

PREPARATIVNÍ A SEPARAČNÍ METODY



LADISLAV SKLENÁK

OSTRAVA 2005

Rozsah: 2/0/2**Počet kreditů:** 6**Ukončení:** zkouška ústní**Přednášející :** doc.L.Sklenák**ČASOVÝ PLÁN****1. Úvod**

Seznámení s problematikou.

Postavení biofyziky v systému vědních oborů. Vzájemné souvislosti a inspirace.

2. Preparativní a analytické metody

Extrakce, srážení, sedimentace, centrifugace. Dělení látek membránou, dialýza, filtrace membránou.

Chromatografie - úvod, obecné principy a klasifikace, adsorpční chromatografie, rozdělovací chromatografie. Chromatografie na iontoměničích.

Gelová a afinitní chromatografie.

Kapalinová a plynová chromatografie. Elektroforéza, krystalizace. Speciální metody dělení biomolekul.

3. Vybrané elektrochemické analytické metody

Základy elektrochemie, galvanické články.

Elektrody. Konduktometrie, potenciometrie, polarografie.

4. Vybrané optické metody

Základní pojmy a zákony paprskové a vlnové optiky. Refraktometrie, polarimetrie.

5. Stanovení molární hmotnosti biopolymerů

Koligativní vlastnosti biopolymerů v roztocích.

Osmometrie. Viskozimetrie. Sedimentační analýza. Normální rozptyl světla.

STUDIJNÍ LITERATURASKLENÁK,L. *Preparativní a separační metody*. Studijní text KFY PřF OU, Ostrava 2005PROSSER,V., aj. *Experimentální metody biofyziky*. Academia Praha 1989ERDELSKÝ,K., aj. *Praktikum a analytické metody vo fyziológii rastlín*. SPN Bratislava 1979KEIL,B., aj. *Laboratorní technika organické chemie*. ČSAV. Praha 1963KALOUS,V., aj. *Biofyzikální chemie*. SNTL Praha 1980MOORE,W.,J. *Fyzikální chemie*. SNTL Praha 1979

ÚVOD

POSTAVENÍ FYZIKY. VZNIK, POSTAVENÍ A ÚLOHA BIOFYZIKY. HLAVNÍ VÝVOJOVÉ TRENDY BIOFYZIKY. EXPERIMENTÁLNÍ METODY BIOFYZIKY. ZÁKLADNÍ SCHÉMA POZNÁVÁNÍ BIOFYZIKY. UPLATNĚNÍ BIOFYZIKY V PRAXI, VLIV NA JINÉ OBORY, INSPIRACE

POSTAVENÍ FYZIKY

Vývoj lidského poznání – od původně **integrovaných** teologicko – filosoficko – přírodovědných poznatků ke středověké **diferenciaci** až k opětné **integraci** ve 20. století. Přírodovědné obory mají – zejména ve druhé pol. 20. století globální charakter. Jde o syntézu přístupů a výsledků poznání všech specializovaných vědních oborů, k řešení úkolů jsou používány týmy vědců úzké specializace ale pracujících stejnou metodou.

Fyzika má z tohoto hlediska význačné, ne-li výsadní postavení. Vše, co víme o neživé přírodě – to nejpodstatnější a univerzální, je dílem fyziky. Všechny ostatní přírodní vědy převzaly **fyzikální metodu** a rozvíjejí základní fyzikální principy. Proč?

Fyzika je v celém vesmíru táž, pouze objekty zkoumání různých přírodních věd mají svá specifika

VÝHODY FYZIKÁLNÍ METODY

1. Přirozená schopnost fyziky vyšetřovat jevy ve vývoji, v dynamice jak z hlediska časového, tak i prostorového.
2. Racionální matematický jazyk fyziky.
3. Velmi dobře rozvinuté experimentální metodiky, umožňující vysoce přesná měření a exaktní vyjádření jejich výsledků.

Původní používání subjektivních schopností člověka v biologii umožňovalo postihnout objekty a procesy v intervalech:

Prostor: $10^{-5}\text{ m} - 10^5\text{ m}$ – 10 řádů ; **čas:** $10^{-2}\text{ s} - 10^7\text{ s}$ – 9 řádů .

Použití současných **fyzikálních** metod v biologii přineslo obrovské rozšíření těchto intervalů:

Prostor: $10^{-15}\text{ m} - 10^{25}\text{ m}$ – 40 řádů; **čas:** $10^{-25}\text{ s} - 10^{18}\text{ s}$ – 43 řádů.

Pro vyšetřování jakýchkoliv objektů a dějů jsou pro fyziku nezbytné **modely**. Původní **prostorověčasová** úroveň (metr-sekunda) byla díky fyzikálnímu poznání extrapolována jak na **ultramikroskopické** struktury (atomy, částice), tak i na struktury **ultramakroskopické** (kosmos). Použití fyzikálních modelů při přechodu na **živé** objekty a systémy - předpoklad o tom, že jejich makroskopické vlastnosti a chování jsou **důsledkem** mikroskopické stavby a dynamiky jejich mikrostruktury. Zdá se totiž, že

Biologické funkce jsou ve většině případů podmíněny nebo podstatně ovlivněny vlastnostmi hmoty na úrovni molekul, atomů a jejich elektronových obalů.

I přesto se však v současné době pro pochopení struktury a hlavně funkce **živé** hmoty jeví jako zásadní **kooperativní jevy mikrosystémů**, které tvoří **makrosystém**.

Řada **biologických** objektů je na rozmezí **mikro** a **makrosvěta** - proto **fyzika** svými kvantově teoretickými modely a mimořádně jemnými experimentálními technikami představuje mimořádně významný nástroj pro poznávání základních vlastností živé hmoty.

VZNIK, POSTAVENÍ A ÚLOHA BIOFYZIKY

V poměrně nedávné historii vzniká jak v **biologii**, tak ve **fyzice** řada (hybridních) relativně autonomních oborů jako **radiační biologie**, **biomechanika**, **lékařská fyzika**, **biofyzikální chemie** apod. Syntézou všech těchto oborů vznikl mezní obor **BIOFYZIKA**. Jde o obor velmi obtížný, neboť (zatím) jen velmi málo biologů je dobrými fyziky a naopak (výzva pro studenty!).

Vznik **biofyziky** a její rozvoj lze přirovnat k rozvoji chemie ve 30. letech 20. st. díky principiálnímu pochopení **chemické vazby** prostřednictvím **kvantové fyziky**. Zásadní průnik **fyziky** do **biologie** se udál v 60. letech – dešifrace genetické informace díky špičkovým fyzikálním metodám (difrakce **RTG** záření, elektronová mikroskopie apod.). Současný prudký rozvoj **molekulární biologie** lze jednoznačně přičíst tomu, že biologie je v tomto oboru spojena s fyzikou nejen **metodicky**, ale i **obsahově**. **Biologické systémy** nejsou z fyzikálního hlediska ničím neobvyklým - jejich “stavebními kameny” jsou přece tytéž atomy jako v „neživé“ přírodě; jsou to tedy objekty s týmiž interakcemi. Přesto se v **biologických systémech** objevují tyto zásadní problémy a odlišnosti:

- A.** Jde o systémy, které existují a jsou funkčně podmíněné v dimenzích na **rozhraní** mezi **mikrosvětlem** a **makrosvětlem** ($10^{-10} \text{ m} - 10^1 \text{ m}$). Proto je při jejich studiu nutné prolínání **klasického** a **kvantového** fyzikálního přístupu. Např. molekula **nukleové kyseliny** (délka řádově 10^{-3} m příčný rozměr řádově **nm**), jejímiž stavebními kameny jsou deriváty jednoduchých dusíkatých heterocyklů, je **současně makro i mikrosystémem**. To vyžaduje nové fyzikální **modely**, nové matematické popisy, nové teorie. Ještě složitější situace nastává u komplikovanějších systémů (membrány, orgány, orgány apod.)
- B.** Jde o systémy neobvykle složené, komplexní a **heterogenní**. Objevuje se proto nutnost nových delikátních (nedestruktivních, neinvazivních) **experimentálních** přístupů. Do hry vstupují i velmi složité vzájemné interakce. Přesto bývá i zde výtečným východiskem **model** zdánlivě velmi jednoduchý až triviální (např. **WATSONŮV** a **CRICKŮV** model dvojité šroubovice DNK).
- C.** Biologické systémy existují (žijí) jen v **časové dynamice**. Přitom časové dimenze jsou velmi odlišné – od 10^{-15} s do 10^8 s (desítky let). Toto časové rozmezí je možno obsáhnout pouze **fyzikálními** přístupy.

POSTUP

modelový systém jednoduchý → modelový systém komplexní → biologický systém in vitro → modelový systém in vivo → biologický systém in vivo.

Přitom jsou využívány obecně platné teoretické principy a také **funkce odezvy**

Okamžitý stav systému není plně popsán jen okamžitými parametry ale i jeho “historií” – všemi předcházejícími stavy systému .

- D.** **Biologické systémy** jsou systémy typicky **otevřené nerovnovážné** s výraznou **specifickou** interakcí hierarchicky uspořádaných **subsystémů** a interakcí s vnějším prostředím. Při jejich činnosti se nadto projevuje vysoký stupeň **kooperace**, optimalizace a vysoká účinnost. Běžné fyzikální metody nejsou použitelné a je nutné

jejich **zobecnění** v oblastech **termodynamiky, fyzikální statistiky, synergetiky, teorie nerovnovážných stavů a teorie systémů**. Tyto **fyzikální** přístupy přinášejí obrovský efekt a obohacují i samotnou fyziku – jde o velmi plodnou symbiózu fyziky a biologie.

Vždy je třeba mít na paměti, že biologický objekt není prostým součtem nižších biologických jednotek.

HLAVNÍ VÝVOJOVÉ TRENDY BIOFYZIKY

Současný biofyzikální výzkum lze rozdělit na tři hlavní úrovně:

A. Molekulární a nadmolekulární úroveň

B. Buněčná a tkáňová úroveň

C. Složité systémy

ad A) Výklad biologické funkce živých systémů a osvětlení podstaty biologických jevů na základě znalosti vlastností atomů a molekul (fyzika biopolymerů, DNK, bílkoviny a jejich komplexy s DNK, polysacharidy, pigmenty, enzymy, toxiny apod.).

ad B) Strukturní parametry buněk, biologických membrán apod. Použití metodiky fyzikálních sond – různé druhy záření. Přenos energie v živých systémech, přenos informací (fotosyntéza, vznik ATP, smyslové receptory, vliv fyzikálních polí na živé organizmy apod.).

ad C) Základy chování organismu nebo některého jeho funkčního podsystemu jako celku. Tvorba částečně makroskopických modelů, studium kooperativních, regulačních a reprodukčních procesů. Vztahy mezi vstupními a výstupními signály (podněty a signály). Smyslové orgány ale i výzkum dalších čidel, studium mezibuněčné komunikace, přenosu nervových vzruchů apod. Fyzika v této oblasti poskytuje nejen účinnou metodiku, ale zabývá se i vytvářením podmínek pro optimalizaci vztahů mezi společenstvími a vztahů mezi živou a neživou přírodou (ekologie, sociologie apod.).

EXPERIMENTÁLNÍ METODY BIOFYZIKY

Základní schéma poznávání, tvorby modelů a experimentálního ověřování v biofyzice se neliší od postupů užívaných ve fyzice a některých dalších vědách. Specifičnost biofyzikálních experimentálních metod tkví v tom, že je nutno vyšetřovat

Systémy mimořádně komplexní a heterogenní, termodynamicky nerovnovážné s autonomní časovou dynamikou, jejichž funkční procesy probíhají na rozhraní mikro a makrosvěta.

Kromě toho je nutno upravit experimentální metodiku tak, aby nedošlo k narušení živého systému ani z hlediska struktury, ani ve funkčních vztazích. V rozhodujících experimentech tedy volíme **neinvazivní** metody. Dále je třeba v experimentech výrazněji respektovat interdisciplinaritu oboru a při tvorbě modelů i výběru metod kombinovat přístupy fyzikální s biologickými, biochemickými, fyzikálně chemickými, sociologickými a dalšími.

SCHÉMA VÝZKUMU

Biologický objekt (nebo jeho podsystém) je černou skříňkou a vstupními signály jsou různé fyzikální faktory, jimiž na objekt působíme. Na ně biologický objekt reaguje, tj. zpracovává je, případně transformuje a vysílá pak jako výstupní signály.

Vstupními i výstupními signály mohou být:

- různé formy **hmoty** (elementární částice, fotony, atomy a jejich složky, molekuly a jejich soubory, včetně makrosystémů),
- různé fyzikální **veličiny** (teplota, energie, silová pole - např. pole tlakové, elektrické, magnetické apod.),

Signály mohou mít **klasickou** nebo **kvantovou** povahu.

Z odpovědi (**odezvy**) biologického objektu na vnější signál, tedy ze vztahu **vstupní - výstupní signál**, děláme pak závěry o struktuře, funkci, chování, vlastnostech apod. zkoumaného objektu. V **biofyzice** mnohem častěji než v jiných fyzikálních oborech je řada významných údajů o vyšetřovaném objektu známa z biologických, chemických či jiných výzkumů.

Zvláštní místo v biofyzikálních experimentech zaujímají **neinvazivní** metody. U nich jsou vstupní i výstupní signály **téhož charakteru** → ze **změny** signálu provádíme soudy o vlastnostech objektu. Specifickým a stále častěji používaným signálem tohoto typu je **světlo**. Výhoda - bezdotyková, ve většině případů nedestruktivní sonda, nesoucí kromě energetické informace a prostorových parametrů i údaje bezprostředně spjaté s čistě **kvantovými** charakteristikami. Světlo je kvantově statistický relativistický systém a má proto mimořádné možnosti vysokého **časového** rozlišení. Z hlediska vyšetřování biologických objektů jde tedy o ideální experimentální metodiku.

ZÁKLADNÍ SCHÉMA POZNÁVÁNÍ V BIOFYZICE

Biologický objekt podrobíme experimentu. Zhodnocením korelací vstupního a výstupního signálu vytvoříme model objektu. Na základě tohoto modelu vypracujeme teorii, která je schopna objasnit strukturu, funkce, vlastnosti a časový vývoj vyšetřovaného objektu. Provedeme zpřesněný (modelový) experiment (simulaci). Podle tohoto schématu pokračujeme až do potvrzení nebo vyvrácení navrženého modelu nebo teorie.

Je tradicí fyziky, že existuje úzká souvislost mezi **experimentem**, vytvářením experimentálně-teoretického **modelu** a navrhovanou **teorií**. Zatímco experiment je vždy vázán na činnost člověka – je **makroskopický**, musí teorie pracovat zpravidla s pojmy mikrosvěta a výsledný navrhovaný model je rovněž povahy mikroskopické.

V biofyzice se to týká všech jevů na úrovni **molekulární** a **submolekulární** a některých jevů na úrovni buněčné. Zvláštní místo při vytváření modelů a teorií má **matematický** popis.

Pokud logická struktura výstavby matematiky odpovídá logické struktuře výstavby vesmíru - tedy i biologických objektů, umožňuje aplikace matematiky provádět extrapolace i mimo uvažovaný model a provádět tedy i zobecňování některých vlastností

Abstrakcí některých fyzikálních parametrů biologického objektu můžeme kromě toho vytvářet čistě matematické modely. Matematické (počítačové) modelování má mimořádné možnosti. Při respektování kooperativních procesů mohou počítačové simulace funkčnosti některé navrhované modely vyloučit a jiné upřednostnit. Dochází tedy k racionalizaci a urychlení experimentální a výzkumné činnosti a tím i k významnému snížení nákladů.

Hlavními **biofyzikálními** experimentálními metodami jsou **nedestruktivní** fyzikální metody. Velmi intenzivně se rozvíjejí především metody založené na interakci **elektromagnetických** a **akustických** polí s biologickými objekty, případně jejich kombinace – např. **fotoakustická spektroskopie**. Významným impulsem v této oblasti byl vynález **maseru** a **laseru** – tj. zdrojů elektromagnetických polí s vysokým stupněm **koherence**, frekvenční čistotou převyšující klasické zdroje o **10 řádů**, s vysokou intenzitou, převyšující klasické zdroje o **5 až 7 řádů** a s velkou hustotou energie. V současné době jsou tyto zdroje rozšířeny o **synchrotronní** záření – kontinuální koherentní záření pokrývající celé spektrum frekvencí od RTG až po mikrovlny. Lasery a synchrotronní zdroje mohou pracovat v režimu vysokého časového rozlišení, takže časový interval **10^{-14} s** je dnes již běžně laboratorně dosažitelný.

Metody absorpční a emisní spektroskopie – možnost detailního zjišťování energetických procesů na úrovni molekul a komplexů včetně jejich kinetiky.

Rozptylové mechanismy – normální rozptyl světla – základní parametry makromolekul. **BRILLOUINNŮV** rozptyl světla (rozptyl na akustických vlnách) – informace o termodynamických parametrech. **RAMANŮV** rozptyl světla – detailní informace o energetických poměrech a dalších fyzikálních parametrech molekul, makromolekul, membrán apod.

Rádiospektroskopické metody – elektronová paramagnetická rezonance (**EPR**), nukleární (jaderná) magnetická rezonance (**NMR**) – detailní informace o struktuře a dynamice živých objektů na molekulární i nadmolekulární úrovni včetně slabých interakcí mezi molekulami a jejich komplexy – princip tomografie.

MÖSSBAUEROVA spektroskopie – rezonanční (selektivní) **absorpce** záření **gama** jádru atomů, specifická pro řadu izotopů, mezi nimiž je např. stabilní izotop **Fe^{57}** – vhodné zejména pro studium hemoproteinů.

Difrakce RTG záření – ve spojení s počítačem poskytuje detailní informace o poloze jednotlivých atomů, elektronové hustotě atomových a molekulových obalů, vazbách mezi atomy, struktuře membrán apod. V současné době můžeme touto metodou pracovat s časovým rozlišením řádově **1 μ s**.

Elektronová a světelná mikroskopie – podobně jako u **RTG** difrakce v oblasti buněčné.

Mnohé z výše uvedených metod jsou dnes zaváděny jako komplexní diagnostické metody v lékařství – ultrazvuková a **NMR** tomografie, ultrazvuková holografie, infračervená termovize, infračervená tomografie, magnetokardiografie apod.

UPLATNĚNÍ BIOFYZIKY V PRAXI, VLIV NA JINÉ OBORY, INSPIRACE

Výsledky biofyzikálních výzkumů se promítají do

- **společenské praxe,**
- **jiných vědních disciplín,**
- **výrobní praxe (možnosti principiálně nových technologií v oblasti potravy, úspor energie, alternativních energetických zdrojů, ekologie apod.).**

Analogie s rozvojem fyziky **pevných látek** v 50.letech – polovodiče a jejich význam pro všechny oblasti lidské činnosti a existence. Rozdíl – organické a biologické struktury jsou systémy s nesrovnatelně větší **variabilitou** a **komplexností**. Proto i počet uměle vytvořených látek má podstatně širší spektrum. Řadu procesů lze dnes sledovat již na **molekulární úrovni** – možnost mnohem větší variability a miniaturizace $\Rightarrow$ **molekulární elektronika, bioelektronika, technika molekulárních pamětí, molekulárních čidel** apod.

Na buněčné a **nadbuněčné** úrovni jsou to především **biotechnologie** umožňující reparační procesy v živých systémech, vytváření nových struktur, orgánů a organismů optimalizovaných podle předem zadaných parametrů. Obecně tedy jde o orientaci vědeckotechnického rozvoje v oblasti organických struktur s neomezenými a nedohlednými možnostmi a perspektivami. Biofyzikální výzkum může účinně přispět i při hledání perspektivních zdrojů a forem energie (zvláště v oblasti fotosyntézy a následného využití biomasy), při zajišťování nových zdrojů pro průmyslovou výrobu, zdrojů pro efektivní a racionální výživu apod.

Velmi rozsáhlé jsou styčné oblasti biofyziky s jinými vědními obory, zvláště přírodovědnými, technickými a lékařskými. Většina biofyzikálních jevů, probíhajících na úrovni tkání, orgánů a organismů má své jednoduché technické **analogie**. Senzory, přenos, zpracování, uchování a vybavení informace, paměti, regulace a autoregulace, zpětná vazba jsou běžnými pojmy dnešní elektroniky a kybernetiky. Technické modelování biologických jevů je předmětem **bioniky**. Studují se fyzikální, energetické, kinetické a jiné podobnosti biologických mechanismů, které se vytvářely a optimalizovaly přirozenou selekcí a evolucí milióny let. Dnes již existují **servomechanizmy**, které předčí mechanismy biologické. Na druhé straně má však řada současných technických zařízení parametry nesrovnatelně horší než jejich biologické analogy.

Biofyzikální přístupy a metody výrazně pronikají do **lékařských věd** na nejrůznější úrovni. Cíl – co nejobjektivnější diagnostický systém, možnosti reparace patologických změn a poruch apod. V oblasti zemědělství a výživy – biotechnologie (inhibice nebo stimulace vývoje, kontrola a ovlivňování kultivačních procesů, řízená fotosyntéza v hale a pod.). V biologii – především při formování biologie jako exaktní vědy. Postupně se biofyzika stává základním vědním oborem pro další rozvoj všech biologických věd. Biofyzika působí zpětně i na fyziku – iniciace rozvoje termodynamiky nerovnovážných stavů, molekulární fyziky apod. $\Rightarrow$ nové netradiční experimentální techniky a metodiky. V matematice se biofyzikální výsledky zúčastňují zejména v **biokybernetice** (např. biologické analogy řídicích, informačních a regulačních systémů), v teorii informací, řízení, systémů, chaosu apod. Mimořádný význam má biofyzika pro **filozofii** - zejména pro teorii poznání.

PREPARATIVNÍ METODY

DĚLICÍ METODY. UVOLNĚNÍ Z TKÁNĚ, DEZINTEGRACE, EXTRAKCE, SRÁŽENÍ, CENTRIFUGACE, DIALÝZA, FILTRACE

DĚLICÍ METODY

VÝZNAM, KLASIFIKACE, VÝBĚR

Biologicky významné látky se vyskytují buď v přírodních materiálech, nebo v produktech reakcí v laboratořích nebo v průmyslu. Podmínkou pro studium je jejich fyzikální a chemická **čistota**.

Metody získání biologických látek – některé velmi staré (**srážení, destilace, extrakce, krystalizace**). Ve 20.stol. jejich významné zdokonalení a rozšíření.

Cíl – získání co nejčistší biologické látky v dostatečném množství. **Dříve** – dílo náhody, **dnes** – vysoce racionální postup.

Podmínka oddělení dvou látek – odlišnost alespoň v jedné fyzikální nebo chemické vlastnosti. Např.

- v bodu varu - destilace, lyofilizace,
- v rozpustnosti – krystalizace, srážení, extrakce,
- v rozdělovací konstantě – rozdělovací chromatografie LLC, GLC,
- v disociační konstantě – chromatografie na iontoměničích,
- v iontové pohyblivosti – elektroforéza,
- ve velikosti a hmotnosti molekul – centrifugace, gelová chromatografie, dialýza, ultracentrifugace.

Jiná možnost rozdělení dělicích metod – podle toho, zda k dělení dochází uvnitř **jedné fáze** (např. dialýza, elektroforéza), nebo mezi **dvěma fázemi** (např. chromatografie, krystalizace, destilace).

Požadavky na dělicí metodiku: **1. dostatečná čistota, 2. dostatečná šetrnost vůči požadované látce** – v praxi obvykle **kompromis**. Podle těchto hledisek posuzujeme **účinnost** příslušné dělicí metody.

Obecně

Dělicí metody biofyziky = postupy preparativní organické chemie a biochemie.

První úkol – zdroj materiálu obsahujícího danou látku v co největší koncentraci. Pak

UVOLNĚNÍ Z TKÁNĚ, DEZINTEGRACE

Třecí miska, homogenizátor (mixér), koloidní mlýn, ultrazvuková dezintegrace, specifické chemické metody – rozrušení pevných buněčných stěn louhem, specifickými enzymy – lysozym (slzy), celuláza, žaludeční šťávy hlemýžďe zahradního apod.

EXTRAKCE

Převod dané látky z **tuhého** nebo **kapalného** homogenátu do **kapaliny**. Základní typy extrakcí:

Pevná fáze → kapalina

- **Macerace** – luhovalání do jedné dávky kapaliny při normální teplotě,

- **Digesce** – luhování do jedné dávky kapaliny při zvýšené teplotě (čaj),
- **Perkolace** – luhování za normální teploty do protékající kapaliny,
- **Kontinuální extrakce** – perkolace v průmyslovém provedení.

Kapalina → kapalina

- **Vytřepávání** – jedinou dávkou (lepšího) rozpouštědla (dnes již téměř nepoužívané),
- **Perforace** – (lepší) rozpouštědlo, do něhož má přejít dělená látka je v neustálém oběhu. Prostupuje kapalným homogenátem, odebírá z něj dělenou látku a hromadí se v oddělené baňce. V ní se odpařuje a po kondenzaci v chladiči prostupuje homogenátem znovu. Dělená látka se hromadí v destilačním zbytku.
- **Roztřepávání** – jedna z prvních účinných metod umožňující dělení látek, jejichž rozdělovací konstanty jsou velmi podobné. Jejím zdokonalením je
- **Rozdělovací chromatografie** (bude probráno později).

Princip dělicích metod při přechodu kapalina → kapalina:

Požadovaná látka je (spolu s dalšími látkami) v **kapalném** homogenátu – v nějakém rozpouštědle použitým při homogenizaci nebo luhování. Při **vytřepávání**, **perforaci**, **roztřepávání** nebo **rozdělovací chromatografii** musíme najít a použít další rozpouštědlo, které se

- nemísí s prvním rozpouštědlem,
- v němž je daná látka (a pokud možno **jen ona**) rozpustná lépe, než v rozpouštědle prvním.

Hlavním problémem extrakce z kapaliny do kapaliny je tedy volba vhodného (druhého) **rozpouštědla**. Hlediska a požadavky:

1. Co **nejmenší** vzájemná **mísitelnost** obou rozpouštědel. Východisko – **mixotropní (eluotropická)** řada organických rozpouštědel seřazených podle rostoucí **polarity** (podle rostoucí relativní permitivity) – **uhlovodíky < alkoholy < voda** – např.:

pentan < benzen < dietyléter < chloroform < aceton < dioxan < etylacetát < pyridin < etanol < metanol < voda

Platí - čím větší je rozdíl relativních permitivit - čím jsou rozpouštědla v mixotropické řadě od sebe **dále**, tím **hůře** se mísí.

2. Co **nejvyšší rozpustnost** dané látky. Pravidlo: **podobné rozpouští podobné**. Pro látky **lipofilní (hydrofóbní)** – bojí se vody), které jsou **nepolární**, používáme uhlovodíky. Látky **hydrofilní (polární)** se naopak velmi dobře rozpouštějí v polárních rozpouštědlech – alkoholy, voda.
3. **Chemická stálost**. Rozpouštědlo nesmí chemicky reagovat s prvním rozpouštědlem ani s danou látkou
 - **Nejjednodušší** extrakce – **macerace, vytřepávání**.
 - **Nejdokonalejší** extrakce – **roztřepávání, rozdělovací chromatografie**.
 - **Nejúčinnější** extrakce z hlediska produktu – **kontinuální** (nepřetržitá protiproudění) extrakce.

Výhody extrakčních metod – rychlost, bezodpadovost, ekonomičnost.

Extrakční metody jsou nezastupitelné všude tam, kde selhává chromatografie – např. při izolaci antibiotik (roztřepávání), cholesterolu ze surového lanolinu (kontinuální extrakce) apod.

SRÁŽENÍ

Vylučování tuhé fáze dané látky z roztoku prudkým **přesycením** tohoto roztoku danou (nebo jinou) látkou.

- **Vytěšňování** – jsou-li v daném rozpouštědle bez vzájemné reakce rozpustné dvě látky, ale jedna z nich je **lépe** rozpustná než druhá, bude látka více rozpustná vytěšňovat látku méně rozpustnou.
- **Vysolování** – vytěšňování dané látky z roztoku přidáním vhodné **solí**. Jedna z **nejstarších** metod separace bílkovin z vodných roztoků síranem amonným, NaCl, fosforečnany, citráty apod. Metoda není nejúčinnější, ale je levná a při chlazení nehrozí denaturace bílkovin. Totéž např. pro nukleové kyseliny.
- **Srážení kapalinou** – do roztoku dané látky přidáme rozpouštědlo, v němž je daná látka **nerozpustná** – látka se ze směsi obou rozpouštědel vysráží (srážení z vodných roztoků: acetone, etanolem, pyridinem, srážení bílkovin z vodných roztoků polyetylenglykolem).
- **Srážení změnou pH** – rozpustnost mnoha organických látek je závislá na **pH**. Okyselením nebo alkalizací roztoku těchto látek dojde k jejich vysrážení. Běžnou metodou je takováto izolace bílkovin pře vedením **pH** roztoku na hodnotu tzv. **Izoelektrického (izosbestického) bodu** dané bílkoviny, při níž je tato bílkovina prakticky nerozpustná.
- **Srážení tvorbou nerozpustných komplexů** – do roztoku přidáme vhodnou látku, která **chemicky** reaguje s látkou rozpuštěnou na sloučeninu v daném rozpouštědle nerozpustnou. Např. pro nukleové kyseliny ve vodném roztoku je tímto srážecím činidlem cetyltrimetylamoniumbromid.

SEDIMENTACE - CENTRIFUGACE

Princip: využití **různé hustoty** látek – složek dělené směsi. Tuto metody používáme k dělení směsí, jejichž alespoň jedna složka je **kapalina – suspenze, emulze, koloidní roztoky**, jejichž složky se liší tvarem, velikostí a hustotou.

Přírodní sedimentace – přirozený proces, který je pro laboratorní potřeby příliš pomalý. K jeho urychlení používáme **odstředivé** silové pole $\Rightarrow$ **centrifugace** (odstředování).

Pohyb částice při odstředování je ovlivněn:

① tvarem částice, ② viskozitou, a ③ velikostí odstředivé síly.

Pro makromolekuly biopolymerů je charakteristický tzv. **sedimentační koeficient S**, jehož jednotkou je **swedberg (S)**. $1S = 1 \cdot 10^{-13} \text{ s}$.

Sedimentační koeficient pro **bílkoviny** a **nukleové kyseliny** je $\approx 1S$; pro **celé buňky** $\approx 10^8 S$.

Intenzita centrifugace je charakterizována **relativním odstředivým zrychlením R**, což je velikost $r \omega^2$ setrvačného odstředivého zrychlení vztahovaná na velikost **normálního** tíhového zrychlení **g**.

$$R = \frac{r \omega^2}{g} = 1,119 \cdot 10^{-5} \cdot (\text{rpm})^2;$$

r je poloměr rotace (cm), ω je úhlová rychlost (s^{-1}), g je velikost normálního tíhového zrychlení, rpm (revolution per minute) je počet otáček za minutu.

Problém: určení času, potřebného k sedimentaci pro nás zajímavé složky směsi na dno kyvety; orientačním východiskem je SWEDBERGOVA rovnice.

METODY PREPARATIVNÍ CENTRIFUGACE

- **Diferenciální metoda** (metoda pohyblivého rozhraní) - nejjednodušší - částice směsi se dělí podle sedimentačních koeficientů. Volíme čas a otáčky pro sedimentaci nejtěžších částic na dno kyvety. Sediment nad těmito částicemi, obsahující všechny další složky směsi, nazýváme **supernatant** – oddělíme jej a opět centrifugujeme vzhledem k nejtěžším částicím atd. atd. **Nevýhoda** – malá čistota.
- **Sedimentace v koncentračním gradientu** (zonální sedimentace) – před centrifugací se kyveta naplní "kapalinou", jejíž hustota roste směrem ke dnu kyvety. Na povrch této kapaliny se nastříkne dělená směs. Při tzv. **izopyknické centrifugaci** je hustota u dna kyvety větší než hustota kterékoliv složky směsi. Pohyb sedimentujících částic se pak zastaví v místě, v němž má kapalina v kyvetě **stejnou** hustotu jako sedimentující částice – různé složky dělené směsi tedy sedimentují ve formě **oddělených** zón v různých částech kyvety. Jako "kapaliny" s koncentračním gradientem se používá nejčastěji sacharózy (zvlhčené). Hustota se může měnit **nespojité** – vrstvený roztok, nebo **spojité** – velmi obtížně. Nevýhodou této metody je obtížné vytahování supernatantu z kyvety a oddělování zón.
- **Centrifugace** (60.léta – ANDERSON) – celé zařízení je lehce rozebíratelné – zóny jsou dobře přístupné. Technické provedení je však velmi náročné.

Typy odstředivek

1. Rotor s výkyvnými kyvetami (sklo, plast) – rpm $\approx 3000-10000 \Leftrightarrow R \approx 3000 g$.
2. Úhlové rotory – rpm $\leq 33000 \Leftrightarrow R \approx 130000 g$, chlazení.
3. Ultracentrifugy – rpm $\approx 40000-60000$. Evakuace, turbinový pohon, chlazení.
4. Zonální rotory – pomalé – rpm ≈ 1000 ; izopyknická centrifugace, použití v průmyslu.
5. Kontinuální odstředivky – průmysl.

POZOR! Velmi drahá, přesná a náročná technika. Proto **opatrnost** při používání!

DĚLENÍ LÁTEK MEMBRÁNOU, DIALÝZA, FILTRACE

Princip: – využití různé velikosti molekul složek dělené směsi.

„Hybnou silou“ procesu dělení je tlakový nebo koncentrační gradient po obou stranách membrány.

MEMBRÁNY

(semipermeabilní – výběrově propustné)

- **Mikroporézní membrány** – pevné látky – keramika, sklo, slitiny, papír. Různorodé póry o průměru $1 \text{ nm} - 10^3 \text{ nm}$. Zadržování molekul větších než největší pór. **Použití:** zvyšování koncentrace látek ($M_r > 10^4$). Možné použití tlakového gradientu

- **Homogenní (difúzní) membrány** – pružné blány, jednotná velikost (válcových) pórů. Přirozené – střeva, měchýře, vaječná blanka; umělé - kolodium (roztok nitrátů celulózy s nízkým obsahem dusíku a alkoholéteru), celofán, PVC, polyetylén. Možnost použití tlakového i koncentračního gradientu.
- **Anizotropní membrány** – dvě vrstvy: první je **gelová** s definovanými póry (tloušťka $0,1\ \mu\text{m} - 0,5\ \mu\text{m}$), druhou je **mikroporézní pevná** podložka s **většími** póry.

DIALÝZA

Frakční difúze **nízkomolekulárních** látek (malé molekuly) membránou nepropustnou pro makromolekuly z koncentrovanějšího do méně koncentrovaného roztoku.

Provedení: dialyzační trubice různého tvaru a průměru (membránou jsou jejich stěny). Doba trvání – desítky hodin. Urychlení – míchání a výměna méně koncentrované kapaliny. Dlouhá doba trvání dialýzy představuje **riziko** pro **biofyzikální** použití – možnost denaturace látek a množení mikroorganismů – proto udržujeme **teplotu těsně nad 0°C** .

Použití:

- odstraňování solí po vysrážení bílkovin,
- zahušťování roztoků makromolekulárních látek,
- odstraňování vody (zavěšení trubice s roztokem do proudu studeného vzduchu),
- umělá ledvina (nízkomolekulární toxiny, kyselina močová a kreatinin přecházejí z krve do roztoku stejného osmotického tlaku).

FILTRAČNÍ METODY

Kritérium pro dělení: velikost molekul a použitý tlak.

- **reverzní osmóza** – $M_r < 500$; $p \in (1\ \text{MPa} - 10\ \text{MPa})$;
- **ultrafiltrace** – $M_r \in (500 - 300\ 000)$; $p \in (0,1\ \text{MPa} - 1\ \text{MPa})$;
- **mikrofiltrace** – velikost molekul $< 1\ \mu\text{m}$; $p < 0,1\ \text{MPa}$;
- **filtrace** – velikost molekul $> 1\ \mu\text{m}$; $p \leq 0,1\ \text{MPa}$.

Možnost kombinace těchto metod s použitím **elektrického pole**:

elektrodialýza, elektrodekantace (frakcionace **vysokomolekulárních** látek).

FILTRACE MEMBRÁNOU

Ultrafiltrace: selektivní oddělování molekul protlačováním roztoku membránou s přesně definovanými póry: $0,1\ \text{nm} - 50\ \text{nm}$. Přetlak, chlazení. **Ultrafiltry:** **anizotropní** membrány (kruhové, dutá vlákna) fy AMICON. Základní charakteristika ultrafiltru: **molekulový limit** - **hmotnost nejmenší** částice, která je filtrem zadržena. Limit nebývá ostrý, jeho stanovení se provádí **globulárními** bílkovinami.

Použití: čištění a frakcionace labilních biomolekul (NK, enzymy, protilátky aj.).

Účinnost dělení: největší pro molekuly, jejichž hmotnost se liší o **jeden** řád.

Mikrofiltrace: podobná ultrafiltraci. Póry mikrofiltrů jsou však podstatně **větší** ($0,05\ \mu\text{m} - 10\ \mu\text{m}$). Použití **podtlaku**.

Použití: separace buněčných organel, buněk, mikroorganismů a virů $\Rightarrow$ **sterilizace** kapalin, **izolace** buněk pro cytologická vyšetření; **koncentrování** virů; odstraňování **sorbentu** – aktivního uhlí z reakčních směsí apod.

MOLEKULOVÁ SÍTA

Speciální membrány – látky anorganického nebo organického původu, jejichž struktura a fyzikální vlastnosti umožňují selektivní oddělování látek s rozdílnou hmotností molekul. Výhoda – jemnější dělení. **Forma** molekulových sít – **prášek**, **granule**, **gel**. Dělení molekulovými sítami je proces **opačný** k filtraci – malé molekuly dělené látky vnikají do pórů a sítím procházejí velké molekuly.

Anorganická molekulová síta: Přírodní nebo syntetické zeolity – hlinitokřemičitany (hydratované aluminosilikáty alkalických kovů).

Použití:

- čištění a **vysušování** rozpouštědel (po zaplnění pórů molekulami H_2O je nutná **aktivace** síta vysušením při teplotě $300^\circ C - 400^\circ C$), jako **adsorbenty** v chromatografii. **Pórovitá skla** – vyšší odolnost vůči chemikáliím a vyšším teplotám než u zeolitů (BIOGLAS).
- separace virů, NK, také jako **iontoměniče**.

Organická molekulová síta: Makromolekulární látky se složitou vnitřní strukturou (**sítování**) – dutiny definované velikostí – škrobové, želatinové a agarové gely ve formě **granulí** (**agar** – komerčně dostupná látka z mořských řas rozpustná ve vroucí vodě. Při teplotě pod $50^\circ C$ tuhne v rosol – gel). Hydrofilní a hydrofóbní forma. Značná dělicí schopnost. **Nevýhoda** – snadná možnost mechanického nebo chemického poškození.

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

PLOŠNÁ A SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE. ADSORPČNÍ A ROZDĚLOVACÍ
CHROMATOGRAFIE. CHROMATOGRAFIE NA IONTOMĚNÍČÍCH, GELOVÁ A AFINITNÍ
CHROMATOGRAFIE. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE. PLYNOVÁ
CHROMATOGRAFIE.

Chromatografie – separační, dělicí i analytická metoda 20.století.

1903 – ruský biolog **CvĚT** – (adsorpční) chromatografické dělení listových pigmentů na sloupci sacharózy. Další vývoj až ve 40. letech – **1941** – **rozdělovací** chromatografie; 60.léta – **HPLC** a pak již bouřlivý rozvoj.

Význam: jedny z **nejúčinnějších dělicích metod** pro účely **preparativní i analytické**. Pro řadu látek **jediná** možnost separace.

OBECNÝ PRINCIP

Opakované ustalování **rovnováhy** rozpuštěné látky mezi dvěma fázemi:

- jedna je **pohyblivá** – **mobilní** – F_M ,
- druhá je **nehybná (zakotvená)** – **stacionární** – F_S .

Vzhledem k tomu, že rovnováha se ustavuje **mnohokrát**, dají se takto rozdělit i látky, které se v afinitě k těmto fázím liší jen nepatrně. Molekuly složek $(S_1, S_2, S_3, \dots)$ dělené směsí vnikají do obou fází, ale setrvávají v nich **různě dlouhou** dobu. Molekuly složky S_1 tráví **více** času v pohybující se **mobilní** fázi, jsou více strhávány, než molekuly složky S_2 , setrvávající **déle** ve fázi **stacionární**. Postupně se proto tyto látky (složky) od sebe oddělí.

KLASIFIKACE CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Klasifikace podle fyzikálně-chemického principu dělení:

- **Chromatografie adsorpční** – rozdílná adsorpce látky na stacionární a mobilní fázi,
- **Chromatografie rozdělovací** – extrakce a rozpouštění,
- **Chromatografie na iontoměničích** – elektrostatická interakce a difúze,
- **Chromatografie gelová** – rozdílná velikost molekul,
- **Chromatografie afinitní** – specifická chemická interakce.

Klasifikace podle druhu mobilní fáze:

Ve značce označuje **první** písmeno vždy druh **mobilní** fáze F_M .

F_M – **plyn** $\Rightarrow$ **plynová** chromatografie (**GC**),

- F_S – **kapalina** – **rozdělovací** chromatografie (**GLC**),
- F_S – **pevná látka** – **adsorpční** chromatografie (**GSC**).

F_M – **kapalina** $\Rightarrow$ **kapalinová** chromatografie (**LC**),

- F_S – **kapalina** – **rozdělovací** chromatografie (**LLC**),

- F_s – gel – gelová chromatografie (GPC),
- F_s – pevná látka – 1. adsorpční chromatogr. (LSC), 2. afinitní chromatogr. (AC),
- F_s – iontoměnič – chromatografie na iontoměničích (IEC).

Klasifikace podle uspořádání:

Plošná chromatografie (FBC):

- papírová (PC);
- tenkovrstevná (TLC).

Sloupcová chromatografie (CC):

- kapalinová (LCC);
- vysoce účinná, vysokotlaká (HPLC).

Z historických důvodů je **normální**, když je F_s **polární** a F_M **nepolární**. Je-li tomu naopak (a často tomu tak bývá), mluvíme o chromatografii s **obrácenou fází**.

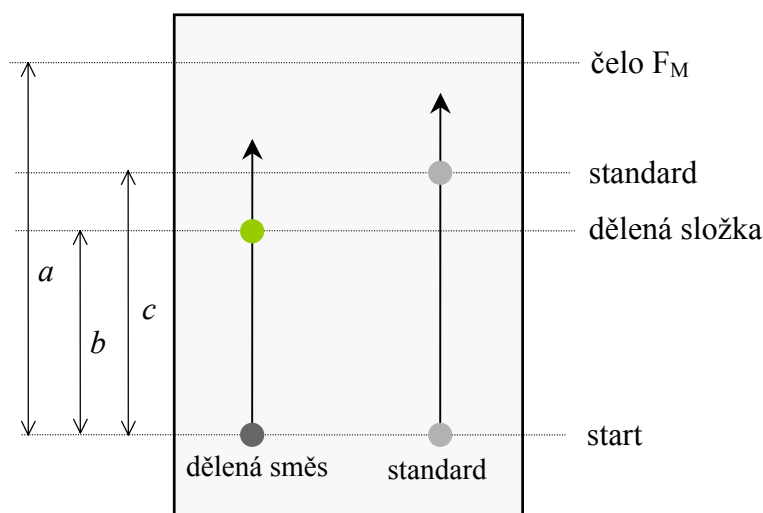
Účinnost chromatografického dělení závisí obecně na kvalitě sloupce, papíru, vrstvy – tj. na zakotvení stacionární fáze.

CHROMATOGRAFICKÉ VELIČINY UMOŽŇUJÍCÍ POSOUZENÍ KVALITY DĚLENÍ

Eluční (retenční) objem – objem čisté **mobilní** fáze (rozpuštědla), vyšlé z kolony do okamžiku, kdy první složka směsi v něm obsažená dosáhne svého maxima (**eluce** – vymývání).

Eluční (retenční) čas – totéž měřeno v jednotkách času.

PLOŠNÁ CHROMATOGRAFIE (FBC)



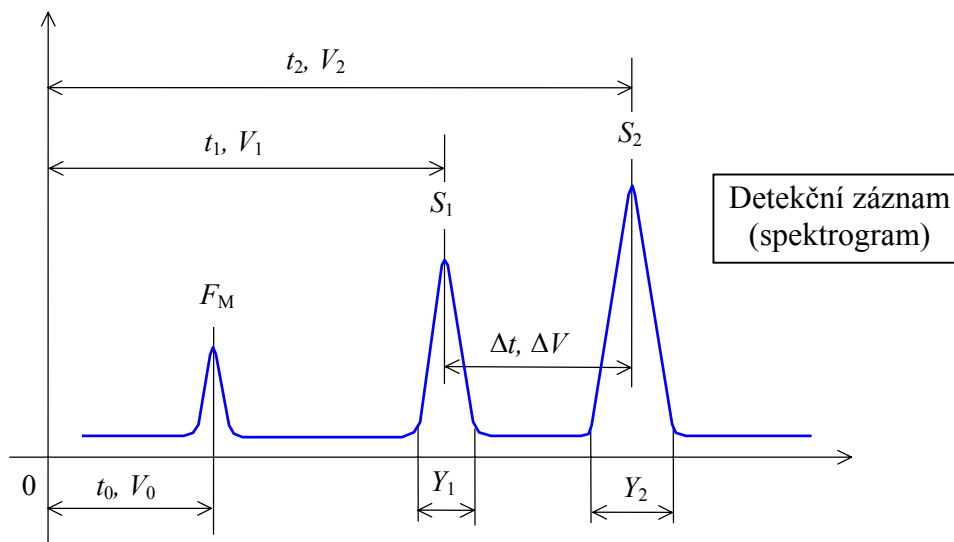
Retardační faktor R_F – poměr dráhy chromatogramované složky k dráze mobilní fáze

$$R_F = \frac{b}{a}$$

Použijeme-li ke srovnání **standard**, můžeme retardační faktor (vůči tomuto standardu) vyjádřit jako

$$R_{(x)} = \frac{b}{c}$$

SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE (CC)



V_0 – **mrtvý objem** (registrace čisté mobilní fáze při výtoku z kolony), V_1, V_2 – eluční objemy první a druhé složky dělené směsi, Y_1, Y_2 – šířky píků.

Rozlišovací schopnost (RS)

$$RS = 2 \frac{\Delta V}{Y_1 + Y_2} = 2 \frac{\Delta t}{Y_1 + Y_2}$$

DETEKCE A ANALÝZA CHROMATOGRFOVANÝCH LÁTEK

Vysoce citlivé a selektivní **detektory**, které jsou obvykle součástí komerčně vyráběných přístrojů. Obecně může být k detekci využita kterákoliv fyzikálně-chemická odlišnost, nejčastěji je však používána **absorpční** a **luminiscenční spektrofotometrie**, **polarografie**, **refraktometrie** a další **optické** metody. V případě použití radioaktivními izotopy značených látek jsou používány **scintilační** detektory.

VOLBA STACIONÁRNÍ FÁZE

Požadavky:

- **inertnost** (mechanická vůči (p, T) , chemická např. **Ph** – obecně nezpůsobující denaturaci dělených látek),
- **kapacita** (plocha povrchu – obvykle kompromis – čím menší částice, tím větší kapacita, ale dělení směsi látek je pomalejší).
- **homogenita** velikosti částic a jejich **sorpčních vlastností**.

Forma stacionární fáze:

1. **Pevná** porézní látka – **adsorbent** – LSC, IEC, GPC, GC, AC.
2. **Kapalina**, která je fyzikálně nebo chemicky vázána na **nosiči (sorbentu)** (LLC, GC, HPLC).

Sorbenty: celkově porézní nebo povrchově porézní. Nejčastěji používané sorbenty: **silikagel** (gel kyseliny křemičité) v různých úpravách, např. **silufol** pro TLC, syntetické pryskyřice (**separon**, **spheron**), polyakrylamidové gely, iontoměniče (**dowex**), polysacharidové gely (**sephadex**) pro chromatografii bílkovin, NK a biomolekul obecně.

Volba mobilní fáze:

Tento krok má **klíčový** vliv na kvalitu i účinnost dělení $\Rightarrow$ fyzikální chemie **rozpouštědel** (a jejich mísitelných **směsí**). **Konstantní** složení F_M – **izokratická** eluce. Jestliže se složení F_M během vyvíjení chromatogramu mění – **gradientová** eluce.

ADSORPČNÍ CHROMATOGRAFIE (ADC)

Adsorpce – **povrchový** jev – zachycování (usazování, hromadění) látky (složky dělené směsi) na rozhraní dvou fází s větší **afinitou** složky ke stacionární fázi F_S (ale ne zase příliš větší – jinak by se tato složka nepohnula z místa startu).

Mechanismus adsorpce – **mezimolekulární** povrchové síly – od malých (VAN DER WAALS) přes střední (elektrické) až po velké – blízké chemické vazbě (při chromatografii nežádoucí).

PROVEDENÍ

F_S – **pevná** látka (adsorbent), F_M – **kapalina** nebo **plyn** $\Rightarrow$ LSC, GSC. Největší vliv na adsorpci má **povrch** adsorbentu (porozita, morfologie).

ADSORBENTY POLÁRNÍ

Tyto adsorbenty jsou **hydrofilní** (historicky **tradiční**): **oxidy** (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , CaO , MgO), **hydroxidy** [$Ca(OH)_2$, $Mg(OH)_2$], **sírany** ($CaSO_4$, $MgSO_4$), **uhličitany** ($CaCO_3$), **křemičitany** (křemelina – mikroskopické skořápky pravěkých rozsivek, **silikagel**), **fosforečnany** [$Ca_3(PO_4)_2$], **škrob**, **sacharóza**.

Použití adsorpční chromatografie s polární stacionární fází:

Dělení málo polárních látek (**pigmenty**, **vitamíny**, **hormony**, **tuky** aj.).

ADSORBENTY NEPOLÁRNÍ

Tyto adsorbenty jsou **hydrofóbní** (**obrácená** fáze) – různé formy aktivního uhlí, organické pryskyřice.

Použití adsorpční chromatografie s nepolární stacionární fází:

Dělení **nepolárních** látek a těch **polárních** látek, jejichž molekuly obsahují **aromatické** jádro (aromatické aminokyseliny, fenoly, nukleové kyseliny aj.).

F_M je **kapalina** (LSC) – fyzikální chemie rozpouštědel. **Pozor!** I rozpouštědlo se při chromatografování adsorbuje na adsorbent – molekuly složek dělené směsi **soutěží** s molekulami rozpouštědla v adsorpci na aktivním povrchu adsorbentu.

F_S je **polární** $\Rightarrow$ F_M musí být o něco méně polární, než molekuly dělené látky. Čím je dělená látka polárnější než F_M , tím pevněji je poutána k adsorbentu. V opačném případě molekuly rozpouštědla vytěsňují adsorbovanou látku a k dělení nedojde. Po ukončení chromatografování je nutno (na polární F_S adsorbované) oddělené složky dělené směsi vymýt – **eluovat** – silně polárním rozpouštědlem.

Je-li F_S **nepolární** – vše **opačně**.

Obecné použití adsorpční chromatografie:

Dělení **nepolárních** nebo málo polárních látek na **polárních** adsorbentech.

METODIKA ADSORPČNÍ CHROMATOGRAFIE

- Klasická **sloupcová chromatografie (LSC)** – **nejpoužívanější preparativní metoda v laboratoři organické chemie**. **Adsorbent** – **silikagel** (dělení rostlinných **pigmentů**), **apatit** (dělení **bílkovin**).
- **Vysoce účinná (vysokotlaká) sloupcová chromatografie (HPLC)** – později bude probírána zvlášť.
- **Tenkovrstevná chromatografie (TLC)** – rozšíření techniky papírové chromatografie (PC). Hlavní přednost před papírovou chromatografií – větší odolnost materiálu (vrstvy), což dovoluje i použití drastických elučních činidel.

VRSTVY

- Volně sypané na skleněné podložce (specifické složení),
- Vrstvy fixované pojídlem. Komerční výrobky – **silufol** (silikagel na hliníkové podložce, **lucefol** (celulóza na hliníkové podložce), **alufol** (oxid hlinitý na hliníkové podložce)

METODIKA TENKOVRSTEVNÉ CHROMATOGRAFIE

Start, vyvíjení F_M , odpařování rozpouštědla, detekce zón, oddělení zón, eluce.

Použití TLC:

Většinou pouze **kvalitativní metoda (dělení, preparace)**. Některé postupy však mohou poskytovat i kvantitativní výsledky (analýza) - sériové dopingové testy.

ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRAFIE

Dělicí princip je stejný, jako u **extrakce** (je kvantitativně vystižen **rozdělovací konstantou** $k_p = c_1/c_2$ – poměrem koncentrací dělené látky ve dvou vzájemně se **nemísících kapalinách** za stavu dynamické rovnováhy).

Použití k dělení:

- **hydrofilních** látek: F_S – voda, vodný roztok organického rozpouštědla na nosiči, kterým je zpravidla škrob, celulóza, křemelina. F_M – nepolární organické rozpouštědlo (uhlovodíky, chloroform).
- **hydrofóbních** látek: F_S – hydrofóbní kapaliny (parafrinový, silikonový olej) na nosiči, kterým je např. silikonovaná nebo acetylenovaná celulóza nebo křemelina. F_M – hydrofilní kapaliny (vodné roztoky nižších alkoholů).

METODIKA ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRAFIE

- **Klasická sloupcová (CC)** – dnes již prakticky nepoužívaná.
- **Papírová (PC)** – F_S : voda zakotvená na chromatografickém papíře (čistá celulóza), pro zakotvení **nepolární** F_S (**obrácená fáze**) nutnost úpravy papíru – acetylace.
- **Provedení:** vzestupná, sestupná, jednorozměrná, dvojrozměrná.
- **Výhody:** nenáročnost, rychlost, velká dělicí schopnost.

- **Nevýhody:** malá kapacita.
- **TLC.**
- **HPLC.**

Obecné použití rozdělovací chromatografie:

Možnost dělení všech látek, **nejčastěji** však dělení **polárních nízkomolekulárních** látek (alkaloidy, peptidy aj.).

CHROMATOGRAFIE NA IONTOMĚNIČÍCH (IEC)

Iontoměniče (ionexy) – anorganické nebo organické **polyelektrolyty** nerozpustné v běžných rozpouštědlech. Jejich molekuly obsahují "zabudované" (ionizované) **ionogenní** funkční skupiny – se "zabudovanými" kladnými nebo zápornými elektrickými náboji. Tyto náboje přitahují a udržují ve své blízkosti (vážou) elektricky ekvivalentní množství opačně nabitých iontů. Tyto – tzv. "protiionty" – se mohou ve vodném roztoku vyměňovat za jiné.

Mechanismus dělení:

Vratná výměna iontů mezi mobilní fází F_M (vodný roztok) a stacionární fází F_S – iontoměničem (jeho ionogenními skupinami). Dělení je způsobeno rozdílem ve velikostech **nábojů** různých iontů. Velikost nábojů iontů závisí na jejich **oxidačním čísle** a na **disociační konstantě**, která je ovlivněna **pH** prostředí.

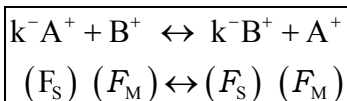
ROZDĚLENÍ IONTOMĚNIČŮ

- **Podle původu**
 1. **Přírodní** – **anorganické** – zeolity (vodné hlinitokřemičitany jednomocných a dvojmocných prvků), organické – humus, bílkoviny, hnědé uhlí aj.
 2. **Syntetické** – **anorganické** – syntetické zeolity, mikrokrytalické gely, **organické** – pryskyřice na bázi styren-divinyl-benzén.
- **Podle funkčních skupin**
 1. **Katexy** (výměna kationtů),
 2. **Anexy** (výměna aniontů),
 3. **Redox ionexy** (oxidačně redukční),
 4. **Selektivní ionexy** (výběrové),
 5. **Amfoterní ionexy** (obojaké – katexy nebo anexy podle **pH** prostředí).
- **Podle skupenství**
 1. **Pevné** – **zrnité** (sférické nebo mleté), **neznité** (vlákna, membrány, trubice),
 2. **Kapalné.**

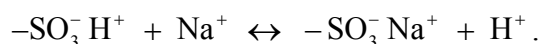
ZÁKLADNÍ POJMY

Cyklus ionexu

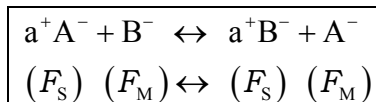
katex:



$k^- A^+$ – katex v cyklu A^+ ; $k^- B^+$ – katex v cyklu B^+ . Např.



anex:



$a^+ A^-$ – anex v cyklu A^- ; $a^+ B^-$ – anex v cyklu B^- . Např.



V konkrétních příkladech říkáme "ionex v cyklu H^+ , Cl^- , $(\text{OH})^-$ " apod.

Cyklování ionexu: příprava, navázání vhodných iontů (před jeho chromatografickým použitím).

Kapacita ionexu – maximální množství iontů ($\text{mval} \cdot \text{g}^{-1}$), které je ionex schopen vázat za optimálních podmínek.

1 val je množství reagující látky, které v daném chemickém nebo elektrickém vazebném procesu kvantitativně nahradí **1 mol** vodíku nebo **1 mol** elektronů.

Kapacitu ionexu ovlivňuje:

- zrnitost, porozita (bobtnání, sítování),
- iontová síla roztoku – F_M – soutěž o ionty mezi F_M a ionexem,
- pH roztoku – F_M – zvláště u slabých ionexů.

Katexy: silné $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ (sulfoskupina),
slabé $-\text{COO}^- \text{H}^+$ (karboxylová skupina).

Anexy: silné $-\text{N}^+(\text{CH}_3)^-$ (amoniová skupina),
slabé $-\text{N}^+ \text{R}_2$ (aminoskupina).

METODIKA CHROMATOGRAFIE NA IONTOMĚNIČÍCH

Sloupcové provedení; ionex v koloně. F_M – proměnná hodnota pH – gradientová eluce. Proměnná hodnota pH mění "zajímavost" iontů dělené směsi pro použitý ionex (mění vlastnosti ionexu selektivně i kapacitně). Ionty se stejným nábojem (**stejného druhu**) se proto zachycují (vyměňují) **na též místě** sloupce ionexu.

Eluce zachycených iontů: opačný postup než při chromatografii – použití rozpouštědla (látky), jejíž ionty vytěsňují ionty zachycené ionexem.

Použití chromatografie na iontoměničích:

A. Odstranění nežádoucích iontů

Změkčování vody ($\text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^+, \text{Mg}^+$), **rafinace cukru** (odstranění kovových iontů), **deionizace vody** (katex v cyklu H^+ + anex v cyklu $\text{OH}^- \Rightarrow$ snížení koncentrace oxoniových a hydroxoniových iontů na koncentraci $\approx 2 \cdot 10^{-4} \%$ – sekundární okruhy v jaderných elektrárnách). **Odstranění rušivých iontů** [např. iontů kovů ovlivňujících chuť, barvu i toxicitu ovocných sirupů, srážlivost krve při fyziologických pokusech ($\text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^+$)], příprava umělého mateřského mléka se sníženou srážlivostí v žaludku,

odstraňování složitých polymerů z roztoků, např. nukleových kyselin při izolaci enzymů apod.].

B. Koncentrování a izolace stopových množství látek

Použití selektivních **ionexů** např. pro stanovení **Cu** v mléce i při koncentracích $\approx 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Odstraňování těžkých kovů z odpadních vod, v biofyzice – např. izolace kyseliny askorbové (vit. **C**) z citrusového odpadu po lisování, izolace streptomycinu z kultivačního média. Používáno i v jaderné fyzice pro izolaci “několika” atomů transuranů, získaných pomocí urychlovačů částic.

C. Chromatografické dělení složitých směsí anorganických i organických iontů

V biofyzice – nejrozšířenější aplikací této metody je analýza směsi aminokyselin, rutinní kontrola léčiv, krmiv, potravin.

D. Chromatofokusace

Modifikace chromatografie na iontoměničích – preparativní chromatografická metoda s vysokým stupněm rozlišení pro dělení **bílkovin** podle jejich **izoelektrického** bodu (1977). Lineární gradient **pH** v koloně – speciální anexy a amfoterní tlumivé roztoky (pufry). Takto získané zóny jednotlivých bílkovin jsou velmi ostré (šířka $\approx 0,004 \text{ pH}$).

GELOVÁ (VYLUČOVACÍ) CHROMATOGRRAFIE (GPC)

Dělení složek směsi podle **velikosti** molekul. Difúze nízkomolekulárních látek dovnitř gelu – **permeace** (gel permeation chromatography – **GPC**). Při určité velikosti pórů a molekul směsi je permeace selektivní. **Gel** – inertní polymerní zesíťovaná matrice s volitelnou velikostí pórů.

F_S – kapalina – nejčastěji voda zachycená uvnitř gelu. **F_M** – tatáž kapalina vně gelu.

Extrémní případy průchodu dělené látky kolonou obsahující:

- **exkluze** (molekuly procházejí bez zachycení),
- **totální permeace** (zachycení všech molekul).

Charakteristika gelu: **vylučovací mez** **$M_{r, \text{lim}}$** – relativní molární hmotnost **největší** částice, která je ještě schopna proniknout do pórů gelu. Možnosti: $10^2 < M_{r, \text{lim}} < 10^7$.

Použití gelové chromatografie:

Analytika a preparace **makromolekulárních hydrofilních** látek.

Analytické použití: stanovení **molární hmotnosti**, analýzy směsí bílkovin a kapalin biologického původu.

Preparativní použití: odsolování (čištění bílkovin), dělení suspenzí buněk a buněčných částí, izolace DNA, gamaglobulinu apod. Vysušování.

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE (AC)

Mechanismus dělení: schopnost biologicky aktivních látek vytvářet specificky a vratně komplexy (**chemicky se vázat**) s určitými látkami, nazývanými **afinanty**.

Afinant je obvykle vázán na pevnou látku – **nosič** (nejčastěji agaróza) – afinantní **sorbent** – v koloně. Biologicky aktivní látka se při průchodu kolonou na tomto sorbentu zadrží (váže) – ostatní látky protékají. Tradiční název afinitní chromatografie je poněkud nepřesný. Situaci by lépe odpovídal název **biospecifická sorpce**.

Eluce: zvýšení iontové síly elučního roztoku – obvykle změnou pH. Často používanou modifikací je tzv. vsádková metoda – přidání afinantního sorbentu do roztoku.

Použití afinitní chromatografie:

Izolace složitých a vzácných látek, čištění bílkovin, pigmentů, izolace vakcín. Také např. izolace lektinů – bílkovin v krvi s vysokou aktivitou k cukru – při rychlém určování krevní skupiny.

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysoce účinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie (HPLC).

Nejdokonalejší varianta sloupcové (kolonové) kapalinové chromatografie.

Vznik: teorie chromatografických procesů + prudký rozvoj přístrojové techniky, zejména v oblasti detekce chromatografovaných látek.

Sorbent: velmi jemné ($\varnothing \approx 2 \mu\text{m} - 50 \mu\text{m}$) vysoce homogenní částice v kovových (vyjíměčně i skleněných) trubicích (kolonách). Průměr trubic je asi $2 \text{ mm} - 8 \text{ mm}$, jejich délka $\approx 10 \text{ mm} - 1 \cdot 10^2 \text{ mm}$.

F_s je chemicky (“navždy”) vázaná na sorbent. Velký hydrodynamický odpor proti průtoku F_M ; proto je použito velkého tlaku ($\approx 10 \text{ MPa}$) pro urychlení průtoku (při dělení i eluci).

Výhody: velká účinnost a rozlišovací schopnost. Možnost velmi přesné temperace. HPLC je jednou z **nejdokonalejších analytických metod**.

Nevýhoda: velmi **drahé** komerční přístroje – HPLC chromatografy.

METODIKA HPLC

Jsou používány všechny principy **kapalinové** chromatografie (obvykle s **obrácenou** fází).

Použití vysoce účinné kapalinové chromatografie:

Dělení složitých směsí **velmi příbuzných** látek.

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (GC)

Mechanismus dělení:

adsorpce, extrakce, rozdělovací chromatografie. F_M – **plyn** (plynná směs látek). F_s – kapalina (GLC), pevná látka (GSC).

METODIKA PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Sloupcová (kolonová) chromatografie prováděná výlučně na **komerčních** plně automatizovaných a velmi **drahých** přístrojích – **plynových chromatografech**. Kolonami jsou skleněné trubice ($\varnothing \approx 0,25 \text{ mm}$, délka až $1 \cdot 10^2 \text{ m}$).

Použití plynové chromatografie:

Převážně k analýze **těkavých** látek. **Adsorpční princip** je používán pro dělení **permanентních** plynů – výfukové plyny, bioplyn apod. **Rozdělovací princip** se uplatňuje při kontrole **aromatických** látek (voňavky, parfémy, likéry). GC je soudní metodou při stanovení obsahu alkoholu v krvi, při kontrole potravin, odpadních vod apod.

ELEKTROFORÉZA, KRYSTALIZACE, SPECIÁLNÍ METODY DĚLENÍ BIOMOLEKUL

ELEKTROFORÉZA, KRYSTALIZACE, DESTILACE, LYOFILIZACE

ELEKTROFORÉZA

Dělicí metoda využívající **různé pohyblivosti** různých **iontů** (složek směsi) ve **stejnoseměrném** (homogenním) **elektrickém poli**.

Pohyblivost iontů závisí na:

- velikosti náboje,
- velikosti a tvaru částice – iontu,
- použitém elektrolytu,
- povaze nosiče elektrolytu.

Většinu biologicky zajímavých látek lze ve vodném prostředí převést na elektricky nabitě částice.

Metodika:

- disociace,
- změna **pH**,
- adsorpce iontů jiného druhu,
- chemickou vazbou - tvorbou tzv. ionogenních komplexů.

TEORIE POHYBU NABITÉ ČÁSTICE V ELEKTRICKÉM POLI

Uvažujme pro jednoduchost např. **kulovou** částici nesoucí náboj **Q** v elektrickém poli o intenzitě **E** .

Působící síly:

- **elektrická síla** $F_1 = EQ = \text{konst.}$,
- **odpor prostředí** $F_2 = 6\pi r \eta v = k \eta v \neq \text{konst.}$ (roste s rychlostí).

Rovnovážný stav nastane při nulové výslednici; tedy když $F = F_1 - F_2 = 0 \Rightarrow EQ = 6\pi r \eta v = k \eta v \Rightarrow$

$$v = EQ / (k\eta) \quad (\eta - \text{součinitel dynamické viskozity}).$$

Pro lepší srovnání zavádíme **měrnou** veličinu $\mu = v/E = Q/k\eta$, nazývanou **pohyblivost** částice. V praxi dochází k odchylkám od této teoretické hodnoty z následujících důvodů:

1. Iontový obal částice zvětšující její průměr a snížení její pohyblivosti. **Východisko:** početní **korekce**.
2. Elektrolýza – průchod el.proudu – změna elektrod a jejich okolí (změna **pH**). **Východisko:** oddělení elektrodového a separačního prostoru.

3. Elektroosmóza – transport H_2O hydratovanými ionty – změna osmotického tlaku v jejich okolí. **Východisko**: početní korekce.
4. Přeměna elektrické energie ve vnitřní energii (**JOULEOVO** teplo). Nutnost **chlazení**.

Vysokonapět'ová elektroforéza ($U > 1000 \text{ V}$) – opatrnost!

Použití: dělení nízkomolekulárních látek.

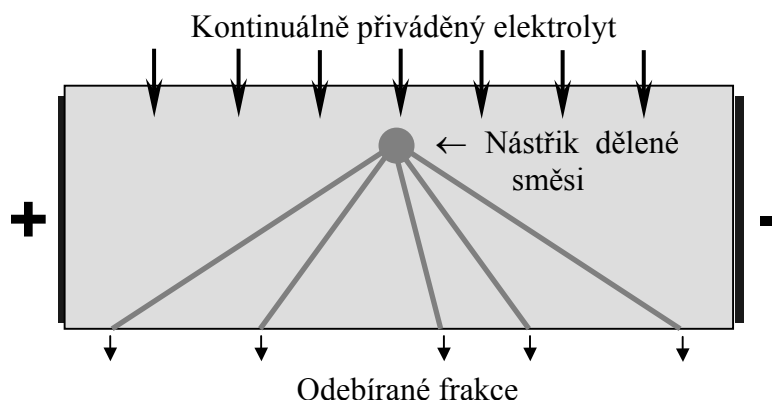
Nízkonapět'ová elektroforéza ($U \approx 200 \text{ V}$).

Použití: dělení **labilních** biopolymerů (**chlazení**).

VOLNÁ ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza s **pohyblivým rozhraním**; možnost oddělení pouze nejpomalejších a nejrychlejších iontů. **Nejstarší**, dnes již velmi málo používaná metoda.

Kontinuální zónová (volná beznosičová) elektroforéza



Výhody: značný výkon; malé ztráty, účinné dělení.

Použití kontinuální zónové elektroforézy: dělení tkáňových extraktů, bílkovin, živých buněk i jejich částí, čištění syntetických hormonů pro genetické inženýrství v beztlakovém stavu – až **5krát** větší čistota než v podmínkách pozemských laboratoří.

ELEKTROFORÉZA NA NOSIČÍCH

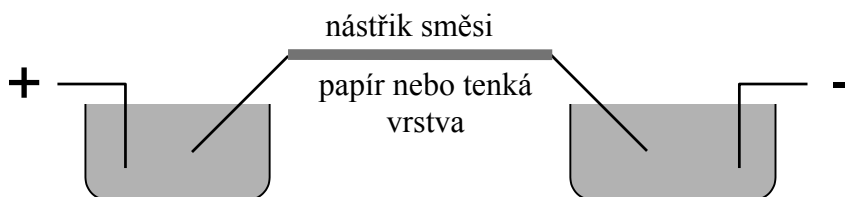
Umožňuje odstranit hlavní nevýhodu volné elektroforézy (zpětné míšení rozdělených látek termickou konvekcí) tím, že elektrolyt je **zakotven** na nosiči.

A. Základní elektroforéza – pouze využití rozdílné pohyblivosti iontů. Dělení **podle** nosiče elektrolytu:

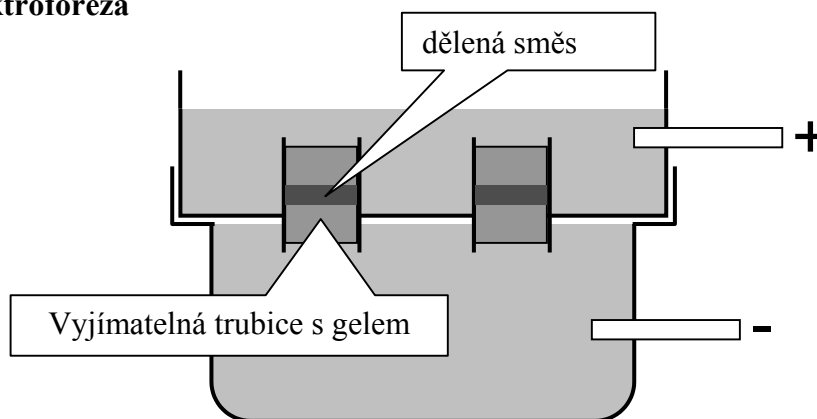
- **papírová elektroforéza** – nosičem elektrolytu je chromatografický papír. $E \approx (5 - 10) \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ – analýza bílkovin; $E \approx 200 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ – dělení nízkomolekulárních látek.
- **elektroforéza na tenké vrstvě** – nosičem elektrolytu (H_2O + pufr) je vrstva silikagelu nebo škrobu na skleněné podložce.
- B. Kombinovaná elektroforéza** – k dělení je využito (kromě el.náboje) ještě dalších odlišností – např. velikosti a molární hmotnosti iontů. Nosičem elektrolytu je obvykle **gel** – při dělení je využito možností **gelové chromatografie**.

METODIKA

Papírová nebo tenkovrstevná elektroforéza



Gelová elektroforéza



MODIFIKACE GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

- Elektroforéza s **gradientem** porozity,
- **Izoelektrická fokusace** – gradient **pH** v gelu – dělení bílkovin podle jejich **izoelektrického** bodu (použití pro diagnostické klinické analýzy, k dělení buněk a virů).
- **Izotachoforéza** – pohyb zón stejnou rychlostí (různé elektrolyty v katodovém a anodovém prostoru).

KOMBINOVANÉ ELEKTROFORETICKÉ METODY

Elektroforéza + další dělicí metody ⇒ značné zvýšení účinnosti dělení

- **Elektrochromatografie** – dvourozměrná – jeden směr chromatografie, druhý směr elektroforéza,
- **Elektrodialýza**,
- **Elektroultrafiltrace**,
- **Elektrodesorpce** – eluce složek afinitní chromatografie elektrickým polem.

VÝZNAM ELEKTROFORÉZY PRO DĚLENÍ BÍLKOVIN:

- **mapování lidských bílkovin** (řádově tisíce),
- **praktická medicína** (klinická diagnostika, např. dnes již rutinní testy ke zjištění maligního bujení),
- **základní biochemický výzkum a genetické inženýrství.**

KRYSTALIZACE

Vylučování látky v **pevné** fázi (ve formě **krystalů**) z fáze **plynné** nebo **kapalné** (z roztoku nebo z taveniny). **Krystal** – homogenní anizotropní kontinuum – modelová představa.

Krystalizace – jednoduchá a **dokonalá** čistící metoda (účinnější než **destilace**). Příprava látky v krystalickém stavu – cíl každého současného biofyzika (i alchymistů).

Princip čištění: teplota tání čisté látky je **vyšší** než u látky znečištěné. Proto je teplota tání (za daného tlaku) důležitou identifikační informací.

Krystalizace v běžném slova smyslu – zahuštění roztoku $\Rightarrow$ ochlazení $\Rightarrow$ oddělení vykrystalizované látky.

Požadavek: čistota, výtěžek.

Krystalizaci dělíme na:

- **Preparativní** – průmyslová výroba krystalických látek,
- **Pěstování monokrystalů** – získání jediného, co nejdokonalejšího a největšího monokrystalu.

KRYSTALIZACE Z ROZTOKU

Při tomto postupu je rozhodující **rozpouštědlo**.

Rozdělení podle metodiky přesycení:

- Ochlazování roztoku – rozhodující je rychlost ochlazování.
- Odpařování rozpouštědla – pomalejší odpařování $\Rightarrow$ větší krystaly.
- Přidání jiného rozpouštědla, které se mísí s původním, ale v němž je daná látka nerozpustná nebo méně rozpustná (např. přidání etanolu do vodného roztoku cukru).

KRYSTALIZACE Z TAVENINY

Zonální tavení – vyvinuto pro výrobu anorganických polovodičů (Ge). Pro biologicky významné látky nepoužitelné – příliš vysoká teplota.

SUBLIMACE

Vypařování látky z pevné fáze – metoda vhodná pro biologicky významné látky. Provádíme jej obvykle za sníženého tlaku.

Použití organických monokrystalů: Naftalen, antracén – **scintilátory**, triglycinsulfát - **piezoelektrikum**. Organické **polovodiče** a **supervodiče**. Zvláštní význam monokrystalů pro jejich RTG strukturální analýzu – jedinou metodu umožňující "vidět" prostorovou strukturu krystalu až po atomové detaily $\Rightarrow$ **konstituce**, **interakce**, **kinetika**, farmakologický účinek apod.

MIKROMETODY PRO PĚSTOVÁNÍ MONOKRYSTALŮ MAKROMOLEKUL ZACHOVÁVAJÍCÍCH JEJICH NATIVNÍ VLASTNOSTI

- izotermální destilace,
- dialýza v mikrodialyzátorech,
- ultracentrifugace.

DESTILACE

Destilace je jedna z nejstarších metod k dělení **kapalin, nízkotajících látek a zkapalnitelných plynů**, vycházející z rozdílu v jejich **teplotách varu**.

Za normálního tlaku:

- **prostá** destilace,
- **frakční** destilace (rektifikace).

Za sníženého tlaku:

- **vakuová** destilace.

Nejjednodušší je prostá destilace. Pro **rektifikaci** (zvláště průmyslovou) je zapotřebí složitá aparatura – **zpracování ropy, výroba rozpouštědel a destilátů**.

Snížení tlaku při **vakuové destilaci** vede ke snížení teploty varu – výhodné v **biofyzice** pro zachování **nativnosti**. Další výhodou této (vakuové) metody je omezení vlivu vzdušného kyslíku. Rizikem při vakuové destilaci je tzv. **utajený var** – silné lokální **přehřátí** spodních vrstev kapaliny v kádince nebo baňce díky hydrostatickému tlaku. Při náhodném promíchání (otřesu) a přemístění této kapaliny k hladině – **explozivní var**. Zamezení – probublávání inertního plynu z kapiláry, jejíž ústí je až u dna.

MOLEKULÁRNÍ DESTILACE

Destilace **labilních** látek, při níž je (za vysokého stupně vakua) vzdálenost hladiny kapaliny a povrchu chladiče menší, než střední volná dráha kapalinu opustivších molekul. Zahřívání kapaliny bývá obvykle mžikové (10^{-2} s).

LYOFILIZACE

Jde o **mrazovou sublimaci** – **nejšetrnější způsob sušení** biologicky významných látek.

Princip: tenkou vrstvu vodného roztoku látky necháme dokonale zmrznout. Pak – vysoký stupeň vakua ($0,01 - 2$ mm Hg) $\Rightarrow$ intenzivní sublimace H_2O $\Rightarrow$ další samovolné ochlazování.

Výhody:

- Nepatrné riziko **denaturace** (bílkoviny, antibiotika, enzymy, viry, mikroorganismy apod.),
- Zabránění úniku **těkavých** látek, které by při běžné destilaci byly strženy vodní parou,
- Zachování **objemu** vysušované látky – kyprost a z ní plynoucí následná vynikající **rozpuštěnost** ve vodě,
- Díky nízké teplotě nehrozí nebezpečí mikrobiologické nákazy nebo enzymatických destrukčních procesů,
- Vyloučení vlivu vzdušného kyslíku a tím i porušení snadno oxidovatelných látek,
- Výsledný produkt má nepatrnou vlhkost ($\approx 0,5\%$) což umožňuje prakticky neomezené dlouhé **skladování**.

CHEMICKÉ DĚLÍCÍ METODY

- A. **Chemické reakce** – přechod na látky snázeji dělitelné (eterifikace, esterifikace, acetylace, aj.)
- B. **Tvorba komplexů** – molekulární sloučeniny (chemická vazba), inkluzní komplexy (skládají se z molekul hostitele, v nichž je uzavřen host)
- **Klatráty** (mřížoví) – např. molekuly hydrochinonu uzavírají hosta v kulové dutině své molekuly,
 - **Kanálkové struktury** – krystalické adukty s močovinou,
 - **Vrstevnaté sloučeniny** – **interkaláty** – např. grafit nebo slída.

DĚLENÍ BÍLKOVIN

Přírodní výskyt těchto látek: složité směsi s velmi malými rozdíly ve vlastnostech složek. Malá výchozí koncentrace. Značná labilita. $\Rightarrow$

Problém !!

Proto tyto požadavky: omezení denaturačních vlivů, co nejnižší teplota, kontrola pH.

Postup:

1. Extrakce do roztoku,
2. Klasické dělicí metody (srážení, centrifugace, dialýza aj.),
3. Moderní dělicí metody (chromatografie, elektroforéza aj.),
4. Zvyšování čistoty (opakovaná krystalizace)

VYBRANÉ ELEKTROCHEMICKÉ METODY

ELEKTROLÝZA, GALVANICKÉ ČLÁNKY, ELEKTRODY, POLAROGRAFIE

Téměř všechny chemické interakce jsou na atomové úrovni interakcemi elektrickými. V tomto smyslu je chemie vlastně **elektrochemií**. V **užším slova smyslu** se pod pojmem **elektrochemie** rozumí studium roztoků **elektrolytů** a jevů na **elektrodách** do těchto roztoků ponořených.

HISTORICKÉ POZNÁMKY

- elektřina $\approx$ **GILBERT** – fyzik britské královny **ALŽBĚTY** (kolem 1600),
- kladná a záporná elektřina $\approx$ **B. FRANKLIN** (1747),
- „živočišná elektřina" $\approx$ **L. GALVANI** (1791),
- první baterie (**VOLTŮV** sloup – destičky **Ag** a **Zn** proložené **NaCl**) $\approx$ **A.VOLTA** (1800),
- elektrolýza, elektrický oblouk $\approx$ **H. DAVY** (1806), ale hlavně **MICHAEL FARADAY**.

FARADAY nastoupil roku 1813 jako laborant k **DAVYMU** do královského britského institutu. Geniální experimentátor. Původní vzdělání – tiskař, fyzik samouk. Od **FARADAYE** pochází kromě jiného elegantní dodnes používané názvosloví a samozřejmě zákony **elektrolýzy** (jedny z **nejpřesněji platících** zákonů ve fyzice a v přírodě vůbec).

Po **FARADAYOVÝCH** objevech vzal vývoj v elektrochemii velmi rychlý spád.

ZÁKLADNÍ POJMY

- elektrický **náboj** (elementární náboj o hodnotě $e = \pm 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)
- elektrický **proud** (uspořádaný pohyb volných nosičů elektrického náboje).

VEDENÍ ELEKTRICKÉHO PROUDU

Vodiče:

1. **třídy** (lineární vodiče) – kovy,
2. **třídy** – kapaliny, plyny.

Elektrolyty:

Kapaliny vedoucí elektrický proud, v širším smyslu tak nazýváme i látky, které po rozpuštění v daném (proud nevedoucím) rozpouštědle z něj elektrolyt vytvářejí (např. soli).

Elektrický odpor (rezistence):

značka **R** - odpor proti vedení elektrického proudu - všeobecná a přirozená vlastnost látek. $[R] = \Omega(\text{ohm})$. Pro vodiče **1. třídy** platí **OHMŮV zákon**: $U = R I$; $R = \sigma l / S$.

Významnou (tabulkovou) veličinou je **měrný odpor**: $\sigma = \sigma(T)$; $[\sigma] = \Omega \cdot \text{m}^{-1}$.

Pro vodiče **2. třídy** (elektrolyty) platí OHMŮV zákon pouze v **omezeném rozsahu** - jen v určitém intervalu koncentrací rozpuštěné látky.

Převrácenou hodnotou elektrického odporu je **vodivost** $G = R^{-1}$; $[G] = \text{S}(\text{siemens})$, $\text{S} = \Omega^{-1}$. $G = \kappa S / l$. Významnou (tabulkovou) veličinou je **měrná vodivost** $\kappa = \sigma^{-1}$;

$[\kappa] = S \cdot m^{-1}$. Podle měrné vodivosti dělíme elektrolyty na **silné** (soli, anorganické kyseliny) a na **slabé** (organické kyseliny).

ELEKTROLYTICKÁ DISOCIACE

Působení rozpouštědla – štěpení molekul rozpouštěné látky na **nabité** částice – **ionty** obojího znaménka. Při malých koncentracích se u silných elektrolytů projevuje **úplná** disociace, u slabých elektrolytů je pouze **částečná** disociace rozpouštěné látky. Současně s disociací probíhá **rekombinace** – ionty se opět spojují v neutrální molekuly.

Je-li v daném objemu roztoku n_0 molekul rozpouštěné látky, z nichž n'_0 je disociováno, je

$$\alpha = \frac{n'_0}{n_0}$$

tzv. **stupeň disociace** elektrolytu; $\alpha \in (0; 1)$; $\alpha \approx T$; $\alpha \approx c^{-1}$. Pro silně zředěné roztoky ($c \rightarrow 0$) je $\alpha \rightarrow 1$.

Dále definujeme tzv. **molární vodivost**

$$\boxed{\Gamma = \kappa / c}, \quad [\kappa = \kappa(c), [c] = \text{kmol} \cdot \text{m}^{-3} = \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}],$$

která je obecně **rostoucí** funkcí koncentrace c (**lineární** je pouze pro vodný roztok **KCl**).

Pro srovnání vodivosti **různých** elektrolytů provádíme **extrapolaci** pro nulovou koncentraci $c \rightarrow 0$:

$$\boxed{\lim_{c \rightarrow 0} \Gamma = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\kappa}{c} = \Gamma^\infty}$$

Hodnoty Γ^∞ jsou pro většinu běžně používaných elektrolytů uváděny v **tabulkách** $\Rightarrow$ možnost experimentálního stanovení **stupně disociace** roztoku o **známé koncentraci** c měřením jeho **vodivosti** κ a výpočtem jeho molární vodivosti Γ jako

$$\boxed{\alpha = \frac{\Gamma}{\Gamma^\infty}}$$

Experimentální metoda, spočívající v měření **vodivosti** elektrolytů, se jmenuje **KONDUKTOMETRIE** ($c; \kappa \rightarrow \Gamma; \Gamma, \Gamma^\infty \rightarrow \alpha$).

ELEKTROLÝZA

je chemický děj (**lýza** – rozklad, oddělení) způsobený průchodem elektrického proudu elektrolytem. Spojeno s přenosem hmotnosti. **Dva** zákony elektrolýzy – **FARADAY**.

1. zákon: Hmotnost (m) **látky vyloučené na elektrodě je přímo úměrná**
prošlému náboji (Q)

$$\boxed{m = A Q}$$

A je tzv. **elektrochemický ekvivalent látky**; $[A] = \text{kg} \cdot \text{C}^{-1}$

Z prvního FARADAYOVA zákona plyne: $A = m/Q = \mu/ze$, kde μ je hmotnost iontu, e je elementární náboj a z je oxidační číslo.

Použijeme-li AVOGADROVY konstanty $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, můžeme psát

$$A = \frac{\mu}{ze} \frac{N_A}{N_A} = \frac{M}{z} \frac{1}{N_A e} = \frac{M}{z F},$$

kde

$$F = 9,649 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$$

je tzv. FARADAYŮV náboj a M/z je tzv. kilogramekvivalent prvku (kiloval, chemický ekvivalent).

2. zákon: Elektrochemické ekvivalenty (A) různých prvků (látek) jsou přímo úměrné jejich chemickým ekvivalentům (M/z)

$$A = \frac{1}{F} \frac{M}{z}$$

1. a 2. FARADAYŮV zákon můžeme spojit a psát

$$m = A Q = \frac{M}{z F} Q \Rightarrow A = \frac{1}{F} \frac{M}{z}$$

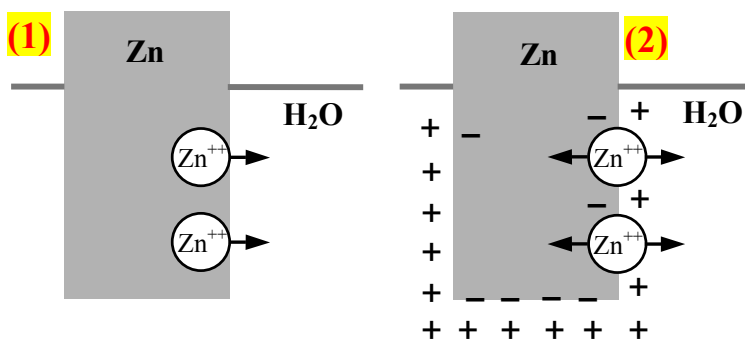
FARADAYOVY zákony jsou jedny z **nejpřesnějších přírodních zákonů**, umožňujících určení AVOGADROVY konstanty a elementárního elektrického náboje.

Z těchto zákonů vycházela starší definice **ampéru** – jednotky elektrického proudu. V době svého vzniku (1. pol.19. stol.) tyto zákony výrazně podpořily představu o **atomické** struktuře elektrického náboje a o **atomismu** vůbec.

Experimentální metoda, spočívající v přesném měření elektrického proudu při elektrolytických dějích, se jmenuje **COULOMETRIE**.

GALVANICKÉ ČLÁNKY

Soustavy, poskytující elektrickou energii na úkor energie, vytvářené při samovolných chemických nebo koncentračních změnách, které v nich probíhají.



Ponoříme-li destičku **kovu** (např. **Zn**) do vody, dojde samovolně k hydrataci iontů **Zn⁺⁺** v povrchové vrstvičce kovu a přechod těchto iontů do vody v okolí destičky **(1)**. To má za

následek vznik **difúzní elektrické dvojvrstvy** s rozdílem potenciálů mezi kovem a jeho nejbližším „vodním“ okolím (2), bránícím dalšímu pronikání iontů Zn^{++} do vody.

Jde o stav **dynamické rovnováhy** – přechod iontů Zn^{++} mezi kovem a vodou je **obousměrný** a ve stavu rovnováhy kvantitativně stejný.

Potenciálový rozdíl v difúzních dvojvrstvách různých kovů je **různý**. Ušlechtilější kovy se rozpouštějí méně – méně iontů v okolí kovu – menší potenciálový rozdíl v dvojvrstvě.

Podobný děj nastává při ponoření kovu do roztoku své **solí**. V tomto případě je však přechod kovových iontů do roztoku ztížen – v roztoku již tyto ionty jsou. Existuje dvojí možnost:

- rozpouštění povrchové vrstvy a přechod iontů do roztoku – kov se nabíjí **záporně** a jeho kapalně okolí **kladně**,
- kov se nerozpouští a ionty přecházejí z roztoku do kovu – kov se proto nabíjí **kladně** a jeho kapalně okolí **záporně**.

Podle starších představ (NERNST – méně přesné, ale názorné) závisí **polarita** difúzní elektrické dvojvrstvy **na dvou tlacích**. Je to

- **elektrolytický rozpouštěcí tlak** P , vyvolávající rozpouštění povrchové vrstvy kovu $\Rightarrow$ přechod iontů do roztoku,
- **osmotický tlak** π iontů v roztoku, vyvolávající přechod iontů z roztoku do kovu.

Možnosti:

- $P > \pi$ – převládne přechod kovů do roztoku - kov se vůči roztoku nabíjí **záporně**,
- $P = \pi$ – stav elektrický neutrální (potenciálový rozdíl v dvojvrstvě je **nulový**),
- $P < \pi$ – převládne přechod iontů z roztoku do kovu - kov se vůči roztoku nabíjí **kladně**.

kov (elektroda) + roztok (i voda), do něhož je ponořen = poločlánek

Elektrolytický potenciál poločlátku (rozdíl potenciálů = napětí v elektrické dvojvrstvě) jeho **znaménko i velikost** – závisí obecně na:

- druhu kovu,
- elektrolytickém rozpouštěcím tlaku P (vliv rozpouštědla),
- osmotickém tlaku π (vliv rozpouštědla),
- valenci (náboji) iontů,
- teplotě apod.

Podle **NERNSTOVY** teorie lze potenciál V **poločlátku (elektrody)** vyjádřit vztahem

$$V = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{P}{\pi}$$

Potenciál poločlánku nelze měřit přímo (aby to bylo možné, museli bychom vytvořit elektrický obvod – do roztoku bychom museli ponořit další elektrodu, která je opět poločlánkem s vlastním potenciálem).

Východisko – porovnání potenciálu dané elektrody s vhodným **normálem** – s tzv. **srovnávací elektrodou**. Tímto srovnáním získáme **relativní hodnotu** potenciálu dané elektrody, což je postačující, neboť v praxi – při konstrukci **článků** – pracujeme pouze s **rozdílem potenciálů** použitých elektrod a ten je pro jejich absolutní i relativní hodnoty stejný.

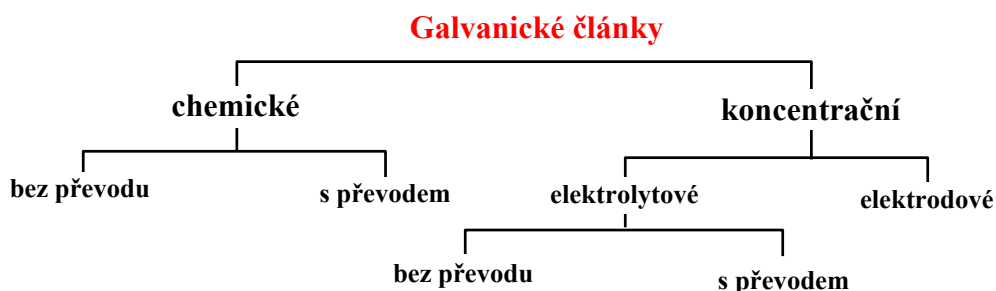
Srovnávací elektrodou je tzv. **vodíková standardní elektroda** (viz dále), jejíž potenciál byl dohodou stanoven jako **nulový (0 V)**.

Spojením dvou poločlánků o různých elektrolytických potenciálech (elektroda kontra elektrolyt v jejím okolí) vznikne galvanický článek.

Pro **elektromotorické napětí (EMN)** článku (složeného ze dvou poločlánků) platí

$$EMN = \Delta V = V^{(+)} - V^{(-)}$$

ROZDĚLENÍ GALVANICKÝCH ČLÁNKŮ



- **bez převodu** - spojení dvou poločlánků se **stejným** elektrolytem,
- **s převodem** - spojení dvou poločlánků s **různými** elektrolyty.

Převod - kapalinové rozhraní, na němž při průchodu el. proudu – při použití článku jako zdroje EMN – dochází postupně k **nevratným** změnám (po vybití je článek nepoužitelný).

JINÉ ROZDĚLENÍ GALVANICKÝCH ČLÁNKŮ

- **Články primární** – vznik EMN pouhým spojením dvou poločlánků. Nevýhoda – jednorázové použití. **Příklad:** salmiakový **LECLANCHEŮV** článek $\{[C^{+}] + \text{chlorid amonný } NH_4Cl - \text{salmiak}] ; [Zn^{-} + \text{chlorid zinečnatý } ZnCl_2]\}$.
- **Články sekundární** – **akumulátory**. Nejdříve nabití – polarizace elektrod (viz dále). **Příklad:** olověný akumulátor, alkalický akumulátor apod.
- **Palivové články** – přímá přeměna energie **chemické** na energii **elektrickou** - oxidace paliva.
- **Standardní články** – např. **WESTONŮV normální článek** $(Cd + Hg + CdSO_4 - \text{nasycený roztok})$, $EMN(20^{\circ}C) = 1,017934 V$. Tímto článkem **nesmí** procházet elektrický proud – slouží pouze pro **kompenzační** měření.

V současné době prudký rozvoj galvanických článků – strategická záležitost kontra lobby naftových společností. I přes četná zlepšení je elektrická energie galvanických článků stále ještě mnohem **dražší**, než při její standardní výrobě (turbogenerátory).

ELEKTRODY

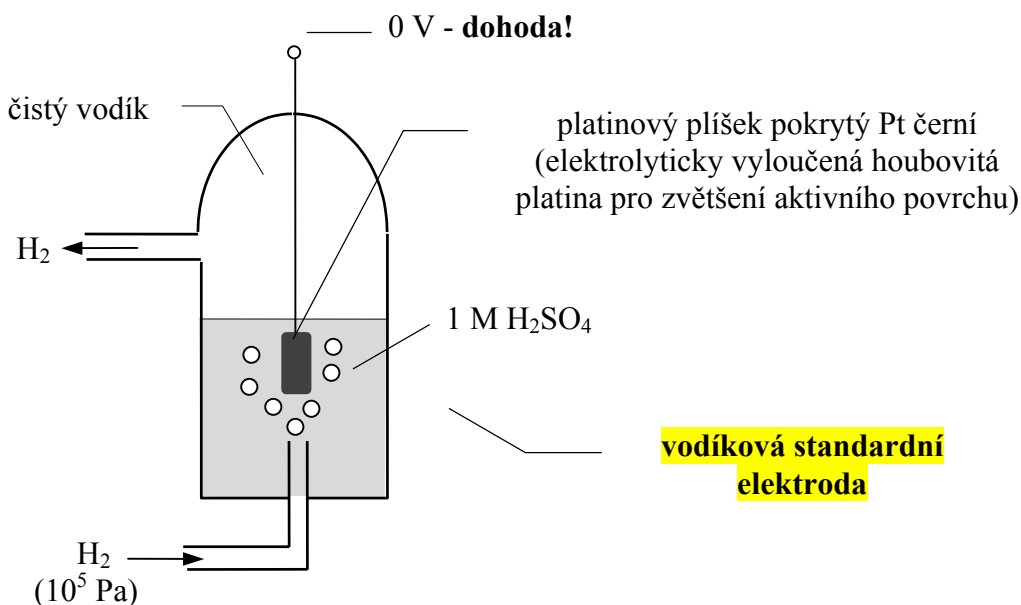
Obecně neomezené množství kombinací **pevná látka + elektrolyt**. Praktický význam pro **elektrochemické analytické metody** však mají pouze některé z nich.

A. ELEKTRODY 1.DRUHU

- **Kovové** – kov ponořený do roztoku **svých iontů** – např. $\text{Ag}|\text{AgNO}_3$
- **Plynové** – např.

VODÍKOVÁ STANDARDNÍ ELEKTRODA

Platinový plíšek, pokrytý elektrolyticky vyloučenou houbovitou platinou, sycený plynným vodíkem a ponořený do roztoku obsahujícího vodíkové ionty. **Potenciál této elektrody byl dohodou stanoven jako nulový.**



- **Oxidačně-redukční** – inertní **kov** + roztok (elektrolyt) obsahující ionty ve **dvou různých oxidačních stavech** – např. $\text{Pt} + \text{Fe}^{2+}|\text{Fe}^{3+}$.

B. ELEKTRODY 2.DRUHU

Kov a jeho nerozpustná **sůl** + roztok obsahující **stejně anionty**. Např.

ARGENTOCHLORIDOVÁ ELEKTRODA

Stříbrný plíšek elektrolyticky pokrytý **AgCl** ponořený do kyseliny chlorovodíkové, nebo do roztoku rozpustného chloridu: $\text{Ag} + \text{Ag}^+\text{Cl}^-|\text{Cl}^-$

Kov a (jeho) nerozpustný **oxid** + roztok obsahující **anionty**. Příklad

ANTIMONOVÁ ELEKTRODA $\text{Sb} + \text{Sb}_2\text{O}_3 \mid \text{OH}^-$

Elektrody **2. druhu** se používají nejčastěji jako elektrody **referenční** (srovnávací).

C. MEMBRÁNOVÉ ELEKTRODY

Využívají tzv. **membránového potenciálu**, vznikajícího na površích membrán, oddělujících dva (různé) elektrolyty (důležité např. u buněčných membrán). Příklad

MEMBRÁNOVÁ SKLENĚNÁ ELEKTRODA

Tenkostěnná baňka ze speciálního skla („membrána“) naplněná roztokem konstantního složení (např. HCl), používaná pro měření pH . Pro vyjádření membránového potenciálu je přijímána představa o výměně vodíkových iontů z roztoku, do kterého je elektroda ponořena, za sodné ionty z povrchu skla. Tato výměna



probíhá ve vrstvičce křemičitého gelu, který se **předem** vytvoří na povrchu elektrody jejím **máčením** ve vodě. Povrch skleněné elektrody působí tedy jako **iontoměnič**.

Potenciál elektrody závisí jak na aktivitě vodíkových, tak i sodných kationtů (obecně alkalických iontů přítomných v roztoku) $\Rightarrow$ **alkalická** (pozitivní) chyba. V silně kyselém prostředí se naopak uplatňuje tzv. **kyselá** (negativní) chyba $\Rightarrow$ nutnost korekcí těchto chyb.

Nevyjasněná zatím zůstává otázka tzv. **asymetrického** potenciálu, který má skleněná elektroda i v případě, kdy na obou stranách skleněné membrány jsou roztoky naprosto stejného složení. U běžných skleněných elektrod dosahuje asymetrický potenciál hodnot řádu jednotek **mV**. Asymetrický potenciál je jev krajně nežádoucí a lze jej zmenšit dlouhodobým máčením ve vodě nebo slabě alkalickém pufru.

Pozor! Skleněná elektroda musí být i v době kdy je „mimo službu“ uchovávána ve vodném prostředí.

D. IONTOVĚ SELEKTIVNÍ ELEKTRODY - ISE

Selektivně (výběrově) citlivé na **ionty určitého druhu** $\Rightarrow$ **použití** pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Kromě selektivity je charakteristikou ISE tzv. **detekční limit** vyjadřující minimální měřitelnou koncentraci daných iontů v elektrolytu. Dobré elektrody mají tento limit řádově roven 10^{-5} M , špičkové pak až 10^{-8} M .

SKLENĚNÉ ELEKTRODY

Při vhodném složení skla membrány jsou tyto elektrody citlivé na **jednomocné kationty** - $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ag}^+, \text{Li}^+, \text{NH}_4^+$ apod. Selektivita skleněných elektrod se vysvětluje tím, že v hydratovaném skle jsou přítomna anionická místa se záporným nábojem, která přitahují kationty s příslušným poměrem **náboj / velikost kationtu**.

KRYSTALOVÉ ELEKTRODY

Syntetický **monokrystal** je upevněn tak, že je z jedné strany omýván zkoumaným roztokem, z druhé strany je převrstven referenčním roztokem, do něhož zasahuje obvykle **argentochloridová** elektroda. **Použití** – detekce a kvantitativní analýza fluoridových, bromidových, chloridových, jodidových iontů.

Použití ISE: stanovení všech známějších kationtů a některých aniontů. Např. sledování **fluorizace** vody, detekce a analýza siřičkových a kyanidových iontů a iontů těžkých kovů ve vodě a **odpadech**, stanovení draselných a sodných iontů v **lékařství**, detekce amonných iontů a jiných elektroaktivních komponent, vznikajících při **enzymatických reakcích** $\Rightarrow$ **enzymové ISE**, detekce aminokyselin, glukózy, močoviny, cholesterolu vázaného i volného apod.

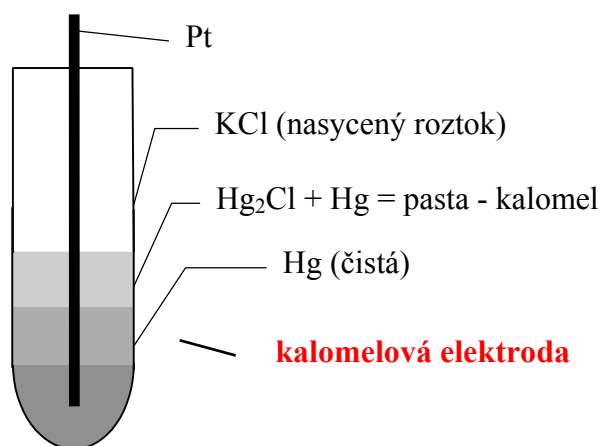
Pozor! Existuje poměrně snadná možnost **nevratné změny („otravy“) ISE ionty určitého druhu. Nutnost zacházení a použití daného návodem, neboť cena dobré ISE je značná.**

E. INDIKAČNÍ ELEKTRODY

Ve spojení s některou **referenční** elektrodou (obvykle druhu **B** – např. **argentschloridovou**) slouží ke kvalitativní i **velmi přesné** kvantitativní **analýze**. Důležité příklady

KALOMELOVÁ ELEKTRODA

Tato elektroda je tvořena **rtuť** pokrytou **kalomelem** (chloridem rtuťným) a převrstvenou roztokem chloridu draselného.



MERKURO-SULFÁTOVÁ ELEKTRODA – $\text{Hg} | \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$

Princip měření indikačními elektrodami: Vhodná **indikační** + vhodná **referenční** elektroda se ponoří do zkoumaného roztoku a měří se **potenciálový rozdíl** mezi těmito elektrodami, který závisí na složení roztoku – směsi rozpuštěných látek a jejich koncentraci. Metodika – **potenciometrie**.

POLARIZACE ELEKTROD

Poločlánek – elektroda v elektrolytu – elektrolytický potenciál $\bar{V}$ (+ nebo –). Dva poločlánky – **článek**. Za bezproudového stavu – stacionárního dynamicky rovnovážného stavu na elektrodách platí: $\text{EMN} = \Delta V = V^{(+)} - V^{(-)} = V_r^{(+)} - V_r^{(-)}$.

Tento stav se **změní**, jakmile článkem začne procházet elektrický proud (probíhá elektrolyza) – po připojení **vnějšího napětí**, nebo (vnějším) **spojením** elektrod článku. Na

povrchu elektrod a v jejich blízkém okolí začne při průchodu elektrického proudu probíhat tzv. **elektrodová reakce**, sestávající z následujících dějů:

1. **difúze** výchozích elektroaktivních látek k elektrodě,
2. reakce v difúzní elektrodové **dvojvrstvě**, těsně přiléhající k elektrodě,
3. **adsorpce** výchozích látek na elektrodě,
4. výměna **elektronů** mezi adsorbovanými molekulami či ionty a elektrodou,
5. **desorpce** produktů této výměny z elektrody,
6. reakce v difúzní elektrodové **dvojvrstvě**,
7. **difúze** produktů směrem od elektrody.

Při těchto procesech je možná a velice častá **chemická** nebo **koncentrační** změna elektrody, které říkáme **polarizace**. Polarizací mění elektroda svůj elektrolytický potenciál z **bezproudivé** hodnoty V_r na hodnotu V (elektroda se „brání“ průchodu el. proudu vytváří **sekundární** poločlánek, jehož polarita je namířena proti směru elektrolytického proudu).

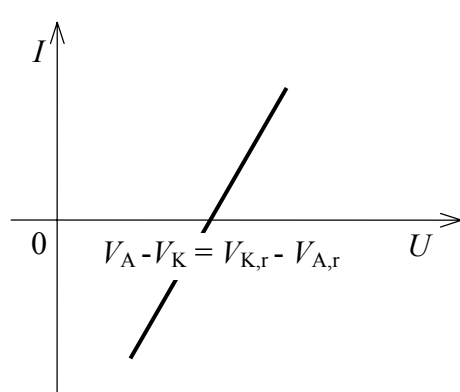
Elektrody, které se při průchodu proudu polarizují – **polarizovatelné elektrody** ($V_r \neq V$).
Opakem (spíše vyjimečným) jsou elektrody **nepolarizovatelné** ($V_r = V$). Příkladem nepolarizovatelné elektrody je **stříbrná** elektroda v roztoku svých iontů.

POLARIZOVATELNÉ ELEKTRODY

Připojíme-li k článku zdroj stejnosměrného elektrického napětí tak, že napětí tohoto zdroje je svojí polaritou namířeno **proti** EMN článku, bude článkem procházet elektrický proud v jednom nebo druhém směru podle toho, zda napětí vnějšího zdroje U je **větší** nebo **menší** než rozdíl potenciálů elektrod.

Označme V_A potenciál **anody** – **kladné** elektrody článku – a V_K potenciál jeho **záporné** elektrody (**katody**).

Označíme-li úhrn všech odporů v obvodu (z nichž největší bývá odpor **elektrolytu** v článku) jako R_i , lze proud procházející článkem vyjádřit podle **OHMOVA** zákona vztahem



$$I = \frac{U - (V_A - V_K)}{R_i}.$$

Je-li $U > V_A - V_K$, je proud procházející článkem **kladný**, je-li naopak $U < V_A - V_K$, má procházející proud hodnoty **záporné**.

Při průchodu proudu článkem se potenciál jeho elektrod **nemění** pouze tehdy, je-li článek tvořen elektrodami **nepolarizovatelnými**.

Označíme-li hodnoty potenciálů elektrod článku, kterým **neprochází** elektrický proud, jako $V_{A,r}$, $V_{K,r}$, můžeme vyjádřit závislost proudu na vnějším napětí pro danou dvojici **nepolarizovatelných** elektrod vztahem

$$I = \frac{U - (V_A - V_K)}{R_i} = \frac{U - (V_{A,r} - V_{K,r})}{R_i}.$$

Příkladem takového článku jsou dvě **stříbrné** elektrody ponořené do roztoků **stříbrných** iontů.

Průchod proudu přes rozhraní **elektroda – roztok** je téměř **vždy** spojen s chemickou přeměnou (oxidací či redukcí) částic přítomných v roztoku nebo v materiálu elektrody. Proto jsou **nepolarizovatelné** elektrody případem spíše **vyjímecím**.

Daleko rozšířenějším případem jsou elektrody, u nichž při průchodu proudu dochází ke **koncentračním** a **chemickým** změnám a jejichž potenciál se proto průchodem proudu **mění** ($V_r \rightarrow V$). Takové elektrody označujeme jako **polarizovatelné** a změny, které na nich při průchodu proudu nastávají, nazýváme souhrně **polarizace**.

Připomeňme, že při **bezprúdovém** stavu závisí potenciál elektrody V_r pouze na **typu** poločlánku (elektroda + elektrolyt).

Probíhá-li na elektrodě při průchodu proudu pouze **jediná elektrodová reakce**, je mírou její **polarizace** tzv. **přepětí**.

Přepětí η elektrody následkem její polarizace je $\eta = V - V_r$ (přitom bereme v úvahu i znaménka obou potenciálů).

Připomeňme, že V je **proudový** potenciál elektrody a V_r její **bezprúdový** potenciál, který závisí pouze na typu poločlánku (elektroda + elektrolyt).

Příčina a mechanismus polarizace – zpoždění některého (nebo některých) z dějů **1 - 7** proti ostatním. Zpravidla to bývá děj **4** – důsledkem je tzv. **přenosové přepětí**. Při zpoždění dějů **1** nebo **7** (nebo obou) vzniká tzv. **difúzní přepětí**.

Hodnota přepětí (včetně jeho znaménka) a samozřejmě také hodnota potenciálu V závisí na velikosti a směru procházejícího proudu: $\eta = \eta(V)$; $\eta = \eta(I)$.

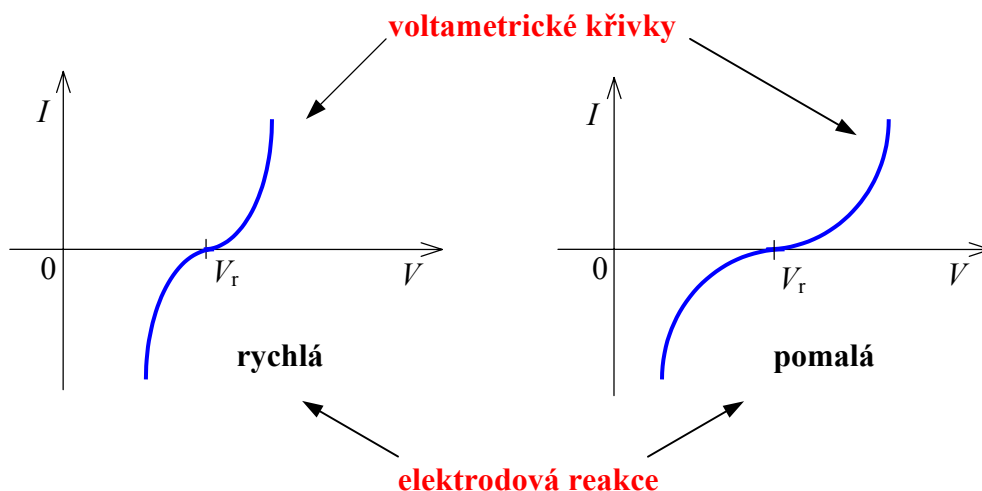
Hodnotu i směr proudu můžeme ovlivnit hodnotou a polaritou **vnějšího** napětí U , vloženého na elektrody. Z historických důvodů pracujeme s **inverzními** závislostmi

$I = I(\eta)$, $I = I(V)$, $I = I(U)$; U – vnější napětí, V – proudový potenciál elektrody.

Grafickým znázorněním těchto závislostí jsou u **polarizovatelných** elektrod tzv. **polarizační** neboli **voltametrické** křivky.

Polarizace elektrod je velmi složitý proces, ovlivňující průchod proudu elektrolytem a celkový elektrický odpor článku. Teorie tohoto procesu je obtížná, analytické vyjádření voltametrických křivek je složité a dosti nepřesné, přesto v zásadě možné (**IL'KOVIČ**, **HEYROVSKÝ**).

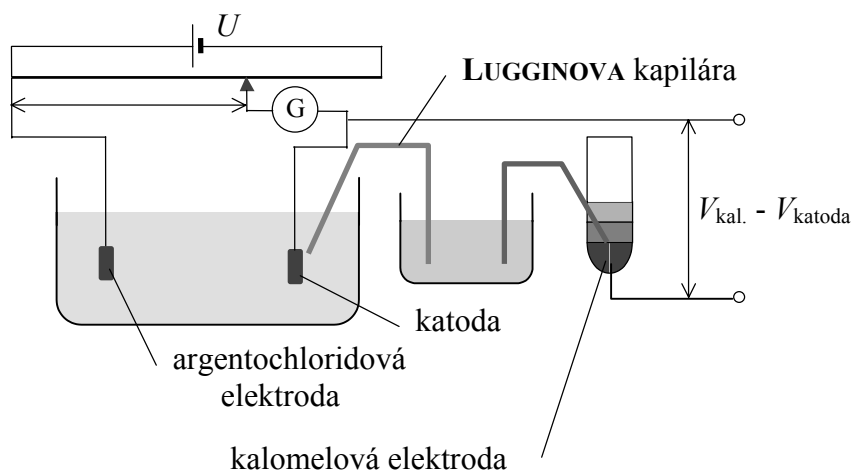
Měření voltametrických křivek polarizovatelných elektrod v různých elektrolytech a následná analýza složení těchto elektrolytů – **VOLTAMETRIE**.



MĚŘENÍ POLARIZAČNÍ KŘIVKY

Měřená elektroda (na obr. **katoda** článku) se zkombinuje s vhodnou **nepolarizovatelnou** elektrodou (např. argentochloridovou) a na takto vzniklý článek se vloží **vnější proměnné stejnosměrné napětí**.

Aby se co nejvíce omezil vliv odporu elektrolytu, měří se potenciál V_r třetí referenční elektrodou, kterou bývá nejčastěji nasycená kalomelová elektroda.



Polarizace elektrod je velmi složitý proces, ovlivňující průchod proudu elektrolytem a celkový elektrický odpor článku.

ROZDĚLENÍ ELEKTROCHEMICKÝCH METOD

(dosud nejednotné)

1. **Metody založené na elektrických vlastnostech roztoků**, t.j. na přenosu elektrického náboje a na dielektrické polarizaci –

KONDUKTOMETRIE, DIELEKTRIMETRIE, OSCILOMETRIE.

2. **Metody založené na elektrodové reakci**

- A. Reakce přenosu náboje mezi elektrodou a elektrolytem při nulovém elektrolytickém proudu – **rovnovážné metody** –

KLASICKÁ POTENCIOMETRIE (např. měření **pH** nebo **potenciometrická titrace**).

B. Reakce přenosu náboje mezi elektrodou a elektrolytem při konečném elektrolytickém proudu – **proudové metody**.

- Transport látky k povrchu elektrody se děje **konvekcí** a **difúzí** – **VOLTAMETRIE**.
- Transport látky se děje pouze **difúzí** – **KLASICKÁ POLAROGRAFIE**, **ELEKTROGRAVIMETRIE**, **COULOMETRIE**.

POLAROGRAFIE

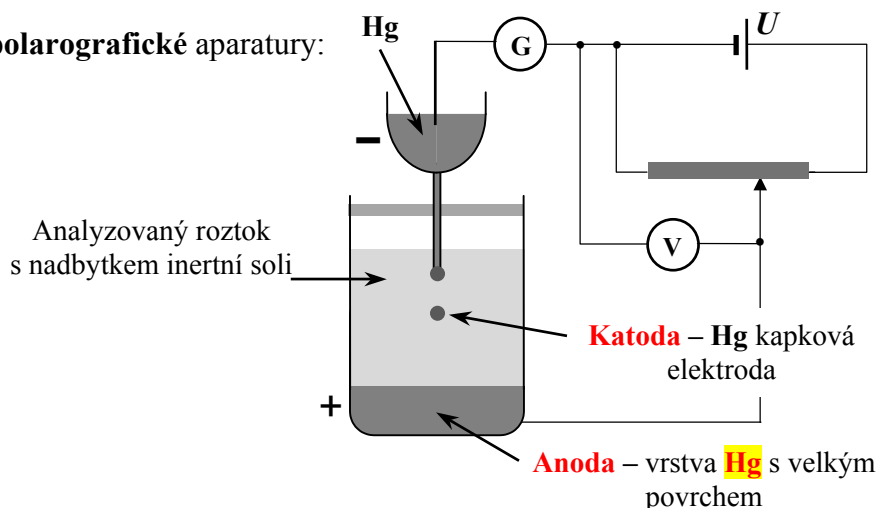
Měření **polarizace** elektrody, jejíž povrch se **neustále obnovuje** (ztrácí polarizaci).

Princip: potenciály (V_r) **těže** elektrody v **různých** elektrolytech (směsích různých iontů) jsou různé $\Rightarrow$ možnost kvalitativní i kvantitativní analýzy těchto směsí.

Technické provedení: článek: **anoda** – **nepolarizovatelná** elektroda, **katoda** – **polarizovatelná** elektroda s neustále **obnovovaným** povrchem – neustále odstraňovanou polarizací).

Katoda požadovaných vlastností (hlavní „trik“) – **rtuťová kapková elektroda** – princip **1922**, první praktické provedení **1924** - **JAROSLAV HEYROVSKÝ**. Po řadě dalších zlepšení přinesla svému autorovi **Nobelovu cenu** za chemii v r. **1959**.

Schéma **polarografické** aparatury:



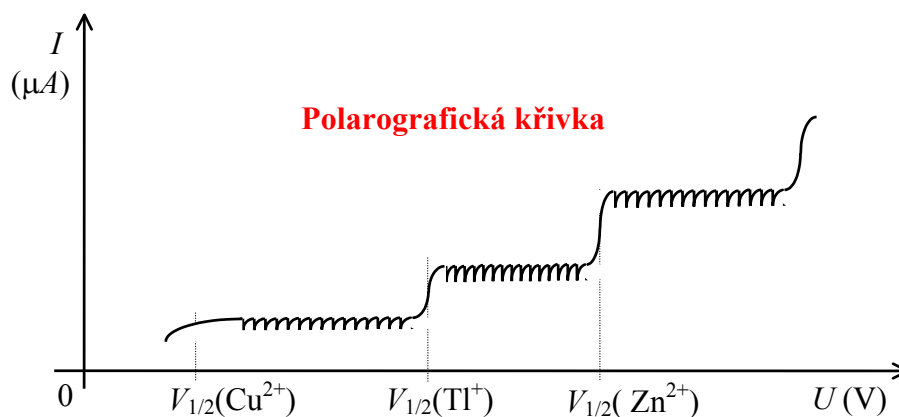
Anodu článku tvoří vrstva rtuti s velkým povrchem; proto je tato elektroda prakticky **nepolarizovatelná**. **Katodou** je **kapička rtuti** padající z kapiláry o vnitřním průměru **0,05 - 0,07 mm**. Kapička padá analyzovaným roztokem asi **2 – 4 s**. Během pádu se její povrch polarizuje. Při dopadu na povrch anody se z kapiláry uvolňuje další kapka s nepolarizovaným povrchem a celý děj se opakuje.

Rtuťová kapková elektroda má proti jiným elektrodám výhodu naprosto čistého povrchu, neboť se neustále obnovuje. Další výhodou je jednoduchá konstrukce a spolehlivost. Povrch kapek je tak malý, že množství látky, které se na elektrodě přeměňuje, je nepatrné – **koncentrace** analyzovaného roztoku se při měření prakticky **nemění**.

Metodika: Do analyzovaného roztoku přidáme potřebné množství **indiferentní** látky (roztoky solí, kyselin, louhů alkalických kovů, organických rozpouštědel, pufrů apod.) pro **zvýšení vodivosti**.

Vložené vnější napětí U se projeví jako **vnucený záporný potenciál** katody (kapky), neboť konstantní potenciál **nepolarizovatelné** anody můžeme položit rovný **nule** $\Rightarrow V_k = -U$.

Elektrolytický proud roste s napětím (potenciálem katody) **nelineárně** – ve **vlnách** („skocích“), způsobených **selektivním** zapojením **různých kationtů** z analyzovaného vzorku do přenosu elektrického náboje.



Tzv. **půlvalnové potenciály** ($V_{1/2}$) – hodnoty V_k , při nichž k tomuto skokovému zvýšení proudu dochází a které závisí pouze **na druhu daných iontů** v elektrolytu.

Půlvalnové potenciály **organických** látek, jejichž redukce se účastní vodíkové ionty, závisí dále na **pH** roztoku. Proto se k údajům ($V_{1/2}$) musí vždy připojit **pH** pufru, v němž bylo měření (polarografování) prováděno.

Určení a přiřazení půlvalnových potenciálů - **kvalitativní analýza**.

Kvantita – koncentraci jednotlivých stanovených látek určíme z velikosti elektrolytického proudu, která závisí na

- velikosti povrchu kapky – povrch roste v ústí kapiláry až do odkápnutí - proto proud v jednotlivých částech polarografické křivky osciluje mezi minimální a maximální hodnotou,
- hodnotě vnějšího napětí,
- na počtu (koncentraci) iontů a jimi přenášeného el. náboje pocházejících:
 - a) z inertního elektrolytu (pozadí),
 - b) z látek rozpuštěných v roztoku a zapojujících se do přenosu selektivně v závislosti na hodnotě vnějšího napětí.

Příprava přesně pracující polarografické aparatury je velmi pracná – nutnost **kalibrace** pro všechny očekávané látky pomocí jejich roztoků známé koncentrace. Přesto však schůdné a **polarografická analýza** patří mezi velmi rozšířené analytické metody a je neustále zdokonalována.

Použití polarografie:

1. Analytické stanovení látek.
2. Měření různých fyzikálně-chemických veličin.
3. Konstituce organických látek.

ad 1 - zejména těžké kovy, z organických látek aminokyseliny, bílkoviny, alkaloidy, barbituráty apod.

ad 2 - např. měření **rychlostních konstant** velmi rychlých chemických reakcí.

ad 3 - ad 2 + teorie = konstituce.

MODERNÍ POLAROGRAFICKÉ METODY

Derivační polarografie – rozlišení iontů, jejichž půlvlnové potenciály jsou velmi blízké.

- **Diferenční polarografie** – použití dvou kapkových elektrod ve dvou různých elektrolytech.
- **Tastpolarografie** – studium dějů na konci života kapky při její největší polarizaci.
- **Impulsová polarografie** – vnější vkládané napětí má pilovitý průběh.
- **Oscilografická polarografie** – polarografie se střídavým vkládaným napětím.

Dnešní metodika: drahé komerční přístroje - **polarografy**. Jejich **zásadní** součástí je však stále modifikovaná **Heyrovského** polarografická nádoba s kapkovou elektrodou.

VYBRANÉ OPTICKÉ METODY

ZÁKLADNÍ POJMY A ZÁKONY PAPRSKOVÉ A VLNOVÉ OPTIKY. REFRAKTOMETRIE, POLARIMETRIE.

Světlo je (příčné) **elektromagnetické vlnění**. Viditelná oblast v intervalu vlnových délek: $350\text{ nm} - 750\text{ nm}$. Rychlost světla ve vakuu $c = 2,9979 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ - univerzální přírodní konstanta. V látkovém prostředí se světlo šíří pomaleji – rychlostí $v < c$. Poměrem $c/v = n_0$ je definován **absolutní index lomu** daného prostředí. Pro **vákuum** je $n_0 = 1$, pro **vzduch** (20°C , b_n) je $n_0 = 1,00028 \Rightarrow \text{vzduch} \approx \text{vákuum}$.

Index lomu závisí na **teplotě** látky a také na **frekvenci** (barvě) světla – **disperze**. Porovnáváme-li dvě prostředí podle rychlosti, s níž se v nich šíří světlo, je prostředím **opticky hustším** to prostředí, v němž se světlo šíří **pomaleji**. Opticky **hustší** prostředí má tedy **větší** index lomu než prostředí opticky **řidší**.

VELIČINY CHARAKTERIZUJÍCÍ MONOCHROMATICKÉ (JEDNOBAREVNÉ) SVĚTLO

Frekvence (kmitočet) f (ν – "ný"), **vlnová délka** λ , **perioda** T ; $T = \lambda/c = \lambda'/\nu$; **frekvence** (barva) světla **nezávisí** na prostředí, kterým se světlo šíří.

Bílé – např. sluneční světlo – je **složené** – **polychromatické** (vícebarevné). Vlnově – částicový **dualismus** světla – někdy vlnění, jindy částice – **foton**. Dále již **nedělitelné kvantum** energie fotonu monochromatického (ν) světla je $\varepsilon = h \nu$; $h = 6,625 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ je **PLANCKOVA** konstanta.

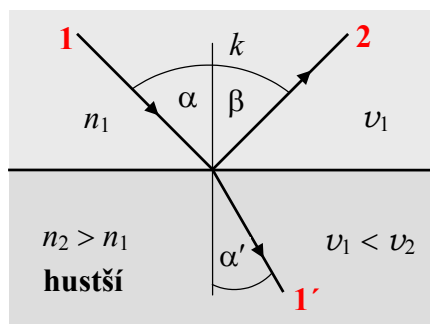
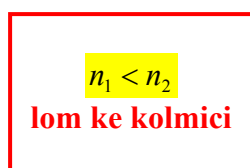
ODRAZ A LOM SVĚTLA

Při dopadu světla na **rozhraní** dvou prostředí, lišících se indexem lomu, se jeho část od rozhraní **odráží** zpět do prvního prostředí, zbývající část světelné energie obecně projde rozhraním a šíří se druhým prostředím. Vzhledem k různým rychlostem šíření světla v obou prostředích dochází při průchodu jejich rozhraním k **lomu (refrakci)** světelných paprsků.

Zákon odrazu: $\alpha_1 = \beta \Rightarrow$ **úhel odrazu je roven úhlu dopadu, paprsek odražený (2) leží v rovině dopadu (1,k).**

Zákon lomu:
$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{c/v_2}{c/v_1} = \frac{n_2}{n_1}.$$

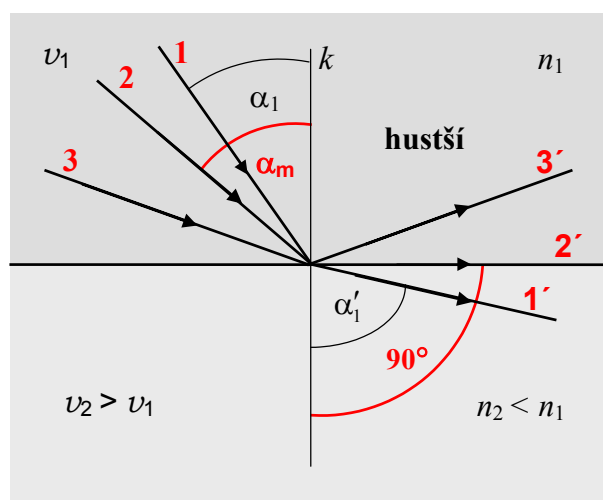
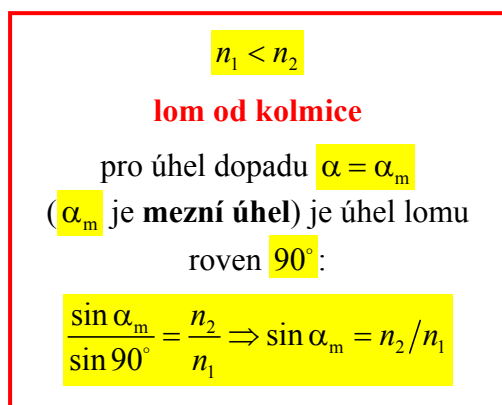
1. Směr řidší → hustší


$$n_1 = c/v_1$$

hustší prostředí

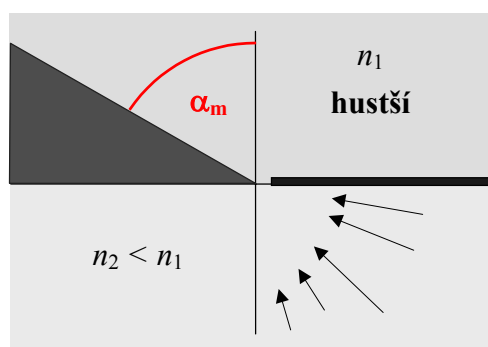
$$n_2 = c/v_2$$

2. Směr hustší → řidší



Je-li úhel dopadu **větší** než **mezní** úhel, nastává na rozhraní tzv. **úplný** neboli **totální odraz** do prvního prostředí – rozhraním v tomto případě **neprojde** do druhého prostředí ani sebemenší část vlněním přenášené **energie**.

Do prostoru ohraničeného **rozhraním**
a ramenem **mezního** úhlu nepronikne
žádný paprsek z řidšího prostředí –
tento prostor je **tmavý**

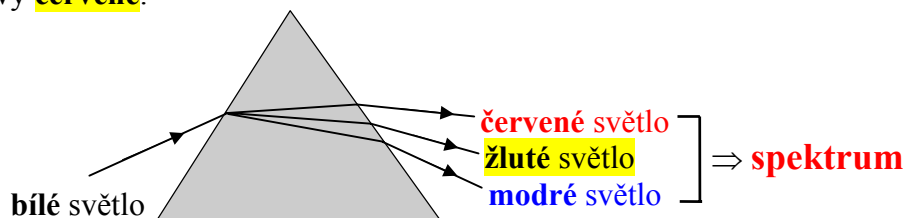


ROZKLAD (DISPERZE) POLYCHROMATICKÉHO SVĚTLA

Ve **vakuu** se světlo všech barev – všech (viditelných) frekvencí šíří **stejnou rychlostí**. V látkovém prostředí je však rychlost šíření (klesající) funkcí frekvence (barvy), tj. **rostoucí** funkcí vlnové délky. Nejpomaleji se tedy šíří světlo **fialové**, nejrychleji světlo **červené**.

Index lomu látkového prostředí je (rostoucí) funkcí frekvence ν vlnění, které se jím šíří. Tomuto jevu $[n = n(\nu)]$ říkáme disperze.

Při přechodu **polychromatického** světla (např. slunečního) ze vzduchu ($\hat{=}$ vakuum) do kapaliny nebo pevné látky (např. skla) se tedy **nejvíce** láme světlo barvy **fialové**, **nejméně** světlo barvy **červené**.



Indexy lomu různých látek se vzhledem k disperzi vztahují k různým vlnovým délkám monochromatických světél – podle tzv. **FRAUNHOEROVÝCH** čar ve spojitém slunečním spektru – např. n_A, n_C, n_D apod., kde

A: 759,4 nm (**červená** – **kyslík**), C: 56,3 nm (**červená** – **vodík**),

D: 589,3 nm (**žlutá** – **sodík**), F: 486,1 nm (**modrá** – **vodík**).

V daném (látkovém) prostředí se pro světla těchto vlnových délek (barev) změří index lomu a vypočtou srovnávací veličiny

střední disperze $n_F - n_C$; **relativní disperze** $\frac{n_F - n_C}{n_D - 1}$.

Prevrácená hodnota relativní disperze dané látky – **ABBEOVO číslo**. Všechny tyto veličiny jsou důležitými charakteristikami **optických skel**.

Obecně je disperze v zobrazovacích soustavách **nežádoucí** (způsobuje **barevnou** neboli **chromatickou** vadu zobrazení) a musí se korigovat.

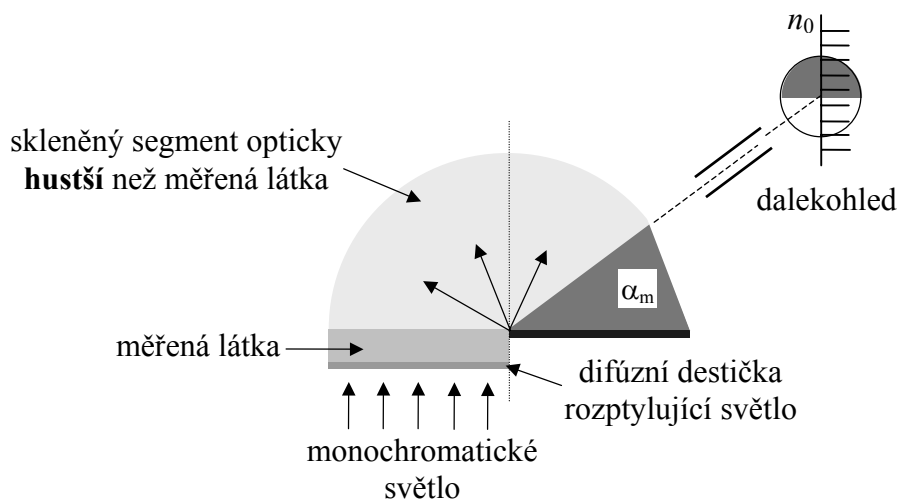
REFRAKTOMETRIE

Měření indexu lomu látky z hodnoty **mezního** úhlu (určeného z polohy rozhraní mezi tmavým a světlým sektorem) a následné určení **látky** pomocí tabulkových hodnot této veličiny. Přístroje – **refraktometry**

Princip: disperzní soustava (výměnné zpravidla skleněné segmenty s různými indexy lomu pro dosažení přechodu „**řidší** → **hustší**“ vzhledem k měřené látce) a otáčivý dalekohled se stupnicí indexu lomu nebo speciální stupnicí – udávající např. **koncentraci** látky v roztoku nebo v plynné směsi.

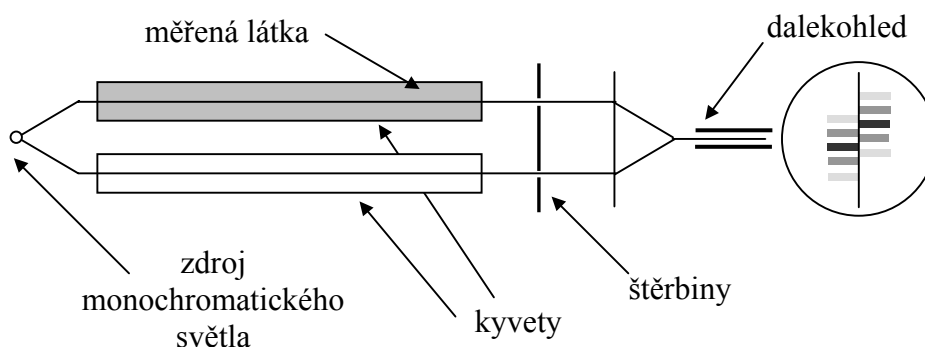
Při měření v polních podmínkách používáme obvykle bílé polychromatické světlo – rozhraní mezi **tmavým** a **světlým** sektorem v zorném poli dalekohledu je vlivem disperze **neostré** (barevné) – nutnost korekce **barevné** vady **AMICIHO** hranoly (opětné složení jednotlivých monochromatických světél).

Refraktometry mají různou konstrukci poplatnou požadavkům přesnosti i podmínkám měření. Přesnost běžných refraktometrů je $\approx 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-5}$. Větší přesnost mají tzv. diferenční refraktometry.



K měření velmi malých rozdílů indexů lomu používáme velmi přesné **interferenční refraktometry**, pracující s přesností $\approx 10^{-6}$.

Princip **interferenčního** refraktometru (RAYLEIGH)



Dva paprsky z téhož zdroje monochromatického světla procházejí dvěma dlouhými rovnoběžnými kyvetami (řádově metry v případě **plynů**). V jedné kyvet je čisté rozpouštědlo (plyn), ve druhé je měřený roztok (plynná směs). V důsledku různých (byť nepatrně se lišících) rychlostí světla v kyvetách, jsou interferenční proužky, vznikající ohybem na šterbinách u obou paprsků posunuty úměrně rozdílu indexů lomu obsahu obou kyvet. Z tohoto posunutí lze tento (i nepatrný) rozdíl – tzv. **inkrement indexu lomu** – určit a stanovit tak např. **koncentraci** měřeného roztoku nebo určitého (očekávaného) plynu v plynné směsi. Při měření je neobvykle důležitá přesná **teplota** – roli zde hraje i diference teplot řádu $1 \cdot 10^{-2} \text{ } ^\circ\text{C}$.

Použití refraktometrie:

- identifikace látky podle indexu lomu,
- stanovení stupně znečištění látky,
- ověřování teoretických představ o konstituci látek.

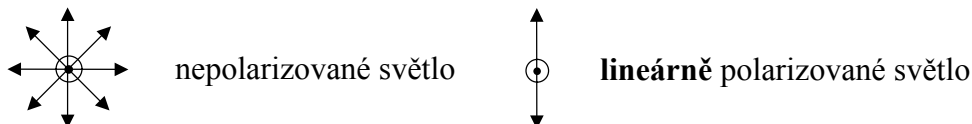
Z indexu lomu a chemického složení látky se určí tzv. **molární refrakce**

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \frac{M}{\rho}$$

a porovná se **součtem** tzv. **atomových** refrakcí atomů prvků, tvořících molekulu dané látky. Příspěvek daného prvku k molární refrakci závisí totiž nejen na jeho atomové refrakci, ale i na způsobu jeho **vazby** v molekule.

POLARIZACE SVĚTLA

Zdroj světla (plamen, žárovka, výbojka, Slunce, apod.) vysílá **nepolarizované** světlo – kmitosměr příčně kmitajícího elektrického (i magnetického) vektoru se **náhodně** otáčí kolem směru šíření světla (paprsku).



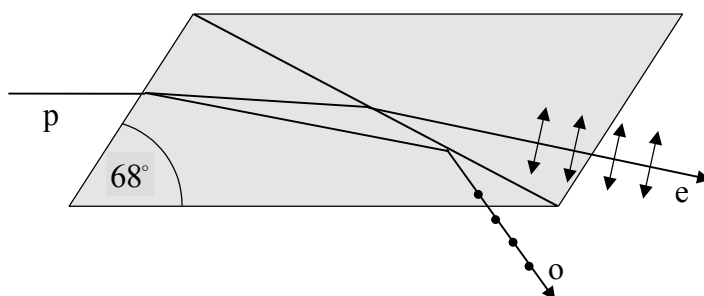
Existuje možnost (odraz, lom, dvojlom, rozptyl apod.) omezení kmitání vektoru pouze na **jedinou** rovinu, které říkáme rovina **polarizační**. Prochází-li toto tzv. **lineárně** polarizované světlo roztokem **opticky aktivní** látky (např. roztokem sacharózy), stáčí se jeho polarizační rovina v závislosti na koncentraci **c** opticky aktivní látky a na délce optické dráhy – délce **l** kyvety s roztokem opticky aktivní látky o úhel $\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t l c$, kde $[\alpha]_{\lambda}^t$ je tzv. **specifická** (měrná) **otáčivost** látky (tabulky). $[\alpha]_{\lambda}^t$ je funkcí **vlnové délky** λ světla (proto obvykle určeno pro **D**), mírně klesající funkcí **teploty** a závisí také (dosti výrazně) na použitém **rozpouštědle**.

Opticky aktivní látky jsou **pravo** a **levotočivé** – $[\alpha]_{\lambda}^t$ má buď znaménko **plus** nebo **mínus**. Optická aktivita je způsobena zvláštnostmi **mikrostruktury** látky – stavbou (strukturou, konstitucí) její molekuly. Nejčastější případ – přítomnost tzv. asymetrického uhlíku v molekulách organických látek. U látek anorganických je příčinou optické aktivity centrální atom kovu (kobalt, platina apod.).

POLARIMETRIE

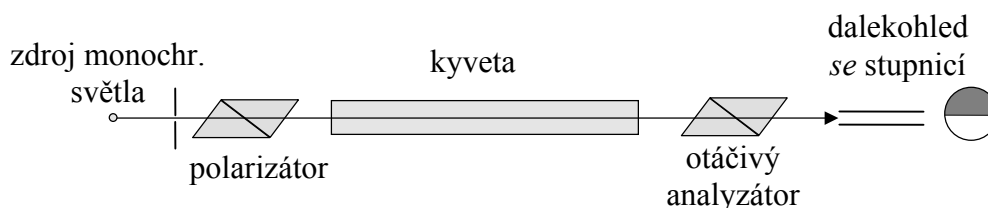
Měření úhlu otočení polarizační roviny (a odtud např. stanovení koncentrace opticky aktivní látky).

Základními částmi **polarimetru** jsou **polarizátor** a **analyzátor** – nejčastěji různé hranoly – např. tzv. **NICOLŮV** hranol (**nikol**). Tento hranol je tvořen dvěma stejnými kosými hranoly z islandského vápence, slepené kanadským balzámem (pryskyřice kanadské balzámové jedle – $n_D = 1,54$). Nepolarizovaný paprsek (**p**), vniknuvší do nikolu, se **dvojlomem** rozdělí na dva paprsky **lineárně** polarizované, jejichž polarizační roviny jsou navzájem **kolmé**. K měření se používá tzv. paprsek **mimořádný** – extraordinarius (**e**), zatímco paprsek **řádny** – ordinarius (**o**) po **úplném** odrazu na rozhraní vápence – balzám hranol **opouští**.



Jiná možnost – **polarizační filtry** – fólie s vrstvičkou jodchininsulfátu nebo turmalínu (herapatitu) – **drahé!**

Princip **polarimetru** (jedna z mnoha modifikací – **BIOT**)

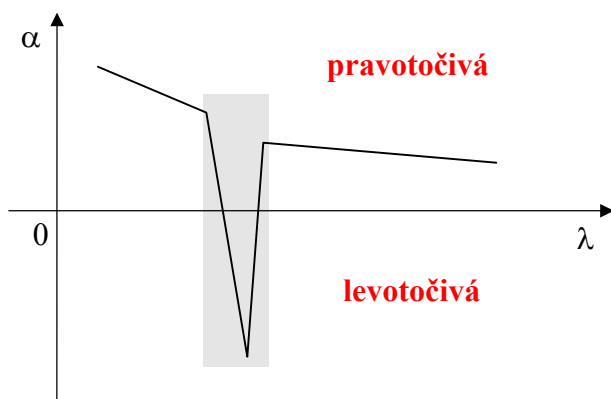


Analyzátor propustí polarimetrem lineárně polarizovaný **mimořádný** paprsek pouze tehdy, je-li jeho polarizační rovina **shodná** s rovinou, v níž by byl tento paprsek polarizován paprsek samotným **analyzátozem**. Pokud by mezi polarizátorem a analyzátozem nebyla kyveta s opticky aktivní látkou, došlo by k průchodu světla při naprosto **stejně** poloze (natočení) polarizátoru i analyzátoru.

Dojde-li při průchodu paprsku kyvetou s opticky aktivní látkou ke **stočení** jeho polarizační roviny o úhel α , musíme **analyzátor** pro dosažení světlého zorného pole v dalekohledu s ním spojeného pootočit o **stejný úhel**. Stupnice otáčení dalekohledu a s ním spojeného analyzátoru může být – při stálé délce kyvety a při předepsané teplotě cejchována přímo v jednotkách **koncentrace** polarimetricky měřené opticky aktivní látky (např. **sacharimetr** v cukrovarech)

Použití polarimetrie: Např. stanovení **bílkovin** nebo **cukru** v moči apod.

SPECIÁLNÍ POLARIMETRICKÉ METODY



světla – **spektropolarimetrie**.

SPEKTROPOLARIMETRIE –

využití tzv. optické **rotační disperze** – závislosti specifické otáčivosti opticky aktivní látky na vlnové délce světla $[\alpha = \alpha(\lambda)]$. V blízkosti vlnové délky, při níž je světlo opticky aktivní látkou **absorbováno**, se mění (skokem) znaménko optické aktivity – **COTTONŮV** jev.

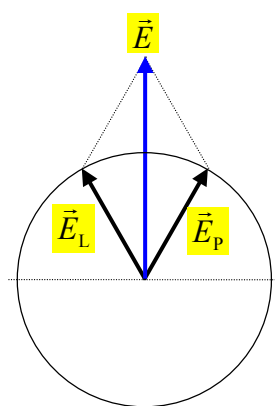
Jde tedy o **polarimetrii** se spojitě se **mění** vlnovou délkou polarizovaného

DICHROGRAFIE – využití tzv. **cirkulačního dichroismu**.

Představa: lineárně polarizované světlo lze (vektorově) složit ze dvou světél **kruhově** polarizovaných, jejichž polarizační roviny (kmitoměry) se **rovnoměrně** otáčí stejnou úhlovou rychlostí v **opačných** směrech: $\vec{E} = \vec{E}_p + \vec{E}_L$.

Při průchodu původně **lineárně** polarizovaného světla $\vec{E} = \vec{E}_p + \vec{E}_L$ látkou mohou nastat tyto možnosti:

1. Složky $\vec{E}_p$ a $\vec{E}_L$ se šíří stejnou rychlostí a jsou látkou **stejně** absorbovány - kmitosměr výslednice $\vec{E}$ se nemění – látka **nejev**í optickou aktivitu.



2. Jedna ze složek $\vec{E}_p$ a $\vec{E}_L$ se látkou šíří **pomaleji** než druhá (absorpce obou složek je opět stejná) – úhlová rychlost jednoho z vektorů $\vec{E}_p$ a $\vec{E}_L$ je různá – kmitosměr výslednice $\vec{E}$ se stáčí – látka je opticky **aktivní**.

3. Jedna ze složek $\vec{E}_p$ a $\vec{E}_L$ je látkou absorbována více než druhá (jeden z vektorů $\vec{E}_p$, $\vec{E}_L$ se „zkracuje“ rychleji než druhý) – koncový bod výslednice $\vec{E}$ opisuje elipsu – světlo je látkou polarizováno elipticky – to je tzv. **cirkulační dichroismus**. Je-li navíc látka opticky aktivní, dochází i ke **stáčení** hlavní osy elipsy, po níž se pohybuje koncový bod vektoru $\vec{E}$.

DICHROGRAFIE: měření (stupně) eliptické polarizace, měření úhlu mezi hlavní osou elipsy a původním kmitosměrem. Přístroje – **dichrografy**.

Použití spektropolarimetrie a dichrografie: řešení problémů spojených s **konstitucí** a **konformací** složitých (organických) molekul – např. steroidy, bílkoviny.

STANOVENÍ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI BIOPOLYMERŮ

KOLIGATIVNÍ VLASTNOSTI BIOPOLYMERŮ, OSMOMETRIE, VISKOZIMETRIE

KOLIGATIVNÍ VLASTNOSTI BIOPOLYMERŮ V ROZTOCÍCH

Biopolymery – látky zajímavé z hlediska reakcí a funkcí v **živých** organizmech, v nichž jsou většinou přítomny ve **vodných** roztocích. Zkoumáme je proto většinou v tomto jejich přirozeném prostředí. Jednou z nejvýznamnějších charakteristik biopolymerů je jejich **molární hmotnost** M .

Hodnoty **relativní molární hmotnosti** M_r biopolymerů, vztažené k **atomové hmotnostní jednotce** (a.h.j), se pohybují ve velmi širokém rozmezí. Spíše než horní hranice tohoto intervalu bývá pro biopolymery udávána hranice **dolní** – udává se pro ni obvykle hodnota $M_{r, \min} = 20\,000$. Tato hranice dělí např. obecně polypeptidy od bílkovin. Jde však o hranici **orientační** – některé velmi důležité bílkoviny (např. inzulin) jsou **pod** touto hranicí.

Většina **přirozených** polymerů (výjimkou je např. celulóza) má naprosto **identické** (makro)molekuly – proto jsou hmotnosti molekul určité bílkoviny stejné. Touto vlastností se přirozené biopolymery liší od polymerů **syntetických** (uměle připravených), jejichž molekuly jsou **různé**. Vzorky biopolymerů, které jsou co do velikosti (a tím i hmotnosti) různé (nehomogenní), jsou charakterizovány **statistickými průměry** $\bar{M}_x$ **molární hmotnosti**, jejichž hodnoty závisí na **metodě** použité při jejich stanovení.

Tak např. měřením tzv. **koligativních vlastností** určíme tzv.

Číselný (četnostní) průměr

$$\text{molární hmotnosti} \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i};$$

n_i je počet molekul **i – té frakce**, jejichž relativní molární hmotnost je M_i .

Měřením **normálního rozptylu světla**, **sedimentačními metodami** nebo **difuzimetrií** získáme tzv.

Hmotnostní průměr

$$\text{molární hmotnosti} \quad \bar{M}_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}.$$

Méně často se používají i statistické **průměry vyšších řádů**

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_i n_i M_i^3}{\sum_i n_i M_i^2}; \quad \bar{M}_{z+1} = \frac{\sum_i n_i M_i^4}{\sum_i n_i M_i^3}.$$

Pro zcela **homogenní** vzorky biopolymerů platí $\bar{M}_n = \bar{M}_w = \bar{M}_z = \bar{M}_{z+1} = \dots$. U vzorků **nehomogenních** je $\bar{M}_n < \bar{M}_w < \bar{M}_z < \bar{M}_{z+1} < \dots$.

Ze statistického průměru můžeme určit **průměrnou hmotnost** $\bar{m}$ molekuly **biopolymeru** jako $\bar{m} = \bar{M}_x / N_A$, $N_A = 6,023\,08 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Většina biopolymerů je dobře rozpustná ve **vodě**. Existují však četné (a nutné) výjimky – např. **stavební bílkoviny** jako **kolagen** (kůže, šlachy, kosti), **keratin** (vlasy, nehty, peří, vlna), **myosin**, **aktin** (svaly).

Molekuly (rozpustných) **biopolymerů** ve vodných roztocích bývají **hydratovány**, případně interagují s přítomnými ionty nebo dalšími složkami roztoku. Proto jejich hmotnost, určená některou z dále uvedených metod, je zpravidla **větší**, než hmotnost **skutečná**. Z těchto důvodů je nutno provádět patřičné **korekce** výsledků příslušných měření.

Ukazuje se, že některé vlastnosti **zředěných** roztoků závisejí spíše na **počtu** přítomných molekul než na jejich **druhu**. **Koligativní vlastnost** je (řečeno poněkud zjednodušeně) vlastnost měnící se v závislosti na **koncentraci** molekul biopolymeru.

Závislost **aktivity** (a) rozpouštědla na **hmotnostní koncentraci** (c) v něm rozpuštěného polymeru lze zapsat pomocí mocninné řady

$$\ln a = -\bar{v} \left(\frac{c}{\bar{M}_n} + A_1 c^2 + A_2 c^3 + \dots \right)$$

$\bar{v} = N_A v / M$ je tzv. **parciální molární objem** rozpouštědla, $A_1, A_2, A_3, \dots$ jsou tzv. **virialní koeficienty**.

Při velmi **malých** koncentracích ($c \rightarrow 0$) můžeme v mocninné řadě **zanedbat** členy vyšších řádů a psát

$$\frac{\ln a}{\bar{v} c} = - \frac{1}{\bar{M}_n}$$

Aktivitu rozpouštědla a všechny veličiny s ní související lze tedy použít k určení **četnostního průměru** M_n molární hmotnosti (v tomto rozpouštědle) rozpuštěného biopolymeru.

Aktivitu rozpouštědla a veličiny s ní související (i **vlastnosti**, které tyto veličiny popisují) nazýváme veličiny **koligativní**. Pro přímé experimentální využití jsou významné především následující (koligativní) vlastnosti:

OSMOTICKÝ TLAK (Π)

Jde o tlak, který by při příslušném silovém působení na daný roztok vyvolal zvýšení aktivity rozpouštědla na hodnotu, příslušející jeho **čistému** stavu. S rostoucí koncentrací roztoku totiž aktivita rozpouštědla **klesá** – stále větší počet molekul rozpouštědla je vázán interakcí s molekulami rozpuštěné látky. Platí (R je univerzální plynová konstanta, T je absolutní teplota)

$$\Pi = - \frac{RT}{\bar{v}} \ln a$$

Experimentální metoda určení molární hmotnosti z měření osmotického tlaku se jmenuje **OSMOMETRIE**.

SNÍŽENÍ TEPLoty TUHNUTÍ

roztoku ve srovnání s **čistým** rozpouštědlem

$$\Delta T_t = - \frac{RT_t^2}{\delta H_t} \ln a; \Delta T_t < 0,$$

kde T_t je (absolutní) teplota tuhnutí čistého rozpouštědla a δH_t je **molární skupenské teplo tání** (tuhnutí) čistého rozpouštědla za daného tlaku. Experimentální metoda – **KRYOSKOPIE**.

ZVÝŠENÍ TEPLoty VARU

roztoku ve srovnání s **čistým** rozpouštědlem

$$\Delta T_v = \frac{RT_v^2}{\delta H_v} \ln a; \Delta T_v > 0,$$

kde T_v je teplota varu čistého rozpouštědla a δH_v je molární skupenské teplo varu za daného tlaku. Experimentální metoda – **EBULIOSKOPIE**.

Ze všech výše uvedených metod je pro určování molární hmotnosti **biopolymerů nejcitlivější**

OSMOMETRIE

Osmóza – **samovolné** pronikání molekul rozpouštědla **do roztoku** polymeru (v témže rozpouštědle) semipermeabilní membránou propouštějící pouze molekuly rozpouštědla.

V roztoku (s přírůstkem molekul rozpouštědla) **roste tlak** až do hodnoty, při níž (za dané koncentrace roztoku) toto samovolné pronikání molekul ustane – osmóza se **zastaví**. Tuto hodnotu tlaku nazýváme **osmotický tlak** (Π) roztoku polymeru při jeho dané koncentraci.

TEORIE

Spojením vztahů $\ln a = -\bar{v} \left(\frac{c}{\bar{M}_n} + A_1 c^2 + A_2 c^3 + \dots \right)$ a $\Pi = -\frac{RT}{\bar{v}} \ln a$ dostaneme

$$\Pi = RT \left(\frac{c}{\bar{M}_n} + A_1 c^2 + A_2 c^3 + \dots \right)$$

$$R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}, [T] = \text{K}, [c] = \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}, [\Pi] = \text{Pa} \Rightarrow [M_n] = \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Připomeňme, že $A_1, A_2, A_3, \dots$ jsou tzv. **virialní** koeficienty.

$$\text{Mírně zředěné roztoky } (c \rightarrow 0) \Rightarrow \Pi \doteq RT \left(\frac{c}{\bar{M}_n} + A_1 c^2 \right), \quad (1)$$

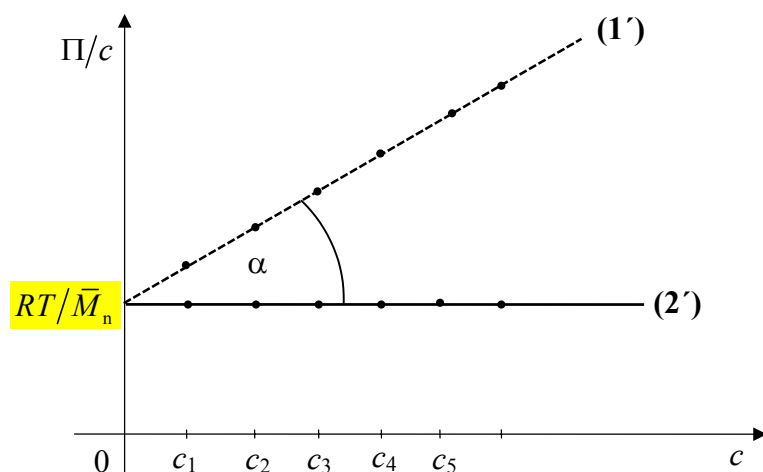
$$\text{Silně zředěné roztoky } (c \approx 0) \Rightarrow \Pi \doteq RT \frac{c}{\bar{M}_n}. \quad (2)$$

Vztahy (1) a (2) jsou vyjádřením **zákona VANT'HOFFOVA**. Jejich úpravou dostaneme

$$\frac{\Pi}{c} = \frac{RT}{\bar{M}_n} + A_1 c \quad (1'), \quad \frac{\Pi}{c} = \frac{RT}{\bar{M}_n} = \text{konst.} \quad (2')$$

Veličinu Π/c nazýváme **redukovaný osmotický tlak**.

Grafické znázornění



Vztah i graf (1') vyjadřují situaci v **reálných** roztocích **biopolymerů**, které mají konečnou koncentraci; $\text{tg } \alpha = A_1$; A_1 je **první viriální** koeficient. Jeho hodnota vyjadřuje **kvalitu** rozpouštědla ve vztahu k rozpouštěné látce. Platí – čím je rozpouštědlo **kvalitnější**, tím je úhel α (a také $\text{tg } \alpha = A_1$) větší – polopřímka (1') je **strmější**.

Z VAN'T HOFFOVY rovnice plyne, že osmotický tlak ve zředěném roztoku je roven tlaku, který by byl vyvolán stejným počtem molekul rozpouštěné látky, pokud by tato látka byla v **plynném** stavu a měla též objem a teplotu jako roztok. To vede k představě, že tlak plynu a osmotický tlak mají stejný původ. Tlak plynu je způsoben nárazy jeho molekul na stěnu nádoby a osmotický tlak je vyvolán nárazy molekul rozpouštěné látky na polopropustnou membránu nebo stěnu nádoby. Že se proti tomuto tlaku membránou samovolně nasávají molekuly čistého rozpouštědla je zdánlivě protismyslné. Vysvětlení toho to jevu je však prosté a zní takto.

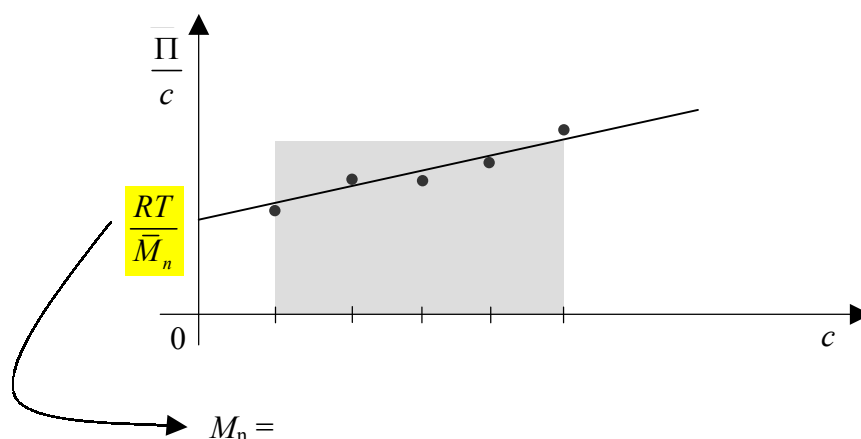
Rozpouštědlo a roztok, oddělené polopropustnou membránou, jsou zpočátku vystaveny stejnému tlaku. Vyvolávají-li nárazy molekul rozpouštěné látky na stěny nádoby stejný tlak jako stejný počet molekul ideálního plynu téhož objemu jako má roztok, pak molekuly rozpouštědla svými nárazy na stěny nádoby vyvolávají **menší** tlak než **čisté** rozpouštědlo a to právě o tlak, vyvolaný molekulami rozpouštěné látky.

Můžeme si to představit také tak, že molekuly **rozpuštěné** látky se při svém tepelném pohybu “vsouvají” mezi molekuly **rozpouštědla** a oddalují je od sebe. Tím se nepatrně zvětší objem rozpouštědla (proti jeho **čistému** stavu), což vzhledem k nepatrné stlačitelnosti kapalin stačí k tomu, aby jeho tlak klesl o značnou hodnotu. Poněvadž je tedy (částečný) tlak rozpouštědla v roztoku **menší** než je tlak v čistém rozpouštědle, nasává se čisté rozpouštědlo membránou do roztoku tak dlouho, až je jeho tlak v obou kapalinách

stejný. Osmotický tlak je tedy skutečně vyvolán **pouze** přítomností **molekul rozpuštěné látky** a z výkladu je zřejmé, že **roste** s jejich **koncentrací** – jde tedy skutečně o **koligativní** vlastnost.

TEORIE + PRAXE

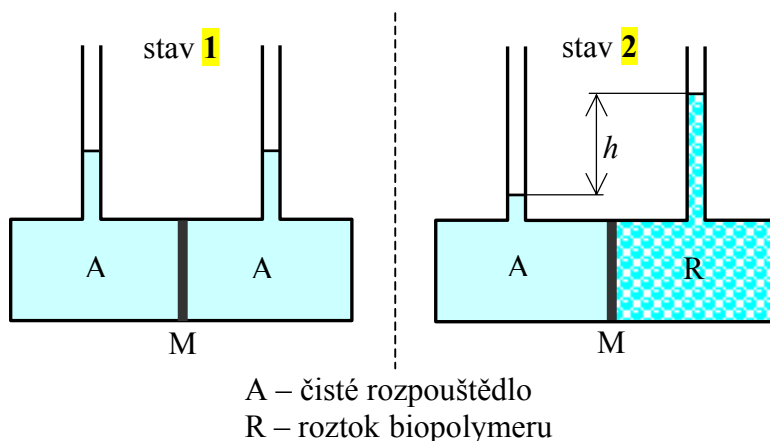
1. Příprava několika málo koncentrovaných roztoků téhož zkoumaného biopolymeru o koncentracích $c_1, c_2, c_3, \dots$ ve zvoleném rozpouštědle.
2. Měření osmotického tlaku těchto roztoků osmometrem $\Rightarrow \Pi_1, \Pi_2, \Pi_3, \dots$.
3. Početní zpracování $\Rightarrow \left[c_1; \frac{\Pi_1}{c_1} \right], \left[c_2; \frac{\Pi_2}{c_2} \right], \left[c_3; \frac{\Pi_3}{c_3} \right], \dots$.
4. Graf.



EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ

Přístroje k měření osmotického tlaku – **osmometry**.

Princip **membránového** osmometru



Ke stavu **2** dojde **samovolně** po jistém čase – rozdíl h hladin v manometrických trubicích se již nemění. Výška sloupce h je přímo úměrná **hydrostatickému** tlaku, kompenzujícímu **osmotický** tlak Π roztoku.

Popsaná metoda měření osmotického tlaku je metodou **statickou**. Její nevýhodou je **dlouhé** trvání – obecně desítky hodin. Proto je rozšířenější metoda **dynamická** (je méně přesná ale rychlejší – desítky minut). U **dynamických** osmometrů se zabráňuje pronikání

rozpuštědla membránou do roztoku působením vnější tlakové síly. Velikost této síly (a tím i hodnota kompenzačního tlaku) se volí např. podle průhybu membrány.

OSMOMETRIE umožňuje stanovení (relativní) **molární hmotnosti** v intervalu (přibl.) **15 000 – 500 000**. Pro hodnoty **menší než 10 000** je obtížné najít vhodnou membránu, pro hodnoty **větší než 500 000** jsou osmotické tlaky tak **malé**, že jsou prakticky neměřitelné.

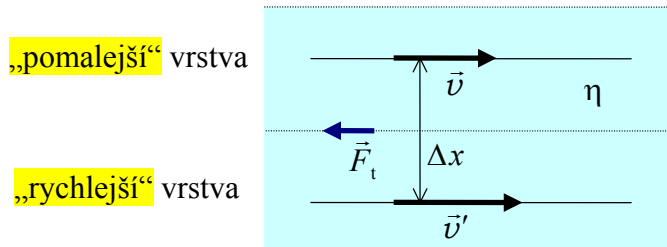
Rozhodujícím prvkem každé osmometrické aparatury je **membrána**. Používají se membrány **kolodiové** nebo odolnější membrány **celulózové**, **polyetylenové** apod. (komerční výrobky).

Poznámka

Z grafu závislosti **redukovaného** osmotického tlaku Π/c na koncentraci c lze určit tzv. první **virální** koeficient $A_1 = \text{tg } \alpha$. Z jeho hodnoty lze provést velmi hrubý odhad **tvary** makromolekuly (bio)polymeru. **Možné úskalí:** u řady látek (zvláště v případě bílkovin) dochází v roztoku během měření k **agregaci** (spojování) makromolekul, což (spolu s dalšími faktory) způsobuje, že může nastat stav $A_1 = \text{tg } \alpha < 0$, takže závislost $\Pi/c \approx c$ je **klesající** – agregace makromolekul **zmenšuje** kvalitu použitého rozpouštědla. Tato skutečnost naštěstí neovlivňuje **limitní** hodnotu redukovaného osmotického tlaku a tím i stanovení molární hmotnosti.

VISKOZIMETRIE

Klasická hydrodynamická metoda umožňující stanovení molární hmotnosti a odhad velikosti a tvaru makromolekul. **Viskozita** – vnitřní tření “uvnitř” kapalin a plynů. Kvantitativně (již NEWTON)



$$F_t \approx \tau = \eta \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta v}{\Delta x} = \eta \frac{dv}{dx}; \Delta v = v' - v$$

$\vec{F}_t$ – **disipativní** síla, vznikající na rozhraní “různě rychlých” vrstev kapaliny, namířená proti pohybu **rychlejší** vrstvy. Její příčinou je **tečné napětí** τ , které existuje pouze ve **skutečných – vazkých** tekutinách; η je součinitel **dynamické viskozity** nebo krátce **dynamická vazkost**; $[\eta] = \text{N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s} = \text{Pa} \cdot \text{s}$. **Pozor!** Nezaměňovat s tzv. **kinematickou vazkostí** $\nu = \eta/\rho$; $[\nu] = \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

NEWTONŮV vztah platí přesně pouze při **laminárním** proudění. Dynamická vazkost je v tomto případě konstantní a tekutinu nazýváme **newtonovskou**. Roztoky **biopolymerů** takovými tekutinami obecně nejsou. Makromolekuly přítomné v roztoku přispívají k jeho celkové viskozitě. Tento přírůstek závisí na:

- typu biopolymeru,
- velikosti a tvaru makromolekuly,

- rychlostním gradientu dv/dx , který může makromolekuly deformovat.

Viskozita roztoku biopolymeru závisí i na druhu **rozpouštědla**, na **teplotě** roztoku (výrazně) a (velmi málo) na atmosférickém tlaku.

DŮLEŽITÉ VELIČINY

Relativní viskozita $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0$;

η je viskozita roztoku (nebo suspenze makromolekul), η_0 je viskozita čistého rozpouštědla (při dané teplotě).

Specifická viskozita $\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\Delta\eta}{\eta_0}$;

$\Delta\eta$ je přírůstek viskozity následkem rozpuštění biopolymeru – měřitelné.

Redukovaná viskozita (při koncentraci c) $\eta_{\text{red}} = \frac{\eta}{c}$.

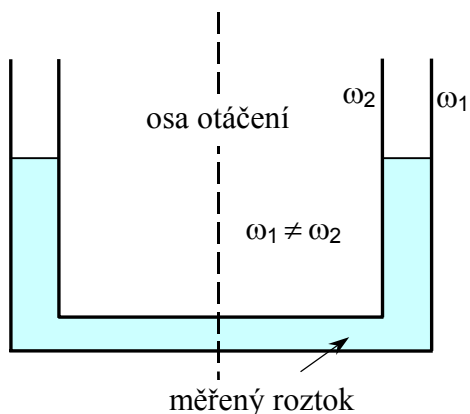
Všechny tyto veličiny závisí na **koncentraci** c roztoku a na rychlostním **gradientu** $G = dv/dx$. Pro **porovnání** různých biopolymerů z hlediska jejich příspěvků k viskozitě se dále zavádí tzv. **limitní viskozitní číslo** (nebo také **vnitřní viskozita** roztoku)

$$[\eta] = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ G \rightarrow 0}} \frac{\eta_{\text{sp}}}{c}$$

Základní podmínkou pro stanovení limitního viskozitního čísla, charakterizujícího makromolekulu daného biopolymeru, je měření viskozity zředěného roztoku při co nejmenším (ideálně nulovém) rychlostním gradientu - při co nejmenších rychlostech proudění. K tomu je nutná **úprava** klasických (kapilárních i rotačních) viskozimetrů.

KAPILÁRNÍ (PRŮTOKOVÉ) VISKOZIMETRY

Např. konstrukce odvozená od **UBBELOHDEHO** průtokového viskozimetru. K vyvolání a udržení co nejmenší rychlosti proudění ($G \rightarrow 0$) je využita pouze **složka** intenzity tíhového pole – **náklon** rovné kapiláry nebo tvar šroubovice. I při velmi malých rychlostech proudění je však gradient rychlosti nenulový - měření je proto vždy zatíženo chybou.



ROTAČNÍ VISKOZIMETRY

V principu jde o dvě **souosé** (koaxiální) válcové nádoby blízkého poloměru. Mezi jejich stěny je umístěn měřený roztok. Rotuje-li jeden z válců konstantní rychlostí, funguje měřený roztok jako “spoinka”, přenášející rotační pohyb a vyvolávající rotaci druhého válce. Fázové **zpoždění** této rotace i její úhlová rychlost závisí na **viskozitě** roztoku, který **neproudí** – rotační viskozimetry splňují podmínku $G \rightarrow 0$.

MĚŘENÍ VIZKOZITY

Přesná matematická (exaktní) teorie opět neexistuje. K dispozici jsou pouze experimentálně získané (empirické) vztahy – např. empirická rovnice **MARKOVA – HOUWINKOVA** $[\eta] = K(\bar{M}_n)^\alpha$, v níž K a α jsou parametry závislé na použitém rozpouštědle a tvaru makromolekuly rozpuštěné látky. Před každým (ke stanovení molární hmotnosti určeným) měřením je nutno tyto parametry experimentálně určit pomocí roztoku přesně definované makromolekulární látky ve stejném rozpouštědle, u jejíž makromolekuly předpokládáme **stejný tvar**, jako u molekuly měřené.

METODIKA A ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Obdobně jako u **osmometrie** – vhodný **viskozimetr** + **kalibrace** roztokem látky, jejíž molární hmotnost i tvar **známe**. Kalibrací (měřením viskozity a dosazením do **MARKOVY-HOUWINKOVY** rovnice) získáme parametry K a α .

Pak příprava několika roztoků **měřeného** biopolymeru v rozpouštědle použitým při kalibraci a měření jejich viskozity $\Rightarrow [c_1, \eta_{\text{red},1}], [c_2, \eta_{\text{red},2}], [c_3, \eta_{\text{red},3}], \dots$. Dále graf a **extrapolace** na **nulovou** koncentraci $\Rightarrow [\eta] \rightarrow \text{Mark.-Houw.} \rightarrow \bar{M}_n = ([\eta] / K)^{1/\alpha}$.

SEDIMENTAČNÍ ANALÝZA

Další metoda stanovení molární hmotnosti. Experimentální metodikou je **ultracentrifugace**, při níž dochází k pohybu molekul biopolymeru v odstředivaném roztoku. Při zpracování naměřených výsledků vycházíme z mechaniky i z fenomenologického popisu daného jevu.

Mechanika:

Model - makromolekula jako těleso ponořené do kapaliny známé hustoty v poli odstředivé síly. Na těleso (makromolekulu) působí podle mechanických představ tři síly

- **Odstředivá síla** $F_1 = m a_0 = m \omega^2 r$;
- **Vztlaková síla** $F_2 = \rho V \omega^2 r$, ρ je hustota roztoku, V je objem makromolekuly;
- **Odpor prostředí** $F_3 = f dr/dt = f v$, f je tzv. **frikční** koeficient (**frikce** – tření).

Podmínka pro **rovnoměrný** pohyb makromolekuly:

$$\vec{F}_1 + \vec{F}_2 + \vec{F}_3 = \vec{0} \Rightarrow F_1 - (F_2 + F_3) = 0 \Rightarrow F_3 = F_1 - F_2 \Rightarrow$$

$$\frac{dr}{dt} = \frac{m \omega^2 r - \rho V \omega^2 r}{f} = \frac{\omega^2 r}{f} \left(\frac{M}{N_A} - \rho \frac{M}{N_A} \bar{v} \right) \Rightarrow$$

$$\frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt} = \frac{M(1 - \rho \bar{v})}{N_A f} = S \Rightarrow \frac{dr}{dt} - S \omega^2 r = 0.$$

V těchto vztazích je ρ – hustota roztoku, ω – úhlová rychlost odstředování, M – (hledaná) molární hmotnost biopolymeru, $\bar{v}$ – partiální objem biopolymeru ($\bar{v}_{\text{biopol.}} = \rho_{\text{biopol.}}^{-1}$), $r(t)$ – vzdálenost makromolekuly od osy otáčení.

$S = M(1 - \rho \bar{v}) / N_A f$ je tzv. **sedimentační koeficient** závisející mimo jiné na **molární hmotnosti** biopolymeru – $S = S(M)$; jednotkou této veličiny je **swedberg** (10^{-13} s).

Řešení **diferenciální** rovnice

$$\frac{dr}{dt} - S \omega^2 r = 0 \Rightarrow \frac{dr}{r} = S \omega^2 dt$$

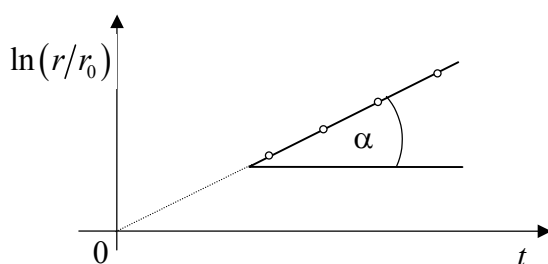
má tvar

$$\ln(r/r_0) = S \omega^2 t \wedge S = S(M) \Rightarrow \text{možnost určení molární hmotnosti.}$$

V okamžiku $t = 0$ je poloha makromolekuly $r = r_0$, od této polohy je již její (další) "odstředivý" pohyb **rovnoměrný**.

PRAKTICKÉ MĚŘENÍ RYCHLOSTI SEDIMENTACE

"Sledování" pohybu makromolekuly polymeru a určení rychlosti jejího rovnoměrného pohybu $\Rightarrow (r_0, v)$ – **optické** sledování (rovnoměrného) pohybu **rozhraní** roztoku a čistého rozpouštědla v kyvetě při **odstředování** (např. měřením indexu lomu).



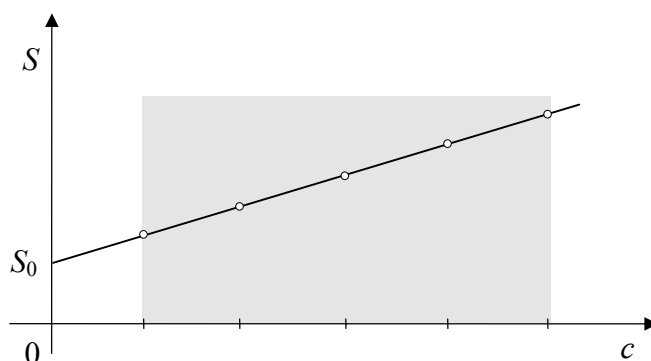
$$\operatorname{tg} \alpha = S \omega^2 \Rightarrow S \Rightarrow M.$$

Měření provádíme pro **jedinou** koncentraci roztoku biopolymeru, jehož molární hmotnost chceme určit.

Velký problém: v praxi se k "odstředivému" pohybu makromolekul vždy přidává jejich tepelný pohyb a dochází k **difúzi** – rozhraní je neostře a celé měření je zatíženo velkou

chybou. Proto nevystačíme pouze s mechanikou, ale – protože difúzní (tepelný) pohyb makromolekul je zcela nahodilý a chaotický – musíme vzít na pomoc poznatky **termodynamiky**.

Při fenomenologickém termodynamickém popisu používáme termodynamické ("vnější") veličiny a opouštíme představu makromolekuly jako tělesa v kapalině. Zahrneme-li takto mezi uvažované jevy i difúzi, ukazuje se, že sedimentační koeficient S závisí i na **koncentraci** roztoku biopolymeru $\Rightarrow$ pro **každou** zvolenou koncentraci musíme provést výše popsané měření sedimentačního koeficientu. Takto získáme dvojice hodnot $[c_1; S_1], [c_2; S_2], [c_3; S_3], \dots$. Pak $\Rightarrow$



S_0 – sedimentační koeficient daného biopolymeru extrapolovaný na nulovou koncentraci – **limitní sedimentační číslo** (slouží i pro posouzení sedimentačních

vlastností různých biopolymerů). Základě termodynamických poznatků můžeme odvodit tzv. SWEDBERGOVU rovnici

$$\bar{M}_w = \frac{S_0 RT}{D_0 (1 - \rho \bar{v})},$$

v níž veličiny mají svůj obvyklý význam a D_0 je tzv. **difúzní koeficient**, k jehož určení je potřeba **dalšího** měření – **DIFUZIMETRIE**.

DIFÚZE

Proces **samovolného** vyrovnávání koncentrace všude tam, kde existuje koncentrační gradient. Mechanismus – chaotický tepelný pohyb makromolekul. K měření veličin souvisejících s difúzí se používá různých metod:

VOLNÁ DIFÚZE – optické sledování rozmývání původně ostrého rozhraní mezi roztokem biopolymeru v dolní části a čistým rozpouštědlem v horní části svislé kyvety (FICKOVY zákony volné difúze). Měření volné difúze je časově velmi náročné.

ROTAČNÍ DIFÚZE – za normálního stavu jsou (makro)molekuly biopolymeru v roztoku zcela náhodně orientovány. Tato situace může být změněna silovým polem - např. polem odstředivým nebo elektrickým. Účinkem tohoto pole se všechny molekuly orientují ("seřadí") jistým stejným způsobem. Po zrušení pole dojde během tzv. **relaxační** doby k návratu k původnímu, co do orientace makromolekul, chaotickému stavu. Tomuto přechodu od uspořádané orientace ke stavu orientace chaotické se říká **rotační difúze**. Experimentálně se relaxační doba měří např. metodou **optického dvojzlomu** za toku.

DIELEKTRICKÁ DISPERZE – roztok biopolymeru vystavíme působení vysokofrekvenčního střídavého elektrického pole ($10^3 - 10^{13}$ Hz) a měříme jeho **permitivitu**. Při malých frekvencích se stačí molekuly biopolymeru i rozpouštědla střídavě orientovat ve směru elektrického pole. Při vyšších frekvencích však již molekuly biopolymeru nestačí reagovat na změnu polarity pole a proto je permitivita roztoku $[\epsilon = \epsilon(f)]$ **klesající** funkcí frekvence pole f . Z průběhu této funkce lze opět určit **relaxační** dobu.

Některou z výše uvedených metod můžeme určit difúzní koeficient D měřeného roztoku a extrapolací na nulovou koncentraci získat jeho limitní hodnotu D_0 , kterou můžeme dosadit do SWEDBERGOVY rovnice a z ní určit molární hmotnost $\bar{M}_w$.

STANOVENÍ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI METODOU NORMÁLNÍHO ROZPTYLU SVĚTLA

Interakce světla (elektromagnetického vlnění) s látkou – obecně **zeslabení** vstupujícího paprsku. Na **úbytku** zářivé energie se podílí:

- Absorpce
- Fluorescence
- Rozptyl světla

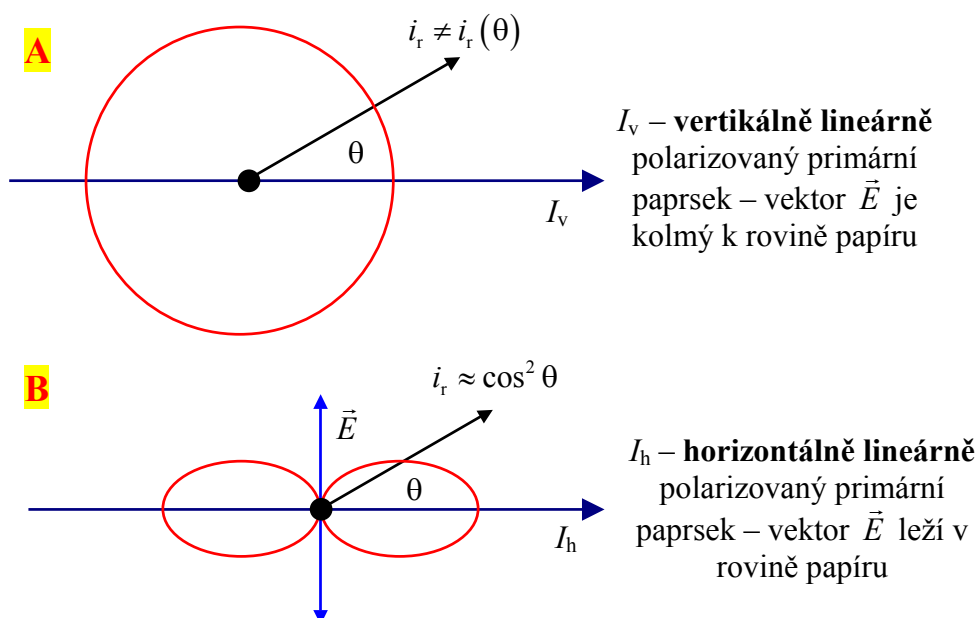
NORMÁLNÍ (RAYLEIGHŮV) ROZPTYL SVĚTLA

Při průchodu světla látkovým prostředím – např. roztokem biopolymeru – dochází na molekulách rozpuštěné látky k rozptylu.

Mechanismus rozptylu – modelová představa: molekulu rozpuštěné látky považujeme za prostorový oscilátor, rezonančně rozkmitávaný dopadajícím příčným elektromagnetickým vlněním, které mu předává (malou) část své energie.

Kmitající elektrické náboje – elektrony v obalu molekul – představují zdroj nového elektromagnetického vlnění. Je-li frekvence tohoto (rozptýleného) záření stejná jako u záření dopadajícího (primárního), hovoříme tzv. **normálním rozptylu světla** (RAYLEIGHŮV rozptyl) – na rozdíl od tzv. RAMANOVA rozptylu světla). Teorie normálního rozptylu – klasické představy – RAYLEIGH, EINSTEIN, SMOLUCHOWSKI, **ZIMM** aj.

Intenzita rozptýleného světla je ve srovnání s intenzitou dopadajícího paprsku velmi malá. Její hodnota je závislá na směru měření – výklad pomocí lineárně polarizovaného primárního paprsku:



Při dopadu nepolarizovaného světla – (**A+B**) $\Rightarrow I_v + I_h \Rightarrow i_r \approx 1 + \cos^2 \theta$. Podmínkou platnosti a správnosti těchto úvah je **izotropie molekul** (jejich schopnost stejných oscilací v **libovolném** směru) a jejich **velikost** – (příčný rozměr molekuly by neměl překročit zhruba dvacetinu vlnové délky primárního paprsku v daném prostředí).

Obecný vztah, vyjadřující intenzitu i_0 světla, rozptýleného **jedinou** "malou" izotropní molekulou ve směru daném úhlem θ , měřeným od dopadajícího primárního paprsku byl odvozen na základě výše uvedených modelových úvah a má tvar

$$i_0 = \frac{\pi^2 \alpha^2}{2 \lambda^4 r^2 \epsilon_0^2} I_0 (1 + \cos^2 \theta).$$

V tomto vztahu je α **polarizovatelnost** molekuly a λ je vlnová délka světla primárního paprsku o intenzitě I_0 . Tento vztah vyjadřuje následující skutečnosti

1. $i_0 \approx \lambda^{-4}$, nejvíce je tedy rozptylováno světlo **modré**.

2. Rozptýlené světlo má **stejnou** frekvenci jako primární dopadající (a rozptylující se) paprsek (pouze asi **0,1%** intenzity rozptýleného světla má frekvenci odlišnou – **RAMANŮV** rozptyl).
3. Radiační obálka rozptýleného světla je **symetrická**,
4. Amplituda velikosti vektoru intenzity elektrického pole rozptýleného světla je přímo úměrná polarizovatelnosti molekuly ($e_0 \approx \alpha$).

Další matematické úpravy daného vztahu souvisí s přechodem od **jediné** molekuly k **souboru** molekul – $I_0 = \sum_j (i_0)_j$ přímá souvislost s **koncentrací** roztoku (biopolymeru).

Další úpravou získáme (opět) tzv. **redukovanou intenzitu rozptýleného světla**

$$R_0 = \frac{I_0 r^2}{I_0 (1 + \cos^2 \theta)}.$$

Pomocí vztahů známých z elektřiny a optiky můžeme toto vyjádření redukované intenzity rozptýleného světla upravit na tvar

$$R_0 = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 M c = K M c$$

a odtud získat **výchozí** rovnici pro určení **molární hmotnosti**

$$\boxed{\frac{1}{M} = \frac{Kc}{R}}$$

Pozor! Výše uvedené vztahy platí přesně pouze v systémech izotropních, vůči vlnové délce malých, vzájemně neinteragujících částic (molekul), tvořících spolu s prostředím v němž jsou dispergovány opticky **izotropní** systém. Roztoky **biopolymerů** tyto podmínky obecně **nesplňují**. Příčiny:

1. Nadměrná velikost makromolekul ($l > \lambda/20$) – následkem toho není radiační obálka rozptýleného světla symetrická, neboť dochází k **interferenci** světla, rozptýleného různými částmi téže makromolekuly. Tento jev nazývaný **disymetrie** vyžaduje korigování naměřených hodnot. Pozitivum tohoto jevu – informace o **velikosti** i **tvaru** makromolekuly.
2. Anizotropie makromolekul (polárnost a proto různá polarizovatelnost v různých směrech) – vliv na polarizaci rozptýleného světla za předpokladu, že primární paprsek je lineárně polarizovaný. Jev nazýváme **depolarizace** rozptýleného světla – opět nutnost korekcí, zároveň však další informace o tvaru molekuly.

Otázky ke zkoušce z předmětu

PREPARATIVNÍ A SEPARAČNÍ METODY (SEPMP)

1. Extrakce. Polarimetrie
2. Srážení. Koligativní vlastnosti biopolymerů v roztocích.
3. Sedimentace, centrifugace. Chromatografie - úvod, obecné principy a klasifikace.
4. Dělení látek membránou, dialýza, filtrace membránou. Adsorpční chromatografie, rozdělovací chromatografie.
5. Chromatografie na iontoměničích. Refraktometrie.
6. Gelová a afinitní chromatografie. Základní pojmy a zákony paprskové a vlnové optiky.
7. Kapalinová chromatografie. Elektrody.
8. Elektroforéza, krystalizace. Polarimetrie.
9. Speciální metody dělení biomolekul. Polarografie.
10. Plynová chromatografie. Stanovení molární hmotnosti biopolymerů (přehledně).