řešit ve spojitosti s teorií kyselin a bazí. Vzhledem k aplikaci v biochemii se lze na tomto místě při výkladu omezit pouze na vodné roztoky. **Kyseliny** jsou takové látky, které mohou **uvolňovat proton** (vodíkový kationt). Kyselina je tím silnější, čím ochotněji proton uvolňuje. Naopak **baze** je taková látka, která proton **přijímá** a to tím ochotněji, čím je silnější. Každá kyselina tvoří se svou bazí **acidobazický konjugovaný pár**, přičemž silná kyselina je konjugována se slabou bazí a naopak.

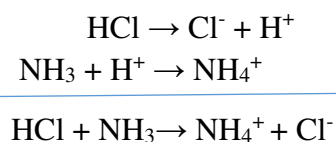
Kyselina $\rightarrow$ Baze + $H^+$	Konjugovaný pár
$HCl \rightarrow Cl^- + H^+$	silná kyselina / slabá baze
$H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$	slabá kyselina / silná baze
$NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$	slabá kyselina / slabá baze

Z uvedených příkladů vyplývá:

a) Je-li silná kyselina (HCl) konjugována se slabou bazí (Cl<sup>-</sup>), bude se v páru HCl / Cl<sup>-</sup> uplatňovat prakticky pouze kyselina jako donor protonů, zatímco baze jako akceptor H<sup>+</sup> se projeví v míře zcela zanedbatelné. To platí analogicky pro silnou bazi (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) jako akceptor protonů ve dvojici HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

b) Není-li schopnost přijímat či odevzdávat proton jednoznačně vyhraněna, označují se tyto látky jako **amfolity**.

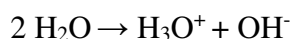
Proton může být uvolněn z kyseliny jen tehdy, je-li akceptován přítomnou bazí. Analogicky probíhají elektronové výměny v redoxních dějích.



Zcela vyjíměčné postavení má při těchto výměnách voda, neboť může být podle situace jak donorem, tak akceptorem protonu. Jako donor H<sup>+</sup> vystupuje v přítomnosti bazí (chová se jako kyselina), v přítomnosti kyselin vystupuje jako akceptor H<sup>+</sup> (chová se jako baze).



K výměně protonů dochází (i když jen v nepatrné míře) i mezi dvěma molekulami vody (tzv. autoprotolýza):



Látkovou koncentraci  $c(\text{H}_3\text{O}^+)$  ve vodě lze odvodit z rovnovážné disociační konstanty:

$$K_V = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+].[\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]^2}$$

$$K_V \cdot [\text{H}_2\text{O}]^2 = [\text{H}_3\text{O}^+].[\text{OH}^-] = K_s$$

Konstanta  $K_s$  se nazývá *iontový součin vody* a její číselná hodnota je při 25°C:

$$K_s = 1,12 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2$$

Ve vodě je  $c(\text{H}_3\text{O}^+) = c(\text{OH}^-) = 10^{-7} \text{ mol/l}$ . V kyselých roztocích je pak  $c(\text{H}_3\text{O}^+) > 10^{-7} \text{ mol/l}$ , v alkalických roztocích je  $c(\text{H}_3\text{O}^+) < 10^{-7} \text{ mol/l}$ .

### Vodíkový exponent (pH)

Pojem vodíkového exponentu (běžně pH) zavedl S. P. L. Sørensen (1909) ve snaze zjednodušit údaje o koncentraci vodíkových iontů v roztoku. Na jeho návrh bylo zavedeno používání logaritmické stupnice:

$$pH = -\log c(\text{H}^+) \qquad c(\text{H}^+) = 10^{-pH}$$

Analogicky lze logaritmickou funkcí vyjádřit i další vztahy odvozené z iontového součinu vody:

$$pOH = -\log c(\text{OH}^-) \qquad c(\text{OH}^-) = 10^{-pOH} \qquad pH + pOH = 14$$

Po této úpravě má pak voda  $pH = 7$ , v kyselých roztocích je  $pH < 7$ , v alkalických roztocích je  $pH > 7$ . Praktický rozsah hodnot pH ve vodných roztocích je 0 až 14.

$$pH = 14 - pOH \qquad pOH = 14 - pH$$

V klinické biochemii je velmi pozorně sledována hodnota pH arteriální krve. Normální hodnota je  $7,40 \pm 0,04$ , což odpovídá koncentraci  $\text{H}^+$  iontů 40 nmol/l (s rozpětím 36,5 až 44,0 nmol/l). Při používání stupnice pH je nutno si vždy plně uvědomit, že jde o logaritmickou škálu. Změna pH o jednotku znamená změnu skutečné koncentrace o řád.

### Výpočet pH roztoků silných kyselin a hydroxidů

Za silné kyseliny se považují takové kyseliny, které jsou ve zředěných vodných roztocích prakticky úplně disociované. V takovém případě lze z jejich látkové koncentrace odvodit koncentraci vodíkových iontů. Pro výpočet pH se použije samozřejmě koncentrace  $c(\text{H}^+)$ , která je závislá na sytnosti příslušné kyseliny.



Za silné hydroxidy se považují hydroxidy alkalických kovů a kovů alkalických zemin a to proto, že jsou ve vodě plně disociovány na kovový kationt a hydroxidový aniont OH<sup>-</sup>. Tento aniont je silná base, neboť odebírá protony reakčnímu partnerovi. Z koncentrace hydroxidu lze tedy odvodit i koncentraci c(OH<sup>-</sup>) potřebnou pro výpočet pH.

## Výpočet pH roztoků slabých kyselin a hydroxidů

Slabé kyseliny jsou ve vodných roztocích disociovány jen částečně. Stupeň disociace je závislý na hodnotě disociační konstanty. Disociuje-li slabá kyselina (HAc) dle rovnice:



pak rovnovážná disociační konstanta ( $K_k$ ) pro tuto kyselinu je:

$$K_k = \frac{[\text{H}^+].[\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]}$$

Z disociační rovnice plyne, že  $[\text{H}^+] = [\text{Ac}^-]$ , tedy po dosazení:

$$K_k = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{HAc}]}$$

a po úpravě:

$$c(\text{H}^+) = \sqrt{K_k \cdot c(\text{HAc})}$$

Koncentrace c(HAc) představuje koncentraci nedisociovaných molekul přítomné slabé kyseliny. Vzhledem k tomu, že disociace probíhá jen v malé míře a na celkovou koncentraci kyseliny ( $c_k$ ) má jen zanedbatelný vliv, považuje se koncentrace c(HAc) za celkovou koncentraci přítomné kyseliny ( $c_k$ ). Zlogaritmováním uvedeného vztahu a zavedením pH a  $pK_k$  ( $pK_k = -\log K_k$ ) se získá konečný výraz pro **výpočet pH slabých kyselin**:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (pK_k - \log c_k)$$

Analogicky lze odvodit podobný vztah pro **výpočet pH slabých hydroxidů**:

$$\text{pH} = 14 - \frac{1}{2} \cdot (pK_z - \log c_z)$$

# Měření pH

Určování pH patří k základním úlohám v laboratoři i v chemické praxi. Používají se jednoduché kolorimetrické metody i exaktní měření pomocí pH-metrů. V kolorimetrických metodách se používají různé acidobazické indikátory nejčastěji impregnované na proužku savého papíru. Přesnost odhadu se pohybuje okolo  $\pm 0,2$  jednotek pH. Moderními pH-metry založenými na principu potenciometrie lze měřit pH s přesností setiny jednotek pH.

## Kolorimetrické měření pH

Měření je založeno na pozorování barevných změn acidobazických indikátorů. Tyto indikátory mění své zbarvení v závislosti na koncentraci iontů  $H^+$  v roztoku. Pro měření jsou vhodné pouze dvojbarevné indikátory, které přecházejí z jedné barvy do druhé vždy v určitém, pro ně charakteristickém rozmezí pH.

Indikátor (I) se chová jako slabá kyselina nebo slabá zásada. Budeme uvažovat častější případ, tedy dvojbarevný indikátor HI, který je slabou kyselinou. Jeho disociaci ve vodě vyjadřuje disociační rovnice:



Rovnovážná disociační konstanta  $K_i$  je:

$$K_i = \frac{[H^+].[I^-]}{[HI]}$$

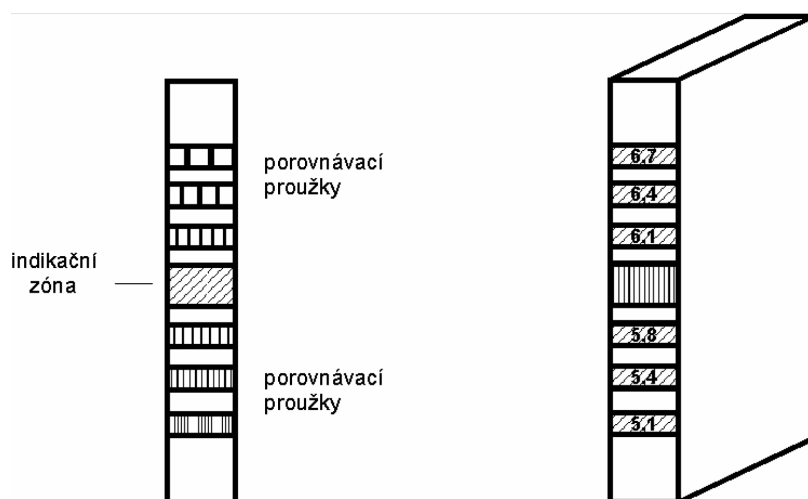
Z této formule je možné odvodit následující vztah:

$$pH = pK_i + \log \frac{[I^-]}{[HI]} = pK_i + \log \frac{[baze]}{[kyselina]}$$

Jsou-li formy  $[I^-]$  a  $[HI]$  barevně odlišné, pak z odvozené rovnice plyne, že změní-li se pH roztoku, změní se i poměr složek a to je spojeno s barevnou změnou. Změnu barvy lze rozlišit, je-li přítomno alespoň 10% jedné z forem indikátoru, z čehož plyne, že k výrazným barevným změnám dochází v rozmezí  $pH = pK_i \pm 1$ . Tato skutečnost je podkladem kolorimetrického měření pH.

Velice jednoduché je stanovení pH *pomocí indikátorových papírků* (v ČR je vyrábí firma LACHEMA). Universální indikátorový papírek má osmnáctičlennou srovnávací barevnou stupnici pro pH v rozmezí od 0 do 12 s možností odhadu  $\pm 0,5$  pH.

K přesnějšímu zjištění pH lze použít papírky vyráběné v ČR pod názvem **PHAN**. Mají uprostřed nanesen indikátor a po obou stranách jsou natištěny srovnávací barevné proužky, jejichž barevný tón odpovídá určitým hodnotám pH. Ty jsou vyznačeny pro každý druh papírku na přiložené stupnici dělené většinou po 0,3 pH. Přesnost měření při zachování všech podmínek je  $\pm 0,15$  pH.



*Indikátorové papírky PHAN*

V praxi se osvědčily též různé speciální indikátorové proužky určené pro prostředí, kde běžné papírky selhávají, např. ke stanovení pH silně zbarvených nebo zakalených roztoků. Speciálně účelové papírky se používají rovněž v potravinářství (kyselost mléka, sýrů, tvarohu), v zemědělství (reakce půdy, kontrola siláže), v klinické biochemii (vyšetření moči) aj.

### ***Stanovení pH za použití pufrů***

Je-li známo přibližné pH vyšetřovaného roztoku, vybere se vhodný indikátor, jehož barevný přechod leží v oblasti předpokládaného pH. Jako srovnávací roztoky se použijí pufrů, u nichž bylo pH zjištěno přesným elektrometrickým měřením. Vlastní stanovení je jednoduché. Do řady stejných zkumavek se odpipetuje stejné množství vhodných pufrů lišících se obvykle o 0,2 pH. Do další zkumavky se dá stejný objem vzorku. Pak se přidá do všech zkumavek stejné množství indikátoru a porovná se zbarvení vyšetřovaného vzorku se zbarvením pufrů.

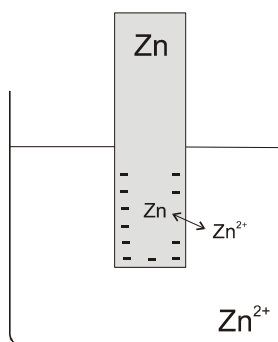
## **Potenciometrie**

Analyty, které vykazují elektrický náboj, lze kvantitativně stanovovat pomocí ***potenciometrie***. Je to elektrochemická metoda založená na měření rozdílu potenciálů mezi dvěma elektrodami.

Obecně je elektroda systém navzájem vodivě propojených elektrických fází. Prakticky jde o elektrický vodič, který je v přímém kontaktu s něčím dalším vodivým, obvykle elektrolytem. Elektrod je mnoho různých typů podle jejich konstrukce a procesů, které na nich probíhají.

Principiálně nejjednodušší jsou elektrody prvního druhu. Jsou tvořeny prvkem (kovem v případě většiny elektrod, vzácně plynem, např. vodíkem) a jeho iontem obsaženým v roztoku. Například zinková elektroda vznikne ponořením zinkového plíšku do roztoku obsahujícího  $Zn^{2+}$  kationty.





Zinková elektroda



$$E_{\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}} = E_{\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}}^0 + \frac{RT}{2F} \ln [\text{Zn}^{2+}]$$

standardní elektrodový potenciál  $E_{\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}}^0 = -0,763 \text{ V}$

Přesněji vystihuje efektivní koncentraci pojem **aktivita**, která se skutečnou koncentrací souvisí jednoduchým vztahem, např. pro látku A:

$$a_A = \gamma_A \cdot [A]$$

$a_A$  ... aktivita látky A,

$[A]$  ... rovnovážná koncentrace látky A

$\gamma_A$  ... molární aktivitní koeficient (rozdíl mezi aktivitou a koncentrací, který je způsoben vzájemným působením částic látky A s ostatními částicemi v reakčním roztoku.)

Se zředováním roztoků se rozdíl mezi aktivitou a koncentrací zmenšuje. S ohledem na to, že roztoky vnitřního prostředí organismu jsou ponejvíce silně zředěné, nebývá zapotřebí odlišovat koncentraci od aktivity.

Potenciometrické články jsou sestaveny ze dvou elektrod. Elektroda, jejíž potenciál není ovlivněn koncentrací stanovované látky a má tudíž hodnotu elektrodového potenciálu neměnnou, se označuje jako elektroda **referenční (srovnávací)**. Používají se např. elektrody argentchloridové (Ag/AgCl), kalomelové (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) nebo merkurosulfátové (Hg/HgSO<sub>4</sub>).

Elektroda, která mění svůj elektrodový potenciál v závislosti na změnách koncentrací stanovované látky, se označuje jako elektroda **indikační (měrná)**. Jako měrné se používají elektrody z kovu, jehož ionty jsou obsaženy v měřeném roztoku, nebo membránové iontové selektivní elektrody (skleněná).

Je-li koncentrace stanovované složky určována přímo z hodnoty elektromotorického napětí článku, jedná se o **potenciometrii přímou** (měření pH).

**Nepřímým** využitím potenciometrie je např. potenciometrická titrace. Grafickým záznamem průběhu titrace s potenciometrickou indikací je křivka s charakteristickým esovitým tvarem.

### Historie

Za první potenciometrickou práci je považována **Hehradova** studie o stanovení halogenidů dusičnanem rtuťným, r. 1893. Téhož roku **Le Blanc** použil vodíkové elektrody ke stanovení koncentrace vodíkových iontů. Potenciometrické měření se postupně stávalo stále běžnějším, byly vyzkoušeny nové indikační elektrody; především elektroda skleněná. Schopnost skleněných membrán reagovat změnou potenciálu na změny koncentrace vodíkových iontů objevil v roce 1906 **M. Cremer**. První acidobazické měření provedli **F. Haber** s **Z. Klemensiewiczem** roku 1909.



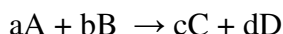
F. Haber

Elektromotorické napětí článku  $U$  (značeno také  $\Delta E$ ) je dáno rozdílem rovnovážných potenciálů **elektrody měrné** ( $E_m$ , indikační) a **elektrody srovnávací** ( $E_{ref}$ , referenční):

$$\Delta E = E_m - E_{ref}$$

Podle konstrukce konkrétní elektrody je její potenciál dán buď potenciálem elektrodovým, nebo potenciálem membránovým.

**Elektrodový potenciál** vzniká na fázovém rozhraní elektroda/elektrolyt. Probíhá-li na elektrodě elektrochemická reakce podle rovnice:



Ize rovnovážný elektrodový potenciál v závislosti na koncentracích (aktivitách) reagujících látek vyjádřit **Nernstovou rovnicí**:

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

<b><math>E^0</math></b>	standardní elektrodový potenciál redoxního páru (z tabulek)
<b><math>R</math></b>	plynová konstanta ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}$ )
<b><math>T</math></b>	absolutní teplota [K] (teplota ve $^{\circ}\text{C} + 273,15$ )
<b><math>F</math></b>	Faradayova konstanta ( $96485,3 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
<b><math>Z</math></b>	počet elektronů vyměněných při reakci
<b><math>[A], [B], [C], [D]</math></b>	rovnovážné koncentrace umocněné na odpovídající stechiometrické koeficienty

**Walther Hermann Nernst** (1864 – 1941) byl německý chemik. Za svou práci v oblasti termochemie obdržel v roce 1920 Nobelovu cenu. Nernst pomohl založit moderní fyzikální chemii a přispěl do oblastí elektrochemie, termodynamiky, fotochemie.

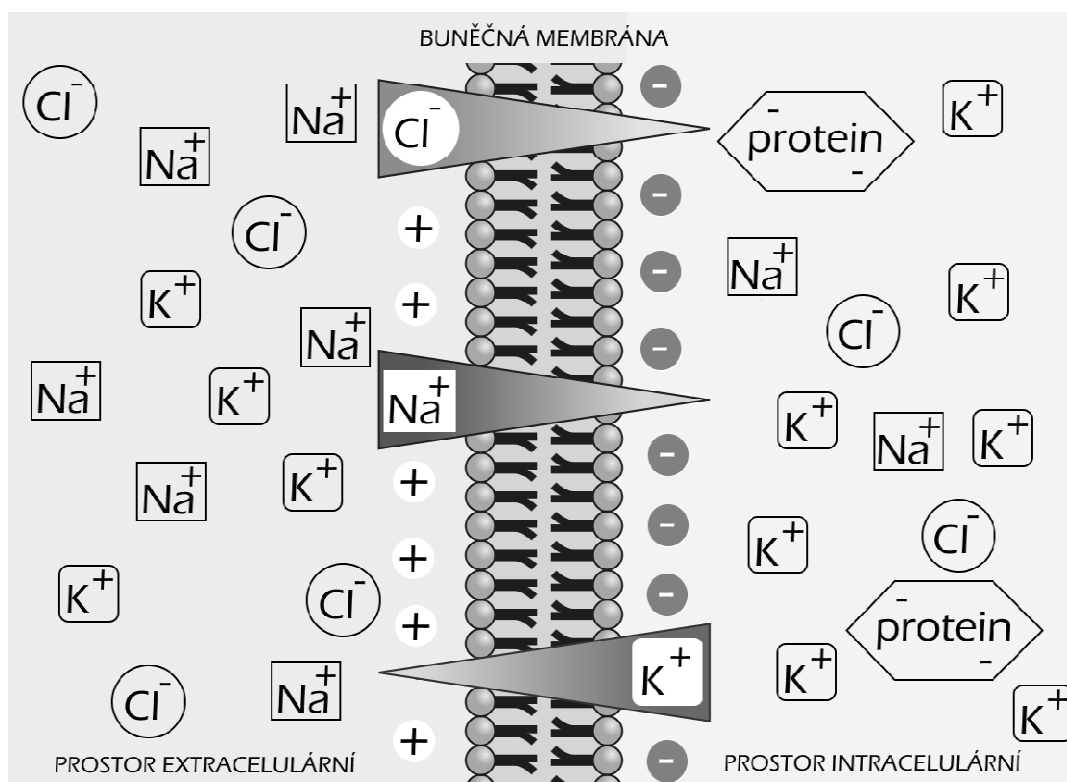


W.H. Nernst

**Membránový potenciál** vzniká na fázovém rozhraní membrána/elektrolyt tehdy, když je membrána prostupná pouze pro některé druhy iontů, a pro jiné nikoli. Jinak řečeno, membrána je propustná pro rozpouštědlo i pro některé ionty, ne však pro všechny. Důsledkem toho je vznik **Donnanova potenciálu** na obou stranách membrány a membránového potenciálu, který je jejich rozdílem ( $\Delta\varphi$ ) a je popsán vztahem:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

odvozeným ze vztahu Nernstova.



*Příklad (Donnanovy) membránové rovnováhy na buněčné membráně. Klíny znázorňují potenciálový spád příslušných iontů. Roztok na jedné straně obsahuje proteiny, které nemohou procházet membránou. Jsou tedy mezi roztoky po obou stranách membrány rozděleny nerovnoměrně, proto bude mezi oběma stranami membrány nenulový potenciálový rozdíl ( $\Delta\varphi \neq 0$ ). Přítomnost iontů, pro které je membrána nepropustná, způsobí nerovnoměrné rozdělení ostatních iontů mezi roztoky na obou stranách membrány.*

## Potenciometrické měření pH

### Elektrody pro měření pH

#### Vodíková elektroda

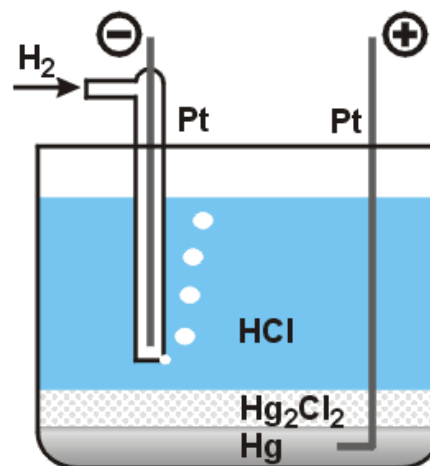
Konvence stanoví, že standardní vodíková elektroda je konstruována jako platinový plíšek, potažený platinovou černí, ponořený do roztoku s aktivitou vodíkových iontů  $a(\text{H}^+) = 1$ , nasyceného vodíkem pod tlakem 101,325 kPa.

Platinová čern katalyzuje disociaci molekulárního vodíku na atomární, který je v rovnováze s vodíkovými ionty podle vztahu:



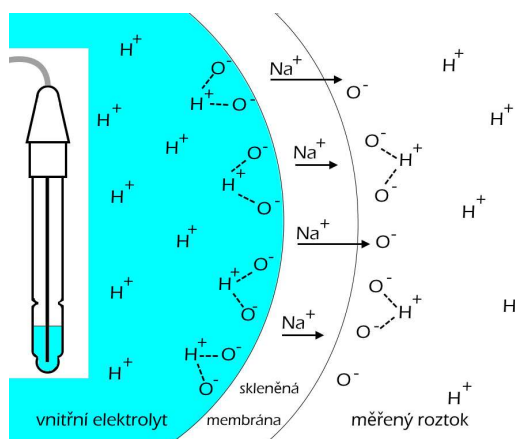
Potenciál vodíkové elektrody uvedené konstrukce je výchozím pro stanovení potenciálů ostatních elektrod. Tzv. **standardní potenciál** vodíkové elektrody se považuje za nulový pro všechny teploty.

Použitím této elektrody byly změřeny relativní elektrodové potenciály kovů ponořených do roztoků vlastních solí. Na jejich základě pak byla *N. N. Beketovem* sestavena **elektrochemická řada napětí kovů**: Li, Rb, K, Na, Ba, Sr, Ca, Mg, Al, Be, Mn, Zn, Cr, Fe, Cd, Co, Ni, Sn, Pb, H, Sb, Bi, As, Cu, Hg, Ag, Pt, Au. Kovy nacházející se vlevo od vodíku vykazují záporný potenciál, kovy vpravo od vodíku potenciál kladný.



#### Skleněná elektroda

Skleněná elektroda je membránová. Membránou je tenkostěnná baňka ze speciálního sodno-vápenatého skla. Vnitřním elektrolytem je pufr (pro udržení konstantního pH), do kterého je ponořena vnitřní referenční elektroda, obvykle argentchloridová. Působením vody z měřeného roztoku dochází k hydrolytickému uvolňování sodíkových kationtů ze skla a jejich výměně za vodíkové kationty z roztoku.



Výhodou skleněné elektrody je, že měření není ovlivňováno přítomností oxidačně-redukčních soustav, iontů těžkých kovů, bílkovin, povrchově aktivních látek nebo některých organických rozpouštědel.

## ***Další typy elektrod pro měření pH***

### ***Metlicko – oxidové elektrody***

Elektrody z kovů (Sb, Bi, Te), jsou tvořeny tyčinkou z čistého kovu, na jehož povrchu se po ponoření do měrného roztoku vytvoří film příslušného oxidu.

### ***Chinhydrónová elektroda***

Je tvořena platinovým drátkem ponořeným do roztoku nasyceného chinhydrónem.

## **Referenční elektrody**

### ***Argentchloridová elektroda***

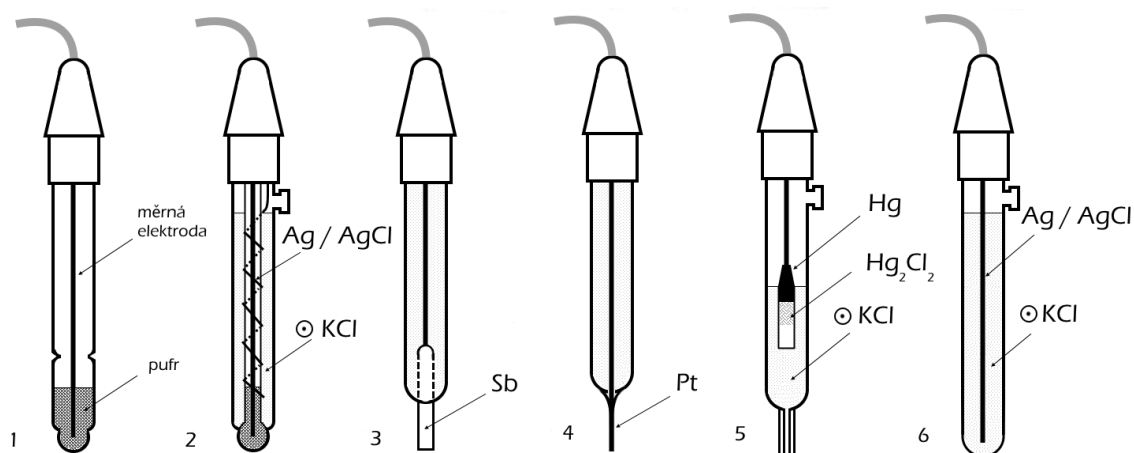
Je tvořena stříbrným drátkem (nebo platinovým drátkem s elektrolyticky vyloučeným stříbrem) pokrytým chloridem stříbrným, ponořeným do roztoku chloridu draselného, nasyceného chloridem stříbrným. Používá se v článku s měrnou elektrodou skleněnou.

### ***Merkurochloridová elektroda***

Je tvořena rtuťovou elektrodou podvrstvenou suspenzí chloridu rtuťného (kalomelu,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) v roztoku chloridu draselného.

## **Kombinované elektrody**

Z praktických důvodů jsou často měrná a srovnávací elektroda spojeny do jednoho celku. Tyto elektrody se nazývají kombinované a dosahují stejné přesnosti a citlivosti jako oddělený elektrodový systém.



*Konstrukční typy elektrod pro měření pH*

*1 – skleněná, 2 – skleněná kombinovaná (s referenční), 3 – antimonová, 4 – platinová,  
5 – merkurochloridová, 6 – argentchloridová*

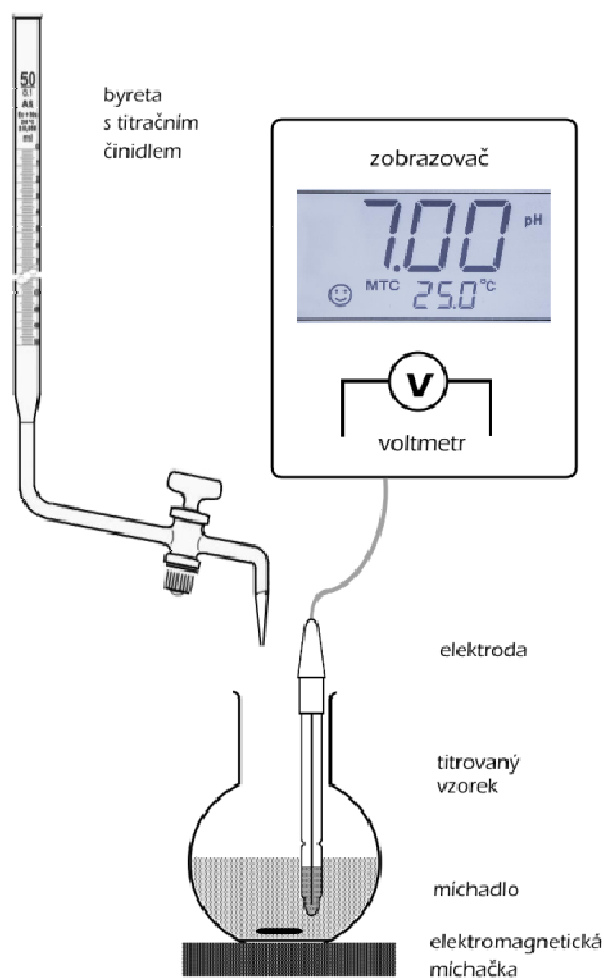
## Přímá potenciometrie

Soubor metod, při kterých se zjišťuje aktivita či koncentrace některého iontu či molekuly pomocí článku tvořeného měrnou a referenční elektrodou, je *potenciometrie přímá*. Článek spolu s voltmetrem měří elektromotorické napětí.

## Potenciometrická titrace (nepřímá potenciometrie)

Při potenciometrické titraci se sleduje závislost potenciálu (u neutralizačních titrací i závislost pH) na objemu přidaného titračního činidla. Průběh titrací neutralizačních, srážecích, komplexních i redoxních je podobný a výsledná titrační křivka má charakteristický esovitý tvar. Spotřeba titračního roztoku v ekvivalentním bodě se odečte z grafu nebo se získá výpočtem. Výhod takto prováděných titrací je několik:

- objektivita
- není nutno použít indikátor
- lze titrovat i roztoky zakalené nebo zbarvené



*Potenciometrická titrace*

## Kalibrace pH-metru

Při potenciometrickém měření pH se provede nejprve kalibrace pH-metru, pak se uskuteční vlastní měření. Kalibrace pH-metru, při níž se dvěma hodnotám napětí naměřeného při použití kalibračních pufrů přiřadí příslušné hodnoty pH.



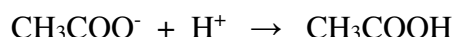
*pH metr*

## Tlumivé soustavy

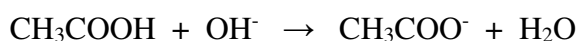
V chemické praxi bývají pro různé účely požadovány roztoky s určitou konkrétní hodnotou pH, kterou si navíc mají zachovat i při působení různých vnějších vlivů. Tento požadavek lze v silně kyselé a silně alkalické oblasti pokrýt vhodným ředěním silných anorganických kyselin resp. hydroxidů. Ve střední oblasti stupnice pH (asi 3 až 11) plní tuto funkci tzv. **tlumivé roztoky**, označované rovněž jako ústočné roztoky, tlumiče, ústoje, nárazníky nebo **pufr** (z něm. Puffer - nárazník). Jak označení napovídá, mají tyto roztoky schopnost podstatným způsobem zmírnit (ztlumit) změnu pH, k níž by jinak vlivem zásahu zvenčí došlo.

Tlumivé soustavy jsou složeny vždy ze dvou složek: slabé kyseliny a její konjugované baze, event. ze slabé baze a její konjugované kyseliny. V prvním případě budou mít obě složky **společný aniont** (např. CH<sub>3</sub>COOH a CH<sub>3</sub>COONa), v druhém případě mají **společný kationt** (např. NH<sub>4</sub>OH a NH<sub>4</sub>Cl).

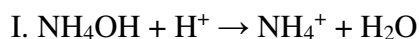
Funkci tlumivých roztoků lze dobře vysvětlit na příkladě acetátového pufru, který je tvořen směsí roztoku kyseliny octové a octanu sodného. Kyselina octová je slabý protolyt a její disociace je ještě více potlačena přítomnými ionty CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, které vznikly disociací její soli. Okyselí-li se tento roztok, pak přidané ionty H<sup>+</sup> zreagují ihned s ionty acetátovými na nedisociovanou CH<sub>3</sub>COOH a pH roztoku se příliš nezmění.



Přidá-li se naopak roztok silné zásady (např. NaOH), proběhne reakce s kyselinou octovou opět bez podstatného výkyvu pH.

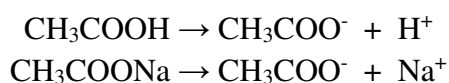


Analogicky se chová i pufr amoniakátový (NH<sub>4</sub>OH / NH<sub>4</sub>Cl). Náraz kyseliny (a tím nutně vyvolanou prudkou změnu pH) ztlumí hydroxid amonný (I.), změnu pH vyvolanou silným hydroxidem ztlumí přítomný chlorid amonný (II.)



### Henderson-Hasselbalchova rovnice

Pufr je soustavou dvou složek se společným aniontem nebo kationtem. Smíchá-li se např. kyselina octová a octan sodný ve vodném prostředí, proběhnou tyto reakce:





Disociační konstanta ( $K_k$ ) kyseliny octové je:

$$K_k = \frac{[CH_3COO^-] \cdot [H^+]}{[CH_3COOH]}$$

Disociace kyseliny octové je silně potlačena přítomnými ionty  $CH_3COO^-$ , takže lze považovat hodnotu  $[CH_3COO^-]$  za látkovou koncentraci soli v celkovém objemu pufru ( $c_s$ ) a hodnotu  $[CH_3COOH]$  za látkovou koncentraci přítomné kyseliny v celkovém objemu pufru ( $c_k$ ).

Po úpravě:

$$K_k = \frac{[H^+] \cdot c_s}{c_k}$$

$$c_{(H^+)} = \frac{K_k \cdot c_k}{c_s}$$

Po zlogaritmování dostaneme konečný výraz označovaný jako **Henderson-Hasselbalchova rovnice**, který slouží k výpočtu pH a složení tlumivých soustav:

$$pH = pK_k + \log \frac{c_s}{c_k}$$

Symbols  $c_s$  a  $c_k$  označují látkové koncentrace složek v celém objemu pufru. Henderson-Hasselbalchovu rovnici lze upravit do tvaru s látkovým množstvím, který lze s výhodou používat ve většině výpočtů:

$$pH = pK_k + \log \frac{n_s}{n_k}$$

Analogicky lze připravit tlumivý roztok pro alkalickou oblast pH a to ze směsi roztoku slabé baze a její konjugované kyseliny, např. z amoniaku a chloridu amonného. Podobnou úvahou jako v předchozím případě je možno odvodit Henderson-Hasselbalchovu rovnici, která má pro tyto případy tvar:

$$pH = 14 - \left( pK_k + \log \frac{n_s}{n_k} \right)$$

K přípravě tlumivých soustav se používají roztoky slabých kyselin a jejich solí, ale vhodné jsou rovněž hydrogensoli, např. dvojice  $NaH_2PO_4$  a  $Na_2HPO_4$ . Sůl s větším počtem atomů vodíku zastupuje kyselinu.

Jiná možnost přípravy pufrů je částečná neutralizace kyselin či zásad vypočítaným množstvím příslušného činidla. Např. v acetátovém pufru lze nahradit octan sodný reakcí kyseliny octové a NaOH, nebo v amoniakátovém pufru chlorid amonný reakcí amoniaku s HCl.

Smícháním několika tlumivých soustav lze získat pufrы účinné v širokém úseku pH. Např.: Britton-Robinsonův universální pufr je směsí  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , k nimž se přidá předepsané množství  $\text{NaOH}$ , což vzhledem k trojsytnosti kyseliny fosforečné představuje pět tlumivých soustav, které pokrývají celou oblast pH v rozmezí 2 až 12. Složení tlumivých soustav se uvádí v různých tabulkách. Pro názornost uvedeme nejběžnější.

Tlumivá soustava	Oblast pH
Kyselina citronová - citrát sodný	$3,06 \pm 1$
Kyselina octová - octan sodný	$4,75 \pm 1$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - a $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$7,21 \pm 1$
$\text{H}_3\text{BO}_3$ - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	$9,24 \pm 1$
$\text{NH}_4\text{OH}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$	$9,25 \pm 1$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{Na}_3\text{PO}_4$	$12,32 \pm 1$
$\text{H}_3\text{PO}_4$ - $\text{CH}_3\text{COOH}$ - $\text{H}_3\text{BO}_3$ - $\text{NaOH}$	1,8 až 12

Význam tlumivých soustav je mimořádný. Uplatňují se při mnoha chemických procesech v roztocích, včetně biochemických a jsou nezbytnou součástí regulačních soustav živých organismů.

## Funkce tlumivých soustav

Úkolem tlumivých soustav je zabránit velkým změnám pH v roztoku. Jejich účinnost omezuje několik činitelů.

Prvním limitujícím faktorem je hodnota disociační konstanty  $\text{p}K_k$  (resp.  $\text{p}K_z$ ). **Maximální pufrovací schopnost** mají takové soustavy, kde je:

$$\begin{array}{ll} \text{pH} = \text{p}K_k & \text{pak je } n_s = n_k \\ \text{resp. } \text{pH} = 14 - \text{p}K_z & \text{pak je } n_s = n_z \end{array}$$

Dobrou pufrovací schopnost mají ještě roztoky, kde je:

$$\frac{n_z}{n_k} = \left( \text{resp. } \frac{n_s}{n_z} \right) = \frac{1}{10} \text{ až } \frac{10}{1}$$

Tento poměr vymezuje tzv. **pufrovací oblast**. Každý jednoduchý pufr je tedy použitelný v rozsahu

$$\text{pH} = \text{p}K_k \pm 1 \quad \text{resp. } \text{pH} = 14 - (\text{p}K_z \pm 1)$$

Dalším činitelem, který ovlivňuje vlastnosti pufru, je **látkové množství jeho složek**. Z Henderson-Hasselbalchovy rovnice plyne, že poměr složek ovlivňuje hodnotu pH, zatímco jejich látkové množství má vliv na kapacitu pufru.

***Pufrovací kapacita udává látkové množství silné kyseliny nebo hydroxidu, které způsobí změnu pH o jednotku.*** Kapacita je závislá na látkovém množství složek pufru. Bude-li pufr obsahovat více soli, bude lépe odolávat náporu kyseliny. Bude-li naopak obsahovat více kyseliny, bude lépe odolávat náporu zásady. Budou-li obě složky zastoupeny stejně, bude na obě strany vyvážený.

Pro pufr se často udává tzv. celková koncentrace pufru, která je dána vztahem:

$$c_p = \frac{n_p}{V_p} = \frac{n_s + n_k}{V_p} \left( \text{resp.} = \frac{n_s + n_z}{V_p} \right)$$

$c_p$  celková koncentrace pufru

$n_p$  celkové látkové množství složek pufru

$V_p$  objem pufru

# Optické metody

Optické metody patří mezi nejvyužívanější analytické metody v biochemické laboratoři. Tyto metody jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s hmotou. Podle toho, zda při interakci dochází k výměně energie mezi zkoumaným vzorkem a zářením, dělíme optické metody na spektrální a nespektrální.

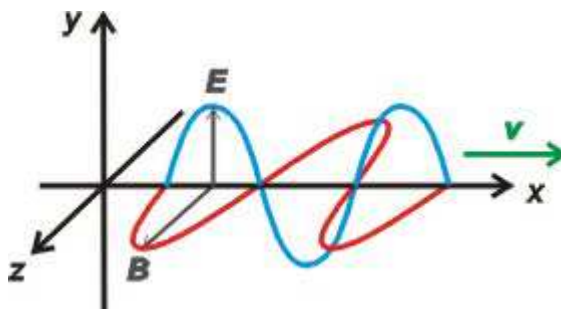
Principem spektrálních metod je výměna energie mezi látkou a zářením. Hmota má schopnost záření charakteristickým způsobem pohlcovat - energii přijímat (kolorimetrie, fotometrie nebo spektrofotometrie, atomová absorpční spektrometrie) nebo naopak vysílat (emisní spektrální analýza, plamenová fotometrie).

U nespektrálních metod nedochází k výměně energie, ale pouze ke změnám určitých vlastností záření. Například může dojít ke změně rychlosti záření (refraktometrie) nebo k otáčení roviny polarizovaného světla (polarimetrie).

Slovo *optika* pochází z řec. **optikós**, což znamená "týkající se vidění", od **óps** znamenající "oko, zrak";  $\delta\phi\theta\alpha\lambda\mu\acute{o}\zeta$  (*ophthalmos*) = oko, zrak, záblesk

## Vlastnosti elektromagnetického záření

**Elektromagnetické záření** je příčné vlnění tvořené dvěma složkami - elektrickou (vektor intenzity elektrického pole  $\vec{E}$ ) a magnetickou (vektor magnetické indukce  $\vec{B}$ ). Obě složky jsou neoddělitelně spjaty a vytvářejí jediné elektromagnetické pole. Tyto složky jsou na sebe navzájem kolmé a jsou kolmé na směr šíření vlnění.



Podstatu elektromagnetického vlnění vyložil ve 2. polovině 19. století **James Clarc Maxwell** (1831–1879, Skotský matematik a fyzik). Z jeho teorie elektromagnetického pole vyplývá, že kolem částic s nábojem, které se pohybují se zrychlením, existuje proměnné elektrické pole vyvolávající zároveň proměnné pole magnetické.



Elektromagnetické záření má duální charakter. Lze jej považovat za vlnění i proud částic, tzv. fotonů.

**Foton** je kvantum energie elektromagnetického vlnění, jako částice má foton nulovou klidovou hmotnost a pohybuje se výhradně rychlostí světla. Světlo se ze zdroje šíří ve vlnoplochách, které mají tvar soustředných kulových ploch. Ve vakuu se světlo šíří rychlostí  $c = 299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $c \approx 3\cdot 10^8\text{ m}\cdot\text{s}^{-1} = 300\,000\text{ km}\cdot\text{s}^{-1}$ ), což je maximální rychlost jakou mohou hmotné objekty dosáhnout. V ostatních prostředích je rychlost světla vždy nižší než ve vakuu.

Elektromagnetické záření je charakterizováno *vlnovou délkou*  $\lambda$ , respektive *frekvencí*  $f$ , která určuje jeho fyzikální vlastnosti. *Vlnová délka*  $\lambda$  určuje barvu světla. Zdroj vyzařující světlo charakterizuje *frekvence*  $f$ . Frekvence se při průchodu světla různými prostředími nemění. Vztah mezi frekvencí a vlnovou délkou udává rovnice:

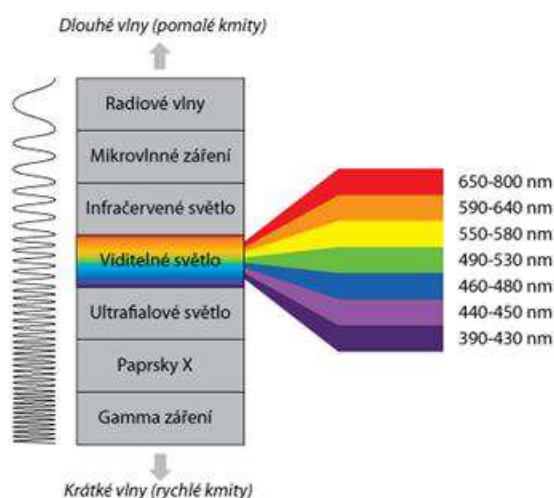
$$f = \frac{c}{\lambda} \quad [s^{-1} = \text{Hz}]$$

kde  $c$  ... rychlost světla ve vakuu,  $3\cdot 10^8\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$   
 $\lambda$  ... vlnová délka [většinou v nm,  $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$ ]

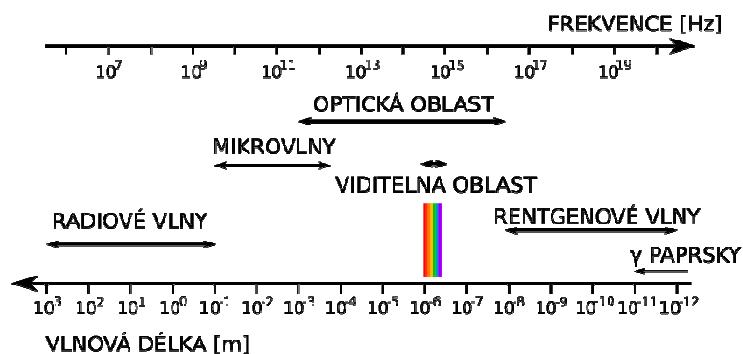
Energie záření je nepřímo úměrná vlnové délce světla ( $\lambda$  = nejmenší vzdálenost dvou bodů kmitajících se stejnou fází). Tzn. čím kratší je vlnová délka, tím vyšší je energie fotonu. Energie fotonu je dána vztahem:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot f \quad [\text{J}]$$

kde  $h$  ... Planckova konstanta,  $6,6252\cdot 10^{-34}\text{ J}\cdot\text{s}$   
 $c$  ... rychlost světla ve vakuu,  $3\cdot 10^8\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$   
 $\lambda$  ... vlnová délka [nm]  
 $f$  ... frekvence [ $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$ ]



Podle vlnové délky lze rozlišit několik druhů záření - záření  $\gamma$ , záření X, ultrafialové záření, viditelné a infračervené záření, mikrovlny a rádiové vlny. Souhrn všech elektromagnetických vln uspořádaných podle stoupající vlnové délky se nazývá **elektromagnetické spektrum** (někdy zvané **Maxwellova duha**). Hranice mezi jednotlivými druhy elektromagnetického záření není ostrá, přechody jsou plynulé nebo se oblasti jednotlivých druhů záření i překrývají.



*Spektrum elektromagnetického záření*

**Světlo** je část elektromagnetického vlnění (**elektromagnetického záření**) vyvolávající v lidském oku stimulaci fotoreceptorů sítnice. Jedná se o frekvenci  $8,0 \cdot 10^{14}$  Hz až  $3,9 \cdot 10^{14}$  Hz, což odpovídá vlnové délce světla ve vakuu od 390 nm do 800 nm. Tento rozsah je viditelným světlem pro člověka. Některé druhy živočichů vnímají jiný rozsah, např. včely jej mají posunutý směrem ke kratším vlnovým délkám (ultrafialové záření), naopak někteří plazi vnímají i infračervené záření.

## Absorpce a emise záření, barevnost látek

V atomech a molekulách se elektrony pohybují v orbitalech, jejichž energie jsou kvantovány. Jestliže elektrony zaujmají nejnižší energetické stavy, říkáme, že jsou v základním stavu. Existují však i další energetické kvantové stavy molekuly, tzv. excitované stavy. Atom nebo molekula může přijmout - absorbovat jen takový foton, jehož energie odpovídá přechodu mezi přítomnými energetickými hladinami. Pokud je látka v excitovaném stavu, může naopak foton odpovídající energie vyzářit - emitovat a navrátit se do základního stavu. Těchto principů využívají spektrální optické metody.

Látky, které neabsorbují záření ve viditelné oblasti, vnímáme jako látky bezbarvé. Pokud látka obsahuje valenční elektron, který může být excitován do vyšší energetické hladiny elektromagnetickým zářením a energetický rozdíl těchto hladin odpovídá energii fotonů vlnové délky ve viditelné části spektra, tato látka se jeví lidskému oku barevná. Barva bude odpovídat barvě doplňkové k barvě absorbovaného světla, viz tabulka.

<i>Absorbovaná vlnová délka [nm]</i>	<i>Barva absorbovaného světla</i>	<i>Barva látky</i>
400 – 435	fialová	žlutozelená
435 - 480	modrá	žlutá
480 - 490	zelenomodrá	oranžová
490 - 500	modrozelená	červená
500 - 560	zelená	purpurová
560 - 580	žlutozelená	fialová
580 - 595	žlutá	modrá
595 - 650	oranžová	zelenomodrá
650 - 670	červená	modrozelená

Na základě chemické struktury lze barevnost předpokládat, jestliže látka obsahuje systém násobných vazeb ( $-CH=CH-CH=CH-$ ), charakteristickou funkční skupinu, např. azoskupinu ( $-N=N-$ ), komplexní sloučeniny s kovem jako centrálním atomem nebo sloučeniny obsahující přechodný kov ve vysokém oxidačním stupni. Toho využívají analytické metody v lékařské chemii a biochemii, např. při průkazu etanolu ve vydechovaném vzduchu lze využít změnu barvy při redukci  $Cr^{6+}$  na  $Cr^{3+}$ . Biuretová reakce využívá tvorby barevných komplexů při stanovení bílkovin, atd.

Optické prostředí označujeme podle toho, jak ovlivňuje šíření světla:

- 1) **průhledné** – v tomto optickém prostředí nedochází k rozptylu, u **čirého** procházejí všechny vlnové délky bez zeslabení, u **barevného prostředí** projde jen jeho určitá vlnová délka, ostatní světlo je pohlceno
- 2) **průsvitné** – zde se část procházejícího světla rozptyluje, dochází ke změně jeho směru šíření (např. matné sklo)
- 3) **neprůhledné** – v tomto prostředí je světlo silně pohlcováno nebo dochází k odrazu (např. při dopadu na zrcadlo)

Pokud má optické prostředí ve všech místech stejné vlastnosti, jedná se o prostředí **homogenní**, jestliže se jeho vlastnosti v různých místech liší, jde o prostředí **nehomogenní**.

Šíří-li se světlo všemi směry prostředí stejnou rychlostí, jde o optické prostředí **izotropní**. U **anizotropního** prostředí je rychlost šíření světla v různých směrech různá a jeho rychlost šíření je tedy závislá na směru (např.  $CaCO_3$ ).

Světlo šířící se ze zdroje může být:

- 1) **monochromatické** – světlo určité frekvence nebo úzké oblasti frekvence jedné určité barvy (*lat. chromos = barva*), tento druh světla se v přírodě nevyskytuje, zdrojem mohou být např. speciální lasery
- 2) **složené** – světlo obsahující vlnění o různých vlnových délkách, běžné světlo, jehož zdrojem je např. žárovka, Slunce nebo zářivky
- 3) **bílé** – část složeného světla, kde jsou zastoupeny pouze složky viditelného záření

**Odraz a lom** světla nastávají na rozhraní mezi dvěma opticky různými prostředími. Každé rozhraní optických prostředí je charakterizováno **indexem lomu**.

**Absolutní index lomu** určuje kolikrát pomaleji než ve vakuu se v daném prostředí světlo šíří (index lomu vakua je 1, ostatní prostředí mají tento index větší).

**Relativní index lomu** udává poměr rychlostí šíření světla ve dvou opticky rozdílných prostředích.

**Index lomu  $n$ :** 
$$n = \frac{c}{v}$$

kde  $c$  ... rychlost světla ve vakuu ( $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , v prvním prostředí)  
 $v$  ... rychlost světla ve druhém prostředí [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

Pro odraz a lom platí dva zákony:

**1. Zákon odrazu:**

Úhel odrazu  $\alpha'$  se rovná úhlu dopadu  $\alpha$  a leží v rovině dopadu.  $\alpha = \alpha'$

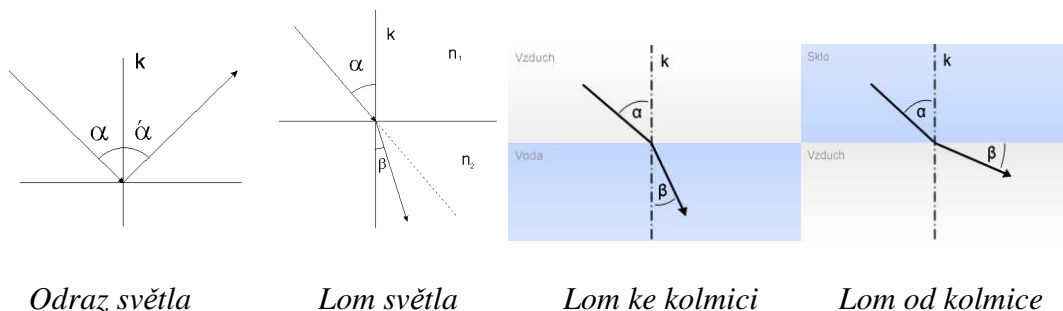
**2. Zákon lomu (Snellův zákon):**

Tento zákon udává vztah mezi úhlem dopadu  $\alpha$  a úhlem lomu  $\beta$ , který leží v rovině dopadu.

$$n_2 \cdot \sin \beta = n_1 \cdot \sin \alpha$$

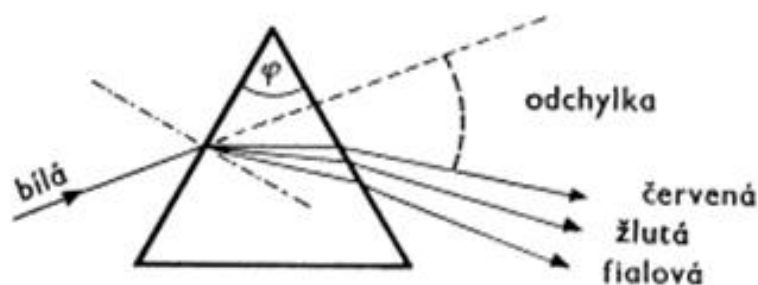
$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2}$$

kde  $\alpha$  ... úhel dopadu  
 $\beta$  ... úhel lomu  
 $v_1$  ... rychlost světla v prvním prostředí  
 $v_2$  ... rychlost světla ve druhém prostředí  
 $n_1$  ... index lomu světla prvního prostředí  
 $n_2$  ... index lomu světla druhého prostředí





Protože platí, že absolutní index lomu je závislý na vlnové délce procházejícího světla, lze bílé světlo rozložit lomem na jednotlivé barvy.



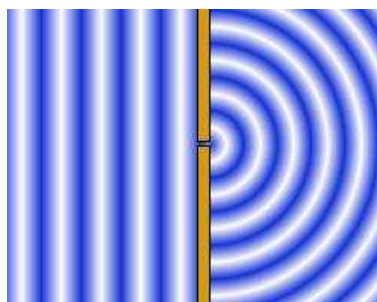
Index lomu roztoku je závislý na jeho koncentraci. Toho využívá refraktometrie, která se dříve využívala v klinické praxi ke stanovení relativní hustoty moči nebo ke stanovení celkové bílkoviny v séru.

## Interference

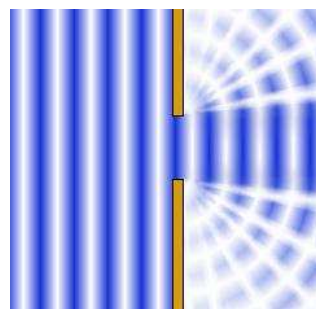
Pokud se prostředím šíří současně více vlnění z různých zdrojů, každé vlnění se chová podle **principu nezávislosti šíření vlnění**, tzn. každé z těchto vlnění se šíří tak, jako by v daném prostředí jiné neexistovalo. Vzhledem k tomuto principu dochází v místě setkání vlnění k jejich skládání a vzniká **složené vlnění**. Tato vlnění se v určitém bodě vzájemně zesilují, zatímco v jiných bodech se vzájemně ruší. Na tomto principu pracují nejjednodušší monochromátory - interferenční filtry.

## Difrakce (ohyb)

Difrakce je ohyb světla na jakékoliv překážce o velikosti srovnatelné s vlnovou délkou záření. Tento jev můžeme sledovat, prochází-li světlo štěrbinou. Dochází k ohybu světla a to se částečně šíří i za překážkou, kam by se šířit nemělo (světlo se šíří i do oblasti geometrického stínu). Protože hranice mezi světlem a stínem není ostrá, vytvoří se **ohybový (difrakční) obrazec**, což je soustava nestejně širokých světlých a tmavých pruhů. Na principu difrakce pracuje rentgenová strukturní analýza, což je metoda studující prostorovou strukturu makromolekul např. enzymů nebo nukleových kyselin. *Roku 1959 byla analyzována touto metodou struktura hemoglobinu.*



*Difrakce na bodové štěrbině*



*Difrakce malé štěrbině*

*Ohyb světla jako první pozoroval kolem roku 1660 **Francesco Maria Grimaldi** (italský matematik). Ten nechal do zatemněné místnosti dopadat sluneční světlo malým kruhovým otvorem a do dráhy tohoto světla umisťoval různé předměty. Zjistil, že stíny jsou neostře a navíc ohraničené barevnými proužky.*

## **Fotoelektrický jev**

Na tomto principu pracují detektory záření ve spektrofotometrech. Jedná se o fyzikální jev, tzv. fotoelektrickou emisi, kdy jsou v důsledku absorpce elektromagnetického záření z látky (nejčastěji z kovu) uvolněny (emitovány) elektrony (fotoelektrony). Pokud tento jev probíhá na povrchu látek, vlivem vnějšího elektromagnetického záření se fotoelektrony uvolňují do okolí, jedná se o **fotoelektrický jev vnější**, a využití tak nachází v solární energii. Tento jev však může probíhat i uvnitř látky, uvolněné elektrony potom látku neopouštějí, zůstávají jako **vodivostní elektrony**, potom hovoříme o **fotoelektrickém jevu vnitřním**, což se uplatňuje např. u polovodičů.

## Absorpční spektroskopie

Spektroskopie je rozsáhlý obor, který zkoumá vlastnosti a použití optických spekter. Podle toho, zda zkoumá vznik (emisi) nebo absorpci fotonů, rozdělujeme spektroskopii na emisní a absorpční. Podle povahy zkoumané látky lze spektroskopii rozdělit na atomovou a molekulovou. Při těchto metodách se využívá záření v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) nebo infračervené (IR) oblasti spektra.

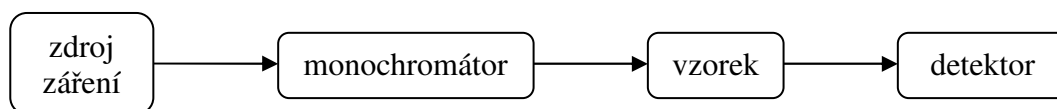
Spektroskopické metody patří mezi nejstarší a dosud nejpoužívanější nástroje analytické chemie. Využívají se jak pro strukturní analýzu, tak pro stanovení koncentrace látek.

### Historie

Základy k pevnému zakotvení spektroskopie v chemii položili **Gustav R. Kirchhoff** (vlevo) a **Robert W. Bunsen** (vpravo) objevem metody emisní spektrální analýzy v roce 1859. Tuto metodu použili k doplnění periodického systému o dva nové prvky alkalických kovů – cesium (1860) a rubidium (1861). Z našich chemiků se s metodou spektrální analýzy seznámil během ročního pobytu v Bunsenově universitní laboratoři v Heidelbergu (1878–1879) **Bohuslav Brauner** (1855–1935), který pak v letech 1881–1882 v laboratoři Sira Henry Roscoe v Manchesteru metodou absorpční spektroskopie identifikoval v separovaných frakcích didymu (směsi praseodymu a neodymu do té doby považované za jeden z prvků této skupiny), dva nové prvky skupiny vzácných zemin (1882). Izolované frakce didymu, označil Brauner jako *Dia* a *Diβ*. Tento postup později reprodukoval **Auer von Welsbach** a nazval tato chemická individua praseodym a neodým (1885).

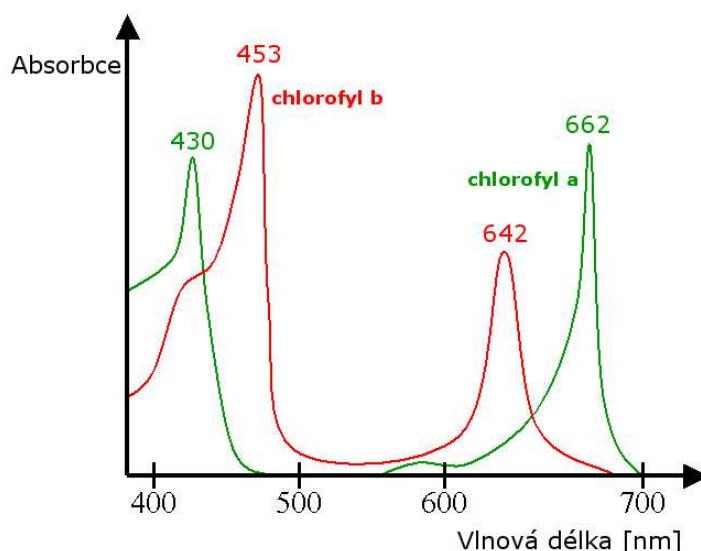


Absorpční spektrometrii si můžeme znázornit následujícím obecným schématem:

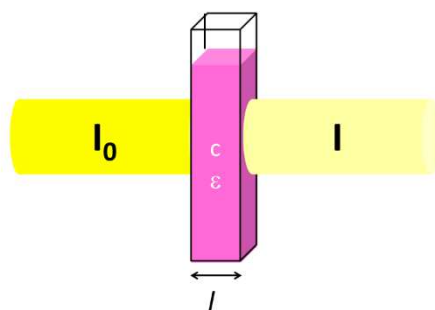


Při absorpci elektromagnetického záření (světla) nastává interakce elektrické složky záření s elektrickým polem molekuly, které je vytvářeno pohybujícími se elektrony kolem jednotlivých jader atomů. Elektrony se pohybují v orbitalech, jejichž energie jsou kvantovány. Jestliže elektrony zaujmají nejnižší energetické stavy, říkáme, že jsou v základním stavu. Podmínkou absorpce světelného záření je existence dalších energetických kvantových stavů molekuly, kterým říkáme excitované stavy. Jinými slovy, absorbuje-li molekula světelné záření, zaujmou elektrony vyšší energetické hladiny a dostanou se do excitovaného stavu a molekula tak změní svůj elektronový stav. Pravděpodobnost přechodu určuje zároveň velikost absorpce.

Veličinu, která charakterizuje pravděpodobnost přechodu, nazýváme **molární absorpční koeficient**  $\epsilon$ . Tento koeficient charakterizuje strukturu sloučeniny a nezávisí na koncentraci látky. Závislost molárního absorpčního koeficientu, resp. absorbance na vlnové délce použitého záření nazýváme **absorpční spektrum**. Absorpční spektrum jedné látky se obvykle skládá z více než jednoho pásu. Jednotlivé pásy odpovídají určitým částem struktury molekuly. Pásky mohou být odděleny nebo se mohou překrývat.



Všem absorpčním metodám je společný princip: měříme poměr intenzity záření, kterým vzorek ozařujeme, a intenzity záření, které vzorkem prošlo.



Zavádíme veličinu **transmittance**  $T$  (**propustnost**) vztahem:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

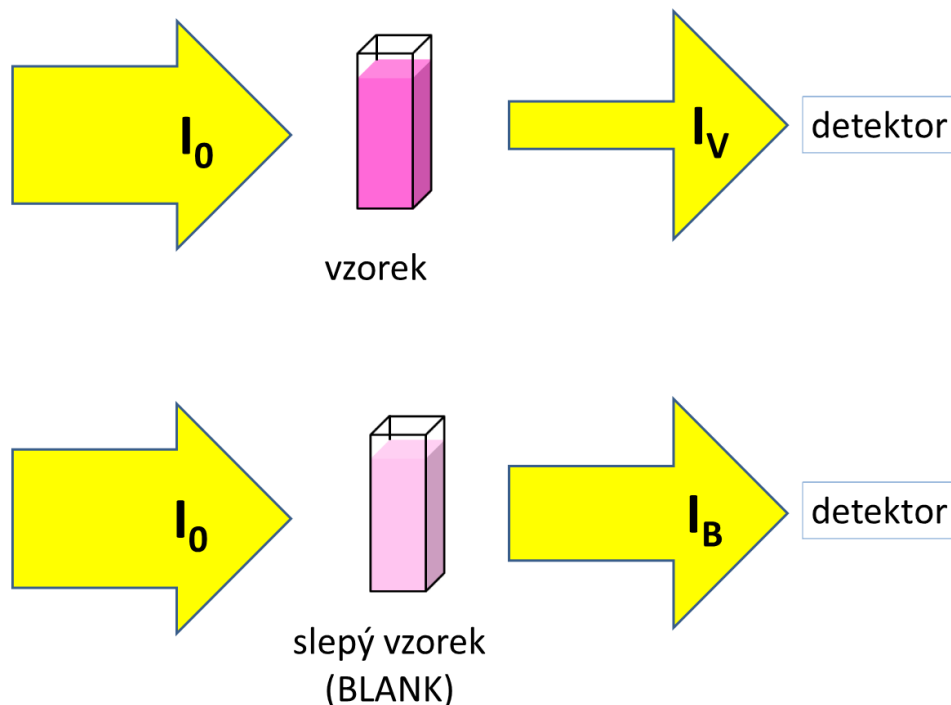
$T$  ... transmittance

$I$  ... intenzita světla, které prošlo vzorkem

$I_0$  ... intenzita světla, které do vzorku vstoupilo

Kromě vlastností vzorku je intenzita záření dopadajícího na detektor ovlivněna i absorpcí a odrazem světla na stěnách květy a v optice fotometru, prostředím, v němž probíhá měření atd. Proto se obvykle měří transmittance relativně vzhledem ke slepému vzorku (blank,

porovnávací roztok), tj. roztoku obsahujícímu všechny složky vyjma stanovované látky. V praxi se tedy nejprve změří intenzita světla procházejícího slepým vzorkem, potom se za stejných podmínek měří intenzita světla procházejícího analyzovaným vzorkem.



*Princip měření absorpčním spektrofotometrem*

Transmittance je pak definována vztahem

$$T = \frac{I_v}{I_b}$$

$T$  ... transmittance

$I_v$  ... intenzita světla, které prošlo vzorkem

$I_b$  ... intenzita světla, které prošlo slepým vzorkem

Měří-li se transmittance tímto způsobem, není třeba se zabývat nespecifickými ztrátami intenzity světla. Intenzita světla, které prochází slepým vzorkem, se považuje za 100 % (tj. transmittance blanku je 100 %) a transmittance vzorků absorbujících světlo dané vlnové délky je vždy menší než 100 %.

Ve spektrofotometrii se častěji než transmittance používá k popisu absorpce záření veličina **absorbance** ( $A$ , ve starší literatuře extinkce,  $E$ ). Udává, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem.

Absorbanci můžeme definovat na základě transmittance jako:

$$A = -\log T = \log 1/T$$

*A ... absorbance*

*T... transmittance téhož vzorku za stejných podmínek*

Z definice transmittance vyplývají pro absorbanci vztahy:

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

*I<sub>0</sub> ... intenzita světla vstupujícího do vzorku*

*I ... intenzita světla ze vzorku vystupující*

Z výše uvedených rovnic je zřejmé, že nulovou absorbanci bude mít vzorek, který nepohlte žádné světlo (tj. blank). Absorbance, stejně jako transmittance, je bezrozměrná veličina.

Pokud roztok absorbuje určitou vlnovou délku viditelného spektra (viz prostřední sloupec tabulky), jeví se nám tento roztok jako barevný. Ostatní vlnové délky roztokem projdou, avšak pozorované zbarvení roztoku je dáno tzv. doplňkovou (komplementární) barvou k barvě pohlcené (viz sloupec vpravo).

<b>vlnová délka (nm)</b>	<b>absorbovaná část VIS spektra</b>	<b>komplementární - propuštěná barva</b> (= určuje zbarvení roztoku)
400 - 430	fialová	žlutá
430 - 475	modrá	žlutooranžová
475 - 495	zelenomodrá	oranžová
495 - 505	modrozelená	červenooranžová
505 - 555	zelená	červená
555 - 575	žlutozelená	purpurová
575 - 600	žlutá	fialová
600 - 650	oranžová	modrá
650 - 700	červená	zelená

Absorbance roztoku záleží na:

- vlastnostech absorbující látky
- vlnové délce procházejícího světla
- na teplotě
- na tloušťce květy
- množství absorbující látky, tj. na její koncentraci v roztoku

Pro využití spektrofotometrie pro kvantitativní analýzu je klíčový vztah mezi absorbancí a koncentrací látky, který popisuje **Lambert-Beerův zákon**:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$\epsilon$  ... molární absorpční koeficient [ $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$l$  ... tloušťka vrstvy [cm]

$c$  ... látková koncentrace absorbující látky [mol/l]

Zákon platí pro monochromatické světlo. Výhodou je, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky. Molární absorpční koeficient ( $\epsilon$ ) je pro danou látku konstantou, která závisí na teplotě a především na vlnové délce. Běžně se jeho hodnota nezjišťuje, neboť se pracuje buď paralelně se standardem o známé koncentraci, nebo se využívá tzv. kalibračních křivek.

**August Beer** (1825–1863, německý fyzik, chemik a matematik, který se věnoval převážně optice) poprvé matematicky formuloval závislost transmitance na koncentraci. Za předpokladu použití monochromatického světla platí:

$$T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$$

$T$  ... transmittance

$\epsilon$  ... molární absorpční koeficient

$l$  ... optická délka kyvety (tloušťka vrstvy)

$c$  ... látková koncentrace absorbující látky

Algebraickými úpravami můžeme získat vztahy:

$$\log T = -\epsilon \cdot l \cdot c \quad \text{nebo} \quad -\log T = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Poslední vztah se označuje jako **Lambert-Beerův zákon**.

(*Johann Heinrich Lambert*, 1728–1777, švýcarský matematik, fyzik, astronom a filozof).



## Stanovení koncentrace

Spektrofotometrické stanovení koncentrace roztoků lze provádět v zásadě dvojím způsobem:

### 1. Metoda kalibrační křivky

Tato metoda se používá tehdy, nacházejí-li se koncentrace vzorků v širším koncentračním rozmezí. Připraví se základní roztok, jehož koncentrace je větší než předpokládané koncentrace vzorků. Z něho se vhodným ředěním získají kalibrační roztoky. Při ředění se používá buď metody pravidelného přírůstku (např. 1/10, 2/10, 3/10, ... původní koncentrace základního roztoku) nebo metody poměrné (např. zředění 3:1, 2:3, 1:2, 1:3, 1:4, apod.). Kalibrační roztoky se zpracují stejným způsobem jako vlastní vzorky a zjistí se jejich absorbance. Získané hodnoty se vynesou do grafu. Na osu  $x$  se nanese koncentrace kalibračních roztoků ve stejných jednotkách, jaké se požadují u vzorků (nejčastěji v mol/l, mmol/l nebo g/l), na osu  $y$  se nanese absorbance. Měřítko na osách se zvolí tak, aby výsledná kalibrační křivka svírala s osou  $x$  úhel přibližně  $45^\circ$ . Dále je praktické zvolit délky na grafu ve vhodném poměru k nanášené veličině (např. 1 cm na ose  $x$  odpovídá koncentraci 10 mmol/l, 1 cm na ose  $y$  odpovídá absorbanci 0,01 apod.).

### 2. Metoda paralelního standardu

Tato metoda je vhodná v těch případech, kde se koncentrace vzorků pohybují v určitém, poměrně úzkém rozmezí, což je např. běžné v klinické biochemii při analýze séra, mozkomíšního moku a dalších tělních tekutin. V tomto případě se připraví standard, jehož koncentrace obvykle odpovídá normální hodnotě sledované složky. Standard i vzorky se zpracují stejným způsobem a za stejných podmínek se změří absorbance.

Pak platí:

$$A_v = \varepsilon \cdot c_v \cdot l$$

$$A_{st} = \varepsilon \cdot c_{st} \cdot l$$

Odtud:

$$\frac{A_v}{A_{st}} = \frac{c_v}{c_{st}}$$

$$c_v = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st}$$

### ***Spektrofotometr***

Pro měření veličin jako absorbance a transmitance se používají fotometry a spektrofotometry. Jednodušší zařízení, které měří při jedné vlnové délce nebo úzkém pásu vlnových délek (možno vymezit barevným filtrem), označujeme jako *fotometr*. Technicky složitější a dokonalejší přístroje, které umožňují vlnovou délku libovolně nastavit, se nazývají *spektrofotometry*.

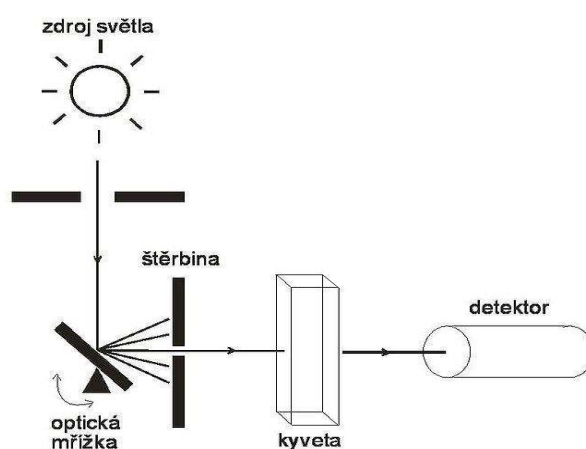


Principiálně se fotometr i spektrofotometr skládá ze čtyř částí:

1. zdroj světla
2. monochromátor
3. oddíl, ve kterém je umístěn vzorek
4. detektor

### **Princip**

Spektrofotometr se skládá ze **zdroje bílého světla**, za kterým následuje **monochromátor** (například **difrakční (optická) mřížka**), jehož úkolem je rozložit bílé světlo na jednotlivé složky. Záření o konkrétní vlnové délce se vybírá pomocí štěrbin. Monochromatické světlo prochází **vzorkem** (v kyvetě) a dopadá na **detektor** záření, který měří jeho intenzitu.



*Uspořádání a funkce fotometru*

### **Kyvety**

Většinou se pracuje s roztoky, které se plní do tzv. kyvet. Kyvety se v přístroji umísťují do prostoru, který zajišťuje jejich přesnou polohu, může být temperován a někdy obsahuje i magnetickou míchačku, pomocí níž lze po vložení míchadélka do kyvety promíchávat její obsah během měření. U některých typů přístrojů je možné vložit najednou několik kyvet, které se pak automaticky vsunují do optické dráhy. Přesnost stanovení je ovlivněna:

- výběrem vhodné kyvety - zvolená vlnová délka musí ležet v pásmu, pro které je kyveta určena
- čistotou kyvety - po naplnění destilovanou vodou musí být absorbance u všech kyvet stejná; kyveta musí být zvenčí suchá
- homogenitou vzorku - vzorek musí být dostatečně promíchaný, uvnitř nesmí zůstat bublinky vzduchu (*kapka stékající po kyvetě, bublinky, plovoucí sraženina nebo sedimentace vzorku se projeví obvykle neustále se měnící absorbancí*)
- dostatečným naplněním kyvety vzorkem – na kyvetě bývá ryska určující minimální výšku hladiny vzorku

Měří-li se více vzorků postupně v jedné kyvetě, je třeba pracovat tak, aby chyba způsobená zbytky předchozího roztoku byla co nejmenší. Obvykle se kyveta mezi vzorky vyplachuje destilovanou vodou a pak se co nejlépe vysuší. Přesnějších výsledků dosáhneme, pokud se kyveta po vymytí ještě propláchne malým množstvím vzorku, který se vylije a pak teprve se kyveta naplní potřebným množstvím vzorku pro měření. Pokud se pracuje s několika podobnými roztoky, může být přesnější kyvety mezi nimi neproplachovat destilovanou vodou.

Kyvety se vyrábí z různých materiálů a mohou mít různé provedení. Kyvety z optického skla (zpravidla označované OG = optical glass, G = glass apod.) se hodí pro měření ve viditelné části spektra. Pro měření v UV oblasti je třeba použít kyvet z křemenného skla (Q = quartz, UV).

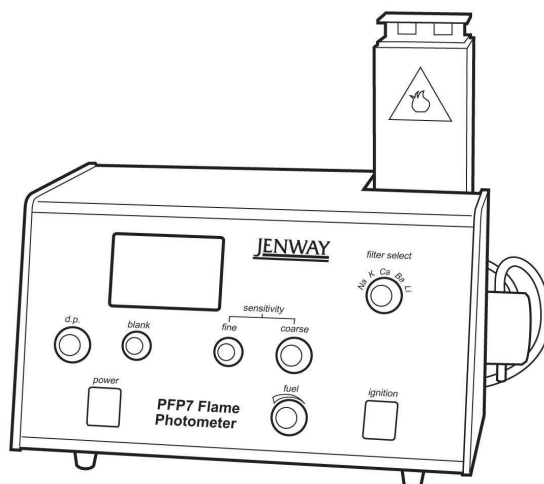
*Kyvety jsou však relativně drahé – z optického skla stojí řádově stovky až tisíce korun, cena běžné kyvety z křemenného skla se pohybuje kolem čtyř až pěti tisíc korun. Přitom je životnost kyvet omezená, navíc jejich údržba je poměrně pracná. Z těchto důvodů se pro běžná měření používají jednorázové plastové kyvety, jejichž cena bývá jen několik korun, na druhou stranu s nimi lze spolehlivě měřit s přesností jen na dvě až tři desetinná místa (což je však pro většinu aplikací plně postačující). Většinou se vyrábějí z polystyrenu (PS) – pro viditelnou část spektra, nebo z polymetylmakrylátu (PMMA) – i pro část UV oblasti.*



Standardní kyvety mají vnitřní rozměr 1×1 cm a výšku 3 - 4 cm a plní se podle uspořádání fotometru a výšky paprsku nad dnem kyvety. Často se také používají kyvety se zúženým prostorem, ve kterých je možno měřit i mnohem menší objemy vzorku (stovky až jednotky mikrolitrů).

## Plamenová fotometrie

Zástupcem emisních spektrálních metod je *plamenová emisní spektrofotometrie, flame atomic emission spectroscopy (FAES)*. Je jednou z metod pro měření koncentrací iontů sodíku, draslíku, lithia, příp. také vápníku a cesia v biologických tekutinách.



Základní části optického emisního spektrometru jsou:

- budící zdroj - dodává energii potřebnou pro vyvolání emise záření atomy vzorku
- monochromátor
- detektor

Analytickým výstupem je emisní čárové spektrum, ve kterém poloha čáry charakterizuje kvalitativní složení vzorku a intenzita čáry charakterizuje množství vzorku.

*Plamenová fotometrie* se používá ke stanovení obsahu prvků I.A a II.A skupiny periodické tabulky, neboť energie potřebná k excitaci jejich valenčních elektronů není tak vysoká jako u jiných prvků a postačuje k ní tedy teplota plamene. Některé alkalické kovy a kovy alkalických zemin charakteristicky zbarvují plamen hořící směsi vhodného paliva a okysličovadla. **Lithium** barví plamen **červeně**, **sodík žlutě**, **draslík fialově**, **vápník cihlově červeně** a **cesium modrofialově**. Intenzita zbarvení plamene je přímo úměrná koncentraci iontů ve vzorku.

Vzorek se do plamene dopravuje ve formě aerosolu. Elektrony nejvyšší obsazené hladiny přítomných prvků (**valenční elektrony**) se teplem budícího zdroje excitují a zaujmou na zlomek sekundy vyšší energetickou hladinu. Při návratu do původních drah, v chladnější části plamene, potom vyzáří (emitují) světlo, jehož vlnová délka je pro každý prvek charakteristická. Emisní spektra jsou čárová a počet čar je u výše uvedených prvků nevelký. Hlavní emisní čáry využívané pro měření leží ve viditelné oblasti spektra. Charakteristické čárové spektrum vysílá prvek pouze tehdy, když je v plamenu přítomen jako volný atom. Energie plamene musí rozrušit chemické vazby a kation prvku musí přejít do stavu volného atomu. Množství atomů dotyčného prvku, *tzv. stupeň atomizace*, závisí na teplotě plamene a na složení hořící směsi. Počet excitovaných atomů představuje vždy pouze asi 10 % z celkového počtu přítomných atomů.

# Enzymologie

## OBECNÉ VLASTNOSTI ENZYMŮ

Prakticky veškeré biologicky významné chemické reakce jsou katalyzovány. Dosahuje se toho pomocí specifických biokatalyzátorů známých jako *enzymy*. Enzymy jsou schopny zvýšit rychlost reakce, která probíhá v té které buňce nebo tkáni. Je třeba připomenout, že enzymy nemění chemickou rovnováhu a rovněž nemění celkový energetický příjem nebo výdej v průběhu reakce. *Enzymy zvyšují reakční rychlost tím, že snižují aktivační energetickou bariéru reakce.*

Téměř všechny známé enzymy jsou *bílkoviny*. Relativní molekulová hmotnost enzymů se nachází ve velmi širokém rozmezí. Např. enzym ribonukleasa je poměrně malý a jeho molekulová hmotnost je přibližně 13700. Naproti tomu jeden z glykolytických enzymů, aldoláza, má molekulovou hmotnost přibližně 156 000, skládá se ze čtyř podjednotek, každá o molekulové hmotnosti přibližně 40000. Pyruvátdehydrogenáza, která katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-KoA, je multienzymový komplex, v němž jsou jednotlivé komponenty tak pevně propojeny, že celý systém může být izolován jakožto kompletní funkční jednotka z mnoha tkání. Tento komplex izolovaný z prasečího myokardu má molekulovou hmotnost přibližně  $1 \times 10^7$ . Obsahuje minimálně 42 jednotlivých molekul, včetně několika důležitých kofaktorů. Celá tato struktura pyruvátdehydrogenázového komplexu je nezbytná pro katalytickou funkci.

Vedle proteinové části mnohé enzymy vyžadují pro svoji katalytickou funkci též neproteinovou složku. Tyto přídatné části jsou nazývány různě, a to *prosthetické skupiny*, *kofaktory*, nebo *koenzymy*. Termínem *prosthetická skupina* se označuje ta část molekuly bílkoviny, která není tvořena aminokyselinami, a která bílkovinu dává určitou specifickou vlastnost. Tyto prosthetické skupiny mohou být připojeny k bílkovinné části buď kovalentně (hem v cytochromech) nebo nekovalentně (hem v hemoglobinu). Termín *kofaktor* je také poměrně široce definován. Malé organické molekuly, jako třeba fosfolipidy, jsou někdy zcela podstatné pro udržení správné prostorové konformace proteinové části enzymu, která je vhodná pro katalytický účinek, aniž by se příslušný fosfolipid nějak sám na katalýze podílel. Některé enzymy vyžadují jako kofaktor aniont (např. chloridový), častěji ale kationt (např. hořečnatý). Přítomnost kovového iontu v proteinové struktuře je nezbytná pro řadu enzymů obecně označovaných jako *metaloenzymy* (např. karbonátdehydrodratáza obsahuje v každé molekule atom zinku). Termín *koenzym* se používá pro řadu organických molekul, nezbytných pro aktivitu některých enzymů, které bývají velice často odvozené od různých vitaminů. Koenzym bývá obvykle pevně připojen k proteinové části příslušného enzymu, takže při pokusu jej izolovat, dochází poměrně často k denaturaci vlastního enzymu. V některých případech je koenzym vázán tak slabě, že se dá separovat od proteinové části enzymu pouhou dialýsou. Koenzymy se vždy podílejí na katalytické reakci. Kompletní funkční komplex, zahrnující jak proteinovou část enzymu, tak všechny další přídavné složky jakéhokoliv druhu, se nazývá *holoenzym*. Naopak, pouze proteinová část, bez dalších kofaktorů, je nazývána *apoenzym*.

Pravděpodobně nejnápadnější vlastností enzymů je jejich *specifita*, která ovšem nemusí být vždy absolutní. Ureáza nebo kataláza jsou příklady enzymů s absolutní specifitou vůči svým substrátům, na druhé straně kupř. chymotrypsin vykazuje poněkud nižší specifitu, když štěpí peptidové vazby, na nichž se podílejí aromatické aminokyseliny.

Enzymy získané izolací ze svých přirozených zdrojů se mohou použít *in vitro* k detailním studiím těch reakcí, které katalyzují. Reakční rychlost se totiž může měnit v důsledku změn takových parametrů jako je pH nebo teplota, nebo v důsledku rozdílného iontového složení reakčního prostředí, ale i v důsledku přidání různých ligandů, dokonce jiných nežli je substrát nebo koenzymy. Vzhledem k tomu, že struktura proteinu určuje jeho enzymovou aktivitu, pak cokoliv, co narušuje proteinovou strukturu, vede ke změnám enzymové aktivity. Denaturace proteinu, což je vlastně vznik náhodného prostorového uspořádání, může být vyvolána různými způsoby. Vyvolá ji jednak teplo, jednak chemikálie, které ruší vodíkové můstky v proteinové struktuře, jako třeba močovina ve vysoké koncentraci, detergeny jako např. dodecylsulfát sodný, nebo thiolové (sulfhydrylové) reagenty jako např. mekaptoethanol. Enzymy často vykazují velkou *tepelnou citlivost*. Jestliže se zahřejí na teplotu nad 50 °C, pak většina enzymů, i když ne všechny, denaturují. Denaturace vysokou teplotou je zpravidla ireverzibilní. Dokonce i za podmínek, kdy denaturace ještě nenastává, většina enzymů vykazuje určité teplotní optimum, při němž je aktivita maximální. Změny aktivity nad a pod teplotní optimum nemusí mít vždy symetrický charakter.

Enzymová aktivita má rovněž úzký vztah k míře ionizace vlastní struktury, především její proteinové části, neboť polypeptidové řetězce obsahují funkční skupiny, jejichž stupeň ionizace závisí na převažujícím pH prostředí. Tak jako to platí pro proteiny obecně, mají i enzymy svůj isoelektrický bod, při němž je jejich souhrnný náboj nulový. pH tohoto *isoelektrického bodu* (pI) prakticky nikdy není totožné s hodnotou pH, při níž enzym vykazuje maximální aktivitu. Ionizace funkčních skupin je zpravidla rozhodující pro konformaci enzymu a pro zformování aktivního centra. *Optimální pH* enzymů může být značně rozdílné. Pepsin, který existuje v kyselém prostředí žaludeční šťávy, má optimální pH 1,5, na druhé straně argináza, která štěpí aminokyselinu arginin, má pH optimum 9,7. Avšak většina enzymů má své pH optimum mezi hodnotami 4 a 8. Některé enzymy vykazují širší toleranci, pokud jde o pH prostředí, jiné fungují pouze v úzkém rozmezí pH. Jestliže je enzym vystaven extrémním hodnotám pH, je zpravidla denaturován. Značná citlivost řady enzymů ke změnám pH je jedním z důvodů, proč musí být pH vnitřního prostředí organismu tak pečlivě řízeno a proč jeho změny mohou vyvolat tak závažné důsledky.

Enzymy se liší od ostatních proteinů hlavně tím, že obsahují tzv. *aktivní katalytické centrum*. Toto aktivní centrum je tvořeno relativně malým počtem aminokyselinových zbytků, a to takovými, které nenásledují bezprostředně za sebou z hlediska primární struktury proteinu. Nicméně tyto aminokyseliny spolu vzájemně reagují takovým způsobem, že umožňují katalyzovanou reakci. S ohledem na složitý a v podstatě individuální způsob, jakým jsou peptidové řetězce prostorově uspořádány, mohou se takové aminokyseliny, které jsou z hlediska primární struktury značně vzdálené, podílet na funkci aktivního centra. Na druhé straně to ale zároveň znamená, že nevelká strukturální změna může způsobit ztrátu potřebného kontaktu aminokyselin tvořících aktivní centrum. To je i důvodem toho, že někdy i mírné vlivy mohou způsobit denaturaci enzymu.

Některé enzymy, především ty, které mají mohutný nevratný účinek (např. proteolytické enzymy trávicího traktu, enzymy kaskády srážení krve aj.) jsou syntetizovány v podobě neaktivních prekursorů, zvaných *proenzymy* nebo též *zymogeny*. Typický aktivizační mechanismus je vyštěpení peptidového fragmentu s následnou změnou konformace, při níž se vytvoří aktivní centrum.

U mnoha biologických druhů, člověka nevyjímaje, byly izolovány z téže nebo z různých tkání různé molekulární formy enzymů, zvané *isoenzymy* nebo *isozymy*. Laktátdehydrogenáza (LDH) a malátdehydrogenáza jsou příklady detailně studovaných isoenzymů. LDH je složena ze čtyř podjednotek. Dva typy podjednotek, které jsou výrazem dvou velmi podobných genů a které se poněkud liší svým aminokyselinovým složením a sekvencí, se mohou kombinovat ve čtyřech podjednotkách pěti možnými způsoby. Jestliže jeden typ podjednotky označíme *M* (jedná se o hlavní typ, přítomný ve svalcích – muscle a v játrech) a druhý typ označíme *H* (hlavní forma přítomná ve srdečním svalu – heart), pak možné tetramery budou mít složení  $M_4$ ,  $M_3H$ ,  $M_2H_2$ ,  $MH_3$  a  $H_4$ . Tyto frakce lze oddělit elektroforézou. U člověka se liší obsah jednotlivých isoenzymů v játrech a v srdci, což se dá využít v diferenciální diagnóze při onemocnění těchto orgánů.

## KINETIKA ENZYMOVÉ REAKCE

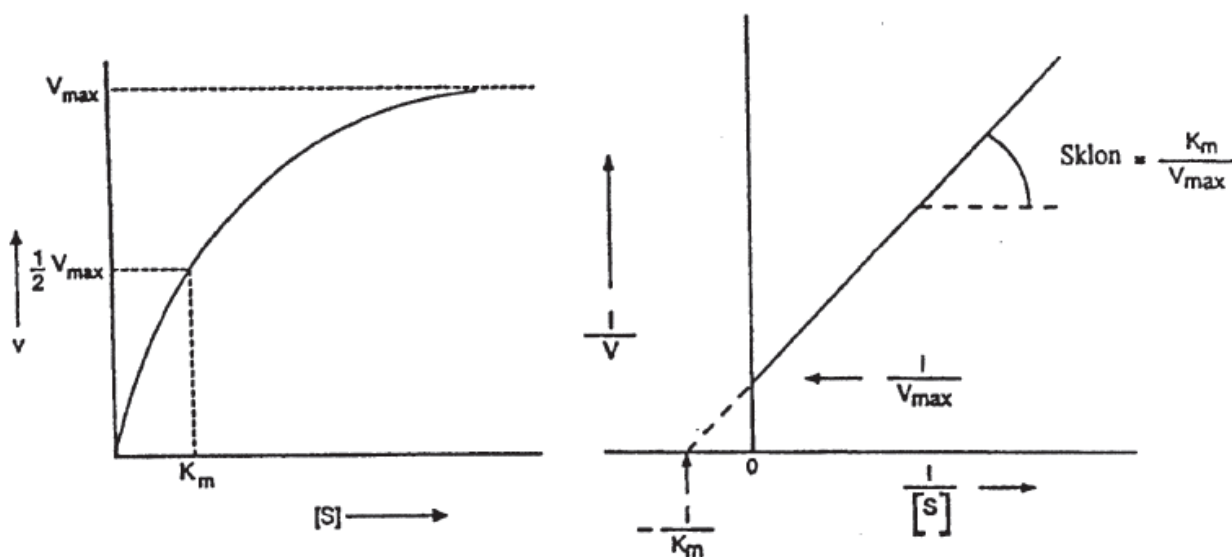
Již dříve bylo řečeno, že enzymy urychlují chemické reakce svým katalytickým působením. Podívejme se proto na některé kvantitativní aspekty enzymové reakční kinetiky. Analýza enzymové reakce závisí většinou na stanovení reakčních časů. Jestliže budeme stanovovat *počáteční reakční rychlost* (tj. rychlost měřenou v době, kdy je koncentrace produktu ještě stále blízka nule) v závislosti na koncentraci substrátu, pak získáme vztahy zobrazené na následujícím obrázku.

Křivka, spojující jednotlivé naměřené body bude hyperbola a bude se asymptoticky blížit určité maximální hodnotě reakční rychlosti, označené jako  $V_{max}$ . Jedná se o maximální iniciální reakční rychlost, kterou lze získat, aniž se zvýší množství enzymu.

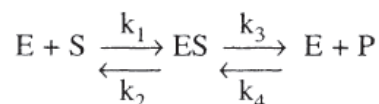
Hyperbolický charakter křivky ovšem poněkud ztěžuje její praktické využití. Jestliže se však použijí převrácené (reciproké) hodnoty obou veličin, pak se sledovaná funkce změní na přímku. Systém zobrazení reakční rychlosti v závislosti na koncentraci substrátu pomocí dvojích recipročných hodnot se označuje podle autorů jako Lineweaverův-Burkův graf.

Jestliže použijeme standardní označení pro molární koncentrace (kupř.  $[S]$  jako molární koncentraci substrátu) a několik předpokladů pro experimentální situaci, získáme užitečné rovnice, které popisují enzymovou kinetiku. Předpokládejme:

1. Systém zahrnuje pouze jediný substrát.
2. Systém je ve stavu dynamické rovnováhy, tj.  $[ES]$  je konstantní a volný enzym  $E$  je v rovnováze s komplexem  $ES$ .
3. Systém je určen tak, že  $[E]$  je menší než  $[S]$  z hlediska molárních koncentrací.
4. Jelikož tato analýza počítá s počáteční rychlostí, je  $[S]$  podstatně vyšší než  $[P]$  a  $[P]$  je zanedbatelné za těchto podmínek.



V tomto případě pak můžeme reakční mechanismus formulovat takto:



kde  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  a  $k_4$  jsou příslušné reakční konstanty.

Ve stavu dynamické rovnováhy je koncentrace ES konstantní, tzn. že rychlost vzniku tohoto komplexu je stejná jako rychlost jeho rozpadu. Za těchto podmínek můžeme odvodit reakční rovnici:

$$k_1[E][S] + k_4[E][P] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

Poněvadž tato analýza se omezuje na počáteční reakční rychlost, kdy  $[P]$  je zanedbatelné a  $[S]$  je prakticky konstantní, lze tedy člen obsahující  $[P]$  vypustit a členy obsahující  $[ES]$  spojit, takže dostaneme následující vztah:

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad \text{nebo} \quad \frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$$

Výraz  $(k_2 + k_3) / k_1$  lze nahradit jedinou konstantou  $K_M$ , známou jako *Michaelisova konstanta*.

*Maximální počáteční rychlost* může být dosažena pouze tehdy, jestliže veškerý přítomný enzym je ve formě aktivního komplexu (ES), z čehož vyplývá, že:

$$V_{\max} = k_3[E]$$

Za jakýchkoliv jiných podmínek je pak měřená počáteční reakční rychlost následující funkcí:

$$V = k_3[E]$$

S využitím těchto vztahů pak můžeme odvodit konečnou formu rovnice *Michaelise-Mentenové*:

$$v = \frac{[S] V_{\max}}{[S] + K_m} = \frac{[S] k_3 [E]}{[S] + K_m}$$

Význam hodnoty  $K_M$  je z rovnice patrný. *Jestliže  $K_M$  se rovná  $[S]$ , pak  $v = 1/2 V_{\max}$ .* Tento vztah je vlastně definicí  $K_M$ : *Michaelisova konstanta je taková koncentrace substrátu, při níž je počáteční rychlost reakce rovna polovině  $V_{\max}$ .* Obě hodnoty,  $K_M$  a  $[S]$  jsou vyjádřeny v týchž jednotkách, tj. v mol/l. Z rovnice také vyplývá, že jestliže  $[S]$  je výrazně vyšší než  $K_M$ , pak  $K_M$  můžeme zanedbat, a tudíž

$$v = V_{\max} [S] / K_M$$

Tyto vztahy je třeba respektovat v jakékoliv laboratorní práci. Při stanovení koncentrace některého enzymu v krvi nebo v jiném materiálu je velice důležité zajistit dostatečné množství substrátu, aby byl příslušný enzym substrátem plně saturován, tj. aby se vytvořil v plné míře komplex enzym-substrát. Na druhé straně, jestliže měříme pomocí enzymatické reakce koncentraci substrátu, je třeba vytvořit relativní nadbytek enzymu, aby reakční rychlost byla funkcí koncentrace substrátu.

Význam  $K_M$  při posuzování určité metabolické situace vyplývá z její definice jakožto koncentrace substrátu, při níž je počáteční rychlost polovinou rychlostního maxima. Z toho lze odvodit důležité závěry:

1. Koncentrace substrátu může hrát důležitou roli v řízení rychlosti enzymatické reakce pouze tehdy, je-li přibližně srovnatelná s hodnotou  $K_M$ .
2. Jestliže enzym působí na dva různé substráty, z nichž každý je charakterizován svými hodnotami  $K_M$  a  $V_{\max}$ , pak rychlosti jednotlivých přeměn mohou být vypočteny z rovnice Michaelise-Mentenové. Předpokládá to ovšem, že koncentrace jednotlivých substrátů in vivo jsou známy. Jestliže koncentrace některého substrátu in vivo je výrazně nižší než příslušná  $K_M$ , pak tento substrát nebude signifikantně přeměňován na příslušný produkt. Příkladem takové situace je alkoholdehydrogenáza, která „preferuje“ ethanol před jinými alkoholy.
3. Jestliže substrát může být přeměněn dvěma různými enzymy na různé produkty, pak enzym s nižší  $K_M$  přemění většinu substrátu na svůj specifický produkt. Z toho vyplývá, že fyziologický význam (důležitost) jednotlivých enzymů lze posoudit z hodnot  $K_M$  a  $V_{\max}$  a z koncentrace příslušného substrátu in vivo.

Jednotkou enzymové aktivity je *katal* (*kat*), který je definován jako počet molů substrátu přeměněných enzymem za jednu sekundu. Pro vyjádření koncentrace enzymu v analyzovaných tělních tekutinách (sérum, mozkomíšni mok, moč) se používá *kat/l* (*mkat/l*, *μkat/l*, *nkat/l*). Při stanovení enzymové aktivity zpravidla

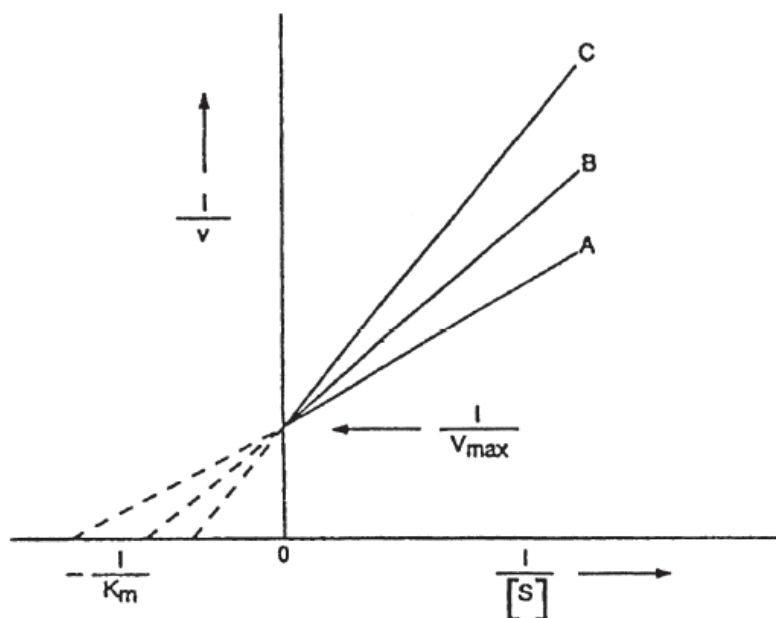
měříme úbytek substrátu nebo přírůstek produktu, je možné také měřit změny koenzymu, tedy cokoliv, co je výhodné z laboratorního hlediska. Osvědčují se různé syntetické substráty, poskytující barevné produkty, nebo i následné reakce založené na vlastnostech vedlejších produktů enzymové reakce.

## INHIBICE ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Enzymy mohou být inhibovány specifickými molekulami nebo ionty. Při ireverzibilní inhibici je inhibitor poután kovalentně k enzymu nebo je jinak připojen tak pevně, že disociace inhibitoru od enzymu velice nízká. Reverzibilní inhibice naproti tomu je charakterizována skutečnou rovnováhou mezi volným enzymem a inhibitorem a komplexem enzym-inhibitor. *Kompetitivní inhibitory* brání substrátu ve vazbě na aktivní centrum. Snižují reakční rychlost tím, že snižují počet molekul enzymu, které váží substrát. *Nekompetitivní inhibitory* naopak snižují číslo přeměny. Rozlišení obou typů inhibice je možné zjištěním, zda inhibice může být potlačena zvýšenou koncentrací substrátu, což je typické pro kompetitivní inhibici.

In vivo je aktivita mnohých enzymů regulována. V tomto směru jsou zejména důležité tzv. allosterické interakce, což jsou interakce mezi prostorově odlišnými místy enzymů. V enzymových regulacích se velmi často setkáváme s jevem, při němž je enzym katalyzující první reakci určité syntetické dráhy inhibován koncovým produktem této dráhy. Enzymy jsou mnohdy řízeny také regulačními proteiny typu kalmodulinu, který svojí konformací reflektuje hladinu vápenatých iontů. Důležitým nástrojem regulace enzymů bývá také kovalentní modifikace prostřednictvím fosforylace serinových, tyrosinových nebo threoninových zbytků ve struktuře enzymu. Nejmohutnější regulační mechanismus je patrně spojen s tvorbou inaktivních prekursorů, které se proteolytickým štěpením mění na aktivní enzymy – tzv. proteolytická aktivace.

Podstatou enzymové katalýzy je zpravidla selektivní stabilizace aktivovaného meziprojektu, který je enzymem vázán pevněji, nežli původní substrát. Proto jsou nejúčinnějšími inhibitory enzymů právě strukturální analogy aktivovaných meziprojektů. To se vztahuje i na imunogeny, neboť interakce antigenu a protilátkou silně připomíná reakci enzym-substrát a nejlepší producenty protilátek jsou imunogeny (antigeny), které imitují aktivovaný meziprojekt.

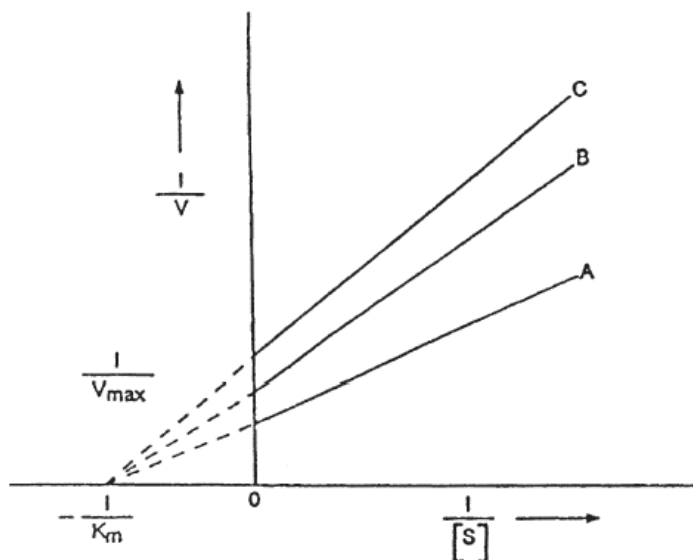


**Kompetitivní inhibice podle Lineweaverova-Burkova grafu:**  
**A – normální neinhibovaná reakce**  
**B a C – dvě různé koncentrace inhibitoru (B<C)**

Dříve uvedený Lineweaverův-Burkův graf má ještě jedno důležité využití, a to posouzení charakteru eventuelní *inhibice enzymu*. Má-li proběhnout katalysovaná reakce, musíme předpokládat určitou strukturní korelaci mezi povrchem substrátu na jedné straně a vnitřním povrchem aktivního centra enzymu na straně druhé. Cokoliv, co mění tyto struktury nebo brání jejich vzájemné interakci inhibuje nebo úplně blokuje enzymovou katalýsu. Metabolity, léky nebo toxické látky mohou inhibovat mnohé enzymy do té míry, že se katalytická reakce zpomalí, nebo dokonce zastaví. Inhibitory klasifikujeme podle toho jak reagují s enzymem:

*Kompetiční inhibitory* se váží reverzibilně na enzym a v podstatě konkurují substrátu ve vazbě na aktivní centrum enzymu. Jestliže je inhibitor vázán na enzym, substrát nemůže tvořit s enzymem aktivní komplex ES, a tudíž méně molekul enzymu je k dispozici pro katalytickou reakci. Vzhledem k tomu, že se jedná o kompetiční vztah mezi substrátem a inhibitorem, dostatečně vysoká koncentrace substrátu může eliminovat inhibici, takže  $V_{max}$  bude mít stejnou hodnotu jako v reakci bez inhibitoru. Avšak, bude-li koncentrace substrátu srovnatelná s koncentrací inhibitoru, hodnota  $K_M$  bude pochopitelně zvýšená.

*Nekompetiční inhibitory* se váží jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát. V tomto případě je hodnota  $V_{max}$  snížena, aniž se změní  $K_M$  pro dotyčný substrát. Ani extrémně vysoká koncentrace substrátu nemůže zcela vyloučit inhibiční efekt.



**Nekompetiční inhibice podle Lineweaverova-Burkova grafu:**

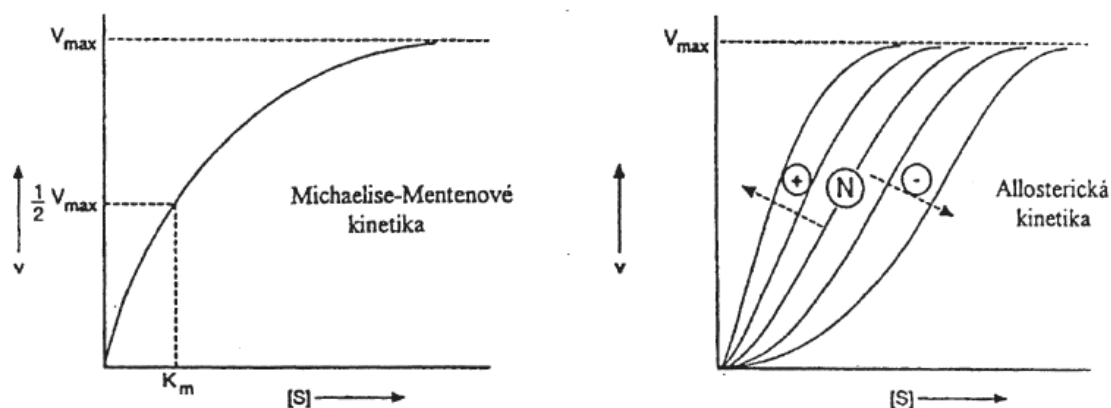
**A – normální neinhibovaná reakce**

**B a C – dvě různé koncentrace inhibitoru (B<C)**

*Bezkompetiční (uncompetitive) inhibitory* se naproti tomu váží pouze na volný enzym, nikoliv však na již existující komplex enzym-substrát. V tomto případě jsou změněny obě konstanty, tj. jak  $V_{max}$  tak  $K_M$ . Lineweaverův-Burkův graf vykazuje paralelní přímky pro různé koncentrace inhibitoru.

## ALLOSTERICKÁ REGULACE

Některé enzymy se však nechovají zcela podle modelu Michaelise-Mentenové. Existuje významná skupina enzymů, jejichž aktivita je v podstatě řízena jinými molekulami, které se váží na specifická místa enzymu, avšak vždy na místa odlišná od aktivního katalytického centra. Tyto molekuly, nazývané *efektory*, však ovlivňují kvalitu vazby substrátu na aktivní centrum, respektive ovlivňují kvalitu aktivního centra jako takového. Tyto enzymy jsou známy pod jménem *allosterické enzymy*. Některé allosterické enzymy jsou





složeny z více podjednotek s identickou nebo podobnou strukturou. Jejich kvarterní struktura a celková konformace je pak ovlivňována zmíněnými efektory. Tyto enzymy tudíž vykazují jedno nebo více aktivních *katalytických center* (C), která váží substrát, a vedle toho ovšem jedno nebo více *regulačních center* (R), která váží efektory. V některých případech jsou R a C centra na různých podjednotkách enzymu, jindy nacházíme obě centra na téže podjednotce. Zcela charakteristické pro všechny allosterické enzymy ovšem je to, že grafické znázornění závislosti počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu má vždy esovitý (sigmoidální) charakter a nikoliv charakter hyperbolický. Charakter této křivky je rovněž silně závislý na přítomnosti a koncentraci pozitivně nebo negativně působících efektorů. Změny vyvolané typem a množstvím efektoru silně připomínají změny hodnot  $K_M$  u klasických enzymů. S jistou tolerancí můžeme tedy říci, že efekторы allosterických enzymů mění „hodnotu  $K_M$ “ pro určitý substrát. Znamená to, že allosterický enzym má různou aktivitu za různých metabolických okolností, které jsou signalizovány měnicími se koncentracemi efektorů. Jedná se tedy o vysoce kvalitní typ regulace enzymové aktivity.

Ve velmi obecné podobě lze allosterickou kinetiku vyjádřit následující rovnicí:

$$v = \frac{[S]^n V_{\max}}{[S]^n K}$$

kde  $n$  je koeficient charakterizující aktivní centrum,  $K$  představuje míru afinity substrátu k enzymu a ostatní symboly jsou standardní.

## ENZYMOVÁ AKTIVITA SÉRA

Stanovení enzymových aktivit v krvi, plazmě, nebo v krevním séru patří mezi základní biochemická vyšetření. Ve speciálních případech je možno stanovit enzymy i v biotickém materiálu, zejména při podezření na vrozenou metabolickou poruchu. V krvi lze prokázat velké množství různých enzymových aktivit. V zásadě rozlišujeme enzymy, jejichž aktivita v krvi je vyšší než v buňkách a krev je tudíž kompartment, kde provozují svou funkci, a enzymy, které nemají plazmatickou funkci a jejich nitrobuněčná aktivita podstatně převyšuje aktivitu plazmatickou. Do první skupiny enzymů řadíme např. pseudocholinesterázu, cholesterolsterázu, ceruloplazmin a proenzymy koagulace a thrombolýzy. Protože vznikají v hepatocytech a jsou secernovány do krve, můžeme je nazvat také *enzymy sekrečními*. Jejich aktivita je poměrně vysoká, diagnosticky je důležité její snížení, protože poukazuje na genetický defekt nebo poruchu produkčního orgánu.

Druhá skupina enzymů se za normálních okolností prokazuje jen velmi citlivými metodami. Patří k normální buněčné výbavě nebo jsou vylučovány žláзовými orgány trávicího traktu. Jejich přítomnost se přičítá přirozené obměně buněk ve tkáních a nejvíce jich pochází z orgánů s rychlým metabolickým obratem (játra, pankreas). Ke zvýšení jejich aktivity dochází v souvislosti s poruchou orgánu, ve kterém se vyskytují, takže indikují jeho postižení. Odtud pochází název *enzymy indikační*. Je však nutno dodat, že vzestup některých enzymových aktivit lze vyprovokovat i některými látkami, známá je např. indukce jaterních aminotransferáz barbituráty a alkoholem. Indukci je ovšem nutno odlišit od toxických projevů. Předpokladem průniku enzymů z buněk do extracelulárních tekutin je porušení buněčné membrány. Nejmírnějším stupněm je postižení energetického metabolismu buňky, které vede k poruše transportu iontů s retencí vody a ke kalcium podmíněné vezikulaci části buněčných membrán. To může být provázeno dočasným vyplavováním *cytoplazmatických enzymů*. Při pokračující poruše dochází k narušení kontinuity membrány, což je již jev nevratný. Nejprve unikají cytoplazmatické enzymy, později *enzymy mitochondriální*.

*Enzymy lyzosomální* se uvolňují jako poslední a likvidují struktury již zaniklé buňky. Z hlediska časné diagnózy je tedy prvořadé stanovení vzestupu aktivit cytosolových enzymů, průkaz enzymů vázaných na membrány či buněčné organely je pak úměrné spíše hloubce postižení.

Při hodnocení zvýšených hladin intracelulárních enzymů je třeba přihlídnout k *enzymovému profilu* jednotlivých orgánů. Některé enzymy mají totiž ubikvitární výskyt, nacházejí se prakticky ve všech buňkách, jako např. enzymy glykolýzy (laktátdehydrogenáza, aldoláza), takže jejich nálezy nemusí vést přímo k diagnóze orgánového postižení. U řady enzymů je však řádový rozdíl v expresi u různých orgánů, takže nálezy zvýšených aktivit je již informativní. Tak např. ALT převládá v játrech, AST ve svalech, játrech a erytrocytech, kreatinkináza ve svalech, kyselá fosfatáza v prostatě. Jen málo enzymů je absolutně orgánově specifických. Jako příklad lze uvést sorbitoldehydrogenázu, vyskytující se výlučně v hepatocytech. V případě aminotransferáz je možno využít faktu, že AST je přítomna jednak v cytoplazmě jaterních buněk podobně

jako ALT, jednak v mitochondriích, kde se ALT nenachází, takže poměr těchto dvou aminotransferáz se mění podle závažnosti postižení hepatocytu. Při poměru AST/ALT (*DeRitisův kvocient*) menším než 1 se jedná o lehké postižení s přítomností plazmatické formy AST. Vzestup nad 1 už signalizuje únik mitochondriální frakce, což je ukazatelem nekrózy jaterních buněk. Zvláštní situace je u enzymů, které se normálně vylučují do trávicího traktu (*sekreční enzymy*). Jedná se o amylázu, lipázu, jaterní alkalickou fosfatázu a leucinarylamidasu (leucinaminopeptidasu). V případě amyláz v klidu převládá enzym produkovaný příušní žlázou, při nekrose pankreatu prudce stoupne enzym slinivky břišní, vyplavovaný z acinů lymfatickými cestami. Aktivita posledních dvou jmenovaných enzymů se zvyšuje při stagnaci žluči následkem uzávěru žlučových cest.

Enzymové profily vybraných orgánů

	srdce	játra	kosterní sval
AST			
ALT			
SD			
LD <sub>1</sub>			
LD <sub>5</sub>			

Při enzymologickém monitorování poruch je třeba sledovat aktivity jednotlivých enzymů v čase a hodnotit je vzhledem k jejich *poločasu odbourávání* (biologickému poločasu). Je to doba, za kterou by aktivita enzymu klesla na polovinu, pokud by nebyl doplňován ze tkání. Poločasy inaktivace kolísají od 3–6 hodin u amylázy do 10 dnů u alkalické fosfatázy, cholinesterázy a lipázy. K odbourávání dochází po endocytóze hlavně v játrech a ve slezině. Na krátkém poločasu amylázy se podílí především vylučování v ledvinách, vzhledem k poměrně malé molekule (MH 50 tis.). Zahuštění moči pak způsobuje nález vyšších aktivit v moči než v krevním séru. Při renální insuficienci ovšem vylučování ledvinou klesá a sérové hodnoty jsou pak vyšší. Vylučování je vzácně blokováno při vytvoření plazmatických komplexů mezi amylázou a imunoglobulinovými molekulami, které neprojdou glomerulární membránou (makroamylasemie). Trvá-li porucha tkáně, produkující indikační enzymy déle (např. u cirhózy jater), může dojít k poklesu celkové proteosyntézy natolik, že se enzymové zvýšení zdánlivě normalizuje. Obecně tedy pokles aktivit může znamenat jak reparaci chorobného procesu, tak selhávání funkce produkujícího orgánu.

Většina klinicky významných enzymů se vyskytuje ve dvou nebo více variantách, které se nazývají *izoenzymy*. Jedná se o molekuly se stejnou, nebo velmi blízkou enzymovou aktivitou, ale s určitými změnami v aminokyselinovém složení. Rozdílu ve fyzikálně-chemických vlastnostech se využívá k separaci a identifikaci izoenzymů. V předchozí kapitole jsme se již setkali s existencí 5 izoenzymových forem laktátdehydrogenázy. Zmíněná cytosolová a mitochondriální forma AST jsou také izoenzymy, další příklady uvidíme u fosfatáz. Od izoenzymů musíme odlišit enzymové molekuly, lišící se pouze svou sacharidovou složkou, tj. charakterem posttranslačních modifikací, při stejném genovém transkriptu. Tyto produkty jsou uváděny jako *izoformy enzymů*.

## STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY A JEJÍ VYJADŘOVÁNÍ

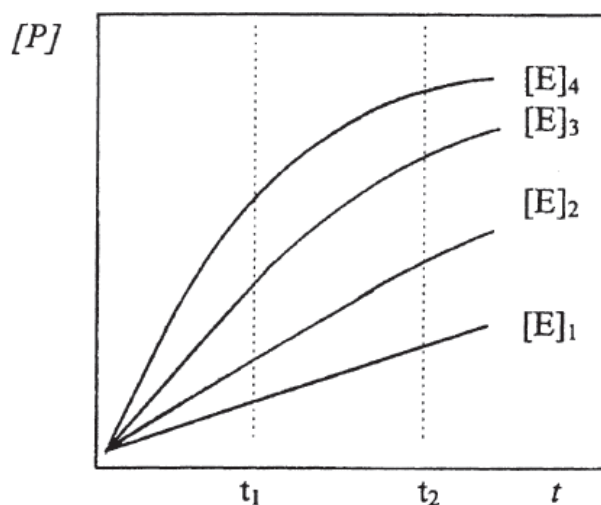
Množství enzymu se v enzymologii zpravidla nahraňuje pojmem *enzymová aktivita* a místo pojmu koncentrace enzymu se užívá aktivita vztažená na 1 litr vyšetřované tekutiny (*katalytická koncentrace*). Výjimku tvoří výsledky speciálních imunochemických metod, které mohou jako antigen detegovat i degradované formy enzymů, které by nebyly dostatečně aktivní při kinetických měřeních. Zde se výsledky vyjadřují v jednotkách hmotnostní koncentrace ( $\mu\text{g/l}$ ). Jednotkou enzymové aktivity je množství substrátu (*mol*) přeměně-

né za jednotku času ( $s$ ) a nazývá se *katal* (*kat*). V oblasti klinické biochemie připadají v úvahu odvozené jednotky  $\mu\text{kat}$  a  $\text{nkat}$ , aplikované na katalytickou koncentraci pak  $\mu\text{kat/l}$  a  $\text{nkat/l}$ .

Při stanovení aktivit musí být definovány podmínky katalytické reakce, snahou je, aby byly optimální pro činnost vyšetřovaného enzymu. Protože se katalytická koncentrace enzymu stanovuje z *rychlosti enzymové reakce*, musí být množství biologického materiálu, substrátu a kofaktorů takové, aby rychlost v prakticky měřitelném intervalu odpovídala *rychlosti maximální* (viz výklad kinetiky enzymových reakcí). Základní podmínkou je proto dostatek substrátu aby byla splněn předpoklad  $[S] > K_m$ , v druhé řadě pak přiměřená aktivita enzymu. Ideální technikou je kinetické měření ve více časových intervalech, při kterém se vybere úsek s největším sklonem pro výpočet maximální rychlosti reakce. Na následujícím schématu je znázorněn průběh tvorby produktu při různých aktivitách enzymu. Všimněte si, jak se mění přírůstek produktu ve druhém časovém intervalu při vyšších katalytických koncentracích enzymu, kdy dochází k rychlému poklesu koncentrace substrátu:

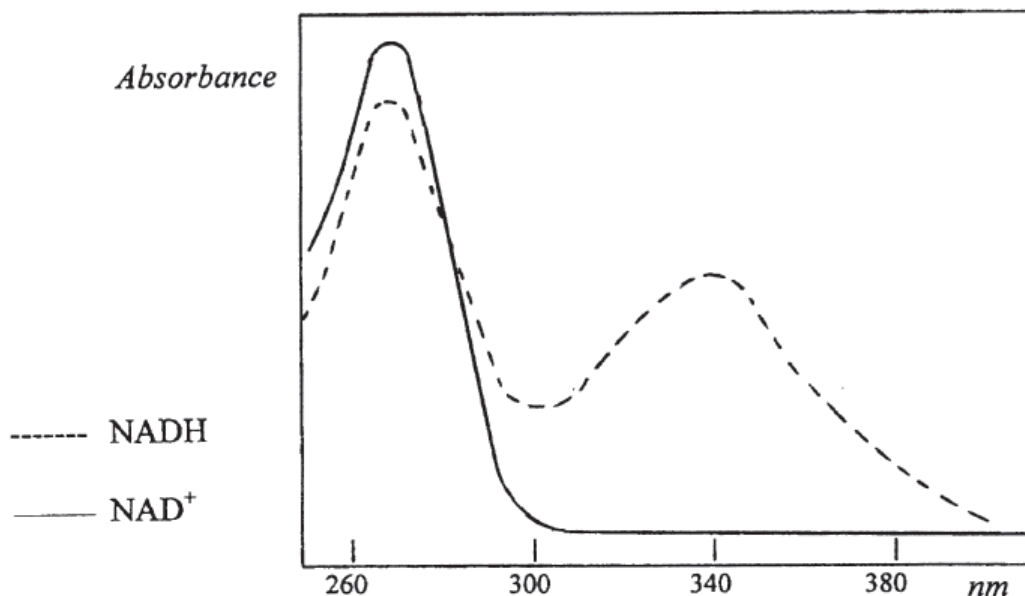
Při sledování enzymové reakce dáváme v klinickobiochemických laboratořích přednost optickým metodám. Je lhostejné, zda sledujeme přírůstek produktu nebo úbytek substrátu. Některé produkty je možno stanovit fotometricky ve viditelném světle, např. fosfatázy odštěpují žlutý p-nitrofenol z p-nitrofenylfosfátu. Zde můžeme využít běžný fotometr s wolframovou žárovkou jako zdrojem světla. Jiné produkty je možno stanovit následnou jednoduchou reakcí se vznikem barevného adduktu, jako např. DNP-hydrazonu

kys. pyrohroznové při testu na aminotransferázy. Ukázalo se však, že nejspolehlivější jsou metody založené na sledování *změny koncentrace pyridinových koenzymů*, které se účastní enzymové reakce oxidoredukčního typu buď přímo, jako je tomu u stanovení laktátdehydrogenázy, nebo jsou kofaktory spřažené reakce, kvantitativně přeměňující produkt (viz alternativní stanovení aminotransferáz). Tato metoda, známá pod názvem *Warburgův optický test*, je založena na rozdílech v UV absorbanci redukované a oxidované formy pyridinových koenzymů. NADH má druhý vrchol absorpance při vlnové délce 340 nm, kde  $\text{NAD}^+$  má absorpanci nulovou. Je-li UV-spektrofotometr nastaven na tuto délku, při redukčním procesu měříme úbytek, při oxidačním ději přírůstek absorpance.



#### Kinetika enzymových reakcí při různých katalytických koncentracích enzymu

Rutinní metody stanovení enzymových aktivit jsou zatíženy největší průměrnou chybou ze všech klinickobiochemických vyšetření (uvádí se asi 15 %), což je zčásti dáno choulostivostí metodik samotných. O tom se ostatně studenti sami přesvědčí při praktických cvičeních. Je dále třeba vyvarovat se všech technických chyb při manipulaci se vzorkem před vyšetřením, tj. dodržovat zásady správného odběru materiálu, krev by měla být co nejdříve odstředěna (aby se zabránilo kontaminaci séra erytrocytárními enzymy) a krevní sérum uchováváno při 4 °C, event. zmrazené, a to co nejkratší možnou dobu. Při vyšších koncentracích enzymu je nutno sérum ředit, což je zdrojem dalších chyb. K ředění by se mělo užívat tepelně inaktivované sérum.



Warburgův optický test

## NÁZVOSLOVÍ A KLINICKÝ VÝZNAM RUTINNĚ VYŠETŘOVANÝCH ENZYMŮ

**Aldoláza (ALD):** štěpí fruktosa-1,6-bisfosfát

- orgánově nespecifická, stoupá hlavně u poškození jater a svalů
- norma do 50 nkat/l.

**$\alpha$ -Amyláza (AMS):** hydrolyzuje škrob a glykogen v centru molekul, produkuje oligosacharidy

- jsou známy slinná (S) a pankreatická (P) izoforma, liší se od sebe sacharidovou složkou, lze je od sebe odlišit pomocí lektinů nebo specifických protilátek, vzestup jednotlivých izoform u chorob pankreatu, zejména akutní nekrosy, a u chorob slinných žláz (parotitis), další informace v oddílu 5.3.1, vylučování močí, kde jsou vzhledem ke zkoncentrování vyšší aktivity
- norma AMS(sérum): do 3,3  $\mu$ kat/l, AMS(moč): do 20  $\mu$ kat/l.

**Alaninaminotransferáza (ALT):** L-alanin-2-oxoglutarát-aminotransferáza

- cytoplazmatický enzym, nejvyšší aktivita v hepatocytech, podílí se na přeměnách aminokyselin a eliminaci  $\alpha$ -aminodusíku, podrobnosti v kap. 5.3.1, zvyšuje se při chorobách jater (hepatitis, inf. mononukleóza, toxická poškození)
- norma do 0,67  $\mu$ kat/l.

**Aspartátaminotransferáza (AST):** L-aspartát-2-oxoglutarát-aminotransferáza

- nejvyšší koncentrace v játrech a srd. svalu, existuje izoenzym plazmatický a mitochondriální, podrobnosti viz oddíl 5.3.1., vzestup při infarktu myokardu, postižení hepatocytů (zejména těžších), poškození kosterních svalů, třeba hodnotit vzhledem k aktivitě ALT
- norma do 0,67  $\mu$ kat/l.

**Fosfatáza alkalická (ALP):** hydrolyzuje monoestery kys. fosforečné v alkalickém prostředí

- existují tři izoenzymy ALP: (1) placentární, (2) střevní, (3) izoenzym kostí, jater a ledvin, při čemž kostní a jaterní izoenzym se vyskytuje v odlišné izoformě oproti ledvinovému (nepřítomen v séru), zvýšení při jaterních afekcích spojených s cholestázou a u onemocnění kostí (obtíže s rozlišením), fyziologicky jako výraz osteoblastické aktivity u dětí, placent. izoenzym stoupe v těhotenství
- norma u dospělých: pod 2,3  $\mu$ kat/l.

**Fosfatáza kyselá (ACP):** hydrolyzuje monoestery kys. fosforečné v kyselém prostředí

- vyskytuje se nejvíce v prostatě, obsažena také v kostech, erytrocytech a trombocytech, prostatický izoenzym je tartarát labilní, stoupe při karcinomu prostaty, zejména při jeho generalizaci, izoenzym kostní, erytrocytární a trombocytární je tartarát stabilní (využívá se při stanovení), stoupe při osteoklastických procesech kostních, fyziologicky je zvýšen u dětí, zvyšuje se při hemolýze, proto je lépe vyšetřovat plazmu, ACP je nestabilní při fyziologickém pH, plazmu je nutno okyselit citrátovým pufrem
- norma ACP(muži): pod 108 nkat/l, ACP(ženy): pod 92 nkat/l.

**$\gamma$ -Glutamyltransferáza (GMT):** přenos  $\gamma$ -glutamylového zbytku na peptidový akceptor

- obsažena hlavně v hepatocytech a stěnách žlučových cest, v tubulárních buňkách ledvin, význam nejasný, zvyšuje se zejména u toxických postižení jater (alkohol, léky) a při obstrukcích žlučových cest
- norma GMT(muži): pod 1,77  $\mu$ kat/l. GMT(ženy): 1,10  $\mu$ kat/l.

**Glutamátdehydrogenáza (GMD):** oxidoreduktáza deaminující kyselinu glutamovou, NAD<sup>+</sup> závislá

- obsažena v mitochondriích jaterních buněk, zvyšuje se při těžším jaterním postižení (nekrózy)
- norma: do 23 nkat/l.

**Cholinesteráza (CHS):** hydrolýza esterů cholinu

- v erytrocytech specifická **acetylcholinesteráza**, v séru **pseudocholinesteráza** secernovaná játry, štěpí i jiné estery, klinicky významné je snížení aktivity, provázející těžké jaterní léze, intoxikaci organofosfáty, a vrozený defekt enzymu, manifestující se hlavně při aplikaci myorelaxancií typu sukcinylcholinu v souvislosti s operačním zákrokem
- norma: 76–230  $\mu$ kat/l.

**Kreatinkináza (CK):** ATP: kreatin-fosfotransferáza

- nejvíce obsažena v kosterním a srdečním svalu a v mozku, dimer ze subjednotek dvou typů, M(muscle), B(brain), možné tři kombinace, BB v mozku, v krvi jen při mozkových nádorech, MM v kosterních svalech a srdci, myokard však obsahuje více hybridního MB izoenzymu, takže zvýšený podíl MB při vzestupu CK (**CK-MB**, samostatně stanovitelný při inhibici M subjednotek) podporuje diagnosu infarktu, jinak nejvyšší hodnoty CK u svalových dystrofií, mírný vzestup i po nadměrném svalovém výkonu u netrenovaných
- norma CK(muži): pod 3,2  $\mu$ kat/l, CK(ženy): pod 2,4  $\mu$ kat/l, CK-MB: pod 0,4  $\mu$ kat/l, nebo pod 6 % celkové aktivity CK.

**Laktátdehydrogenáza (LD):** L-laktát:NAD<sup>+</sup>oxidoreduktáza

- jako závěrečný enzym anaerobní glykolýzy se vyskytuje prakticky ve všech tkáních, podrobnosti v kap. 5.2.3., tetramerní struktura, 2 typy subjednotek (H, M), 5 izoenzymů, H<sub>4</sub> hlavně v myokardu a erytrocytech, stoupe u infarktu a při hemolýze, H subjednotky schopny dehydrogenovat i  $\alpha$ -hydroxybutyrát, proto je ekvivalentní stanovení aktivity  **$\alpha$ -hydroxybutyrátdehydrogenázy (HBD)**, M<sub>4</sub> v játrech a ve svalech, stoupe u jaterních chorob a svalových dystrofií jako CK
- norma LD: pod 8  $\mu$ kat/l
- norma HBD: pod 6  $\mu$ kat/l.

**Leucinarylamidáza (LAS, dříve leucinaminopeptidáza):** štěpí jednoduché peptidy s leucinem i jinými aminokyselinami

- vyskytuje se hlavně v hepatocytech a buňkách žlučových cest, zvýšené aktivity provázejí zejména uzávěry žlučových cest
- norma: 0,13–0,37  $\mu$ kat/l.

**Lipáza (LPS):** hydrolýza triacylglycerolů na monoacylglyceroly a mastné kyseliny

- jedná se o enzym vylučovaný pankreatem, třeba odlišit od lipoproteinové lipázy, obsažené v endothelu cév (viz kapitola Lipoproteiny), stoupá u pankretických poruch, zejména akutní nekrosy, podobně jako pankreatický izoenzym amylázy
- norma: pod 3,2  $\mu\text{kat/l}$ .

**Sorbitoldehydrogenáza (SD):** katalyzuje přeměnu sorbitolu na fruktosu

- enzym specifický pro jaterní buňky, zvyšuje se u různých poruch jater, u infarktu pouze dojde-li k jaterní hypoxii
- norma: pod 6,7 nkat/l.

Z dalších, méně častých stanovení, je možno uvést vyšetření *5'-nukleotidasy*, která se zvyšuje při uzávěrech žlučových cest, **thymidinkinázy (TK)**, která stoupá v krvi při rakovinném bujení, takže se řadí k tzv. tumorovým markerům, stanovení *prostate-specifického antigenu (PSA)*, který je vlastně proteolytickým enzymem a jeho přítomnost v krvi signalizuje rakovinu prostaty. PSA je z větší části v komplexu s antichymotrypsinem a alfa-2-makroglobulinem, menší část je volná. Hraniční koncentrace celkového PSA je asi 6  $\mu\text{g/l}$ .

## ENZYMY ENERGETICKÉHO METABOLISMU: ALDOLÁZA, LAKTÁTDEHYDROGENÁZA

Buňky získávají energii degradací energeticky bohatých sloučenin především při glykolýze, při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin a v cyklu kys. citronové, což jsou procesy napojené prostřednictvím redukovaných koenzymů na oxidativní procesy dýchacího řetězce. V následujícím textu uvidíme, že nález některých enzymů

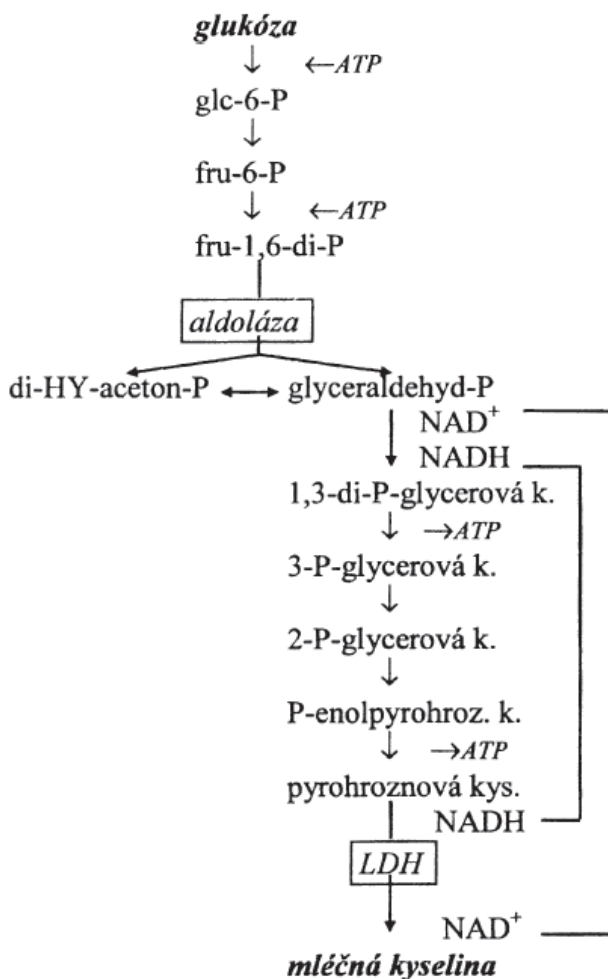


Schéma anaerobní glykolýzy

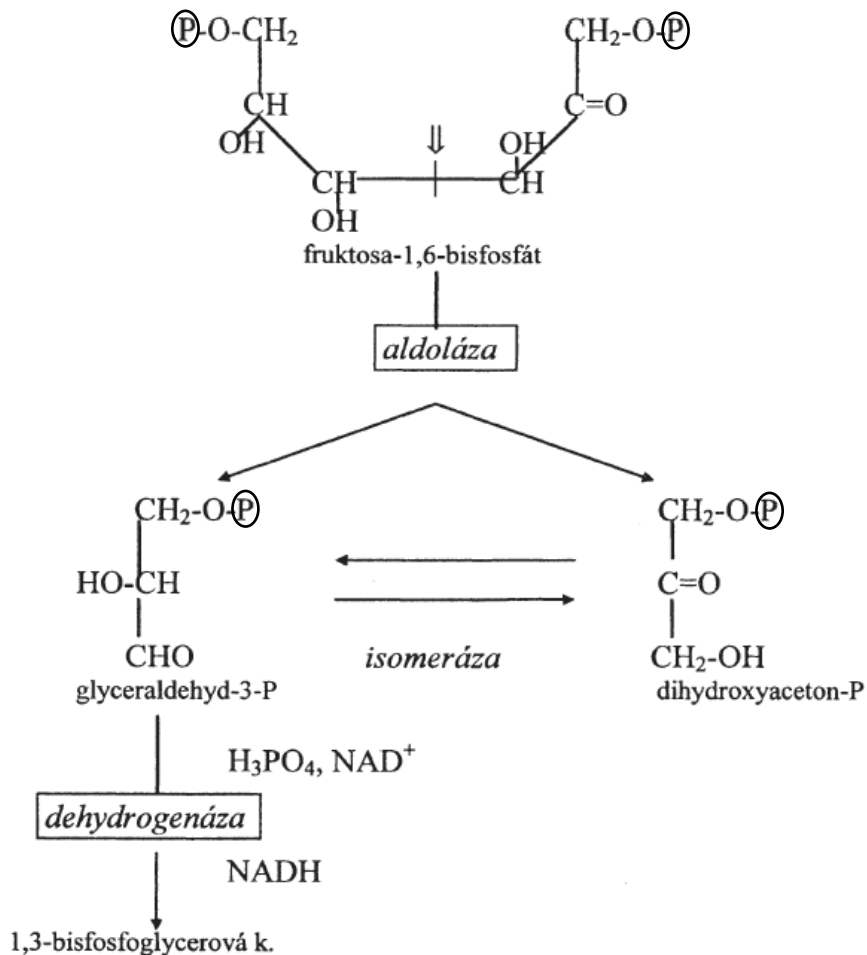
zmíněných drah v séru má také medicínský význam jako více nebo méně specifický indikátor orgánového poškození.

Při anaerobní glykolýze je konečným produktem odbourávání glukózy *kys. mléčná*. Vzniká např. ve velkém množství v pracujícím svalu, nestačí-li nabídka kyslíku krýt potřeby tkáňového dýchání. Konverze pyruvátu na laktát je zde nutná z energetických důvodů, neboť glykolýza a tím i produkce ATP na úrovni substrátů mohou probíhat jen při regeneraci  $\text{NAD}^+$  z  $\text{NADH}$ , vzniklého při oxidaci glycerinaldehyd-P na di-P-glycerovou *kys.* Kyselina mléčná je dodatečně regenerována v játrech na glukózu. Některé tkáně mají zvlášt dobře vyvinutou schopnost krýt energetickou spotřebu glykolýzou za anaerobních podmínek. Vedle tkáně svalové to jsou např. nádorové buňky. U bakterií mléčného kvašení se jedná dokonce o hlavní metabolickou dráhu.

Pro osvěžení znalostí základních reakcí anaerobní glykolýzy včetně role pyridinových koenzymů připojujeme zjednodušené schéma této důležité metabolické dráhy.

### Funkce a vlastnosti aldolázy

**Aldoláza** umožňuje jeden z klíčových kroků glykolytické dráhy, totiž štěpení **fruktosa-1,6-bisfosfátu** na dvě triosy, glycerinaldehyd-P a dihydroxyaceton-P. Tyto dva produkty jsou vzhledem k dalšímu průběhu glykolýzy rovnocenné, díky zapojení fosfotriosoisomerázy, která zajišťuje vzájemnou konverzi obou trios. Tak může glycerinaldehyd-P, který je dehydrogenován na fosfoglycerovou kyselinu, vznikat rovnoměrně z obou produktů. Rovnováha izomerizace je posunuta na stranu dihydroxyacetonfosfátu (96 %).

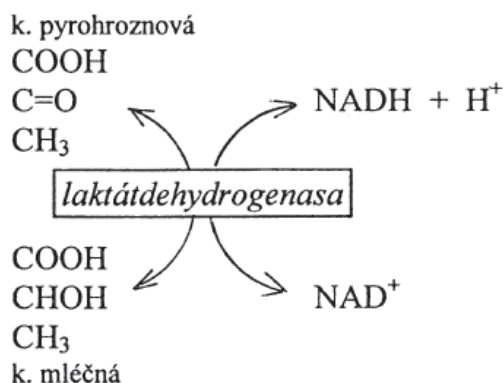


Aldoláza je nitrobuněčný enzym, lokalizovaný v cytoplazmě, ve vysoké koncentraci zejména u svalových, méně jaterních buněk. Při destruktivních pochodech těchto tkání se objeví i v krevním séru, jeho nále z však není příliš specifickým ukazatelem. Protože se vyskytuje i v červených krvinkách, automaticky se zvyšuje jeho hladina při hemolýze.

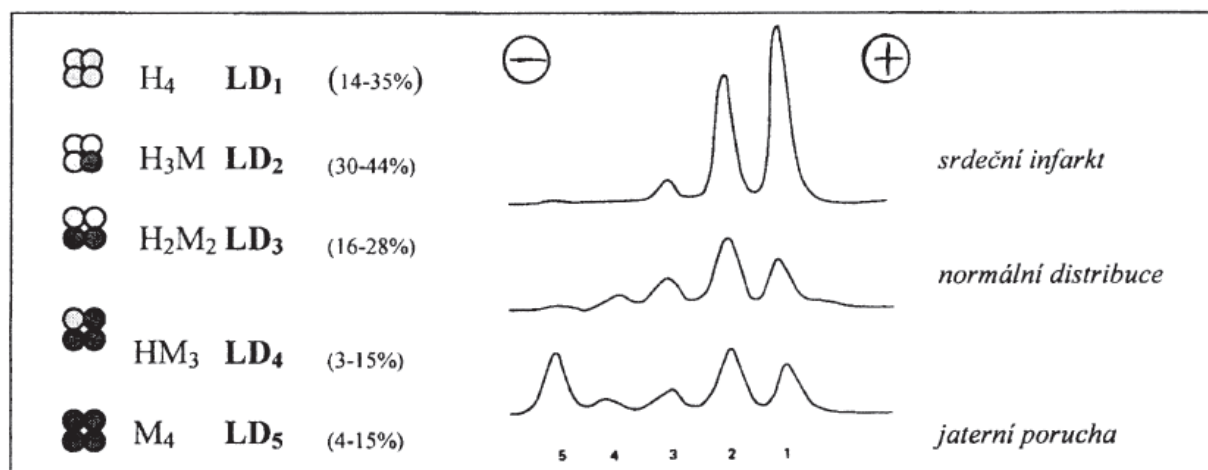
Pro stanovení aktivity enzymu máme k dispozici jednak barevnou reakci, při které reagují produkty aldolázové reakce s dinitrofenylhydrazinem za vzniku barevných hydrazonů, jednak spřaženou reakci, ve které je dihydroxyaceton-P redukován na glycerol-1-P za současné konzumace NADH, což lze přímo sledovat v UV světle (*Warburgův optický test*). Normální aktivity v séru nepřesahují 50 nkat/l.

## Funkce a vlastnosti laktátdehydrogenázy

**Laktátdehydrogenáza (LD)** katalyzuje vratnou přeměnu pyruvátu na laktát. Patří mezi  $\text{NAD}^+$  závislé oxidoreduktázy. Rovnováha je při tom posunuta výrazně ve prospěch laktátu. Význam enzymu pro regeneraci oxidované formy nikotinamidového koenzymu při anaerobní glykolýze vyplývá ze schématu v úvodní kapitole.



Molekula enzymu je složena ze čtyř bílkovinných subjednotek. Vzhledem k tomu, že existují dva typy monomerů, které jsou kombinovatelné, rozeznáváme 5 variant kvarterní struktury laktátdehydrogenázy. Tyto monomery se liší jak svou primární strukturou, což dovozuje např. elektroforetickou separaci typů, tak i svým metabolickým zapojením a expresí v různých orgánech. „H“ (*heart*) subjednotka je produkována především v srdeční svalovině, kde také převládají tetramery  $\text{H}_4$ . Komplexní struktura je specializována na přednostní oxidaci kys. mléčné na pyruvát, který pak slouží jako zdroj energie pro srdce. Naopak v kosterním svalu a v játrech jsou přepisovány především geny pro subjednotky „M“ (*muscle*), takže se zde vyskytují v největší míře tetramery typu  $\text{M}_4$ , specializované na pochod opačný, tj. redukci pyruvátu na laktát, předpoklad anaerobní glykolýzy. Jiné kombinace subjednotek mají afinity proporcionální počtu jednotlivých monomerů. „H“ subjednotky mají vyšší anodickou mobilitu při elektroforéze než subjednotky „M“, což vedlo ke klasifikaci 5 isoenzymů laktátdehydrogenázy dle rychlosti migrace ( $\text{LD}_{1-5}$ ). Souběžně se však užívá i klasifikace podle poměru subjednotek.





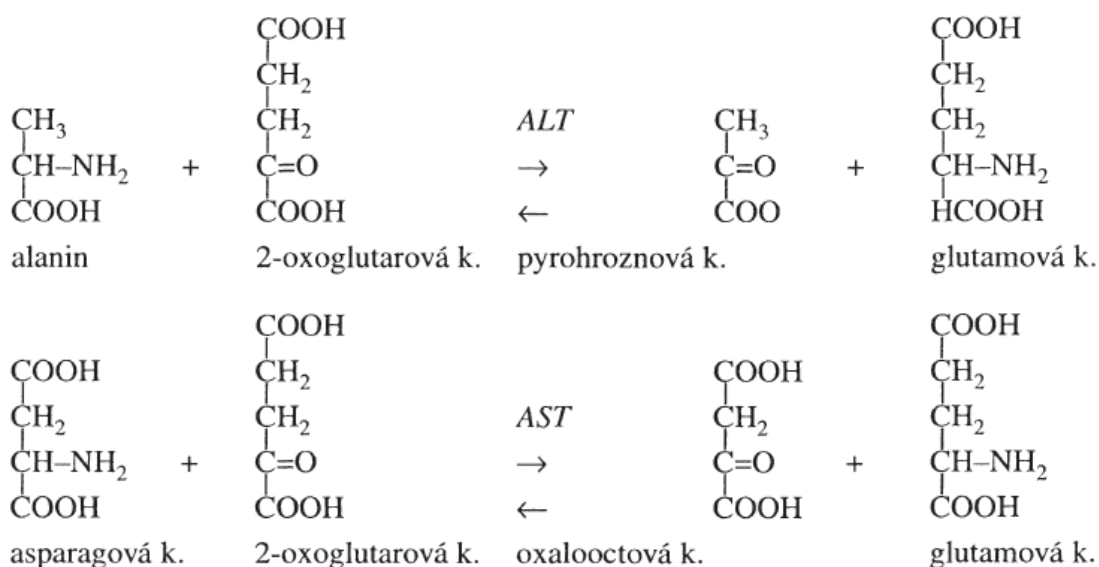
První izoenzym je kromě srdečního svalu také obsažen v erytrocytech, takže hemolýza arteficiálně zvyšuje koncentrace právě této frakce. Je zajímavé, že komplex obsahující více H subjednotek může oxidovat i  $\alpha$ -hydroxybutyrát, takže aktivita  $\alpha$ -hydroxybutyrát-dehydrogenázy v séru je vlastně aktivitou izoenzymů LD bohatých na H subjednotky.

Stanovení laktátdehydrogenázy je založeno na sledování poměru oxidované a redukované formy NAD koenzymu. Měřit je možno přímo v UV oblasti (340 nm) nebo převést změnu do barevné oblasti redukcí jodonitrotetrazoliové violeti na červený formazan, měřitelný při 510 nm. Za normální se považují hodnoty celkové LD menší než 8  $\mu$ kat/l séra.

## ENZYMY PŘEMĚN AMINOKYSELIN: AMINOTRANSFERÁZY

Centrální postavení v metabolismu aminokyselin má kys. glutamová, která se jako jediná může přímo deaminovat při biosyntéze močoviny, hlavního odpadního dusíkatého produktu v katabolismu bílkovin. Téměř všechny ostatní aminokyseliny předávají svůj  $\alpha$ -aminodusík prekurzoru kys. glutamové, kys. 2-oxoglutarové, mechanismem transaminace. Reakce je katalyzována enzymy, nazývanými **aminotransferázy**, dříve **transaminázy**. Ve všech je jako prosthetická skupina zabudován fosfopyridoxal a vyznačují se úzkou substrátovou specifitou jak pro donor  $\alpha$ -aminoskupin, tak pro 2-oxo akceptor. Nejsou známy žádné genetické defekty postihující aminotransferázy, tento stav by nebyl slučitelný se životem.

Z klinického hlediska má význam zejména stanovení aminotransferáz alaninu a kys. asparagové, které přenášejí aminoskupiny na totožný akceptor, kys. 2-oxoglutarovou. Zkratky *ALT* (L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferáza) a *AST* (L-aspartát:2-oxoglutaryl-aminotransferáza) vystihují hlavní směr této vratné reakce lépe než dřívější symboly GPT a GOT, odvozené od převažujících produktů reakce:

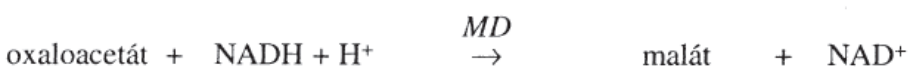
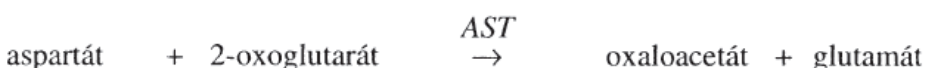
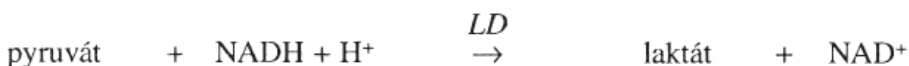
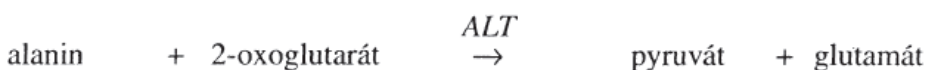


Aspartátaminotransferáza zajišťuje mj. rovnováhu mezi kys. glutamovou a asparagovou při biosyntéze močoviny, na které se obě aminokyseliny podílejí svým aminodusíkem. Oba enzymy jsou přítomny ve značném množství v játrech, AST je rovněž velmi aktivní v srdečním a kosterním svalu a v erytrocytech. U AST jsou známy 2 izoenzymy, plazmatický a mitochondriální, zhruba ve stejné katalytické koncentraci. Jak bylo již uvedeno v kap. 5.3.1, poměr AST/ALT je ukazatelem závažnosti jaterního onemocnění. Klinický význam a referenční hodnoty aminotransferáz jsou uvedeny v kap. 5.3.3.

Laboratorní stanovení aktivity aminotransferáz je založeno na *barevné reakci 2-oxoderivátů s 2,4-dinitrofenylhydrazinem* (metoda Reitman-Frankela) nebo na kvantifikaci spřažených enzymových reakcí (viz níže). Červený hydrazon v barevné reakci kys. pyrohroznové, produktu ALT reakce, poskytuje vyšší absorbanci při 505 nm než hydrazon kys. 2-oxoglutarové, substrátu enzymové reakce. Přesto je však žádoucí, aby koncentrace tohoto substrátu v reakční směsi byla co nejnižší, aby nedocházelo k falešné pozitivitě testu. To přináší

ovšem nevýhodu v poměrně úzkém rozmezí měřených aktivit, při vyšších katalytických koncentracích enzymu je nutno vzorek ředit. Při stanovení AST je využita stejná reakce, oxaloacetát z větší části spontánně dekarboxyluje na pyruvát.

Vzhledem k určitým teoretickým a technickým problémům zatěžujícím tuto jinak jednoduchou a levnou metodu dáváme v současné době přednost využití *spřažených enzymových reakcí*, kde je kofaktorem pyridinový koenzym. Zde jsou oba 2-oxoprodukty během reakce redukovány na kys. mléčnou a jablečnou za vzniku NAD<sup>+</sup> z NADH:



Aktivity jsou úměrné rychlosti redukčního procesu, tj. úbytku NADH, který lze měřit přímo *Warburgovým optickým testem* (viz kap. 12.2.), tj. sledováním úbytku absorbance při 340 nm, nebo navázat barevnou reakci s pyridinovými koenzymy ve viditelné oblasti. Uvedené stanovení je zejména výhodné při kinetickém sledování transaminační reakce.

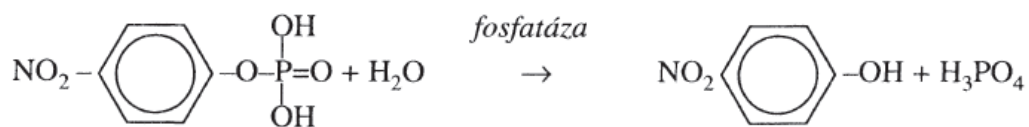
## ENZYMY ŠTĚPÍCÍ ESTERY KYSELINY FOSFOREČNÉ

Fosfatázy patří systematicky do skupiny hydroláz štěpících estery kyseliny fosforečné. Tyto enzymy se rozdělují na fosfomonoesterázy a fosfodiesterázy podle počtu esterových vazeb kyseliny trihydrogenfosforečné. **Fosfomonoesterázy** hydrolyzují různé fosforečnanové estery především cukrů a bílkovin, ale i nukleotidy. Patří sem klinicky důležité indikační enzymy. Podle optimálního pH reakce se dělí na alkalické (pH optimum 7–10) a kyselé (pH optimum 4–6). **Fosfodiesterázy** jsou důležité enzymy katabolismu nukleových kyselin, ale mohou štěpit i fosfolipidy (fosfatázy z hadích jedů).

**Alkalická fosfatáza (ALP)** se vyskytuje ve formě tří izoenzymů. Střevní izoenzym je důležitý pro vstřebávací procesy, kostní izoenzym se účastní výstavby a přestavby kostí. Stejný izoenzym se nachází v játrech, kde je nezbytný pro přeměny glycidů, a v ledvinách. Třetí je izoenzym placentární. Ve všech případech jsou enzymy lokalizovány v cytoplazmatické membráně, k aktivaci jsou nezbytné ionty Mg<sup>2+</sup>. Zvýšení sérové aktivity ALP se pozoruje u poruch jater, provázených cholestázou. Soudí se, že městnání vyvolá zvášenou syntézu alkalické fosfatázy v epiteliálních buňkách žlučových kanálků. Vzestup provází také metabolické poruchy kostí (křivici) a kostní nádory primární a metastatické. Vzhledem ke zvýšené aktivitě osteoblastů u dětí jsou zde fyziologicky nacházeny vyšší sérové katalytické koncentrace. Aktivitu ALP je možno stanovovat také v leukocytech, kde je enzym ve značné koncentraci. Změny aktivit jsou příznačné pro některé leukemie.

**Kyselá fosfatáza (ACP)** je v nejvyšší katalytické koncentraci v prostatě dospělých mužů, ostatní tkáň jí obsahují o 2–3 řády méně. Protože je lokalizována v lyzosomech, souvisí její uvolnění do krve s hlubším zásahem do struktury buňky, při kterém dojde k porušení lyzosomální membrány. U zdravého jedince je proto aktivita prostatického izoenzymu v séru sotva postižitelná. Nález zvýšené aktivity může být známkou karcinomu prostaty, zejména jeho kostních metastáz. Prostatický izoenzym můžeme odlišit od druhého izoenzymu z kostí, erytrocytů a trombocytů jeho citlivostí vůči vinanu („tartarát labilní frakce ACP“). Značnou aktivitu tohoto exkrecečního enzymu má seminální tekutiny, což se v soudně-lékařské praxi využívá k průkazu spermatu. Vzhledem k tomu, že ACP je přítomna i v erytrocytech, jsou vyšetření znehodnocena hemolýzou séra. Doporučuje se proto vyšetřovat krevní plazmu, a to po okyselení acetátovým pufrem pro zamezení degradace enzymu při fyziologickém pH.

Biochemické stanovení obou typů fosfatáz je založeno na štěpení syntetických esterů kys. fosforečné. Odštěpené substituenty jsou buď samy barevné, nebo je lze na základě jednoduché barevné reakce stanovit. Sety Lachema obsahují jako substrát *p*-nitrofenylfosfát:



Podle typu stanovovaného enzymu probíhá reakce buď v kyselém nebo v alkalickém prostředí. Žlutý *p*-nitrofenol stanovujeme fotometricky při 405 nm.