

# **MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE**

v UV a viditelné oblasti spektra

# Kinetické metody

- **Analyt** představuje **katalyzátor** = aktivátor nebo inhibitor.
- Rychlost katalyzované reakce  $\approx$  koncentraci katalyzátoru = koncentraci analytu
- Reakce 1. řádu vzhledem k reaktantům a produktům
- Změna absorbance reaktantu nebo produktu s časem

## 1. Diferenciální technika

$$aA + bB \rightarrow \quad \frac{dA}{dt} \approx \frac{dx}{dt} = \underbrace{k_0 (c_A - x)^a}_{\text{Nekatalyzovaná reakce}} + \underbrace{k_1 (c_A - x)^a c_K}_{\text{Katalyzovaná reakce}}$$

**X** = koncentrace produktu P  
**c<sub>K</sub>** = koncentrace katalyzátoru  
**c<sub>A</sub>** = koncentrace složky A na počátku reakce v čase limitujícím k nule

**Nekatalyzovaná  
reakce**  
**k<sub>0</sub> → 0**

**Katalyzovaná  
reakce**  
**k<sub>1</sub> → ∞**

# Kinetické metody

Počátek reakce:  $t \rightarrow 0$ ;  $(c_A - x) \rightarrow c_A \Rightarrow$

$$\frac{dA}{dt} \approx \frac{dx}{dt} = k_0 c_A + k_1 c_A \cdot c_K \quad A = k_0 c_A + k_1 c_A \cdot c_K \cdot t$$

Rychlost reakce je úměrná  $c_K$  a v počátku reakce ji lze považovat za konstantní

## Podmínky analytického využití

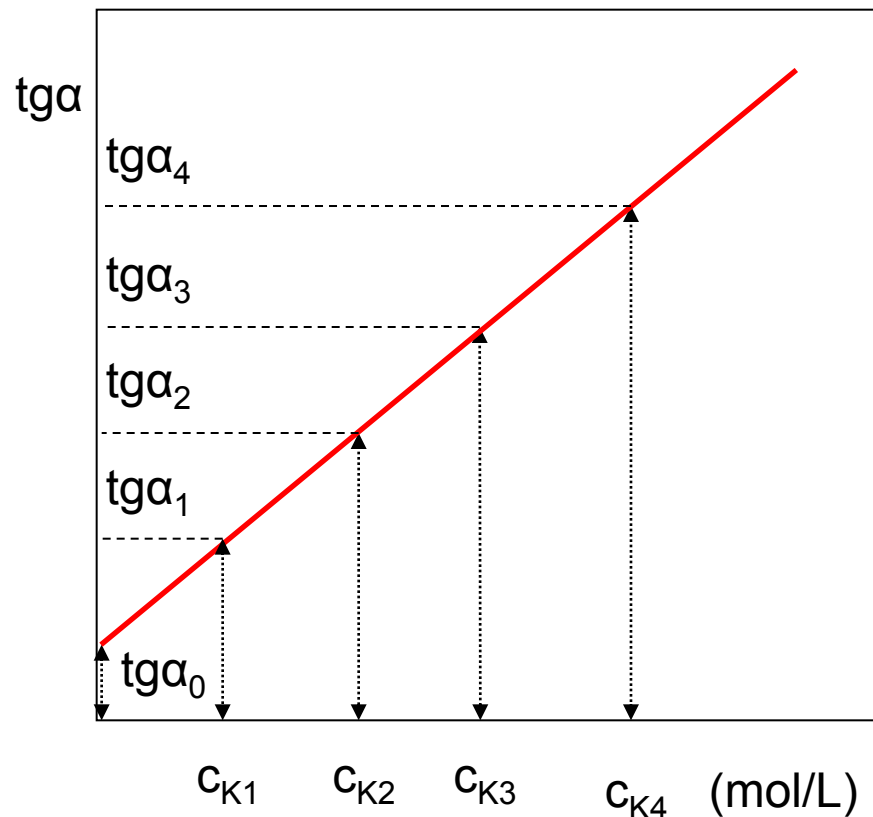
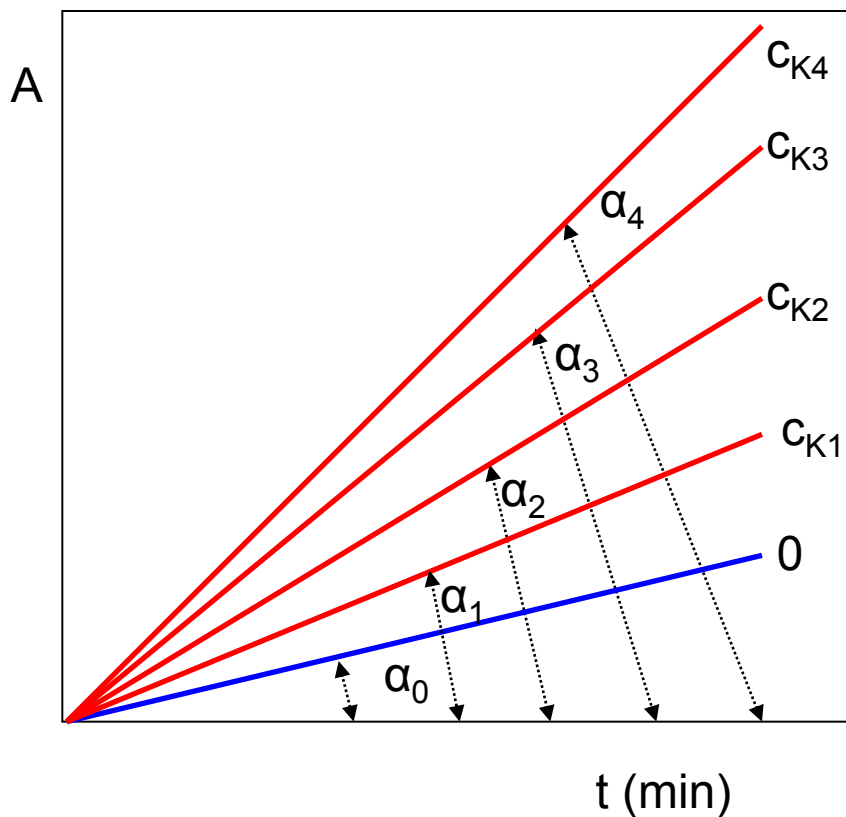
- Citlivé určení malého množství reakčního produktu  $P$  nebo složky  $A$
- Splnění Beer-Lambert-Bouguerova zákona
- Reakční rychlost nekatalyzované reakce musí být zanedbatelná vůči rychlosti katalyzované reakce

# Kinetické metody

- Vyhodnocení dat
  - a) Metoda tangent

$$\operatorname{tg} \alpha = k_0 c_A + k_1 c_A \cdot c_K$$

Kalibrační přímka

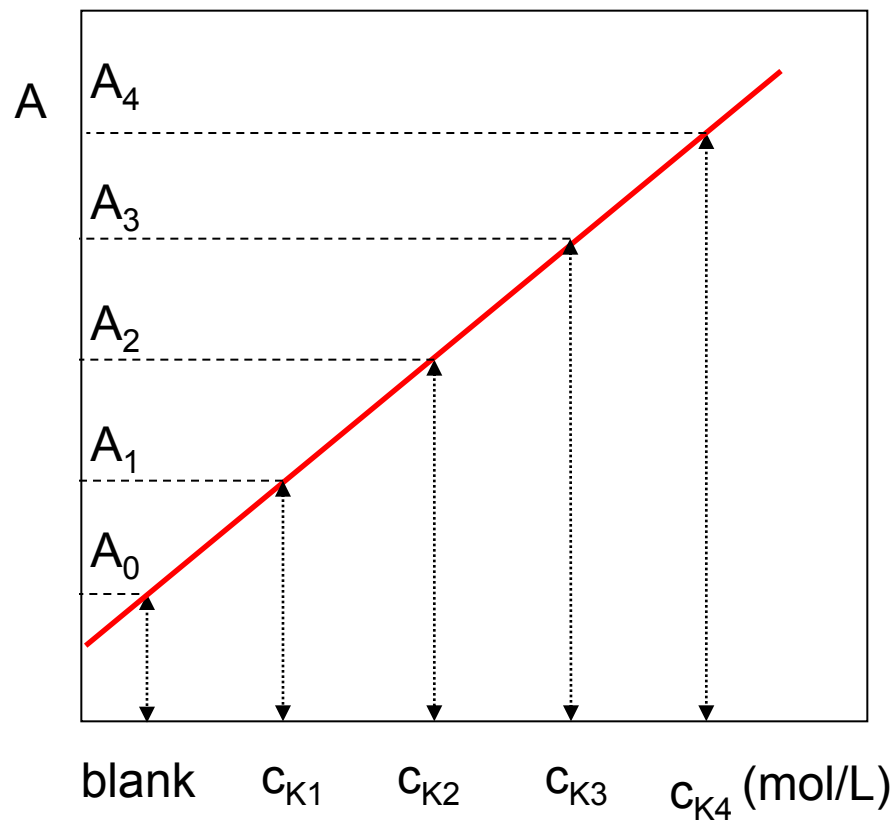
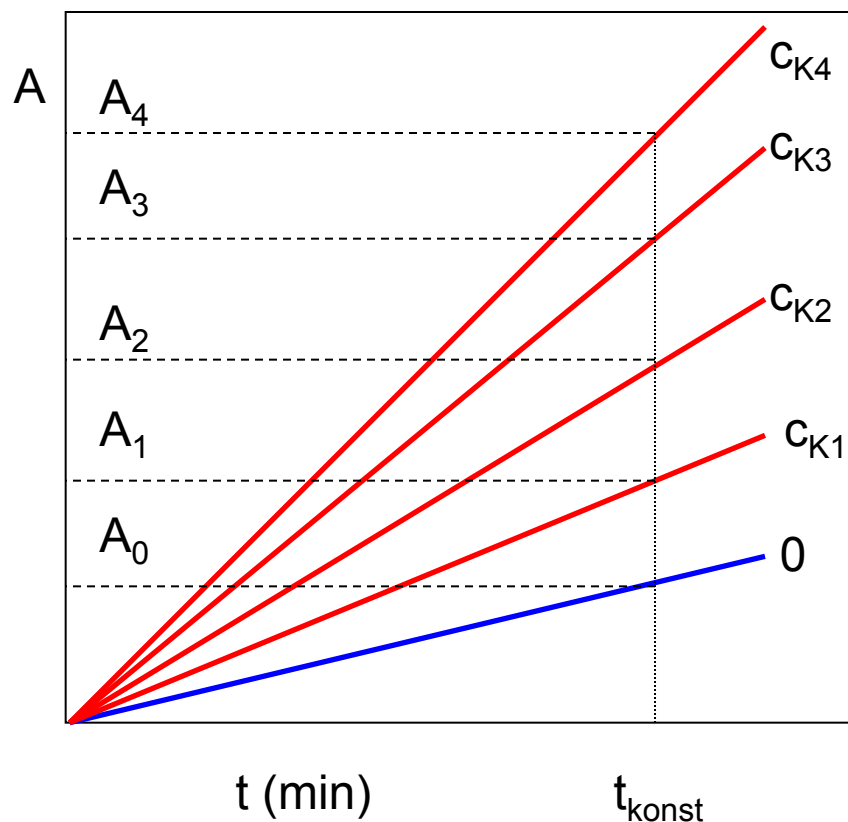


# Kinetické metody

- Vyhodnocení dat
  - b) Metoda konstantního času

$$A = k_0 c_A + k_1 c_A \cdot c_K$$

Kalibrační přímka

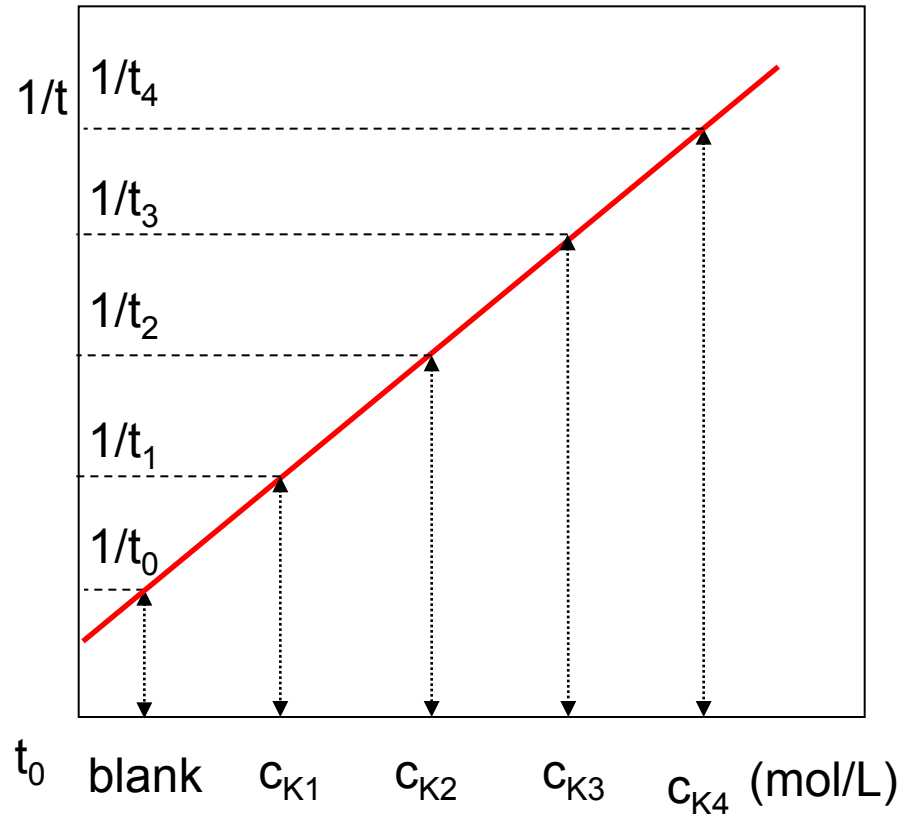
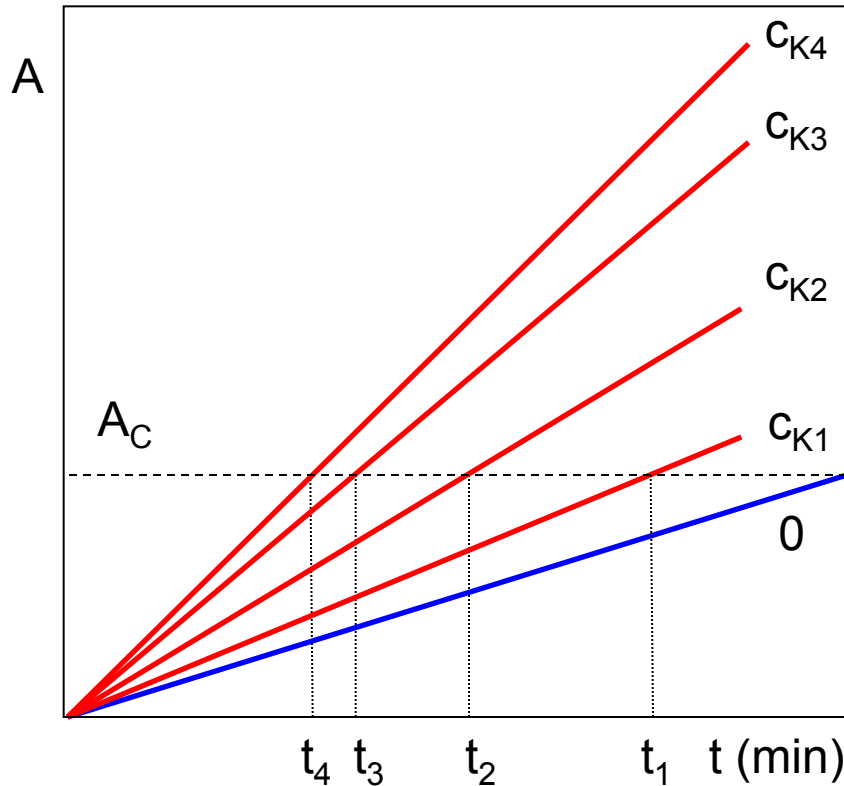


# Kinetické metody

- Vyhodnocení dat
  - c) Metoda fixní koncentrace reakčního produktu

$$\frac{1}{t} = k_0 c_A + k_1 c_A \cdot c_K$$

Kalibrační přímka



# Kinetické metody

## 2. Integrální technika

Je vhodná při nezanedbatelné změně  $c_A$  a při startu katalyzované reakce se zpožděním. Integrovaná forma diferenciální rovnice 1. řádu

$$\ln \frac{c_A}{c_A - x} = k \cdot c_k \cdot t \quad \log \frac{c_A}{c_A - x} = \frac{1}{2.303} \cdot k \cdot c_K \cdot t$$

$$\log \frac{c_A - x_0}{c_A - x} = \frac{1}{2.303} \cdot k \cdot c_K \cdot t$$

Platí i při souběhu katalyzované a nekatalyzované reakce. Vyhodnocení se provádí například metodou tangent

# Kinetické metody

## Příklad: Fotometrické stanovení fluoridů

- Katalytický účinek fluoridových iontů na reakci Zr(IV) v prostředí Cl<sup>-</sup> s organickými barvivy
- Princip: Depolymerace hydroxokomplexů Zr(IV) v přítomnosti F<sup>-</sup> - rychlá tvorba ternárních komplexů s:
  - Xylenolovou oranží
  - Methylthymolovou modří
  - Glycin-thymolovou modří
  - Arsenazo III
- Polymerní Zr(IV) reaguje s barvivy pomalu, avšak v přítomnosti F<sup>-</sup> se tvoří ZrF<sup>3+</sup>, ZrF<sub>2</sub><sup>2+</sup> a tyto rychle reagují s barvivem. Koncentrace fluoridů musí být substechiometrická vzhledem k Zr(IV). Nadbytek F<sup>-</sup> způsobuje rozklad chelátu a ztrátu zbarvení



# Kinetické metody

## Příklad: Fotometrické stanovení fluoridů

- Podmínky měření
  - Roztok Zr(IV) musí být starší (polymerace)
  - Zbarvení se vyvíjí po dobu 90 minut (Xylenol. Oranž)
  - $c_{\text{HCl}}$  v rozmezí 0.3 – 0.45 mol/L
  - $\lambda_m = 530 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 2.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Meze detekce  $10^{-3}$ -  $10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Rychlost a opakovatelnost reakce závisí na:
  - Teplotě
  - Iontové síle
  - Reakčním prostředím (doprovázející ionty)
- Nízká selektivita, nutnost maskování nebo separace rušících iontů (anionty P, As, S, Ox, Citr.)

# Kinetické metody

## Příklady fotometrických stanovení: katalýza oxidačních procesů

Prvek	Reakce	c (ng/mL)	$\lambda_{\max}$ (nm)
Cr(VI)	Oxidace ortho-di-anisidinu $\text{H}_2\text{O}_2$ v HCl	1 - 100	450
Fe(III)	Oxidace para-phentidinu $\text{H}_2\text{O}_2$ s 1,10-fenantrolinem jako aktivátorem	1 - 100	536
Co(II)	Oxidace alizarinové červeni $\text{H}_2\text{O}_2$ , alkal. p.	0.1 - 1	555

# Kinetické metody

## Příklady fotometrických stanovení: katalýza oxidačních procesů

Prvek	Reakce	c (ng/mL)	$\lambda_{\max}$ (nm)
Mo(VI)	Oxidace kys. rubea- novodíkové $\text{H}_2\text{O}_2$ v HCl	od 0.5	400
Cu(II)	Oxidace kyseliny sulfanilové $\text{H}_2\text{O}_2$	5 - 50	370
Ni(II)	Oxidace půs. $\text{H}_2\text{O}_2$ pyrokatechin -3,5-di- sulfonové kyseliny	1 - 10	420

# Kinetické metody

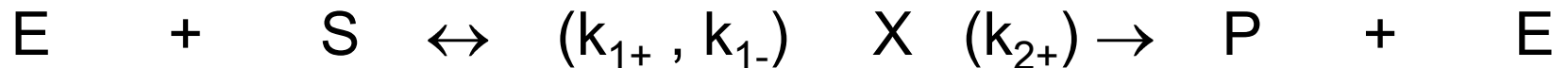
Příklady fotometrických stanovení:  
katalýza oxidačních procesů

Prvek	Reakce	c (ng/mL)	$\lambda_{\max}$ (nm)
Ag(I)	Oxidace kyseliny sulfanilové peroxodisíranem	1 - 35	535
V(V)	Oxidace kys. galové peroxodisíranem	0.1 – 0.8	425

# Kinetické metody

## Enzymově katalyzované reakce

- Stanovení:
  - Enzymové aktivity
  - Koncentrace substrátu



Enzym

Substrát

Meziprodukt

Produkt

Enzym

$[E]_0$  počáteční koncentrace enzymu

$[S]_0$  počáteční koncentrace substrátu

$[E] = [E]_0 - [X]$  ;  $[S] = [S]_0 - [X] \cong [S]_0$  ;  $[X] < [E]_0$  ;  $[E]_0 < [S]_0$

Ustálený stav:

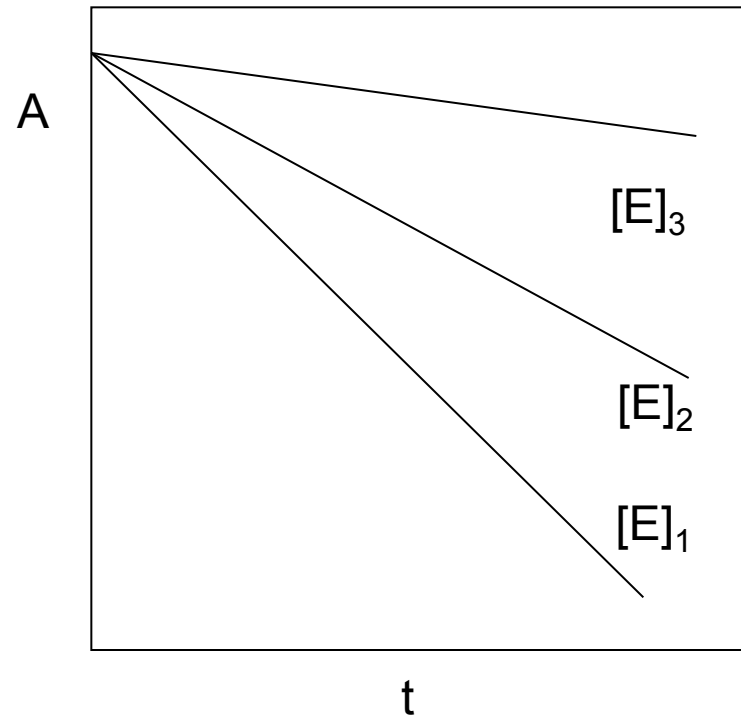
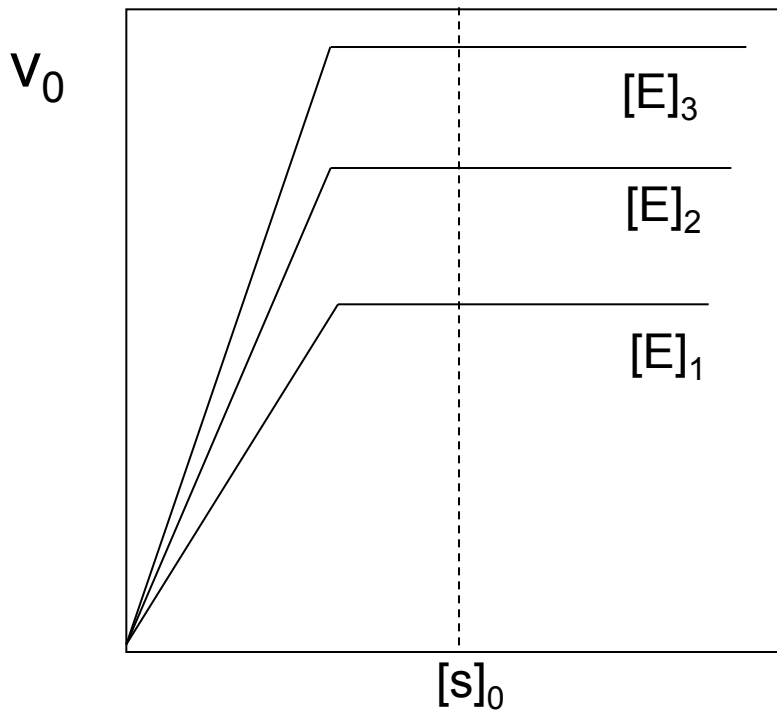
$$\frac{d[X]}{dt} = k_{1+} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0 - [X] - k_{1-} \cdot [X] - k_{2+} \cdot [X] = 0$$

# Kinetické metody

## Enzymově katalyzované reakce

Počáteční rychlost reakce  $v_0$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 + [K] = - \frac{d[S]}{dt} \approx [E]_0; [S]_0$$



# Kinetické metody

## Enzymově katalyzované reakce

- Vyhodnocení koncentrace enzymu metodou:
  1. tangent
  2. fixního času
    - Enzymy - vysoká selektivita, m.d.  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  mol/L při  $10^{-6}$  mol/L substrátu, skladování  $<5$  C, inaktivace  $>30$  C, inaktivace pH  $<5$ , pH  $>9$ , denaturace org. rozp., stabilizace vysokými konc. inertních solí.
    - Spektrofotometrické stanovení vybraných enzymů

# Kinetické metody

## Enzymově katalyzované reakce

<u>Enzym</u>	<u>Substrát</u>	<u>Produkt</u> (měří se nebo reaguje s indikátorem)	<u>Indikátor</u> (koenzym)
Lipáza Hydroláza Esteráza	Estery fluoresceinu	Fluorescein	-
Cholin esteráza	Indofenylacetát Butyrylthiochinolin	Indofenol Thiochinolin	<sup>a</sup> Dithiobis-(nitrobenzoát)
(LDH) Laktát-dehydrogenáza	Kyselina mléčná	Kyselina pyrohroznová	<b>NADH*</b>
Transamináza (GOT) glutamát-oxaloctové kys.	K. asparagová +k. $\alpha$ -ketoglutarová	Oxaloctová kys.	<b>NADH*</b>

\*Dihydrogen nikotinamid adenin dinukleotid difosfát

<sup>a</sup>Tvorba 2-nitro-5-merkaptobenzoátu (400-420 nm)



# Kinetické metody

## Enzymově katalyzované reakce

<u>Enzym</u>	<u>Substrát</u>	<u>Produkt</u> (měří se nebo reaguje s indikátorem)	<u>Indikátor</u> (koenzym)
Transamináza glutamát-pyro hroznové kyseliny (GPT)	Kyselina $\alpha$ - ketoglutarová + 1-alanin	Kys. pyrohroznová	<b>NADH*</b>