

# Laboratorní cvičení z chemie a biochemie

1. ročník, zubní lékařství

ZIMNÍ SEMESTR

2021/2022



Ústav lékařské chemie a biochemie

Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



## Pravidla bezpečnosti a ochrany zdraví při práci

1. Do laboratoře mají přístup pouze studenti, kteří jsou rozvrhem hodin vypsáni na příslušná praktika. Jakékoliv návštěvy jsou zakázány.
2. Studenti jsou povinni před nástupem do praktik teoreticky ovládat úlohy, které budou prakticky provádět. Přinesou si laboratorní plášť a pracovní návod. Praktikování bez pláště je nepřípustné. Vlasy musí být upraveny tak, aby nemohlo dojít k úrazu při práci s kahanem. Svrchní oděvy, tašky, batohy a ostatní zavazadla studenti odloží na místě k tomu určeném.
3. Veškeré odchody z praktik jsou povoleny pouze s výslovným svolením asistenta vedoucího praktika.
4. V laboratoři je povoleno provádět pouze ty práce, které jsou náplní praktického cvičení. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit, dále přechovávat potraviny a používat laboratorní nádobí a zařízení k jiným účelům, než jsou určeny.
5. Pro práce, při nichž může dojít k úniku škodlivých chemických látek do ovzduší, se musí zabezpečit odsávání. Práce s látkami dýmovými, dráždivými, zapáchajícími, jedovatými plyny a parami, stejně jako žíhání a spalování je dovoleno provádět jen v digestořích.
6. Při nasazování balónku na skleněnou pipetu je nutné dbát zvýšené opatrnosti. Střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do zvláštní nádoby s označením „SKLO“.
7. Do výlevek lze vylévat jen rozpouštědla s vodou dokonale mísitelná, dostatečně zředěná (nejméně 1:10), v množství nejvýše 0,5 litru a vodné roztoky kyselin a zásad zředěné nejméně 1:30. S vodou nemísitelná rozpouštědla, jedy, kyseliny a louhy nad uvedenou koncentraci a látky, které uvolňují jedovaté a dráždivé plyny, do výlevek vylévat nelze. Tyto látky se likvidují do zvláštní odpadní nádoby.
8. Při ředění se kyseliny zásadně vlévají do vody, nikoliv naopak.
9. Je zakázáno nasávat roztoky do pipet ústy. Musí být použito příslušných pomůcek (balónek).
10. Rozlité kyseliny je nutno ihned spláchnout vodou, případně neutralizovat práškovou sodou. Rozlité zásady stačí jen důkladně spláchnout vodou.
11. Při rozlití hořlavých kapalin se musí okamžitě zhasnout všechny kahany, vypnout elektrický proud a zajistit účinné větrání. Rozlitá kapalina se nechá vsáknout do vhodného porézního materiálu, který se odklidí na bezpečné místo.
12. Při zahřívání kapalin v baňkách se musí zabránit utajenému varu alespoň tak, že se do baňky vloží varný kamínek.
13. Před zahájením práce je nutno zkontrolovat stav všech přístrojů a zařízení, případné závady a nedostatky nahlásit asistentovi nebo laborantce.
14. Posluchačům je zásadně zakázána jakákoliv svévolná manipulace s elektrickou instalací, s přístrojovým vybavením a materiálem. Zapnutí přístroje a zapálení plynových kahanů se děje až po souhlasu asistenta nebo laborantky.
15. Obsluha laboratorní centrifugy musí být prováděna jen v přítomnosti asistenta nebo laborantky. Centrifugační nádobky musí být dokonale vyváženy, víko centrifugy při chodu bezpečně uzavřeno.
16. Při úniku plyných paliv (zemní plyn) musí být uzavřen přívod plynu, vypnut elektrický proud a účinně větráno.
17. Zapálené kahany nelze nechat hořet bez dozoru. Prošlehne-li plamen dovnitř, musí se okamžitě uzavřít přívod plynu a kahan seřídít.
18. Jakékoliv nehody, úrazy, požití chemikálií apod. je nutno ihned nahlásit vedoucímu asistentovi.
19. Hrubé porušení uvedených pravidel, vyplývající z nekázně či neznalosti, má za následek vykázání posluchače z praktických cvičení se sankcí neomluvené absence.
20. Studenti musí být seznámeni s klasifikací látek toxických, kancerogenních, mutagenních a toxických pro reprodukci. Bezpečnostní listy jednotlivých látek jsou k dispozici v praktikárnách.
21. Studenti musí být seznámeni s pravidly bezpečnosti práce s látkami vysoce toxickými (označeny T+) používanými ve studentské laboratoři (např. rtuť, kyanid draselný, ethidium bromid, dusičnan rtuťnatý).

## ROZPIS ÚLOH

### Lab 1: Základní dovednosti potřebné pro práci v laboratoři

strana 5

- a) Laboratorní sklo a další pomůcky
  - seznámení se s názvy a způsobem použití laboratorního skla a dalších pomůcek
- b) Návčik odměřování objemů a vážení
  - pipetování destilované vody s kontrolou vážením
  - zjištění hustoty roztoku
  - příprava roztoku a jeho přesné rozpipetování do více zkumavek
  - pipetování velkých objemů

### Lab 2: Příprava roztoků, reakce anorganických sloučenin

strana 9

- a) Příprava roztoku přesné koncentrace
  - příprava 100 ml roztoku chloridu vápenatého o koncentraci 100 mmol/l
- b) Vybrané reakce anorganických sloučenin
  - reakce iontů  $Ag^+$  se zředěným roztokem  $HCl$
  - reakce iontů  $Fe^{3+}$  s roztokem hexakynoželesnatanu draselného
  - reakce iontů  $Fe^{3+}$  s ionty  $SCN$
  - reakce iontů  $Cu^{2+}$  s amoniakem
  - reakce iontů  $Ca^{2+}$  s kyselinou šťavelovou
  - reakce uhličitánů se zředěným roztokem  $HCl$
- c) Filtrace, centrifugace
  - paralelně ve dvou zkumavkách vysrážet  $Ca^{2+}$  kyselinou šťavelovou ve 3 ml připraveného roztoku chloridu vápenatého, vzniklou sraženinu oddělit filtrací a centrifugací

### Lab 3: Osmóza, osmotický tlak, osmolalita

strana 14

- a) Demonstrace osmózy
  - demonstrace kapilárních jevů a osmózy Osmometrem DM555-1A
- b) Příprava isotonických infúzních roztoků
  - příprava 200 ml fyziologického roztoku
  - příprava 250 ml Ringerova roztoku
- c) Kryoskopické měření osmolality
  - měření osmolality moderním osmometrem

### Lab 4: Chromatografie

strana 23

- a) Papírová chromatografie aminokyselin
- b) Dělení rostlinných pigmentů chromatografií na tenké vrstvě
- c) Dělení barevné směsi gelovou chromatografií

### Lab 5: pH, pufrů I – Měření pH

strana 34

- a) Měření pH
  - univerzálním pH papírkem
  - papírkem "PHAN"
  - pomocí acidobazického indikátoru a srovnávacích pufrů
  - pH metrem
- b) Výpočty pH – příklady

Lab 6: pH, pufrý II – Demonstrace funkce pufrů

*strana 37*

- a) Demonstrace funkce pufrů
- b) Pufrý – příklady

Lab 7: Odměrná analýza

*strana 41*

- a) Alkalimetrie
  - standardizace titračního roztoku NaOH
  - stanovení koncentrace  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve vzorku kuchyňského octa
- b) Chelatometrie
  - stanovení koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  v minerální vodě
  - stanovení obsahu niklu v pevném vzorku

Lab 8: Optické metody

*strana 47*

- a) Identifikace acidobazického indikátoru pomocí absorpčního spektra
- b) Stanovení koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  (kalibrační křivka)
- c) Stanovení koncentrace  $\text{Cl}^-$  (jeden standard)

Lab 9: Enzymologie I

*strana 53*

- a) Závislost aktivity enzymů na pH ( $\alpha$ -amyláza)
- b) Specifita enzymů (sacharáza,  $\alpha$ -amyláza)
- c) Sledování aktivity mléčné xanthinoxidoreduktázy

Lab 10: Enzymologie II

*strana 63*

- a) Stanovení Michaelisovy konstanty kyselý fosfatázy
- b) Kompetitivní inhibice sukcinátdehydrogenázy malonátem

# Lab 1: Základní dovednosti potřebné pro práci v laboratoři

## a) Laboratorní sklo a další pomůcky

**Úkol:** Seznamte se s názvy pomůcek používaných v laboratořích

Na pracovním stole je rozloženo různé laboratorní sklo a další pomůcky. Přiřaďte kartičky s příslušným názvem. Po splnění úkolu si nechte překontrolovat správnost asistentem nebo laborantkou, kartičky posbírejte a zamíchejte pro další pracovní skupinku.



zkumavka



kádinka



Erlenmeyerova  
baňka



Petriho miska



hodinové sklo



titrační baňka



reagenční lahev



dělicí nálevka



nálevka



násypka



exsikátor



třecí miska  
s tloučkem



držák na zkumavky



plynový kahan



lihový kahan

### Odměrné sklo



odměrný válec



pipeta



byreta



odměrná baňka

## b) Nácvik odměřování objemů a vážení

### 1. Pipetování destilované vody s kontrolou vážením

#### a) Pipetování větších objemů, pipety s fixním objemem

Na misku vah položte prázdnou *malou kádinku*, do níž budete pipetovat destilovanou vodu, a stiskněte tlačítko pro **tárování** (vynulování hmotnosti na vahách položené nádoby, v níž vážíme).

Kádinku přeneste z misky vah na pracovní stůl a postupně do ní napipetujte destilovanou vodu v následujících objemech:

3 x 2000  $\mu\text{l}$

2 x 500  $\mu\text{l}$

Pro pipetování 2 ml (=2000  $\mu\text{l}$ ) použijete pipetu s fixním objemem a příslušnou špičku (velká bílá). Je třeba překontrolovat, že spojení špičky s pipetou těsní. Pipety, které budete používat, se nasazováním a sundáváním špičky snadno v místě připojení špičky povolí, pak netěsní a pipetovaná kapalina ze špičky vytéká! Podobně budete pipetovat 0,5 ml (=500  $\mu\text{l}$ ), pipetou s fixním objemem a příslušnou špičku (modrá).

Po dokončení pipetování kádinku položte na misku vah a odečtěte hmotnost napipetované destilované vody. Srovnajte skutečný navážený výsledek s očekávanou hodnotou vypočítanou součtem pipetovaných objemů a přepočtem objemu na hmotnost přes hustotu. Uvažujte hustotu destilované vody při teplotě v laboratoři rovnu  $\rho=1,000 \text{ g/cm}^3$ .

Očekávaný objem	Očekávaná hmotnost	Skutečný výsledek

#### b) Pipetování menších objemů, pipety s nastavitelným objemem

Na misku vah položte prázdnou malou plastovou zkumavku, tzv. *ependorfku*, do níž budete pipetovat destilovanou vodu, a stiskněte tlačítko pro **tárování**.

Otevřenou *ependorfku* si vezměte do ruky a postupně do ní napipetujte destilovanou vodu v následujících objemech:

375  $\mu\text{l}$

25  $\mu\text{l}$

Pro pipetování 375  $\mu\text{l}$  použijete pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 100-1000  $\mu\text{l}$  a příslušnou špičku (modrá). Pro pipetování 25  $\mu\text{l}$  použijete pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 20-200  $\mu\text{l}$  a příslušnou špičku (žlutá).

Po dokončení pipetování *ependorfku* uzavřete a položte na misku vah. Odečtěte hmotnost napipetované destilované vody. Srovnajte skutečný navážený výsledek s očekávanou hodnotou vypočítanou součtem pipetovaných objemů a přepočtem objemu na hmotnost přes hustotu. Uvažujte hustotu destilované vody při teplotě v laboratoři rovnu  $\rho=1,000 \text{ g/cm}^3$ .

Očekávaný objem	Očekávaná hmotnost	Skutečný výsledek



#### 4. Pipetování velkých objemů

Do *titrační baňky* napipetujte: 10,0 ml destilované vody  
přidejte: 5,0 ml 0,1 M HCl  
5 kapek indikátoru

Pro pipetování 10,0 ml destilované vody použijte skleněnou pipetu s balónkem. 5,0 ml 0,1 M HCl přidejte z dávkovače. Dávkovač je určen pro odměřování agresivních reagentů. Jde o nádobu opatřenou pístem, na němž lze nastavit požadovaný objem. Pro vaši úlohu je objem 5 ml již nastaven, pouze k výtokové trubičce přistavíte titrační baňku. Celý píst se vytáhne na doraz nahoru a pak se pomalu stlačí zpět dolů. V posledním kroku přidáte 5 kapek indikátoru (**methylová červená**).

Závěr:



## Lab 2: Příprava roztoků, reakce anorganických sloučenin

### a) Příprava roztoku přesné koncentrace

**Úkol: Připravte 100 ml roztoku chloridu vápenatého o koncentraci 100 mmol/l**

Vypočítejte, kolik g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ( $M = 147,03 \text{ g/mol}$ ) bude třeba na přípravu 100 ml roztoku o koncentraci 100 mmol/l.

	Výsledek
	g

Odvažte přesně potřebné množství.

Použijete váhy nazývané *předvážky*, tj. normální laboratorní váhy, se kterými se snadno a rychle pracuje a jejichž přesnost je pro obvyklé potřeby dostačující. Váhy umožňují tzv. **tárování** (vynulování hmotnosti na vahách položené nádoby, v níž vážíme).

Na misku vah položte malou kádinku, v níž budeme vážit, a stiskněte tlačítko pro tárování.

Pomocí lžičky přidávejte pevný chlorid vápenatý tak, abyste měli přesně potřebné množství.

Odvážené množství chloridu vápenatého rozpustíte v kádince v „malém“ množství destilované vody (cca 30-50 ml).

Obsah z kádinky přelijte do odměrné baňky o objemu 100 ml.

Do kádinky, ve které jste chlorid vápenatý rozpouštěli, přidejte „nové malé množství“ destilované vody (cca 20 ml). Obsah znovu přelijte do odměrné baňky.

Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku přesně po rysku (na objem **100 ml**).

Odměrnou baňku uzavřete zátkou a důkladně obsah promíchejte.

Jaká je látková koncentrace rozpuštěných iontů v připraveném roztoku?

$\text{Ca}^{2+}$	mmol/l
$\text{Cl}^-$	mmol/l

Jaká je hmotnostní koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v připraveném roztoku?

$A_r(\text{Ca}) = 40,08$

	Výsledek
	g/l
	mg/l

*Pozor! Roztok nevytlévejte – budete jej potřebovat v části c).*

## b) Vybrané reakce anorganických sloučenin

**Úkoly:** Vyzkoušejte si vybrané reakce anorganických sloučenin.

Pro každou z následujících úloh budete potřebovat 1 čistou zkumavku. Nezáleží na přesném odměřování objemů, ze zásobních lahví budete roztoky přenášet kapátkem nebo přímo odlévat do zkumavek v přiměřeném malém množství (asi 1 ml, tj. cca 1 cm výšky sloupce roztoku ve zkumavce).

### 1. reakce iontů $\text{Ag}^+$ se zředěným roztokem $\text{HCl}$

POZOR: při potřísnění kůže ionty  $\text{Ag}^+$  vznikají těžko odstranitelné černé skvrny; rizikové je nejen polítko roztokem, ale i dotýkání se špinavého skla

Do zkumavky opatrně odlijte asi 1 ml roztoku s ionty  $\text{Ag}^+$ .

K roztoku ve zkumavce přilijte asi 1 ml zředěného roztoku  $\text{HCl}$ , zkumavkou netřepejte a pozorujte.

*pozorované změny:*

*reakční rovnice v iontové podobě*

### 2. reakce iontů $\text{Fe}^{3+}$ s roztokem hexakvanoželeznatanu draselného

*vzorec hexakvanoželeznatanu draselného:*

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku s ionty  $\text{Fe}^{3+}$ .

*barva původního roztoku:*

K roztoku ve zkumavce přidejte pár kapek roztoku hexakvanoželeznatanu draselného.

*pozorované změny:*

*reakční rovnice v iontové podobě*

*Jaký je tradiční název pro intenzivní barvu vzniklou reakcí  $\text{Fe}^{3+}$  iontů s hexakvanoželeznatany?*

### 3. reakce iontů $\text{Fe}^{3+}$ s ionty $\text{SCN}^-$

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku s ionty  $\text{Fe}^{3+}$ . Dále přidejte pár kapek roztoku s ionty  $\text{SCN}^-$ .

*pozorované změny:*

### 4. reakce iontů $\text{Cu}^{2+}$ s amoniakem

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku s ionty  $\text{Cu}^{2+}$ .

*barva původního roztoku:*

K roztoku ve zkumavce přidejte asi 1 ml zředěného roztoku amoniaku.

*pozorované změny:*

*reakční rovnice v iontové podobě*

### 5. reakce iontů $\text{Ca}^{2+}$ s kyselinou šťavelovou

Volné ionty  $\text{Ca}^{2+}$  plní v tělních tekutinách mnoho funkcí. Důležitou roli hrají i při srážení krve (hemokoagulaci). Vyvázáním  $\text{Ca}^{2+}$  lze *in vitro* zabránit srážení krve, což má význam v klinické laboratorní praxi, pokud potřebujeme, aby krev po odběru zůstala nesražená. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  je možné z roztoku odstranit (vyvázat) pomocí organických kyselin obsahujících více karboxylových skupin. Příkladem takových látek jsou mj.

*vzorec kyseliny šťavelové (oxalové)*

*vzorec kyseliny citrónové*

Vyzkoušejte si reakci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů s kyselinou šťavelovou. Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku  $\text{Ca}^{2+}$ . K roztoku ve zkumavce přidejte asi 1 ml roztoku kyseliny šťavelové.

*pozorované změny:*

*reakční rovnice v iontové podobě*

## 6. reakce uhličitánů se zředěným roztokem HCl

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku uhličitanu sodného. K roztoku ve zkumavce přidejte asi 1 ml zředěného roztoku HCl.

*pozorované změny:*

<i>reakční rovnice</i>	<i>plyn, který se uvolňuje</i>

### c) Filtrace, centrifugace

**Úkoly:** Část připraveného roztoku chloridu vápenatého vysrážejte kyselinou šťavelovou, vzniklé sraženiny oddělte pomocí filtrace a centrifugace

#### 1. Srážení

Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  je možné z roztoku odstranit (podle koncentrace buď jen vyvázat, nebo při vyšších koncentracích i vysrážet) pomocí kyseliny šťavelové.

Do každé ze dvou připravených centrifugačních zkumavek (kónické dno) odpipetujte 3,0 ml roztoku chloridu vápenatého připraveného podle návodu v oddílu a).

Spočítejte, kolik ml roztoku kyseliny šťavelové ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) je třeba k úplnému vysrážení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v odměřených 3,0 ml roztoku.

	Výsledek
	ml

Napipetujte do centrifugačních zkumavek s roztokem chloridu vápenatého vypočítaný objem roztoku kyseliny šťavelové.

*pozorované změny:*

Sraženinu v první zkumavce oddělte filtrací, ve druhé centrifugací:

## 2. Filtrace

Filtrační papír přeložte na polovinu a následně na čtvrtinu a otevřete ho tak, aby vytvořil kužel. Takto připravený filtr vložte do nálevky. Ovlhčete jej destilovanou vodou, aby přilnul na stěny.

Nálevku s filtrem vložte do filtračního kruhu upevněného na stojanu. Pod nálevku umístěte kádinku tak, aby se seříznutý stonek nálevky dotýkal delším koncem vnitřní stěny kádinky.

Roztok se sraženinou nalévejte na filtr po tyčince ke stěně nálevky. Proud nesmí směřovat přímo do ústí nálevky, aby nedošlo k protržení filtru.

## 3. Centrifugace

Zkumavky uvnitř centrifugy musí být vyvážené, potřebujeme „protizkumavku“. Do druhé stejné centrifugační zkumavky dejte přibližně stejný objem vody.

Požádejte svého asistenta případně laborantku o provedení centrifugace.

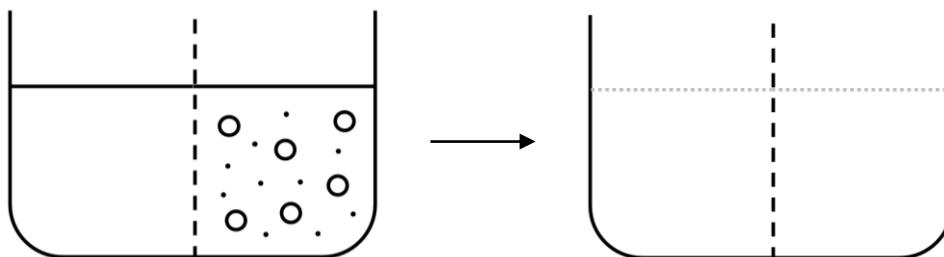
Zhodnoťte výsledky:

Závěr:

## Lab 3: Osmóza, osmotický tlak, osmolalita

Uvažujme nádobu rozdělenou na poloviny membránou (v obrázcích je znázorněna čárkovanou čarou). Na začátku je v levé polovině nádoby čistá voda, v pravé polovině nádoby je roztok obsahující směs velkých a malých molekul (iontů, či jiných částic). Hladiny jsou v obou polovinách nádoby ve stejné výši. Budeme řešit tři odlišné možnosti chování membrány rozdělující nádobu. Zakreslete do obrázku na pravé straně, jak bude vypadat situace v pravé a levé polovině nádoby po dosažení rovnovážného stavu (množství velkých a malých částic, výšky hladin). Najděte odpovědi na uvedené otázky.

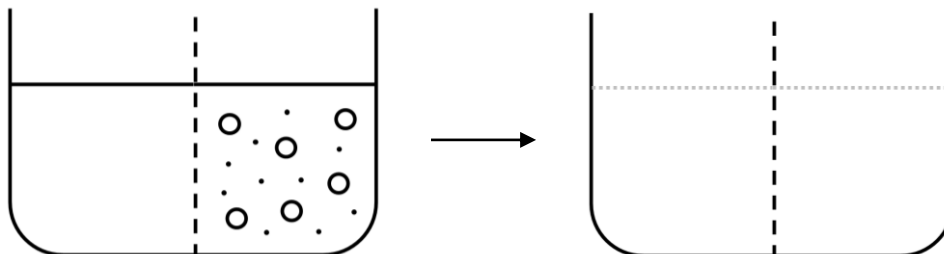
### 1) membrána je volně propustná pro vodu, malé i velké částice



Popište slovy, k čemu dojde:

Tento proces se nazývá:

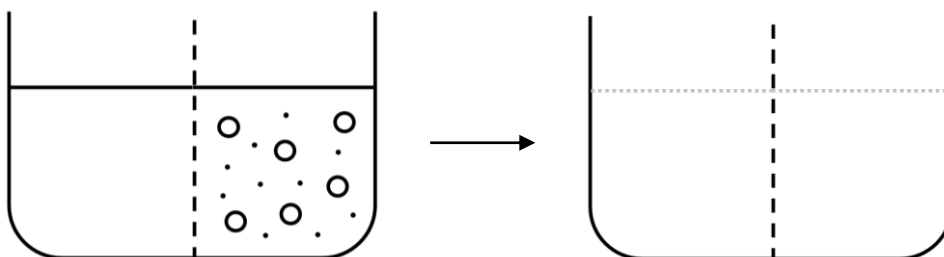
### 2) membrána je volně propustná jen pro vodu a malé částice



Popište slovy, k čemu dojde:

Tento princip je využíván u separační (dělící) metody, která se nazývá:

### 3) membrána je volně propustná jen pro vodu, rozpuštěné částice neprocházejí



Popište slovy, k čemu dojde:

Tento jev (děj, proces) se nazývá:

Abychom měli výčet možností chování membrány úplný, ještě by přicházela v úvahu jedna možnost, kdy membrána není propustná vůbec pro nic. Ale to není ničím zajímavé ☺.

Membrána popsaná v případech 2 a 3 je propustná jen pro něco, označuje se proto jako **semipermeabilní** (polopropustná). Dále se budeme zabývat pouze jevem popsaným v případě 3, kdy jsou prostředí od sebe oddělena membránou propustnou pouze pro rozpouštědlo (v našem případě pro vodu). Děj, který jste popsali, je způsoben přítomností tzv. osmoticky aktivních částic v roztoku. Nezáleží na velikosti částic, jejich náboji ani tvaru. Důležitý je pouze počet "kusů" těchto částic. Přítomnost osmoticky aktivních částic nezpůsobuje pouze jev popsaný výše, ale mění řadu vlastností použitého rozpouštědla (pro nás bude rozpouštědlem vždy voda).

Dochází k: snížení teploty tání (= kryoskopický efekt)  
vzestupu teploty varu (= ebullioskopický efekt)

K popisu vlastnosti roztoku, která způsobuje popsané jevy, je možné použít některou z těchto veličin:

Veličina		Základní jednotka
osmotický tlak	tlak, který je třeba aplikovat shora na pravou polovinu nádoby, aby nedocházelo k jevu znázorněnému v případě 3	Pa
osmolarita	látková koncentrace všech osmoticky aktivních částic v roztoku	mol/l
osmolalita	koncentrace osmoticky aktivních částic vztažená na kg rozpouštědla	mol/kg rozpouštědla

Je důležité si uvědomit, že jediné, na čem záleží, je koncentrace všech možných částic v roztoku (iontů, molekul, ...) bez ohledu na druh částice, její velikost, náboj a tvar.

Jakou osmolaritu má roztok glukózy o koncentraci 100 mmol/l?	Výsledek
	mmol/l

Jakou osmolaritu má roztok NaCl o koncentraci 100 mmol/l?	Výsledek
	mmol/l

Jakou osmolaritu má roztok CaCl <sub>2</sub> o koncentraci 100 mmol/l?	Výsledek
	mmol/l

Jakou osmolaritu má roztok, který obsahuje: NaCl        140 mmol/l glukóza    10 mmol/l močovina   10 mmol/l	Výsledek
	mmol/l

V biochemii budeme dávat přednost osmolalitě (číselně se nerovná přesně osmolaritě, ale není ani výrazně odlišná).

Osmolalita vnitřního prostředí (= extracelulární tekutiny, krevní plazmy)

$$= 285 \pm 10 \text{ mmol/kg vody}$$

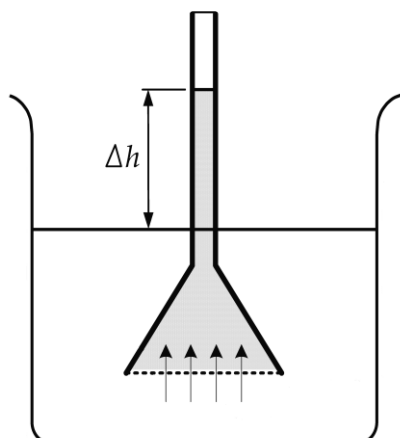
Osmolalita vnitřního prostředí se udržuje stálá, na úkor osmolality moči. Osmolalita moči se může pohybovat v širokém rozmezí hodnot (50–1200 mmol/kg vody), záleží především na příjmu tekutin, ale i na dalších vlivech (pocení, ...).

Srovnáváme-li osmolalitu (osmolaritu, osmotický tlak) dvou roztoků, používáme termíny:

**hypoosmolární, isoosmolární a hyperosmolární**



## a) Demonstrace osmózy



Pokusíme se realizovat klasický experiment demonstrující osmózu, jehož princip je znázorněn na obrázku. Roztok o větší osmolalitě nasává přes polopropustnou membránu vodu, a dochází tak k vzestupu jeho hladiny. Teoreticky by se měl vzestup hladiny zastavit, až hydrostatický tlak sloupce vyrovná osmotický tlak roztoku.

$$\pi = \Delta h \rho g$$

$\Delta h$  ... výška sloupce

$\rho$  ... hustota kapaliny

$g$  ... gravitační konstanta

### Pokus

Máme k dispozici komerčně dostupnou pomůcku pro demonstraci kapilárních jevů a osmózy.



Osmometr DM555-1A

Trubice má velmi tenký průměr (kapilára), uplatní se zde výrazně i kapilární jevy způsobené povrchovým napětím, které velmi usnadňují pohyb kapaliny vzhůru proti směru působení gravitace. Povrchové napětí způsobuje, že se povrch kapalin chová jako elastická vrstva, snaží se dosáhnout co nejmenší energie.

Přes dno baňky osmometru přichyťte pomocí gumiček polopropustnou membránu. Gumičky musí zajistit těsnost systému. Membránu zvlhčete ponořením do destilované vody.

Do baňky osmometru nalijte 2-3 mm od kraje roztok sacharózy (pro lepší viditelnost obarvený modrým potravinářským barvivem).

Hrdlo baňky uzavřete zátkou na spodním konci skleněné trubice osmometru.

Vložte osmometr do velké kádinky s destilovanou vodou a zafixujte tak, aby spodní část osmometru s membránou nestála na dně.

Na stopkách začněte měřit čas. Zaznamenejte dobu, za kterou vystoupí hladina v kapiláře až na její vrchol přecházející v rozšířenou baňku.

Začátek pokusu: ("kolik je hodin")	Konec pokusu: ("kolik je hodin")	Doba: minut
Rozdíl hladin – výška sloupce (mm):		

***Proč používáme právě sacharózu?***

Celofán, který používáme jako membránu, se rozhodně nechová jako ideální teoretická semipermeabilní membrána, nepouští jen rozpouštědlo (vodu), ale bohužel i další malé částice velikosti  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  iontů, proto pro tento demonstrační pokus nemůžeme použít roztok  $\text{NaCl}$  případně  $\text{CaCl}_2$  (běžné soli velice dobře rozpustné ve vodě, vezmeme-li dále v úvahu nízkou molární hmotnost iontů vzniklých disociací, dojdeme k závěru, že jsou to ideální látky pro přípravu roztoků o vysoké osmolalitě). Sacharóza ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) už má dost velkou molekulu, aby póry v našem celofánu neprošla. Je to cukr s extrémní rozpustností ve vodě, což umožní také připravit celkem "koncentrovaný" roztok.

Jaká je látková koncentrace nasyceného roztoku sacharózy ( $M = 342,3 \text{ g/mol}$ )?  
Rozpustnost při  $25^\circ\text{C}$ : 67,9 g sacharózy ve 100 g roztoku (hustota  $1,338 \text{ g/cm}^3$ )

	mol/l
	mmol/l
Jakou má tento roztok osmolalitu (osmolaritu)?	
Závěr:	

## b) Příprava isotonických infúzních roztoků

### Úkol 1: Připravte 200 ml fyziologického roztoku

Fyziologický roztok je 0,9% roztok NaCl. Jedná se o roztok isotonický, tj. roztok isoosmolární s krevní plazmou.

Vypočítejte, kolik g NaCl bude třeba na přípravu 200 ml 0,9% roztoku NaCl (hustota:  $1,00 \text{ g/cm}^3$ ).

	Výsledek
	g

Odvažte přesně potřebné množství.

Odvážené množství NaCl přeneste do kádinky, kde ho rozpustíte v „malém“ množství destilované vody (cca 50 ml).

Obsah z kádinky přelijte do odměrné baňky o objemu 200 ml.

Do kádinky, ve které jste NaCl rozpouštěli, přidejte „nové malé množství“ destilované vody (cca 50 ml). Obsah znovu přelijte do odměrné baňky.

Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku po rysku (tj. na objem **200 ml**).

Odměrnou baňku uzavřete zátkou a důkladně obsah promíchejte.

Jaká je látková koncentrace připraveného roztoku?

$M_{\text{NaCl}} = 58,5 \text{ g/mol}$

	Výsledek
	mol/l
	mmol/l

Jaká je hmotnostní koncentrace připraveného roztoku?

	Výsledek
	g/l

Jakou má tento roztok osmolalitu (osmolaritu)?

--

## Úkol 2: Připravte 250 ml Ringerova roztoku

Fyziologický roztok v podobě 0,9% NaCl obsahuje pouze  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  ionty. V krevní plazmě jsou přítomny ale i jiné ionty. V praxi se používají i infúzní roztoky trochu více odpovídající složení krevní plazmy. Jedním z nich je Ringerův roztok.

Postupně navažte pomocí plastové váženky a přeneste navážená množství do téže 250 ml Erlenmayerovy baňky:

chlorid sodný	2,150 g
chlorid draselný	0,075 g
chlorid vápenatý	0,083 g

Do téže Erlenmayerovy baňky spláchněte i nepozorovatelné zbytky z váženky pomocí stříčky s destilovanou vodou.

Přidejte destilovanou vodu do objemu asi tak 100 – 150 ml a krouživým mícháním dokonale rozpustíte obsah.

Pomocí nálevky přelijte obsah Erlenmayerovy baňky do 250 ml odměrné baňky. Erlenmayerovu baňku alespoň 2x propláchněte malým množstvím vody, vše pořád slejte do odměrné baňky.

Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku přesně po rysku (na objem **250 ml**). Odměrnou baňku uzavřete zátkou a důkladně obsah promíchejte.

Jaká je látková koncentrace jednotlivých iontů v připraveném roztoku?

$$M(\text{NaCl}) = 58,45 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{KCl}) = 74,56 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 146,99 \text{ g/mol}$$

	Výsledek
$\text{Na}^+$	mmol/l
$\text{K}^+$	mmol/l
$\text{Ca}^{2+}$	mmol/l
$\text{Cl}^-$	mmol/l

Jakou má tento roztok osmolalitu (osmolaritu)?

Závěr:
--------

### c) Kryoskopické měření osmolality

Osmolalitu budeme stanovovat na základě kryoskopického efektu. Čím je větší osmolalita roztoku, tím má nižší teplotu tání (tuhnutí). Rozdíl mezi teplotou tání roztoku a teplotou tání čistého rozpouštědla ( $\Delta T$ , pokles bodu tání) je přímo úměrný osmolalitě. Konstantou úměrnosti je tzv. kryoskopická konstanta.

$$\Delta T = K \times \text{osmolalita} \quad \text{kryoskopická konstanta vody: } K_K = 1,86 \text{ } ^\circ\text{C} \times \text{kg} \times \text{mol}^{-1}$$

pozn. K měření osmolality by bylo možné využít i ebullioskopického efektu. Čím je větší osmolalita roztoku, tím má vyšší teplotu varu. Rozdíl mezi teplotou varu roztoku a teplotou varu čistého rozpouštědla ( $\Delta T$ , vzestup bodu varu) je přímo úměrný osmolalitě. Konstantou úměrnosti je v tomto případě ebullioskopická konstanta.

$$\text{ebullioskopická konstanta vody: } K_E = 0,513 \text{ } ^\circ\text{C} \times \text{kg} \times \text{mol}^{-1}$$

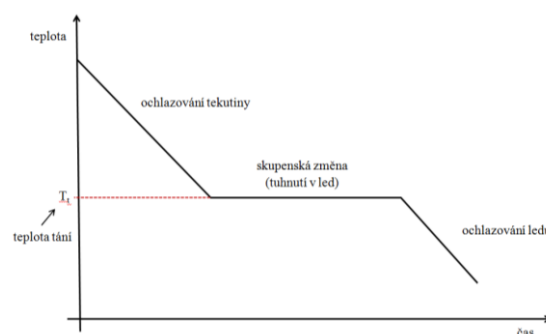
Jakou teplotu tání (tuhnutí) má vodný roztok o osmolalitě 5 mol/kg vody ?	Výsledek
	$^\circ\text{C}$

Tyto znalosti nám umožní převést úlohu "Jak změřit osmolalitu?" na úlohu "Jak změřit teplotu tání?".

Teplotu tání (tuhnutí) lze snadno odečíst z časového průběhu poklesu teploty během ochlazování analyzovaného vzorku.

Co se stane s tekutinou, budeme-li ji ochlazovat?

Teplota postupně klesá, dosáhne-li se teploty tuhnutí (tání), pokles teploty se zastaví, dokud všechna tekutina nezuhne v led. Teprve potom může pokles teploty pokračovat a zastaví se na teplotě prostředí, kam je tento vzorek umístěn.



### Měření osmolality moderním osmometrem

Máme k dispozici i moderní osmometr, přístroj pro kryoskopické stanovení celkové osmolality ve vodných roztocích s dotykovým LCD. Používá velmi citlivý teploměr s rozlišitelností 0,001  $^\circ\text{C}$ , což odpovídá ve výsledku osmolality rozlišitelnosti 1-2 mmol/kg. Pracuje se s objemy vzorků 50  $\mu\text{l}$ , doba měření je cca 1 min. Měření je snadné a rychlé, proto proměříme více vzorků.

### Příprava vzorků

1. Destilovaná voda – eppendorfka ve stojánku u přístroje
2. Vzorek vlastní moči – k dispozici je odběrová nádoba, toaleta...
3. Fyziologický roztok (0,9% NaCl) – máme připraveno
4. Ringerův roztok – máme připraveno
5. Ringerův roztok + ethanol:

Odměrným válcem odměřte co nejpřesněji 50 ml Ringerova roztoku, přelijte do kádinky a připipetujte **0,25 ml** 40% alkoholického nápoje.

Spočítejte, jaký vzestup osmolality (osmolarity) by měl tento přírůstek ethanolu způsobit:

6. Ringerův roztok + glukóza:

Odměrným válcem odměřte co nejpřesněji 50 ml Ringerova roztoku, přelijte do kádinky. Odvažte pomocí váženky **270 mg** glukózy a tu rozpusťte v roztoku v kádince.

Spočítejte, jaký vzestup osmolality (osmolarity) by měl tento přírůstek glukózy způsobit:

Vzorek	Změřená osmolalita
Destilovaná voda	mmol/kg
Vzorek moči	mmol/kg
Fyziologický roztok (0,9% NaCl)	mmol/kg
Ringerův roztok	mmol/kg
Ringerův roztok + ethanol	mmol/kg
Ringerův roztok + glukóza	mmol/kg

Závěr:

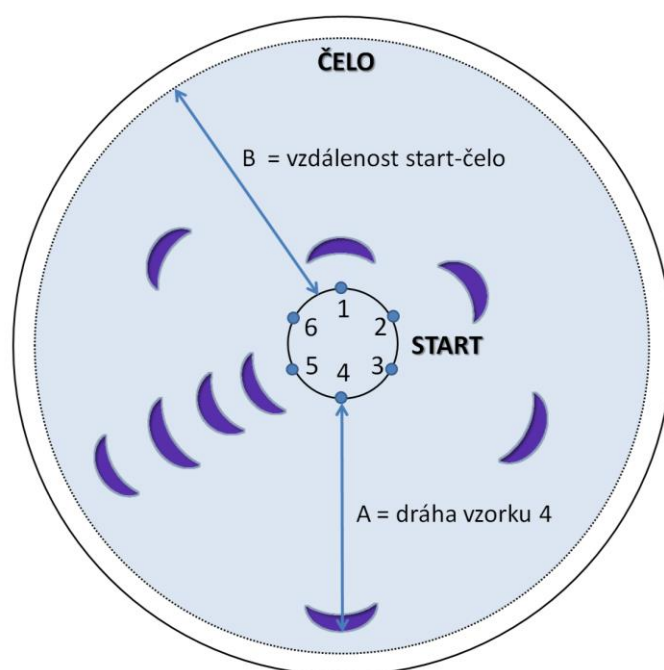
## Lab 4: Chromatografie

### a) Papírová chromatografie aminokyselin

Dělení probíhá na chromatografickém papíře, který je nosičem stacionární fáze, tj. vody, která je v množství asi 5% trvale vázaná na celulosu. Pro méně náročné práce může být nahrazen papírem filtračním, který na rozdíl od papíru chromatografického nemá tak přesně definované vlastnosti. Mobilní fází jsou různá organická rozpouštědla nebo jejich směsi s určitým podílem vody, aby nedocházelo k vymývání stacionární fáze z nosiče.

Vzorky se nanášejí na start kapilární mikropipetou v objemu 2 až 10  $\mu\text{l}$ . Během nanášení se rozpouštědlo odpařuje, aby se vzorek zkoncentroval do skvrny o malém průměru.

Vyvíjení se provádí ve skleněných uzavřených komorách. Dojde-li čelo na konec papíru, chromatogram se vyjme, usuší a podle potřeby vyvolá. (Postříká se vhodným činidlem, které dává se všemi vzorky výraznou barevnou reakci). Někdy se použije UV-detekce. Řada látek (často přírodního původu) vykazuje v UV-světle barevnou fluorescenci. K vyhodnocení se použije hodnota retardačního faktoru  $R_f$  a provede se srovnání s paralelně nanesenými standardy.



$$R_f = \frac{A}{B}$$

### Příprava chromatogramu

Na pracovním stole máte připraven chromatografický papír o velikosti  $18 \times 18$  cm. Určete střed a kolem středu opište kružnici o průměru přibližně 2,5 cm (*můžete použít připravenou šablonu*). Na kružnici naznačte **lehce** šest bodů tak, aby jednotlivé body byly po kružnici rovnoměrně rozloženy. Jednotlivé body, na které se budou nanášet vzorky, očísľujte (*použijte měkkou tužku, nikoliv propisovací nebo fix!*)

Na body označené čísly 1 až 4 naneste standardy. *Standardy jsou ve stojánku na pracovním stole. K nanášení použijte Pasteurovy pipety.* Na bod označený číslem 5 naneste směs

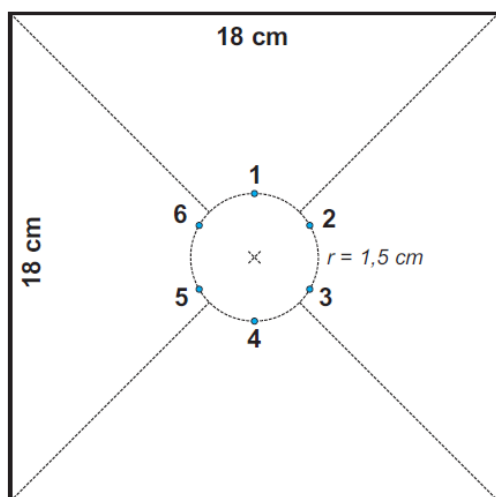
standardů, na bod číslo 6 jeden z neznámých vzorků. Standardy, směs i vzorek naneste 3× na stejné místo. Mezi jednotlivými kapkami stále odpařujte rozpouštědlo (použijte k tomu fén nebo infralampu), aby vzorek zůstal na malé ploše. Průměr skvrny by neměl přesáhnout 0,5 cm. Jednotlivé vzorky nanesené na kružnici se nesmí dotýkat nebo dokonce překrývat. Na kvalitní a pečlivé práci při nanášení vzorků závisí i dobrý výsledek experimentu.

Do středu kruhu udělejte malý otvor (např. hrotem tužky), jímž provléknete „knot“ (pevně stočený proužek chromatografického papíru).

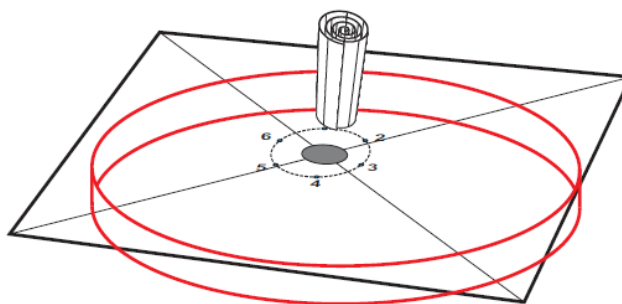
## Vyvíjení a detekce

*Pracujte pouze v digestoři!*

Do Petriho misky s připravenou vyvíjecí směsí (*n*-butanol – kyselina octová - voda 4:1:1) vložte chromatogram tak, aby knot zasahoval do vyvíjecí směsi. Lehce přiklopte horní misku a pozorujte radiální postup rozpouštědla. Vyvíjení trvá asi 1 hodinu.



Chromatogram



Vyvíjecí komora

Dojde-li čelo k okraji misky, vyvíjení ukončete. Chromatogram vyjměte, pinzetou odstraňte knot a **ihned**, dokud je papír ještě vlhký, tužkou označte polohu čela. Pak nechte chromatogram v digestoři usušit.

Suchý chromatogram stejnoměrně z vhodné vzdálenosti postříkejte činidlem pro detekci aminokyselin (roztok ninhydrinu v acetonu).

*Pracujte pouze v digestoři, použijte ochranné rukavice!*

Snažte se, aby celá plocha mezi startem a čelem (místo, kde putovala mobilní fáze a kde lze očekávat, že se budou nacházet složky vzorku) byla rovnoměrně zvlhčena. Nechte v digestoři uschnout před rozsvícenou infralampou ve vzdálenosti asi 30 cm (chromatogram můžete opřít o zadní stěnu digestoře) a pak zahřejte asi na 80°C přiblížením chromatogramu těsně k infralampě (celá plocha musí být postupně zahřáta). Objeví se modrofialové skvrny aminokyselin. Najděte jejich těžiště a změřte potřebné vzdálenosti pro výpočet  $R_f$ .



Porovnáním výsledků určete neznámou aminokyselinu. Chromatogram přiložte k protokolu, hodnoty  $R_f$  zapište do tabulky.

Pozice	Aminokyselina	$R_f$ (jednotlivých vzorků)
1	Lysin	
2	Glycin	
3	Alanin	
4	Isoleucin	
5	Směs aminokyselin 1 – 4	---
6	Vzorek	

Závěr:

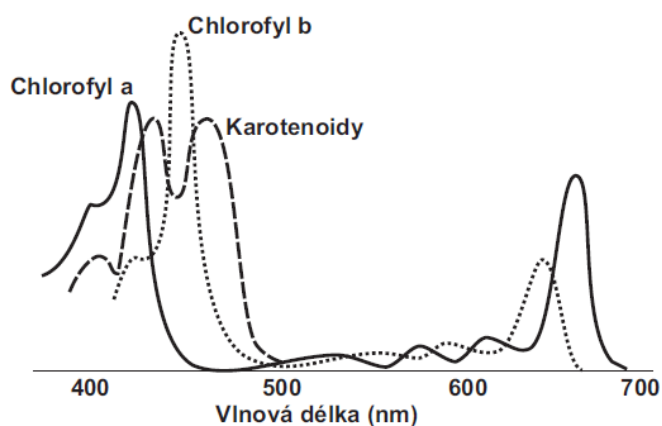
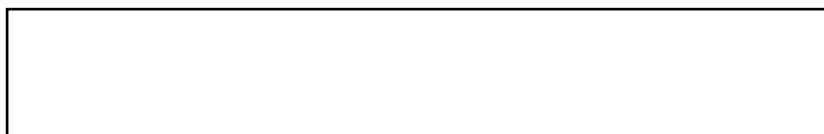
## b) Dělení rostlinných pigmentů chromatografií na tenké vrstvě

Tenkovrstvá chromatografie (TLC – thin layer chromatography) představuje velmi jednoduchou, ale značně účinnou chromatografickou metodu, jejíž podstatou je rozdělení jednotlivých složek směsi na základě jejich odlišné interakce se sorbentem, který je nanesen v tenké vrstvě na pevnou podložku. Mobilní fází je organické rozpouštědlo o vhodné polaritě. Volba nejvhodnějšího sorbentu, detekčního činidla a rozpouštědla závisí na typu dělené směsi.

TLC slouží především ke sledování průběhu reakcí a je ukazatelem čistoty produktů. Tenká vrstva stacionární fáze je tvořena buď volně sypaným sorbentem, nebo sorbentem fixovaným vhodným pojivem (škrob nebo sádra). V současnosti jsou častěji využívány fixované tenké vrstvy, se kterými je dobrá manipulace, a které poskytují dobře reprodukovatelné výsledky. Tyto vrstvy jsou připravovány rozprostřením suspenze sorbentu v rozpouštědle na vhodnou podložku (hliníková nebo plastová fólie). Vlastní chromatografie se provádí obvykle vzestupným způsobem tak, aby nanesený vzorek nebyl ponořen do kapaliny, ale rozpouštědlo se na úroveň startu dostalo jen vztlínáním. Chromatografická komora musí být po celou dobu vztlínání rozpouštědla těsně uzavřena, aby nedocházelo k úniku par a tím k nežádoucím okrajovým jevům, které nepříznivě ovlivňují průběh dělení. Destička s tenkou vrstvou se z chromatografické komory vyjme ve chvíli, kdy čelo rozpouštědla dospěje několik milimetrů od jejího horního okraje. Poté se provede vyhodnocení chromatogramu, které je nejjednodušší u barevných látek, protože tam je přímo vidět poloha získané stopy. V případě, že se jedná o látky bezbarvé, je potřeba získané stopy zviditelnit detekčním činidlem, které při reakci se stanovovanou látkou vytváří barevnou stopu.

V listech zelených rostlin se vyskytuje větší počet lipofilních barviv, jejichž charakteristickou vlastností je rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Chemicky i funkčně jsou velmi různorodá, jejich společným rysem je větší počet konjugovaných dvojných vazeb v molekule. Většina těchto barviv souvisí s fotosyntézou, přičemž rozhodující význam mají chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy, které se uplatňují při zachycování a přeměně světelné energie. Chlorofyly jsou cyklické tetrapyrroly s centrálním atomem hořčíku, karotenoidy zahrnují xantofyly a karoteny.

*Uveďte jiný cyklický tetrapyrrol, jeho centrální atom a oxidační stupeň.*



Pokud budeme sledovat, které vlnové délky určité barvivo absorbuje, získáme tzv. **absorpční spektrum**. Toto spektrum vykazuje maxima (tzv. píky), která jsou typická pro danou látku. Ideální je sledování absorpčního spektra ve viditelné oblasti, což je dostatečné pro identifikaci několika barviv obsažených v listech. Rozkladnými produkty chlorofylu jsou feofytiny, karotenoidy přecházejí přes epoxidy na bezbarvé sloučeniny.

Rychlého rozdělení listových barviv lze dosáhnout chromatografií na tenké vrstvě, kde adsorbentem je oxid křemičitý fixovaný pomocí škrobového pojidla na hliníkovou destičku (Silufol). Složky směsi se dělí na základě rozdílné adsorpční afinity stacionární fáze k molekulám rozpuštěných látek. Po rozdělení extraktu lze jednotlivé složky vymýt (= eluovat) z nosiče organickými rozpouštědly a spektrofotometricky stanovit.

Přinesete si rostlinný materiál ("zelené části" – list, jehličí, stonek). Doporučuji **tis** ze zahrady fakulty (stačí krátká větvička s jehličím, cca 5 cm).

### **Příprava vzorku**

Vzorek rostlinného materiálu jemně nastříhejte do třecí misky - čím menší kousky, tím lépe se vám budou homogenizovat. Přímo do misky přidejte na špičku lžičky uhličitanu vápenatého, který zabrání nežádoucímu snižování pH v průběhu homogenizace, malé množství skleněných střípků a rozetřete s malým množstvím acetonu (1 až 2 ml), abyste získali koncentrovaný extrakt. Aceton je těkavé rozpouštědlo, pokud se před zahájením nanášení vzorku odpaří, je nutné ho do třecí misky opět malé množství přidat. Cílem je nanášet koncentrovaný extrakt směsi barviv, a tedy acetonu je třeba dávat jen tolik, kolik je nezbytně nutné k nasátí extraktu do kapiláry.

*Pro ochranu očí použijte ochranné brýle!*

Napište strukturní vzorce:

uhličitanu vápenatého



acetonu a isopropanolu



### **Příprava vyvíjecí soustavy**

Ve vyvíjecí komoře máte připravenou vyvíjecí směs benzín : petroléter : aceton v poměru složek 4 : 1 : 2. Komora musí být uzavřena skleněnou deskou, aby před vlastním pokusem byla nasycena parami směsi.

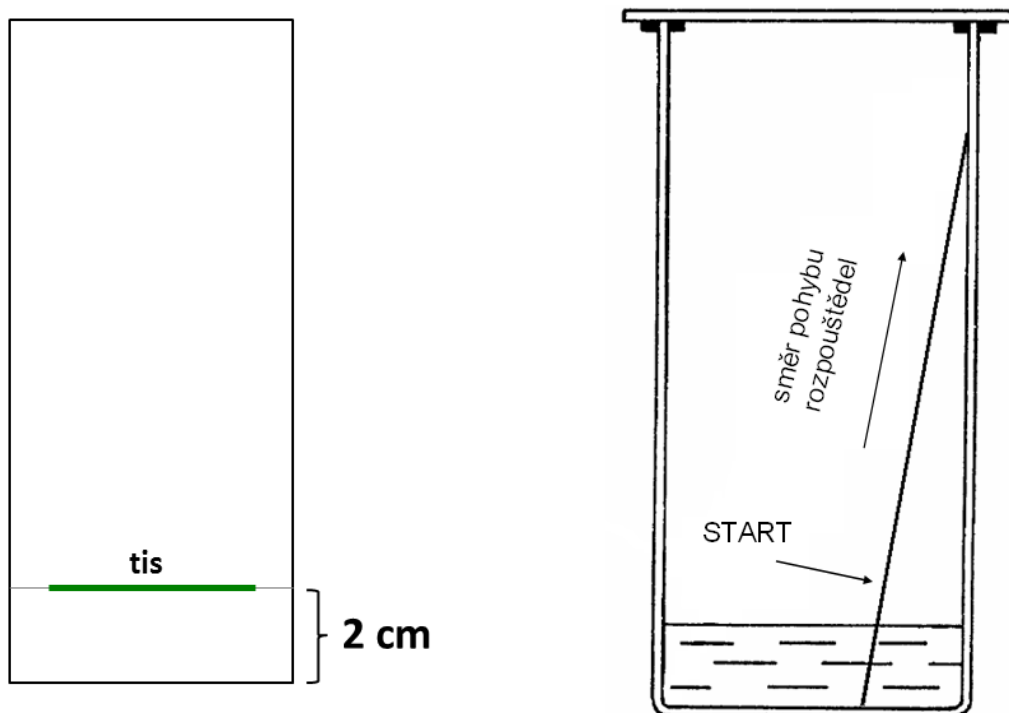
*Máte-li vyvíjecí komoru o obdélníkové základně 25 x 10 cm, kolik ml vyvíjecí směsi potřebujete, aby linie startu, která je dva centimetry od spodního okraje, byla půl centimetru nad hladinou?*

*A máte-li připravit toto množství vyvíjecí směsi ve výše uvedeném poměru, kolik budete potřebovat ml jednotlivých složek?*

## Nanášení vzorku

Budete pracovat se silufolovou deskou. Na kratší straně silufolové desky asi 2 cm od dolního okraje naznačte lehce tužkou start. Dbejte na to, abyste přitom neporušili tenkou vrstvu oxidu křemičitého! Vzorek budete nanášet skleněnou kapilárou, která je ponořena v čistícím roztoku ve skleněném válečku. Před použitím kapiláru osušte dotknutím se savého papíru nebo buničiny.

Na start desky naneste skleněnou kapilárou acetonový extrakt vzorku jako dlouhou tenkou čárku (viz obrázek). Po nanesení vyčkejte zaschnutí. Po zaschnutí se nanášení na stejné místo 3-4× zopakuje, aby se dosáhlo dostatečné sytosti. Pozor, extrakt má tendenci se rozpíjet, a proto dbejte na to, aby proužek vzorku byl co nejužší. Po dokončení nanášení by neměl zasahovat od startu dále jak 3 mm nahoru/dolů. Nanášení provádějte dostatečně pomalu! Vzorek nanášejte tak, aby byla mezera (cca 5 mm) mezi okrajem destičky a naneseným vzorkem (viz obrázek).

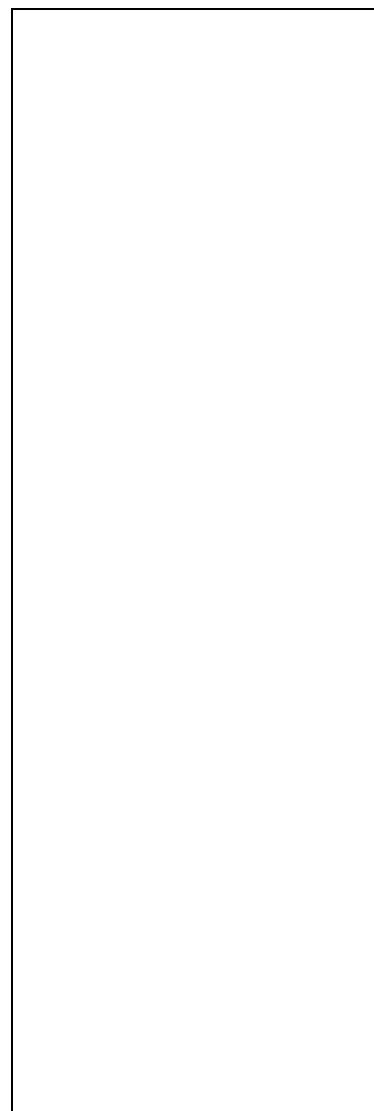
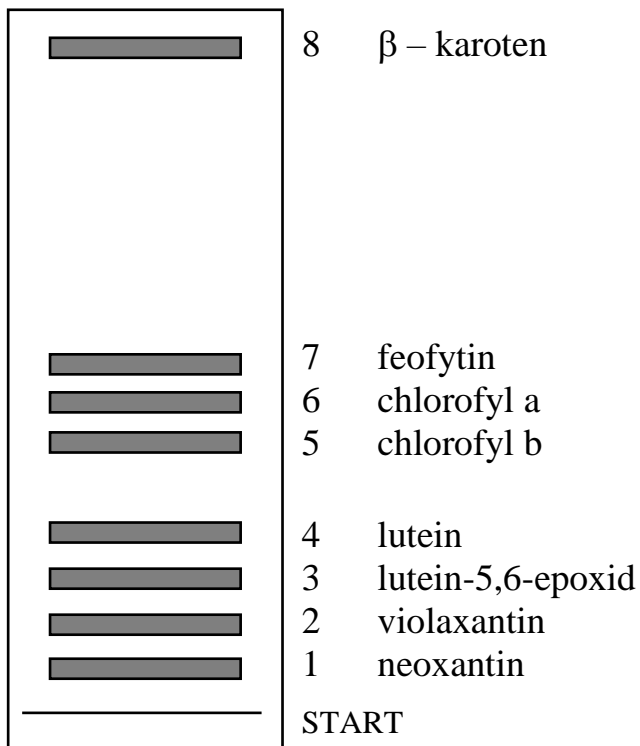


## Vyvíjení

Vložte do vyvíjecí komory připravenou silufolovou destičku s naneseným vzorkem. Destičku opřete šikmo o stěnu komory tak, aby byl dolní okraj ponořen ve vyvíjecí směsi. Start nesmí být v žádném případě ponořen! Komoru pečlivě uzavřete. Vyvíjení ukončete ve chvíli, kdy dojde čelo rozpouštědla asi 1 cm pod horní okraj destičky. Po vyjmutí destičky označte tužkou místo, kam rozpouštědlo doputovalo, a destičku vysušte.

Na základě znalosti hlavních barviv obsažených v rostlinných materiálech přiřaďte jednotlivým barevným frakcím názvy pigmentů (ne všechny zóny z obrázku musí být přítomny, nebo naopak se mohou vyskytnout i jiné).

*Sem překreslete nebo vlepte chromatogram*



Vysvětlete následující pojmy:

Stacionární fáze

Mobilní fáze

Závěr:

### c) Dělení barevné směsi gelovou chromatografií

Úkol: Oddělte dextranovou modř od chromanu draselného

Dextranová modř Co jsou to dextransy?	Barva	Molární hmotnost
		$\sim 2 \times 10^6$ g/mol

Chroman draselný	Barva	Molární hmotnost
vzorec:  co je přítomno v roztoku:		g/mol

Na pracovním stole máte připravenou kolonu naplněnou stacionární fází - gelem *Sephadex* (polysacharid dextranového typu).

Odzátkujte kolonu, otevřete kohout a kapalinu nad gelem nechte vytéci. Ponechte jen malou vrstvu nad gelem (asi 2 mm). Do ní pipetou naneste 0,5 ml barevné směsi (dextranová modř a chroman draselný). *Směs před pipetováním promíchejte.* Pipetu s nasazenou modrou špičkou je třeba vsunout opatrně do kolony tak, aby špička byla těsně nad povrchem gelu (hladinou kapaliny v koloně). Obsah špičky vyprazdňujte velmi pomalu! Barviva nesmí ulpět na stěně kolony!

Barva směsi:

Pootevřete kohout a směs nechte pomalu vsáknout.

Do skleněné pipety (s nasazeným balónkem) si připravte asi 3 ml elučního roztoku (fyziologický roztok; 0,9% NaCl).

Pipetu vsuňte do kolony tak, aby její ústí bylo těsně nad hladinou, pomalu a velmi opatrně přidávejte eluční roztok. **Povrch gelu se nesmí zvířit!** Současně kohoutem nastavujte rychlost průtoku kolonou, aby se nad gelem přidávaný eluční roztok nehromadil, 1 až 2 kapky za sekundu. Roztok, který vytéká z kolony (tzv. **eluát**), jímejte do odpadní nádoby. Jakmile dojde roztok v pipetě, zavřete kohout kolony, v klidu si prohlédněte, co se v koloně děje a připravte se na pokračování promývání a jímání barevných frakcí.

Popište pozorované změny v koloně:

### Získání eluční křivky

Máte nacvičený postup promývání kolony. Ujistěte se, že víte, co budete v následujících minutách dělat! Čistý návod v průběhu práce je pozdě!

Skleněnou pipetu naplňte po maximální objem elučním roztokem. Připravte se k zahájení experimentu – pipetu vsuňte do kolony.

V okamžiku zahájení eluce (přidávání roztoku z pipety za současné regulace rychlosti průtoku kohoutem) začněte měřit eluční čas (pusťte stopky – v průběhu eluce je **nebudete** vypínat, jen si zaznamenate příslušné časy. Eluát jímejte zatím do odpadní nádoby.

Sledujte po celou dobu průběh dělení. V okamžiku, kdy se v eluátu objeví **první barevná frakce**, zaznamenejte čas (v sekundách), kdy začala tato frakce vytékat. Současně ji zachytávejte do kalibrované zkumavky. (použijte tenčí zkumavku – objem 10 ml)

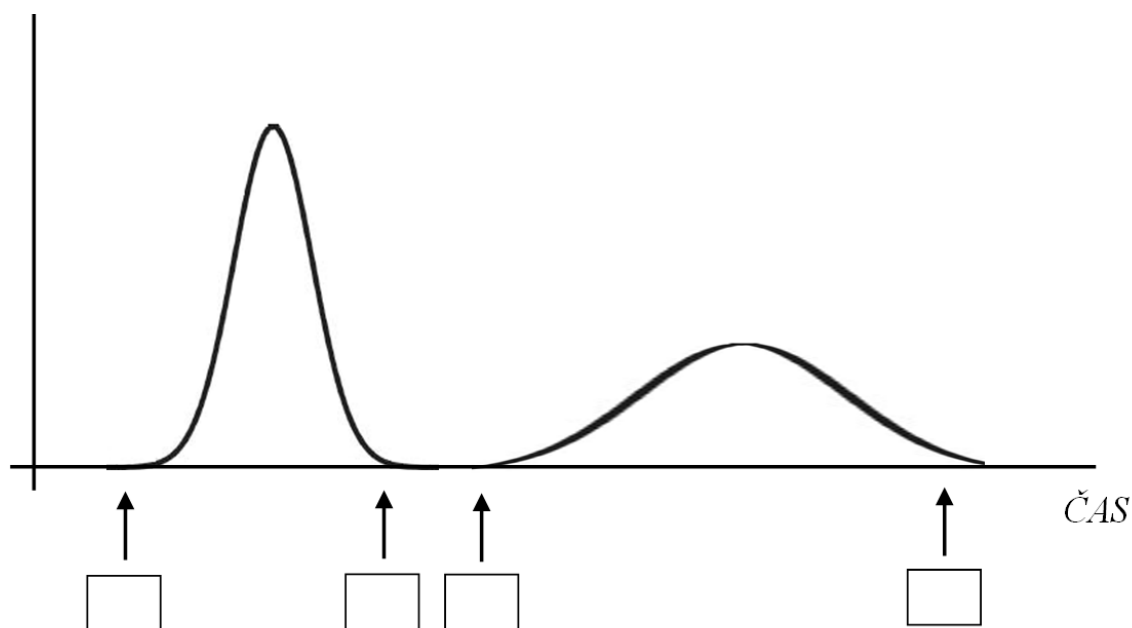
Pravděpodobně nedosáhnete dokonalého oddělení obou složek. Jakmile se vám barva roztoku vytékajícího z kolony přestane zdát "čistá", ukončete jímání první frakce a zaznamenejte čas.

Vytékající směs můžete jímat do zvláštní zkumavky.

V okamžiku, kdy se v eluátu objeví **čistá druhá barevná frakce**, zaznamenejte čas, kdy začala vytékat. Současně ji zachytávejte do druhé kalibrované zkumavky. (použijte širší zkumavku – objem 20 ml)

Zaznamenejte čas ukončení vytékání druhé frakce.

V kalibrovaných zkumavkách odečtěte objemy zachycených frakcí.



Frakce číslo	Barva	Látka	Objem
1			
2			



Vysvětlete pořadí eluovaných barviv:

### **Ukončení experimentu, úklid pracoviště**

Nakonec kolonu promyjte dostatečným množstvím elučního roztoku (nesmí v ní zůstat stopy barviv). Nad gelem ponechte asi 5 cm vrstvu roztoku, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Kolonu uzavřete zátkou.

Závěr:

## Lab 5: pH, pufrů I – Měření pH

### a) Měření pH

Na pracovním stole je láhev označená "Měření pH – vzorek". Úkolem je změřit pH tohoto roztoku čtyřmi metodami. Pro měření pomocí indikátorových papírků a pH metrem si odlijete přiměřené množství vzorku do kádinky. Pro srovnávání se škálou pufrů si odpipetujete 10,0 ml do zkumavky.

#### 1) univerzálním pH papírkem

Univerzální pH papírek uchopte do pinzety a krátce ponořte do zkoumaného vzorku v kádince. Zbarvení porovnejte se stupnicí na obalu a odečtěte přibližné pH.

#### 2) papírkem "PHAN"

Vyberte proužek PHAN tak, aby předpokládané pH leželo přibližně uprostřed rozsahu uvedeného na obalu. Proužek ponořte krátce do roztoku tak, aby byly zvlhčeny všechny barevné zóny. Po vyjmutí porovnejte indikační zónu (uprostřed) se srovnávacími barevnými proužky. Najdete-li shodu, přiložte papírek ke stupnici na obalu a odečtěte pH.

#### 3) pomocí acidobazického indikátoru a srovnávacích pufrů

Podle tabulky si připravte do zkumavek srovnávací škálu pufrů. Vypočítejte pH pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Do každé zkumavky přidejte 20 kapek indikátoru (bromkresolová zeleň). Všechny zkumavky promíchejte opakovaným převrácením.

Číslo zkumavky	CH <sub>3</sub> COOH (100 mmol/l)	CH <sub>3</sub> COONa (100 mmol/l)	pH
	ml	ml	
1	9,0	1,0	
2	8,0	2,0	
3	7,0	3,0	
4	6,0	4,0	
5	5,0	5,0	
6	4,0	6,0	
7	3,0	7,0	
8	2,0	8,0	

Do zkumavky s 10 ml vzorku, jehož pH chcete určit, přidejte rovněž 20 kapek indikátoru a také dobře promíchejte. Srovnajte barvu zkumavky se vzorkem se srovnávací škálou pufrů o známém pH. Hledejte barevnou shodu.

#### 4) pH metrem

Na pracovním stole máte připravený pH-metr s kombinovanou elektrodou.



Z elektrody sejměte ochranný kryt s uchovávacím roztokem. Odložte do stojánku. Elektrodu pečlivě opláchněte destilovanou vodou a osušte kouskem buničiny. Do čisté kádinky přelijte vzorek, ponořte elektrodu a na pH-metru odečtěte hodnotu pH. Po změření vzorku elektrodu důkladně opláchněte destilovanou vodou, otřete a vložte zpět do ochranného krytu s uchovávacím roztokem.

<b>Metoda</b>	<b>Zjištěné pH</b>
<i>univerzální pH papírek</i>	
<i>papírek "PHAN"</i>	
<i>srovnání s roztoky pufrů</i>	
<i>pH metr</i>	

Závěr:

## b) Výpočty pH – příklady

Vypočítejte pH roztoků uvedených látek (každý roztok o koncentraci 100 mmol/l).

1) kyselina chlorovodíková

2) kyselina sírová

3) kyselina mravenčí

4) kyselina octová

5) hydroxid sodný

6) hydroxid vápenatý

7) amoniak

Vypočítejte pH roztoku kyseliny chlorovodíkové:

1)  $c = 0,1 \text{ mol/l}$

2)  $\mu = 0,1 \text{ g/l}$

3) 0,1 % roztok

## Lab 6: pH, pufrů II – Demonstrace funkce pufrů

### a) Demonstrace funkce pufrů

Pufry jsou roztoky, které udržují relativně stálé pH. Přesněji řečeno, pH se mění pouze velmi málo, je-li do roztoku pufru přidáno malé množství silné kyseliny nebo silné zásady. Pufry se vždy skládají ze dvou složek – **slabé kyseliny a její konjugované báze** (nebo ze slabé báze a její konjugované kyseliny).

**Henderson–Hasselbalchova rovnice** popisuje chování pufrů, lze ji využít k výpočtům jejich pH:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{puřrová báze}}{\text{puřrová kyselina}} \quad \text{kde } \text{pK}_a \text{ je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty}$$

$\Rightarrow$  pH je určeno:  $\text{pK}_a$  slabé kyseliny, od níž je pufr odvozen  
poměrem složek puřrová báze / puřrová kyselina

### Úkol 1

Budete pracovat s "fosfátovým puřrem" složeným z **hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného**.

Pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice spočítejte, jaké objemy roztoků složek musíte smíchat, abyste dostali **10,0 ml** fosfátového puřru o **pH = 7,0**.  $\text{pK}_a = 7,21$

Máte k dispozici: roztok hydrogenfosforečnanu sodného  $c = 100 \text{ mmol/l}$   
roztok dihydrogenfosforečnanu sodného  $c = 100 \text{ mmol/l}$

*Výpočet:*

*Vypočítané objemy složek puřru zaokrouhlete na jedno desetinné místo.*

Složka	Vzorec	Potřebný objem (ml)
hydrogenfosforečnan sodný		
dihydrogenfosforečnan sodný		

Na pracovním místě jsou dvě titrační baňky. Do jedné titrační baňky napipetujte (pomocí skleněné pipety a balónku) přesně **10,0 ml vody**.

Do druhé titrační baňky napipetujte přesně **vypočítané objemy obou složek fosfátového pufru**.

Přidejte 2-3 kapky indikátoru (**methylová červeň**) do obou titračních baněk.

**Methylová červeň** je pH indikátor s barevným přechodem:

(kys.) **červená** 4,4 – 6,2 **žlutá** (zás.)

Byretu naplňte titračním roztokem **HCl (c = 0,100 mol/l)** a titrujte do barevné změny indikátoru (růžově červená barva). Zaznamenejte objem HCl potřebný k dosažení tohoto bodu.

*Jak titrovat? To už byste měli sami vědět... Pokud si to nepamatujete:*

*Titrační baňku je vhodné držet v pravé ruce a levou rukou ovládat kohout byrety. Za neustálého míchání pomalu přidávejte titrační roztok ke vzorku v titrační baňce. Neustále sledujte zbarvení roztoku v titrační baňce. Titraci ukončíte v ekvivalentním bodě (poznáte náhlou změnou zbarvení).*

*V případě vody postupujte zvláště opatrně!*

	Objem v titrační baňce	pH	Objem HCl, který způsobil změnu pH
<b>voda</b>	<b>10,0 ml</b>	<b>7.0</b>	
<b>fosfátový pufr</b>	<b>10,0 ml</b>	<b>7.0</b>	

Závěr:

## Úkol 2

Na pracovním stole máte dvě skleněné lahve. V jedné je deionizovaná (ultračistá) voda, ve druhé je fosfátový pufr o pH blízkém 7.

### Voda

Pomocí odměrného válce odměřte **50 ml** deionizované vody, přelijte do čisté kádinky a změřte pH metrem pH. Hodnotu zaznamenejte. Vodu z kádinky vylijte. Stejným odměrným válcem odměřte dalších **50 ml** deionizované vody, přelijte do stejné kádinky a znovu změřte pH. Elektrody po druhém měření nechte ponořené v kádince a do kádinky připipetujte **100 µl roztoku kyseliny chlorovodíkové** o koncentraci 0,1 mol/l. Obsah kádinky opatrně zamíchejte. Chvilí počkejte a запиšte, na jakou hodnotu se změnilo pH.

pH deionizované vody		pH po přidání HCl
měření 1	měření 2	

Vyjádřete se k pH deionizované vody a ke změně v pH způsobené přidáním malého množství HCl:

### Pufr

Pomocí odměrného válce odměřte **50 ml** fosfátového pufru, přelijte do čisté kádinky a změřte pH metrem pH. Hodnotu zaznamenejte. Pufr z kádinky vylijte. Stejným odměrným válcem odměřte dalších **50 ml** pufru, přelijte do stejné kádinky a znovu změřte pH. Elektrody po druhém měření nechte ponořené v kádince a do kádinky připipetujte **100 µl roztoku kyseliny chlorovodíkové** o koncentraci 0,1 mol/l. Obsah kádinky opatrně zamíchejte. Chvilí počkejte a запиšte, na jakou hodnotu se změnilo pH.

pH pufru		pH po přidání HCl
měření 1	měření 2	

V závěru se vyjádřete ke stálosti pH pufru a ke změně v pH způsobené přidáním malého množství HCl:

## b) Pufry – příklady

Fosfátový pufr obsahuje 35 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 65 mmol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Jaké je jeho pH?  $\text{pK}_a = 7,21$

Jak se změní pH tohoto pufru po přidání 10 mmol HCl?

Jak se změní pH tohoto pufru po přidání 10 mmol NaOH?

Jaké pH má pufr vzniklý smícháním 1,2 l roztoku kyseliny octové ( $\text{pK}_a = 4,75$   $c = 0,5$  mol/l) a 45 g octanu sodného ( $M = 82$  g/mol)?

Jaké pH má pufr vzniklý smícháním 1,2 l roztoku kyseliny octové ( $\text{pK}_a = 4,75$   $c = 0,5$  mol/l) a 500 ml roztoku hydroxidu sodného ( $c = 600$  mmol/l)?



## Lab 7: Odměrná analýza

Odměrné stanovení (titrace) patří mezi metody kvantitativní analýzy, tj. slouží ke stanovení koncentrace analyzované látky ve vzorku. Podstatou je přesné měření objemů dvou látek, které spolu reagují rychle, kvantitativně a stechiometricky. Titrační (odměrné) činidlo o známé koncentraci se postupně přidává z byrety ke známému objemu vzorku v titrační baňce, dokud není dosaženo bodu ekvivalence. Bod ekvivalence je okamžik, kdy vzorek právě kvantitativně zreagoval s přidaným odměrným činidlem. Ze stanovené spotřeby titračního činidla a dalších známých údajů (koncentrace titračního činidla, objem vzorku a stechiometrie reakce, která je podkladem pro dané stanovení) lze vypočítat látkové množství nebo koncentraci látky ve vzorku.

### Provedení titrace

Do titrační baňky odpipetujte (pomocí skleněné pipety a balónku), co nepřesněji vzorek nebo standard.

Pokud je potřeba, přidejte indikátor a krouživým pohybem obsah promíchejte.

Byretu naplňte pomocí nálevky titračním roztokem. Po naplnění nálevku z byrety sejměte.

Nastavte hladinu titračního roztoku v byretě na nulovou hodnotu upuštěním činidla do odpadní nádoby umístěné pod byretou. Odečítá se poloha dolního menisku kapaliny při pohledu kolmo, tj. ne šikmo shora nebo zdola.

*Poznámka: před každou další titrací se ujistěte, zda máte v byretě dostatek činidla. Stává se, že pro jeho nedostatek „sjedete“ pod stupnici a tak přijdete o celé měření.*

Titrační baňku je vhodné držet v pravé ruce a levou rukou ovládat kohout byrety. Pro leváky to platí obráceně. Ke vzorku v titrační baňce za neustálého míchání přidávejte po kapkách titrační roztok. Stále sledujte zbarvení roztoku v titrační baňce. Po náhlé změně barvy titrovaného roztoku (bod ekvivalence) ukončete titraci.

Na stupnici byrety odečtěte spotřebu. Titraci ještě jednou opakujte (kroky 1-5). Po předchozím už víte, jakou spotřebu přibližně očekávat. Při opakované titraci můžete rovnou rychle přidat titrační roztok téměř až k očekávané spotřebě a pak dále pokračovat po kapkách, pomalu. Je-li rozdíl obou zjištěných spotřeb větší než 0,5 ml, titraci zopakujte po třetí.

*Pokud je některé měření "na první pohled" chybné, nebudete s ním počítat. Příklad: naměřené spotřeby jsou 1,5 ml a 7,4 ml. Provedete třetí titraci a odečtete 7,2 ml. Hodnota 1,5 ml bude pravděpodobně zcela chybná, nebudete s ní počítat. Budete pracovat s průměrnou spotřebou spočítanou z hodnot 7,4 ml a 7,2 ml; průměr = 7,3 ml.*

Vypočítejte **přesnou** koncentraci vzorku nebo titračního roztoku.

### Vážení

Váženou látku nikdy nesypte přímo na misku vah!!! Vždy je nutné použít vhodnou nádobku (váženku, kádinku, hodinové sklo...), případně čtverec papíru s hladkým povrchem, celofánu nebo alobalu. V případě rozsypání navažované látky je nutné váhy ihned očistit.

Budete pracovat s digitálními váhami, které umožňují nastavit nulovou hmotnost tzv. tárování. Váženku umístíte na plochu vah a stisknete tlačítko „TARE“. Tím se překalibruje nulová hmotnost a lze navažovat bez nutnosti odečítat hmotnost váženky.

## a) Alkalimetrie

Úkol: Zjistěte koncentraci kyseliny octové ve vzorku kuchyňského octa

### A. Standardizace titračního roztoku NaOH

Do titrační baňky odpipetujte co nepřesněji **10,0 ml** standardního roztoku **kyseliny šťavelové** ( $c = 0,050 \text{ mol/l}$ ) a přidejte 2-3 kapky indikátoru (**fenolftalein**) a obsah promíchejte. Roztok zůstane bezbarvý, v bodě ekvivalence se barva titrovaného roztoku náhle změní na růžovou.

Byretu naplňte titračním roztokem NaOH ( $c \sim 0,1 \text{ mol/l}$ ) a proveďte titraci (2 - 3×).

Vypočítejte **přesnou** koncentraci titračního roztoku.

*reakční rovnice:*

spotřeby:  $V_{t1} =$             ml             $V_{t2} =$             ml            ( $V_{t3} =$             ml)

průměrná spotřeba  $V_t =$             ml

výpočet:

$c_t =$             mol/l

### B. Stanovení koncentrace $\text{CH}_3\text{COOH}$

Máte za úkol zjistit koncentraci kyseliny octové ve vzorku kuchyňského octa.

Její koncentrace je zde příliš vysoká, před titrací je nutné nejdříve provést ředění.

Do malé kádinky odlijte z lahve octa přiměřené množství (cca 20 ml).

*Proč? Jde o to, neznečistit obsah originální lahve.*

Do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetujte z kádinky přesně **10,0 ml**.

Odměrnou baňku doplňte **destilovanou** vodou po rysku (tj. na objem **100 ml**) - tělo baňky doplňte ze zásobní lahve a hrdlo ze stříčky. Rysku přitom mějte ve výši očí.

Odměrnou baňku uzavřete zátkou a obsah důkladně, opakovaným převrácením, promíchejte.

Obsah přelijte do Erlenmayerovy baňky.

*Proč? Hrdlo odměrné baňky je pro pipetu příliš úzké.*

Z Erlenmayerovy baňky odpipetujte co nejpřesněji **10,0 ml** do titrační baňky.

Přidejte 2-3 kapky indikátoru (**fenolftalein**) a proveďte vlastní titraci. Titraci ukončete, když se roztok zbarví růžově (bod ekvivalence).

Vypočítejte původní koncentraci kyseliny octové v lahvi kuchyňského octa (látkovou i hmotnostní koncentraci, hmotnostní zlomek, hmotnostní procenta). **POZOR!** Nezapomeňte na to, že jste původní roztok před titrací ředili.

$M(\text{CH}_3\text{COOH}) = 60,0 \text{ g/mol}$  počítejte s hustotou  $1,0 \text{ g/cm}^3$

<i>reakční rovnice:</i>
-------------------------

OCET				
výrobce:	udávaná koncentrace kys. octové:			%
spotřeby: $V_{t1} =$	ml	$V_{t2} =$	ml	( $V_{t3} =$ ml)
průměrná spotřeba $V_t =$	ml			
výpočet:				
výsledky	koncentrace látková	$c =$ mol/l	koncentrace hmotnostní	$\mu =$ g/l
	hmotnostní zlomek		hmotnostní procenta	%

Porovnejte výrobcem udávanou a zjištěnou koncentraci kyseliny octové.  
O kolik procent vyšší/nížší koncentraci jste naměřili?

Závěr:

## b) Chelatometrie

### Úkol 1: Zjistěte koncentraci $Mg^{2+}$ v minerální vodě

Podstatou chelatometrie je tvorba nedisociovaných, ale ve vodě **rozpuštěných** komplexů kovových kationtů nejprve s metalochromním indikátorem a následně s komplexotvornými činidly (**chelatony**).

Nejprve se vytvoří komplex indikátor-kov, ze kterého v bodě ekvivalence chelaton vytěsňuje indikátor. Volný indikátor má jinou barvu než v komplexu se stanovovaným kovovým kationtem.

Chelaton 2 = kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA)

Chelaton 3 = disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové

*EDTA - vzorec:*

S chelatony reagují obecně všechny vícemocné kationty kovů ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Bi^{3+}$ ...). Přítomnost jiných iontů než  $Mg^{2+}$ , reagujících s chelatony, budeme pro Magnésii zanedbávat.

Do kádinky odlijte z lahve přiměřené množství minerální vody (cca 50 ml).

Do titrační baňky odpipetujte z kádinky přesně **10,0 ml**.

Upravte pH přidáním 1 ml amoniakátového pufru (v digestoři; pozor, žíravina!). Zbarvení indikátoru je závislé na pH, přidání pufru zabrání změnám pH v průběhu titrace.

Přidejte práškový indikátor (eriochromová čerň T, Erio T), stačí velmi malé množství (jen několik zrněk, přidat můžete vždy, ubrat už nikoli!). Roztok se zbarví slabě

vínově. Předávkování indikátoru způsobí syté zbarvení roztoku, v němž se hůře „odečítá“ změna zbarvení v bodě ekvivalence.

Přidáním indikátoru (Erio T) ke vzorku se vytvoří komplex [indikátor - Mg], který má jinou barvu než volný indikátor. V zásaditém pH, udržovaném amoniakátovým pufrem, je volný indikátor modrý, kdežto komplex [indikátor - Mg] vínově červený.

Byretu naplňte titračním roztokem **Chelatonu 3** ( $c = 0,010 \text{ mol/l}$ ) a proveďte titraci. V bodě ekvivalence dochází ke změně barvy z vínové na blankytně modrou.

Vypočítejte látkovou a hmotnostní koncentraci  $Mg^{2+}$ .

$M(Mg) = 24,3 \text{ g/mol}$

*reakční rovnice (ve strukturních vzorcích):*

<b>minerální voda:</b>	výrobce <u>m</u> udávaný obsah $Mg^{2+}$	mg/l
spotřeby: $V_{t1} =$ ml $V_{t2} =$ ml                    ( $V_{t3} =$ ml) průměrná spotřeba $V_t =$ ml výpočty:		
<b><math>Mg^{2+}</math></b>	koncentrace látková $c =$ mmol/l	koncentrace hmotnostní $\mu =$ mg/l

Vypočítejte, kolik mg Mg je obsaženo v 1,5 litrové lahvi minerální vody a porovnejte výrobcem udávanou a vámi zjištěnou koncentraci. O kolik procent se liší?

Závěr:

## Úkol 2: Stanovte obsah niklu (%) v pevném vzorku

Pomocí váženky navažte přesně asi 0,15 g analyzovaného vzorku.

“přesně asi 0,15 g”, znamená, že navážené množství nemusí být zrovna 0,15000 g, ale musíme navážené množství znát s maximální možnou přesností

Navážený prášek kvantitativně přeneste do titrační baňky pomocí asi 10 ml destilované vody (tj. spláchněte do titrační baňky odměřenou destilovanou vodou). K odměřování destilované vody použijte odměrný váleček. Krouživým pohybem obsah baňky důkladně promíchejte, aby se prášek úplně rozpustil.

Upravte pH přidáním 2,5 ml koncentrovaného amoniaku (pozor, žíravina!). Amoniak je v digestoři v lahvi s dávkovačem.

Přidejte práškový indikátor (murexid); stačí velmi malé množství. Roztok se zbarví světle žlutě. Pozor na předávkování indikátoru.

Titrujte roztokem Chelatonu 3 ( $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ). V ekvivalentním bodě se objeví fialové zbarvení murexidu uvolněného z nikelnatého komplexu.

Vypočítejte obsah Ni (%) v analyzovaném vzorku.  $M(\text{Ni}) = 58,7 \text{ g/mol}$

číslo vzorku:	první stanovení	druhé stanovení	(třetí stanovení)
navážka (mg)			
spotřeba (ml)			
látkové množství $\text{Ni}^{2+}$ v titrační baňce (= v navážce)			
hmotnost Ni v titrační baňce (= v navážce)			
obsah Ni (%) v analyzovaném vzorku			

průměrná hodnota obsahu Ni (%) v analyzovaném vzorku (z výsledků prvního a druhého stanovení):

Závěr:

## Lab 8: Optické metody

Definujte veličinu transmitance:
Definujte veličinu absorbance:
Vzorkem prošlo 20 % záření. Jaká je absorbance?
Lambertův-Beerův zákon:

### a) Identifikace acidobazického indikátoru pomocí absorpčního spektra

Absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce (nebo vlnočtu) světelného záření. Obvykle je to křivka s jedním nebo několika maximy, jejichž poloha je charakteristická pro každou látku. Absorpční spektra slouží k identifikaci látek nebo ke kontrole jejich čistoty. Budeme se zabývat převážně absorpcí ve viditelné oblasti záření v rozsahu vlnových délek 400-700 nm (VIS spektra). Praktické použití VIS oblasti záření je limitované jen na "barevné roztoky". Ale i mnoho bezbarvých látek může absorbovat záření v blízké UV oblasti. Pro identifikaci organických látek je velice výhodná práce se zářením IR oblasti, kde jsou spektra velice bohatá na "peaky" (= charakteristická maxima, která odpovídají jednotlivým vazbám a funkčním skupinám). Interakce látky s IR zářením způsobuje různé typy vibrací a rotací vazeb, spektra v této oblasti jsou charakteristická pro každou látku (fingerprint region). Spektra se využívají v různých oborech. Např. v organické chemii při studiu struktury složitých molekul, v analytické chemii při studiu stechiometrie komplexů, ve farmacii při kontrole léků a drog, v soudním lékařství k průkazu karbonylhemoglobinu a v mnoha dalších teoretických i aplikovaných oborech.

Z jakých anglických slov pocházejí zkratky:	<b>IR</b>	
	<b>VIS</b>	
	<b>UV</b>	

Acidobazické indikátory jsou organická barviva různého složení, která mění svou strukturu (a tím i zbarvení) v závislosti na pH prostředí. Obě formy mají ve viditelné oblasti spektra charakteristické maximum, které může posloužit k identifikaci indikátoru.

## Provedení

Na pracovním stole máte zkumavku s roztokem acidobazického indikátoru ve vodě (pH = 7).

Jakou má roztok indikátoru barvu při neutrálním pH?

Vezměte dvě čisté zkumavky a do každé z nich napipetujte **1 ml roztoku indikátoru**. V jedné ze zkumavek (označte ji **K**) převedete indikátor do kyselé formy přidáním **1 ml roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$**  ( $c = 0,05 \text{ mol/l}$ ). Ve druhé ze zkumavek (označte ji **Z**) převedete indikátor do zásadité formy přidáním **1 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$**  ( $c = 0,05 \text{ mol/l}$ ).

Jakou barvu má kyselá forma indikátoru?

Jakou barvu má zásaditá forma indikátoru?

Měření spektra proveďte na spektrofotometru, jako porovnávací roztok použijte destilovanou vodu. Změřte absorbance v rozsahu vlnových délek 400 až 700 nm. Hodnoty plynule zvyšujte po 10 nm.

**Plastové kyvety nepřepíňujte, plňte je jen cca 1 cm pod okraj! Nedotýkejte se stěn kyvet, přes které bude procházet ve fotometru světlo! Jsou-li tyto stěny špinavé, otřete je buničinou. Dávejte pozor na správný směr vložení do otvoru pro kyvety ve fotometru!**

vlnová délka	A (kys. prostř.)	A (zás.prostř.)	vlnová délka	A (kys. prostř.)	A (zás.prostř.)
nm	-	-	nm	-	-
400			560		
410			570		
420			580		
430			590		
440			600		
450			610		
460			620		
470			630		
480			640		
490			650		
500			660		
510			670		
520			680		
530			690		
540			700		
550					



Naměřené hodnoty zadejte do tabulky v počítači. *Soubor označen AB indikátor*. Získáte absorpční spektrum indikátoru, v němž odečtete polohu maxima (v nm). V atlasu spekter vyhledejte indikátor, jehož maxima se pro obě formy nacházejí při stejných vlnových délkách jako u vašeho vzorku.

Vlnová délka absorpčního maxima kyselé formy:

Vlnová délka absorpčního maxima zásadité formy:

Identifikovaný acidobazický indikátor:

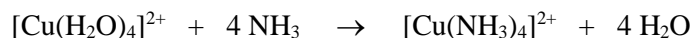
Identifikovaný acidobazický indikátor – zkuste si najít strukturní vzorec:

K protokolu přiložte graf.

Závěr:

## b) Stanovení koncentrace $\text{Cu}^{2+}$ (kalibrační křivka)

Hydratované ionty  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  jsou modré, ale pro fotometrické stanovení je toto zbarvení málo intenzivní a musí být zvýrazněno vhodným činidlem. Tím může být roztok amoniaku, který dává sytě modrý tetraamminměďnatý komplex.



Stanovení koncentrace provedete pomocí kalibrační křivky. Ředěním roztoku o známé koncentraci vytvoříte několik kalibračních roztoků a proměříte jejich absorbance při optimální vlnové délce (maximum absorpčního spektra). Funkci  $A = f(c)$  vynesete do grafu, čímž současně prověříte platnost Lambertova-Beerova zákona. Grafickým vyjádřením musí být přímka procházející počátkem. Z křivky odečtete koncentrace zkoumaných vzorků.

### Provedení

Do stojánku si připravte suché zkumavky a označte čísly:

1 až 10	kalibrační roztoky
0	porovnávací roztok („BLANK“)
vz 1, vz 2	vzorky

Podle tabulky si připravte kalibrační roztoky ředěním základního roztoku vodou. Základní roztok obsahuje 25 mmol  $\text{Cu}^{2+}/\text{l}$ . Na přesném pipetování velmi záleží.

Číslo roztoku	Základní roztok	$\text{H}_2\text{O}$	$c(\text{Cu}^{2+})$
-	ml	ml	mmol/l
0	-	5,0	
1	0,5	4,5	
2	1,0	4,0	
3	1,5	3,5	
4	2,0	3,0	
5	2,5	2,5	
6	3,0	2,0	
7	3,5	1,5	
8	4,0	1,0	
9	4,5	0,5	
10	5,0	-	

Nyní přidejte ke všem kalibračním roztokům i porovnávacímu roztoku 5 ml roztoku amoniaku. Použijte automatický dávkovač.

Současně si připravte také roztoky vzorků (5 ml předloženého vzorku smíchejte s 5 ml amoniaku).

Všechny roztoky promíchejte opakovaným převrácením zkumavek. Nechte 10 minut stát.

Vyhledejte optimální vlnovou délku. Měření proveďte na spektrofotometru proti porovnávacímu roztoku. Z kalibračního roztoku číslo 5 odlijte potřebné množství do jedné kyvety a druhou naplňte roztokem číslo 0 (porovnávací roztok). Vložte do spektrofotometru a zjistěte absorbance pro vlnové délky 400, 450, 500, 550, 600, 650 a 700 nm. Maximum

absorbance ukazuje na optimální vlnovou délku, při níž provedete měření ostatních kalibračních roztoků a vzorků.

Optimální vlnová délka použitého záření (pro kalibrační roztok č. 5):

vlnová délka [nm]	400	450	500	550	600	650	700
absorbance							

Absorbance zadejte do příslušné tabulky v počítači. *Soubor označen Cu ionty*. Vypočítejte koncentraci kalibračních roztoků a запиšte do tabulky v počítači.

Číslo roztoku	koncentrace	absorbance
-	mmol/l	-
0	0,0	0,000
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Poté dostanete kalibrační křivku. Všechny body by měly ležet na přímce. Odchyšky mohou být způsobeny chybami a nepřesností při přípravě roztoků, neboť podmínky platnosti Lambertova-Beerova zákona nebyly porušeny.

Z kalibrační křivky odečtete koncentrace předložených vzorků.

vzorek	absorbance	koncentrace
č.	-	mmol/l
1		
2		

Kalibrační křivku přiložte k protokolu.

Závěr:

### c) Stanovení koncentrace Cl<sup>-</sup> (jeden standard)

Činidlo pro stanovení koncentrace Cl<sup>-</sup> obsahuje Hg(SCN)<sub>2</sub> a Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Chloridové anionty reagují s Hg(SCN)<sub>2</sub> za vzniku bezbarvého nedisociovaného komplexu [HgCl<sub>2</sub>] a uvolněné ionty SCN<sup>-</sup> poskytují s ionty Fe<sup>3+</sup> červený komplex vhodný k spektrofotometrickému stanovení.

#### Provedení

Ve stojánku máte 3 malé suché zkumavky, označte je **vz** (vzorek), **st** (standard) a **0** (porovnávací roztok). Do zkumavek podle tabulky pečlivě odpipetujte (*na dno, roztok nesmí zůstat ve špičce!*) uvedené roztoky:

Zkumavka 1 (vzorek)	20 μl analyzovaného séra ( <i>je v eppendorfci</i> )
Zkumavka 2 (standard)	20 μl standardu Cl <sup>-</sup> (c <sub>st</sub> = 100 mmol/l)
Zkumavka 3 (porovnávací roztok)	20 μl destilované vody

Do všech zkumavek odpipetujte po **2,0 ml činidla**.

Vzorky pečlivě promíchejte a po 5 minutách změřte na fotometru absorbanci vzorku (A<sub>v</sub>) a standardu (A<sub>st</sub>) proti porovnávacímu roztoku **při 450 nm**.

	absorbance
vzorek	
standard	

Koncentraci Cl<sup>-</sup> vypočítáte podle vztahu:  $c_{vz} = \frac{A \text{ vzorku}}{A \text{ standardu}} \times c_{st}$

	Výsledky
	c <sub>vz</sub> =                      mmol/l

Jaká je normální (fyziologická) koncentrace chloridů v krevním séru?

Srovnajte výsledky s touto referenční hodnotou, napište závěr:

## Lab 9: Enzymologie I

### a) Závislost aktivity enzymů na pH ( $\alpha$ -amyláza)

Enzymy jsou chemicky bílkoviny. Pro správnou funkci vyžadují správnou konformaci, která je závislá na relativně slabých typech interakcí (vodíkové vazby, iontové interakce, hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly). Není proto překvapivé, že enzymy jsou citlivé k řadě vnějších vlivů jako je teplota a pH prostředí.

Připomenutí termínů: primární – sekundární – terciární – (kvartérní) struktura proteinů

Katalytickou aktivitu mohou vykazovat i jiné typy molekul než proteiny (Nobelova cena za chemii 1989).

Které?

Kde se uplatňují?

Kdo získal za tento objev Nobelovu cenu?

Se vzrůstající teplotou rychlost chemických reakcí obecně vzrůstá (Arrheniova rovnice). U enzymově katalyzovaných reakcí to má ale své meze, s proteinovou povahou enzymů souvisí konformační změny až denaturace vlivem vysoké teploty. Enzym vykazuje maximální aktivitu při teplotě označované jako **teplotní optimum** (u lidských enzymů se jedná o teplotu kolem 37 °C).

V přírodě se ale najdou i enzymy, které mají teplotní optimum při extrémnějším teplotách, takovým enzymem je např. **Taq polymeráza** z bakterie *Thermus aquaticus*.

Jaké je teplotní optimum tohoto enzymu?

Kde se tento enzym používá?

Kromě teploty jsou enzymy velmi citlivé i k pH prostředí. Enzymy jsou složeny z aminokyselin a ty obsahují funkční skupiny, jejichž ionizace je závislá na pH.

Které aminokyseliny obsahují v postranním řetězci skupiny, které mohou nést **záporný náboj**?

Které aminokyseliny obsahují v postranním řetězci skupiny, které mohou nést **kladný náboj**?

V jaké podobě se ionizovatelná funkční skupina bude nacházet, záleží i na její disociační konstantě (pK). Která z výše uvedených aminokyselin má pK blízké pH v lidském těle a tedy změny pH, které mohou v lidském těle nastávat, mají relativně velký vliv na její ionizaci?

Závislost aktivity enzymu na pH má obvykle Gaussovo rozložení. Enzym vykazuje maximální aktivitu při pH prostředí označovaném jako **pH optimum**. Většina lidských enzymů má pH optimum při pH kolem 7.

Jsou i lidské enzymy s extrémnějším pH optimem.

Který lidský enzym má pH optimum při extrémně kyselém pH (kolem 1,5)?

Jakou má tento enzym funkci?

V praktikách budeme pracovat s  $\alpha$ -amylázou, protože, jak sami uvidíte, enzymový preparát obsahující tento enzym si snadno a levně připravíte.

Kde všude v lidském těle je tento enzym tvořen?

Co je substrátem pro tento enzym?

Jaké jsou produkty reakce katalyzované tímto enzymem?

### **Příprava enzymového preparátu $\alpha$ -amylázy**

Odběr slin provedete pomocí soupravy *Salivette*<sup>®</sup>. Odzátkujte zkumavku, vyjměte z vrchní části žvýkací váleček a jemně žvýkejte nebo převalujte v ústech po dobu asi 1 minuty, aby došlo k nasátí slin do válečku. Vatový váleček pak vložte zpět do příslušné centrifugační zkumavky a uzavřete víčkem. Zkumavku odevzdejte laborantce.

K získání vzorku slin se provede odstředění po dobu 2 minut při rychlosti 2 500 ot./min.

Do čisté zkumavky napipetujte 6 ml destilované vody, přidejte 0,5 ml sliny získané výše uvedeným postupem a otáčením zkumavky obsah promíchejte. Tím získáte zředěnou slinu, kterou budete používat jako **enzymový preparát  $\alpha$ -amylázy** (i pro další úlohu: „Specifita enzymů“).

### **Příprava zkumavek s pufrů o různém pH**

Do sady 7 zkumavek připravených ve stojánku napipetujte složky pufrů podle tabulky: Lihovým fixem zkumavky očísľujte a označte je tak, abyste si je poznali (iniciály).

Číslo zkumavky	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	kys. citronová (ml)	pH
1	2,9	2,1	5,6
2	3,1	1,9	6,0
3	3,5	1,5	6,4
4	3,8	1,2	6,8
5	4,3	0,7	7,2
6	4,7	0,3	7,6
7	4,9	0,1	7,8

Do každé zkumavky přidejte **1 ml roztoku škrobu**.

Do každé ze sedmi připravených zkumavek (obsahujících stejné množství substrátu – škrobu, ale lišících se v pH) napipetujte **0,5 ml připraveného enzymového preparátu α-amylázy**.

Celou sadu sedmi zkumavek umístěte do vodní lázně zahřáté na 37°C. Od okamžiku vložení do vodní lázně začnete měřit čas.

Aktivita α-amylázy v připraveném enzymovém preparátu se může vzorek od vzorku velmi lišit. Jsou studenti, jejichž i velmi naředěná slina dokáže rozštěpit všechnu jí nabídnutý škrob za jakýchkoli podmínek během krátké chvíle. Naopak jsou i studenti, kteří snad ve slinách ani α-amylázu nemají :-). Pro vyhodnocení experimentu bude nutné ze zkumavek inkubovaných ve vodní lázni odebírat **opakovaně** vzorky v časových intervalech zhruba **5-10 minut** (v žádném případě ne delších!).

#### Odběr vzorků a vyhodnocování

Z každé zkumavky inkubované ve vodní lázni odlijte asi 1 ml roztoku do další čisté označené zkumavky. Zbytek směsi nechte dále inkubovat ve vodní lázni (pro případné další odběry).

K odebraným vzorkům přidejte 5 ml destilované vody, kapátkem několik kapek roztoku jodu a důkladně obsah zkumavek promíchejte. Proveďte vyhodnocení.

Jaké zbarvení poskytnou s jodem nehydrolyzovaný škrob?

Jaké zbarvení je ve zkumavkách s produkty hydrolýzy škrobu?

Z důvodu výše popsané dopředu neodhadnutelné aktivity α-amylázy v preparátu připraveném ze slin se může stát, že pH optimum se nepovede zjistit. Tato situace nastane, pokud bude hned při prvním odběru už ve všech zkumavkách škrob hydrolyzovaný. V tomto případě ukončíte experiment a budete vyhodnocovat spolu s jinou pracovní skupinkou.

Druhá opačná situace nastane, pokud bude v čase odběru vzorků pro vyhodnocování ve všech zkumavkách zatím ještě nehydrolyzovaný škrob. V tomto případě ještě není nic ztraceno, odběr nových vzorků ze zkumavek inkubovaných ve vodní lázni po delším čase může dát požadovaný výsledek.

Enzymová hydrolýza škrobu prochází různými stádii, která se projeví také reakcí s jodem. Škrob se barví jódem temně modře, štěpné polysacharidy – dextriny fialově (amylodextrin), purpurově až červeně (erytrodextrin), popř. se nebarví jódem vůbec (achrodextrin).

Zjištěné pH optimum slinné  $\alpha$ -amylázy:

Co je to škrob?

"škrob" anglicky:

"škrob" řecky:

Jaké má složky?

Nakreslete část struktury a šipkou ukažte na vazby, které  $\alpha$ -amyláza štěpí:

$\alpha$ -amyláza štěpí

vazbu.

Závěr:

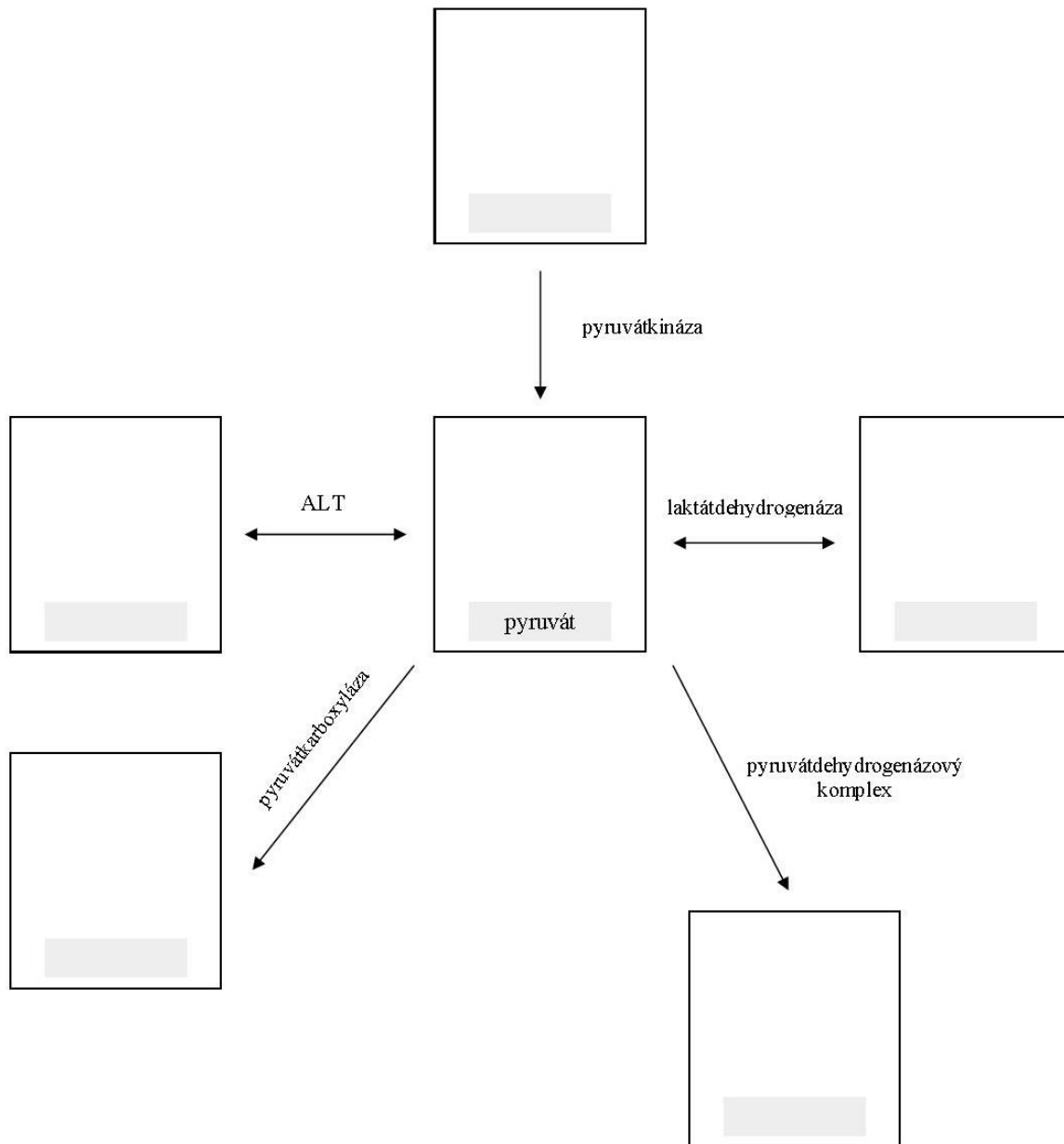


## b) Specifita enzymů (sacharáza, $\alpha$ -amyláza)

Hlavní výhodou enzymů jako "biokatalyzátorů", na rozdíl od katalyzátorů užívaných v chemickém průmyslu, je jejich specifita. Jde rozlišit dva typy specifity, specifitu funkční (reakční) a specifitu substrátovou.

### *Specifita funkční (reakční)*

Enzym katalyzuje jeden určitý typ reakce. Když je to "karboxyláza", tak karboxyluje, nebude hydroxylovat nebo deaminovat :-). Podívejme se, jaké všechny enzymy dokáží pracovat s kyselinou pyrohroznovou (pyruvát) jako substrátem (produktem):



Doplňte vzorce a názvy produktů (substrátů). Všimněte si, že některé reakce jsou reverzibilní (možné oběma směry), některé prakticky ireverzibilní (směr je znázorněn šipkou).

Úkol pro nejlepší: Doplňte k šipkám k názvům enzymů i potřebné koenzymy (kofaktory).

### *Specifita substrátová*

Substrátová specifita znamená, že enzym působí pouze na omezenou skupinu substrátů a jiných si "nevšímá". V tomto smyslu jsou enzymy různě specifické, některé vykazují specifitu absolutní, katalyzují přeměnu pouze jednoho určitého substrátu a ani hodně podobných molekul si "nevšímají". Některé enzymy dokáží katalyzovat reakci několika podobných substrátů, často ovšem s rozdílnou afinitou (některý substrát je preferován). Příkladem může být alkoholdehydrogenáza, která dokáže oxidovat nejen ethanol, ale i např. methanol.

V úloze, kterou budete provádět, budeme mít dva enzymy, budete jim za různých podmínek nabízet dva různé substráty a analyzovat, co se stalo.

Enzymy:  $\alpha$ -amyláza a sacharáza

Substráty: škrob a sacharóza

Co je to sacharóza?

Nakreslete strukturu sacharózy a rovnici reakce znázorňující její štěpení sacharázou:

Sacharáza vzniká v enterocytech tenkého střeva. Sacharáza z kvasnic (invertáza) je zaměřena na  $\beta$ -glykosidovou vazbu (jde o  $\beta$ -fruktofuranosidázu, její systematický název je  $\beta$ -D-fruktofuranosid-fruktohydroláza). Tím se liší od sacharázové aktivity tenkého střeva savců, která patří mezi  $\alpha$ -glykosidázy.

Substráty a produkty štěpení budete analyzovat reakcí s Fehlingovým činidlem a s jodem.

Jaké látky obecně deteguje Fehlingovo činidlo?

Co detegujeme jodem?

## TEORIE

	Fehlingova reakce	reakce s jodem
škrob		
štěpné produkty škrobu		
sacharóza		
štěpné produkty sacharózy		

### Provedení

#### Příprava enzymového preparátu sacharázy

Na hodinovém sklíčku máte přibližně **0,5 g kvasnic**, ke kterému přidejte **2 ml destilované vody** a pomocí tyčinky rozpusťte.

#### Příprava enzymového preparátu $\alpha$ -amylázy

*viz návod k úloze: „Závislost aktivity  $\alpha$ -amylázy na pH prostředí“*

Připravte si sadu **8 zkumavek**, do kterých napipetujte roztoky dle tabulky:  
Lihovým fixem zkumavky očísľujte a označte je tak, abyste si je poznali (iniciály).

		1	2	3	4	5	6	7	8
ENZYM	<i><math>\alpha</math>-amyláza</i>	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-
	<i>sacharáza</i>	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-
	<i>destil. voda</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
POVAŘENÍ		-	-	ANO	-	-	ANO		
SUBSTRÁT	<i>škrob</i>	2,0	-	2,0	-	2,0	-	2,0	-
	<i>sacharóza</i>	-	2,0	-	2,0	-	2,0	-	2,0
Všechny zkumavky inkubujte <b>30 minut</b> ve vodní lázni při <b>37°C</b> .									
Obsah každé zkumavky rozdělte přibližně na 2 poloviny. (do paralelní řady 8 zkumavek přelijte vždy asi polovinu obsahu příslušné zkumavky)									
<p><b>Jedna sada zkumavek:</b> Proveďte Fehlingovu reakci: Smíchejte <b>2 ml</b> roztoku <i>Fehling I</i> a <b>2 ml</b> roztoku <i>Fehling II</i>. Do každé zkumavky přidejte <b>0,5 ml Fehlingova roztoku</b> a <b>povařte</b>.</p> <p><b>Druhá sada zkumavek:</b> Přidejte <b>5 ml destilované vody</b>, <b>několik kapek jodu</b> a promíchejte.</p>									
Výsledek Fehlingovy reakce									
Zbarvení vzniklé s jodem									

## Vyhodnocení

Zdůvodněte výsledky Fehlingovy reakce a reakce s jodem v jednotlivých zkumavkách.

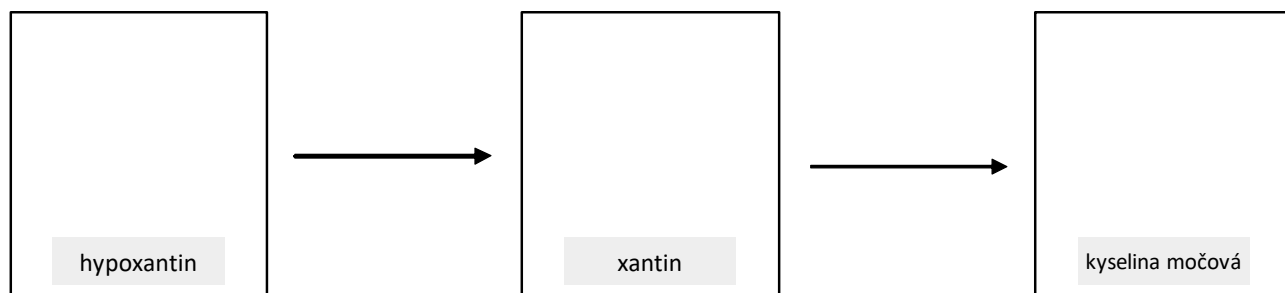
Zkumavka č.	Vysvětlení
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

Do protokolu запиšte ve strukturních vzorcích schéma hydrolýzy škrobu  $\alpha$ -amylázou a sacharózy kvasničnou sacharázou. Vyznačte vazby, které uvedené enzymy hydrolyzují.

Závěr:

### c) Sledování aktivity mléčné xanthin-oxidoreduktázy

*Xanthin-oxidoreduktáza (XOR)*, *xantinoxidáza* je všeobecně pokládána za klíčový enzym pro degradaci purinů, uskutečňuje následující přeměny:



Doplňte vzorce.

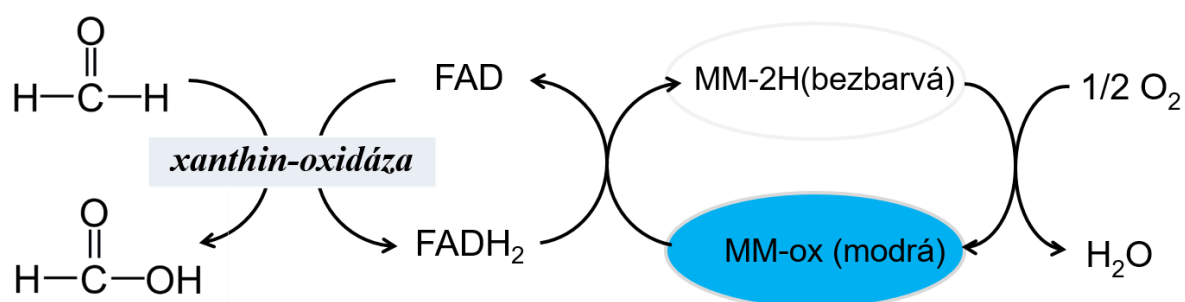
Jedná se o komplexní molybden obsahující flavoprotein schopný pracovat v různých "režimech", buď jako *oxidáza* (používat O<sub>2</sub> a generovat jako vedlejší produkt oxidace substrátu reaktivní formy kyslíku – peroxid vodíku, případně i superoxidový radikál), nebo jako *dehydrogenáza*, která reaktivní formy kyslíku nevytváří.

<p>V klinické praxi našel uplatnění inhibitor tohoto enzymu. (až si najdete na internetu vzorec, srovnajte strukturu s hypoxantinem)</p> <p>Jaké má léčebné využití?</p>	<p><i>jméno, vzorec</i></p>
--	-----------------------------

Xanthin-oxidoreduktáza se vyskytuje i v mléce, nepasterizované kravské mléko bude sloužit jako enzymový preparát pro následující experiment. Xanthin-oxidoreduktáza dokáže oxidovat i jiné substráty než výše zmíněné puriny. My jako substrát využijeme formaldehyd, který bude oxidován na kyselinu mravenčí. Pro detekci použijeme methylenovou modř.

<p>Methylenová modř je redoxní barvivo, tj. barva závisí na tom, jestli se nachází v oxidované nebo redukované formě.</p> <p>Jaké je barva oxidované formy?</p> <p>Jaké je barva redukované formy?</p>
--

Methylenová modř může být převedena z redukované formy na oxidovanou oxidací kyslíkem ze vzduchu (tj. intenzivním protřepáním roztoku).



Popsanou reakci je možno použít jako jednoduchý test na pasterizaci či povaření mléka. Vyšší teploty způsobí denaturaci xanthinoxidázy, takže přidání formaldehydu odbarvení methylenové modři nemůže vyvolat.

## Provedení

Odměřte do **4 zkumavek** podle tabulky:

<i>Zkumavky</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Čerstvé mléko</i>	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Zkumavky č. 3 a 4 povařte nad kahanem (opatrně!), čímž se zdenaturuje enzym. Dále přidávejte dle schématu:				
<i>Methylenová modř</i>	5 kapek	5 kapek	5 kapek	5 kapek
<i>Formaldehyd</i>	5 kapek	-	5 kapek	-

Všechny zkumavky protřepejte a umístěte do vodní lázně **37° C**. Sledujte, ve které zkumavce dojde k odbarvení a zdůvodněte proč.

Zkumavku, ve které došlo k úplnému odbarvení, vyjměte z lázně a energicky protřepejte až do zmodrání obsahu. Pak pokračujte v inkubaci.

Vyčkejte opět do úplného odbarvení, znovu protřepejte. Celý cyklus opakujte několikrát, až se methylenová modř přestane odbarvovat v důsledku úplného vyčerpání zásoby substrátu.

Přesvědčte se, že po přidání několika dalších kapek formaldehydu počne reakce probíhat znovu.

## Vyhodnocení

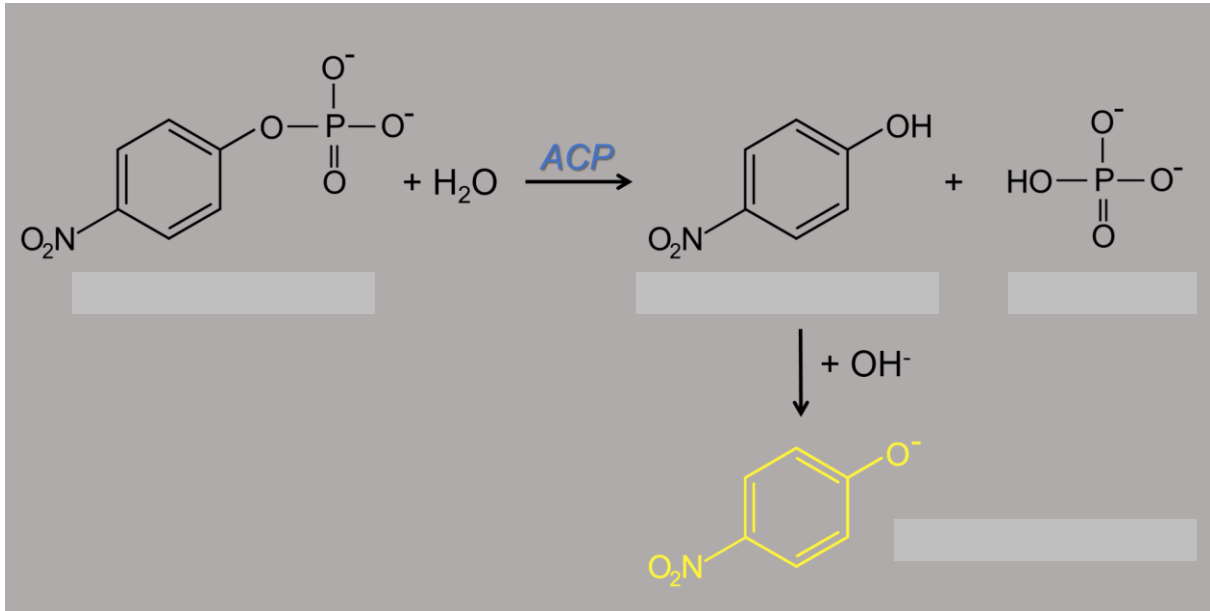
Zkumavka	Popište svými vlastními slovy, co v dané zkumavce proběhlo/neproběhlo a proč
1	
2	
3	
4	

Závěr:

## Lab 10: Enzymologie II

### a) Stanovení Michaelisovy konstanty kyselých fosfatáz

Fosfatázy štěpí esterové vazby fosforečné kyseliny, takže uvolňují fosfát a příslušný alkohol. Do reakce si doplňte názvy substrátu a produktů! Pro sledování enzymové aktivity je výhodné použít syntetický substrát, který umožní přímé fotometrické stanovení:



Reakci provedeme při různých koncentracích substrátu a budeme sledovat závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu a graficky vyjádříme v systému dvojích reciprokých hodnot.

#### ***Přečtěte celý návod před zahájením vlastní práce!***

K dosažení dobrých výsledků je nutné pipetovat přesné objemy roztoků a dodržovat dobu inkubace!

#### **Provedení**

Do stojánku připravte a označte **10 zkumavek**.

Mechanickými mikropipetami napipetujte podle následující tabulky nejdříve citrátový pufr a teprve potom substrát (lze použít stejnou špičku na pipetu), po dokončení práce špičku vyhoďte.

Zkumavka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Citrátový pufr [ $\mu$ l]	450	400	350	300	250	200	150	100	50	–
Substrát [ $\mu$ l]	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500

Koncentrace základního roztoku substrátu je **2,5 mmol/l**.

Sadu zkumavek umístěte do vodní lázně **37°C** teplé a nechte je předeřhřát **5 minut**. Mezitím přineste enzym z ledničky (kyselá fosfatáza v Eppendorf zkumavce), připravte stopky a pipetu na **50 µl** s *čistou špičkou*.

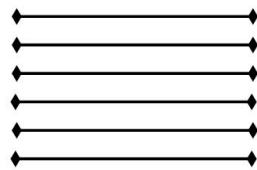
Nyní je třeba, aby v každé ze zkumavek běžela reakce **přesně 10 minut**. Reakce bude zahájena přidáním enzymu, přesně po 10 minutách ukončena přidáním inhibičního roztoku, který změnou pH denaturuje enzym.

Jak toho dosáhnout? Jaké jsou možnosti?

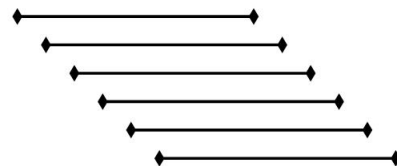
- a) Zpracovávat postupně každou ze zkumavek. *Zabralo by celá praktika ☹*



- b) Zpracovávat všechny zkumavky najednou. *Pěkné, ale technicky neproveditelné ☹...*



- c) Zpracovávat zkumavky s časovým posunem.



Další práci zorganizujte tak, že jeden student(ka) pipetuje enzym a druhý student(ka) měří čas a hlásí jej tak, aby pipetování enzymu proběhlo v naprosto přesných **30 sekundových** intervalech. Pipetující student/ka nejprve nasaje roztok enzymu do špičky pipety, pak vyjme první zkumavku z vodní lázně, zavede špičku pipety do zkumavky asi 0,5 cm nad hladinu, ale substrátu se nesmí dotknout. Z této vzdálenosti vypustí enzym do roztoku substrátu (nikoliv tedy na stěnu zkumavky) a ve stejný moment druhý student/ka stiskne stopky. Zkumavkou pak lehce zatřepe a okamžitě ji vrátí do vodní lázně. Stopky necháme běžet po **celou dobu** pokusu.

Připravte další enzym a druhou zkumavku, do které přesně za **30 sekund** rovněž přidejte enzym a tak pokračujte.

*Intervaly mezi jednotlivými zkumavkami musí být vždy stejné!!!*

Připravte inhibiční roztok, který ukončí enzymovou reakci. Láhev je opatřena dávkovačem. Přesně za **10 minut** od přidání enzymu do první zkumavky přidejte do téže zkumavky **2 ml inhibičního roztoku** a promíchejte. Zkumavku již nevracejte do vodní lázně. Do dalších zkumavek přidávejte inhibiční roztok přesně ve stejných intervalech, jako jsme přidávali enzym, takže ve všech zkumavkách probíhá reakce naprosto stejnou dobu, tj. 10 minut. Po zpracování všech zkumavek stopky zastavte.

Změřte absorbanci všech vzorků proti vodě při **405 nm** na fotometru. Měřte od 1. do 10. zkumavky bez vyplachování kyvet, pouze je vylejte a obrácením a kontaktem s buničinou odsajte tekutinu.



Zkumavka č.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Koncentrace substrátu (mmol/l)	0										
Absorbance	0										

Změřené hodnoty vložte do tabulky v počítači. Vypočítejte a vložte též koncentraci substrátu (p-nitrofenylfosfát) v každém reakčním vzorku. Změřená absorbance je úměrná enzymové reakční rychlosti v každé zkumavce, protože reakční rychlost znamená množství přeměněného substrátu za jednotku času. V tomto případě výsledek představuje množství produktu vzniklého za 10 minut. Program vytvoří *Lineweaverův-Burkův graf*, tj. závislost  $1/v$  na  $1/[S]$  a zobrazí rovnici pro danou přímku. Michaelisovu konstantu zjistíte výpočtem z rovnice nebo odečtením z grafu, kde ovšem čteme hodnotu  $-1/K_M$ .

Co to je Michaelisova konstanta?

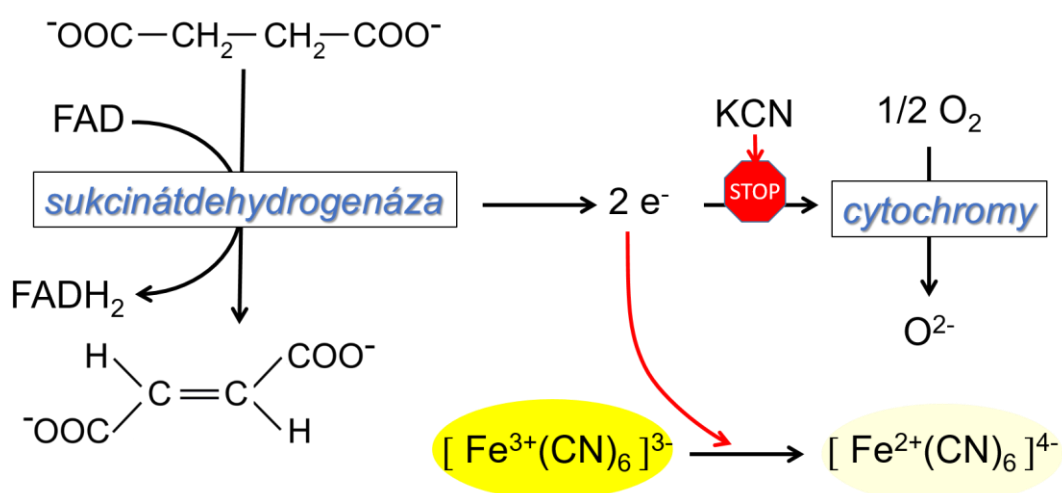
Výpočet Michaelisovy konstanty:

Závěr:

Zpracujte konečný protokol, jehož částí je též výtisk tabulky a grafu.

## b) Kompetitivní inhibice sukcinátdehydrogenázy malonátem

Aktivitu *sukcinátdehydrogenázy* budeme demonstrovat přímo na mitochondriích, a to pomocí „umělého přenašeče elektronů“. Jako elektronový akceptor poslouží ferrikyanid draselný, („červená krevní sůl“), který se přijetím elektronů redukuje na ferrokyanid draselný („žlutá krevní sůl“). Tento přechod můžeme dobře fotometricky sledovat, je provázen blednutím žlutého roztoku ferrikyanidu. Vzhledem k tomu, že v mitochondriích jsou přítomny všechny články terminálních oxidací, je třeba zabránit přestupu elektronů z redukované formy koenzymu přirozenou cestou, tj. přes koenzym Q a cytochromy na kyslík. Tuto cestu zablokujeme v našem experimentu kyanidem draselným, který selektivně inhibuje cytochromový systém.



Na takto uspořádaném pokusu můžeme snadno sledovat kinetiku enzymové reakce i účinky inhibitorů, např. kompetičního inhibitoru sukcinátdehydrogenázy, malonátu. (Ten se mj. uplatnil při objevu metabolitů citrátového cyklu.)

vzorec malonátu

### Provedení

Do **250 ml kádinky** připravte led z výrobníku a přidejte trochu studené vody. Tak máte připravenou ledovou lázeň pro preparát mitochondrií.

V kalibrované zkumavce nařed'te fosforečnanový pufr 5× destilovanou vodou (2ml pufru + 8 ml destilované vody), promíchejte a umístěte do ledové lázně.

### Příprava tkáňového homogenátu ze zmražené srdeční tkáně

Preparát mitochondrií nesmí obsahovat červené krevní a svalové barvivo (interferuje při fotometrii), proto je nutno ještě před vlastní homogenizací zbavit tkáň krve a hemoglobinu. Svalovinu rozstříhejte na kousky do vychlazené třecí misky, tlakem pestíku rozdr'te a **2 - 3× suspendujte** v ledovém zředěném fosfátovém pufru. Tkáňovou drť přeneste do vychlazené centrifugační zkumavky a krátce odstřed'te (5min/2000 ot.).

*V průběhu přípravy preparátu mitochondrií jeden student ze skupiny připraví reakční roztoky.*

Supernatant opatrně slijte do odpadu a sediment, který již musí být bezbarvý, vraťte do třecí misky ke konečné homogenizaci, kterou usnadníte přidáním skleněných střípků. *Použijte*

*ochranné brýle!* Ke tkáňové drti pak přidejte asi **3 ml vychlazeného zředěného fosforečnanového pufru**, rozmíchejte a přeneste do centrifugační zkumavky. Odstředějte 5 minut při 2000 otáčkách. Po odstředění opatrně slijte supernatant, tvořený především suspenzí mitochondrií. Ta představuje náš enzymový preparát sukcinátdehydrogenázy.

*Mitochondrie jsou velmi choulostivé struktury, a proto je uchovávejte v ledové lázni.*

### Příprava základního roztoku

V Erlenmayerově baňce smíchejte **3 ml kyanidu**, **3 ml ferrikyanidu** a **10 ml fosforečnanového pufru** (neředěného).

Do **zkumavek** pipetujte reakční roztoky podle schématu:

<b>Zkumavky</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>základní roztok (ml)</i>	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	-
<i>jantaran (ml)</i>	1,0 ml	1,0 ml	-	-
<i>malonát (ml)</i>	-	0,5 ml	0,5 ml	-
<i>destilovaná voda (ml)</i>	0,5 ml	-	1,0 ml	3,5 ml

Zapněte fotometr, nastavte vlnovou délku **415 nm**, a připravte celkem 3 fotometrické kyvety a stopky. K fotometru přeneste zkumavky 1 – 4 ve stojánku, enzymový preparát v ledové lázni a pipetu na 0,5 ml.

Do **zkumavky č. 4** (destilovaná voda) přidejte **0,5 ml enzymového preparátu**, promíchejte a nalijte do kyvety. Tím jste připravili slepý vzorek, proti němuž nastavte fotometr na nulovou absorbanci. Zbylé dvě fotometrické kyvety označte na boku (matná plocha) číslicemi 1 a 2.

Do **zkumavky č. 1** přidejte rovněž **0,5 ml enzymového preparátu**, promíchejte a ihned naplňte kyvetu č. 1 a změřte její absorbanci v čase 0. V okamžiku změření spusťte stopky. Další student provede ihned zápis hodnoty absorbance, protože ta se rychle mění (klesá).

Rychle napipetujte **0,5 ml enzymového preparátu** též do reakční **zkumavky č. 2**, promíchejte, naplňte kyvetu č. 2, vložte do fotometru místo kyvety č. 1 a změřte absorbanci v kyvetě č. 2. Okamžik měření musí být přesně 30 sekund po změření zkumavky č. 1.

Pak opět kyvety vyměňte a připravte se na změření absorbance v kyvetě č. 1 přesně **60 sekund** po prvním měření. Měřte tedy každou kyvetu v jednominutových intervalech, se vzájemným posunem o 30 sekund. Celkem proveďte 20 měření každé kyvety.

Zpracujte ještě reakční **zkumavku č. 3**, která je kontrolní, neboť neobsahuje substrát, pouze inhibitor. I k ní přidejte **0,5 ml enzymového preparátu** a měřte v minutových intervalech. Zde nepozorujeme pokles absorbance, jen nepatrný, který představuje systematickou chybu metody.

Hodnoty absorbance všech 3 reakcí zapište do tabulky v programu Excel, který pak graficky reakci zpracuje. Vypracujte konečný protokol, jehož částí je též výtisk tabulky a grafu.

Závěr: