

Analytické metody



HANA LUKŠANOVÁ

HANA.LUKSANOVA@LFMOTOL.CUNI.CZ

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ CHEMIE A KLINICKÉ BIOCHEMIE,
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
A FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE

Analytické metody



- Titrace
- Spektrofotometrie
- Chromatografie
- Elektroforéza
- Potenciometrie

Základní dělení analytických metod



- **Kvalitativní analýza**
 - +/-
 - Srážecí reakce, plamenová zkouška
 - Instrumentální analýza- TLC, MS
- **Kvantitativní analýza**
 - **Množství**
 - Vážková analýza
 - Odměrná analýza
 - Instrumentální analýza

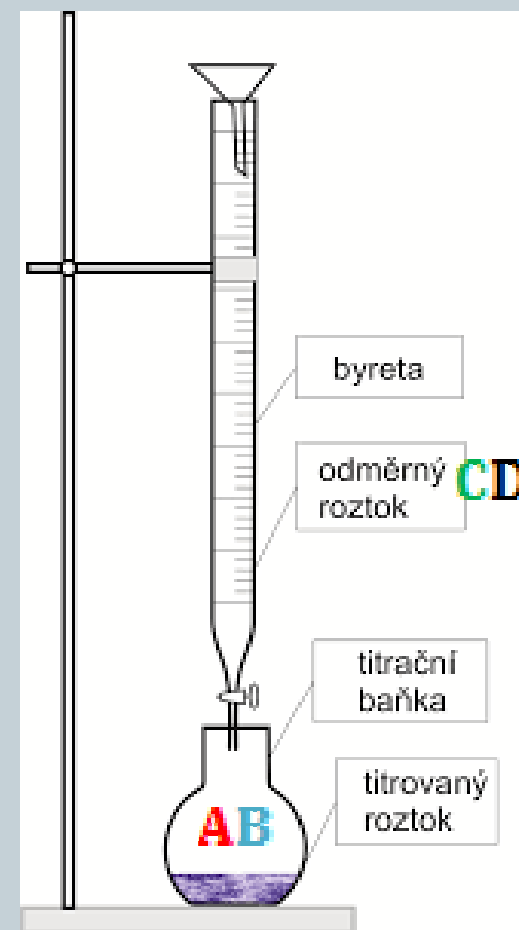
Titrace



- Odměrná analýza – volumetrie
- Kvantitativní analýza
- Titrant - titrační činidlo
 - vhodné činidlo o přesně známé koncentraci
- Bod ekvivalence $AB + CD \rightarrow AD + CB$

$$n_{AB} = n_{CD}$$

$$c_{AB} * V_{AB} = c_{CD} * V_{CD}$$



Druhy titrací



- Typ reakce
 - Acidobazické
 - Oxidačně-redukční
 - Srážecí reakce
 - Komplexotvorné

Indikace bodu ekvivalence

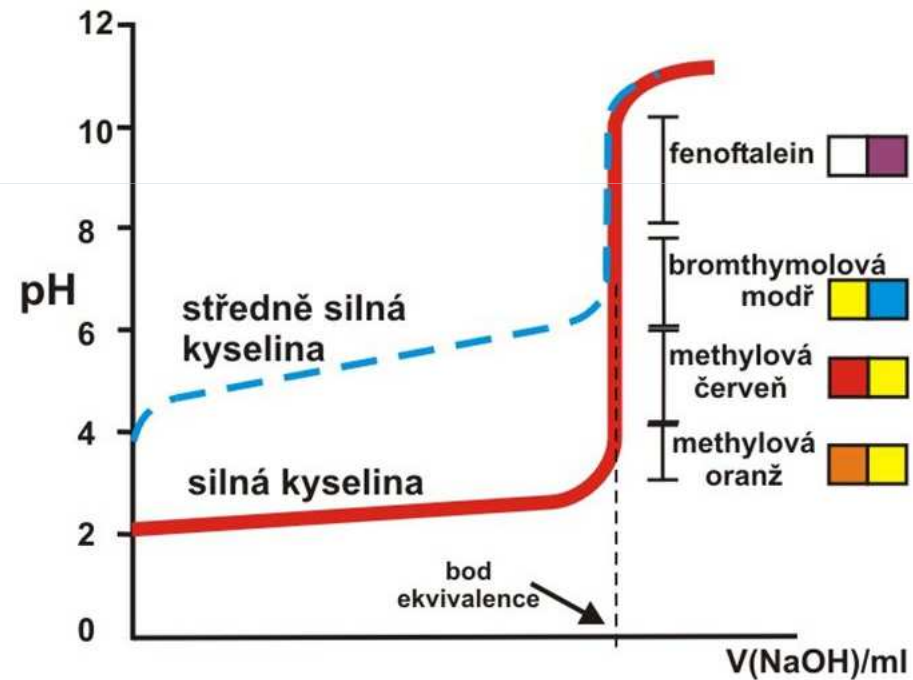


- **Indikátor**
 - reakce s titrantem v bodě ekvivalence či jeho blízkosti
 - Barevná změna roztoku
 - ✦ Slabá organická kyselina jejichž konjugovaná zásada se výrazně liší zbarvením, $\text{pH} = \text{pK}_{\text{HA}} \pm 1$
 - Vznik zákalu či sraženiny
- **Instrumentální metody**
 - Měření pH
 - Vodivosti
 - Redox potenciálu

Titrace



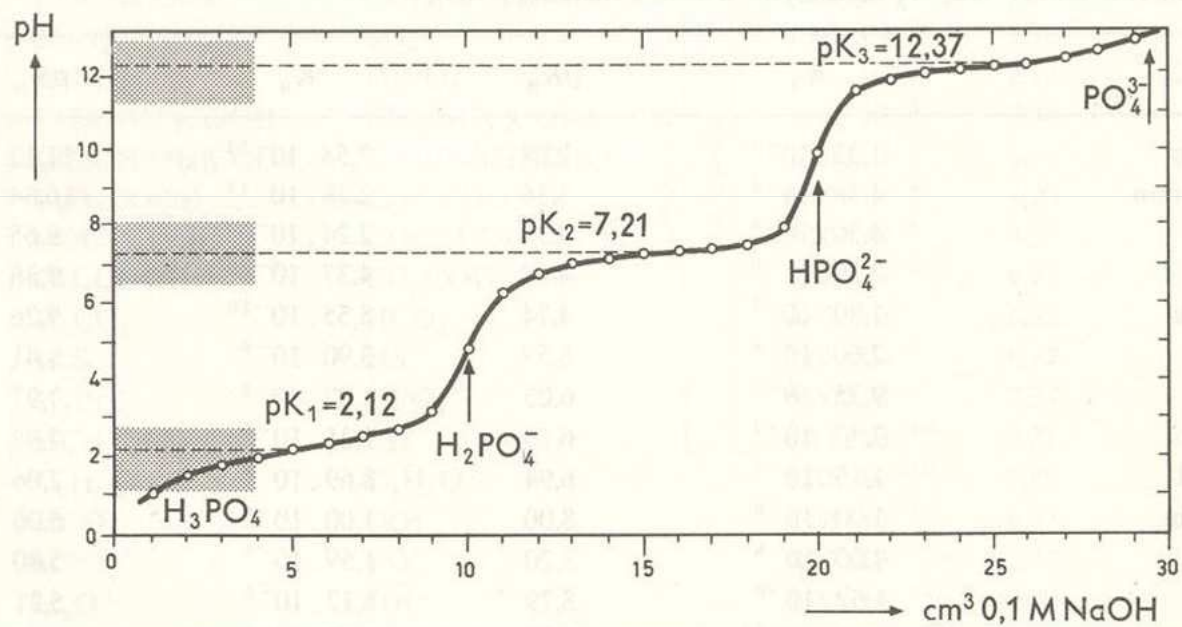
Titrační křivka titrace kyseliny silnou bází



Titrace- příklad



titrační křivka vícesytné kyseliny:



Optické analytické metody



- Instrumentální optická analýza
- Interakce elektromagnetického záření s hmotou
 - Nespektrální- změna vlastnosti záření po průchodu hmotou
 - **Spektrální**- výměna energie mezi látkou a zářením
 - Absorbance- pohlcení světla
 - Fluorescence a fosforescence- emise světla

Energetické stavy

FL - fluorescence

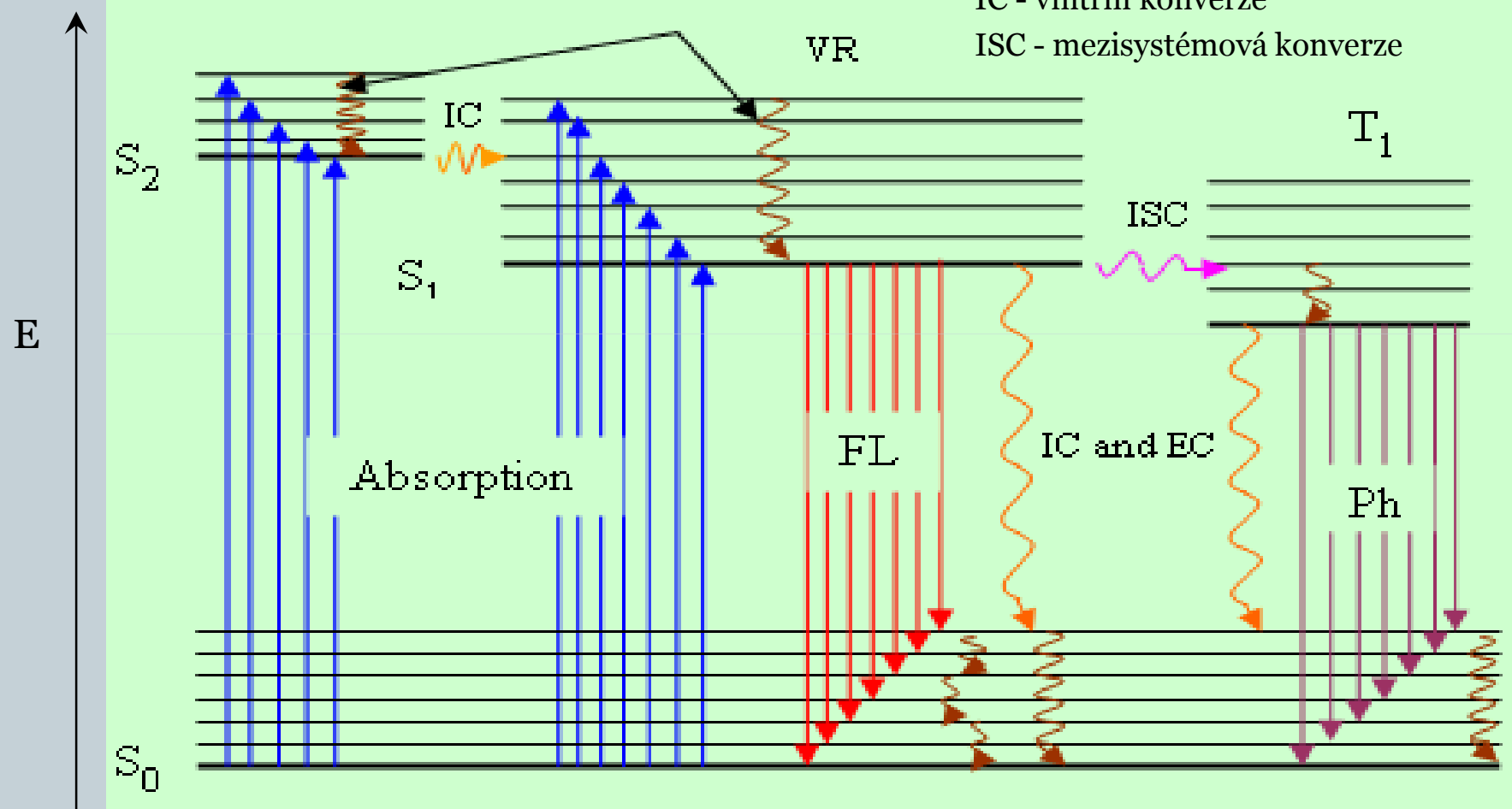
Ph - fosforescence

Nezářivé přechody:

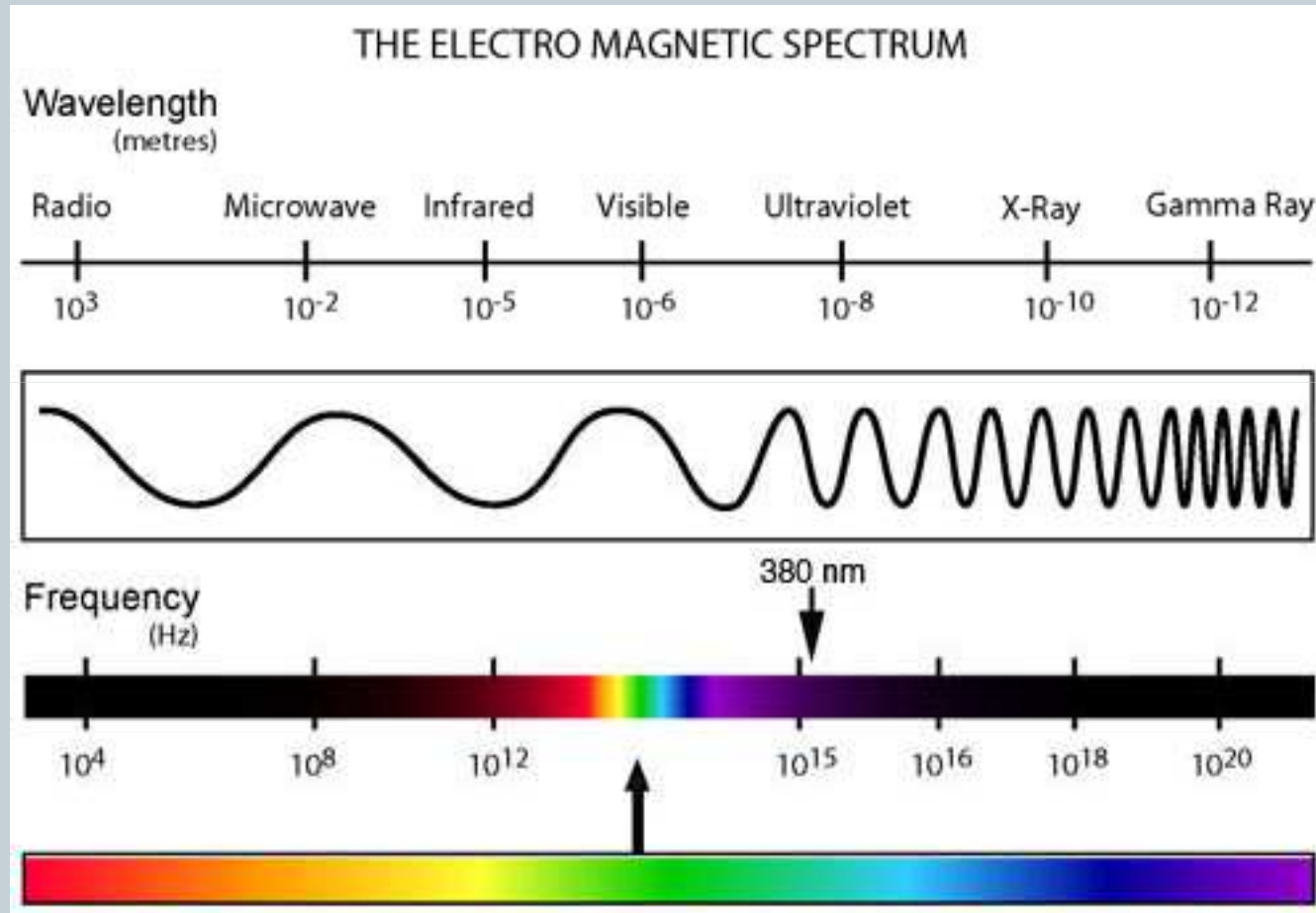
VR - vibrační relaxace

IC - vnitřní konverze

ISC - mezisystémová konverze



Elektromagnetické záření



Elektromagnetické záření



- λ – vlnová délka
- Frekvence [Hz]-f

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad c = 3 * 10^8 \text{ m/s}$$

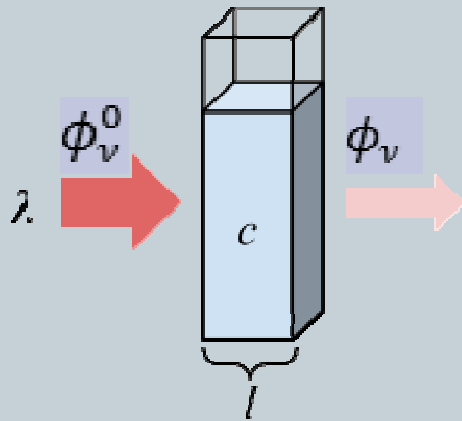
- Energie fotonu - E
- Planckova konstanta - h $h = 6,6 * 10^{-34} \text{ J * s}$

$$E = h * f = h * \frac{c}{\lambda}$$

Transmittance a Absorbance



- Transmittance



$$T = \frac{\phi_v}{\phi_v^0}$$

- Absorbance

- Optická hustota- útlum monochromatické vlny

$$A(\nu) = -\log T = \log \frac{\phi_v^0}{\phi_v}$$

Spektrofotometrie- Lambert-Beerův zákon



- Lamberův zákon

$$A(\nu) = b(\nu) * l$$

- Beerův zákon

$$b(\nu) = \varepsilon * c$$

- Lamber-Beerův zákon

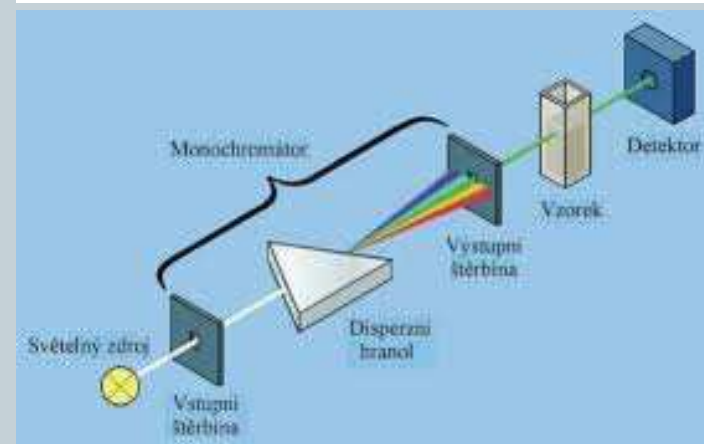
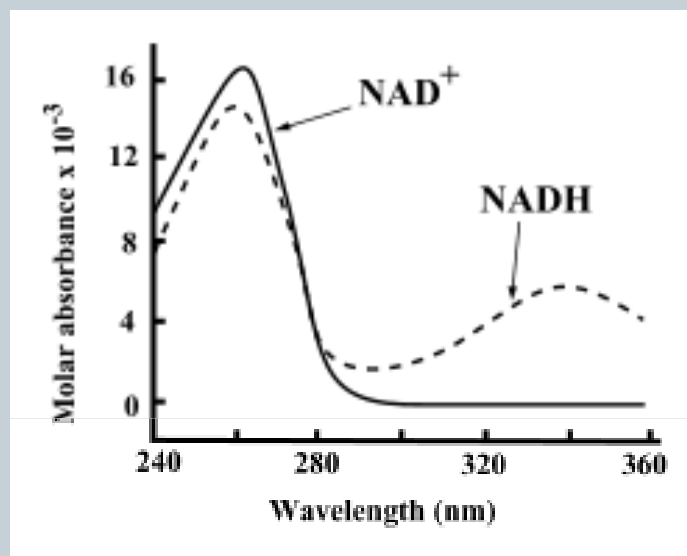
$$A(\nu) = \varepsilon * c * l$$

- Kalibrační křivka

Spektrofotometrie-uspořádání



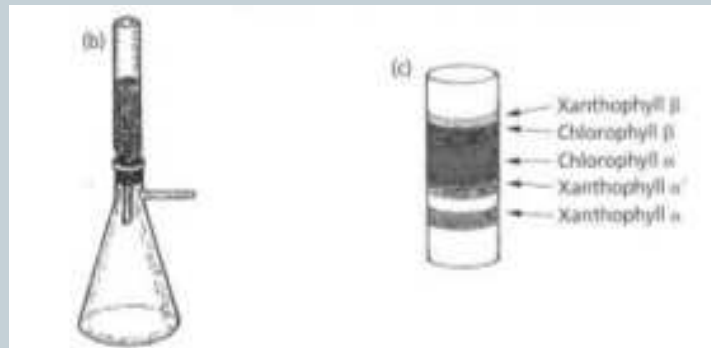
- Vhodná vlnová délka
- Sestrojení kalibrační křivky



Chromatografie

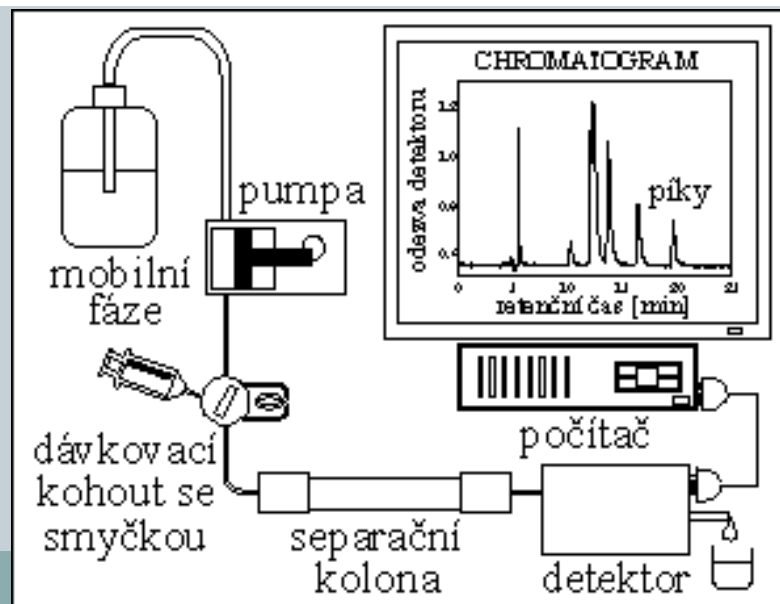
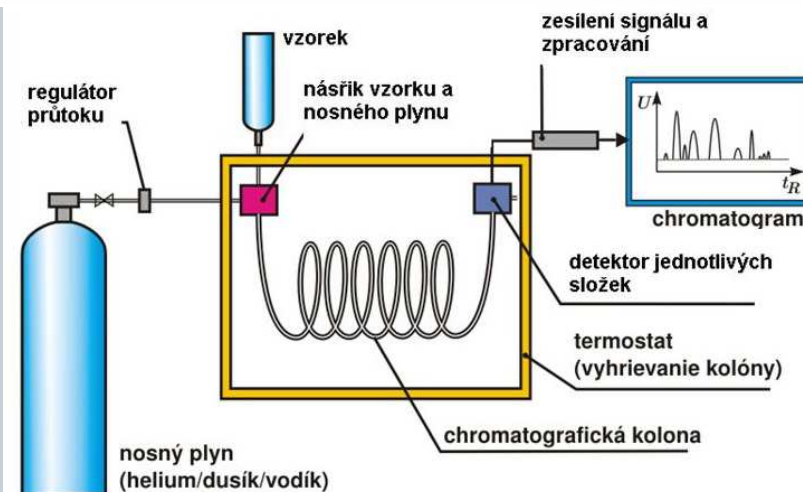


- Separáční metoda založen na rozdílné rovnovážné distribuci složek směsi mezi stacionární a mobilní fází
- Ruský botanik Michail Semjonovič Cvět
 - Dělení rostlinných pigmentů v CS_2 na koloně s CaCO_3



Chromatografie-dělení I

- Dle mobilní fáze
 - Plynná
 - Kapalinová



Chromatografie-dělení II

- Dle uspořádání
 - Kolonová
 - Plošná

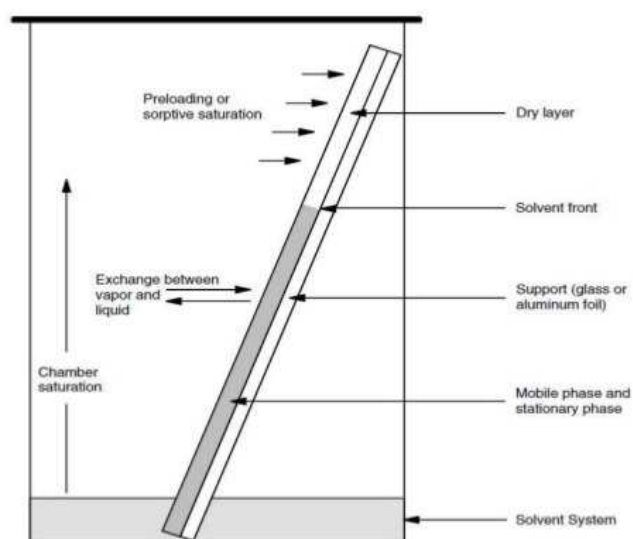
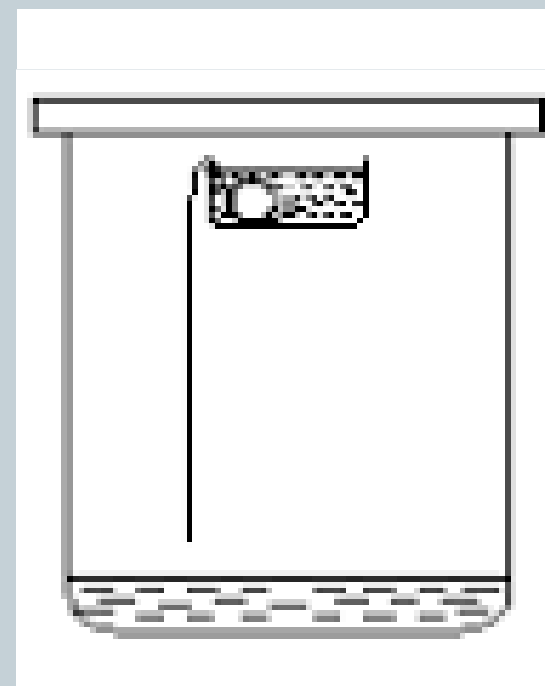
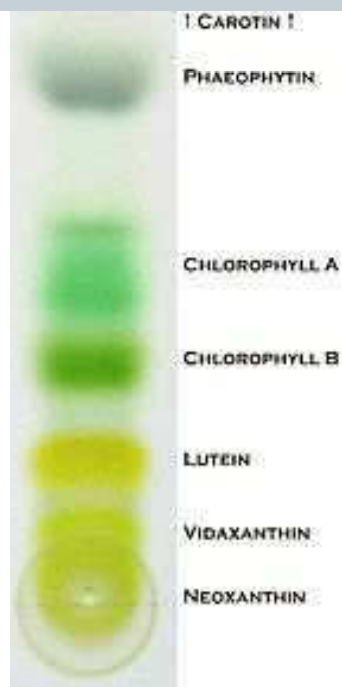


Figure 57. Terms used in connection with chamber saturation
Schematic representation of the exchange processes between the gas space, the solvent system reservoir and the TLC plate before and during development.



Chromatografie-dělení III

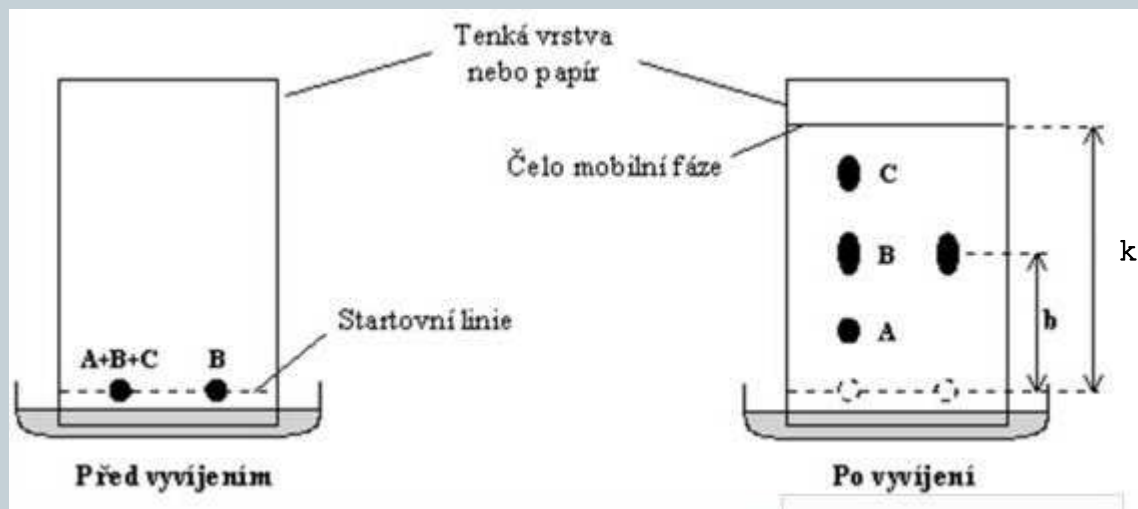


- Dle principu dělení
 - **Rozdělovací**
 - různá rozpustnost mezi mobilní a stacionární fází
 - **Adsorpční**
 - různá adsorpce složek na stacionární fází
 - **Iontově výměnná chromatografie - IONEX**
 - rozdílná interakce s ionty na stacionární fází
 - **Gelová chromatografie**
 - různá velikost molekuly – molekulové síto
 - **Afinitní chromatografie**
 - selektivní vazba

Chromatografie – Vyhodnocení I

- Retenční faktor R_f

$$R_f = \frac{b}{k}$$



Chromatografie – Vyhodnocení II

- Kalibrační křivka
- Kvalitativní stanovení

- Retenční čas

$$t_R = t_M + t'_R$$

- Retenční faktor R

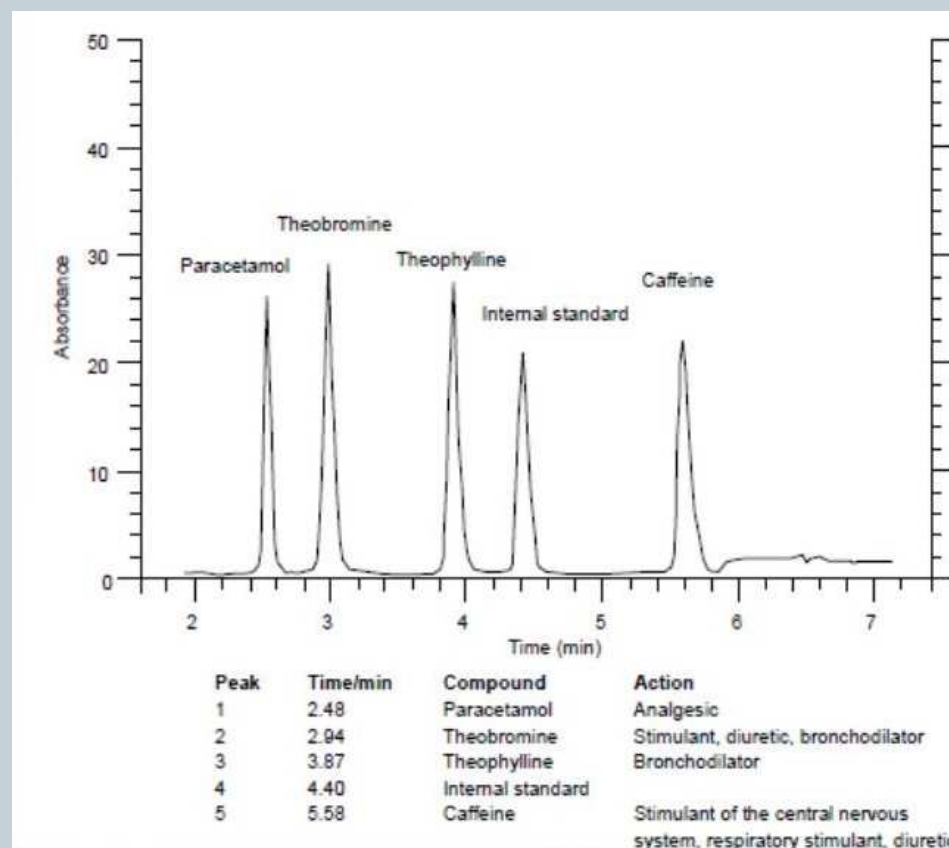
$$R = \frac{t'_R}{t_M}$$

- Retenční objem

$$V_R = V_M + V'_R$$

- Kvantitativní stanovení

- Plocha elučního vrcholu



Elektroforéza

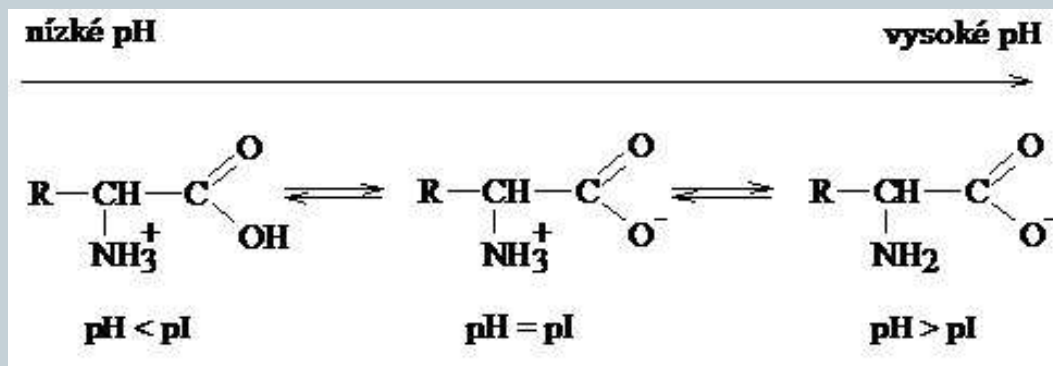


- Instrumentální elektromigrační separační metoda
- Separace proteinů a nukleových kyselin
- Dělení dle **různé pohyblivosti** ve stejnosměrném poli
 - Náboj
 - Velikost

Elektroforéza - dělení



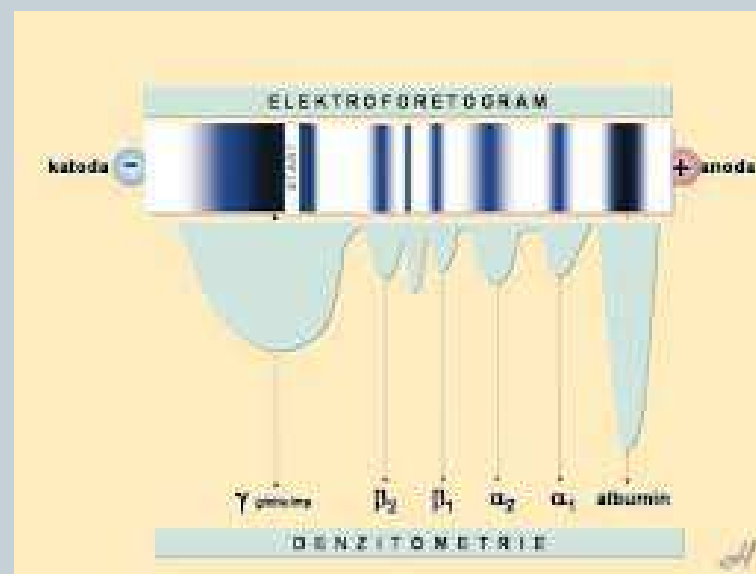
- Zónová elektroforéza
 - na nosiči
 - Konstantní pH
- Izoelektrická fokusace
 - Izoelektrický bod (pI)- nulový náboj
 - pH gradient



Elektroforéza - dělení



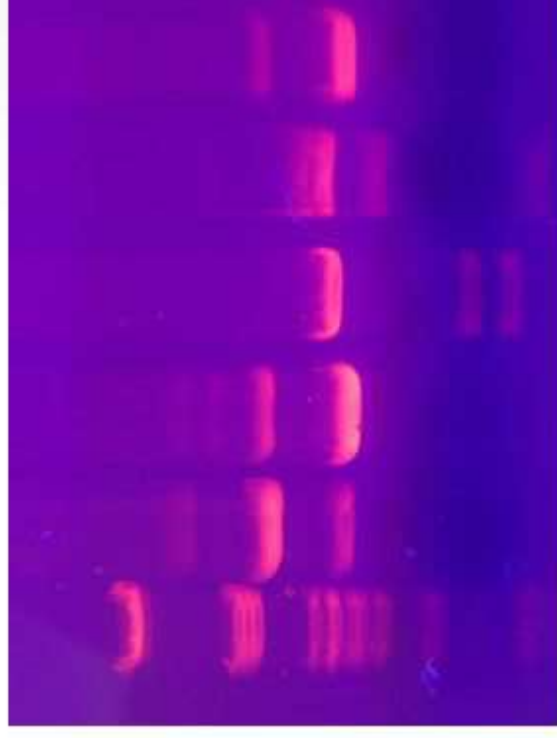
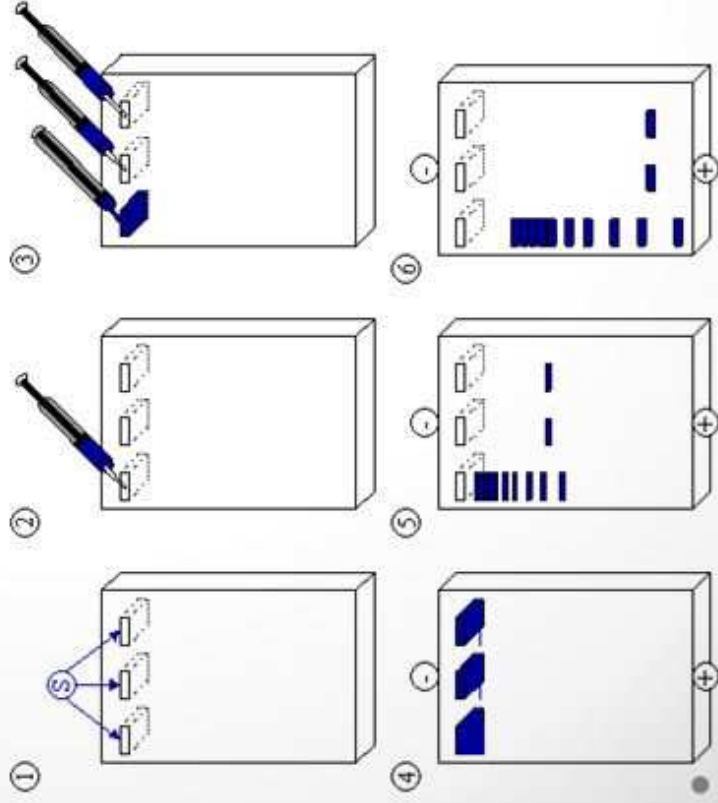
- Dle povahy gelu
 - Agarózová elektroforéza
 - Polyakrylamidová elektroforéza-PAGE
 - Nativní
 - SDS
- Dle uspořádání
 - Vertikální
 - Horizontální



Gelová elektroforéza

= separační metoda

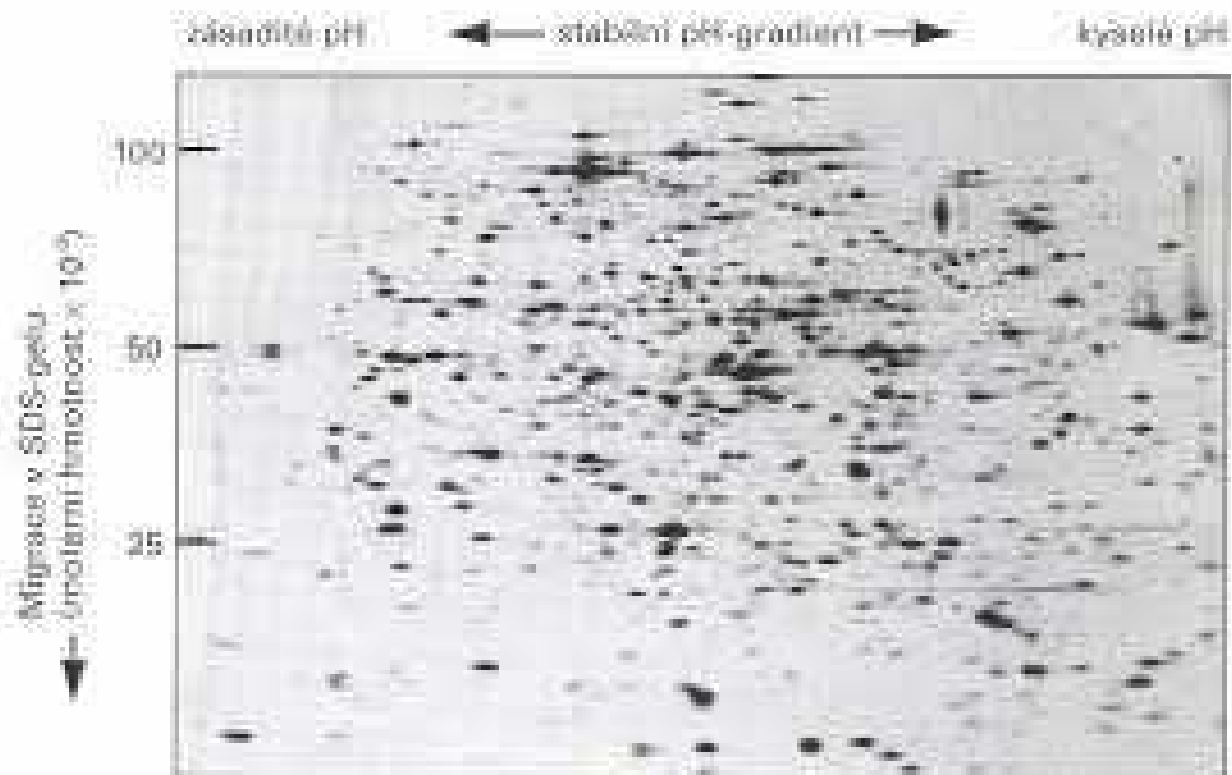
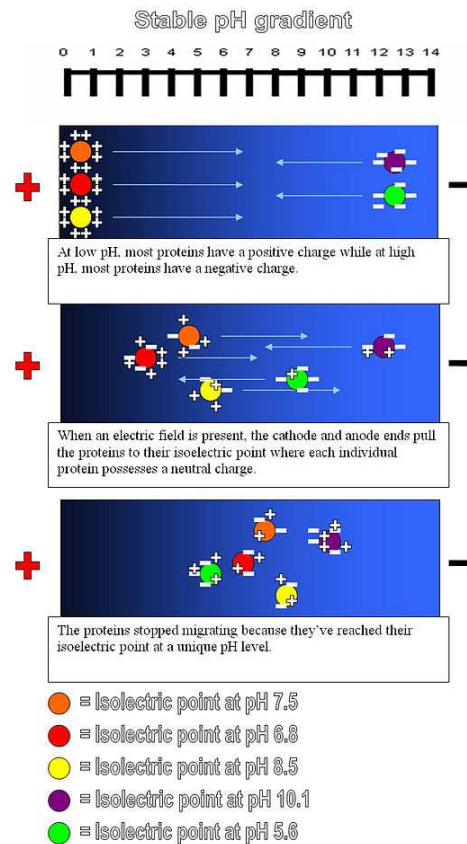
- 1) ve stejnosměrném elektrickém poli se záporně nabitě molekuly DNA pohybují ke kladné elektrodě
- 2) molekuly gelu vytvářejí prostorovou síť, kterou různě velké molekuly putují různou rychlostí



[elektroforéza](#)

2D – Elektroforéza

- 1 . Izoelektrická fokusace
- 2. SDS PAGE elektroforéza
- 3. MS



Potenciometrie



- Elektrochemická metoda
- Změna napětí galvanického článku
 - referenční elektroda (elektroda 1. druhu)
 - Měrná elektroda (elektroda 2. druhu)

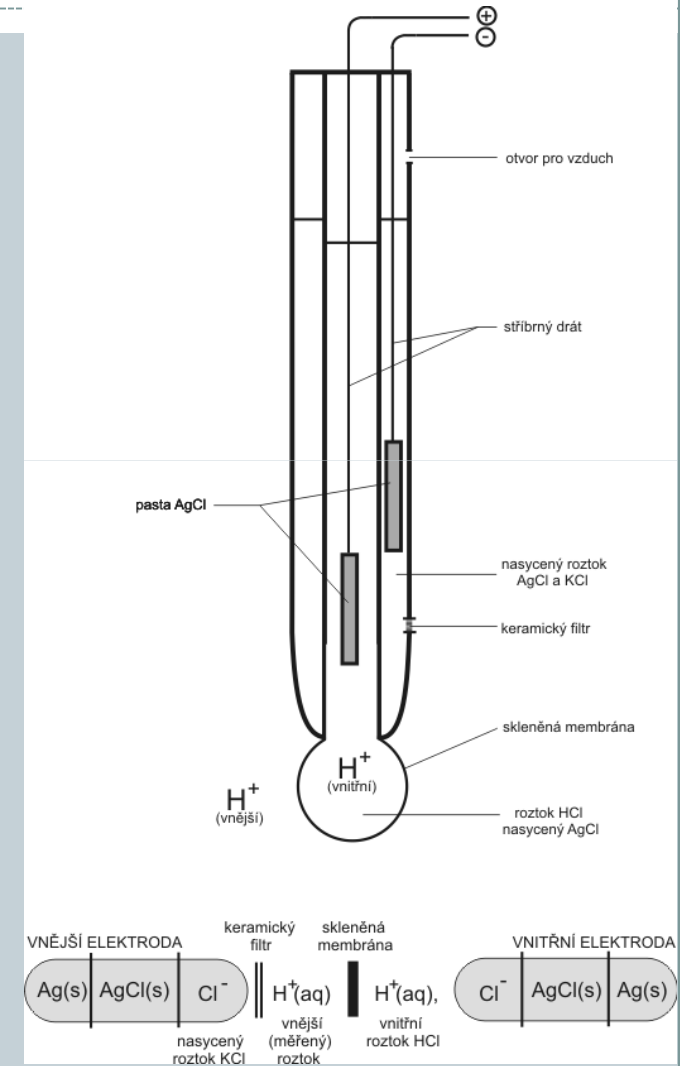
- Nernstova rovnice

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[c_{ox}]}{[c_{red}]}$$

Potenciometrie



- Iontově selektivní elektroda (ISE)
 - Ionty
 - selektivně propustné membrány
 - Membránový potenciál
 - Donnanův potenciál
- Skleněná elektroda (ISE)
 - pH
 - Argentochloridová elektroda
- Potenciometrická titrace



Děkuji za pozornost

