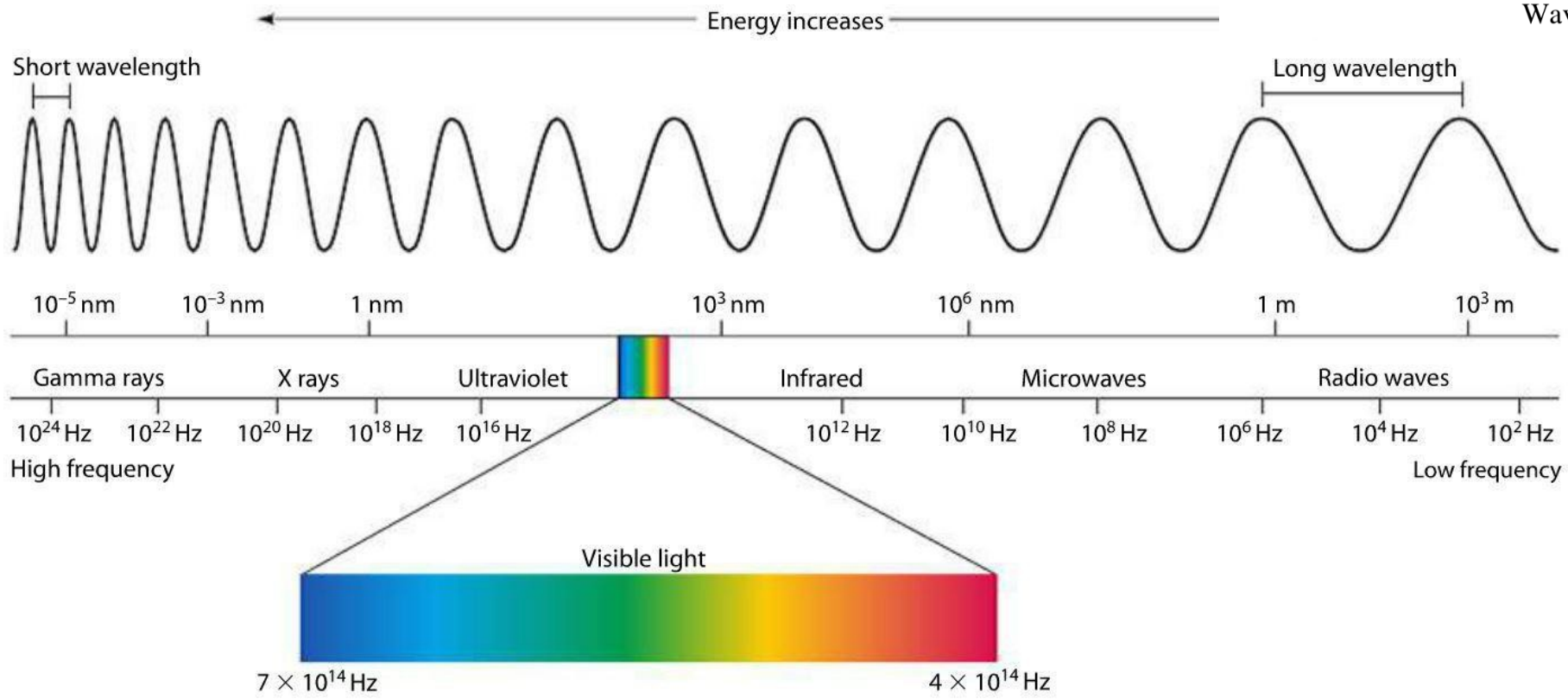
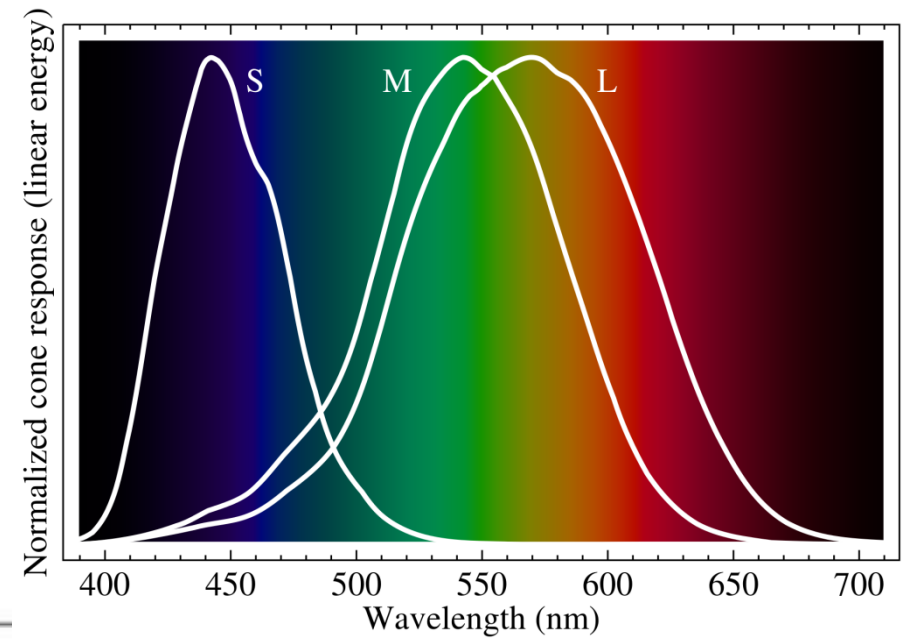


Barevnost molekul a její analytické využití

Ondřej Wiewiorka

Barvy

- Barva je vjem, který vzniká v mozku po dopadu světla na světločivný orgán



Barevnost molekul

- Bílé světlo je složeno ze všech částí viditelného světla
-> absorbcí části tohoto spektra dojde k vjemu tzv. doplňkové barvy

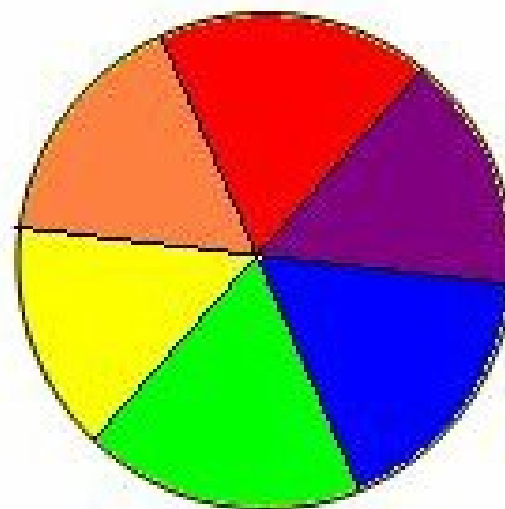
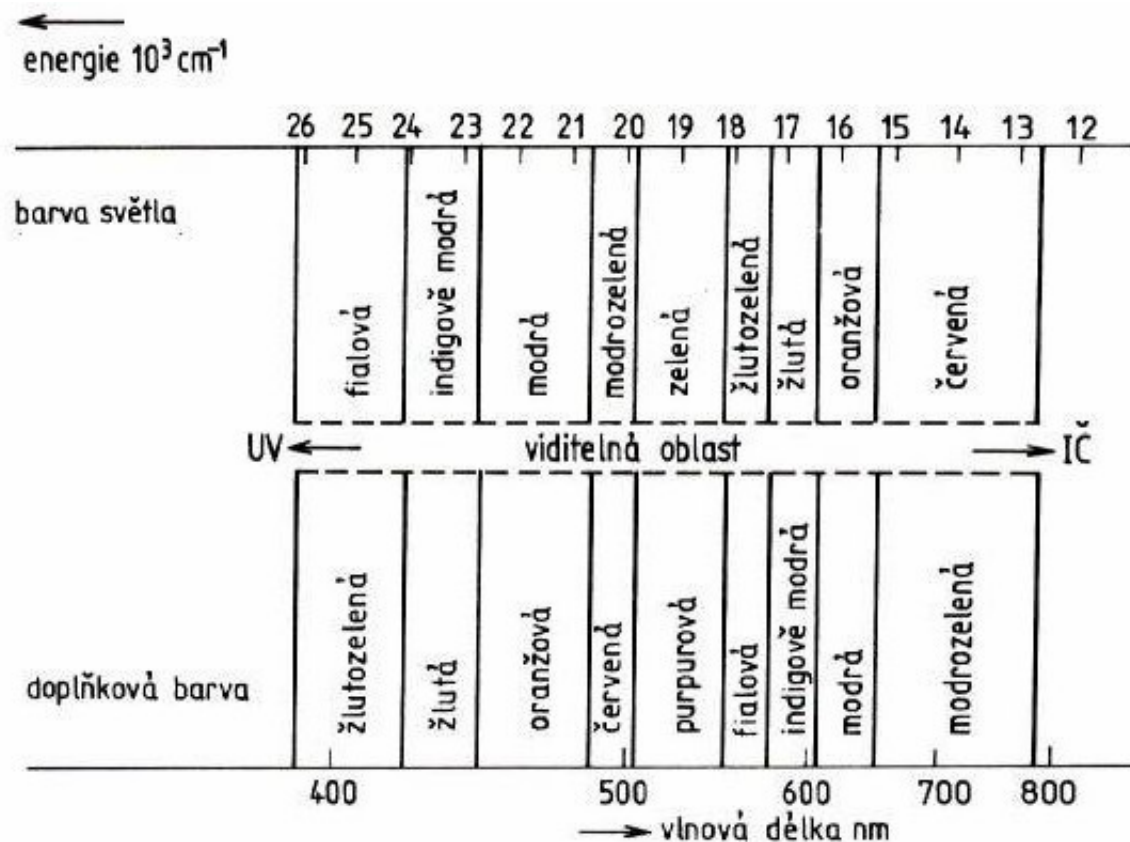
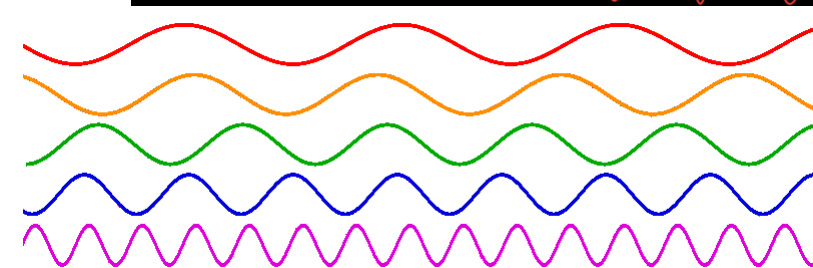
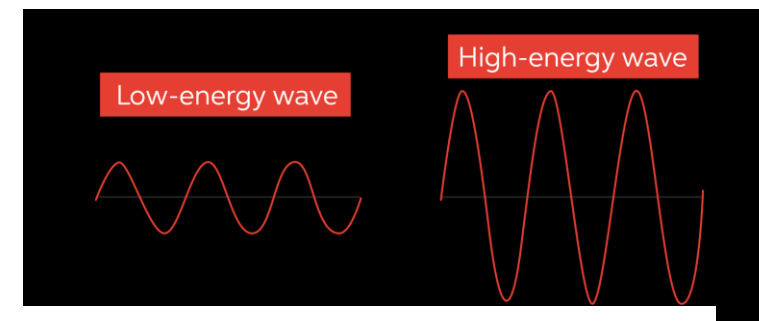


Diagram chromaticity

Barvy – parametry světla

- Amplituda záření
- Vlnová délka
- Polychromatické / monochromatické světlo
- Depolarizované / polarizované světlo



Light Passing Through Crossed Polarizers

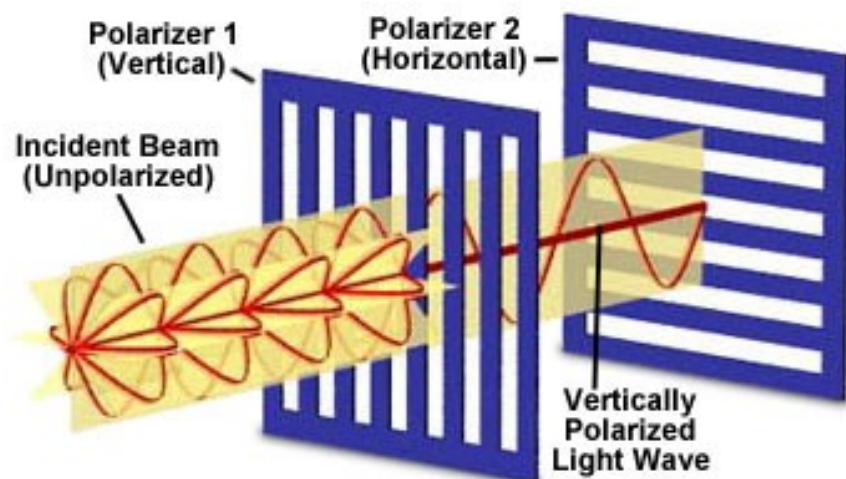
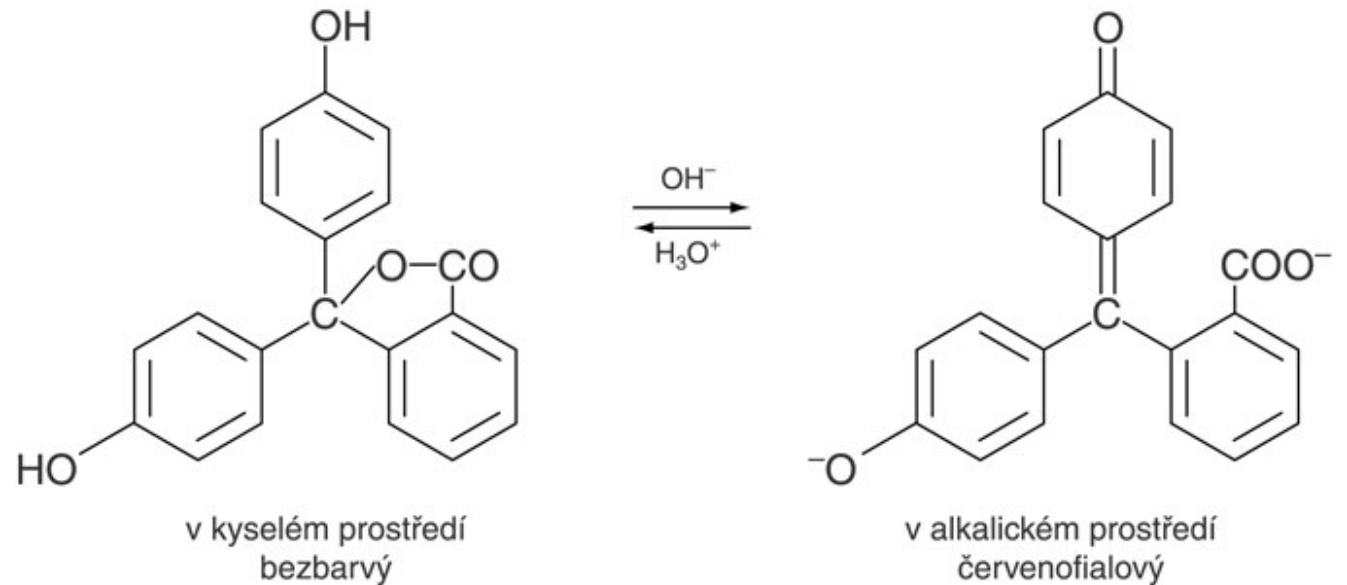


Figure 1



Barevnost molekul

- Absorbance světla je dosažena interakcí elektromagnetického záření s elektronovými obaly
- Dle pravidel kvantové fyziky ovšem dochází k absorpci pouze konkrétních vlnových délek = přechod elektronů mezi energetickými hladinami
- Jaké vlnové délky jsou absorbovány odpovídá struktuře molekuly



Fenolftalein

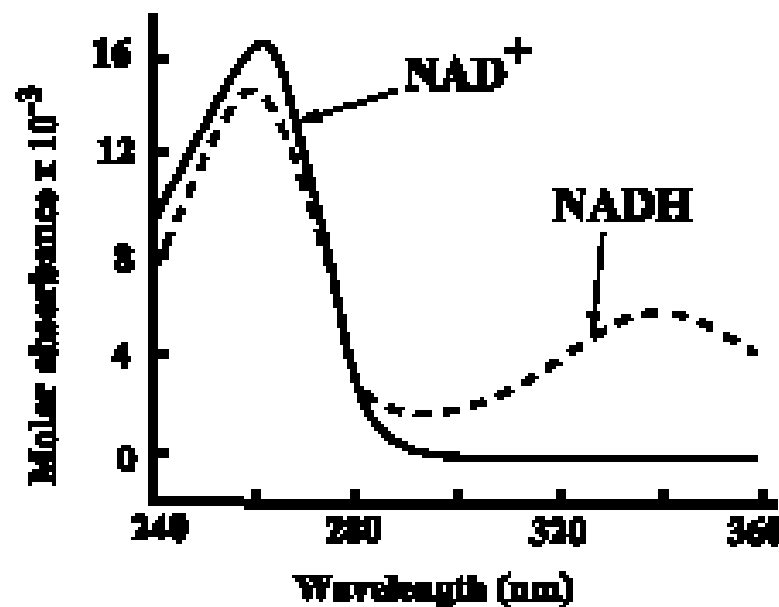
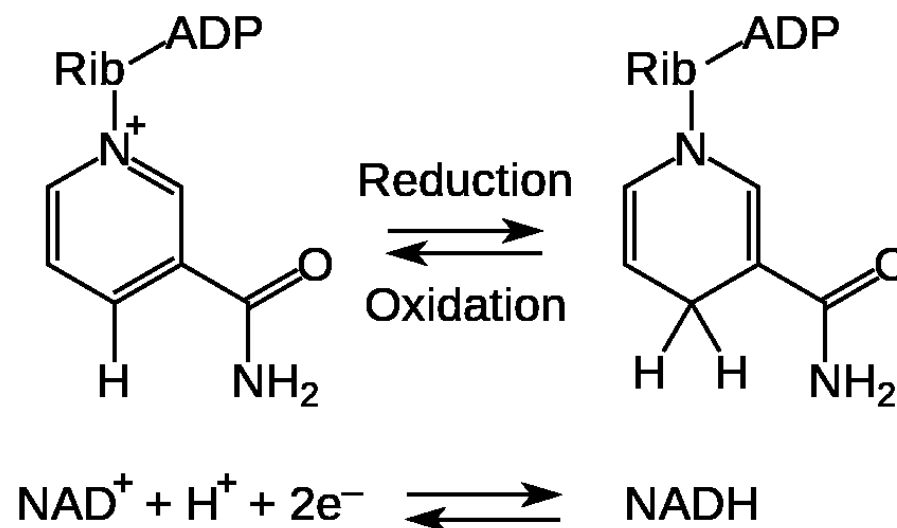
Barevnost molekul

- Absorpce se posunuje k delším vlnám červené oblasti tím více, čím menší energie je třeba k excitaci elektronů do "vzbuzeného stavu,,
- Složitý elektronový systém, interagující se světlem zahrnují
 - Složité organické molekuly často s aromatickými systémy (často N-deriváty)
 - Prvky s valenčními elektrony v d- a f- orbitalech
 - Atomy s vysokým oxidačním číslem

Využití v analytické chemii

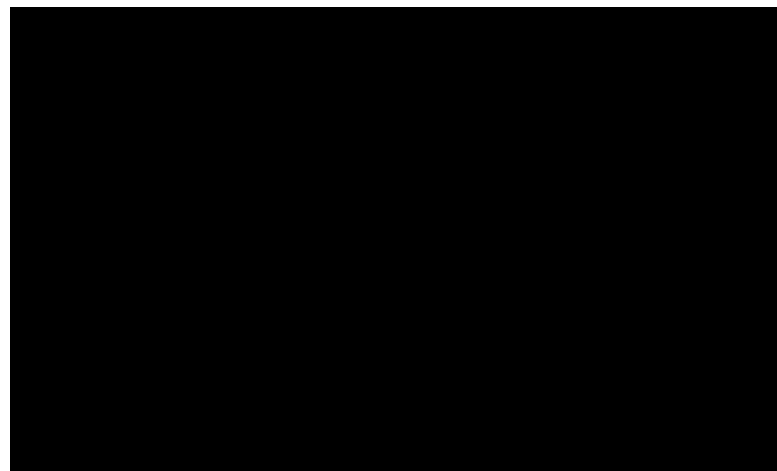
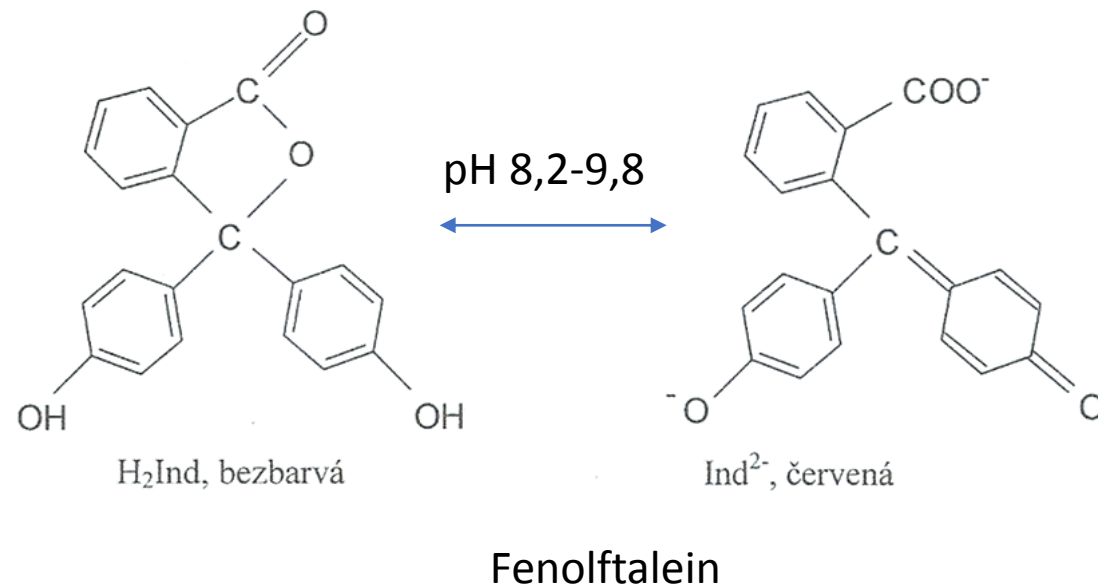
- Změna barvy molekul při chemických reakcích např.:
- Oxidaci/redukci
- Změně pH
- Přítomnosti konkrétního iontu
- Ztráta/zisk funkční skupiny

-> jednoduše jde o změnu, která upraví strukturu/tvar elektronového systému molekuly



Kvantifikace

- Odečet lze provést „okometricky“
 - titrace s barevnými indikátory (iodometrická, manganistan...)
 - přidavek iodu ke škrobu – modré zbarvení
 - Vizualizace pruhů elektroforézy proteinů (Ag, Coomassie brilliant blue, amidočerň),

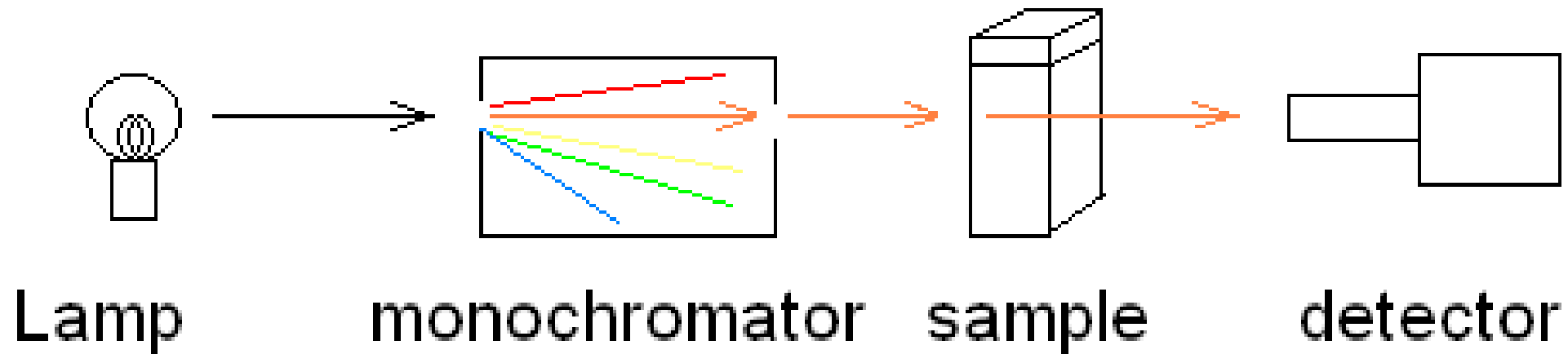


Coomassie brilliant blue

Kvantifikace

- Lidské oko není dost citlivé na jemné změny barev – pro kvantifikaci je vhodnější využít přístroje – absorpční spektrofotometr

Scheme of an Absorption Spectrophotometer



Kvantifikace

- Transmittance

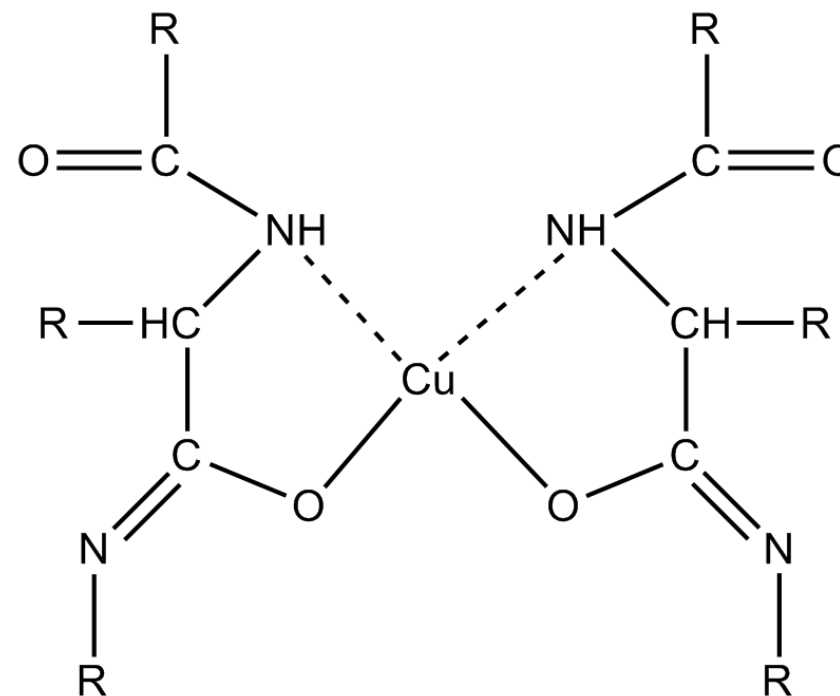
$$\phi = \phi_0 \cdot 10^{-\epsilon_{\lambda} c l} \quad (\phi_0 > \phi)$$

- Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log \frac{\phi}{\phi_0} = -\log T = \epsilon_{\lambda} c l$$

Využití v praxi

- Chemická činidla
 - Celková bílkovina v séru/plazmě biuretovým činidlem (540-550 nm)
 - Protein + Cu^{2+} \rightarrow Cu-protein komplex
 - Reakční směs obsahuje i tartarát sodno-draselný, který zajišťuje komplex s měďnatými ionty a zabraňuje vysrážení $\text{Cu}(\text{OH})_2$
 - Dále je ve směsi přítomný KI, který funguje jako antioxidant



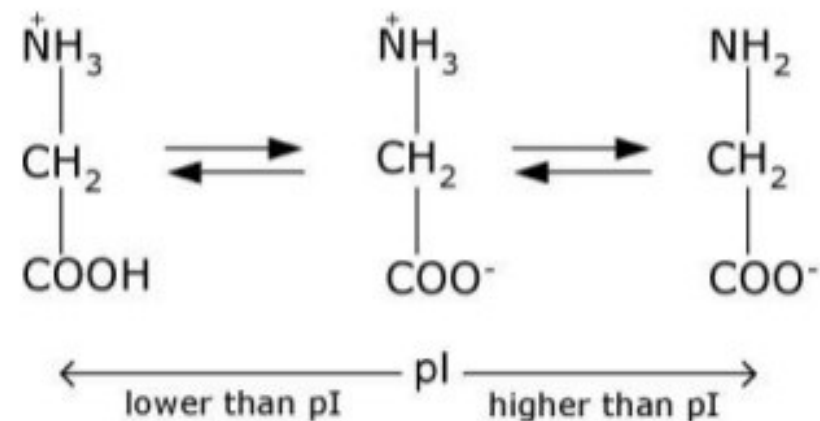
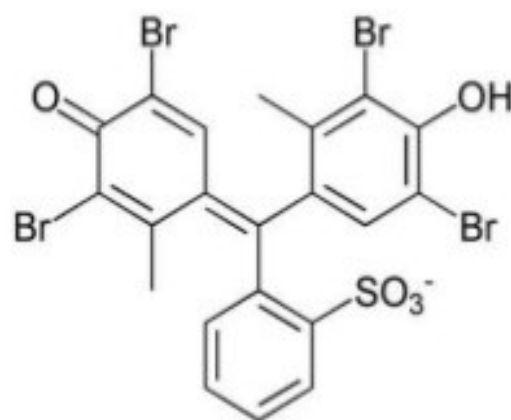
Vazba Cu v peptidové vazbě v alkalickém pH

Využití v praxi

- Chemická činidla

Bromo-Cresol Green Method

- BCG reagent at pH 4.3 is negatively charged
- pI of Albumin is 4.7



Bromocresol green binds quantitatively with albumin to form an intense blue-green complex with an absorbance max at 670 nm.

Využití v praxi

- Chemická činidla

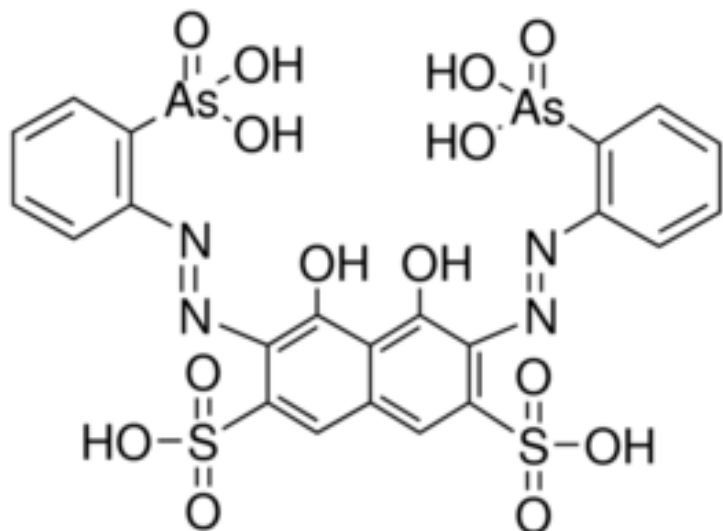
- Stanovení fosfátů pomocí molybdenanu amonného v přítomnosti kyseliny sírové

- $\text{PO}_4^{3-} + (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \rightarrow (\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ detekce při 340 nm.

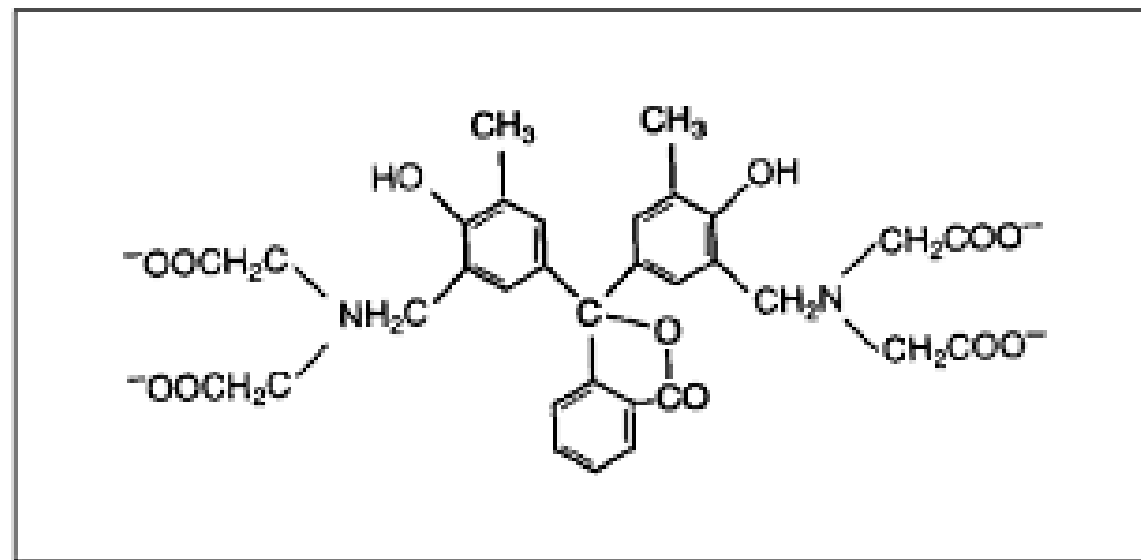
Možná je i následná redukce komplexu za vzniku fosfomolybdenové modři (650 nm)

Využití v praxi

- Chemická činidla
 - Stanovení Ca



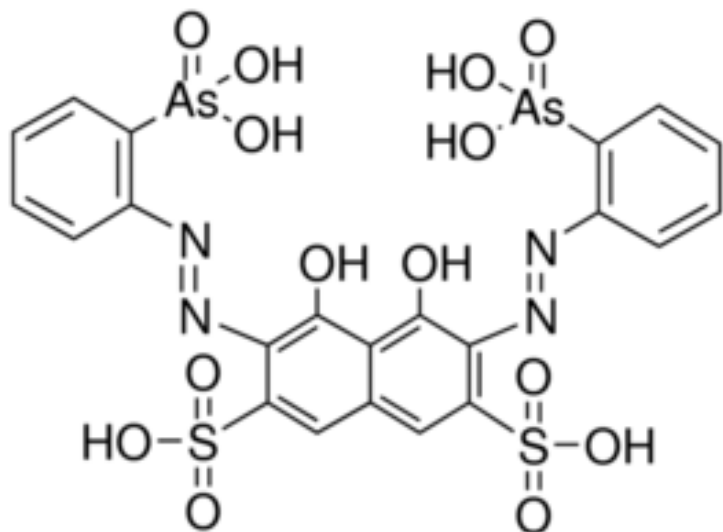
Arzenazo III (při pH 6) dává s vápníkem modrou barvu



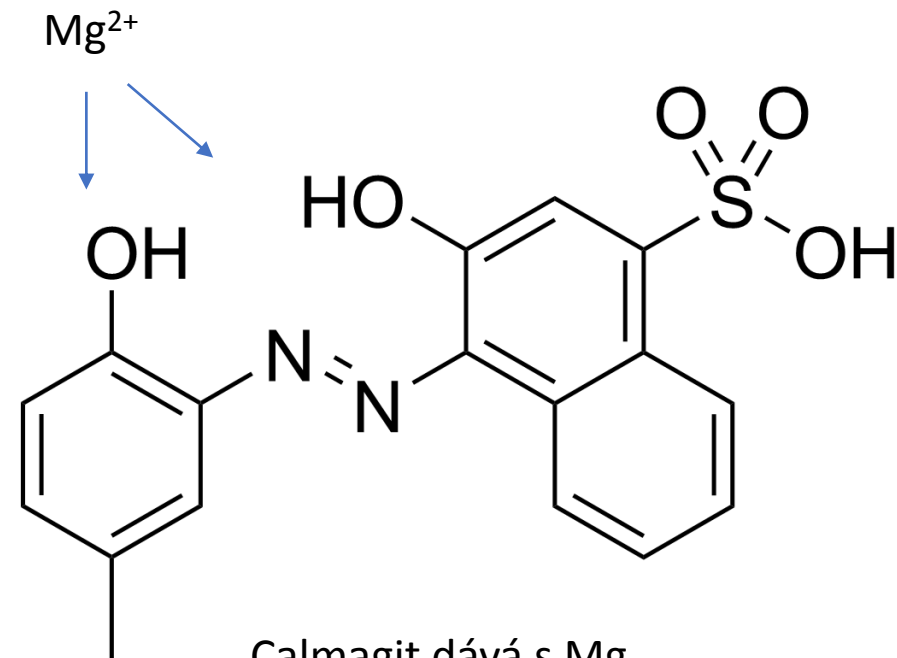
O-kresolftaleinkomplexon (při pH12) dává s vápníkem purpurovou barvu

Využití v praxi

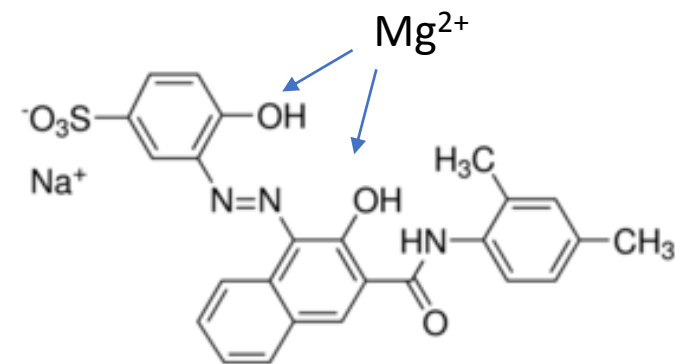
- Chemická činidla
 - Stanovení Mg



Arzenazo III (alkalické pH)
dává s Mg fialovou barvu



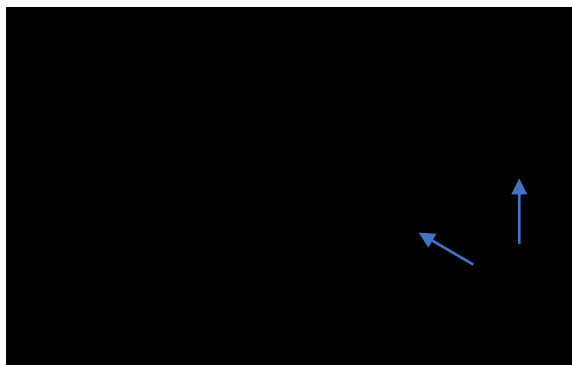
Calmagit dává s Mg
purpurovou barvu



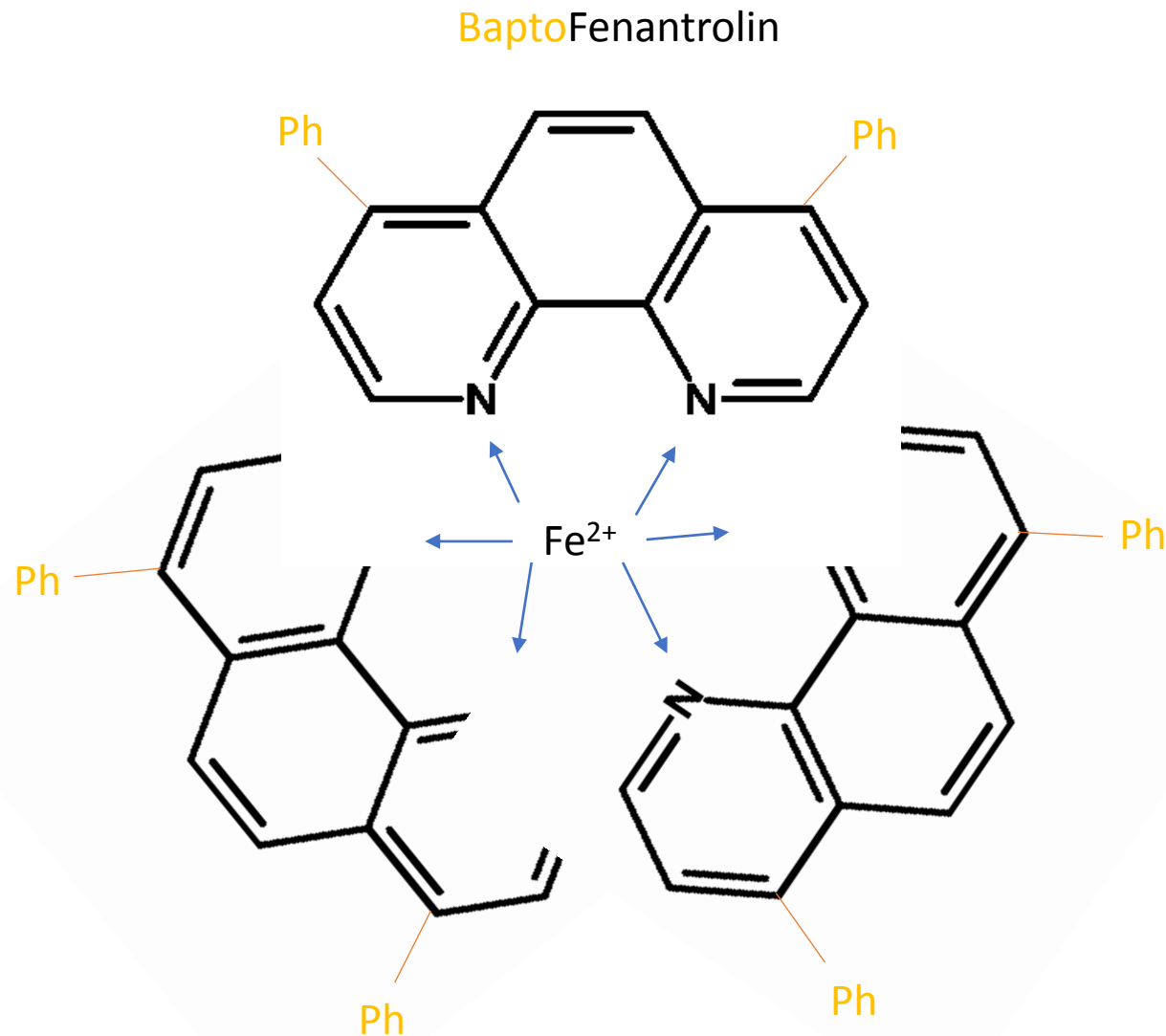
Xylidylová modř
(Magon) dává s Mg
purpurovou barvu

Využití v praxi

- Chemická činidla
 - stanovení Fe



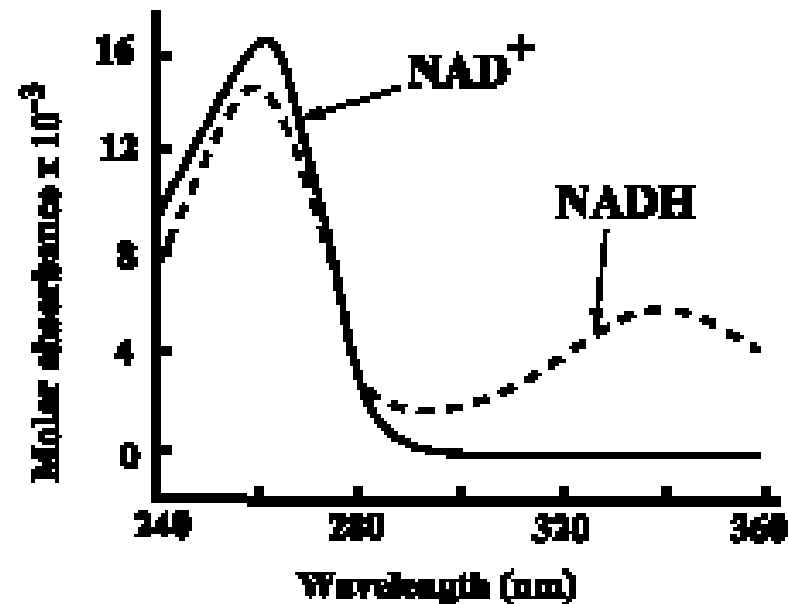
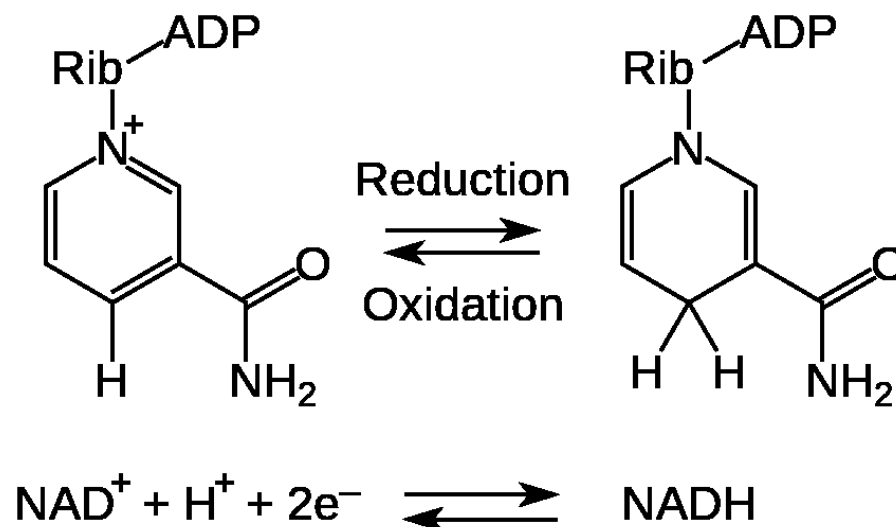
Ferrozín s Fe poskytuje fialovou barvu



Dává s Fe růžovou až červenou barvu

Využití v praxi

Warburgův
optický test



Uvedený kofaktor využívá řada enzymů ze skupiny dehydrogenáz

- **LDH**, GDH, GMD, MD....

pyruvát + NADH + H⁺ -> laktát + NAD⁺

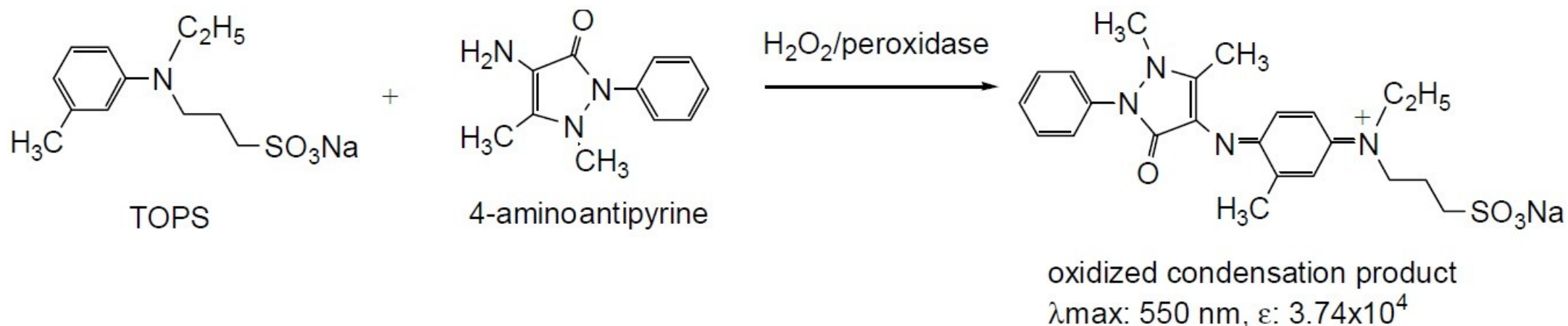
na pyruvát jsou navázány reakce substrátů např.: trigly, Hcy, Lac...

enzymů např.: ALT, AST, CK....

Funguje i u reakcí NAD(P)H->NAD(P)⁺

Využití v praxi

Trinderova (peroxidázová) reakce



Používá se ve spojení s enzymy ze třídy oxidoreduktáz za vzniku H_2O_2 (signální molekula)

- GOD, urikáza, LOD, CHOD, GPO....

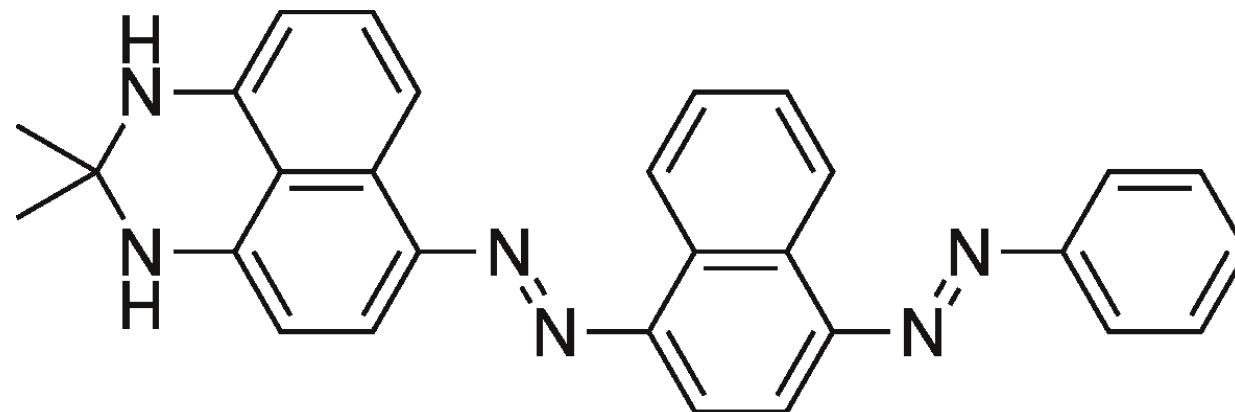
Jako konjugační produkt se-aminoantipyrinem je možné použít i jiné deriváty fenolu/anilinu za vzniku chromogenů s jiným absorpčním maximem

Shrnutí

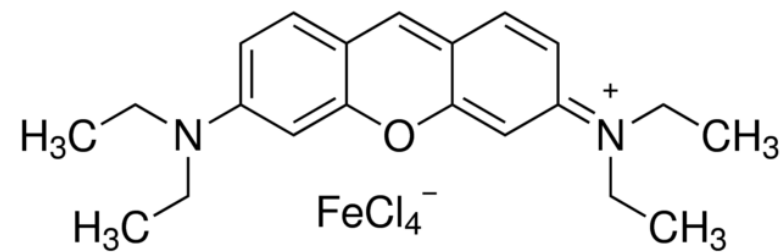
- Použití chemických činidel
 - prvky s valenčními elektrony v d- a f- orbitalu (Cu – celková bílkovina, Ag – barvení proteinů, MnO_4^- titrace)
 - organická komplexotvorná činidla (Ca, Mg, Fe....) – poskytují konkrétní barvu s konkrétním prvkem, činidla tvoří složitou směs oxidantů/antioxidantů, stabilizátorů
 - Calmagit, magon, benzethoniumchlorid
 - Konjugace s enzymy - specifické a univerzální pro organické molekuly utilizované organismem – metabolické dráhy
 - Warburgův optický test, Trinderova peroxidázová reakce

Využití v praxi

- Chemická činidla



Súdánová čerň



Pyronin B

Děkuji za pozornost