

Praktická cvičení: 1. Úvod do práce v laboratoři, bezpečnost – fotometrie

1. Bezpečnost práce v laboratoři

Podmínkou práce v laboratoři, je striktní dodržování laboratorního řádu a pravidel bezpečnosti a ochrany zdraví při práci. Tyto dokumenty jsou volně k dispozici na webových stránkách Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky:

Před vstupem do laboratoří praktické výuky je povinností každého studenta se s těmito dokumenty detailně seznámit.

2. Práce s automatickými pipetami,

3. Disperzní soustavy

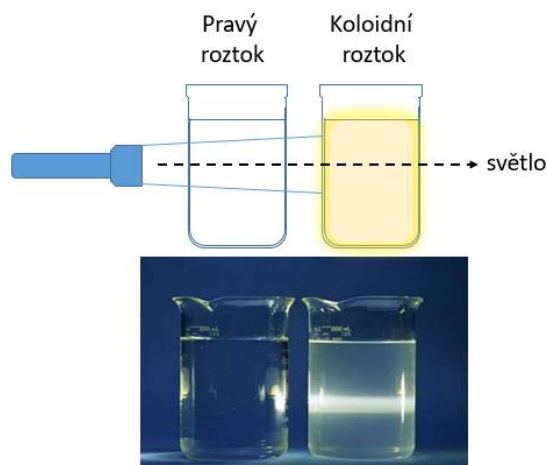
Disperzní soustavou rozumíme systém, který se skládá ze dvou nebo z většího počtu chemicky čistých látek. Jedna ze složek, obvykle ta, která je zastoupena v největším množství, se nazývá **rozpouštědlo**. V rozpouštědle jsou rozptýleny (dispergovány) molekuly ostatních látek, které označujeme jako látky rozpuštěné. Částice těchto látek jsou dokonale promíšeny a navzájem nereagují.

Na základě velikosti rozpuštěných částic, můžeme disperzní soustavy rozdělit analytické (budeme je označovat jako **pravé roztoky**), koloidně disperzní a hrubě disperzní. Roztoky představují homogenní jednofázovou soustavu, přičemž velikost částic rozpuštěné látky je menší než 1 nm.

Soustavy koloidně disperzní jsou takové, ve kterých jsou jemně rozptýleny (dispergovány) drobné částice buď pevné látky, nebo kapaliny, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 1 μ m. Mezi významné typy koloidně disperzních soustav patří micelární a koloidní soustavy.

Micelární roztoky jsou disperze rozpouštědla a drobných sférických částic – micel. Micely se skládají z agregovaných látek, které mají část polární a zároveň i část nepolární. Vzhledem k tomuto duálnímu charakteru jsou označovány jako látky amfifilní. Micelární roztoky se uplatňují při trávení lipidů, kdy dochází k cílené sekreci amfifilních látek do zažívacího traktu za účelem emulzifikace dietárních lipidů. Dále mají uplatnění v kosmetice ve formě tzv. micelární vody, ve kterých částice micel mohou obsahovat látky s hydratačními, zvlhčujícími, protizánětlivými nebo adstringenčními (stahujícími) účinky.

Koloidní soustavy obsahují částice, které svou velikostí spadají do rozmezí 1 nm až 1000 nm. Koloidní roztoky mají řadu specifických vlastností. Vzhledem k tomu, že velikost částic koloidní soustavy je srovnatelná s vlnovou délkou viditelného světla (390–760 nm), dochází při průchodu záření koloidní soustavou kromě absorpce i k dalším optickým jevům – především k odrazu a rozptylu. Tyto jevy jsou podstatou fenoménu, který se označuje jako **Tyndallův jev** (obr. 1.).



Obrázek 1.: Tyndallův jev

*V důsledku velikosti částic v koloidní disperzní soustavě, dochází při průchodu záření roztokem k různým optickým jevům, jako je absorpce, odraz a rozptyl záření. Při průchodu záření **koloidním roztokem**, která záření **rozptyluje**, dochází ke vzniku světelného kužele. **Pravé roztoky** záření nerozptylují a jsou **plně transparentní**.*

Vzhledem ke složení, je pro koloidně disperzní soustavy charakteristické, že jejich částice volně procházejí přes filtrační papír a nelze je tedy oddělit od rozpouštědla klasickou filtrací. Koloidální částice ale nejsou schopné procházet přes specifické membrány a lze je tedy **separovat pomocí dialýzy**. Kromě toho jsou částice koloidně disperzní soustavy vlivem interakce s molekulami rozpouštědla v neustálém pohybu – Brownův pohyb a tudíž **nedochází k jejich sedimentaci**.

Koloidní soustavy jsou dvojího druhu. Buď jsou tvořeny mikro krystalky kovů, jež jsou v kapalném prostředí jemně rozptýleny a dávají koloidnímu roztoku charakteristické zabarvení, nebo „rozpuštěnými“ částicemi jsou shluky organických molekul (makromolekul – například. proteinů). Koloidní roztoky tvoří přechod mezi pravými roztoky a roztoky, jakými jsou suspenze a emulze.

Pokud je v rozpouštědle rozptýlena pevná látka s částčkami o velikosti $> 1 \mu\text{m}$, např. grafitový prach, mluvíme o **suspenzi**, v případě rozptýlené kapaliny, vytvořené např. drobnými kapičkami oleje ve vodě, nazýváme nepravý roztok **emulzí**. Částice tvořící suspenzi nebo emulzi jsou ve většině případů zjištělné optickým mikroskopem. U suspenzí i emulzí dochází po určité době k rozdělení jejich složek – sedimentace. Odstřed'ováním lze tento proces urychlit.

4. Fotometrie a Spektrofotometrie

Fotometrie je jednou ze základních analytických metod umožňujících kvantitativní i kvalitativní analýzu vzorku. Principem fotometrie je interakce záření s molekulami vzorku, přičemž dochází k řadě optických jevů – absorpce, emise, rozptyl aj. Pokud se při analýze použije záření jedné konkrétní vlnové délky, hovoříme o fotometrii, pokud použijeme záření o proměnlivé vlnové délce (spektrum), hovoříme o spektrofotometrii (obr. 2.).

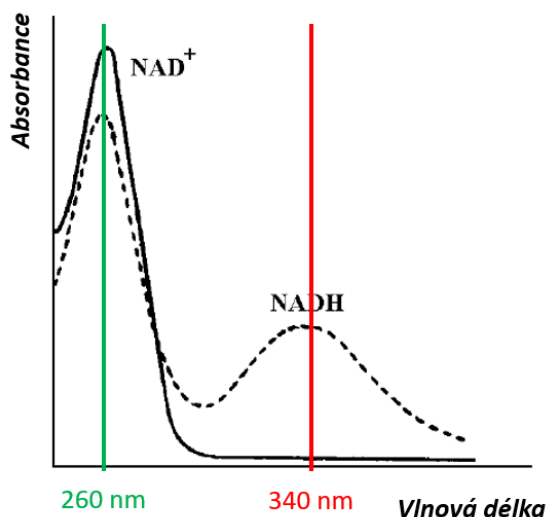
a) **fotometrie** - Měření absorpce světla vzorkem **jestliže**:

měření probíhá **při jedné** nebo **několika konkrétních vlnových délkách**, které většinou odpovídají **absorpčnímu maximu** dané látky. Absorpční maximum je

charakteristické pro každou látku a při fotometrii se používá pro **specifickou kvantifikaci** analyzované látky.

b) **spektrofotometrie** - Měření absorpce světla vzorkem **jestliže**:

měření probíhá v určitém **souvislém rozsahu vlnových délek záření**. Výsledkem spektrofotometrické analýzy je **absorpční křivka/spektrum**, jejíž průběh je specifický pro každou látku a využívá se tedy pro **kvalitativní analýzu** (identifikace látky v roztoku).



Obrázek 2.:

Fotometrická a spektrofotometrická analýza:

Při **fotometrické** analýze se stanovuje absorbance při **jedné konkrétní vlnové délce** – v případě stanovení NAD⁺ při 260 nm, při stanovení NADH při 340 nm. Výsledkem je tedy pouze **jedna hodnota absorbance**. Při **spektrofotometrické** analýze se měření provádí ve **spojitém intervalu vlnových délek** – v tomto případě od 240 do 450 nm. Výsledkem je tedy **křivka**.

Jednou z nejčastějších aplikací fotometrie je kvantitativní analýza – tedy stanovení přesné koncentrace látky v roztoku. Při kvantitativní analýze se využívá skutečnost postulovaná Lambert-Beerovým zákonem (obr. 3.):

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

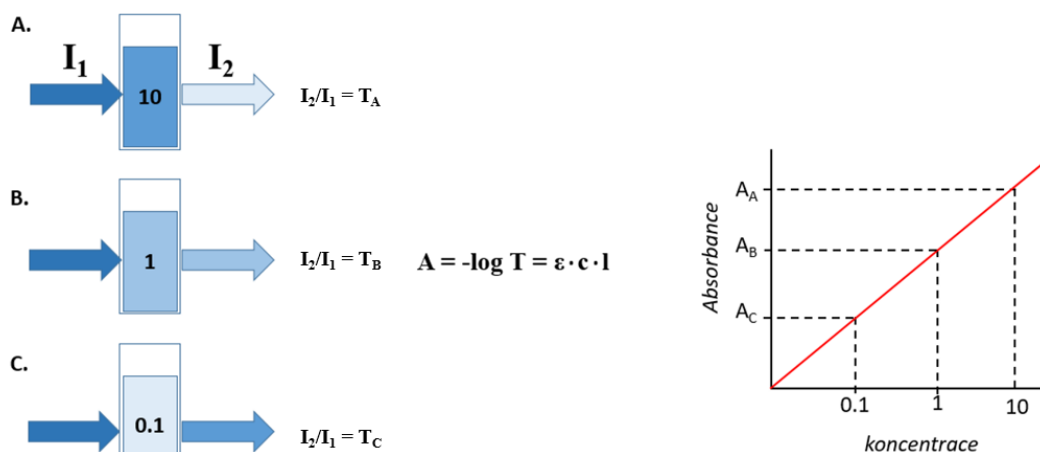
A = absorbance při zvolené vlnové délce

T = transmittance při zvolené vlnové délce

ε = molární absorpční koeficient při zvolené vlnové délce

c = látková koncentrace měřeného roztoku (mol/l)

l = tloušťka měřené vrstvy (kyvety) cm



Obrázek 3.: Lambert-Beerův zákon je matematické vyjádření závislosti míry absorpce záření na vlastnostech látky, skrz kterou záření prochází. Poměr **intenzit záření** po (I_2) a před (I_1) průchodem roztokem se označuje jako **transmittance** (T). Pro většinu kvantitativních analýz se jako vyhodnocovací parametr používá záporný dekadický logaritmus T , který se nazývá **absorbance** (A). Absorbance přímo úměrně závisí na **koncentraci vzorku** (c) a **tloušťce vrstvy**, kterou záření prochází (l – odpovídá šířce kyvety). Specifické absorpční vlastnosti každé látky charakterizuje **molární absorpční koeficient** (ϵ). Grafické vyjádření hodnoty A u vzorků se známou koncentrací (A ; B ; C) se označuje jako **kalibrační křivka**, která má u pravých roztoků v určitém rozsahu lineární průběh. Rozsah koncentrací pokrývající lineární závislost absorbance na koncentraci se označuje jako **linearita**.

Při kvantitativní analýze lze hodnotu koncentrace neznámého vzorku získat těmito způsoby:

- výpočtem z Lambert-Beerova zákona, známe-li molární absorpční koeficient
- odečtením z **kalibrační křivky**
Kalibrační křivka je grafické znázornění vztahu mezi dvěma proměnnými – např. závislost absorbance na koncentraci. Změřením absorbance sady **standardních roztoků** o známé koncentraci zkonstruujeme kalibrační křivku. Z ní následně můžeme odečíst koncentraci **neznámého vzorku**, po předchozím stanovení jeho absorbance. Kalibrační křivku lze použít pouze v oblasti linearity – viz. dále.
- změřením absorbance **standardního roztoku o známé koncentraci, absorbance roztoku vzorku a následným výpočtem ze vztahu:** $A_{st}/A_{vz} = c_{st}/c_{vz}$

A_{st} = absorbance standardu

A_{vz} = absorbance vzorku

c_{st} = látková koncentrace standardu

c_{vz} = látková koncentrace vzorku

Vzhledem k tomu, že k absorpci záření dochází na úrovni molekulových orbitalů, nelze Lambert-Beerův zákon aplikovat na soustavy, ve kterých dochází kromě absorpce záření i k jiným optickým jevům – například k rozptylu. V takovém případě není míra

transmittance, respektive absorbance ovlivněna jen proměnnými $\epsilon \cdot c \cdot l$, ale i dalšími faktory, jako je velikost a struktura dispergovaných částic, mírou sedimentace aj. **Koloidně disperzní soustavy se tedy za určitých podmínek nechovají podle Lambert-Beerova zákona.**

Turbidimetrie a nefelometrie jsou analytické metody, které využívají princip měření intenzity rozptýleného záření. Používají se především pro analýzu koloidně dispersních soustav. Liší se pouze pozicí detektoru – turbidimetrie měří zeslabení intenzity záření po průchodu vzorkem – čím je vzorek více zakalený (koncentrovaný), tím méně světla propustí; nefelometrie měří intenzitu rozptýleného záření - čím je vzorek více zakalený (koncentrovaný), tím více světla rozptýlí.

Přesnost fotometrických metod

Většina fotometrů může měřit absorbanci v rozmezí 0 až 3 nebo 4. To však neznamená, že by měření v celém tomto rozsahu bylo rozumné. Z definice absorbance vyplývá, že při $A = 1$, došlo k absorpci 90% z původní intenzity záření a jen 10% prošlo k detektoru, při $A = 2$ došlo k absorpci 99% z původní intenzity záření viz. obrázek 4. Při vysokých hodnotách absorbance je tedy výsledek zatížen značnou chybou a je obtížně interpretovatelný. Nejlepších výsledků se dosáhne, bude-li se absorbance vzorku pohybovat v rozmezí 0,2 až 0,8. Za rozumné lze považovat měření v rozsahu 0,2 až 1,2. Je-li absorbance vyšší, je nutné vzorek ředit.

Obrázek 4.: Intenzita pohlceného záření odpovídající konkrétní absorbanci vzorku.

T	prošlo (%)	pohlceno (%)	A
1	100	0	0
0.99	99	1	0.004
0.90	90	10	0.05
0.50	50	50	0.3
0.10	10	90	1.0
0.01	1	99	2.0
0.001	0.1	99.9	3.0
0.0001	0.01	99.99	4.0

Blank, nebo také nulový, nebo slepý vzorek, je roztok, který neobsahuje stanovovanou látku, ale jinak má stejné složení jako analyzovaný vzorek. Používá se pro **odečtení vlivu rozpouštědla na měření**. Na začátku každého měření, je třeba nejprve na fotometru nastavit nulovou hodnotu – změřením absorbance blanku se takto získaná hodnota na fotometru určí jako 0. Následující měření zaznamenává rozdíl od této hodnoty – jedná se tedy o relativní kvantifikaci, kdy se zobrazuje změna od nastavené hodnoty 0.

Otázka: Je za určité situace možné měřením získat zápornou hodnotu absorbance?

Oblast linearity spektrofotometrie je rozsah koncentrací vzorku, při kterých je měřená hodnota přímo úměrná koncentraci analyzované látky. V praxi to znamená, že spektrofotometr měří správně, pouze pokud se koncentrace vzorku nachází v daném rozsahu linearity. Při překročení tohoto rozsahu se absorbance přestává chovat podle Beerova-Lambertova zákona, což ovlivňuje přesnost měření.

Absorpční maximum představuje vrchol v absorpčním spektru. Vlnová délka absorpčního maxima je tedy vlnová délka, při které daná látka nejvíce interaguje (absorbuje) se zářením.

Přesnost měření je velmi ovlivněna i přípravou vzorku a kyvety. Nejvýznamnější vlivy, které ovlivňují přesnost spektrofotometrických stanovení, jsou:

- Je třeba měřit ve vhodné kyvetě, zvolená vlnová délka musí ležet v pásmu, pro které je kyveta určena
- Kyvety pro vzorky i blanky musejí být čisté. To lze ověřit tak, že naplněné destilovanou vodou dají všechny stejnou absorbanci.
- **S kyvetami je třeba pracovat tak, aby nedošlo ke znečištění optických ploch (například dotykem prstů).**
- Kyveta musí být zvenčí suchá, uvnitř nesmějí zůstat bublinky vzduchu, měřený roztok musí být dokonale promíchaný. Kapka stékající po kyvetě, bublinky nebo plovoucí sraženina v měřeném roztoku se projeví obvykle tím, že se naměřená absorbance neustále mění.
- **Kyveta musí být vzorkem dostatečně naplněná.**
- 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 se dosáhne, 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, jen je co nejlépe vylít a vysušit.
- Každé měření by se ideálně mělo provádět v sadě – tzv. **replikátu**. Tímto způsobem se minimalizuje chyba. Výsledek se v takovém případě uvádí jako aritmetický průměr z naměřených hodnot $\pm$ směrodatná odchylka.

Násobné ředění

Koncentrace roztoku se velmi často vyjadřuje ve formě násobku ředění/koncentrování oproti cílové koncentraci. V praxi tedy označení 10x znamená, že daný roztok má 10 krát vyšší koncentraci, než je koncentrace cílová. Pokud je tedy cílová koncentrace 0,1 mol/l, pak 10x koncentrovaný roztok má koncentraci 1 mol/l. Takovýto zápis zároveň znamená, že roztok o dané koncentraci, představuje poměrnou část z celkového objemu roztoku o cílové koncentraci. Z 10x koncentrovaného roztoku připravíme roztok o cílové

koncentraci tak, že smícháme 1/10 výsledného objemu 10x koncentrovaného vzorku a 9/10 výsledného objemu rozpouštědla – jedná se tedy o ředění 1:9.

Příklad:

Vypočtete objemy vody a 10x koncentrovaného zásobního roztoku NaCl, potřebné k přípravě 0,5 l 1x koncentrovaného pracovního roztoku.

Řešení:

Zásobní roztok je oproti pracovnímu roztoku 10x koncentrovaný. Ve výsledném objemu pracovního roztoku, je tedy zásobního roztoku 1/10.

Pracovní roztok tedy připravíme smícháním 50 ml (1/10 výsledného objemu – tedy 0,5l) zásobního roztoku a 450 ml vody.