

TRNAVSKÁ UNIVERZITA V TRNAVE



FAKULTA ZDRAVOTNÍCTVA A SOCIÁLNEJ PRÁCE
TRNAVSKEJ UNIVERZITY V TRNAVE
Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve



Recenzenti:

doc. RNDr. Martina Horváthová, PhD.

doc. Ing. Stanislava Blažíčková, PhD.

Mária Dubovská

NÁVODY NA CVIČENIA
Z PREDMETU
BIOCHÉMIA

Vysokoškolské učebné texty



TRNAVA 2018

© Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce
Trnavskej univerzity v Trnave, 2018
Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve

ISBN 978-80-568-0126-0

OBSAH

1. Optické metódy	7
1.1 Energia	8
1.2 Spektrofotometria v UV a viditeľnej oblasti	9
1.2.1 Intenzita absorpcie	10
1.2.2 Experimentálna technika	12
1.2.3 Rozpúšťadlá	13
1.3 Infračervená spektrofotometria	14
1.3.1 Druhy optických spektier	15
1.4 Rozdelenie optických spektrálnych metód	16
1.5 Základné konštrukčné prvky spektrálnych metód	18
2. Základné metódy na izoláciu látok z buniek, tkanív a telesných tekutín	20
2.1 Extrakcia	20
2.2 Homogenizácia	21
2.3 Dialýza a ultrafiltrácia	23
2.4 Zrážacie metódy	24
3. Koncentrovanie a konzervovanie látok	26
3.1 Koncentrovanie látok	26
3.2 Sterilizácia a konzervovanie roztokov	28
4. Biochemické vyšetrenie krvi	30
5. Biochemické vyšetrenie moču	32
5.1 Moč – vlastnosti, zloženie	32
5.2 Vyšetrovanie moču	33

Protokoly

6. Závislosť absorbancie od koncentrácie roztoku	37
7. Kontrola presnosti pipetovania fotometricky	39
8. Závislosť pH od koncentrácie roztoku	42
9. Príprava a titrácia octanového pufru	45
10. Meranie hustoty roztokov	48

1. OPTICKÉ METÓDY

- **Optické metódy** – Základom je interakcia hmoty s elektromagnetickým žiarením s rôznou vlnovou dĺžkou [1] = SPEKTROFOTOMETRICKÉ METÓDY
- **Využitie** – identifikácia vzorky
– koncentrácia vzorky
- **Priebeh interakcie** – Hmota absorbuje časť energie [E] zo žiarenia → žiarenie sa odrazí s menšou E → molekula (hmota) prijala viac E → e⁻ sa dostáva na vyššiu vrstvu (**excitovaný = vzbudený stav** – nestabilný) → molekula sa snaží zbaviť prebytočnej E → vyžiari prebytočnú E → e⁻ klesne na nižšiu vrstvu.
- **Výsledok interakcie** – Výsledkom je zníženie rýchlosti šírenia žiarenia alebo zmena jeho orientácie. Obidve zmeny sa dajú určiť na základe INDEXU LOMU, ktorý ďalej určuje (charakterizuje) polarizovateľnosť molekuly.
REFRAKTOMETRIA – meria index lomu
DISPERZIA – je závislosť indexu lomu od λ
- **Energetické nároky na zmeny v rozložení a v pohybe e⁻, atómov a molekúl:**
 - energeticky najnáročnejšie sú zásahy do pohybu e⁻ vyvolané žiarením z UV alebo VIDITEĽNEJ oblasti;
 - menšie energetické nároky sú z IČ oblasti spektra;

1.1 Energia

- základná vlastnosť elektromagnetického žiarenia
- charakterizujeme ju: – λ (vlnová dĺžka)
 - ν (frekvencia)
 - $\bar{\nu}$ (vlnčet)

$$\lambda \times \nu = c$$

c – rýchlosť svetla ($3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)

$$\bar{\nu} = 1/\lambda = \lambda^{-1}$$

JEDNOTKY λ [$\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$, $\mu\text{m} = 10^{-6}$]

PLANCKOVA ROVNICA:

$$E = h \times \nu$$

čiže ν (ní) lineárne závisí od E

Využitie: λ – v UV a viditeľnej oblasti
 ν – v IČ oblasti

1.2 Spektrofotometria v UV a viditeľnej oblasti

Spektrofotometria sa zaoberá excitáciou, pri ktorej prechádza e⁻ z jednej elektrónovej hladiny do druhej.

• **Princíp absorpčnej spektrofotometrie: Zdroj žiarenia** (napr. vodíková výbojka pri UV žiarení) vydáva určité množstvo energie vo forme svetelných lúčov, ktoré usmerňujú a odrážajú v prístroji rôzne zrkadlá a pod. Lúče ďalej prechádzajú cez **filter**, ktorý vložíme do prístroja podľa toho, v ktorej oblasti elektromagnetického žiarenia (UV, IČ...) naša skúmaná látka v **kyvete** absorbuje žiarenie (tzn. že elektrón prijme časť energie a dostane sa na vyššiu energetickú vrstvu). Žiarenie, ktoré sa neabsorbovalo, prechádza cez hmotu ďalej, ale už s nižšou energiou vo forme lúčov (fotónov), ktoré prechádzajú prostredím a dostávajú sa na **detektor**, ktorý premení svetelnú energiu na elektrickú a tá je zosilnená **zosilňovačom**, pripojeným na detektor tak, aby sa energia dala zaznamenať a **indikátor** túto hodnotu zaznamená napr. ručičkou alebo číslom (to je výsledná hodnota absorbancie, ktorá bola v prístroji vypočítaná tak, že od energie vyslanej zo zdroja žiarenia E sa odčítala energia E_2 , ktorá bola zaznamenaná detektorom. Výsledkom je energia E_1 , ktorá bola absorbovaná atómami skúmaného prvku.

Ľudské oko je citlivé na svetlo s $\lambda = 400 - 750 \text{ nm}$, čo je *viditeľná oblasť*.

Za fialovou časťou viditeľného spektra nasleduje *ultrafialová oblasť*:

- blízka **190 – 400 nm**
- ďaleká **50 – 190 nm** (*Rtg*)

Atmosférický O_2 začína absorbovať až pri 190 nm (pri menšej λ sa musí O_2 zo spektrometra vytlačiť pomocou N_2 alebo sa musí pracovať vo vákuu)

- v praxi sa využíva *viditeľná a UV oblasť*.

1.2.1 Intenzita absorpcie

- pre kvantitatívne merania sa musí uvažovať s absorpciou žiarenia s konštantnou energiou

E = **monochromatické žiarenie**

- absorpcia žiarenia sa riadi podľa **Lambertovho-Beerovho zákona**:

$$\ln \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = k \times n$$

Legenda:

$I_{0\lambda}$ a I_λ – intenzity látkou prepusteného ž.

k – konštanta λ

n – počet molov absorbujúcej látky v optickej dráhe žiarenia

Hodnota n je úmerná molovej koncentrácii c roztoku a dĺžke d optickej dráhy v roztoku:

$$\ln \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = \varepsilon \times c \times d$$

Legenda:

$\ln \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda}$ – absorbancia [A]

ε – molový absorpčný (extinkčný) koeficient

– má rozmer $\text{dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

A – je bezrozmerné číslo

Ak nie je známa molová koncentrácia roztoku, používa sa alternatívna rovnica:

$$\log \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = A = a \times \zeta \times d$$

Legenda:

ζ – koncentrácia (hmotnosť látky v objeme roztoku)

a – konštanta úmernosti – špecifický absorpčný koeficient

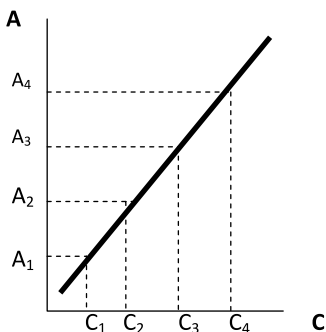
Na grafické znázornenie výsledkov merania sa sleduje závislosť:

1. A od λ

2. T od λ (T – transmitancia = prevrátená hodnota A ; $T = I / I_0$)

Na kvantitatívne znázornenie (stanovenie) určitej látky treba zostrojiť **kalibračnú krivku** závislosti A od koncentrácie c ; $A = f(c)$ pri konštantnej λ

Po odmeraní absorpcie (A) vzorky s neznámou koncentráciou (c) sa koncentrácia látky určí pomocou kalibračnej krivky.



V roztoku s viacerými absorbujúcimi zložkami je výsledná A súčtom absorpcií jednotlivých zložiek:

$$A = \sum A_i = d \times \sum \varepsilon_i \times c_i$$

1.2.2 Experimentálna technika

Základná optická zostava:

- **zdroj žiarenia** – vodíková lampa – UV ž.
– volfrámová žiarovka – viditeľná oblasť

⇓

- **hranol** – na ňom alebo na optickej mriežke sa rozkladá žiarenie

⇓

- **štrbiny** – prechodom cez štrbinu sa vymedzí úzka oblasť zvolených λ

⇓

- **kyveta** – získané monochromatické žiarenie prechádza kyvetou so skúmaným roztokom, resp. cez kyvetu s čistým rozpúšťadlom (blanck)

⇓

- **fotonásobič** – prechádzajúce žiarenie potom dopadá na fotonásobič, ktorého elektrický výstup je frekvenciou I_λ a $I_{0\lambda} = A$

Stupeň **automatizácie** prístrojov:

1. bodový – ručné nastavenie λ (SPEKOL)
2. automatická výmena vzoriek – (HITACHI)
3. výstup údajov v číslicovej (digitálnej) forme s možnosťou prepojenia na tlačiareň alebo PC – (HITACHI)

Optika (kyvety, šošovky, hranoly):

- z kremenného skla
- kyvety – hrúbka – 0,1 – 10 cm (1 cm)
- čistenie – dH_2O

Kalibrácia prístroja:

(kvôli časovému starnutiu optických povrchov i spektrálnej mohutnosti zdrojov žiarenia)

NEODYMOVÉ SKLO – kontrola presnosti λ

- používa sa ako štandard s určenými λ

1.2.3 Rozpúšťadlá

Pri voľbe rozpúšťadiel pri spektrofotometrických analyzátoroch sa berú do úvahy 2 faktory: rozpúšťacia schopnosť a priepustnosť v meranej oblasti spektra.

- *polárne látky* sa rozpúšťajú v polárnych rozpúšťadlách
- *nepolárne látky* sa rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách
- dôležitá je, aby rozpúšťadlo neabsorbovalo v rovnakej oblasti ako meraná látka
- bežnými rozpúšťadlami pre **UV** a **viditeľnú oblasť** sú: *voda*, *alkoholy* (metanol, etanol) a *chloroform*

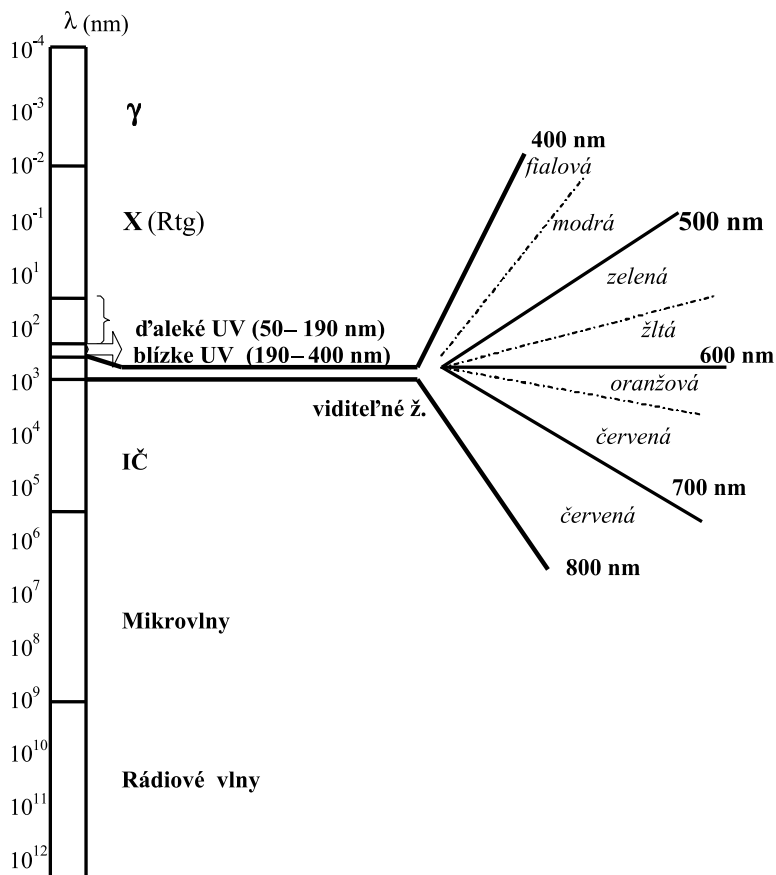
Absorpcia niektorých makromolekúl

- **proteíny (AMK) – 280 nm (λ)**
- UV absorpčné spektrum proteínu je Σ spektier AMK, z ktorých sa skladá proteín
- **nukleotidy – 260 nm (λ)**
- prítomnosť purínových alebo pyrimidínových báz vo všetkých nukleotidoch zapríčiňuje silnú absorpciu (250 – 280 nm)
- identifikujeme prítomnosť *nukleových kyselín*

1.3 Infračervená spektrofotometria

Elektromagnetické spektrum.

- zložené zo súboru svetelných vln, plynule sa meniacich vlnových dĺžok, resp. frekvencií;



1.3.1 Druhy optických spektier

A) Spojité spektrum

- je v ňom zastúpené žiarenie všetkých vlnových dĺžok, teda všetky farby od červenej až po fialovú.

Takéto farebné spektrum získame, ak necháme polychromatické žiarenie (ž. všetkých vlnových dĺžok), napr. zväzok slnečných lúčov, prechádzať optickým hranolom alebo mriežkou.

Spojité spektrum dávajú všetky rozpálené **tuhé** alebo **kvapalné látky**, napr. rozpálené vlákno volfrámovej žiarovky alebo platínový drôt.

B) Čiarové spektrum

- zložené z ostrých, jasne oddelených čiar;
- je typické pre atómy;
- dávajú ho rozpálené **plyny** a **pary** pri nízkom tlaku, ktoré sa skladá z určitých λ vysielaného žiarenia;

C) Pásové spektrum

- zložené zo súpravy pásov vytvorených veľkým počtom husto na seba položených čiar;

1. *emisné* spektrum – dáva žiarenie, ktoré vysielala látka umiestnená v zdroji,
2. *absorpčné* spektrum – získame ho, ak sledujeme podiel primárneho žiarenia zdroja, ktoré látka selektívne pohlcuje,
3. *luminiscenčné* spektrum – získame, ak spojíme absorpčný a emisný princíp;
 - látka selektívne absorbuje primárne žiarenie, pohltené žiarenie transformuje na iné λ a tie ako luminiscenčné žiarenie opäť vysielajú.

1.4 Rozdelenie optických spektrálnych metód

1. EMISNÉ SPEKTRÁLNE METÓDY:

a) emisná spektrálna analýza

- vzorku vkladáme do zdroja žiarenia (najčastejšie el. oblúk alebo iskra), čím sa atómy dostávajú do vzбудeného stavu; žiarenie, ktoré atómy emitujú, je charakteristické pre každý prvok a registruje sa pomocou *spektrografu*;
- vzniká *čiarové spektrum*;
- z λ jednotlivých čiar sa určuje **druh prvku**;
- z *intenzity* vybranej čiary sa určuje zastúpenie **množstva prvku** vo vzorke;

b) plameňová fotometria

- sledujeme intenzitu žiarenie excitovaných atómov stanovených prvkov, ktoré sme rozprášili vo forme aerosólu do plameňa, ktorý slúži ako zdroj tepelnej energie;
- zo spektra čiar daného prvku vymedzíme príslušnú čiaru λ charakterizujúcu **druh určovaného prvku**;
- z *intenzity* vybraného žiarenia (čiar) určíme **množstvo prvku** vo vzorke;

2. ABSORPČNÉ SPEKTRÁLNE METÓDY

a) oblasť Rtg spektier

- v nej sledujeme prechody elektrónov vo vnútorných obalových sférach atómu;
- stanovujeme prvky prítomné v molekule = **atómové spektrum**;

b) oblasť UV a VIDITEĽNEJ spektrofotometrie

- v nej sledujeme prechody é vo vonkajších obalových sfé-
rach atómov alebo v elektrónových orbitáloch molekúl;
- získame *molekulové spektrum*;

c) oblasť IČ spektra

- v nej sledujeme vibrácie atómov v molekulách;
- získame *vibračné rotačné spektrum*, ktoré využívame na
dôkaz prítomnosti charakteristických skupín v molekule,
a tým stanovíme kvalitu látok;

d) oblasť mikrovln

- sledujeme rotáciu molekúl;
- získavame rotačné spektrum;

e) oblasť rádiových vln (NMR)

- aj jadro atómu môže prijímať energiu, pričom fotóny, kto-
ré môže jadro absorbovať, majú veľmi malú E (10^{-26} J).
Takéto fotóny má elektromagnetické žiarenie v oblasti
rádiových vln. Aby prebehla absorpcia, musia byť atómy
(ich jadrá) v silnom magnetickom poli. Tento odbor spek-
troskopie sa nazýva *nukleárna magnetická rezonancia*
(*NMR*);
- slúži na dôkaz kvality látok a štúdium štruktúry molekúl;

3. LUMINISCENČNÉ SPEKTRÁLNE METÓDY

- **fluorimetria** – analytická metóda slúži na kvantitatívne sta-
novenie i stopové množstvo látok;

1.5 Základné konštrukčné prvky spektrálnych metód

1. Zdroje žiarenia:

- **UV oblasť** (180 – 400 nm)
 - vodíková výbojka (200 – 380 nm)
 - deuteriová výbojka
 - xenónová výbojka
 - ortuťová výbojka
- **viditeľná oblasť** (400 – 750 nm)
 - žiarovka s volfrámovou špirálou (360 – 3000 nm)
- **IČ oblasť**
 - nernstova tyčinka (oxidy zirkonia – Zr + yttrium – Y)
 - globarova tyčinka (SiC)

2. Pomocná optika

- **cieľ:** viesť zdroj lúčov prístrojom tak, aby bol maximálne využitý tok zdroja
- **zrkadlá, šošovky, svetlovody, odrazové hranoly a clony**

3. Základné funkčné prvky

- **cieľ:** rozložiť polychromatický zväzok lúčov zo zdroja na zväzky jednotlivých λ ® vymedzie len určitú časť žiarenia potrebného na vyšetrenie
- **rozkladové hranoly, mriežky, filtre, kyvety, monochromátory**

4. *Indikačná jednotka*

- **detektor** – mení energiu žiarenia na inú E, prístupnú meraniu (fotochemická energia = oko, elektrická energia = fotónka, tepelná energia = termočlánok)
- **zosilňovač** – zosilňuje detektorom získaný slabý elektrický signál na hodnotu vhodnú na indikáciu (elektrónkové, tranzistorové zosilňovače)
- **indikátor** – prevádza detektorom transformovanú a zosilňovačom zosilnenú veličinu na veličinu prístupnú nášmu priamemu vnímaniu, napr. ručička, číslo na meracom prístroji

2. ZÁKLADNÉ METÓDY NA IZOLÁCIU LÁTKOK Z BUNIEK, TKANÍV A TELESNÝCH TEKUTÍN

2.1 Extrakcia

Extrakcia z fázy:

- A) TUHEJ – tkanivo, bunky
- B) KVAPALNEJ – sérum

do extrakčného roztoku:

- a) **voda** – rozpúšťa nízkomolekulové látky
- b) **tlmivé roztoky solí (zriedené kyseliny alebo zásady)** – rozpúšťajú biomakromolekuly (proteíny, polysacharidy, polynukleotidy)
- c) **organické rozpúšťadlá** – rozpúšťajú lipofilné látky (tuky, oleje, fosfolipidy, steroidy, vitamíny)

Extrakcia z tuhej fázy:

- príprava tkaniva (strihanie, mletie) ⇒ *homogenát*
- vylúhovanie homogenátu v extrakčnom roztoku – podľa látku, ktoré chceme izolovať *pridáme* buď *enzým*, alebo *organické rozpúšťadlo* + vhodné *stabilizátory* na zachovanie biologickej aktivity izolovanej látky

Extrakcia z kvapalnej fázy:

- odstránenie nečistôt (delipidácia, deproteinácia)
- *izolácia:*
 - a) *pridaním extrakčného roztoku* – podľa potreby (napr. izolácia tukov – organické rozpúšťadlá)

b) *adsorpciou na tuhú fázu* (adsorbent = aktívne uhlie, ionexy, oxid hlinitý)

– využitie:

- pri vysoko a nízkomolekulových látkach (steroidy, indoly, AMK, oligopeptidy)
- *polystyrénové sorbenty* – adsorbujú molekuly z vodného roztoku prostredníctvom hydrofóbných väzieb
- adsorbujú sa molekuly, ktoré majú hydrofóbné skupiny
- desorpcia sa robí čistým metanolom, etanolom alebo acetónom

2.2 Homogenizácia

A) tkanivá orgánov – rozbiť, rozrušiť (spojivé tkanivo – proteolytickými enzýmami – trypsín, pepsín)

B) kosti – rozdrviť (kladivom, mixér, valec s piestom)

C) bunky

I. – *rozrušiť všetky membrány* (cytoplazmatická, jadrová, mitochondriálna, lyzozómová)

II. – *rozrušiť len cytoplazmatickú membránu*

I. Homogenizácia buniek rozrušením všetkých membrán:

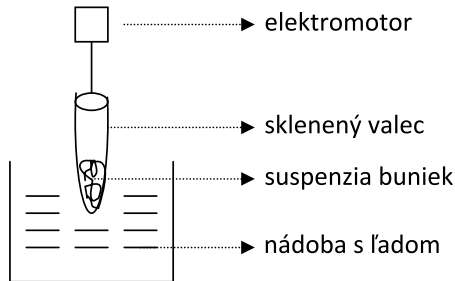
- *USG – ultrasonografia* (membrány sa rozbijú na drobné fragmenty)
- *zmrazovanie a rozmrazovanie* (suspenziu rozdelíme na objemy 1 – 2 cm³ do niekoľkých skúmaviek z tepelne odolného skla – rozbitie P po 6-násobnom opakovaní)
- *roztieranie buniek v trecej miske s pieskom* (mikroorganizmy, slezina, pečej, Le)

- *mikroguľôčkami z olovnateho skla* (baktérie ® kovová valcová nádoba + miešadlo) – priebeh dezintegrácie kontrolovať mikroskopom
- *autolýzou* v prítomnosti organických rozpúšťadiel (kvasinky)

II. Homogenizácia buniek rozrušením len cytoplazmatickej membrány:

cieľ: z buniek vytvoriť suspenziu subcelulárnych častíc, ktoré sa potom dajú *izolovať centrifugáciou*

- *tlakové homogenizátory* (živočíšne bunky a mikroorganizmy)
- *hypotonický šok* (pretrepávanie Er v destilovanej vode)
- *vystrieknutie suspenzie Le z injekčnej ihly* – niekoľkonásobné



Požiadavky na homogenizačné médium:

- musí zaručovať biochemickú a morfológickú stabilitu subcelulárnych častíc
- najvhodnejšie – izoosmotické média – tlak v bunkách = tlaku média

2.3 Dialýza a ultrafiltrácia

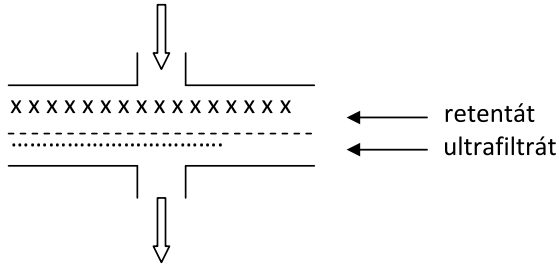
Obidve metódy sa používajú na separáciu alebo zahusťovanie rozpustených látok s molekulovou hmotnosťou $> 10^4$.

Dialýza:

- separačný proces, ktorý závisí od rozdielnej rýchlosti transportu rozpustných látok s rozličnou veľkosťou molekúl cez pórovitú membránu oddeľujúcu dva roztoky
- hnacia sila – *koncentračný gradient*
- robí sa v navlhčenej celofánovej trubici → 1 koniec zaviazať hodvábnou niťou → naleje sa do nej roztok, ktorý sa má dialyzovať (*retentát*) → 2. koniec zaviazať → nad retentátom nechať vzduch, aby vrečko, ak sa ponorí do rozpúšťadla, mohlo plávať;
- rozpúšťadlo (*difuzát*) sa mieša elektromagnetom
- difuzát sa odoberá v pravidelných intervaloch a vždy sa nahradí čistým rozpúšťadlom dovedy, kým 90 % retentátu neprejde do difuzátu;
- meria sa rýchlosť difúzie = *polčas dialýzy* (čas, za ktorý 50 % pôvodného množstva látky prešlo z retentátu do difuzátu)

Ultrafiltrácia:

- využíva sa – pozitívny alebo negatívny tlak + filtre
- + p (pozitívny tlak) – dosahuje sa *inertným plynom* (N_2) a udržuje sa retentátom
- - p (negatívny tlak) – dosahuje sa *vákuom* v priestore difuzátu
- *membránové filtre* – s rozličnou veľkosťou pórov
- látky sa delia selektívne na základe veľkosti svojich molekúl
- roztok sa ultrafiltruje pod $p = 0,05 - 0,5$ MPa, ktorý je vytvorený stlačeným N_2 → rozpúšťadlo + látky $<$ póry membrány, prechádzajú do ultrafiltrátu → zadržané látky nad membránou sa zahusťujú



2.4 Zrážacie metódy

- používajú sa na *hrubé prečisťovanie makromolekúl, najmä proteínov*
- znižovanie solvatačného obalu = DEHYDRÁCIA BUNKY
- zrážanie sa robí pomocou:
 - a) neutrálnych solí** – znižuje hrúbku solvatačného obalu = vrstva molekúl vody a iónov \Rightarrow bunka sa stáva nerozpustnou a vylučuje sa z roztoku vo forme *zrazeniny*
 - b) zmeny pH** – pH ovplyvňuje elektrický náboj bunky, čím aj solvatačný obal ich molekúl
 - c) organických rozpúšťadiel** (metanol, etanol, acetón) – zvýšením koncentrácie organických rozpúšťadiel sa znižuje solvatačný obal bunky \Rightarrow *zrazenina*



Odsolovanie

- vyzrážaná frakcia proteínov sa rozpustí v malom množstve vody alebo tlmivého roztoku; vzniknutý roztok obsahuje *ešte veľké množstvo zrážacej soli*, ktorá sa musí odstrániť *odsolením*

Príprava bezproteínových filtrátov

- pri stanovení (*izolácii*) *nízkomolekulových* látok v klinickom materiáli (sérum, moč, mozgovo miechový mok) sa často vyžaduje *odstrániť bielkoviny*
- **fyzikálne metódy:** ultrafiltrácia, adsorpcia na tuhé sorbenty, tepelná denaturácia
- **chemické metódy:** organické rozpúšťadlá, vysolovanie, ionexy

Izolácia a stanovenie látok pomocou väzbových bielkovín

- hormóny, vitamíny, protilátky majú charakter LIGANDOV a cirkulujú v plazme v komplexoch s proteínmi, napr.: globulín viaže tyroxín (T_3)
- **stanovenie:** vybrať špecifický väzbový proteín → štandardnú vzorku ligandu označíme rádioaktívnym izotopom → oddelenie voľného (L) a viazaného (LP) *ligandu* dialýzou → grafické vyhodnotenie:

$$\frac{L}{LP}$$

3. KONCENTROVANIE A KONZERVOVANIE LÁTOK

3.1 Koncentrovanie látok

- zmenšenie objemu a zväčšenie koncentrácie látky v roztoku

POSTUPY:

1. Odparovanie pri atmosférickom tlaku = destilácia

- *termolabilná, čím by sa destilované vodné roztoky rozkladali alebo denaturovali*
- používa sa zriedka

2. Odparovanie vo vákuu

- najčastejší spôsob
- využitie: nízko- aj vysoko- molekulové látky

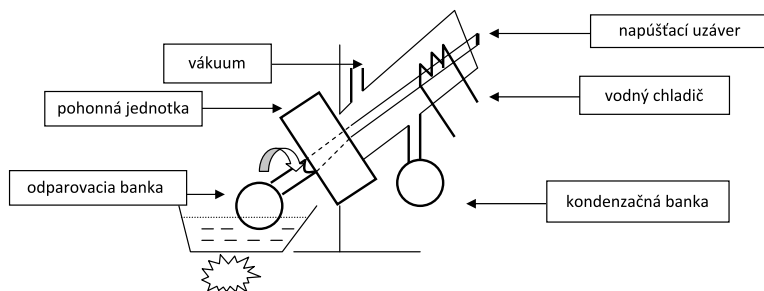
A) ODPAROVANIE MALÝCH OBJEMOV (do $2\text{ cm}^3 = 2\text{ ml}$)

- v evakuovanom exikátore nad vhodným sorbentom (= vstre-
bávač) vody (P_2O_5 , NaOH , CaCl_2)
- voda sa odparuje zo skúmavky uloženej v exikátore
+ lacná a dostupná
- trvá dlhý čas (hod.), odpariť sa dá len voda!

B) ODPAROVANIE STREDNÝCH OBJEMOV

(od $1\text{ cm}^3 - 1\text{ dm}^3$)

- na rotačnej vákuovej odparovacej banke



Postup: Kvapalinu, ktorú chceme odpariť, nalejeme cez napúšťací otvor do odparovacej banky, ktorá sa zahrieva vo vodnom kúpeli a rotuje. Vákuum znižuje bod varu odparovacej banky → kvapalina sa odparuje a jej pary sa kondenzujú na vodnom chladiči a stekajú do kondenzačnej banky.

C) ODPAROVANIE VEĽKÝCH OBJEMOV ($> 1 \text{ dm}^3 = > 1\text{l}$)

- zriedka
- vákuové odparky

3. Mrazová sublimácia = lyofilizácia

- odsublímovanie vody v tuhom skupenstve (ľad) vo vákuu
- ! používať len vodné roztoky látok bez organ. rozpúšťadiel, ktoré znižujú bod mrazu vody; čím je vyššia možnosť roztopenia sa vzorky počas lyofilizácie ⇒ pena a denaturácia enzýmu!
- *tlmivé roztoky* pred lyofilizáciou treba *odsoliť*, lebo soli môžu pri lyofilizácii zmeniť pH!

Postup lyofilizácie: Banka so vzorkou sa ponorí a pod 45° uhlom sa otáča v namrazovacom kúpeli (tuhý CO_2 + acetón alebo etanol ⇒ T (-70°C)) a na jej stenách sa namrazuje vzorka. Po namrazení a do začiatku lyofilizácie sa vzorka uloží pri T (-30°C).

Pred skončením lyofilizácie sa začne do systému vpúšťať vzduch a po zrušení vaku sa začnú odoberať vzorky.

4. Vymrazovanie

- tvorba kryštálov ľadu a obohatenie zvyšného roztoku rozpuštenou látkou zriedkavé

5. Gélová filtrácia

- koncentrovanie vysokomolekulových látok pomocou suchého *Sephadexu G-25 Coarse*;

Postup: Voda a nízkomolekulové látky sa pohlcujú Sephadexom a vysokomolekulové látky zostávajú vo vonkajšom roztoku. Po 10 min. sa zrnká Sephadexu odstránia centrifugáciou alebo filtráciou pod tlakom.

6. Zahusťovanie využitím membránových procesov

- využíva sa semipermeabilná membrána priepustná pre látky určitej veľkosti a tvaru

3.2 Sterilizácia a konzervovanie roztokov

- roztoky biochemických preparátov, tlmivé roztoky a rastové médiá sú často vhodným prostredím na rast mikroorganizmov \Rightarrow rozklad látok v roztoku a znehodnotenie preparátov

Sterilizácia teplom

- rastové médiá a tlmivé roztoky, ktoré neobsahujú látky rozložiteľné teplom
- vysoké teploty inaktivujú enzýmy a proteíny buniek a zastavenie rastu a reprodukcie mikroorganizmov
- sterilizácia v *Kochových* nádobách (atmosférický tlak + T do 100 °C) a *autoklavoch* (30 min. + T do 115 °C)

- *Tyndalizácia* – ničenie spór opakovanou sterilizáciou

Sterilizácia filtráciou

- + – všetky typy roztokov
 - nenastáva deštrukcia termolabilných látok
- filtre s rozličnou veľkosťou pórov (baktérie 0,5 mm) zachytávajú, adsorbujú alebo elektrostaticky priťahujú rôzne mikroorganizmy

Druhy filtrov:

- *membránové* (z celulózy)
- *Seitzove* (azbestové vlákna s bavlnou)
- *Sintrové* (sklené)
- *z neglazúrovaného porcelánu*

Konzervačné látky

- bránia mikrobiálnej kontaminácii
 - ATB (PEN+STM)
 - antimetabolity
 - inhibítory enzýmov (MERFÉN, MERTIOLÁT, AZID SODNÝ)
 - zapríčiňujúce plazmolýzu buniek (CHLOROFORM, TOLUÉN)

→ Na koncentrovanie roztokov *nízkomolekulových* látok sa *ne* používajú metódy: mrazová sublimácia, gélová filtrácia, zahusťovanie využitím membránových procesov.

4. BIOCHEMICKÉ VYŠETRENIE KRVI

sérum – krv odobratá bez protizrážavého roztoku

– po usadení krvných elementov je na povrchu

plazma – krv odobratá s protizrážavým roztokom (citrát sodný)

Obsah jednotlivých látok v krvi:

A) Organické látky

a) dusíkaté látky nebielkovinovej povahy

- močovina
- kyselina močová
- aminokyseliny
- polypeptidy
- kreatín
- kreatinín
- indikán
- amoniak
- amoniak preformovaný

b) dusíkaté látky bielkovinovej povahy

- celkové bielkoviny
- albumín v plazme
- globulín
- fibrinogén
- hemoglobín

c) *glukóza*

d) *lipidy a tuky*

- neutrálny tuk
- mastné kyseliny
- lecitín
- cholesterol + estery
- cholesterol voľný v plazme
- cholesterové estery v plazme

e) *kyselina mliečna*

f) *bilirubín*

g) *acetón, kyselina acetoctová*

B) Anorganické látky

- Na⁺ v sére
- K⁺
- Ca⁺⁺
- Mg⁺⁺
- Fe plazmatické
- Cu⁺⁺
- NaCl
- P (celkový)
- P (anorganický)
- P (fosfatidov)
- sulfáty (S)
- kapacita CO₂ v plazme
- kapacita O₂ v plazme
- J (jód)

5. BIOCHEMICKÉ VYŠETRENIE MOČU

5.1 Moč – vlastnosti, zloženie

- **diuréza (MM/24 h) = 1500 – 2000 ml** – je množstvo moču vylúčeného z organizmu
- **farba** – zlatožltá
 - ranný moč – tmavší – koncentrovanejší
- **merná hmotnosť moču (MHM) = 1016 – 1028** (hustota moču)
 - Za 24 hod. sa močom vylúči cca 60 g pevných látok:

25 g organických:	35 g organických:
Na 5,8 g	močovina CO = (NH ₂) 20 – 40 g
K 2,5 g	kyselina močová 0,7 g
NH ₃ 0,7 g	kreatinin 1,0 – 1,5 g
Ca 0,01 – 0,5 g	kyselina hyppurová 0,7 g
Mg 0,03 – 0,4 g	ostatné: 2,1 g
Cl 8,5 g	oxaláty, mastné kyseliny,
S 0,8 g	sulfáty, farbivá = urochromogény,
P 1,1 g	fermenty, kyselina mliečna, purinová báza,
	oxyproteinová kyselina, cukry,
	glycerofofáty

- **patologické súčasti v moči:**
 - bielkoviny, Bence-Jonesova bielkovina – tuky
 - cukry – lecitín
 - aminokyseliny (leucín, tyrozín, cysteín) – sírovodík – H₂S
 - acetón – cholesterol

- alkapton (kyselina homogentisová)
- krv
- krvné farbivá
- hnis
- melanín
- žlčové farbivá (bilirubín, urobilinogén, urobilín)
- žlčové kyseliny

5.2 Vyšetovanie moču

- **množstvo moču:**

- u vegetariánov je diuréza nižšia

POLYÚRIA (↑ MM)

- DM (s vylučovaným cukrom sa vylučuje aj veľa vody)
- diabetes insipidus > 10 litrov/24 hod
- v rekonvalescencii zápalových horúč. ochorení (PN)
- pri vyplavovaní retinovanej vody (kardiaci, hydronefróza, pečenevé ochorenia)

OLIGÚRIA (↑ MM)

- akútna nefritída
- horúčkové stavy
- po transfúziách
- edémy, ascites (dekomp. srdca, pečenevé ochorenie)
- hnačky, vracanie
- prekážky v odtoku moču

ANÚRIA (↑ MM)

- otrava arzénom, sublimátom
- pri peritonitíde
- pri obličkovej kolike, pri ťažkých nefritídach

NYKTÚRIA (nočné močenie)

- kardiaci (obehová dekompenzácia)

• zmeny vo farbe moču:

- *svetlejší moč* – DM, diabetes insipidus, pitie veľkého množstva tekutín
- *tmavší moč* – veľké extrarenálne straty tekutiny (horúčka, vracanie, hnačky) – porucha odtoku žlče – farba čierneho piva
- *krvavý moč* – (prítomnosť oxyhemoglobínu) – farba mäsovej vody
- *zakalený moč* – obsahuje hnis, tuk, baktérie, kvasinky, cukor

• zápach moču:

- normálny zápach je podmienený prítomnosťou mastných kyselín a urinoиду (C_6H_8O)
- *patologický*:
 - čpavkový – pri rozklade amoniaku
 - acetónový (po zhnitých jablkách) – diabetická acidóza pri DM

• MHM (hustota moču):

- hustota moču sa má merať pri $T = 15\text{ °C}$; ak je $T > 15\text{ °C}$, ku každému stupňu „nad“ sa pripočítajú 3 mmol;
- ↓ – diabetes insipidus
- ↑ – DM (ak sa vylučuje veľa cukru)
- horúčky
- proteinúria

• pH moču: 5 – 8 (fyziologické hodnoty)

- *patologické*:
 - kyslý moč: mäso, bielkovinová strava, horúčky, kachexia, ascites, hydrotorax

- zásaditý moč: rastlinná strava, cystitída, krvácania do tel. dutín
- **bod mrazu moču: $-1,3$ až $-2,3$ °C**
- **močový sediment:**
 - I. **orgánový:**
 - *epitélie*
 - dlaždicové
 - cylindrické
 - guľaté
 - *leukocyty*
 - *erytrocyty*
 - *valce* – homogénne
 - hyalínové
 - voskové
 - granulované
 - epiteliárne, leukocytárne, erytrocytárne
 - zmiešané (pozri hore)
 - cylindroidy
 - pseudovalce

II. **neorgánový:**

- *amorfný*
 - a) v kyslom moči: uráty – sodný, draselný, vápenatý; bilirubín
 - b) v alkalickom moči: fosfáty: kalcia, magnézia; uhličitan Ca
- *kryštalický*
 - a) v kyslom moči: kyselina močová, šťaveľan Ca, síran Ca, kyselina hyppurová, cysteín, tyrozín, leucín, bilirubín
 - b) v alkalickom moči: močan amónny, fosforečnan horečnat-amónny, fosfáty Ca, uhličitan, šťaveľan Ca

III. náhodné prímiesy a znečisteniny:

- vlákna z tkanín
- vlasy
- škrobové zrníčka
- protozoa – z pošvy (*Trichomonas*)
- prímies stolice
- perie, korok, sklený prášok, rastlinné časti

6. ZÁVISLOSŤ ABSORBANCIE OD KONCENTRÁCIE ROZTOKU

PROTOKOL č. 1

Názov: Závislosť absorbcie od koncentrácie

Dátum:

Úloha: Pripravte 4 odmerné roztoky CuSO_4 s objemom 250 ml a s koncentraciami 2 %, 4 %, 6 %, 8 %

Chemikálie: destilovaná voda (dH_2O), pentahydrát síranu meďnatého – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Pomôcky: 4 ks odmerné banky, 4 ks kadičky, 4 ks sklenené lieviky, 4 ks sklenené tyčinky, 4 ks odmerné valce, analytické váhy, prístroj Spektromom 410

Postup:

1. Pripravíme si 4 roztoky so známou koncentraciou.
2. Prístroj Spektromom 410 zapneme do zdroja napätia.
3. Nastavíme prístroj na meranie absorbcie (A).
4. Vložíme do prístroja filter s vlnovou dĺžkou, pri ktorej absorbuje skúmaný roztok.
5. Do kyvetora vložíme kyvetu s rozpúšťadlom (dH_2O).
6. Prístroj vynulujeme na „blank“.
7. Do kyvetora vložíme kyvetu so skúmaným roztokom.
8. Na displeji odčítame hodnotu absorbcie.

9. Hodnotu absorbancie zaznačíme.
10. Po odmeraní každej absorbancie prístroj vynulujeme na „blanck“.
11. Na základe koncentrácií a absorbancií zostrojíme kalibračnú krivku.

Výpočet: Pripravte štyri 250 ml roztoky síranu meďnatého s koncentraciami 2 %, 4 %, 6 %, 8 %.

Vzorec: $m = c \cdot V \cdot M$ [M (g/mol) – zistite z tabuliek]

Záver: Zistili sme, že závislosť medzi absorbanciou a koncentraciou je lineárna a priamo úmerná.

7. KONTROLA PRESNOSTI PIPETOVANIA – FOTOMETRICKY

PROTOKOL č. 2

Názov: Kontrola presnosti pipetovania – fotometricky.

Dátum:

Úloha:

1. Určíte presnosť vášho pipetovania mikropipetou.
2. Pripravte roztok síranu meďnatého s objemom 250 ml a koncentráciou 10 %.

Chemikálie: destilovaná voda (dH_2O), pentahydrát síranu meďnatého – $\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Pomôcky: odmerná banka, lievik, sklenená tyčinka, stojan na skúmavky, 20 skúmaviek, laboratórna lyžica, Petriho miska, mikropipeta, špičky, analytické váhy, prístroj Spektromom 410, kyvety

Postup:

1. Vypočítame si hmotnosť síranu meďnatého potrebného na prípravu 250 ml 10 % roztoku.
2. Pripravíme si odmerný roztok podľa zadania.
3. Roztok rozpipetujeme mikropipetou do 20 skúmaviek po 2 ml.
4. Na prístroji Spektromom 410 si zistíme absorbanciu roztoku z každej skúmavky a zaznačíme ju.

5. Zo zistených hodnôt vypočítame variačný koeficient (Vk) a určíme presnosť nášho pipetovania.

Výpočet:

1. Pripravte roztok síranu meďnatého s objemom 250 ml a koncentráciou 10 %.

Vzorec: $m = c \cdot V \cdot M$ [M (g/mol) – zistíte z tabuliek]

2. Výpočet variačného koeficientu:

- a) Vypočítame priemernú hmotnosť (\bar{x}) všetkých 10 vzoriek podľa vzorca:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Legenda:

\bar{x} – aritmetický priemer

x_i – hmotnosť roztoku z 1 skúmavky

n – počet všetkých hmotností

- b) Od každej hmotnosti odčítame priemer:

$$x_i - \bar{x}$$

- c) Každú výslednú hodnotu z bodu b) umocníme:

$$(x_i - \bar{x})^2$$

- d) Všetky umocnené hodnoty z bodu c) spolu sčítame:

$$\sum (x_i - \bar{x})^2$$

e) Vypočítame smerodajnú odchýlku:

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n-1}$$

f) Vypočítame variačný koeficient:

$$Vk = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 [\%]$$

Pozn.: Správna presnosť pipetovania je taká, ak výsledok variačného koeficientu bol do 5 %, pri veľkom množstve vzoriek do 10 %.

Záver:

Pipetovali sme s odchýlkou (Vk) %.

Čiže presnosť nášho pipetovania je %.

8. ZÁVISLOSŤ PH OD KONCENTRÁCIE ROZTOKU

PROTOKOL č. 3

Názov: Stanovenie závislosti pH od koncentrácie roztoku.

Dátum:

Úloha:

1. Pripravte 3x 100 ml roztoku HCl s koncentraciami 1 %, 2 % a 3 %.
2. Pripravte 3x 100 ml roztoku NaOH s koncentraciami 1 %, 2 % a 3 %.

Chemikálie: kyselina chlorovodíková-HCl, hydroxid sodný – NaOH, destilovaná voda – dH₂O

Pomôcky: odmerné banky, kadičky, sklenené tyčinky, sklenené lieviky, odmerné valce, pH meter, analytické váhy

Postup:

1. Príprava roztokov:

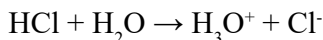
- A) Pripravíme si 3x odmerné roztoky HCl s objemom 100 ml s koncentraciami 1 %, 2 % a 3 %.
- Lejeme HCl do vody, nikdy nie naopak! Reakcia kyseliny chlorovodíkovej s vodou je exotermná, teda uvoľňuje teplo a pri opačnom postupe by mohlo dôjsť k nebezpečnému prskaniu.

- Výpočet objemu HCl (liquid) je na základe zried'ovacej rovnice:

$$c_1V_1 + c_2V_2 = c_3V_3$$

$$V_1 + V_2 = V_3$$

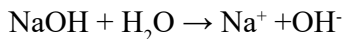
- Pri rozpúšťaní chlorovodíka vo vode sa molekuly HCl štiepia na chloridové anióny a vodíkové katióny, ktoré ďalej reagujú za vzniku oxóniového katiónu:



Preto je kyselina chlorovodíková jednou z najsilnejších anorganických kyselín (nízka hodnota pK_a). Je silnejšia ako kyselina sírová a kyselina dusičná.

B) Pripravíme 3x odmerné roztoky NaOH s objemom 100 ml s koncentraciami 1 %, 2 % a 3 %.

- Sypeme NaOH do vody, nikdy nie naopak! Reakcia hydroxiidu sodného s vodou je exotermná, teda uvoľňuje teplo a pri opačnom postupe by mohlo dôjsť k nebezpečnému prskaniu.
- NaOH (lúh sodný) sa vo vodnom roztoku správa ako silná zásada:



- Výpočet množstva NaOH (solid) potrebného na prípravu zadaných roztokov urobíme podľa vzorca: $m = c \cdot V \cdot M$;

2. Na pH metri zistíme hodnoty pH:

- všetkých troch roztokov kyseliny HCl a všetkých troch roztokov zásady NaOH. Hodnoty pH si zaznačíme.

Postup merania pH na pH metri:

1. pH meter zapojíme do zdroja napätia a zapneme ho aj tlačidlom On/Off.
2. Elektródu z prístroja ponoríme do kadičky s dH_2O a potom do kadičky s roztokom č. 1 (napr. 1 % HCl).
3. Stlačíme „AR“ na pH metri.
4. Stlačíme „ENTER“ na pH metri.
5. Po skončení blikania „AR“, odčítame znázornenú hodnotu; je to pH daného roztoku.

Pozn.: Ak chceme ihneď merať pH druhého roztoku, elektródu opláchneme v dH_2O a ponoríme do meraného roztoku, ale stlačíme už len „ENTER“.

3. Zostrojíme krivku závislosti pH od koncentrácie, pre HCl zvlášť a pre NaOH zvlášť.

Záver:

1. Zistili sme, že so zvyšujúcou sa koncentráciou HCl pH roztoku klesá. To znamená, že **závislosť medzi koncentráciou kyslého roztoku a jeho pH je nepriamo úmerná.**
2. Zistili sme, že so zvyšujúcou sa koncentráciou NaOH pH roztoku stúpa. To znamená, že **závislosť medzi koncentráciou zásaditého roztoku a jeho pH je priamo úmerná.**

9. PRÍPRAVA A TITRÁCIA OCTANOVÉHO PUFRU

PROTOKOL č. 4

Názov: Príprava a titrácia octanového pufru.

Dátum:

Úloha: Titráciou kyseliny a zásady do roztoku octanového pufru zistíte zmeny pH pufru.

Chemikálie: destilovaná voda – dH_2O , kyselina octová – CH_3COOH , soľ kyseliny octovej – octan sodný – CH_3COONa

Pomôcky: kadičky, odmerné banky, Petriho misky, laboratórne lyžice, sklenené tyčinky, lieviky, odmerné valce, sklenené pipety, analytické váhy, pH meter

Postup:

A. Pripravíme si octanový pufor z kyseliny octovej a octanu sodného.

1. Pripravíme si 2 % roztok kyseliny octovej s objemom 250 ml. Výpočet urobíme zriedením 8 % kyseliny octovej na 2 % kyselinu octovú pomocou zriedovacej rovnice:

$$c_1V_1 + c_2V_2 = c_3V_3$$

$$V_1 + V_2 = V_3$$

2. Pripravíme si 2 % roztok octanu sodného s objemom 250 ml. Množstvo octanu sodného potrebné na prípravu roztoku vypočítame podľa vzorca:

$$m = c \cdot V \cdot M$$

3. pH metrom odmeriame pH roztoku kyseliny octovej a pH roztoku octanu sodného. Hodnoty si zaznačíme.
4. V sklenenej kadičke zmiešame v pomere 1:1 rovnaké objemy (napr. po 150 ml) roztoku kyseliny octovej a roztoku octanu sodného, s rovnakou koncentráciou, čím vznikne PUFOR.
5. Na pH metri zistíme hodnotu pH pufru a zaznačíme ju.

B. Do pufru titrujeme roztok kyseliny a roztok zásady.

1. Puforvací roztok si rozdelíme do 2 kadičiek po 50 ml a označíme ich.
2. Do 1. kadičky s pufrom sklenenou pipetou titrujeme roztok kyseliny po 0,5 ml a po každej titrácii objemu 0,5 ml, odmeriame pH pufru a hodnoty si zaznačíme. Pipetujeme dovedy, kým pH nezačne prudko klesať.
3. Do 2. kadičky s pufrom sklenenou pipetou rovnako titrujeme zásadu po 0,5 ml. Po každej titrácii objemu 0,5 ml, odmeriame pH pufru č. 2 a hodnoty zaznačíme. Pipetujeme dovedy, kým pH pufru nezačne prudko stúpať.

C. Odmerané hodnoty pH pufru po titrácii kyseliny a zásady graficky znázorníme na spoločnom grafe.

Záver: Zistili sme, že pri titrácii pufru, tzn. pri postupnom pridávaní zriedených roztokov silnej kyseliny alebo silnej zásady k roztoku pufru, sa pH pufru spočiatku mení len pozvoľne. Pri prekročení hodnoty $\text{pH} = \pm 1$ sú už zmeny pH pufru výrazné. Z priebehu titračnej krivky pufru môžeme určiť pufračnú kapacitu.

10. MERANIE HUSTOTY ROZTOKOV

PROTOKOL č. 5

Názov: Percentuálna hmotnosť roztoku.

Dátum:

Úloha: Zistíte percentuálnu hmotnosť roztoku sacharózy.

Chemikálie: destilovaná voda dH_2O , sacharóza – $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

Pomôcky: cukromer, kadička, odmerný valec, sklenená tyčinka, laboratórna lyžica, analytické váhy

Postup:

1. Pripraviť odmerné roztoky sacharózy s rôznymi koncentraciami 2 %, 4 %, 6 %, 8 % s objemami 250 ml.
Množstvo sacharózy potrebnej k príprave jednotlivých roztokov si vypočítame podľa vzorca:

$$m = c \cdot V \cdot M$$

2. Pripravený roztok s danou koncentráciou prelejeme do odmerného valca.
3. Cukromer ponoríme do odmerného valca s roztokom.
4. Na cukromeri odčítame percentuálnu hmotnosť roztoku (meniskus roztoku nám ukazuje jeho percentuálnu hmotnosť).
5. Rovnakým postupom odmeriame percentuálnu hmotnosť

všetkých roztokov a tieto údaje si zaznačíme do tabuľky, v ktorej porovnáme vzťah koncentrácie roztoku a jeho percentuálnej hmotnosti. Údaje z tabuľky graficky znázorníme.

Záver: Zistili sme, že závislosť medzi koncentráciou roztoku a percentuálnou hmotnosťou je lineárna a priamo úmerná.

RNDr. Mgr. Mária Dubovská, PhD.

**NÁVODY NA CVIČENIA
Z PREDMETU
BIOCHÉMIA**

Zodpovedný redaktor Jozef Molitor
Grafická úprava a zalomenie Jana Janíková

Pre Fakultu zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity v Trnave
pripravilo v elektronickej verzii
vydavateľstvo TYPUS UNIVERSITATIS TYRNAVENSIS,
spoločné pracovisko Trnavskej univerzity
a VEDY, vydavateľstva Slovenskej akadémie vied, ako 240. publikáciu.

ISBN 978-80-568-0126-0