

Laboratorní cvičení z lékařské chemie a biochemie I

1. ročník, všeobecné lékařství

LETNÍ SEMESTR

2019/2020



Ústav lékařské chemie a biochemie

Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova



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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

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

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

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 hexakvanoželeznanu 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

Osmóza, osmotický tlak, osmolalita: strana 13

- 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

Odměrná analýza: strana 22

- a) Alkalimetrie
 - standardizace titračního roztoku $NaOH$
 - stanovení koncentrace CH_3COOH ve vzorku kuchyňského octa
- b) Chelatometrie
 - stanovení koncentrace Mg^{2+} v minerální vodě
 - stanovení obsahu niklu v pevném vzorku

pH, pufrý I – Měření pH: strana 28

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

pH, pufrů II – Demonstrace funkce pufrů

strana 31

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

Optické metody:

strana 35

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

Enzymologie I:

strana 39

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

Enzymologie II:

strana 44

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

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 μl

2 x 500 μl

Pro pipetování 2 ml (=2000 μl) 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 μl), pipetu 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 μl

25 μl

Pro pipetování 375 μl použijete pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 100-1000 μl a příslušnou špičku (modrá). Pro pipetování 25 μl použijete pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 20-200 μl 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

2) Zjištění hustoty roztoku

Na misku vah položte prázdnou *ependorfku* a stiskněte tlačítko pro **tárování**.

Do *ependorfky* napipetujte přesně 1 ml (=1000 μ l) roztoku, jehož hustotu máte za úkol zjistit.

Pro pipetování 1000 μ l použijte pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 100-1000 μ l a příslušnou špičku (modrá).

Ependorfku uzavřete, položte na misku vah a odečtěte hmotnost napipetovaného roztoku. Ze známého objemu a hmotnosti spočítejte hustotu.

Objem	Hmotnost	Hustota

3) Příprava roztoku a jeho přesné rozpipetování do více zkumavek

Do *ependorfky* napipetujte: 93 μ l destilované vody
 7 μ l barevného roztoku

Pro pipetování 93 μ l použijte pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 20-200 μ l a příslušnou špičku (žlutá). Pro pipetování 7 μ l použijte pipetu s nastavitelným objemem v rozsahu 0,5-10 μ l a příslušnou špičku (malá bílá). Přidáváte velmi malý objem. Ústí špičky je třeba ponořit pod hladinu roztoku, který už je v *ependorfce*. Během přidávání těchto 7 μ l výsledný roztok i promícháte. Čtěte níže!

Obsah *ependorfky* promíchejte. Pro tento účel nejlépe poslouží tzv. *propipetování*, tj. opakované "nasávání a vypouštění" do špičky pipety, pohyb roztoku ve špičce "nahoru dolů". V našem případě je roztok barevný, měli byste přímo vidět, zda už je dostatečně promíchaný. Dejte pozor, aby špička po jejím vytáhnutí zpod hladiny na konci propipetování byla prázdná!

Do stojánku si připravte 5 mikrozkušavek a do každé napipetujte přesně 20 μ l připraveného roztoku.

100 μ l $\xrightarrow{5 \times 20 \mu\text{l}}$ 

Zhodnoťte, jak přesně a správně jste pipetovali:

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 (**metylvá červeně**).

Příprava roztoků, reakce anorganických sloučenin

a) Příprava roztoku přesné koncentrace

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

1. 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

2. 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.

3. Odvážené množství chloridu vápenatého rozpustíte v kádince v „malém“ množství destilované vody (cca 30-50 ml).
4. Obsah z kádinky přelijte do odměrné baňky o objemu 100 ml.
5. Do kádinky, ve které jste chlorid vápenatý rozpouštěli, přidejte „nové malé množství“ destilované vody (cca 20 ml). Obsah znovu přelijte do odměrné baňky.
6. Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku přesně po rysku (tj. na objem **100 ml**).
7. Odměrnou baňku uzavřete zátkou a důkladně obsah promíchejte.

Jaká je látková koncentrace rozpuštěných iontů v připraveném roztoku?

Ca^{2+}	mmol/l
Cl^-	mmol/l

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

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

	Výsledek
	g/l
	mg/l

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 Ag^+ se zředěným roztokem HCl

POZOR: při potřísnění kůže ionty 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 Ag^+ .

K roztoku ve zkumavce přilijte asi 1 ml zředěného roztoku HCl , zkumavkou netřepejte a pozorujte.

pozorované změny:

reakční rovnice v iontové podobě

2. reakce iontů Fe^{3+} s roztokem hexakvanoželeznatanu draselného

vzorec hexakvanoželeznatanu draselného:

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku s ionty 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 Fe^{3+} iontů s hexakvanoželeznatany?

3. reakce iontů Fe^{3+} s ionty SCN^-

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

pozorované změny:

4. reakce iontů Cu^{2+} s amoniakem

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku s ionty 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 Ca^{2+} s kyselinou šťavelovou

Volné ionty Ca^{2+} plní v tělních tekutinách mnoho funkcí. Důležitou roli hrají i při srážení krve (hemokoagulaci). Vyvázáním Ca^{2+} lze *in vitro* zabránit srážení krve, což má význam v klinické laboratorní praxi, pokud potřebujeme, aby krev po odběru zůstala nesražená. Ionty 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 Ca^{2+} iontů s kyselinou šťavelovou. Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku Ca^{2+} . K roztoku ve zkumavce přidejte asi 1 ml roztoku kyseliny šťavelové.

pozorované změny:

reakční rovnice v iontové podobě

6. reakce uhličitanů se zředěným roztokem HCl

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

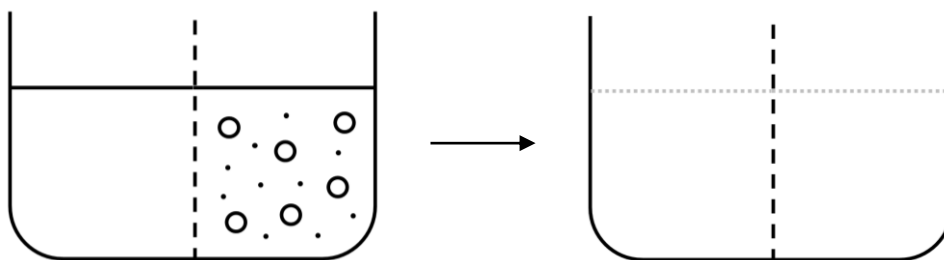
pozorované změny:

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

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.

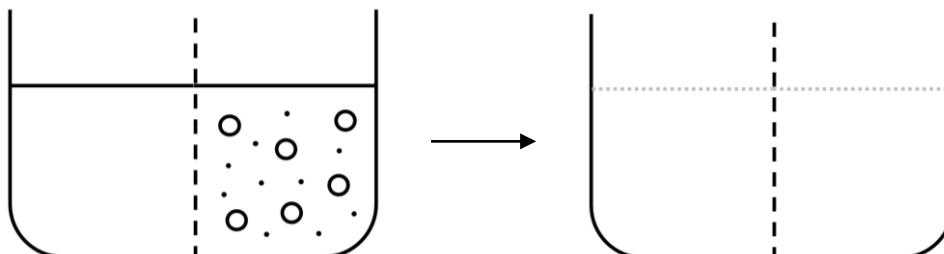
1) membrána je volně propustná pro vodu, malé i velké částice



Popište slovy, k čemu dojde:

Tento proces se nazývá:

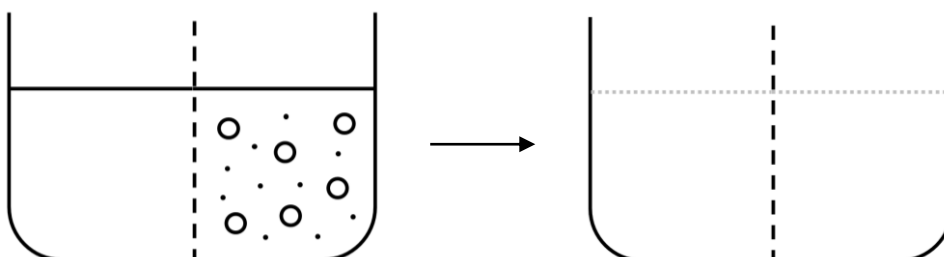
2) membrána je volně propustná jen pro vodu a malé částice



Popište slovy, k čemu dojde:

Tento princip je využíván u separační (dělicí) 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 popsáním 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 popsáný 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 jedině, 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 ₂ 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)

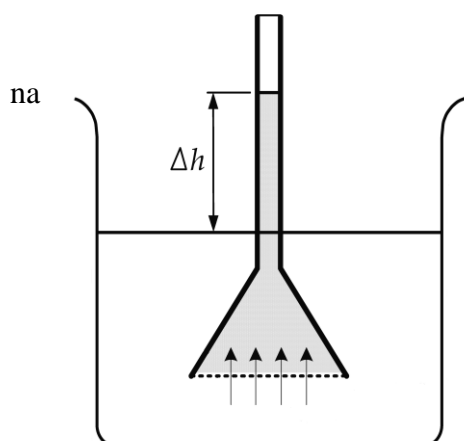
$$= 285 \pm 10 \text{ mmol/kg vody}$$

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 znázorněný obrázkem. 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.

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

Δh ... výška sloupce

ρ ... 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.

1. Přes dno baňky osmometru přichyťte pomocí gumiček polopropustnou membránu. Gumičky musí zajistit těsnost systému. Membránu zvlhčete ponořením do destilované vody.
2. Do baňky osmometru nalijte 2-3 mm od kraje roztok sacharózy (pro lepší viditelnost obarvený modrým potravinářským barvivem).
3. Hrdlo baňky uzavřete zátkou na spodním konci skleněné trubice osmometru.
4. Vložte osmometr do velké kádinky s destilovanou vodou a zafixujte tak, spodní část osmometru s membránou nestála na dně.
5. 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 Na^+ a Cl^- iontů, proto pro tento demonstrační pokus nemůžeme použít roztok NaCl případně 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°C : $67,9 \text{ g}$ sacharózy ve 100 g roztoku (hustota $1,338 \text{ g/cm}^3$)

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

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.

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

	Výsledek
	g

2. Odvažte přesně potřebné množství.
3. Odvážené množství NaCl přeneste do kádinky, kde ho rozpustíte v „malém“ množství destilované vody (cca 50 ml).
4. Obsah z kádinky přelijte do odměrné baňky o objemu 200 ml.
5. Do kádinky, ve které jste NaCl rozpouštěli, přidejte „nové malé množství“ destilované vody (cca 50 ml). Obsah znovu přelijte do odměrné baňky.
6. Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku po rysku (tj. na objem **200 ml**).
7. 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 Na^+ a 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.

1. 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

2. Do téže Erlenmayerovy baňky spláchněte i nepozorovatelné zbytky z váženky pomocí stříčky s destilovanou vodou.
3. Přidejte destilovanou vodu do objemu asi tak 100 – 150 ml a krouživým mícháním dokonale rozpustě obsah.
4. 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.
5. Destilovanou vodou (ze stříčky) doplňte odměrnou baňku přesně po rysku (tj. na objem **250 ml**).
6. 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	
	Na^+	mmol/l
	K^+	mmol/l
	Ca^{2+}	mmol/l
	Cl^-	mmol/l

Jakou má tento roztok osmolalitu (osmolaritu)?

--

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 (ΔT , 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 (ΔT , vzestup bodu varu) je přímo úměrný osmolalitě. Konstantou úměrnosti je v tomto případě ebullioskopická konstanta.

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

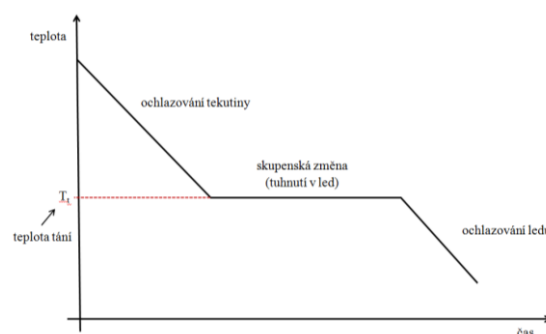
Jakou teplotu tání (tuhnutí) má vodný roztok o osmolalitě 5 mol/kg vody ?	Výsledek
	°C

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 neztuhne 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 °C, což odpovídá ve výsledku osmolality rozlišitelnosti 1-2 mmol/kg. Pracuje se s objemy vzorků 50 µl, doba měření je cca 1 min. Měření je snadné a rychlé, proto proměříme více vzorků.

Příprava vzorků:

- a) Destilovaná voda – eppendorfka ve stojánku u přístroje
- b) Vzorek vlastní moči – k dispozici je odběrová nádobka, toaleta...
- c) Fyziologický roztok (0,9% NaCl) – máme připraveno
- d) Ringerův roztok – máme připraveno

e) 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:

f) Ringerův roztok + glukóza

Odměrným válcem odměřte co nejpřesněji 50 ml Ringerova roztoku, přelijte do kádinky. Odvažte pomocí váženky **270 mg** glukózy a tu rozpust'ete 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

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:

1. Do titrační baňky odpipetujte (pomocí skleněné pipety a balónku), co nepřesněji vzorek nebo standard.
2. Pokud je potřeba, přidejte indikátor a krouživým pohybem obsah promíchejte.
3. Byretu naplňte pomocí nálevky titračním roztokem. Po naplnění nálevku z byrety sejměte.
4. 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.

5. 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.
6. Na stupnici byrety odečtete 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.

7. 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

1. 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.
2. Byretu naplňte titračním roztokem NaOH ($c \sim 0,1 \text{ mol/l}$) a proveďte titraci (2 - 3×).
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 CH_3COOH

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

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

1. Do malé kádinky odlijte z lahve octa přiměřené množství (cca 20 ml).
Proč? Jde o to, neznečistit obsah originální lahve.
2. Do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetujte z kádinky přesně **10,0 ml**.
3. Odměrnou baňku doplňte **destilovanou** vodou po rysku (tj. na objem **100 ml**) - tělo baňky doplňte ze zásobní lahve a hrdlo ze stříčky. Rysku přítom 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 nej přesněji **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 $1,0 \text{ g/cm}^3$

reakční rovnice:

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?

b) Chelatometrie

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

Podstatou chelatometrie je tvorba nedisociovaných, ale ve vodě **rozpustných** 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.

1. Do kádinky odlijte z lahve přiměřené množství minerální vody (cca 50 ml).
2. Do titrační baňky odpipetujte z kádinky přesně **10,0 ml**.
3. 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.
4. Přidejte práškový indikátor (eriochromová čern

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.

5. 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.
6. Vypočítejte látkovou a hmotnostní koncentraci Mg^{2+} . $M(Mg) = 24,3 \text{ g/mol}$

reakční rovnice (ve strukturních vzorcích):

minerální voda:	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:		
Mg^{2+}	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?

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

1. 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

2. 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.

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

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

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

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

<i>číslo vzorku:</i>	<i>první stanovení</i>	<i>druhé stanovení</i>	<i>(třetí stanovení)</i>
navážka (mg)			
spotřeba (ml)			
látkové množství 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):

pH, pufry 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 ₃ COOH (100 mmol/l)	CH ₃ 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. Srovnejte 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.

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

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

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:

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

⇒ pH je určeno: pK_a slabé kyseliny, od níž je pufr odvozen
poměrem složek pufrůvá báze / pufrůvá kyselina

Úloha 1

V této úloze budete pracovat s "fosfátovým pufrům" složeným z **hydrogenfosforečnanu sodného** a **dihydrogenfosforečnanu sodného**.

Pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice spočítejte, jaké objemy roztoků složek musíte smíchat, abyste dostali **10,0 ml** fosfátového pufru 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 pufru 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
voda	10,0 ml	7.0	
fosfátový pufr	10,0 ml	7.0	

Závěr:

Úloha 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	

Vyjádřete se ke stálosti pH pufru a ke změně v pH způsobené přidáním malého množství HCl:

b) Pufry – příklady

Fosfátový pufr obsahuje 35 mmol Na_2HPO_4 a 65 mmol NaH_2PO_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)?

Optické metody

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. Často se pracuje v ultrafialové nebo v infračervené oblasti, v níž zejména organické sloučeniny dávají velmi bohatá spektra s charakteristickými maximy, která odpovídají jednotlivým vazbám a funkčním skupinám. 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.

Provedení:

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.

Na pracovním stole máte zkumavku s roztokem acidobazického indikátoru ve vodě (pH = 7). Pomocí roztoku kyseliny sírové převed'te indikátor do kyselé formy. Ve zkumavce označené **K** smíchejte 1 ml vzorku a 1 ml roztoku H₂SO₄ (c = 0,05 mol/l). Pomocí tetraboritanu sodného převed'te indikátor do formy zásadité. Ve zkumavce **Z** smíchejte 1 ml vzorku a 1 ml roztoku Na₂B₄O₇ (c = 0,05 mol/l).

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

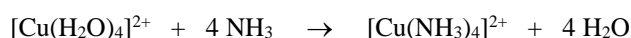
vlnová délka	A (kys. prostř.)	A (zás.prostř.)	vlnová délka	A (kys. prostř.)	A (zás.prostř.)
nm	-	-	nm	-	-
400			560		
410			570		
420			580		
430			590		
440			600		
450			610		
460			620		
470			630		
480			640		
490			650		
500			660		
510			670		
520			680		
530			690		
540			700		
550					

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.

K protokolu přiložte graf a uveďte název indikátoru.

b) Stanovení koncentrace 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 čísla:

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 Cu^{2+}/l . Na přesném pipetování velmi záleží.

Číslo roztoku	Základní roztok	H_2O	$c(\text{Cu}^{2+})$
-	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 destilovanou vodou. 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. Odchytky mohou být způsobeny chybami a nepřesnostmi 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 a výsledky přiložte k protokolu.

c) Stanovení koncentrace Cl⁻ (jeden standard)

Činidlo pro stanovení koncentrace Cl⁻ obsahuje Hg(SCN)₂ a Fe(NO₃)₃. Chloridové anionty reagují s Hg(SCN)₂ za vzniku bezbarvého nedisociovaného komplexu [HgCl₂] a uvolněné ionty SCN⁻ poskytují s ionty Fe³⁺ červený komplex vhodný k spektrofotometrickému stanovení.

Provedení:

Ve stojánku máte 4 malé suché zkumavky, označte je **vz 1,2** (vzorek), **st** (standard) a **bl** (blank). Do zkumavek podle tabulky pečlivě odpipetujte (*na dno, roztok nesmí zůstat ve špičce!*) uvedené roztoky:

Zkumavka 1 (vzorek č.1)	20 μl analyzovaného séra (<i>je v eppendorfce</i>)
Zkumavka 2 (vzorek č.2)	20 μl analyzovaného séra (<i>je v eppendorfce</i>)
Zkumavka 3 (standard)	20 μl standardu Cl ⁻ (c _{st} = 100 mmol/l)
Zkumavka 4 (blank)	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_v) a standardu (A_{st}) proti porovnávacímu roztoku při 450 nm.

	absorbance
vzorek č.1	
vzorek č.2	
standard	

Koncentraci Cl⁻ vypočítáte podle vztahu: $c_{vz} = \frac{A_{vzorku}}{A_{standardu}} \times c_{st}$

c _{vz1} =	mmol/l
--------------------	--------

c _{vz2} =	mmol/l
--------------------	--------

Enzymologie I

a) Závislost aktivity enzymů na pH (α -amyláza)

Princip:

Závislost aktivity enzymu na pH má obvykle Gaussovo rozložení a proto enzym vykazuje maximální aktivitu v relativně úzkém rozmezí hodnot pH. Tato oblast se označuje jako **optimální rozmezí pH** pro daný enzym, někdy se vztahuje přímo ke konkrétní hodnotě pH. Obvykle se však uvádí rozmezí hodnot pH, kdy se s 95% pravděpodobností dosáhne jeho maximální aktivity. Slinná α -amyláza se inaktivuje při pH 4,0 a nižším, což znamená, že v kyselém prostředí žaludku se její účinek zastaví. Pankreatická α -amyláza má pH optimum 7,1.

Provedení:

1. 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_2HPO_4 (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

2. Do každé zkumavky přidejte **1 ml roztoku škrobu**.
3. **Příprava enzymového preparátu α -amylázy:**
Odběr slin provedete pomocí soupravy *Salivette*[®]. Odzátkejte 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 odeberte laborantce. K získání vzorku slin se provede odstředění po dobu 3 minut při rychlosti 2000 ot./min. **Všechny sliny** přelijte do čisté zkumavky a přidejte **6 ml destilované vody**, otáčením zkumavky obsah promíchejte. Tím získáte zředěnou slinu, kterou budete používat jako enzymový preparát **α -amylázy** (i pro úlohu: „Specifita enzymů“!).
4. 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**.

5. Celou sadu sedmi zkumavek umístěte do vodní lázně zahřáté na 37°C . Od okamžiku vložení do vodní lázně začněte měřit čas.
6. Aktivita α -amylázy v připraveném enzymovém preparátu se může vzorek od vzorku velmi lišit. 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!).
7. **Odběr vzorků a vyhodnocování:**
Z každé zkumavky inkubované ve vodní lázni odlijte přibližně **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 **kapku roztoku jodu** a důkladně obsah zkumavek promíchejte. Proveďte zhodnocení.
Není-li vyhodnocení ještě možné (ve všech zkumavkách je stále přítomen nehydrolyzovaný škrob), pokračujte v odběrech nových vzorků ze zkumavek inkubovaných ve vodní lázni (viz bod 6 návodu).

Které pH je pro aktivitu α -amylázy nejvhodnější?

b) Specifita enzymů (sacharáza, α -amyláza)

Princip:

Sacharáza je enzym, který štěpí disacharid sacharózu na glukózu a fruktózu. Sacharáza vzniká v enterocytech tenkého střeva. Sacharáza z kvasnic (invertáza) je zaměřena na β -glykosidovou vazbu (jde o β -fruktofuranosidázu, její systematický název je β -D-fruktofuranosid-fruktohydroláza). Tím se liší od sacharázové aktivity tenkého střeva savců, která patří mezi α -glykosidázy.

α -amyláza štěpí α -1,4-glukosidové vazby polysacharidů. Výsledkem hydrolytického štěpení škrobu je *maltóza*. Maltóza je redukující cukr. Redukující sacharidy jsou schopny za vyšších teplot redukovat ionty těžkých kovů (např. Ag^+ , Cu^{2+} , Bi^{3+}). Enzymová hydrolyza škrobu prochází různými stádii, která se projeví také reakcí s jodem. Škrob se barví jodem temně modře, štěpné polysacharidy – dextriny fialově (amylodextrin), purpurově až červeně (erytrodextrin), popř. se nebarví jodem vůbec (achrodextrin). Současně přibývá redukujících cukrů ve směsi.

Provedení:

1. Příprava enzymového preparátu sacharázy:

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

2. Příprava enzymového preparátu α -amylázy:

viz návod k úloze: „Závislost aktivity α -amylázy na pH prostředí“

3. 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>α-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 30 minut ve vodní lázni při 37°C .									
Obsah každé zkumavky rozdělte přibližně na 2 poloviny. (do paralelní řady 8 zkumavek přelijte vždy asi polovinu obsahu příslušné zkumavky)									
Jedna sada zkumavek: Proveďte Fehlingovu reakci: smíchejte 2 ml roztoku Fehling I a 2 ml roztoku Fehling II , do každé zkumavky přidejte 0,5 ml Fehlingova roztoku a povařte .									
Druhá sada zkumavek: Přidejte 5 ml destilované vody , několik kapek jodu a promíchejte.									

Výsledek Fehlingovy reakce								
Zbarvení vzniklé s jodem								

Úkoly:

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

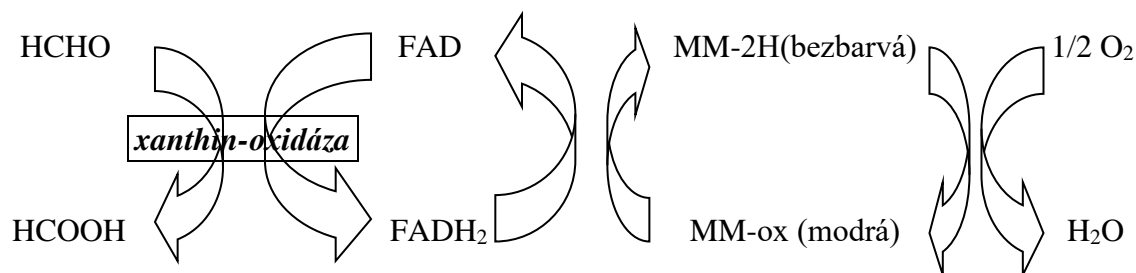
Zkumavka č.	Vysvětlení
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

- b) Do protokolu запиšte ve strukturních vzorcích schéma hydrolýzy škrobu α -amylázou a sacharózy kvasničnou sacharázou. Vyznačte vazby, které uvedené enzymy hydrolyzují.

c) Sledování aktivity mléčné xanthin-oxidoreduktázy

Princip:

Xanthinoxidoreduktáza (XOR) je komplexní molybden obsahující flavoprotein. Xanthinoxidoreduktáza v mléce oxiduje v tomto pokusu formaldehyd na kyselinu mravenčí a elektrony předává methylenové modři, která tím přechází na redukovanou (bezbarvou) leukoformu. Jestliže obsah zkumavky protřepeme, vzdušný kyslík regeneruje leukoformu na původní oxidovanou methylenovou modř. To můžeme opakovat až do vyčerpání formaldehydu.



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:

1. Odměřte do 4 zkumavek:

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

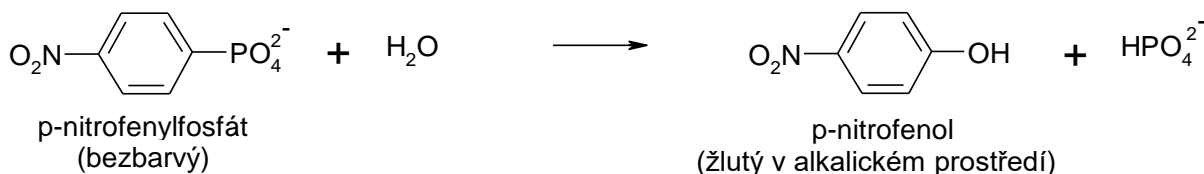
2. Všechny zkumavky protřepajte a umístěte do vodní lázně 37° C. Sledujte, ve které zkumavce dojde k odbarvení a zdůvodněte proč.
3. Zkumavku, ve které došlo k úplnému odbarvení, vyjměte z lázně a energicky protřepajte až do zmodrání obsahu. Pak pokračujte v inkubaci.
4. Vyčkejte opět do úplného odbarvení, znovu protřepajte. Celý cyklus opakujte několikrát, až se methylenová modř přestane odbarvovat v důsledku úplného vyčerpání zásoby substrátu.
5. Přesvědčte se, že po přidání několika dalších kapek formaldehydu počne reakce probíhat znovu.

Enzymologie II

a) Stanovení Michaelisovy konstanty kyselá fosfatázy

Princip:

Fosfatázy štěpí esterové vazby fosforečné kyseliny, takže uvolňují fosfát a příslušný alkohol. 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.

Provedení:

Přečtěte celý návod před zahájením vlastní práce!

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

1. Do stojánku připravte a označte **10 zkumavek**.
2. Mechanickými mikropipetami napipetujte podle následující tabulky nejdříve citrátový pufr a teprve potom substrát (lze použít stejnou špičku na pipetu), po dokončení práce špičku vyhodte.

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

3. Sadu zkumavek umístěte do vodní lázně **37 °C** teplé a nechte je předeheat **5 minut**. Mezitím přineste enzym z ledničky (kyselá fosfatáza v Eppendorf zkumavce), připravte stopky a pipetu na **50 μl** s **čistou špičkou**.
4. 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.

5. 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!!!
6. 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.
7. 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.
8. Změřené hodnoty vložte do tabulky v počítači. Vypočítejte a vložte též koncentraci substrátu (p-nitrofenylfosfát) v každém reakčním vzorku. Koncentrace základního roztoku substrátu je **2,5 mmol/l**. 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.

Výpočet:

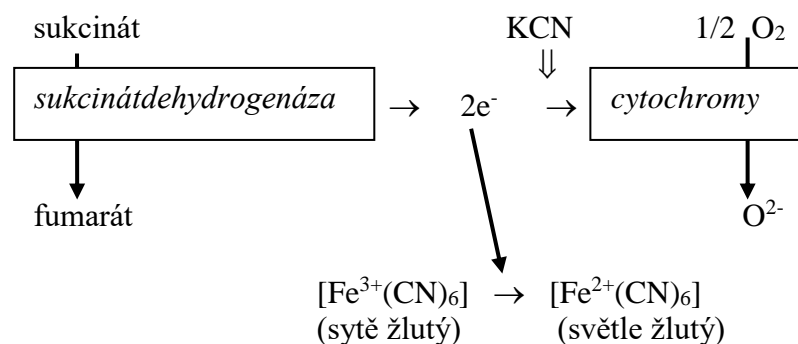
Michaelisovu konstantu zjistíte výpočtem z rovnice nebo odečtením z grafu, kde ovšem čtete hodnotu **$-1/K_M$** .

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

b) Kompetitivní inhibice sukcinátdehydrogenázy malonátem

Princip:

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.)

Provedení:

1. Do **250 ml kádinky** připravte led z výrobku a přidejte trochu studené vody. Tak připravte ledovou lázeň pro přípravu enzymového preparátu.
2. V kalibrované zkumavce naředte fosforečnanový pufr 5x destilovanou vodou (2ml pufru + 8 ml destilované vody), promíchejte a umístěte do ledové lázně.
3. **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 rozdrťte a **2 - 3x suspendujte** v ledovém zředěném fosfátovém pufru. Tkáňovou drť přeneste do vychlazené centrifugační zkumavky a krátce odstředte (5min/2000 ot.).

V průběhu přípravy preparátu mitochondrií jeden student ze skupiny připraví reakční roztoky (bod 5 tohoto návodu).

4. 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. Odstředte

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.

5. Příprava základního roztoku:

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

6. Do **reakčních zkumavek** pipetujte roztoky podle schématu:

Zkumavky	1	2	3	4
<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

7. Zapněte fotometr, nastavte vlnovou délku **415 nm**, a připravte celkem 3 fotometrické kyvety a stopky. K fotometru přeneste reakční zkumavky 1 – 4 ve stojánku, enzymový preparát v ledové lázni a pipetu na 0,5 ml.
8. 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.
9. 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).
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Hodnoty absorbance všech 3 reakcí zapište do tabulky v programu Excel, který pak graficky reakci zpracuje.
14. Proveďte vyhodnocení a závěr.
15. Pečlivě vymyjte kyvety, pipety a ostatní nádobí, uveďte pracoviště do pořádku.