

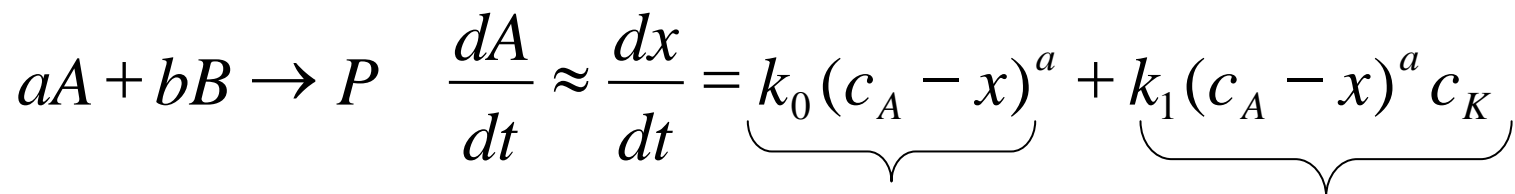
MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

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



X = koncentrace produktu **P**
c_K = koncentrace katalyzátoru
c_A = koncentrace složky **A** na počátku reakce v čase limitujícím k nule

**Nekatalyzovaná
reakce**
k₀ → 0

**Katalyzovaná
reakce**
k₁ → ∞

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

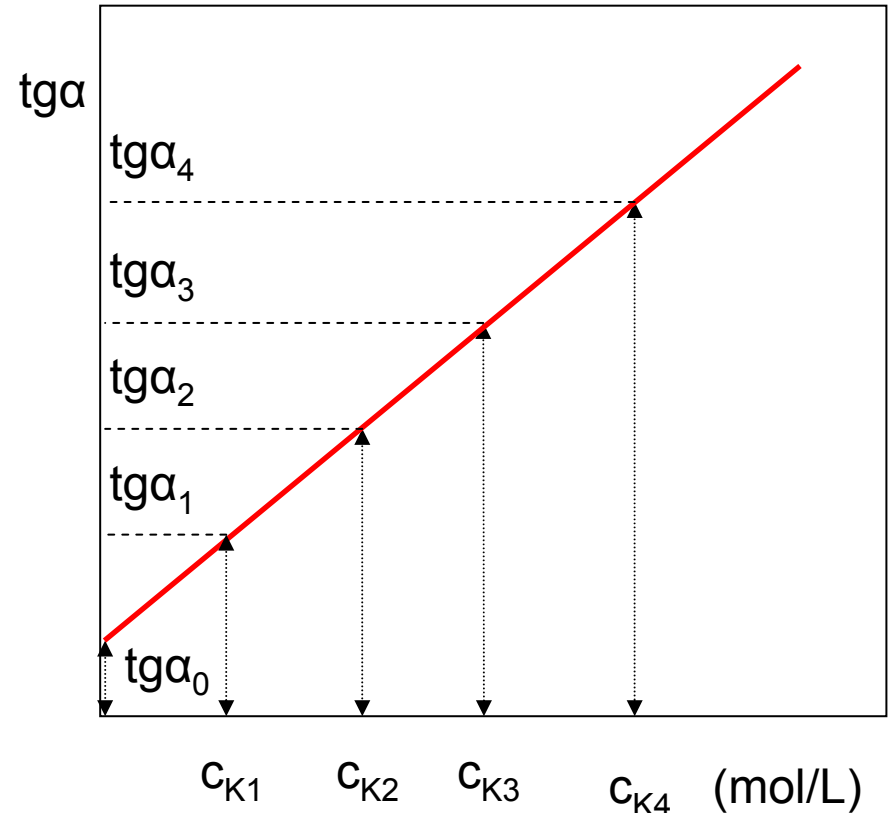
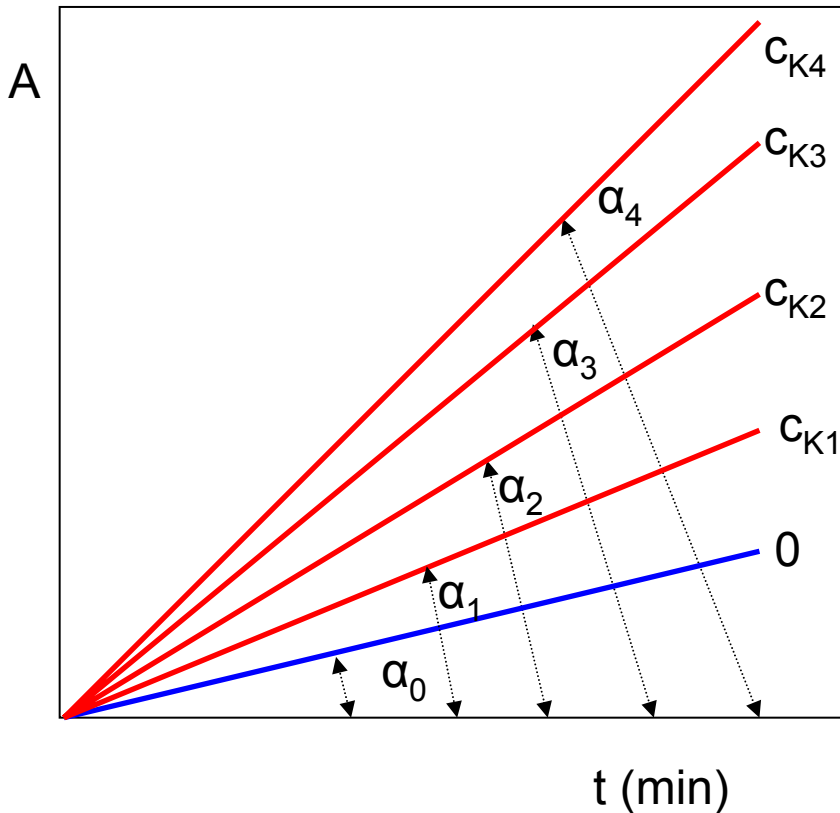
- Citlivé určení malého množství reakčního produktu P nebo složky A
- Splnění Beer-Lambert-Bouguerova zákona
- Reakční rychlost nekatalyzované reakce musí být zanedbatelná vůči rychlosti katalyzované reakce

Kinetické metody

- Vyhodnocení dat
 - a) Metoda tangent

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

Kalibrační přímka

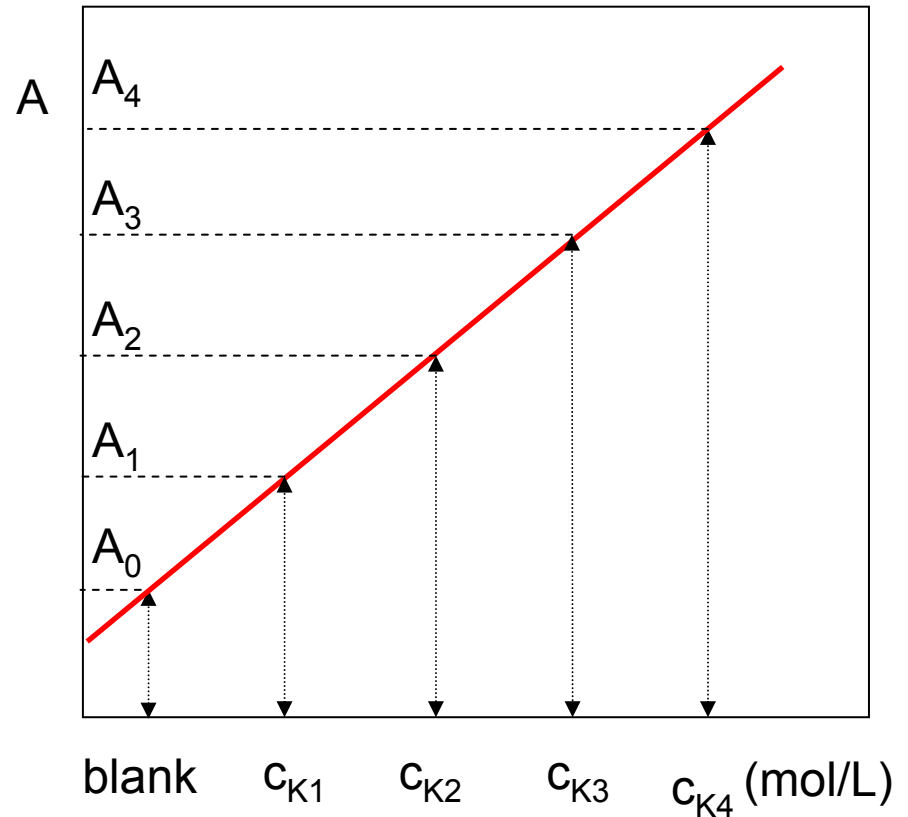
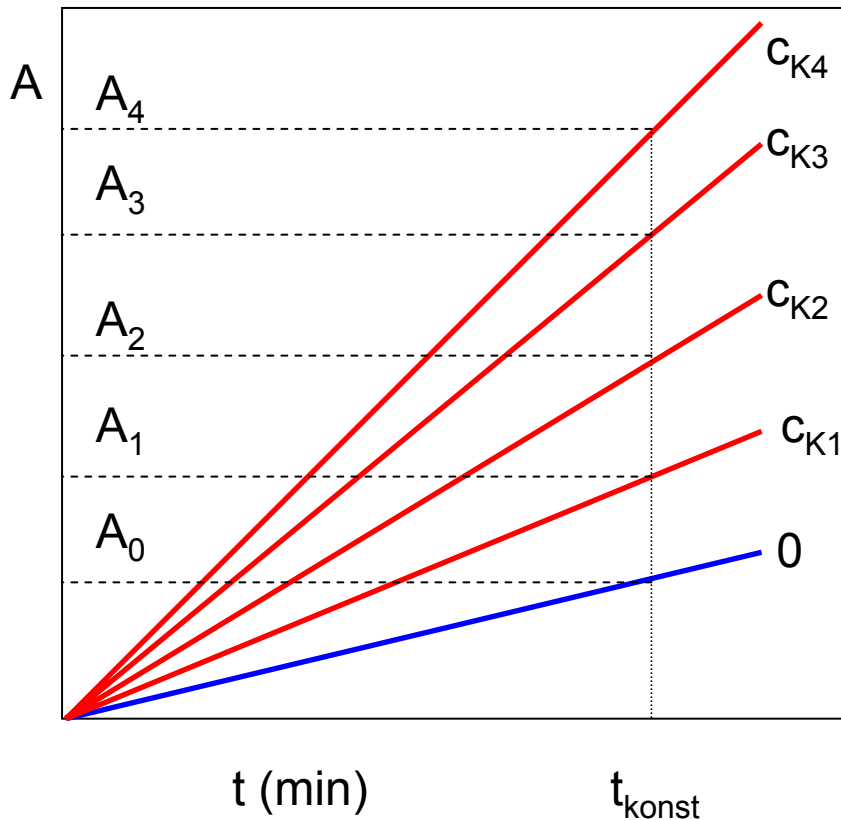


Kinetické metody

- Vyhodnocení dat
 - b) Metoda konstantního času

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

Kalibrační přímka

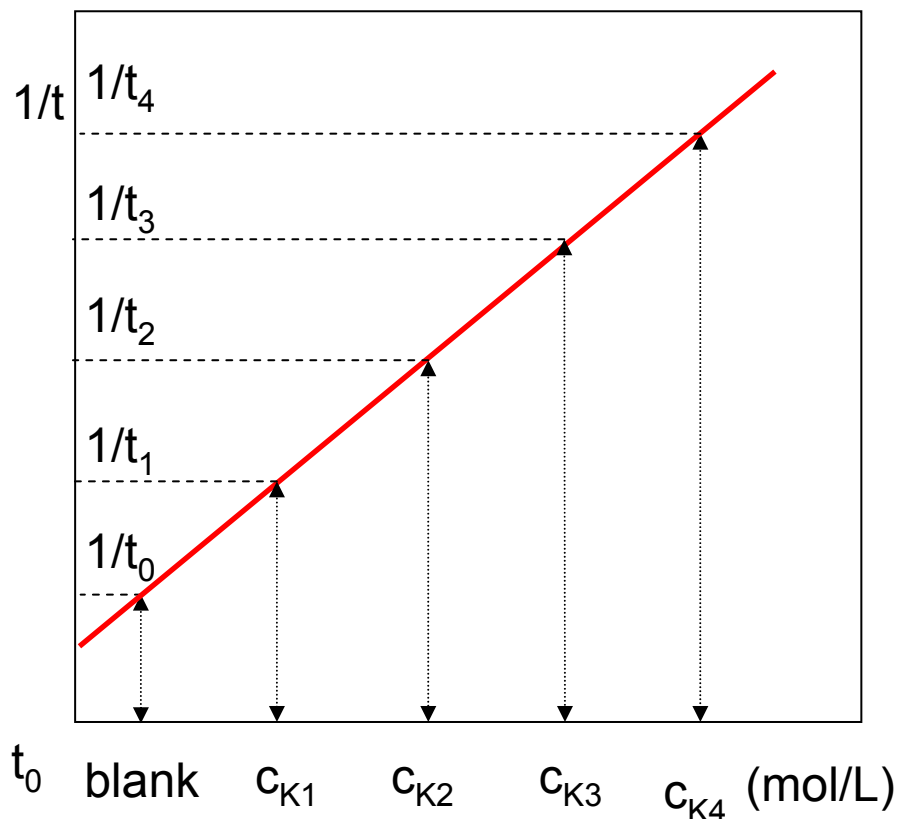
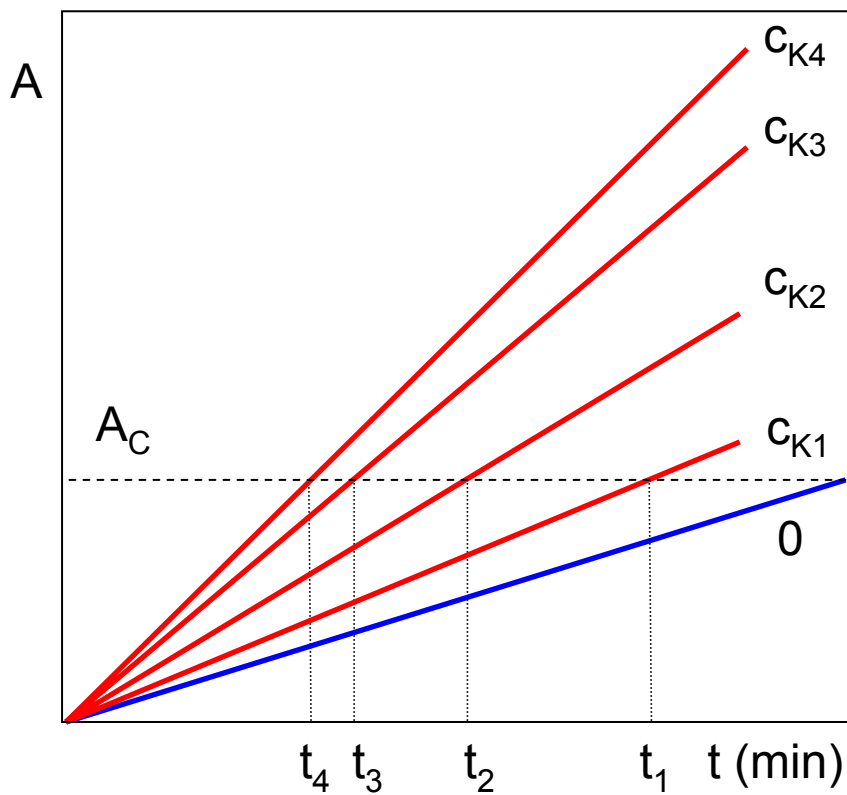


Kinetické metody

- 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. Integrovní 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⁻ s organickými barvivy
- Princip: Depolymerace hydroxokomplexů Zr(IV) v přítomnosti F⁻ - 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⁻ se tvoří ZrF³⁺, ZrF₂²⁺ a tyto rychle reagují s barvivem. Koncentrace fluoridů musí být substechiometrická vzhledem k Zr(IV). Nadbytek F⁻ 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_{HCl} v rozmezí 0.3 – 0.45 mol/L
 - $\lambda_m = 530 \text{ nm}$, $\varepsilon = 2.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- 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)	λ_{\max} (nm)
Cr(VI)	Oxidace ortho-di-anisidinu H_2O_2 v HCl	1 - 100	450
Fe(III)	Oxidace para-phentidinu H_2O_2 s 1,10-fenantrolinem jako aktivátorem	1 - 100	536
Co(II)	Oxidace alizarinové červeni H_2O_2 , alkal. p.	0.1 - 1	555

Kinetické metody

Příklady fotometrických stanovení:
katalýza oxidačních procesů

Prvek	Reakce	c (ng/mL)	λ_{\max} (nm)
Mo(VI)	Oxidace kys. rubea- novodíkové H_2O_2 v HCl	od 0.5	400
Cu(II)	Oxidace kyseliny sulfanilové H_2O_2	5 - 50	370
Ni(II)	Oxidace půs. H_2O_2 pyrokatechin -3,5-di- sulfonové kyseliny	1 - 10	420

Kinetické metody

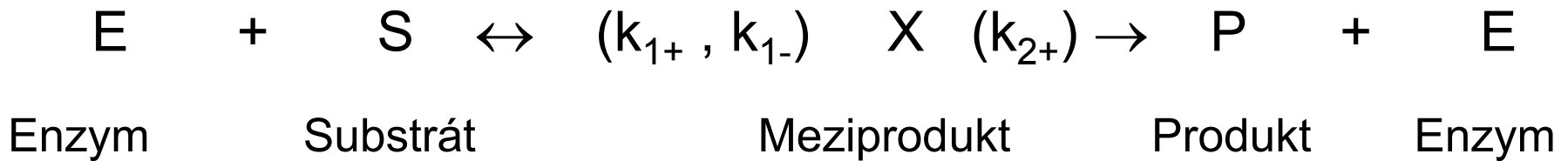
Příklady fotometrických stanovení:
katalýza oxidačních procesů

Prvek	Reakce	c (ng/mL)	λ_{\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



$[E]_0$ 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:

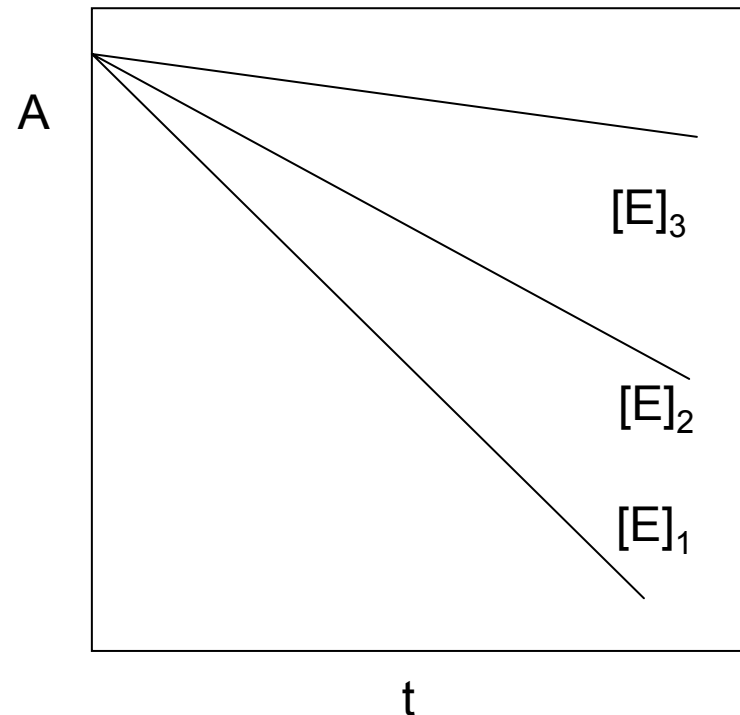
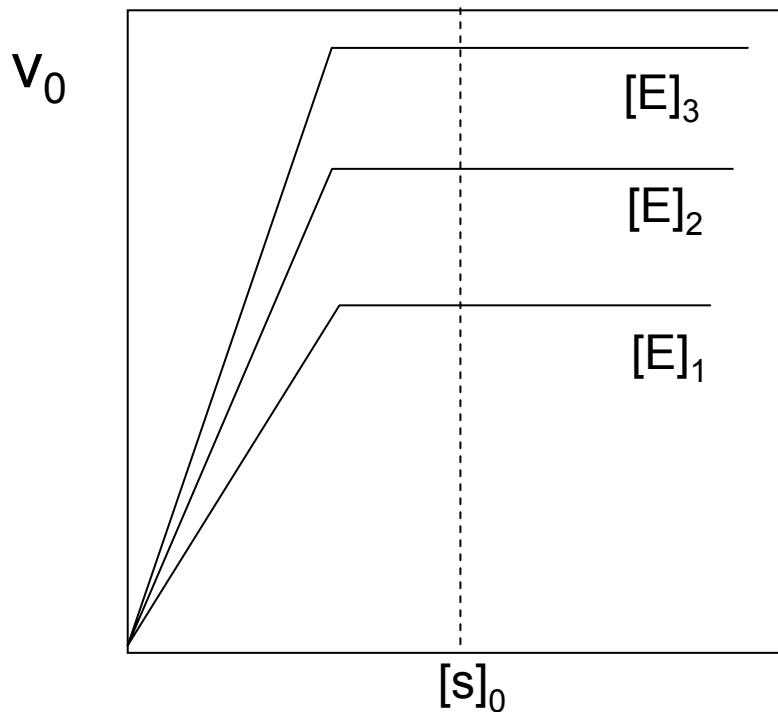
$$\frac{d[X]}{dt} = k_{1+} \cdot [S]_0 \cdot ([E]_0 - [X]) - k_{1-} \cdot [X] - k_{2+} [X] = 0$$

Kinetické metody

Enzymově katalyzované reakce

Počáteční rychlost reakce v_0

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_{2+} [X] = -\frac{d[S]}{dt} \approx [E]_0; [S]_0$$



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 $<5^{\circ}\text{C}$, inaktivace $>30^{\circ}\text{C}$, inaktivace $\text{pH}<5$, $\text{pH}>9$, 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 } }	^a Dithiobis-(nitrobenzoát)
(LDH) Laktát-dehydrogenáza	Kyselina mléčná	Kyselina pyrohroznová	NADH*
Transamináza (GOT) glutamát-oxaloctové kys.	K. asparagová +k. α-ketoglutarová	Oxaloctová kys.	NADH*

*Dihydrogen nikotinamid adenin dinukleotid difosfát

^aTvorba 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 α - ketoglutarová + 1-alanin	Kys. pyrohroznová	NADH*