

ZÁKLADNÍ INSTRUMENTÁLNÍ METODY

Centrifugace

Fotometrie a spektrofotometrie

Měření pH

CENTRIFUGACE

Centrifugace neboli odstředování látky může sloužit ke speciálním preparativním nebo analytickým účelům, nejčastěji je však používána k oddělení složek suspenzí nebo emulzí na základě jejich rozdílných hustot a nahrazuje podstatně pomalejší, v některých případech obtížně proveditelnou filtraci.

Proces centrifugace je nelépe charakterizován pomocí *relativního odstředivého zrychlení R*, které udává násobek zemského gravitačního zrychlení a je funkcí poloměru otáčení:

$$R = 1,12 \cdot 10^5 \cdot r \cdot n^2$$

r poloměr rotace (cm)

n počet otáček (min^{-1})

V praxi je však namísto relativního odstředivého zrychlení velmi často uváděn jako přibližná charakteristika centrifugace pouze počet otáček za minutu - zejména tehdy, je-li zřejmé, jaký typ centrifugy je používán.

Jako *sediment* je označována odstředěná látka usazená na dně centrifugační kyvety.

Jako *supernatant* je označován roztok v centrifugační kyvetě, zbavený odstředěné látky.

K dalšímu zpracování se podle potřeby používá v různých případech buď sediment, nebo supernatant.

Praktické pokyny pro centrifugaci

- centrifugační kyvety plňte maximálně do dvou třetin objemu - v opačném případě hrozí vylití vzorku, jeho částečná ztráta a současně znečištění centrifugy,
- protilehlé centrifugační kyvety (u vysokootáčkových centrifug nejlépe všechny kyvety) je nutné velmi přesně staticky vyvážit (s výjimkou nízkootáčkových stolních centrifug s úhlovým rotorem, do něhož se vkládají mikrozkušavky typu Eppendorf - v tomto případě postačuje vkládat jako protilehlé mikrozkušavky naplněné přibližně stejným objemem téhož vzorku), nevyváženost kyvet může způsobit havárii centrifugy,
- protilehlé kyvety musí být co nejpřesněji vyváženy i dynamicky, tzn. jejich těžiště musí být stejně vzdáleno od osy otáčení - je tedy nutné používat jako protilehlé kyvety (rovněž i pouzdra) naprosto stejného typu, stejných rozměrů a dále je nutné plnit protilehlé kyvety roztoky se stejnou hustotou,
- nepřekračujte povolenou statickou (hmotnost vzorků) ani dynamickou (maximální otáčky) zátěž centrifugy, překročení zátěže může způsobit havárii centrifugy (roztržením rotoru) nebo alespoň deformaci kyvet (v případě skleněných kyvet jejich rozdrčení),
- při tzv. kritických otáčkách centrifugy (doba kmitu rotoru odpovídá počtu otáček) se zpravidla objevují vibrace centrifugy i po velmi přesném vyvážení protilehlých kyvet; nenechávejte běžet centrifugu při kritických otáčkách, při ručním ovládní chodu centrifugy je nutné otáčky co nejrychleji zvýšit nebo snížit mimo kritickou hodnotu,
- většina biologických vzorků vyžaduje chlazenou centrifugaci, při předchlazování centrifugu uzavřete,
- zásadně neotevírejte centrifugu za chodu - nebezpečí vážného úrazu,
- po ukončení centrifugace vyčistěte rotorový prostor (vyčkejte rozmrazení kondenzované vody a rotorový prostor vysušte).

Centrifugace provádějte výhradně pod dohledem personálu laboratoře.

FOTOMETRIE A SPEKTROFOTOMETRIE

Fotometrie

Cílem fotometrických měření je nejčastěji stanovení koncentrace látky v roztoku na základě měření absorpce (poklesu intenzity světla při jeho průchodu roztokem) roztoku. Vzájemný vztah mezi absorpcí látky a její koncentrací v roztoku popisuje Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A absorpce roztoku [*bezrozměrná veličina*] (při definované vlnové délce)

ε absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$], [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$], [$\text{mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$]
(při definované vlnové délce)

c koncentrace látky [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$], [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$], [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

l délka optické dráhy (rozměr kyvety - obvykle se udává v cm)

V praxi opakovaně měříme sadu vzorků v kyvetě stejných rozměrů, tzn. nemění se délka optické dráhy, a platí tedy jednoduchý vztah mezi naměřenou absorpcí a koncentrací látky v roztoku

$$A = f(c),$$

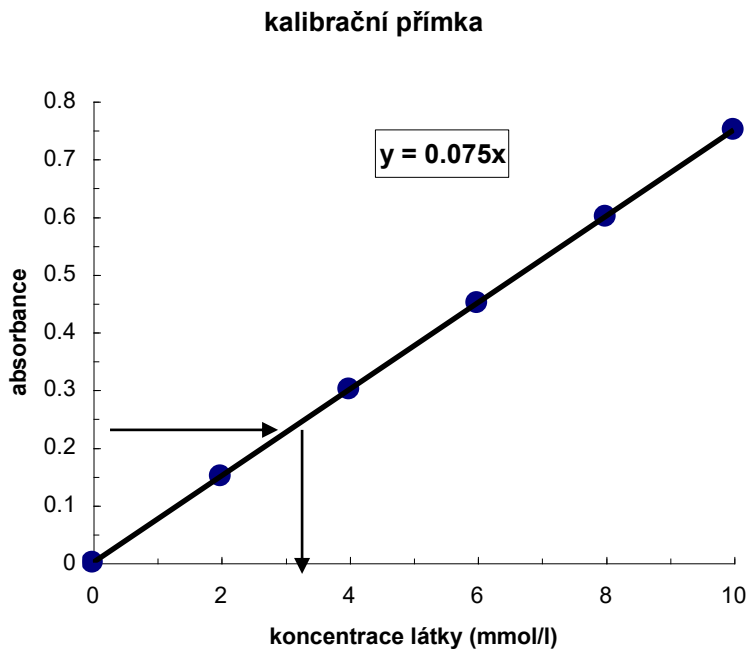
neboť absorpční koeficient ε je při určité vlnové délce konstantní veličinou nezávislou na koncentraci (jeho velikost vyjadřuje hodnotu absorpce roztoku látky s jednotkovou koncentrací - *molární absorpční koeficient* [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$], v anglosaské literatuře se uvádí názorný tvar $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] udává absorpcí 1 mol/l roztoku při délce optické dráhy 1 cm, *milimolární absorpční koeficient* [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$] udává absorpcí 1 mmol/l roztoku při délce optické dráhy 1 cm, *miligramový absorpční koeficient* [$\text{mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$] udává absorpcí roztoku obsahujícího 1 mg látky/1 ml roztoku při délce optické dráhy 1 cm, *specifický absorpční koeficient* udává absorpcí jednocentního roztoku látky atd.).

V koncentračním rozmezí platnosti Lambertova-Beerova zákona má tento vztah lineární průběh. Vztah přímé úměrnosti mezi koncentrací látky v roztoku a absorpcí roztoku však neplatí neomezeně, nýbrž jen v určitém rozsahu koncentrací látky v roztoku (absorpce obvykle nesmí přesáhnout hodnotu 0,6 - 0,8). Jsou-li hodnoty absorpce vyšší, je potřeba vzorek definovaným způsobem zředit (obvykle volíme násobné ředění, zvláště v případě, kdy určíme koncentraci látky v roztoku pomocí absorpčního koeficientu; jestliže sestrojíme kalibrační přímkou, lze ředit všechny vzorky přídatkem stejného objemu rozpouštědla).

Koncentraci látky v roztoku lze určit několika způsoby:

- známe-li hodnotu absorpčního koeficientu stanovované látky, lze ji dosadit do Lambertova-Beerova zákona a vypočítat koncentraci látky,
- neznáme-li hodnotu absorpčního koeficientu stanovované látky, změříme absorpcí roztoku látky o známé koncentraci (standardní vzorek) a z Lambertova-Beerova zákona vypočítáme hodnotu absorpčního koeficientu, kterou použijeme pro výpočet koncentrace neznámé látky (méně přesný způsob),

- neznáme-li hodnotu absorpčního koeficientu stanovované látky, změříme absorbanci sady roztoků látky o známé koncentraci (standardní vzorky) a sestrojíme **kalibrační přímku** - závislost absorbance látky na její koncentraci, jejíž směrnice udává hodnotu absorpčního koeficientu (přesnější způsob); v praxi však častěji odečítáme přímo z kalibračního grafu koncentraci látky na ose x :



absorbance roztoku = 0,24 \Rightarrow koncentrace látky = 3,2 mmol/l

směrnice přímky = 0,075 \Rightarrow milimolární absorpční koeficient ϵ [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$] = 0,075 \Rightarrow 1 mmol/l roztok látky má absorbanci 0,075 (absorbance 0,24 odpovídá koncentraci $0,24/0,075 = 3,2$ mmol/l)

Kalibraci je možné provádět také např. vzhledem k látkovému množství nebo hmotnosti látky rozpuštěné v roztoku, v tom případě však musí být definován objem měřeného vzorku.

Kalibrační přímka musí vždy procházet počátkem (roztok s nulovou koncentrací látky má nulovou absorbanci). Abychom potlačili vliv absorbance jiných látek v roztoku nežli je látka stanovovaná, provádíme diferenční měření proti tzv. slepému vzorku (rozpuštědlo, v němž je stanovovaná látka rozpuštěna, případně reakční směs nebo jiný vzorek obsahující všechna činidla, substráty apod. kromě stanovované látky).

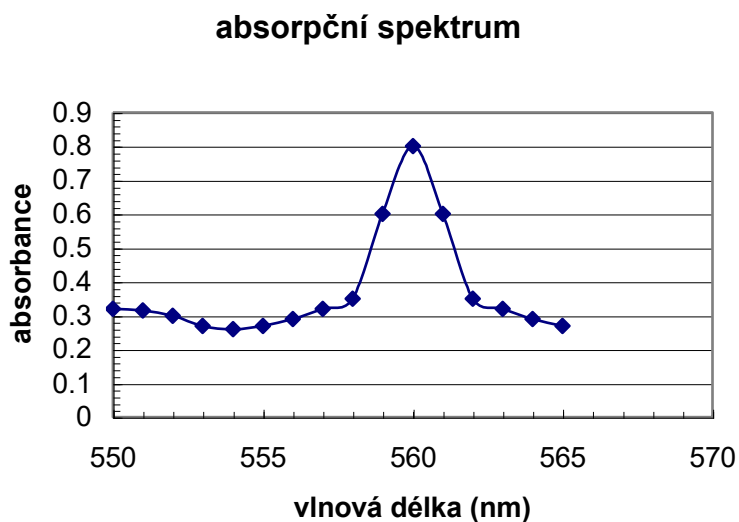
V roztoku s několika absorbujícími složkami je výsledná absorbance součtem absorbancí jednotlivých složek:

$$A = \sum A_i = l \cdot \sum \epsilon_i c_i$$

Koncentraci několika složek ve vícesložkové soustavě lze jednoduše stanovit tak, že se změří absorbance roztoku při několika vlnových délkách (a řeší se soustava několika rovnic o několika neznámých - Lambertův-Beerův zákon s dosazenými hodnotami experimentálně zjištěných absorbcí při různých vlnových délkách a absorpčních koeficientů látek při různých vlnových délkách).

Spektrofotometrie

Absorpční spektrum látky je závislost absorbance látky na vlnové délce světla procházejícího roztokem látky ($A = f(\lambda)$). Každá látka má charakteristické absorpční spektrum, které závisí na struktuře látky. Absorpční spektrum látky o známé koncentraci je charakterizováno jednak polohou absorpčního maxima (vlnová délka absorpčního maxima), jednak hodnotou absorbance v absorpčním maximu (pro absorpční maximum bývá obvykle tabelována hodnota absorpčního koeficientu látky; v praxi se při vlnové délce absorpčního maxima obvykle stanovuje koncentrace látky v roztoku z toho důvodu, že je zde stanovení nejcitlivější).



základní charakteristiky absorpčního spektra:

- vlnová délka absorpčního maxima = 560 nm
- hodnota absorbance (závisí na koncentraci látky v roztoku) v absorpčním maximu = 0,8

Přesnou charakteristiku absorpčního spektra lze získat jeho derivací (první derivace spektra potíná osu x při vlnové délce absorpčního maxima), tuto operaci je schopna provést většina software řídicích moderní spektrofotometry.

Praktické pokyny pro fotometrická a spektrofotometrická měření

- k měření používejte pouze zcela čiré roztoky - zákal vzorku silně zkresluje výslednou absorbanci (výjimkou je např. orientační stanovení množství buněk v suspenzi - v tomto případě se měří záměrně zákal suspenze obvykle jako absorbance při vlnové délce v oblasti 550 - 600 nm),
- proměřujte pouze předem důkladně promíchané vzorky,
- dbejte na dostatečné množství roztoku v kyvetě - paprsek fotometru musí procházet roztokem, nikoliv rozhraním (hladinou roztoku) nebo dokonce nad hladinou roztoku,
- před měřením vždy očistěte stěny kyvety (nejlépe vlhkou buničinou, pozor však na ulpívající vlákna) - jakákoliv nečistota (včetně kapek na vnějších stěnách kyvety) zkresluje výsledek měření,
- pozor na zamlžení stěn kyvety při měření chladných vzorků - značně zkresluje výslednou absorbanci vzorku,
- ve vzorku nesmí docházet k vývoji plynů - bublinky plynu ulpívající na vnitřních stěnách kyvety zkreslují výslednou absorbanci vzorku,
- zjistěte, v jakém směru prochází v používaném přístroji paprsek, a v tomto směru orientujte kyvetu, pokud nemá pro průchod paprsku uzpůsobené všechny čtyři stěny,
- nezapomeňte nastavit nulovou hodnotu absorbance pro slepý vzorek (resp. proměřit tzv. základní linii v případě měření spekter),
 - měření série vzorků provádějte stále ve stejné kyvetě (tutéž kyvetu použijte i pro seřízení absorbance slepého vzorku na nulu)
- překračují-li naměřené absorbance hodnotu 0,6 - 0,8, je potřeba vzorek definovaným způsobem (tzn. přidáním známého objemu vody, pufru apod. ke známému objemu původního vzorku) zředit; stejným způsobem je třeba zředit i slepý vzorek a znovu seřídit hodnotu absorbance slepého vzorku na nulu, resp. proměřit základní linii spektra,
- měříte-li sadu vzorků s podobnou, postupně vzrůstající, postupně klesající apod. koncentrací, je zbytečné mezi měřeními jednotlivých vzorků vymývat kyvetu vodou, naopak se zředěním vzorků zanáší do měření větší chyba než při vzájemném nepatrném smísení vzorků.

Při měření v UV oblasti je zapotřebí používat kyvety z křemenného skla. **Měření v kyvetách z křemenného skla provádějte výhradně pod dohledem personálu laboratoře.**

MĚŘENÍ pH

Koncentrace (aktivita) H^+ v roztoku se stanovuje spektrálními nebo elektrochemickými (potenciometrickými) metodami.

Spektrální metody využívají toho, že změna pH vyvolává v některých sloučeninách (acidobazických indikátorech) změny struktury spojené se změnou spektrálních vlastností (absorpce či fluorescence), v nejjednodušším případě jde o vizuální sledování změny zbarvení indikátoru.

Potenciometrické měření pH roztoků je založeno na měření rovnovážného napětí systému dvou elektrod vložených do roztoku - měrné (indikační) a referentní (se známou hodnotou potenciálu). Potenciál měrné elektrody závisí na koncentraci H^+ v roztoku. Měrná a referentní elektroda se zpravidla používají ve formě kombinované elektrody.

Praktické pokyny pro potenciometrická měření pH

- s elektrodou zacházejte opatrně, je náchylná k poškození (měříte-li pH v míchaném roztoku, musí být elektroda mimo dosah pohyblivého míchadélka),
- před každým měřením (sady vzorků) pH metr zkalibrujte pomocí alespoň jednoho standardního pufru (pokud jsou očekávané hodnoty měřeného pH blízké pH standardního pufru), případně pomocí sady standardních pufrů (měříte-li hodnoty pH v širším rozsahu) - k dispozici jsou komerční standardní pufrы pH 4, pH 7 a pH 9,
- před každým (jednotlivým) měřením elektrodu opláchněte pomocí stříčky destilovanou vodou a velmi opatrně osušte kouskem buničiny,
- pH měřte v dostatečném objemu roztoku (boční vývod referentní elektrody u kombinované elektrody musí být ponořen v roztoku),
- měříte-li pH roztoku, jehož teplota se výrazně odchyľuje od teploty 25 °C, je potřeba nastavit na pH-metru teplotní korekci měření,
- při měření vyčkejte na ustálení odezvy pH metru,
- po skončení měření elektrodu opláchněte a ponořte do nádobky s destilovanou vodou nebo s koncentrovaným roztokem KCl (podle typu elektrody a předpokládané době uskladnění elektrody v roztoku).