

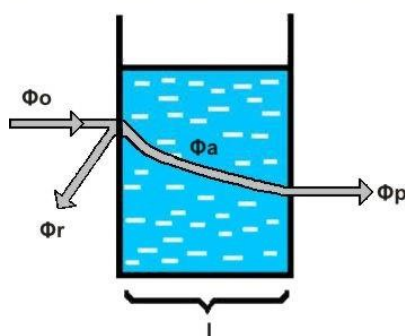
## SV2 I V2. OPTIČKE METODE U MEDICINSKOJ KEMIJI

Optičke metode mogu poslužiti kao kvalitativne i kvantitativne metode analitičke kemije. Identifikacija ili određivanje količine tvari u uzorku temelji se na mjerenju nekog kemijskog ili fizikalnog svojstva ispitivane tvari koje ovisi o njenoj količini.

Važnost kvantitativne analize vrlo je velika. Na njenim su rezultatima postavljeni osnovni kemijski zakoni. Ona daje uvid u sastav nekog novoizoliranog ili novosintetiziranog spoja, rješavanje mnogih pitanja koja su u vezi s kemijskim procesima *in vitro* ili *in vivo* i dobivanje podataka o čistoći i upotrebljivosti nekog spoja kao lijeka, kao živežne namirnice ili kao sirovine u kemijskoj industriji. Kvantitativna analiza je prijeko potrebna i medicinskim znanostima, biokemiji, fiziologiji, patofiziologiji, sudskoj medicini, a osobito internoj medicini, gdje služi kao pomagalo u dijagnozi i prognozi oboljenja.

### 1. Spektrofotometrijsko određivanje mase željeza

Spektrofotometrijska određivanja provode se pomoću uređaja koji koriste svjetlost točno određene valne duljine (spektrofotometri). U fotometriji se koriste uređaji s određenim spektralnim područjem koja se dobivaju uz pomoć optičkih filtara (fotometri). Fotometrija je fizikalno-kemijska metoda koja se temelji na mjerenju apsorpcije svjetla koje prolazi kroz određenu tvar. Naime, apsorpcija ovisi o koncentraciji tvari u otopini i veća je u otopini veće koncentracije.



Slika 2.1. Kiveta

Ako je ispitivana tvar otopina, dio ulazne svjetlosti će se odbiti od otopljenih čestica te se neće uistinu apsorbirati. Stoga možemo postaviti sljedeću jednakost:

$$\Phi_0 = \Phi_r + \Phi_a + \Phi_p$$

gdje je  $\Phi_0$  tok upadne svjetlosti,  $\Phi_a$  tok apsorbirane,  $\Phi_p$  tok propuštene, te  $\Phi_r$  tok reflektirane svjetlosti koji je prosječno oko 4% upadnog toka pa se zanemaruje. Stoga možemo pisati:

$$\Phi_0 \approx \Phi_a + \Phi_p$$

Tok upadne i propušte svjetlosti odnose se prema Lambert-Beerovom zakonu:

$$\Phi_p = \Phi_0 10^{-\varepsilon cl}$$

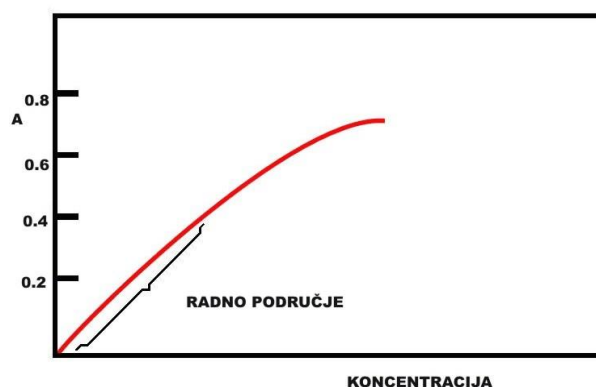
gdje je  $\varepsilon$  molarni koeficijent apsorpcije,  $c$  koncentracija ispitivane tvari te  $l$  debljina kivete kroz koju svjetlost prolazi. Molarni koeficijent apsorpcije ovisi o kemijskoj prirodi otopljene tvari, o upotrebljenom otapalu i o valnoj duljini upadne svjetlosti. Za svaku ispitivanu tvar  $\varepsilon$  je karakteristična vrijednost.

Logaritmiranjem i preuređenjem Lambert-Beerova zakona dolazimo do veličine koju zovemo *apsorbancija*:

$$\log(\phi_p / \phi_0) = -\varepsilon cl \quad \text{ili} \quad \log(\phi_0 / \phi_p) = \varepsilon cl = A$$

Izraz apsorpcija se odnosi na fizikalni proces apsorpcije svjetlosti, dok se absorbancija odnosi na matematičku vrijednosti. Također, absorbancija ne mjeri uvijek apsorpciju, ona je samo prikaz odnosa propuštene svjetlosti prema upadnoj svjetlosti, a ne i mehanizma kojim se intenzitet svjetlosti smanjuje. Unatoč tome, absorbancija se može koristiti za određivanje koncentracija otopina.

Vidi se da je absorbancija uz konstantnu debljinu sloja linearno proporcionalna koncentraciji tvari. Kada se vrijednosti absorbancija nanesu na ordinatu, a pripadne koncentracije na apscisu, dobiva se baždarna krivulja koja je pri nižim koncentracijama u obliku pravca koji prolazi kroz ishodište (slika 2.2).



**Slika 2.2.** Baždarna krivulja

Apsorbancija je bezdimenzijska veličina, debljinu sloja obično izražavamo u cm, a koncentraciju u  $\text{mol dm}^{-3}$ . Molarni koeficijent apsorpcije bit će u tom slučaju izražen jedinicom  $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , što znači da je numerički jednak apsorpciji koju pokazuje otopina ispitivane tvari koncentracije  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  u kiveti debljine sloja od 1 cm.

Veličina koja se instrumentom mjeri je absorbancija, a baždari se uz pomoć slijepe probe. Slijepe proba sadrži sve sastojke reakcijske smjese osim tvari čiju koncentraciju

određujemo. Stoga se pomoću slijepe probe fotometar podešava na nulu. Na slici 3.3. prikazan je spektrofotometar kakav ćemo koristiti prilikom izvođenja vježbe.



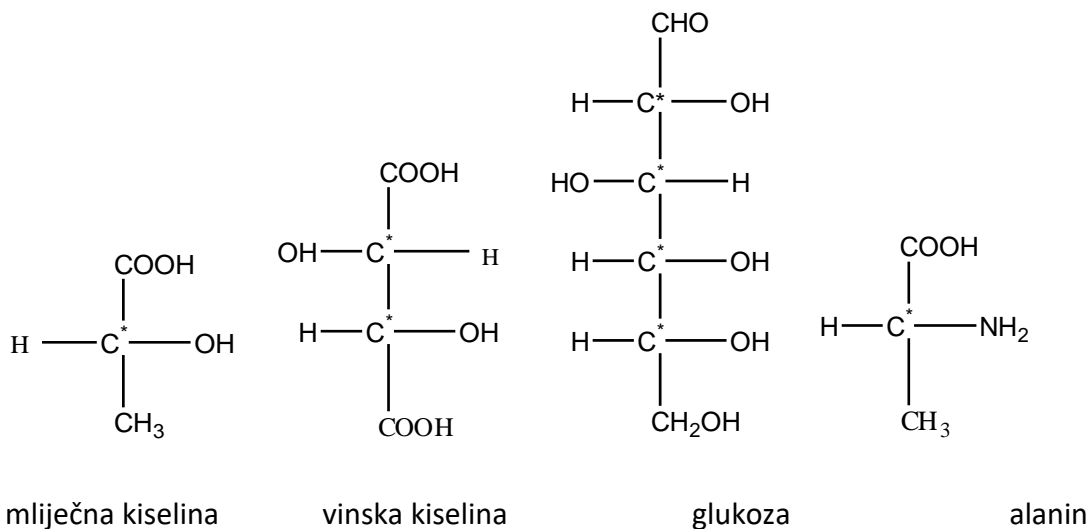
**Slika 2.3.** Spektrofotometar

## 2. Polarimetrija

Polarimetrija je metoda kojom se mjeri zakretanje ravnine polarizirane svjetlosti. Naime, neke tvari u prirodi imaju sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti te se nazivaju *optički aktivne* tvari ili *kiralne* tvari. Ta sposobnost vezana je uz asimetričnu građu molekule te tvari. Svaki atom koji na sebi ima vezane različite atome ili skupine naziva se *kiralni centar* te molekule. Kiralni centri označavaju se zvjezdicom i može ih biti više u istoj molekuli.

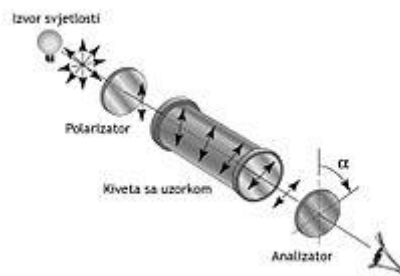
Dva spoja koji se odnose kao predmet i njegova zrcalna slika zovu se *enantiomeri*. Jedan od enantiomera će zakretati ravninu polarizirane svjetlosti u smjeru kazaljke na satu i tada govorimo o + zakretanju, a drugi će zakretati obrnuto od smjera kazaljke na satu i njega označavamo kao - enantiomer. Veličina zakretanja iskazuje se u stupnjevima i radijanima.

Optički su aktivne, na primjer vinska kiselina, mliječna kiselina, alanin, askorbinska kiselina (C-vitamin), različiti šećeri (glukoza), zatim alkaloidi itd.



**Slika 2.4.** Optički aktivne molekule

Na slici 2.4. možemo vidjeti da vinska kiselina ima dva kiralna C-atoma, glukoza četiri, a mliječna kiselina i alanin po jedan.



**Slika 2.5.** Polarimetar

Instrumenti kojima se mjeri zakretanje polarizirane svjetlosti zovu se polarimetri. Polarimetar sadrži polarizator koji prevodi nepolariziranu svjetlost (svjetlost koja titra u svim ravninama) u polariziranu svjetlost (svjetlost koja titra samo u jednoj ravnini). Postoje određeni kristali koji pokazuju tu sposobnost i oni se koriste u polarimetrima (npr. prozirni kalcit,  $\text{CaCO}_3$ ). Polarizatori mogu apsorbirati neželjene polarizacijske ravnine, ili mogu nepolariziranu svjetlost podijeliti na dvije ravnine okomite jednu na drugu. Da bi se dobilo polarizirano svjetlo koje titra samo u jednoj ravnini, mora se ukloniti jedna od tih zraka. Tome služi Nicolova prizma.

Polarimetar se sastoji od duge kivete u koju se stavlja uzorak. Na svakom kraju kivete je Nicolova prizma, prizma na ulazu svjetla naziva se polarizator, a na izlazu iz uzorka analizator. Polarizirano svjetlo se propušta kroz kivetu, a prizma na drugom kraju, odnosno analizator koji se nalazi do oka, zakreće se i tako postupno smanjuje osvjetljenje polja sve dok se potpuno ne zamrača.

Ako među paralelne Nicolove prizme koje su smještene tako da je vidno polje potpuno osvijetljeno, stavimo otopinu optički aktivne tvari, tada u analizatoru nećemo više vidjeti potpuno osvijetljenje.



Da bismo dobili potpuno osvijetljenje, moramo zaokrenuti Nicolovu prizmu analizatora za određeni kut. Zaokret mora biti upravo onolik za koliko je otopina optički aktivne tvari zaokrenula ravninu polariziranog svjetla. Kut zakretanja se zatim očitava na skali.

Veličina optičkog zakretanja ovisi o vrsti tvari, sadržaju tvari u otopini, debljini sloja otopine kroz koju prolazi svjetlo, valnoj duljini svjetla, temperaturi i vrsti otapala:

$$\alpha = \frac{\alpha_m \cdot m \cdot l}{V}$$

$\alpha$ , kut optičkog zakretanja;  $\alpha_m$ , specifična moć optičkog zakretanja;  $m$ , masa optički aktivne tvari otopljene u otopini volumena  $V$ ;  $l$ , debljina sloja otopine (duljina kivete).

$\alpha_m$  se dobije mjerenjem kuta zakretanja svjetlosti 1 g optički aktivne tvari otopljene u 100 cm<sup>3</sup> otopine u kiveti duljine 1 dm, pa je jedinica stupanj cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>dm<sup>-1</sup>.

**Tablica 2.1.**  $\alpha_m$  nekih tvari u vodenoj otopini pri 20°C i uz  $\lambda = 589 \text{ nm}$

optički aktivna tvar	$\alpha_m / ^\circ \text{cm}^3 \text{g}^{-1} \text{dm}^{-1}$
glukoza	+52,7
fruktoza	-92,4
saharoza	+66,5
vinska kiselina	+9,4
mliječna kiselina	-2,9
laktoza	+55,3
maltoza	+137,5
invertni šećer	-20,6
alanin	+2,7
vitamin C	+23,0

**Primjer.** Odredite masenu koncentraciju otopine glukoze koja zakreće ravninu polarizirane svjetlosti za kut  $\alpha = +1,8^\circ$  u kiveti duljine 20 cm.  $\alpha_m = + 52,7^\circ \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ .

$$\alpha = \frac{\alpha_m m l}{V} \Rightarrow \frac{m}{V} = \frac{\alpha}{\alpha_m l} = \frac{1,8^\circ}{52,7^\circ \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1} \cdot 2 \text{ dm}} = 0,017 \text{ g cm}^{-3}$$

Masena koncentracija  $\gamma$  (glukoza) =  $0,017 \text{ g cm}^{-3}$ .

## IZVOĐENJE V2:

### a) Spektrofotometrijsko određivanje mase željeza u uzorku

#### MATERIJAL:

- Osnovna otopina željezova (III) iona je otopina amonijeva željezova (III) sulfata masene koncentracije,  $\gamma(\text{Fe}^{3+}) = 16 \mu\text{g cm}^{-3}$  (otopina je pripravljena otapanjem soli u otopini kloridne kiseline koncentracije,  $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ).
- Otopina kloridne kiseline koncentracije  $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol dm}^{-3}$
- Otopina reagensa: otopina kalijeva tiocijanata koncentracije  $c(\text{KSCN}) = 3 \text{ mol dm}^{-3}$
- Uzorak: otopina željezova (III) iona nepoznate koncentracije, volumena  $1,8 \text{ cm}^3$

#### UPUTE ZA RAD:

#### 1. Priprema reakcijskih smjesa sa standardima za izradu baždarnog pravca i reakcijske smjese s uzorkom

Standardi su serija određenih volumena osnovne otopine koji sadrže poznate vrijednosti rastuće mase željezova (III) iona.

- pripremite slijepu probu (epruveta 0)
- pripremite četiri reakcijske smjese sa standardima (epruvete 1-4)
- pripremite reakcijsku smjesu s uzorkom
- svaku od reakcijskih smjesa 1-4, kao i uzorak nepoznate koncentracije treba pripremiti 3 puta

	Broj epruvete					
	0	1	2	3	4	Uzorak
Volumen osnovne otopine $\text{Fe}^{3+}$ (br.ep.0-4) ili volumen uzorka/ $\text{cm}^3$	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	npr. 1,8
Volumen otopine HCl / $\text{cm}^3$	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volumen destilirane vode / $\text{cm}^3$	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	*
Volumen otopine KSCN / $\text{cm}^3$	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

\*destilirane vode dodati toliko da ukupni volumen smjese iznosi  $10 \text{ cm}^3$

Reakcijske smjese snažno promućkajte, ulijte u kivete i ODMAH izmjerite apsorbancije prema slijepoj probi pri  $\lambda = 500 \text{ nm}$ .

Postupak provesti na sljedeći način:

- slijepu probu ulijte u kivetu (malo iznad oznake), obrišite kivetu i stavite je u spektrofotometar;
- pritiskom na dugme „zero“ podesite apsorbanciju na nulu ( $A = 0,000$ );
- kivetu sa slijepom probom odložite neposredno uz spektrofotometar jer je potrebna za podešavanje nule prije svakog pojedinačnog mjerenja;
- prvu reakcijsku smjesu standarda (epruveta 1) ulijte u novu kivetu, obrišite, stavite umjesto slijepe probe u fotometar i očitajte apsorbanciju
- pomoću slijepe probe podesite  $A = 0,000$
- nastavite mjerenje za drugu epruvetu standarda 1, itd.
- ukoliko su tri mjerenja apsorbancije za isti standard približno jednaka, zbrojite ih i podijelite s 3;
- dobivenu srednju vrijednost apsorbancije za određeni standard upišite u tablicu i ucrtajte u baždarni pravac
- ukoliko jedno od tri mjerenja apsorbancije za isti uzorak znatno odstupa, to mjerenje odbacite te izračunajte srednju vrijednost od preostalih dviju apsorbancija
- vrijednosti apsorbancija upišite u tablicu

## 2. Izrada baždarnog pravca:

- na milimetarskom papiru nacrtajte koordinatni sustav definiran masom  $\text{Fe}^{3+}$  na apscisi i apsorbancijom na ordinati
- ucrtajte eksperimentalne točke i nacrtajte pravac (baždarni pravac)

## 3. Određivanje mase željezova (III) iona u uzorku

Prema izmjerenoj vrijednosti apsorbancije grafički odredite masu  $\text{Fe}^{3+}$  u uzorku očitavanjem iz baždarnog pravca. Vrijednost upišite u tablicu.

MASA $\text{Fe}^{3+}$ u reakcijskoj smjesi/ $\mu\text{g}$	0	8	16	24	32
APSORBANCIJA izmjerena prema slijepoj probi					

APSORBANCIJA	
MASA $\text{Fe}^{3+}$ u uzorku nepoznate koncentracije/ $\mu\text{g}$	





**b) Računski zadaci (dobiveni od voditelja vježbi)**



Potpis:

