

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Plzni



**Praktická cvičení
z lékařské chemie
II.**

Alena Humlová, Miroslav Balvín

1999

Úvod

Tato skripta jsou určena posluchačům II. ročníku všeobecného lékařství LF UK v Plzni pro praktickou výuku chemie v zimním semestru. Obsahují návody ke všem úlohám, jimž předchází stručný teoretický výklad. Naším záměrem je seznámit posluchače se základními principy optických, dělicích a potenciometrických metod a obsluhou přístrojů, které se v těchto metodách běžně používají a patří k základnímu vybavení chemické laboratoře. Kromě toho byla zařazena jednoduchá klinicko-biochemická stanovení, jejichž podrobnější interpretace bude součástí praktik z klinické biochemie v letním semestru.

Chtěli bychom na tomto místě poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Rackovi, CSc. za laskavé poskytnutí některých materiálů, které dokumentují různé patologické stavy a současně ukazují na využití obecných metod v klinické biochemii. Dále děkujeme oběma recenzentům za pečlivé přečtení rukopisu. K jejich připomínkám bylo v závěrečné redakci přihlédnuto.

V Plzni, v červnu 1999

autoři

Pravidla bezpečnosti a ochrany zdraví při práci

1. Do praktikárny 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 pracovní plášť a sešit. Praktikování bez pláště je nepřipustné. Vlasy musí být upraveny tak, aby nemohlo dojít k úrazu při práci s kahanem.
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 nádoby 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, zápachajícími, jedovatými plyny a parami, stejně jako žhánání a spalování je dovoleno provádět jen v digestořích.
6. Při nasazování skleněných trubiček, teploměrů apod. do zátek a hadiček je nutno chránit ruce vhodnými rukavicemi. Konec skleněného předmětu nesmí mít ostré hrany a musí být namazán nebo navlhčen. Sřepky 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.
8. Při ředění se kyseliny zásadně vlévají do vody, nikoliv naopak.
9. Je zakázáno nasávat jedy a žíraviny do pipet ústy. Musí být použito vakuum nebo mechanický dávkovač.
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 nebo trubička.
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.
15. Obsluha laboratorní centrifugy musí být prováděna jen v přítomnosti asistenta nebo laborantky. Centrifugační nádoby 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.

První pomoc při úrazech v laboratoři

Poleptání oka

Vnikne-li do oka kyselý nebo alkalický roztok, je nutno provést okamžitý výplach velkým množstvím vody. Postiženého je nejlépe uložit na bok a pod poraněné oko mu podložit misku nebo smotek vaty. Pak se stáhne palcem dolní víčko a ukazovákem téže ruky se zdvihne horní víčko. Do rozšířené štěrbině se vpouští mírným proudem tekoucí voda tak, aby stékala od vnitřního k zevnímu očnímu koutku. Postiženému je třeba co nejrychleji zajistit odbornou pomoc. V žádném případě nepoužívat neutralizační roztok!

Poleptání těla

Je-li pokožka zasažena kyselým nebo alkalickým roztokem, odstraní se potřísněný oděv a prádlo a poleptané místo se omývá dlouhodobě prudkým proudem vody. Po důkladném omytí vodou je možno použít neutralizační roztok a to:

a) při poleptání kyselinou 6-10% roztok uhličitanu sodného

b) při poleptání zásadami 2% roztok kyseliny octové nebo citronové.

Poleptanou kůži je třeba pokrýt sterilním obvazem a zajistit odbornou pomoc.

Popálení

Je třeba všemi dostupnými prostředky uhasit oheň, zamezit působení horké škodliviny (horká voda, pára apod.) a odstranit hořlavé a zápalné látky z bezprostředního okolí. Z popálené plochy se nestrhává oděv, odstraní se jen žhavé předměty. Na popálenou plochu se nic nelije, nesype, ničím se nepotírá. Po ochlazení se postižená plocha pokryje sterilním obvazem (vyžehlený kapesník, ručník, prostěradlo) a zajistí se odborná pomoc. U lehčích popálenin, má-li postižený chuť, může se podat po troškách tekutina. U těžkých popálenin se ústy nic nepodává.

Otevřené poranění

Především je nutno zastavit krvácení a zabránit infekci rány. Rána se ošetří podle jejího rozsahu a charakteru krvácení. Drobná poranění se omyjí proudem vody a sterilně ošetří. U rozsáhlejších poranění se staví krvácení tlakovým obvazem. Pokud není rána znečištěna chemickými sloučeninami, rána se nevymývá. Podle potřeby se zajistí odborná pomoc.

Při nadýchání škodlivých látek

Postiženého je nutno dopravit na čerstvý vzduch, uvolnit oděv. Nedýchá-li, zahájí se dýchání z plic do plic.

— — —

Při všech úrazech je třeba zajistit postiženému klid, zabránit podchlazení (např. zabalením do deky) a co nejrychleji přesunout pacienta do zdravotnického zařízení.

Pravidla jsou zpracována podle ČSN 01 8003 s přihlédnutím k místním podmínkám.

Práce s mechanickými dávkovacími pipetami

Pro odměřování malých objemů kapalin se v současné době v chemických laboratořích všech zaměření používají **mechanické dávkovací pipety** (často označované jako „automatické pipety“). Vyrábějí se pipety s fixním objemem (jednoobjemové) nebo s nastavitelným objemem (rozsah uveden na pístovém tlačítku). Objem je na pipetě uveden v mikrolitrech. Skládají se z vlastního dávkovače a vyměnitelné jednorázové plastové špičky. Špičky jsou vyráběny z chemicky i mechanicky odolného nesmáčivého plastu a to ve čtyřech základních objemových typech – bílý (0,2 – 10 μl), žlutý (10 – 250 μl), modrý (200 – 1000 μl) a velký bílý (5000 μl a 10 000 μl). Barva špičky odpovídá barvě na pístovém tlačítku.

Práce s automatickou pipetou:

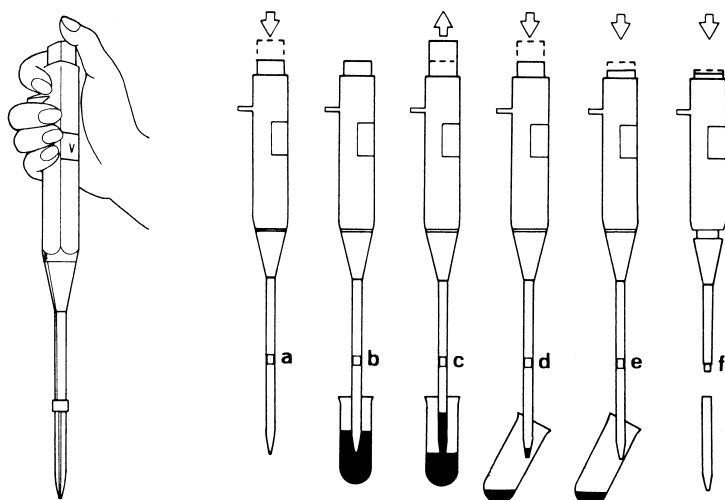
- Podle požadovaného objemu pipetovaného roztoku zvolíte pipetu s daným objemem u fixní pipety, resp. s vhodným rozsahem objemu u nastavitelné pipety (uveden na tlačítku pístu pipety).
- U nastavitelné pipety nastavíte požadovaný objem na stupnici otáčením šroubu:

Údaj na pístu:	2 / 20	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 2 μl	0	2	0	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 15 μl	1	5	0	<table border="1"><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 20 μl	2	0	0
0													
2													
0													
1													
5													
0													
2													
0													
0													
Minimální objem:	2 μl												
Maximální objem:	20 μl												

Údaj na pístu:	20 / 200	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 20 μl	0	2	0	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 150 μl	1	5	0	<table border="1"><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 200 μl	2	0	0
0													
2													
0													
1													
5													
0													
2													
0													
0													
Minimální objem:	20 μl												
Maximální objem:	200 μl												

Údaj na pístu:	200 / 1000	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>2</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 200 μl	0	2	0	<table border="1"><tr><td>0</td></tr><tr><td>5</td></tr><tr><td>5</td></tr></table> 550 μl	0	5	5	<table border="1"><tr><td>1</td></tr><tr><td>0</td></tr><tr><td>0</td></tr></table> 1000 μl	1	0	0
0													
2													
0													
0													
5													
5													
1													
0													
0													
Minimální objem:	200 μl												
Maximální objem:	1000 μl												

- Před pipetováním nasadíte na pipetu vhodnou špičku (barva odpovídá barvě na pístovém tlačítku).
 - Při pipetování stlačíte pístové tlačítko k první zarážce, ponoříte pipetu do roztoku a pomalým uvolňováním pístového tlačítka nasajete roztok do špičky. Po přenesení do příslušné nádoby obsah špičky vypustíte stlačením pístového tlačítka do druhé polohy. Roztok se pipetuje na dno nádoby, přičemž špička nesmí být při vypouštění v roztoku ponořená. Pipetu je nutno držet ve svislé poloze špičkou dolů po celou dobu manipulace!
 - Po pipetování odstraníte špičku stlačením pístového tlačítka do třetí polohy a odložíte ji svisle do stojánku.
- Pro pipetování nového roztoku použijete vždy novou špičku.



Držení a práce s mechanickou dávkovací pipetou

Grafické vyhodnocení experimentálních dat

V analytických metodách, v nichž jsou sledovány různé fyzikálně-chemické veličiny a vztahy mezi nimi, se často používá grafické zobrazení sledované závislosti.

Tyto grafy se používají:

- k ověření platnosti sledované zákonitosti v daných podmínkách
- k posouzení přesnosti zvolené metody
- jako kalibrační křivka pro sériová měření
- k numerickému vyhodnocení hledané veličiny.

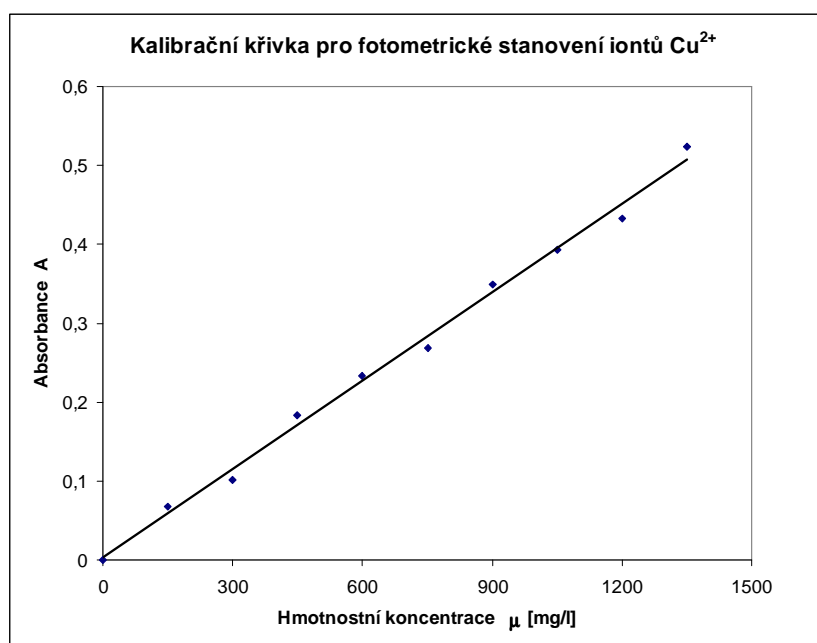
Grafy se rýsují na rastrovaný papír nejčastěji s milimetrovým dělením. Sledujeme-li průběh spojitě funkce $y = f(x)$, pak se **nezávisle proměnná** veličina nanáší na **osu x** . U této veličiny lze zvolit a podle vlastního uvážení měnit měřené intervaly (např. čas, vlnová délka, koncentrace apod.). **Závisle proměnná** veličina se nanáší na **osu y** . Tuto veličinu v průběhu měření odečítáme na škále přístroje nebo jiného kalibrovaného zařízení (např. byrety) nebo ji z naměřených hodnot vypočítáme (např. absorbance, napětí, objem titračního roztoku, rychlost apod.).

Na každé ose se označí nanášená veličina pomocí dohodnutého, běžně používaného symbolu a rovněž jednotka, v níž je veličina udávána. Úsek na ose se rozdělí na vhodný počet celistvých dílků v maximálním rozsahu volených či měřených veličin. Měřítka se volí tak, aby výsledný graf bylo možno narýsovat do plochy přibližného čtverce. Je-li sledovaná závislost lineární, pak by měla výsledná přímka svírat s osou x úhel přibližně 45° .

Jednotlivé experimentálně nalezené body se v grafu označí pomocí křížků nebo malých kroužků s vyznačeným středem. Jimi se pak proloží ideální křivka tak, aby většina bodů ležela na ní, případně stejný počet nad ní a pod ní. Touto grafickou metodou je možno do jisté míry eliminovat odchylky způsobené subjektivními vlivy. Kalibrační křivku je možno rýsovat jen v oblasti měřených hodnot, tzn. že křivka začíná první a končí poslední změřenou hodnotou a nemá být prodlužována do oblasti, která nebyla experimentálně prověřena. K grafu se obvykle připojují i základní údaje o podmínkách měření a datum, případně i jméno pracovníka.

Někdy je vhodné sledovat průběh funkce v její první derivaci, kterou získáme tzv. metodou přírůstků hodnot. V těchto případech se na osu y nanášejí hodnoty $y_1 - y_0 / x_1 - x_0$, $y_2 - y_1 / x_2 - x_1$, $y_3 - y_2 / x_3 - x_2$, ... proti hodnotám x_1 , x_2 , x_3 , ... na ose x . Jindy je vhodná metoda logaritmická, při níž se nanáší jedna nebo obě veličiny v logaritmické stupnici. Pro tyto účely se vyrábějí rastrované semilogaritmické nebo logaritmické papíry. Derivační a logaritmické křivky se používají u složitějších závislostí, jejichž průběh se touto úpravou linearizuje.

Pečlivému sestrojení grafu je třeba věnovat stejnou pozornost jako vlastnímu experimentu. Při nedbalém provedení mohou být všechny předchozí výsledky experimentu znehodnoceny. Na druhé straně nepřesnosti v práci se odrazí velkým rozptylem bodů kolem ideální křivky. V takových případech je nezbytné odhalit zdroj chyb a pokus zopakovat.



1. úloha:

Wyšetření žaludeční sekrece

Žaludeční šťáva je produktem buněk žaludeční sliznice. Je to bezbarvá tekutina s příměsí hlenu, charakteristického zápachu, značně kyselá (pH okolo 2). Kyselost způsobuje přítomnost HCl, která je v žaludeční šťávě jednak volná, jednak vázaná na hlen. HCl vzniká v krycích (*paritálních*) buňkách žaludeční sliznice.

Z oxidu uhličitého a vody se účinkem enzymu karboanhydrázy tvoří kyselina uhličitá, která ihned disociuje na ionty H^+ a HCO_3^- . Vodíkové ionty jsou aktivně transportovány do lumen žaludku výměnou za ionty Na^+ . Hydrogenuhlíčitany se vrací do plasmu a za ně z plasmu putují do krycích buněk a dál do lumen ionty Cl^- . Sekrece HCl je přirozeně stimulována hormonem gastrinem, dále kofeinem, alkoholem, nikotinem i nervovými vlivy.

Úloha HCl při trávení:

1. denaturuje bílkoviny
2. rozpouští ve vodě nerozpustné soli (zejména soli Ca^{II} a Fe^{III})
3. částečně se podílí na sterilizaci potravy.

Pentagastrinový test

Po dvanáctihodinovém lačnění se nazogastrickou sondou odčerpá veškerý obsah žaludku, který se nehodnotí. Pak se kontinuálně odsává žaludeční sekret po dobu 60 minut a získá se žaludeční sekret za klidových podmínek (tzv. *bazální sekrece*). Potom se podkožně injikuje pentagastrin v dávce 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti. Pentagastrin je uměle připravený pentapeptid, N-konec přirozeného hormonu gastrinu (17-ti členný peptid). Opět se odebere čtyřikrát po 15-ti minutách žaludeční sekret a vyhodnotí se tzv. **stimulovaná sekrece**. U všech vzorků se změří objem, titračně se zjistí koncentrace HCl a vypočítá se látkové množství kyseliny chlorovodíkové vyprodukované za hodinu.

Provedení:

- Pomocí odměrného válce změříte objem sekretu. Postupujete od čísla 1 po číslo 5, odměrný válec mezi jednotlivými měřeními nevymýváte.
- Provedete standardizaci titračního roztoku NaOH: Odpipetujete 5 ml standardního roztoku kyseliny šťávelové ($c = 50 \text{ mmol/l}$), přidáte 3 kapky indikátoru (fenolftalein) a ztitrujete do světle růžového zbarvení. Titraci provedete dvakrát a z průměrné spotřeby vypočítáte koncentraci titračního roztoku.

$$c_t = \frac{c_{st} \cdot V_{st}}{V_t \cdot f_{st}} \quad [\text{mmol/l}]$$

- Do titrační baňky odpipetujete 5 ml vzorku sekretu a přidáte:
 - a) 2 kapky *p*-dimethylaminoazobenzenu
 - b) 2 kapky fenolftaleinu
- Je-li přítomna volná HCl, zbarví se roztok na začátku titrace červeně. Titrujete standardizovaným roztokem NaOH do první barevné změny (červená / žlutá) a zapíšete spotřebu (**volná HCl**). Pak pokračujete v titraci dál až do další barevné změny (žlutá / "lososová"). Výsledná spotřeba odpovídá **celkové aciditě**.

$$c_{\text{HCl}} = \frac{c_t \cdot \text{SP}}{5} \quad [\text{mmol/l}]$$

- Vypočítáte látkové množství (mmol) vyprodukované volné i celkové HCl za 1 hodinu u basální sekrece (vzorek 1), resp. za 15 minut u stimulované sekrece (vzorky 2 až 5).

$$n_{\text{HCl}} = c_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{sekret}} \quad [\text{mmol/h, resp. mmol/15 min}]$$

- Sestrojíte graf závislosti látkového množství vyprodukované volné a celkové HCl na čase za bazálních (v mmol/15 min) a stimulovaných podmínek.

Do grafu naneste:

osa x: čas (min.)

osa y: látkové množství (mmol) vyprodukované HCl

Křivku pro volnou HCl a celkovou aciditu narýsujte různými barvami. Funkce není spojitá, proto se spojuje lomenou čarou bod po bodu.

- Vypočítáte výdej HCl (*output*):
 - a) **Bazální výdej HCl** (*basal acid output*) - **BAO**
je látkové množství vyprodukované celkové HCl za klidových podmínek před stimulací (mmol/h)
 - b) **Maximální výdej HCl** (*maximal acid output*) - **MAO**
je součet látkových množství celkové HCl po stimulaci
$$\text{MAO} = n_2 + n_3 + n_4 + n_5 \text{ (mmol/h)}$$
 - c) **Vrcholový výdej HCl** (*peak acid output*) - **PAO**
je součet dvou nejvyšších hodnot vynásobený dvěma
$$\text{PAO} = 2 \times (n_{\text{max}1} + n_{\text{max}2}) \text{ (mmol/h)}$$
- Zhotovíte sloupcový diagram hodnot BAO, MAO a PAO a do téhož grafu zakreslíte rozsah normálních hodnot.

Normální hodnoty:	pH	1,9 - 2,5
	objem sekretu	2 - 3 l/24 h
	volná HCl	20 - 40 mmol/l
	celková acidita	40 - 60 mmol/l
	BAO	1 - 5 mmol/h
	MAO	10 - 30 mmol/h
	PAO	10 - 40 mmol/h
	BAO/PAO	menší než 0,2

- Vyhodnocení nálezu:
V praxi se hodnotí nejčastěji výdeje BAO a PAO a jejich poměr BAO/PAO. Po stimulaci pentagastrinem musí být vrcholový výdej nejméně 5x větší než bazální.

Hodnocení nálezu:

Hyperchlorhydrie

bývá nejčastěji u vředové choroby duodena (PAO > 40 mmol/h), nejvyšší hodnoty se však nacházejí u pacientů s nádorovým onemocněním buněk produkujících gastrin (*gastrinom*), u nichž bývá i basální sekrece velmi vysoká (tvorí i více než 60% sekrece vrcholové).

Hypochlorhydrie

bývá u zánětů žaludeční sliznice (PAO < 10 mmol/h).

Achlorhydrie

je závažný stav, považovaný za prekarcerózu. Může se projevit i u perniciosní (zhoubné) anemie (PAO << 10 mmol/h., pH okolo 6). Volná HCl chybí a často se neobjeví ani po stimulaci pentagastrinem.

Použité roztoky:

1. Standardní roztok (COOH)₂ (c = 50 mmol/l)
2. Titrační roztok NaOH (c = 0,1 mol/l)
3. Fenolftalein (0,1% roztok v 50% ethanolu)
4. p-dimethylaminoazobenzen (0,1% roztok v 90% ethanolu)
5. Vzorčky žaludečního sekretu (imitace)

2. úloha:

Vyšetření mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok (*liquor cerebrospinalis*, cerebrospinal fluid - CSF) se řadí mezi transcelulární tekutiny. Obsahuje stejné složky jako plasma, avšak v odlišných koncentracích. V likvoru je nižší koncentrace proteinů, iontů Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , anorganických fosfátů a hydrogenuhličitanů, naopak vyšší je koncentrace Mg^{2+} a chloridů. Likvor je ve srovnání s plasmou hypoosmotický (obsahuje 200x méně proteinů), ale izosmolální (díky vyšší hladině chloridů).

Pro vyšetření se likvor odebírá nejčastěji lumbální punkcí a pak se ihned dodá do laboratoře. Většina vyšetření se musí provést do 1 hodiny po odběru, jinak hrozí rozpad buněčných elementů, falešné snížení hladiny glukosy a zvýšení laktátu.

Za normálních okolností je mozkomíšní mok čirá, bezbarvá tekutina. U hnisavých zánětů je většinou zbarven žlutě až žlutozeleně, v přítomnosti bilirubinu kanárkově žlutě. Příměs krve se projeví růžovou až červenou barvou, methemoglobin se projeví okrovým až hnědým zbarvením. Zákal je obvykle způsoben množstvím leukocytů, masivní zákal bývá u bakteriální meningitidy.

Nejčastěji se vyšetřuje hladina celkové bílkoviny (*proteinorhachie*), glukosy (*glykorhachie*), chloridů a laktátu. U těchto složek rovněž dochází k největším změnám za patologických stavů.

Normální hodnoty (u dospělých):

	Plasma	Likvor
Bílkoviny	62 - 82 g/l	0,15 - 0,40 g/l
Glukosa	3,6 - 6,1 mmol/l	2,5 - 3,9 mmol/l
Chloridy	97 - 108 mmol/l	120 - 132 mmol/l
Laktát	0,63 - 2,44 mmol/l	1,2 - 2,1 mmol/l

I. Vyšetření bílkovin

Orientační zkoušky jsou založeny na zákalových reakcích, přesná stanovení se provádějí spektrofotometricky, nefelometricky a může se provést rovněž elektroforetická frakcionace nebo další speciální vyšetření.

Orientační zákalové zkoušky:

- **Pandyho reakce**

Na hodinové sklíčko napipetujete 1 ml roztoku 10% fenolu a na okraj přikápnete zkoumaný vzorek likvoru. Po třech minutách hodnotíte zákal stupnicí v arbitrárních jednotkách 0, 1, 2, 3, 4.

Normální nález: 0 arb.j.

- **Nonne-Appeltova reakce**

Do zkumavky odpipetujete 0,5 ml vzorku likvoru a 0,5 ml nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (Pozor! Odeberte jen čirý roztok nad nerozpuštěnými krystaly.) Směs se dobře protřepe a po třech minutách se hodnotí zákal stupnicí 0, 1, 2, 3, 4 arb.j.

Normální nález: 0 arb.j.

- **Weichbrodtova reakce**

V malé aglutinační zkumavce smícháte 0,7 ml likvoru a 0,3 ml 0,1% roztoku sublimátu (HgCl_2) (Pozor, JED! Pipetovat pomocí automatické pístové pipety!). Protřepete a po třech minutách zhodnotíte zákal stupnicí 0, 1, 2, 3, 4 arb.j.

Normální nález: 0 arb.j.

Fotometrické stanovení bílkovin (BIO-LA-test - TP)

Peptidy a bílkoviny dávají s měďnatými ionty v alkalickém prostředí modrý komplex, který je vhodný pro fotometrické stanovení. Měří se absorbance vzorku a standardu proti porovnávacímu (slepému) pokusu při 530 nm.

Provedení:

- Připravíte si tři suché (!) zkumavky, do nichž odpipetujete:

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Likvor (ml)	0,2	-	-
Standard (ml)	-	0,2	-
Destilovaná voda (ml)	-	-	0,2
Činidlo (ml)	2,5	2,5	2,5

- Necháte 30 minut stát, pak změříte absorbanci vzorku (A_v) a standardního roztoku (A_{st}) proti porovnávacímu roztoku při 530 nm.

Fotometrické měření:

- Budete pracovat s fotometrem Spekol 11. Přístroj se uvede do chodu stisknutím tlačítka hlavního vypínače a stiskem tlačítka „E“. Mikrometrickým šroubem nastavíte vlnovou délku 530 nm a zkontrolujete přepnutí fotodetektoru na modrou oblast.
- Jednu kyvetu naplníte porovnávacím roztokem, druhou roztokem vzorku. Roztok nesmí sahat až úplně po okraj kyvety! Kyvety se vkládají do držáku suché! K osušení použijete kousky buničité vaty.
- Zařadíte porovnávací roztok, stisknete tlačítko „R“ a vyčkáte, až se na ukazateli objeví hodnota 0,000. Pak zařadíte kyvetu se vzorkem a odečtete absorbanci (A_v). Stejným způsobem změříte absorbanci standardu (A_{st}).
- Koncentraci vzorku vypočítáte podle vztahu:

$$c_v = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st} \quad [\text{g/l}]$$

- Vyhodnocení nálezu
Normální hodnoty: 0,15 - 0,40 g/l (stoupají s věkem)

Hodnocení nálezu:

Zvýšené hodnoty se nacházejí u poruch hematoencefalické bariéry (*blood-brain barrier -BBB*), při poškození buněk CNS, ale zejména u zánětlivých onemocnění.

II. Semikvantitativní stanovení glukosy

Vyšetření je založeno na schopnosti glukosy redukovat za horka v alkalickém prostředí ionty Cu^{2+} na červenohnědý Cu_2O .

Heinesova zkouška

Heinesovo činidlo je obdobou Fehlingova činidla, které se používá k důkazu aldehydů a redukujících cukrů. Činidlo obsahuje roztok CuSO_4 , KOH a glycerol (na rozdíl od Fehlingova činidla, kde je vlnan sodno-draselný). Není příliš stálé (připravuje se každý den čerstvé), a proto se také provádí kontrola pomocí porovnávacího (slepého) vzorku, v němž je likvor nahrazen vodou.

- Připravíte si dvě zkumavky, do nichž odpipetujete:

	1	2
	Likvor	Porovnávací vzorek
Heinesovo činidlo (ml)	1,0	1,0
Krátkce povařit, pak přidat		
Vzorek likvoru (ml)	1,0	-
Destilovaná voda (ml)	-	1,0
2 minuty povařit		

- Vyhodnocení nálezu: (Zbarvení u porovnávacího vzorku musí zůstat modré.)

barva	koncentrace	nález
červenožlutá	cca 3,5 mmol/l	normální
fialová	cca 2,0 mmol/l	snížená hladina
modrá	pod 1,0 mmol/l	velmi nízká hladina

Normální hodnota: 2,5 - 3,9 mmol/l

Hodnocení nálezu:

Hladina glukosy v likvoru závisí na její hladině v krvi (glykemii) a za normálních okolností tvoří asi 60% sérové hodnoty. K snížení hladiny dochází hlavně u zánětlivých onemocnění, u bakteriální meningitidy se může objevit i hodnota nulová.

III. Stanovení chloridů merkurimetrickou titrací

Hladina chloridů v mozkomíšním moku je normálně vyšší než v plasmě, u patologických stavů se snižuje. Stanovuje se titračně, fotomericky nebo iontově selektivní elektrodou.

Merkurimetrie se řadí ke komplexním titracím. Vzorek je v tomto případě ligandem, který tvoří s centrálním atomem titračního roztoku rozpustný, ale nedisociovaný komplex $[\text{HgCl}_2]$. Titruje se roztokem $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ paralelně se standardem. Indikátorem je roztok dinitrofenylkarbazonu v chloridu uhličitém, konec titrace indikuje světle fialové zbarvení.

Provedení:

- Očísľujete si tři titrační baňky a napipetujete:

	1	2	3
	Likvor	Standard	Porovnávací roztok
Likvor (ml)	0,2	-	-
Standard (ml)	-	0,2	-
Destilovaná voda (ml)	2,0	2,0	2,2
Indikátor (ml)	0,3	0,3	0,3
20% HNO_3	-	-	1 kapka

- Do titrační baňky vložíte míchadlo, postavíte na elektromagnetickou míchačku a za stálého míchání velmi pomalu titrujete roztokem $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Na konci titrace se objeví fialové zbarvení.

- Z nalezených spotřeb pro vzorek (sp_v), standard (sp_{st}) a porovnávací roztok (sp_0) a z koncentrace standardu (c_{st}) vypočítáte koncentraci chloridů v likvoru:

$$c_{Cl^-} = \frac{sp_v - sp_0}{sp_{st} - sp_0} \cdot c_{st} \quad [\text{mmol/l}]$$

- Vyhodnocení nálezu
Normální hodnoty: 120 - 132 mmol /l

Hodnocení nálezu:

Snížené hodnoty se nacházejí při výraznější poruše BBB přítomné u různých typů meningitid.

Použité roztoky:

1. Fenol (10% roztok)
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (nasycený roztok): 85 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se při 90°C rozpustí ve 100 ml vody. Nechá se několik dní stát při laboratorní teplotě.
3. HgCl_2 (0,1% roztok) Pozor, JED!
4. BIO-LA-test (celková bílkovina)

Činidlo obsahuje: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (36 mmol/l, tj. 9 g/l)
 vlnan sodno draselný (95 mmol/l, tj. 20 g/l)
 NaOH (1,8 mol/l, tj. 72 g/l)
 KI (90 mmol/l, tj. 15 g/l)
5. Heinesovo činidlo (2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 15 ml vody, přidá se 15 ml glycerolu a 150 ml 5% roztoku KOH. Přechovává se v tmavé lahvi. Připravuje se každý den čerstvé.)
6. Titrační roztok $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (5 mmol/l)
7. Standardní roztok NaCl (100 mmol/l)
8. Indikátor (dinitrofenylkarbazon v CCl_4)
9. HNO_3 (20% roztok)
10. Vzorek likvoru (imitace)

3. úloha:

Analýza močových konkrementů

Posuzování močových konkrementů se provádí v medicíně už dlouho, ale teprve moderní analytické metody přinesly do této problematiky exaktnost. V současné době mnohé firmy zabývající se výrobou čistých chemikálií přinášejí na trh soupravy s veškerým vybavením ke kvalitativní i semikvantitativní analýze.

Močové konkrementy představují hraniční případy biomineralizace. Jsou výsledkem metabolických procesů, při nichž organismus produkuje pevné látky, které jsou nebo se chovají jako krystaly anorganického původu. Většina konkrementů (asi 78%) je tvořena anorganickými sloučeninami. Nejčastěji se nachází vápník a to jako šřavelan vápenatý $(\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*whewellit*) nebo $(\text{COO})_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (*weddellit*). Tyto minerály, které jsou v přírodě velmi vzácné, tvoří asi 60% všech močových konkrementů. Dále se může vápník vyskytovat jako hydrogenfosforečnan $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (*brushit*) nebo dihydroxid-fosforečnan $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (*hydroxyapatit*). Z organických sloučenin se nejčastěji vyskytuje kyselina močová a její amonná sůl, vzácněji cystin a xanthin. V alkalické moči se může vytvářet konkrement z fosforečnanu hořečnatu-amonného $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (*struvit*).

Pracovní postup:

Pracovat budete se soupravou Merckognost (MERCK - Harnsteinanalyse).

Příprava vzorku:

- Močový kámen se rozdrtí na jemný prášek. Příloženou odměrkou se odebere alikvotní část a rozpustí v malém množství (5 kapek) koncentrované H_2SO_4 . Po úplném rozpuštění se roztok kvantitativně přelije do příložené odměrné nádoby a doplní vodou na 50 ml. Po promíchání se získá základní roztok, z něhož se odebírají vzorky pro jednotlivé zkoušky. Všechny reakce se provádějí v příložených nádobkách, které se plní po značku (5 ml). Zbarvení roztoku se pozoruje pohledem shora. K analýze dostanete již připravený základní roztok, který vyšetříte.

1. Stanovení vápníku

Semikvantitativní stanovení vápníku se provádí chelatometrickou metodou upravenou pro tuto analýzu.

- Zkušební nádobku naplníte vzorkem po rysku (5 ml), přidáte 2 kapky roztoku NaOH a 1 odměrku (špachtle) indikátoru – kys. kalkonkarboxylové (azobarvivo podobného složení jako eriochromová čerň T, kterou jste používali v chelatometrii).
- Po rozpuštění se v přítomnosti vápníku vyvine červení zbarvení komplexu vápníku s indikátorem [Ca - IND].
- Po kapkách přidáváte roztok chelatonu (**kapky počítejte!**), až se roztok právě zbarví modře. Veškerý vápník přejde do bezbarvého komplexu s chelatonem $[\text{CaY}^{2-}]$ a objeví se původní zbarvení indikátoru. Během zkoušky nádobkou stále potřásáte, aby se směs promíchávala.
- Z počtu kapek vypočítáte přibližný obsah vápníku (v %):

$$\% \text{Ca} = (\text{počet kapek}) \times 5$$

2. Stanovení šřavelanů

K důkazu a semikvantitativnímu stanovení šřavelanů se využije tvorby červené komplexní soli iontů Fe^{3+} s kyselinou sulfosalicylovou a skutečnosti, že tento komplex je méně pevný než šřavelan železitý, který je bezbarvý. V přítomnosti šřavelanu se intenzita zbarvení červeného komplexu zeslabí, neboť část iontů Fe^{3+} přejde z barevného komplexu do bezbarvé soli.

- Ke vzorku ve zkušební nádobce (5 ml) přidáte 2 kapky boritanového pufru (pH = 10), 3 kapky roztoku kyseliny sulfosalicylové a 3 kapky roztoku FeCl₃.
- Necháte 2 minuty stát.
- Porovnáte zbarvení s přiloženou barevnou škálou („*Oxalat*“) a odečtete přibližný obsah šťavelanů v %.
- Toto číslo nastavíte na přiloženém pravítku na stupnici „*Oxalat*“ a na spodní (modré) škále odečtete obsah šťavelanu vápenatého. Současně porovnáte (stupnice „*Calcium*“) % Ca. Pokud se odečtená hodnota shoduje s vaším předchozím měřením, je přítomen pouze šťavelan vápenatý. Pokud bylo nalezeno vápníku více, pak je přítomen rovněž fosforečnan vápenatý. Vypočítáte rozdíl mezi celkovým vápníkem a vápníkem vázaným ve šťavelanu, toto číslo nastavíte na stupnici „*Calcium*“ a na modré stupnici „*Apatit*“ odečtete % přítomného hydroxyapatitu /Ca₁₀(OH)₂(PO₄)₆/.

Např.: Bylo nalezeno: 34% vápníku
30% šťavelanu

Z pravítka bylo odečteno: 50% šťavelanu vápenatého (stupnice „*Calciumoxalat*“), což odpovídá 14% vápníku (stupnice „*Calcium*“). Rozdíl v obsahu vápníku je: 34 – 14 = 20%. Toto číslo se nastaví na stupnici „*Calcium*“ a dole na modré stupnici „*Apatit*“ se odečte obsah fosforečnanu vápenatého ve formě hydroxyapatitu (50%).

Močový kámen obsahuje asi 50% šťavelanu a asi 50% fosforečnanu vápenatého ve formě hydroxyapatitu.. (Whewellit a weddelit se při tomto stanovení nerozlišují, je to klinicky bezvýznamné. Rovněž přítomnost karbonátapatitu Ca₁₀(CO₃)PO₄ a brushitu CaHPO₄ · 2 H₂O se nezohledňuje.)

3. Stanovení iontů amonných

Semikvantitativní stanovení je založeno na známé reakci s Nesslerovým činidlem (jodortuřnatan rtuťnatý Hg[HgI₄]), které je specifickým činidlem pro ionty NH₄⁺. Reagují i velmi zředěné roztoky. Při malých koncentracích se objeví žluté až oranžové zbarvení, při velkých koncentracích vzniká až hnědá sraženina.

- Do zkušební nádobky dáte 5 ml vzorku, přidáte 3 kapky Nesslerova činidla a 3 kapky roztoku NaOH. Jsou-li přítomny ionty NH₄⁺, vyvine se žluté zbarvení, které porovnáte s přiloženou barevnou škálou („*Ammonium*“) a odečtete obsah v %.

4. Stanovení fosforečnanů

Při tomto stanovení se využívá reakce fosforečnanů s molybdenany. Vzniklé fosfomolybdenany lze poměrně snadno zredukovat na tzv. *molybdenovou modř*, v níž se předpokládá Mo^V.

- K 5 ml vzorku ve zkušební nádobce přidáte postupně 5 kapek roztoku heptamolybdenanu amonného / (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O/ a pak 5 kapek redukčního činidla.
- Necháte 5 minut stát. Jsou-li přítomny fosforečnany, vyvine se modré zbarvení, jehož intenzitu porovnáte s referenční škálou („*Phosphat*“).

5. Stanovení hořčíku

Hořčík dává v pufrovaném prostředí (pH = 10,24) s činidlem (xylydylová modř) červeně zbarvený komplex.

- Do zkušební nádobky odpipetujete **1 ml vzorku** a doplníte po značku vodou. Přidáte 10 kapek boritanového pufru a 10 kapek činidla. V přítomnosti hořčíku se vyvine červené zbarvení. Jeho intenzitu porovnáte se škálou („*Magnesium*“) a odečtete přibližný obsah hořčíku (%).

- Obsah hořčíku (%) nastavíte na pravítku na škálu „*Magnesium*“ a na stupnici „*Struvit*“ odečtete % obsah $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Současně na stupnici „*Ammonium*“ zkontrolujete obsah solí amonných. Souhlasí-li odečtené číslo s vaším nálezem (úloha 3), jsou přítomny ionty NH_4^+ pouze ve fosforečnanu, bylo-li jich nalezeno více, je přítomen i urát amonný. Vypočítá se rozdíl, nastaví na stupnici „*Ammonium*“ a dole na modré stupnici „*Ammoniumurat*“ se odečte % obsah urátu amonného.

Např.: Bylo nalezeno: 7% hořčíku

8% iontů amonných

Ze stupnice „*Struvit*“ bylo odečteno 70% $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a ze stupnice „*Ammonium*“ 5% NH_4^+ . Rozdíl činí: $8 - 5 = 3\%$ NH_4^+ . Na stupnici „*Ammoniumurat*“ se odečte 30% urátu amonného.

Močový konkrement obsahuje asi 70% $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a asi 30% urátu amonného.

6. Stanovení kyseliny močové

Stanovení je založeno na stejném principu jako u fosforečnanů s tím rozdílem, že redukčním činidlem je samotná kyselina močová nebo uráty. Hodnotí se intenzita zbarvení molybdenové modři.

- Ke vzorku ve zkušební nádobce (5 ml) se přidají 3 kapky roztoku kyseliny fosfomolybdenové, směs se promíchá a nechá 2 minuty stát. Pak se přidají 2 kapky boritanového pufru (pH = 10) a ihned (nejpozději do 10 sekund) se hodnotí na škále „*Harnsäure*“ modré zbarvení. Jeho intenzita se časem zmenšuje.
- Pokud nebyly prokázány ionty amonné, je tato hodnota definitivní. Jsou-li přítomny ionty NH_4^+ , pak porovnáte na pravítku měřítka „*Ammonium*“ a „*Harnsäure*“. Souhlasí-li oba údaje, pak je přítomen jen urát amonný, je-li nalezená hodnota kyseliny močové vyšší, pak se zbývající volná kyselina močová vypočítá z rozdílu.

Např.: Bylo nalezeno: 3,5% iontů amonných (v urátu)

60% kyseliny močové

Odečteno 33% kyseliny močové (na stupnici „*Harnsäure*“), tj. spotřeba na tvorbu urátu. Rozdíl: $60 - 33 = 27\%$ volné kyseliny močové

Močový kámen obsahuje celkem 60% kyseliny močové, z toho je 27% volné kyseliny, 33% je vázáno v urátu amonném.

7. Stanovení cystinu

Cystin se siřičitanem sodným zredukuje na cystein, který dává v alkalickém prostředí s nitroprusidem sodným ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) červené zbarvení.

- Do zkušební nádoby dáte 5 ml vzorku, přidáte 10 kapek 10% roztoku amoniaku a 1 plnou dávkovací lžičku siřičitanu sodného. Mícháte až do úplného rozpuštění. Vyčkáte 1 minutu, přidáte 1 černou dávkovací lžičku nitroprusidu a znovu mícháte do rozpuštění. Je-li přítomen cystin, vyvine se červené zbarvení. Hodnotí se za 30 sekund srovnáním s barevnou škálou „*Cystin*“.

Použité roztoky a činidla:**Stanovení vápníku:**

1. NaOH (27% roztok)
2. Indikátor (pevná směs 4,2 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 70 mg MgCl_2 a 7 mg kyseliny kalkonkarboxylové /kys. 2-hydroxy-1-1-(2'-hydroxy-4-sulfo-1-naftylazo)-3-naftoová/)
3. Chelaton 3 (c = 12 mmol/l)

Stanovení šťavelanů:

1. Boritanový pufr (pH = 10, c = 3,1 mol/l)
76,28 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ a 6 g NaOH rozpustit na 100 ml roztoku
2. FeCl_3 (c = 18 mmol/l)
3. Kyselina sulfosalicylová (c = 0,08 mol/l) + Orange G (c = 0,365 mmol/l)

Stanovení iontů amonných:

1. Nesslerovo činidlo (45,5 g HgI_2 a 34,9 g KI se rozpustí ve 100 ml vody. V jiné nádobě se rozpustí 112 g KOH v 500 ml vody. Oba roztoky se smíchají a doplní vodou na 1 000 ml. Činidlo se nechá 2 až 3 dny stát, pak se zfiltruje. Přechovává se při 4°C.)
2. NaOH (27% roztok)

Stanovení fosforečnanů:

1. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (c = 0,04 mol/l v 8% H_2SO_4)
2. Redukční roztok:
kyselina citronová (10 mmol), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (50 mmol), 4-(methylamino)-fenylsulfát (5,5 mmol), Orange G (33 mmol) ve 100 ml roztoku

Stanovení hořčíku:

1. Boritanový pufr (pH = 10,24, c = 0,145 mol/l)
5,33 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ a 60 mg NaOH rozpustit na 100 ml roztoku
2. Činidlo /xylyldylová modř pro důkaz Mg^{2+} / (c = 2 mmol/l)

Stanovení kyseliny močové:

1. Boritanový pufr (pH = 10, c = 3,1 mol/l) - viz stanovení šťavelanů
2. Kyselina fosfomolybdenová (c = 0,09 mol/l)

Stanovení cystinu:

1. Amoniak (10% roztok)
2. Redukční činidlo (pevná směs 8,8 g Na_2SO_3 a 41,0 g NaCl)
3. Nitroprusid sodný (pevná směs 0,4 g $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ a 51,0 g NaCl)

Vzorek močového konkrementu (v roztoku) - imitace

Stanovení iontů v séru

Život organismu je závislý na prostředí obsahujícím vodu a minerály. Pro buňky je charakteristické, že obsah elektrolytů uvnitř buněk se podstatně liší od prostředí, které je obklopuje. Tato nerovnováha je udržována iontovými pumpami.

Hospodaření s elektrolyty a vodou je propojeno rozmanitými vztahy: pohyb iontů je často doprovázen pohybem vody, ztráta vody je spojena se ztrátou solí apod. Proto je třeba oba problémy posuzovat společně. Na regulaci hospodaření s vodou a minerály se podílejí především ledviny.

Rozhodující význam má hospodaření s chloridem sodným. Skutečná denní spotřeba je menší než 1 g/den, takže příjmová a výdejová bilance je prakticky vyrovnaná. Vylučování probíhá převážně ledvinami (pokud nedochází k mimořádným ztrátám při nadměrném pocení, průjmovém onemocnění apod.). Poruchy jsou spojeny se zvýšenou nebo naopak nedostatečnou funkcí endokrinních žláz (neurohypofyza, kůra nadledvin), souvisí s poruchami hospodaření s vodou a mohou nastat i při přetížení regulačních mechanismů.

Pro stanovení iontů sodných v séru se používají optické metody (plamenová fotometrie nebo atomová absorpční spektrometrie). Obě tyto metody jsou náročné jak na přístrojové vybavení, tak na jejich obsluhu a nelze je do praktických cvičení zařadit. Stanovení **chloridů** lze provést titračně (merkurimetrie), fotometricky nebo s použitím iontově selektivní elektrody. Z dalších iontů bylo do praktického cvičení zařazeno stanovení **vápníku** a to spektrofotometricky a titračně (chelatometrie). Se stanovením všech iontů (tzv. iontogramu) budou studenti seznámeni později v průběhu cvičení z klinické biochemie.

4. úloha:

Stanovení chloridů v séru merkurimetrickou titrací

Merkurimetrii řadíme ke komplexním titracím. Vzorek (jako ligand) tvoří s titračním roztokem (jako centrální iont) rozpustný, ale nedisociovaný komplex obecného složení $[HgX_2]$. Jako odměrné činidlo se používá roztok $Hg(NO_3)_2$, indikátorem je roztok difenylkarbazonu v chloridu uhličitém. Konec titrace indikuje světle fialové zbarvení. Při titraci je třeba zajistit intenzivní míchání, aby došlo k rozptýlení indikátoru na drobné kapénky a tím se zvětšila styčná plocha mezi indikátorem a titračním roztokem.

Provedení:

- Připravíte si tři titrační baňky, do nichž odpipetujete jednotlivé roztoky v pořadí a množství uvedeném v tabulce. Na přesnosti velmi záleží, ve všech případech proto použijte mechanické dávkovací pipety (automatické pipety).

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Sérum (ml)	0,2	-	-
Standardní roztok (ml)	-	0,2	-
Destilovaná voda (ml)	2,0	2,0	2,2
Indikátor (ml)	0,3	0,3	0,3
HNO ₃	-	-	1 kapka

- Do titrační baňky se vloží míchací tělíčko, roztok se na míchačce promíchá a pak za stálého míchání titruje roztokem $Hg(NO_3)_2$ do světle fialového zbarvení. Od nalezených spotřeb pro vzorek (sp_v) a standard (sp_{st}) se odečte spotřeba pro porovnávací (slepý) pokus (sp_0). Koncentrace chloridů v séru se vypočítá podle vztahu:

$$c_{Cl^-} = \frac{sp_v - sp_0}{sp_{st} - sp_0} \cdot c_{st} \quad [mmol/l],$$

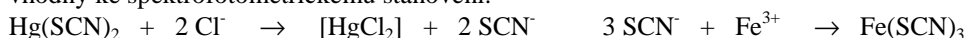
kde c_{st} je koncentrace standardního roztoku v mmol/l.

Použité roztoky a činidla:

1. Titrační roztok $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 5 \text{ mmol/l}$)
2. Indikátor (směs difenylkarbazonu a Na_2SO_4 rozpuštěná v CCl_4 a ethanolu)
3. Standardní roztok NaCl ($c = 100 \text{ mmol/l}$)
4. Kyselina dusičná (20% roztok)
5. Vzorky séra

5. úloha:**Spektrofotometrické stanovení chloridů v séru (BIO-LA-test)****Provedení:**

Činidlo obsahuje $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$. Chloridové anionty reagují s $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ za vzniku bezbarvého nedisociovaného komplexu $[\text{HgCl}_2]$ a uvolněné ionty SCN^- poskytují s ionty Fe^{3+} červený komplex vhodný ke spektrofotometrickému stanovení.



- Připravíte si tři zkumavky a podle tabulky do nich pečlivě odpipetujete uvedené roztoky.

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Sérum (ml)	0,020	-	-
Standardní roztok (ml)	-	0,020	-
Destilovaná voda (ml)	-	-	0,020
Činidlo (ml)	3,000	3,000	3,000
Promíchá se a po 10 minutách se měří absorbance			

- Změříte absorbanci vzorku (A_v) a standardního roztoku (A_{st}) proti porovnávacímu roztoku při 450 nm.

Fotometrické měření:

- Použijete fotometr Spekol 11. Přístroj se uvede do chodu stisknutím tlačítka hlavního vypínače a stiskem tlačítka „E“. Mikrometrickým šroubem nastavíte vlnovou délku 450 nm a zkontrolujete přepnutí fotodetektoru na modrou oblast.
- Jednu kyvetu naplníte porovnávacím roztokem, druhou roztokem vzorku. Roztok nesmí sahat až úplně po okraj kyvety! Kyvety se vkládají do držáku suché! K osušení použijete kousky buničité vaty.
- Zařadíte porovnávací roztok, stisknete tlačítko „R“ a vyčkáte, až se na ukazateli objeví hodnota „0,000“. Pak zařadíte kyvetu se vzorkem a odečtete absorbanci (A_v). Stejným způsobem změříte absorbanci standardu (A_{st}).
- Koncentraci chloridů v séru vypočítáte podle uvedeného vztahu a porovnáte s normální hodnotou.

$$c_{\text{Cl}^-} = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st} \quad [\text{mmol/l}],$$

kde c_{st} je koncentrace standardu v mmol/l.

Normální hodnoty: 97 - 108 mmol/l

Použité roztoky a činidla:

1. BIO-LA-test LACHEMA – Chloridy fotometricky T
2. Vzorky séra

6. úloha:

Stanovení vápníku v séru chelatometrickou titrací

Vápník se nachází v séru v koncentraci 2,1 až 2,6 mmol/l, z toho asi polovina je difuzibilní ionizovaný vápník (Ca^{2+}), zbytek je vázán na sérový albumin (nedifuzibilní vápník) a v různých solích (difuzibilní ionizovatelný vápník). Velikost ionizovaného podílu závisí na pH. Při snížení pH (acidosa) se zvyšuje stupeň ionizace, naopak při zvýšení pH (alkalosa) se ionizace potlačuje. Hodnotu nedifuzibilního vápníku ovlivňuje hladina plasmatických bílkovin. Při velkých ztrátách proteinů (např. při poruše glomerulární fitrace) klesá i hladina celkového vápníku. Ke zvýšení naopak dochází u myelomu (zhoubné nádorové bujení plasmatických buněk kostní dřeně) a také při předávkování vitaminem D.

Pro stanovení celkového vápníku lze využít několika metod. Často se provádí spektrofotometrické stanovení, které je vzhledem ke komerčně dodávaným setům při běžném vybavení laboratoře snadno proveditelné. Jednoduše lze stanovit vápník také chelatometrickou titrací nebo iontově selektivní elektrodou. Nejspolehlivější výsledky dává atomová absorpční spektrometrie, která však vyžaduje poměrně náročné přístrojové vybavení, přesahující možnosti vybavení praktických cvičení.

Chelatometrie patří do skupiny komplexotvorných titrací podobně jako merkurimetrie. Na rozdíl od ní je však v tomto případě titrační roztok donorem ligandu, centrálním atomem jsou kationty kovů s iontovým nábojem 2+, 3+ nebo 4+. Odměrným činidlem je roztok sodné soli kyseliny ethylendiaminotetraoctové (Chelaton 3), který tvoří s vápenatými ionty pevný, nedisociovaný, ale ve vodě rozpustný komplex obecného složení $[\text{CaY}^{2-}]$.

Titraci provedete v silně alkalickém prostředí (pH = 12 až 13) na směsný indikátor (fluorexon, thymolftalexon, murexid) paralelně se standardem a porovnávacím (slepým) roztokem. Indikátor se přidává jako pevná látka (směs s KNO_3) ve vhodném množství.

Provedení:

- Připravíte si tři označené titrační baňky, do nichž pečlivě pomocí automatických pipet odměříte roztoky v pořadí uvedeném v tabulce.

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Vzorek (ml)	1,0	-	-
Standard (ml)	-	1,0	-
Redestilovaná voda (ml)	-	-	1,0
NaOH (ml)	2,0	2,0	2,0

- Přidáte indikátor v takovém množství, aby vzniklo světle zelené zbarvení (pozor na předávkování, u sytě zbarvených roztoků se hůře indikuje ekvivalentní bod).
- Titrujete *po kapkách* na elektromagnetické míchačce do fialově růžového zbarvení.
- Každou titraci provedete dvakrát. Průměrné spotřeby pro vzorek (sp_v), standard (sp_{st}) a porovnávací roztok (sp_0) dosadíte do níže uvedeného vztahu a vypočítáte koncentraci $c(\text{Ca})$ v mmol/l.

$$c_{\text{Ca}} = \frac{sp_v - sp_0}{sp_{st} - sp_0} \cdot c_{st} \quad [\text{mmol/l}],$$

kde c_{st} je koncentrace standardního roztoku v mmol/l.

Použité roztoky a činidla:

Všechny roztoky nutno připravit z redestilované vody a přechovávat v nádobách z plastu.

1. Zásobní roztok chelatonu 3 ($c = 10$ mmol/l, tj. 3,722 g/l)
2. Titrační roztok chelatonu 3 ($c = 1$ mmol/l) – zásobní roztok (roztok 1.) zředit 10x
3. Standardní roztok ($c = 2,5$ mmol Ca/l) připraví se rozpuštěním 250 mg CaCO_3 v 50 ml HCl ($c = 1$ mol/l) a doplněním redestilovanou vodou na 1 l roztoku

4. NaOH (c = 0,05 mol/l)
5. Indikátorová směs (0,3 g fluorexonu, 0,6 g thymolftalexonu a 0,1 g murexidu se dobře rozetře s 50 g KNO₃)
6. Vzorky

7. úloha:

Spektrofotometrické stanovení vápníku v séru (BIO-LA-test)

Provedení:

o-Kresolftaleinkomplexon vytváří s vápenatými ionty v alkalickém prostředí fialově zbarvený komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

- Připravíte si tři suché (!) plastové zkumavky. (Je třeba vyloučit vyluhování vápníku z nedokonale čistého skla, což by při malých koncentracích vápníku v séru mohlo zatížit výsledek značnou chybou.) Do zkumavek podle tabulky pečlivě odpipetujete uvedené roztoky.

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Sérum (ml)	0,020	-	-
Standardní roztok (ml)	-	0,020	-
Destilovaná voda (ml)	-	-	0,020
Činidlo (ml)	1,500	1,500	1,500
Promíchá se a po 5 minutách se měří absorbance			

- Změříte absorbanci vzorku (A_v) a standardního roztoku (A_{st}) proti porovnávacímu roztoku při 578 nm.

Fotometrické měření:

- Použijete fotometr Spekol 11. Přístroj se uvede do chodu stisknutím tlačítka hlavního vypínače a stiskem tlačítka „E“. Mikrometrickým šroubem nastavíte vlnovou délku 578 nm a zkontrolujete přepnutí fotodetektoru na modrou oblast.
- Jednu kyvetu naplníte porovnávacím roztokem, druhou roztokem vzorku. Roztok nesmí sahat až úplně po okraj kyvety! Kyvety se vkládají do držáku suché! K osušení použijete kousky buničité vaty.
- Zařadíte porovnávací roztok, stisknete tlačítko „R“ a vyčkáte, až se na ukazateli objeví hodnota „0,000“. Pak zařadíte kyvetu se vzorkem a odečtete absorbanci (A_v). Stejným způsobem změříte absorbanci standardu (A_{st}).
- Koncentraci celkového vápníku v séru vypočítáte podle uvedeného vztahu a porovnáte s normální hodnotou.

$$c_{Ca} = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st} \quad [\text{mmol/l}],$$

kde c_{st} je koncentrace standardu v mmol/l.

Normální hodnoty: 2,1 - 2,6 mmol/l

Použité roztoky a činidla:

1. BIO-LA-test LACHEMA - Vápník KX (Ca 100 KX)
2. Vzorky séra

Spektrofotometrické stanovení hořčíku v séru (BIO-LA-test)**Provedení:**

Magon (1-(2-hydroxyazo)-2-naftol-3-(2,4-dimethyl)-karboxyanilid) vytváří s hořečnatými ionty v alkalickém prostředí červeně zbarvený komplex vhodný k fotometrickému stanovení. Červené zbarvení komplexu hořčíku s magonem však není vizuálně postřehnutelné, neboť je překryto modrým zbarvením magonu.

- Připravíte si tři suché (!) plastové zkušavky. (Je třeba vyloučit vyluhování iontů z nedokonale čistého skla, což by při malých koncentracích hořčíku v séru mohlo zatížit výsledek značnou chybou.) Do zkušavek podle tabulky pečlivě odpipetujete uvedené roztoky.

	1	2	3
	Vzorek	Standard	Porovnávací roztok
Sérum (ml)	0,015	-	-
Standardní roztok (ml)	-	0,015	-
Destilovaná voda (ml)	-	-	0,015
Činidlo (ml)	1,500	1,500	1,500
Promíchá se a po 15 minutách se měří absorbance			

- Změříte absorbanci vzorku (A_v) a standardního roztoku (A_{st}) proti porovnávacímu roztoku při 505 nm.

Fotometrické měření:

- Použijete fotometr Spekol 11. Přístroj se uvede do chodu stisknutím tlačítka hlavního vypínače a stiskem tlačítka „E“. Mikrometrickým šroubem nastavíte vlnovou délku 505 nm a zkontrolujete přepnutí fotodetektoru na modrou oblast.
- Jednu kyvetu naplníte porovnávacím roztokem, druhou roztokem vzorku. Roztok nesmí sahat až úplně po okraj kyvety! Kyvety se vkládají do držáku suché! K osušení použijete kousky buničité vaty.
- Zařadíte porovnávací roztok, stisknete tlačítko „R“ a vyčkáte, až se na ukazateli objeví hodnota „0,000“. Pak zařadíte kyvetu se vzorkem a odečtete absorbanci (A_v). Stejným způsobem změříte absorbanci standardu (A_{st}).
- Koncentraci hořčíku v séru vypočítáte podle vztahu:

$$c_{Mg} = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st} \quad [\text{mmol/l}],$$

kde c_{st} je koncentrace standardu v mmol/l.

- Porovnáte výsledky spektrofotometrického stanovení s normálními hodnotami.

Normální hodnoty: 0,70 - 1,07 mmol/l

Použité roztoky a činidla:

1. BIO-LA-test LACHEMA - Hořčík (Mg 208)
2. Vzorky séra

Dělicí metody

Získání chemicky stejnorodé látky je prvním předpokladem úspěšného studia jejich vlastností. Zejména pro tyto účely byla vypracována řada dělicích metod, z nichž v chemii přírodních látek našly největší uplatnění metody chromatografické, elektroforetické a v některých případech i dialýza. Velký význam mají tyto metody i pro frakcionaci směsí látek podobného chování (např. elektroforetické dělení plasmatických bílkovin, dělení rostlinných pigmentů chromatografií na tenké vrstvě), dále se používají k purifikaci biologických materiálů (např. při izolaci albuminu, enzymů, nukleových kyselin), k identifikaci látek (např. elektroforetické určení typu haptoglobinu, chromatografický průkaz léků v moči), při kontrole čistoty látek (např. při analýze drog) aj.

Chromatografie

Chromatografie je dělicí metoda, při níž se distribuují složky mezi fází nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). **Stacionární fázi** může být pevná látka nebo kapalina, **mobilní fázi** kapalina nebo plyn. Látka se rozdělí mezi obě fáze ve smyslu své **distribuční konstanty** K_D , která udává poměr množství látky přítomné ve složce stacionární ($[A]_s$) a mobilní ($[A]_m$).

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

Složka, jejíž distribuční konstanta je velká, se bude vyskytovat převážně ve fázi stacionární a bude se pohybovat pomaleji než látka, jejíž konstanta je malá a jež se vyskytuje převážně ve fázi mobilní.

Rozdělení chromatografických metod podle principu dělení:

1. Rozdělovací chromatografie

Stacionární fázi je kapalina (zakotvená na vhodném nosiči), která se nemísí s kapalinou mobilní fáze. K dělení dochází, mají-li látky rozdílné rozdělovací konstanty. Využívá se hlavně v papírové chromatografii.

2. Adsorpční chromatografie

Stacionární fázi je pevná látka s adsorpčními vlastnostmi, mobilní fázi je kapalina nebo plyn. Směsi se dělí na základě rozdílné adsorpční afinity stacionární fáze k molekulám rozpuštěných látek.

3. Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fázi je látka specifických vlastností (iontoměnič), mobilní fázi je kapalina. Mezi tyto fáze se dělí látky iontové povahy a to působením elektrostatických sil mezi ionty rozpuštěnými v mobilní fázi a disociovanými funkčními skupinami iontoměniče.

4. Gelová chromatografie („molekulová síta“)

Stacionární fázi je polymerní gel pravidelného prostorového uspořádání, mobilní fázi je kapalina. Složky se dělí na základě rozdílné velikosti molekul. Látky, jejichž molekuly jsou větší než průměr pórů v gelu, nemohou do něj proniknout a postupují vpřed s mobilní fází. Menší molekuly pronikají do prostorových „ok“ a jejich pohyb se zpomaluje.

5. Afinity chromatografie

Stacionární fázi je polymerní gel, který má na svém povrchu kovalentně navázanou určitou látku (afinant) se schopností interakce se zkoumaným vzorkem. Afinant je vázán ke gelovému nosiči pomocí dlouhého můstku (spacer). Tím je odstraněna sterická překážka v uskutečnění vazby mezi afinantem a vzorkem. Mobilní fázi jsou většinou pufrů s různou iontovou silou.

Rozdělení chromatografických metod podle fází:

1. Plynová chromatografie

Dělení může probíhat v soustavě plyn - kapalina nebo plyn - pevná látka. V prvním případě jde o chromatografii rozdělovací, v druhém o chromatografii adsorpční.

2. Kapalinová chromatografie

Dělení směsi může probíhat v soustavě kapalina - kapalina (chromatografie rozdělovací) nebo v soustavě kapalina - pevná látka (chromatografie adsorpční, gelová nebo iontově výměnná).

Velkého pokroku v dělení složitých směsí se dosáhlo zavedením vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), u níž se používá pro pohyb mobilní fáze přetlakového zařízení. Tím se podstatně zlepšila kvalita dělení a současně zkrátila doba analýzy.

Rozdělení chromatografických metod podle způsobu provedení:

1. Sloupcová chromatografie (*chromatografie na koloně*)

Kolonou se nazývá trubice naplněná chromatograficky aktivním materiálem. Může být přímá, ve tvaru „U“ nebo spirálovitě stočená. Udává se poměr vnitřního průměru kolony a délky sloupce pevné fáze. U běžného uspořádání je tento poměr většinou 1/10 až 1/20. Zakotvení stacionární fáze na nosič se označuje jako **impregnace**. Pak následuje **nanesení vzorku** a **vyvíjení**. Rychlost toku mobilní fáze se obvykle udává v ml/min. Mobilní fáze vytékající z kolony se nazývá **eluát**.

2. Chromatografie v plošném uspořádání

Stacionární fázi představuje arch chromatografického papíru (papírová chromatografie) nebo tenká vrstva adsorbentu nanesená na pevné podložce (chromatografie na tenké vrstvě).

V současné literatuře z oboru chromatografie se často užívají zkratky odvozené z anglických názvů jednotlivých metod. V tabulce je uveden jejich přehled.

Zkratka	Anglický název metody	Druh chromatografické metody
GC	gas chromatography	plynová chromatografie
LC	liquid chromatography	kapalinová chromatografie
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PC	paper chromatography	papírová chromatografie
TLC	thin layer chromatography	chromatografie na tenké vrstvě
GPC	gel permeation chromatography	gelová chromatografie
IEC	ion exchange chromatography	iontově výměnná chromatografie

Vyhodnocení chromatografických metod:

a) Sloupcová chromatografie

V průběhu eluce se postupně sbírají frakce a to buď pomocí časového spínače ve stejných časových intervalech nebo se vhodným zařízením odebírají frakce stejného objemu. Vyhodnocují se nejčastěji fotometricky. Grafickým znázorněním průběhu eluce je tzv. **eluční křivka**. Na osu *x* se nanáší eluční čas nebo eluční objem, na osu *y* naměřená absorbance. Eluce izolované složky má tvar křivky, která se svým rozložením podobá *Gaussově křivce*. Její výška charakterizuje množství látky, její poloha (eluční čas nebo objem odpovídající poloze maxima) může sloužit k její identifikaci. Porovnání se provádí pomocí známých standardů.

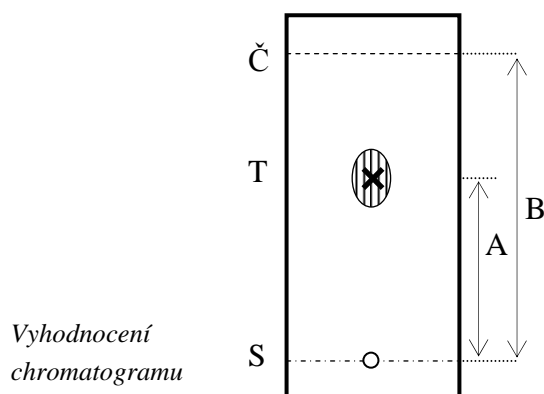
b) Chromatografie v plošném uspořádání

V tomto uspořádání se obvykle látky pouze identifikují. Kvantitativní vyhodnocení lze provést jen u dobře vyvinutých chromatogramů. Pracuje se vždy paralelně se standardy.

Látky se identifikují pomocí **retardačního faktoru (R_f)**. Místo, kam se nanáší vzorek, se označuje jako **start**, poloha mobilní fáze v okamžiku přerušení vyvíjení je **čelo**. Retardační faktor je **poměr vzdálenosti start - těžiště skvrny** vzorku (A) ku vzdálenosti **start - čelo** (B).

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

Hodnoty R_f se udávají v tabulkách, ale spolehlivější je srovnávat vzorek se standardy, které se nanášejí paralelně se zkoumanou látkou a vyhodnocují stejným způsobem.



Adsorpční chromatografie

8. úloha:

Dělení směsi barviv sloupcovou adsorpční chromatografií

Dělení budete provádět na sloupci oxidu hlinitého, který patří mezi hydrofilní adsorbenty. To znamená, že na svém povrchu poutá nejpevněji vodu. Proto je vhodné adsorbent před použitím vyžít. Barviva se po adsorpci postupně vytěsňují promýváním vhodně zvolenými rozpouštědly se stoupající polaritou. Začíná se rozpouštědlem nejméně polárním (benzin) a postupně se polarita zvyšuje, posledním může být až voda, která má polaritu nejvyšší. Látka nejméně polární je vázána na oxid hlinitý nejmenší silou a vytéká z kolony jako první. Za ní následují další složky seřazeny podle rostoucí polarity.

Provedení:

Příprava adsorbentu:

- V odměrném válci odměříte 5 ml oxidu hlinitého (pro chromatografii), přesypete na porcelánovou misku a za stálého míchání 10 minut žiháte. Začnete zahřívat malým plamenem, postupně intenzitu zvyšujete. Misku s vyžítým adsorbentem ihned přenesete do exsikátoru a necháte v něm vychladnout.

Příprava kolony:

- Do suché (!) skleněné trubice opatřené dole kohoutem (kolony) vsunete na dno malý kousek vaty a pak naplníte kolonu asi do poloviny benzinem. **Při práci s benzinem musí být předchozí žihání již ukončeno!**
- Vychladlý vyžítý Al_2O_3 vsypete po malých částech (nejlépe pomocí papírové násypky) do kolony s benzinem tak, aby se vytvořil souvislý sloupec bez trhlin. Při tom dbáte, aby se horní část kolony adsorbentem nepotřísnila, případně tyčinkou se smotkem vaty sklo očistíte.
- Po usazení adsorbentu vypustíte přebytečný benzin tak, aby nad sloupcem adsorbentu zůstala jen vrstva asi 0,5 cm vysoká.

Nanesení vzorku:

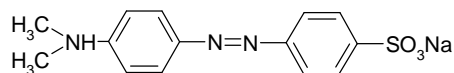
- Suchou (!) pipetou odměříte 0,4 ml směsi barviv. Pipetu zasunete do kolony a vzorek přenesete do benzinové vrstvy. Stěny kolony nesmí být vzorem potřísněny! Je-li to nutné, opět stěny otřete vatou.
- Pootevřením kohoutu necháte vzorek vsáknout. Na povrch kolony nanese 1 ml benzinu a opět necháte vsáknout. Dbáte na to, aby se horní vrstva adsorbentu nezvířila.

Eluce:

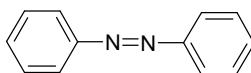
- Do kolony nanese (pipetou) malé množství (1 až 2 ml) 2% roztoku ethanolu v benzinu a pozorujete pohyb barevných látek na sloupci Al_2O_3 . Eluční roztok opatrně po malých dávkách doplňujete. Při tom nesmíte zvířit adsorbent na povrchu sloupce!
- Jakmile začne z kolony vytékat první barevná frakce, zachytíte ji do zkumavky.
- Zvýšíte eluční schopnost a začnete promývat ethanolom. Sledujete dál pohyb barviv a zachytíte další frakci.
- Opět zvýšíte eluční schopnost, třetí frakci vytěsните destilovanou vodou a zachytíte do zkumavky.
- Eluát z odpadní baňky slijete do určené nádoby. **Nevylévat do výlevky!**

Vyhodnocení:

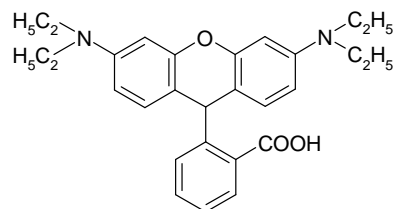
Směs barviv obsahuje 0,1% roztoky methylové oranži (oranžová), azobenzenu (žlutá) a rhodaminu B (červená) v benzínu. Do protokolu přiložíte proužek filtračního papíru se vzorky izolovaných barviv. Jejich pořadí porovnáte s polaritou sloučenin (napíšete vzorce).



methylová oranž



azobenzen



rhodamin B

Použité roztoky a činidla:

1. Al₂O₃ (pro chromatografii)
2. Benzin
3. 2% roztok ethanolu v benzínu
4. Ethanol
5. Směs barviv:
 - 0,1 g azobenzenu (rozpustit v benzínu)
 - 0,1 g methylové oranži (rozpustit v 50% ethanolu)
 - 0,1 g rhodaminu B (rozpustit ve směsi ethanol/benzín)roztoky spojit a doplnit benzinem do 100 ml

9. úloha:

Dělení rostlinných pigmentů chromatografií na tenké vrstvě

Adsorbentem je oxid křemičitý fixovaný pomocí škrobového pojidla na hliníkovou desku (*Silufol*, vyrábí *Sklárny Kavalier*). Vzorek se nanáší na start v podobě tenké čárky asi 1,5 cm dlouhé. Pak se deska umístí do dobře těsnící komory a ponoří dolním okrajem do rozpouštědla. Start se nesmí dostat pod hladinu! Chromatogram se vyjme, dojde-li čelo asi 1 cm pod horní okraj desky.

Provedení:

Příprava vzorku:

- Přinesete si rostlinný materiál (list, stonek) ze dvou druhů zelených rostlin. Vhodné jsou např. jehličnany a listnaté dřeviny. Rostlinný orgán nejprve rozstříháte na drobné kousky a potom v třecí misce v přítomnosti skleněných střípků (úlomky kapilár) jemně rozetřete. Nakonec roztíráte s malým množstvím acetonu (1 až 2 ml), abyste získali koncentrovaný extrakt.

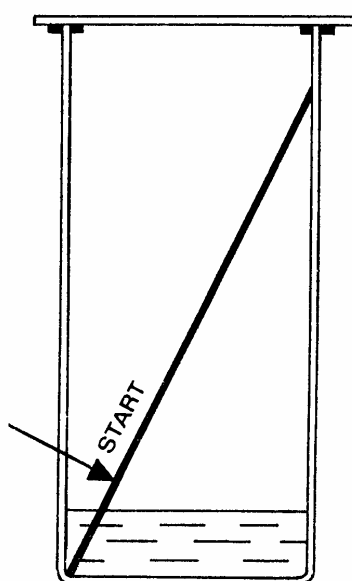
Nanesení vzorku:

- Na kratší straně silufolové desky asi 2 cm od dolního okraje naznačíte lehce tužkou start. Pozor, abyste přitom neporušili tenkou vrstvu oxidu křemičitého!
- Na start naneste skleněnou kapilárou acetonový extrakt první rostliny jako tenkou čárku 1,5 cm dlouhou. Po zaschnutí se nanášení 4 – 5 x zopakujte, aby se dosáhlo dostatečné sytosti. Přitom dbáte, aby skvrna byla co nejužší.

- Stejným způsobem připravíte acetonový extrakt i z druhé rostliny a nanese na start ve vzdálenosti asi 2 cm vedle prvního vzorku.

Vyvíjení:

- Do komory nalijete vyvíjecí směs (benzin – petrolether - aceton /4:1:2/) tak, aby dosahovala výšky asi 1 cm. Komoru uzavřete a necháte 20 minut sytit parami rozpouštědel.
- Vložíte chromatogram: silufolová destička je šikmo opřena o stěnu komory, dolní okraj je ponořen ve vyvíjecí směsi. Start nesmí být v žádném případě ponořen! Komoru pečlivě uzavřete.
- Vyvíjení ukončíte, dojde-li čelo asi 1 cm pod horní okraj desky.



Vyvíjecí komora



- Čelo**
8. žlutá frakce (beta-karoten)
 7. šedá frakce (feofylin a – rozkladný produkt chlorofylu)
 - 5.,6. tmavě zelená frakce (chlorofyl a)
 4. žlutozelená frakce (chlorofyl b)
 3. žlutá frakce (lutein)
 2. žlutá frakce (violaxantin)
 1. žlutá frakce (neoxantin)
- Start**

Chromatogram

Vyhodnocení:

Desku necháte v digestoři uschnout. Skvrny pigmentů jsou dobře patrné, ale musí se vyhodnotit ihned, neboť intenzita i zbarvení se rychle mění. Polohu skvrn zvýrazněte tužkou.

Použité roztoky a činidla:

1. Aceton
2. Vyvíjecí soustava (benzin – petrolether - aceton /4:1:2/)

Papírová chromatografie

Dělení probíhá na chromatografickém papíře, který je nosičem stacionární fáze, tj. vody, která je v množství asi 5% trvale vázaná na celulosu. Mobilní fáze jsou různá organická rozpouštědla nebo jejich směsi s určitým podílem vody, aby nedocházelo k vymývání stacionární fáze z nosiče.

Podle směru pohybu mobilní fáze se papírová chromatografie dělí na:

vzestupnou (rozpuštědlo se pohybuje směrem zdola nahoru)

sestupnou (rozpuštědlo postupuje shora dolů)

kruhovou (rozpuštědlo se rozšiřuje radiálně od středu papíru)

dvojrozměrnou (dělení se provede nejprve v jednom směru a potom s jinou vyvíjecí soustavou ve směru kolmém)

Vzorky se nanášejí na start kapilární mikropipetou v objemu 2 až 10 μl . 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.

10. úloha:

Vzestupná papírová chromatografie aminokyselin

Příprava chromatogramu:

- Na pracovním stole máte připraveny chromatografické papíry (*Whatman 1*) o rozměrech 17,5 x 36 cm. Ve vzdálenosti 2,5 cm od spodního (kratšího) okraje narýsujete start, na němž ve stejných vzdálenostech vyznačíte šest bodů a popíšete čísla 1 až 6. Používejte výhradně obyčejnou měkkou tužku.
- Na body 1, 2, 3 a 4 naneste standardy (jsou připraveny ve stojánku), na bod 5 jejich směs. Na bod 6 naneste vzorek neznámé aminokyseliny. K nanášení použijete *Pasteurovy* pipety. Nanášíte asi 5 μl (tj. asi 3 až 4 cm v kapiláře) po malých dávkách tak, aby průměr skvrny nepřesáhl 0,5 cm. Po nanesení první kapky skvrnu vysušíte pod infralampou a postup stále opakujete, dokud nenanese celou potřebnou objem. Nanášení je práce dosti zdlouhavá, ale na její kvalitě záleží do značné míry i dobrý výsledek dělení.
- Připravený chromatogram stočíte do válce (nanesené vzorky jsou na vnější straně) a obě delší strany k sobě volně sešijete tak, aby se hrany papíru navzájem nedotýkaly. Chromatogram označíte svým jménem.

Vyvíjení a detekce: (pracujete v digestoři)

- Na dno chromatografické komory umístíte *Petriho* misku s vyvíjecí směsí (*n*-butanol - kyselina octová - voda /4:1:1/), do ní vložíte chromatogram a dobře uzavřete. Vyvíjení trvá asi 18 hodin.
- Příští den si chromatogram vyzvednete (případně požádáte o spolupráci laborantku) a suchý papír v digestoři nastříkáte detekčním činidlem (roztok ninhydrinu v acetonu). Pozor na potřísnění rukou! Pracujte v ochranných rukavicích! Pak se chromatogram pod infralampou nebo v sušárně zahřeje na 80°C. Objeví se modrofialové skvrny aminokyselin.

Vyhodnocení:

Skvrny aminokyselin tužkou obtáhnete a určíte přibližné těžiště. Změříte potřebné vzdálenosti a vypočítáte hodnoty R_f pro standardy (nanesené jednotlivě i ve směsi) a pro vzorek. Porovnáním výsledků určíte neznámou aminokyselinu. Chromatogram přiložíte k protokolu, hodnoty R_f zapíšete do tabulky.

<i>Pozice</i>	Aminokyselina	R_f (jednotlivě)	R_f (ve směsi)
1	Lysin		
2	Glycin		
3	Alanin		
4	Isoleucin		
5	Směs aminokyselin 1 – 4	---	---
6	Vzorek		---

Použité roztoky a činidla:

1. Vyvíjecí soustava: *n*-butanol - kyselina octová - voda (4:1:1)
2. Detekční činidlo: ninhydrin (0,2 g ninhydrinu a 0,5 ml konc. kys. octové doplnit acetonem na 100 ml)
3. Standardní roztoky: lysin (0,2% roztok v 30% ethanolu)
glycin (0,2% roztok v 30% ethanolu)
alanin (0,2 roztok v 30% ethanolu)
isoleucin (0,2% roztok v 30% ethanolu)

11. úloha:

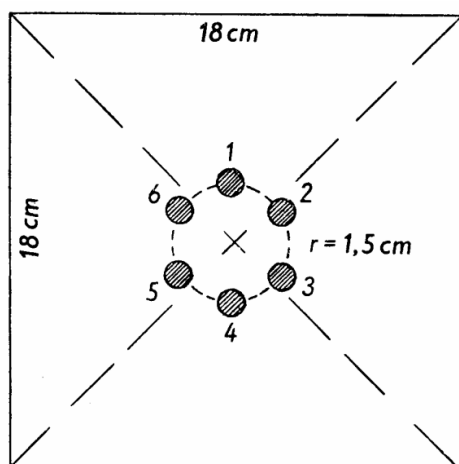
Radiální papírová chromatografie cukrů

Příprava chromatogramu:

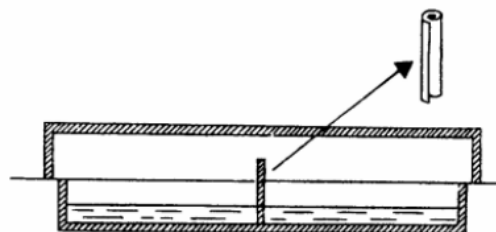
- Na čtvercovém chromatografickém papíře 18 x 18 cm zvolíte střed a kolem něho opíšete kružnici o poloměru 1,5 cm. Na kružnici označíte ve stejných vzdálenostech šest bodů, které očísľujete.
- Na body označené čísly 1 až 4 nanese standardy (jsou ve stojánku), na bod 5 nanese jejich směs, na bod 6 nanese vzorek neznámého cukru. K nanášení použijete *Pasteurovy* pipety. Dbáte na to, aby nedošlo k záměně jednotlivých vzorků. Na každý bod se postupně po malých dávkách nanese asi 5 μ l příslušného roztoku (tj. asi 3 až 4 cm v kapiláře). Mezi jednotlivými kapkami stále odpařujete rozpouštědlo, aby se vzorek zakoncentroval na malou plochu. Průměr skvrny by neměl přesáhnout 0,5 cm, rozhodně se však nesmí vzorky na kružnici dotýkat nebo dokonce překrývat. Na kvalitní a pečlivé práci při nanášení závisí i dobrý výsledek dělení.
- Do středu kruhu uděláte (např. hrotem tužky) malý otvor, jímž provléknete „*knot*“ (pevně stočený proužek chromatografického papíru).

Vyvíjení a detekce: (pracujte v digestoři)

- Do *Petriho* misky nalijete 20 ml vyvíjecí směsi (pyridin – butanol - voda 4:6:3) a vložíte chromatogram tak, aby knot zasahoval do vyvíjecí směsi. Lehce přiklopíte horní misku a pozorujete radiální postup rozpouštědla. Vyvíjení trvá asi 1 hodinu.



Chromatogram



Vyvíjecí komora

- Dojde-li čelo k okraji misky, vyvíjení ukončíte. Chromatogram vyjmete, odstraníte knot a **ihned**, pokud je ještě papír vlhký, tužkou označíte polohu čela. Pak necháte chromatogram v digestoři usušit.
- Suchý chromatogram stejnoměrně z vhodné vzdálenosti (doporučuje se zkusit předem) postříkáte čínidlem pro detekci cukrů (hydrogenftalan anilinu). Snažte se, aby celá plocha mezi startem a čelem byla rovnoměrně zvlhčena. Necháte uschnout a pak zahřejete asi na 80°C pod infralampou nebo v sušárně. Objeví se žluté, žlutohnědé a červenohnědé skvrny jednotlivých cukrů. Najdete jejich těžiště a změříte potřebné vzdálenosti pro výpočet R_f . Porovnáním výsledků určíte neznámý cukr. Chromatogram přiložíte k protokolu, hodnoty R_f zapíšete do tabulky.

Pozice	Cukr	R_f (jednotlivě)	R_f (ve směsi)
1	Glyceraldehyd		
2	Xylosa		
3	Glukosa		
4	Laktosa		
5	Směs cukrů 1 – 4	---	---
6	Vzorek		---

Použité roztoky a činidla:

- Vyvíjecí soustava: pyridin – butanol - voda (4:6:3)
- Detekční činidlo: hydrogenftalan anilinu
0,9 ml anilinu a 1,66 g kyseliny ftalové se rozpustí ve 100 ml butanolu nasyceného vodou (86 ml + 14 ml)
Činidlo není příliš stálé, musí se obnovovat.
- Standardní roztoky: glyceraldehyd (1% roztok)
xylosa (1% roztok)
glukosa (1% roztok)
laktosa (1% roztok)

Gelová chromatografie

Stacionární fázi u tohoto typu chromatografie tvoří polymer, jehož lineárně vázané molekuly jsou navzájem propojeny příčnými řetězci. Tím se vytvoří jakési „molekulové síto“ vhodné k separaci směsi s rozdílnou velikostí molekul. Malé molekuly pronikají do ok a zpožďují se proti větším molekulám, které procházejí kolem, neboť do ok nevniknou. V eluátu se proto objeví jako první.

Široké využití této metody umožnila výroba komerčních preparátů. V současné době je na trhu např. *Sephadex* (polysacharid dextranového typu), *Bio-Gel* (polyakrylamid), *Styragel* (modifikovaný polystyren), *Sepharosa* (agarosa) aj. Zavedení gelové chromatografie přineslo velký pokrok zejména v chemii přírodních látek.

Polymery pro gelovou chromatografii se dodávají ve formě granulí. Před plněním do kolon se rozmíchají ve vodě nebo v pufru a nechají nabobtnat. Směs látek se vytěsňuje elučním roztokem (roztok soli vhodné koncentrace), eluát se jímá v podobě frakcí. Detekce se provede vhodnou analytickou metodou, často se využívá fotometrie.

12. úloha:

Dělení barevné směsi gelovou chromatografií

Úkolem je oddělit vysokomolekulární dextranovou modř ($M = 2 \cdot 10^6$ g/mol) od nízkomolekulárního chromanu draselného ($M = 2 \cdot 10^2$ g/mol)

Provedení:

- Kolonu připravenou na pracovním stole (*Sephadex*) otevřete a kapalinu nad gelem necháte vytéci. Ponecháte jen malou vrstvu (asi 0,5 cm). Do ní pipetou nanese 0,5 ml barevné směsi (dextranová modř a chroman draselný), pootevřete kohout a směs necháte vsáknout. Barviva nesmí ulpět na stěně kolony. Bude-li to nutné, odstraníte jejich stopy tyčinkou se smotkem vaty.
- Kolonu začnete promývat elučním roztokem (0,9% NaCl), který přidáváte pomalu pipetou tak, aby se nezvířil povrch gelu. V okamžiku zahájení eluce začnete měřit **eluční čas**. Eluát jímáte do odpadní nádoby. Sledujete průběh dělení.
- V okamžiku, kdy se v eluátu objeví první barevná frakce, zaznamenáte čas (v sekundách), kdy začala vytékat tato frakce. Současně ji zachytíte do kalibrované zkumavky (**eluční objem frakce I**) a zaznamenáte čas ukončení eluce první frakce.
- Pokračujete v eluci. Stejným způsobem zaznamenáte začátek a konec eluce druhé frakce a zachytíte ji do druhé kalibrované zkumavky (**eluční objem frakce II**).
- Nakonec kolonu promyjete elučním roztokem a uzavřete. Nad gelem ponecháte dostatečnou vrstvu roztoku, aby nedošlo k jeho vyschnutí.

Vyhodnocení:

Na milimetrový papír sestrojíte eluční graf: na osu x nanese čas (v sekundách) a vyznačíte začátek a konec eluce frakce I a II. Na osu y nanese eluční objem (v ml) a pro obě frakce narýsujete *Gaussovu* křivku, která vyjadřuje průběh jejich eluce. Graf vyhodnotíte (vysvětlíte pořadí eluovaných barviv).

Použité roztoky a činidla:

1. *Sephadex G-25* (event. *G-50*)
2. NaCl (0,9% roztok)
3. Směs barviv (dextranová modř a chroman draselný)

Afinitní chromatografie

Tato moderní chromatografická metoda využívá jako nosiče polymery podobných vlastností, jaké mají gelová molekulová síta, např. Sepharosa (vyrábí švédská firma Pharmacia), Agarosa (Merck), Spheron (Lachema). Mají však na svém povrchu kovalentně navázanou určitou látku (**afinant**), která má schopnost interakce se zkoumaným vzorkem. Afinant může být vysokomolekulární i nízkomolekulární látka, která je vázána ke gelovému nosiči pomocí dlouhého můstku (**spacer**). Tím je odstraněna stérická překážka v uskutečnění vazby mezi afinantem a vzorkem, kterým mohou být různé biopolymery jako bílkoviny, enzymy, nukleové kyseliny aj.

Chromatografická kolona se naplní nosičem se zakotveným afinantem. Gel se nechá nabobtnat v pufru o vhodné iontové síle. Pak se nanese dělená směs a po jejím vsáknutí se zachytí vzorek na afinant. Kolona se potom promyje vhodným roztokem, kterým se odstraní nezachycené složky. Následuje eluce (uvolnění zachycené látky z afinantu) pomocí pufru s vyšší iontovou silou. Metoda se využívá např. ke studiu bílkovin, enzymů, apod. a v klinické biochemii např. ke stanovení glykovaného hemoglobinu a glykovaných proteinů.

13. úloha

Stanovení glykovaného hemoglobinu

Při dlouhodobé nebo trvale zvýšené hladině glukosy v krvi (hyperglykémii) dochází k neenzymové glykaci proteinů, při níž reaguje aldehydická skupina glukosy s volnou aminoskupinou peptidového řetězce (zejména u lysinového zbytku). Glykované proteiny mají odlišné vlastnosti, což se projevuje v jejich funkci. Často bývá takto pozměněn hemoglobin (glykovaný Hb má menší afinitu ke kyslíku) a jeho stanovení se provádí v souvislosti s vyšetřením diabetiků. Referenční hodnoty se udávají v rozmezí 4 až 6% celkového hemoglobinu, hodnoty nad 8% jsou velmi nepříznivé.

Ke stanovení glykovaného hemoglobinu je možno použít afinitní chromatografii. Nosič (agarosa) má jako afinant navázanou kyselinu aminofenylboritou, která vytváří komplex s ketoformou glykovaného hemoglobinu. Z kolony se nejprve vymyje nenačatý neglykovaný hemoglobin, pak se pomocí elučního pufru vytěsni Glyk-Hb. Změří se absorbance obou forem hemoglobinu a konečný výsledek se získá výpočtem.

Pro stanovení dodává firma Merck kompletní set se všemi potřebnými roztoky i s připravenými kolonami (Merckotest-1.14361-Glykovaný hemoglobin).

Provedení:

- Kolonka a všechny roztoky se vyjmou z chladničky a nechají se zahřát na laboratorní teplotu. Z kolonky se odstraní **horní** uzávěr a odlije se přebytečný roztok. Pak se odstraní **spodní** uzávěr a kolonka se postaví do stojánku (do zkumavky). Promyje se 2 ml promývacího pufru, který se nechá prokapat do odpadní zkumavky. Tím je kolonka připravena k práci.
- 100 μ l krve se smíchá s 1,0 ml hemolyzačního roztoku, protřepe se a nechá 5 minut stát při laboratorní teplotě.
- Kolona se umístí do označené zkumavky, na ni se pipetou nanese 50 μ l hemolyzátu a nechá se vsáknout. Pak se přidá se 0,5 ml promývacího pufru a nechá se 5 minut stát.
- Po pěti minutách následuje vymytí **neglykovaného hemoglobinu**. Kolona se promyje ještě 5 ml promývacího pufru a roztok se zachytí do zkumavky (1. frakce).
- Následuje eluce **glykovaného hemoglobinu**. Vymění se zkumavka, na kolonu se nanese 3 ml elučního pufru a eluát se zachytí do druhé zkumavky (2. frakce).

- Změří se absorbance 1. frakce (A_1) a 2. frakce (A_2) proti vodě (při 414 nm).
- Vypočítáte obsah glykovaného hemoglobinu v předloženém vzorku:

$$\% \text{ Glyk - Hb} = \frac{3,0 \cdot A_2}{5,55 \cdot A_1 + 3,0 \cdot A_2} \cdot 100$$

Referenční hodnota: 4,3 - 5,8% (zkreslení u anemie)

- Ihned po skončení měření se provede regenerace kolony. Kolona se promyje 5 ml regeneračního roztoku, pak se naplní 2 ml regeneračního roztoku, uzavře nejprve **horním** a pak **spodním** uzávěrem a uloží se zpět do chladničky (při teplotě +2 až +8°C). Přechovává se ve tmě.

Použité roztoky a činidla:

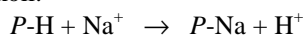
Všechny roztoky a kolony je možno přechovávat v temnu při teplotě +2 až +8°C nejméně 3 měsíce do doby udávané expirace. Krev nebo hemolyzát se může skladovat při stejné teplotě 1 týden.

1. Kolona s 0,5 ml agarosu s kys. aminofenylboritou (na 10 stanovení)
2. Promývací pufr - pH = 8,0 (0,25 mol octanu amonného a 0,05 mol MgCl_2 rozpustit vodou na 1 l roztoku)
3. Eluční pufr - pH = 8,5 (0,1 mol TRIS a 0,2 mol sorbitu na 1 l)
4. Regenerační roztok: kys. octová ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)
5. Hemolyzační činidlo (0,1% Triton X-100)
6. Vzorek

Iontově výměnná chromatografie

Iontoměniče jsou anorganické nebo organické vysokomolekulární látky, které jsou schopny vyměňovat ionty. **Katex** (zkrácením anglického *kation exchanger*) je nerozpustná, vhodně zesíťovaná makromolekulární látka, která má na svém polymerním řetězci vázanu anorganickou snadno disociovatelnou funkční skupinu (např. $-\text{SO}_3\text{H}$).

Ve styku s vodou vyplní molekuly H_2O prostorová oka katexu a protony (ionty H^+), přitahované konjugovanými anionty, se shromáždí uvnitř ok. Tak vznikne zajímavý jev: voda vně prostorových ok obsahuje mizivé množství protonů, zatímco uvnitř ok je koncentrace protonů vysoká. Po přidání roztoku disociované soli (např. Na^+ a Cl^-) proniknou kationty Na^+ do nitra katexu a vytěsní ekvivalentní množství iontů H^+ , které místo nich uniknou do okolí.



Katex ve **vodíkovém cyklu** byl převeden do **sodíkového cyklu**. Reakce je dokonale vratná. Po přidání silně kyselého roztoku (např. HCl) budou vysokým přebytkem protonů z katexu ionty sodné vytěsněny a katex se vrátí zpět do vodíkového cyklu. O tom, kterým směrem bude reakce probíhat, rozhoduje poměr koncentrací.

Anexy (*anion exchanger*) mají podobné vlastnosti s tím rozdílem, že vyměňují anionty. Reakční mechanismus je analogický. Anex v *OH*-cyklu lze roztokem NaCl převést do *Cl*-cyklu a obráceně přebytkem NaOH vrátit zpět do *OH*-cyklu.

Iontoměniče se používají k dělení ionizovatelných látek. Uplatnily se např. při studiu aminokyselin. Zásadité aminokyseliny jsou poutány katexem silněji než neutrální a ty zase silněji než kyselé. Jednotlivé frakce lze získat elucí pufrům s klesající hodnotou pH. Tak byla např. vyřešena sekvence 127 aminokyselin enzymu ribonukleasy. Jinou důležitou aplikací je výroba velmi čisté tzv. *deionizované vody*, což je vzhledem k energetickým úsporám s výhodou využíváno v laboratořích a průmyslu.

Důležitou konstantou každého iontoměniče je **kapacita** (C), která udává látkové množství iontu (v mmol), které je schopen zachytit (event. vyměnit) 1 ml ionexu.

14. úloha:

Stanovení kapacity katexu

Úkolem je stanovit kapacitu katexu *Amberlite* pro vodíkové a vápenaté kationty.

Provedení:

Cyklizace katexu:

- Na pracovním stole máte připravenou kolonu s 5 ml katexu *Amberlite*. Katex musí být stále pod vodou, do sloupce se nesmí dostat vzduchové bubliny! Pootevřením kohoutu vypustíte vodu nad sloupcem a ponecháte jen nepatrnou vrstvu zabraňující vniknutí vzduchu.
- Katex převedete do vodíkového cyklu: do kolony napipetujete 2 x 10 ml roztoku HCl ($c = 4 \text{ mol/l}$) a pootevřete kohout tak, aby toto množství prokapalo asi za 10 minut. Dále budete kolonu promývat destilovanou vodou (použijete stříčku) až do neutrální reakce.

Zkouška neutrality:

- Po přidání celkově asi 150 ml vody odeberete několik kapek eluátu do zkumavky a přidáte 2-3 kapky acidobazického indikátoru (methylová oranž). Neutrální reakci prokáže oranžové zbarvení. Je-li eluát stále kyselý (indikátor červený), v promývání pokračujete. Pro srovnání si můžete připravit porovnávací roztok z destilované vody a indikátoru. Na dokonalém vymytí přebytečných iontů H^+ závisí výsledek pokusu.

Stanovení kapacity:

- Z kolony vypustíte všechnu promývací vodu a napipetujete přesně 10 ml roztoku CaCl_2 . Pod kolonu postavíte suchou odměrnou baňku (objem 100 ml) a podle potřeby upravíte výšku kolony na stojanu tak, aby se její ústí dotýkalo hrdla baňky.
- Pootevřete kohout, necháte roztok CaCl_2 zvolna prokapat a pak budete promývat kolonu destilovanou vodou tak dlouho, až získáte přesně 100 ml eluátu. Baňku odstavíte a prostor nad katexem doplníte dostatečnou zásobou vody.
- Paralelně si připravíte porovnávací (slepý) pokus. Do jiné odměrné baňky (objem 100 ml) odpipetujete 10 ml roztoku CaCl_2 a doplníte vodou po značku. Eluát i porovnávací roztok dobře promícháte několikerým převrácením baňky.

Stanovení kapacity pro vodíkové ionty: (alkalimetrie)

- Standardizace titračního roztoku NaOH:
Do titrační baňky odpipetujete 5 ml standardního roztoku kyseliny šťavelové ($c = 50 \text{ mmol/l}$), přidáte 2-3 kapky indikátoru (fenolftalein) a ztitrujete do trvalého světle fialového zbarvení. Titraci zopakujete a z průměrné spotřeby vypočítáte přesnou koncentraci titračního roztoku.

$$c_t = \frac{c_{st} \cdot V_{st}}{V_t \cdot f_{st}} \quad [\text{mmol/l}]$$

- Z eluátu odeberete 10 ml, přidáte 2-3 kapky indikátoru (fenolftalein) a ztitrujete. Titraci provedete dvakrát a z průměrné spotřeby vypočítáte koncentraci vzorku.

$$c_v = \frac{c_t \cdot V_t \cdot f_t}{V_v} \quad [\text{mmol/l}]$$

Výpočet kapacity pro vodíkové ionty:

$$n(\text{H}^+) = c_v \cdot V_{\text{eluát}} \quad [\text{mmol}]$$

$$C_{\text{katex}} = \frac{n(\text{H}^+)}{V_{\text{katex}}} \quad [\text{mmol H}^+/\text{ml katexu}]$$

Stanovení kapacity pro vápenaté ionty: (vytěšňovací chelatometrie)

- Z eluátu odeberete 10 ml, přidáte 5 ml vytěšňovacího roztoku a tolik indikátoru (*Erio T*), aby byl roztok zbarven slabě vínově. Opakovaně titrujete roztokem chelatonu ($c = 50 \text{ mmol/l}$) do modrého zbarvení (bez fialového odstínu). Z průměru zjistíte spotřebu (sp_v).
- Stejným způsobem titrujete i porovnávací (slepý) pokus a zjistíte spotřebu (sp_o).

$$c_v = \frac{(sp_o - sp_v) \cdot c_t \cdot f_t}{V_v} \quad [\text{mmol/l}]$$

Výpočet kapacity pro vápenaté ionty:

- Vypočítáte kapacitu pro vápenaté ionty:

$$n(\text{Ca}^{2+}) = c_v \cdot V_{\text{eluát}} \quad [\text{mmol}]$$

$$C_{\text{katex}} = \frac{n(\text{Ca}^{2+})}{V_{\text{katex}}} \quad [\text{mmol Ca}^{2+}/\text{ml katexu}]$$

- Porovnáte kapacitu pro vápenaté ionty s výsledkem pro ionty H^+ . Oba výsledky musí být srovnatelné. (Každý vápenatý kationt vytěšní dva ionty vodíkové.)

Použité roztoky a činidla:

1. HCl ($c = 4 \text{ mol/l}$)
2. CaCl_2 ($c = 1 \text{ mol/l}$)
3. Standardní roztok $(\text{COOH})_2$ ($c = 50 \text{ mmol/l}$)
4. Titrační roztok NaOH ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)
5. Titrační roztok chelatonu ($c = 50 \text{ mmol/l}$)
6. Indikátory:
 - Methylová oranž (0,1% roztok ve vodě)
 - Fenolftalein (0,1% roztok v 50% ethanolu).
 - Eriochromová čerň T (pevná směs s NaCl 1:100)
7. Vytěšňovací roztok ($\text{pH} = 10$)
 - 8,92 g NH_4Cl , 62 ml koncentrovaného amoniaku a 20,3 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ se rozpustí v 500 ml vody , přidá se 56 ml chelatonu ($c = 50 \text{ mmol/l}$) a doplní vodou na 1000 ml.
8. Katex (*Amberlite*)

15. úloha:

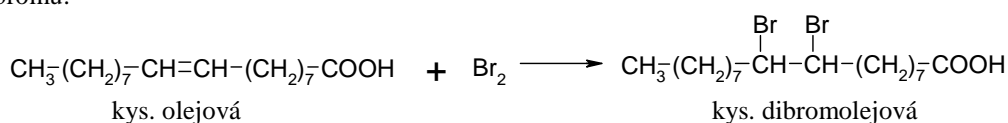
Stanovení jodového čísla tuků podle Hanuše

Tuky (triacylglyceroly) obsahují vedle nasycených mastných kyselin (palmitové, stearové) i kyseliny nenasyčené (olejová, linolová, linolenová, ...). Nenasycené mastné kyseliny jsou pro člověka nezbytné. Patří k esenciálním složkám potravy, neboť jejich syntéza v těle je nepostačující, některé se nesyntetizují vůbec. Množství dvojných vazeb v mastné kyselině se vyjadřuje pomocí **jodového čísla** (J), které udává počet mg jodu vázaného za daných podmínek na 100 mg zkoumaného tuku.

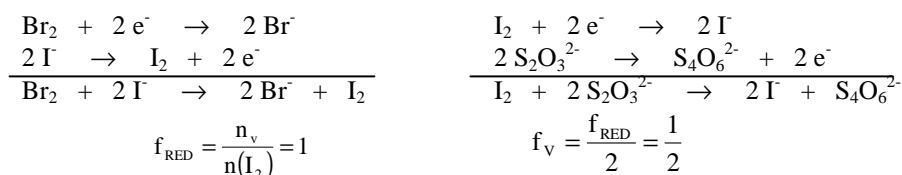
Stanovení se provádí takto: odvážené množství tuku se rozpustí ve vhodném rozpouštědle (chloroform nebo chlorid uhličitý) a přidá se známý nadbytek halogenačního činidla, které obsahuje brom. Ten se aduje na dvojně vazby nenasyčených kyselin. Množství nezreagovaného bromu se zjistí thiosulfátimetrickou titrací. Paralelně se zpracuje i porovnávací (slepý) vzorek, který obsahuje pouze rozpouštědlo. Adované množství bromu se převede na ekvivalentní množství jodu.

Probíhající reakce:

Adice bromu:



Titrace:



Provedení:

- Na pracovním stole máte připravenou baňku (V), která obsahuje vzorek tuku (100 mg/1 ml CHCl_3) a dále baňku (S) s porovnávacím (slepým) pokusem (1 ml CHCl_3).
- Do obou baněk přidáte z automatické byrety přesně 2,5 ml Hanušova halogenačního činidla (*Pozor! Žíravina*), uzavřete zátkou, promícháte a necháte 1 hodinu stát v temnu.
- Po hodině přidáte do každé baňky 2 ml 10% roztoku KI a 10 ml destilované vody. Vložíte míchací tělíčko a promícháte na elektromagnetické míchačce. Jde o to, aby se souvislá chloroformová vrstva na dně dostatečně rozptýlila a přišla do styku s vodným roztokem jodidu. Necháte 10 minut stát.
- Po 10 minutách ztitrujete vzorek za stálého intenzivního míchání na elektromagnetické míchačce roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 50 \text{ mmol/l}$). Těsně před koncem titrace (roztok je světle žlutý) přidáte několik kapek roztoku škrobu (vzorek zmodrá) a dotitrujete do vymizení zbarvení (spotřeba sp_v). Obě fáze (vodná i chloroformová) musí být bezbarvé.
- Stejným způsobem ztitrujete i slepý pokus (spotřeba sp_0). Z rozdílu spotřeb vypočítáte jodové číslo zkoumaného tuku a z tabulky odhadnete, jaký tuk byl ve vzorku přítomen.
- Ztitrované vzorky obsahující chloroform vylijete do určené nádoby.

Výpočet:

$$c_v \cdot V_v = (sp_o - sp_v) \cdot c_t \cdot f_v$$

$$m(I_2) = c_v \cdot V_v \cdot M(I_2)$$

$$J = [m(I_2) : m_v] \cdot 100 \quad [\text{mg } I_2/100 \text{ mg tuku}]$$

Dosazuje se: $M(I_2) = 253,8 \text{ g/mol}$

$(sp_o - sp_v)$ rozdíl spotřeb (v ml)

m_v navážka vzorku (v mg)

Jodové číslo některých tuků:

Tuk	Jodové číslo
Kokosový tuk	7 až 10
Máslo	26 až 42
Vepřové sádlo	53 až 77
Olivový olej	80 až 88
Řepkový olej	97 až 108
Sojový olej	120 až 141
Ořechový olej	140 až 150

Použité roztoky a činidla:

1. Titrační roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 50 \text{ mmol/l}$) - standardizovaný

2. KI (10% roztok)

3. Roztok škrobu (pro thiosulfátimetrickou titraci)

4. Hanušovo halogenační činidlo: (připravovat v digestoři!)

12,7 g jemně rozetřeného jodu se rozpustí asi ve 100 ml konc. CH_3COOH a přidá se 2,6 ml bromu (POZOR! Žíravina). Třepáním se jod během 10 minut rozpustí. Doplní se konc. kyselinou octovou na 1 l.

Uchovává se v tmavé láhvi ve tmě. Na láhev se umístí výrazný nápis, že jde o nebezpečnou žíravinu.

5. Vzorek tuku (rozpuštěný v CHCl_3)

6. Slepý vzorek (CHCl_3)

16. úloha:

Stanovení peroxidového čísla tuků

Volné kyslíkové radikály (VKR) mají v biologických systémech značný vliv, protože mohou iniciovat četné biochemické reakce a ovlivňovat jejich rychlost a směr. Proto mají také významnou úlohu v patogenezi mnoha onemocnění.

Mezi volné kyslíkové radikály se řadí částice obsahující kyslík aspoň s jedním nepárovým elektronem, nejčastěji to je superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), perhydroxylový radikál ($\bullet\text{O}_2\text{H}$), peroxylový radikál ($\bullet\text{OOR}$), alkoxyradikál ($\bullet\text{OR}$) a další. Tyto částice jsou schopny samostatné existence a vykazují značnou reaktivnost s tendencí k řetězovým reakcím.

Hydroxylový radikál, který je nejreaktivnější z VKR, může vzniknout například rozštěpením vazby v molekule vody:

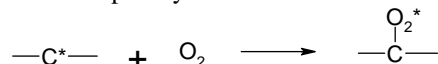


Reaguje okamžitě s první molekulou, se kterou přijde do styku, vytváří další radikál a spouští řetězovou reakci.

Vysoce citlivé k účinku VKR jsou mastné kyseliny buněčných membrán a membránových fosfolipidů, přednostně jsou napadány vícenásobně nenasycené mastné kyseliny. Hydroxylový radikál odebírá z řetězce mastné kyseliny atom vodíku za vzniku vody a uhlíkového radikálu:



Ten reaguje nejčastěji s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu:



Peroxylový radikál napadá další řetězec mastné kyseliny, ze kterého odebírá atom vodíku za vzniku hydroperoxidu lipidů:



Zároveň vzniká další uhlíkový radikál a řetězová reakce pokračuje.

Jeden hydroxylový radikál tak může změnit stovky molekul mastných kyselin na hydroperoxydy, které jsou substrátem pro tvorbu dalších cytotoxických produktů. Lipoperoxydy, hydroperoxydy a jejich degradační produkty mohou porušit strukturu buněčné membrány, poškodit membránové bílkoviny a enzymy vázané na membránách, způsobit změnu její permeability a tím zásadně ovlivnit buněčný metabolismus.

Výše uvedené reakce mohou probíhat *in vivo* v organismu, ale uplatňují se i *in vitro*, např. při žluknutí tuků. Proto se v jedlých tucích kontroluje přítomnost hydroperoxidů pomocí stanovení peroxidového čísla tuků. Hydroperoxydy lipidů oxidují roztok jodidu na jod, který se pak stanoví thiosulfátimetry. Množství obsažených hydroperoxidů se odvozuje od spotřeby titračního roztoku. **Peroxidové číslo (PČ)** udává látkové množství aktivního kyslíku (tj. kyslíku oxidujícího jodid na jod) v μmol v 1 g tuku.

Provedení:

Úkolem bude porovnat dva tuky (zadá asistent):

- čerstvý tuk a tuk podezřelý ze žluknutí
- dva druhy jedlých tuků

- Do titrační baňky (V_1) se přesně odváží asi 500 mg prvního vzorku, do druhé baňky (V_2) asi 500 mg druhého vzorku.
- Do každé baňky přidáte 2,5 ml chloroformu, 2,5 ml konc. kyseliny octové a 1 ml 10% roztoku KI.

- Vložíte míchadlo a směs 1 minutu intenzivně mícháte na elektromagnetické míchačce. (Míchadlo v baňce ponecháte.)
- Paralelně připravíte slepý pokus: Do titrační baňky (S) odměříte 2,5 ml chloroformu, 2,5 ml konc. kyseliny octové a 1 ml 10% KI. Opět 1 minutu mícháte.
- Všechny baňky uzavřete hliníkovou fólií a necháte stát v temnu 20 minut.
- Do každé baňky přidáte asi 20 ml vody a 2-3 kapky roztoku škrobu, objeví se tmavé zbarvení jodoškrobového komplexu.
- Titrace se provede titračním roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 2 \text{ mmol/l}$). Titrujete po kapkách za stálého míchání (na elmg. míchačce) do odbarvení roztoku.
- Ztitrované vzorky obsahující chloroform vylijete do určené nádoby.
- Ze spotřeby na vzorek (sp_v) a slepý pokus (sp_0) vypočítáte peroxidové číslo (PČ):

$$\text{PČ} = \frac{(\text{sp}_v - \text{sp}_0) \cdot c_t}{m_v} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol/g}],$$

- kde
- c_t ... je látková koncentrace titračního roztoku (v mmol/l)
 - m_v ... je navážka vzorku tuku (v mg)
 - sp_v ... je spotřeba na vzorek (v ml)
 - sp_0 ... je spotřeba na slepý pokus (v ml).

Použité roztoky a činidla:

1. Titrační roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 2 \text{ mmol/l}$)
2. Roztok škrobu pro thiosulfátimetrii
3. KI (10% roztok)
4. Konc. kyselina octová
5. Chloroform
6. Vzorky tuku

Optické metody

Optické metody se využívají v mnoha analytických oborech a patří pro svou exaktnost, rozmanitost použití a možnosti využití přesných přístrojů k nejvyhledávanějším. Jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s hmotou, neboť hmota má schopnost záření charakteristickým způsobem **pohlcovat** (kolorimetrie, fotometrie nebo spektrofotometrie, atomová absorpční spektrometrie), **vysílat** (emisní spektrální analýza, plamenová fotometrie), může docházet ke **změně rychlosti záření** (refraktometrie) nebo k **otáčení roviny polarizovaného světla** (polarimetrie).

Jednoduché metody, které nevyžadují náročné přístrojové vybavení, se dnes používají jen okrajově nebo speciálně účelově (např. kolorimetrické stanovení pH). Většina chemických analytických laboratoří je v současnosti vybavena spektrofotometry pro viditelnou, ultrafialovou, event. infračervenou oblast světla, refraktometry, případně (zejména pokud se zabývají analytikou sacharidů) i polarimetry. Na specializovaných pracovištích se používají plamenové fotometry, atomové absorpční spektrometry, rentgenové spektrometry nebo spektrografy a další nákladná a složitá optická zařízení.

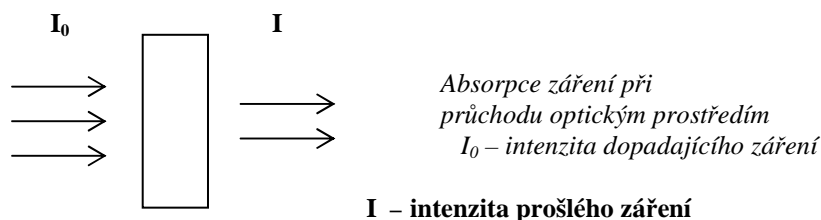
Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

Spektrofotometrie, navazující vývojově na jednodušší kolorimetrii, je jednou z nejužívanějších analytických instrumentálních metod. Výhodou je především jednoduchá příprava vzorků i měření absorpce světla. Také automatizace a možnost měření velkých sérií vzorků byla úspěšně vyřešena. Metodu lze realizovat v provozu i v terénu a pro celou řadu oborů, včetně klinické biochemie, je to nejužívanější a zatím těžko nahraditelná metoda.

Viditelná oblast spektra zahrnuje vlnové délky v rozmezí 400 až 760 nm a tzv. blízká ultrafialová oblast vlnové délky v rozmezí 200 až 400 nm. Oblast ultrafialového (UV) a viditelného záření se nazývá **oblast elektronových spekter**. Absorpce tohoto záření je výsledkem interakce elektromagnetického záření s atomem či molekulou zkoumané látky. Lze ji sledovat pomocí **absorpčního spektra** (tj. závislosti množství absorbovaného záření na vlnové délce, popř. na vlnočtu). Subjektivně lze postihnout absorpci pouze ve viditelné části spektra, což vnímáme jako barevnost. Přitom zbarvení, jež naše oko pozoruje, je komplementární barvou k pohlcenému záření. Např. roztok manganistanu draselného absorbuje záření v oblasti 530 nm (zelená barva viditelného spektra) a naše oko pozoruje červenofialové zbarvení.

Zákon Lambertův - Beerův

Prochází-li paprsek monochromatického záření optickou vrstvou, která toto záření pohlcuje, intenzita původního záření se zeslabí.



Velikost absorpce záření lze vyjádřit pomocí dvou veličin – transmittance (T) a absorbance (A). **Transmittance** (propustnost) udává poměr intenzity záření prošlého k intenzitě záření původního.

$$T = \frac{I}{I_0} \qquad T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

Transmittance nabývá hodnot 0 až 1 (0 až 100%).

Absorbance (ve starší české literatuře a v německy psaných textech včetně návodů k obsluze přístrojů se používá označení **E - extinkce**) udává logaritmický poměr intenzity původního záření k intenzitě záření prošlého.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

Absorbance nabývá hodnot 0 až ∞ . Při absorbanci $A = 0$ ($T = 1$) se záření vůbec neabsorbuje, při absorbanci $A = \infty$ ($T = 0$) se záření pohltí úplně a prostředím vůbec neprojde.

Studiem závislosti absorpce záření na vlastnostech optického prostředí se zabývali H. Lambert a A. Beer. Spojením výsledků jejich prací vznikl **Lambertův-Beerův zákon**.

Zákon platí pro monochromatické světlo a vyjadřuje vztah mezi absorbancí (A), tloušťkou absorbujícího prostředí (l) a jeho koncentrací (c).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l ,$$

kde c je látková koncentrace (mol/l), l je tloušťka vrstvy (cm) a ϵ je molární absorpční koeficient, který je při dané vlnové délce materiálovou konstantou. Jeho rozměr je $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a v těchto jednotkách bývají také jeho hodnoty udávány v tabulkách. Běžně se však jeho hodnota nezjišťuje, neboť se pracuje buď paralelně se standardem známé koncentrace a nebo se využívá tzv. kalibračních křivek.

Platnost Lambertova-Beerova zákona je limitovaná a kontroluje se vynesáním závislosti $A = f(c)$, která se označuje jako **kalibrační křivka**. Linearity je dosaženo jen při nízkých koncentracích (řádově do 10^{-2} mol/l). Odchytky mohou být způsobeny rovněž zákalem nebo měnicí se koncentrací v důsledku změny chemické rovnováhy v roztoku (např. při probíhající disociaci, polymeraci, hydrolýze, tvorbě komplexů, apod.). Rovněž kolísání vlnové délky v průběhu měření je nutno zamezit. Protože se vesměs pracuje s polychromatickými zdroji světla, je kladen důraz na kvalitu monochromátorů. Zcela uspokojivé výsledky dávají přístroje vybavené hranoly nebo mřížkami, méně vhodné je používání barevných filtrů. Také změněm teploty je nutno zabránit. V zásadě musí být udržována teplota v rozmezí $\pm 1^\circ\text{C}$, proto nemohou být bez předchozí temperace měřeny např. roztoky právě vyjmuté z chladničky.

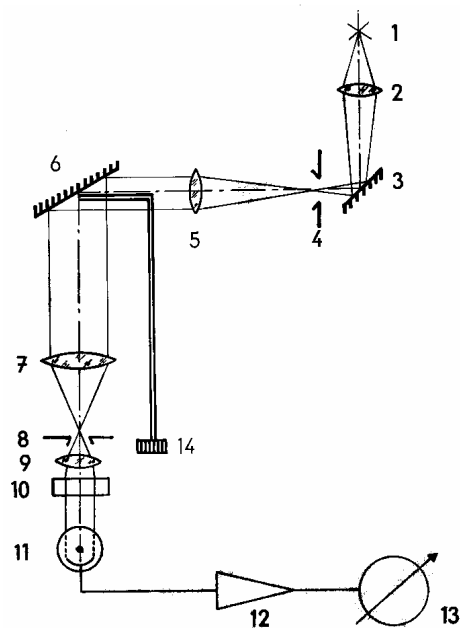
Přístroje

K měření absorpce slouží různé typy fotometrů, spektrofotometrů nebo různá automatizovaná zařízení pro sériová měření. (Název *fotometr* a *spektrofotometr* se používá pro přístroje s objektivní detekcí záření lišící se kvalitou monochromátorů. U fotometrů jsou používány barevné filtry, u spektrofotometrů je zabudován hranol nebo mřížka.)

V zásadě jde o přístroje **jednopaprskové** nebo **dvoupaprskové**. Jednopaprskové přístroje jsou stavebně jednodušší, dvoupaprskové přístroje jsou používány při konstrukci výkonných spektrofotometrů a automatizovaných systémů.

Každý měřicí systém se skládá z těchto základních prvků:

- a) zdroj záření
- b) monochromátor
- c) kyvety se vzorkem (absorbující systém)
- d) čidlo záření (fotodetektor)
- e) měřicí zařízení



Optické schéma jednopaprskového spektrofotometru s mřížkovým monochromátorem (SPEKOL)

- 1 – zdroj záření
- 2 – 9 – optická soustava
- 6 – mřížkový monochromátor
- 10 – kyveta se vzorkem
- 11 – fotodetektor
- 12 – tranzistorový zesilovač
- 13 – výhylkové měřidlo
- 14 – mikrometrický šroub pro nastavení vlnové délky

Zdrojem záření pro blízkou UV oblast bývají různé výbojky, pro viditelnou oblast jsou běžně používány žárovky s wolframovou spirálou plněné inertním plynem.

Monochromatické světlo se získává pomocí **monochromátorů**, tj. pomocí lomu světla hranolem nebo ohybem na mřížce. Barevnými absorpčními filtry jsou vybaveny jen nejjednodušší přístroje. Filtry jsou zhotoveny ze speciálních skel nebo je tvoří roztoky barevných kapalin uzavřené ve speciálních kyvetách. Pro přesná měření se monochromátory kontrolují pomocí doporučených standardů.

Kyvety pro měřené roztoky tvoří nejčastěji hranaté nádoby s konstantní vzdáleností dvou planoparalelních destiček. Pro viditelnou oblast se vyrábějí ze skla, pro UV oblast musí být křemenné. Obvyklá tloušťka kyvety je 1 cm, ale vyrábějí se i v jiných rozměrech. Tloušťka bývá vyryta na přední destičce. Používané kyvety musí být čisté a dokonale odmaštěné, proto se pravidelně promývají vhodnými saponáty. Zvláště důkladně musí být očištěny po práci se silně alkalickými roztoky, které leptají sklo i křemen.

V současné době se používají téměř výhradně **čidla záření** založená na fotoelektrickém efektu, tj. fotonky, fotonásobiče a hradlové fotoelektrické články. U běžných přístrojů se nejčastěji používají selenové články.

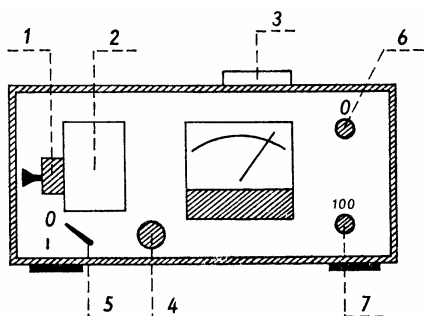
Jako **měřicí zařízení** změny absorpce slouží citlivý galvanoměr. Je-li výchylka galvanoměru konečným údajem pro sledovanou absorpci, jedná se o přístroj výchylkový. U modernějších spektrofotometrů je dalším přídatným zařízením převedena výchylka na číselný (digitální) výstup, případně může být připojeno registrační zařízení. V průběhu praktických cvičení se setkáte s výchylkovým spektrofotometrem **Spekol** (Zeiss Jena) a jeho novější verzí **Spekol 11**, která má digitální výstup.

Obsluha výchylkového spektrofotometru Spekol

Jedná se o jednopaprskový spektrofotometr se selenovým detektorem záření. Monochromatické záření se získává pomocí mřížky. Je určen pro měření ve viditelné oblasti spektra. Kyvety jsou skleněné, délka absorbující vrstvy je 1 cm.

- Spektrofotometr zapojíte do sítě a vypínačem zapnete transformátor. Vyčkáte asi 5 minut, až se ustálí světelný tok.
- Připravíte si dvě kyvety. Jednu naplníte zkoumaným vzorkem, druhou porovnávacím (slepým) roztokem. Kyvety se plní asi 5 mm pod okraj a do přístroje se vkládají osušené buničitou vatou.
- Kyvety se vkládají do držáku kyvet. Do pravého otvoru (z pohledu pracovníka) se vloží kyveta s porovnávacím roztokem, do sousedního otvoru kyveta se vzorkem. S kyvetami zacházejte s maximální opatrností! Držte je vždy za matné boční stěny.
- Pomocí mikrometrického šroubu nastavíte vlnovou délku.
- Zařadíte kyvetu s porovnávacím roztokem. Uzavřete clonu (páčka na levé straně přístroje je v poloze „0“) a potenciometrem „0“ v pravém horním rohu nastavíte na ukazateli nulu na levé straně **dolní stupnice** (nulová propustnost).
- Otevřete clonu (páčka na levé straně dole je v poloze „/“) a potenciometrem „100“ nastavíte na dolní stupnici 100% propustnost.
- Hodnoty 0 a 100 ještě jednou překontrolujete. Na ukazateli ponecháte nulovou hodnotu.
- Zařadíte zkoumaný vzorek. Otevřete clonu a na **horní stupnici** odečítáte zprava doleva absorbanci. Pak opět clonu zavřete.
- Při výměně vzorků zařadíte opět porovnávací roztok a provedete kontrolu nulové a 100% propustnosti.

- Po ukončení měření vylijete obsah kyvet do odpadní nádoby a kyvety dobře (několikanásobně) propláchnete destilovanou vodou. Pak je zvenčí osušíte a dnem vzhůru postavíte do misky s čistou buničitou vatou.
- Nakonec vypnete transformátor a spektrofotometr odpojíte od sítě.



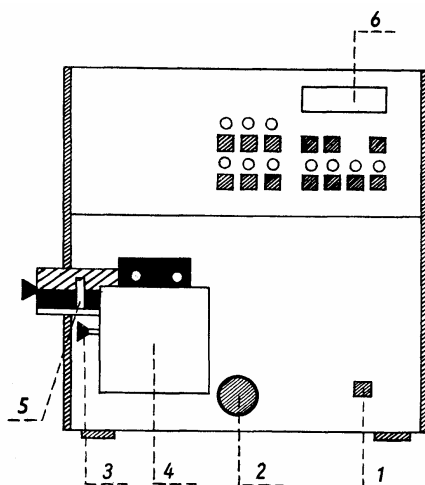
Výchylkový spektrofotometr Spekol

- 1 – držák kyvet
- 2 – fotodetektor
- 3 – zdroj záření
- 4 – nastavení vlnové délky
- 5 – ovládání clony
- 6 – nastavení 0% T
- 7 – nastavení 100% T

Obsluha spektrofotometru Spekol 11

Tato verze spektrofotometru má digitální výstup, částečnou automatizaci měřících postupů a větší rozsah vlnových délek (340 až 850 nm).

- Spektrofotometr připojíte k síti a zapnete hlavním vypínačem vpravo dole. Diody nad tlačítky blikají. Vyčkáte asi 5 minut, pak stisknete tlačítko „E“ (absorbance, v německém textu *Extinktion*).
- Jednu kyvetu naplníte porovnávacím roztokem, otřete ji zvenčí buničitou vatou a suchou vložíte do pravého otvoru držáku kyvet. Druhou kyvetu naplníte zkoumaným roztokem a vložíte do sousedního otvoru. Kyvety se plní asi 5 mm pod horní okraj, minimální objem je asi v polovině naznačen slabou ryskou. Kyvety uchopíte za matné boční stěny a zacházejte s nimi s maximální opatrností.
- Pomocí mikrometrického šroubu se nastaví vlnová délka. Pro **oblast 340 - 620 nm** se táhlem zařadí fotocela ve směru **modré** šipky, pro **oblast 620 - 850 nm** se zařadí fotocela ve směru **červené** šipky.
- Zařadíte kyvetu s porovnávacím roztokem, stisknete tlačítko „R“ a vyčkáte, až se na ukazateli objeví hodnota „0,000“. (Pokud se objeví „OFL“ nebo „-OFL“, požádáte o radu asistenta nebo laborantku.)
- Zařadíte kyvetu se zkoumaným vzorkem a na ukazateli odečtete absorbanci. Při výměně vzorků je třeba nastavení nulové hodnoty zopakovat.
- Po skončení práce se obsah kyvet vylije do připravené odpadní nádoby a kyvety se vymyjí několikrát propláchnutím destilovanou vodou. Osuší se zvenčí a uloží dnem vzhůru na suchou buničitou vatou.
- Spektrofotometr se vypne hlavním vypínačem a odpojí ze sítě.



Spektrofotometr Spekol 11

- 1 - síťový vypínač
- 2 - nastavení vlnové délky
- 3 - táhlo přepínání fotodetektoru
- 4 - fotodetektor
- 5 - držák kyvet
- 6 - digitální ukazatel

Stanovení koncentrace

Spektrofotometrické stanovení koncentrace roztoků lze provádět v zásadě dvojím způsobem:

1. Metoda kalibrační křivky

Tato metoda se používá tehdy, nacházejí-li se koncentrace vzorků v širším koncentračním rozmezí. Připraví se základní roztok, jehož koncentrace je větší než předpokládané koncentrace vzorků. Z něho se vhodným ředěním získají kalibrační roztoky. Při ředění se používá buď metody pravidelného přírůstku (např. 1/10, 2/10, 3/10, ... původní koncentrace základního roztoku) nebo metody poměrné (např. zředění 3:1, 2:3, 1:2, 1:3, 1:4, apod.). Kalibrační roztoky se zpracují stejným způsobem jako vlastní vzorky a zjistí se jejich absorbance. Získané hodnoty se vynesou do grafu. Na osu x se nanese koncentrace kalibračních roztoků ve stejných jednotkách, jaké se požadují u vzorků (nejčastěji v mol/l, mmol/l nebo g/l), na osu y se nanese absorbance. Měřítka na osách se zvolí tak, aby výsledná kalibrační křivka svírala s osou x úhel přibližně 45°. Dále je praktické zvolit délky na grafu ve vhodném poměru k nanášené veličině (např. 1 cm na ose x odpovídá koncentraci 10 mmol/l, 1 cm na ose y odpovídá absorbanci 0,01 apod.)

2. Metoda paralelního standardu

Tato metoda je vhodná v těch případech, kde se koncentrace vzorků pohybují v určitém, poměrně úzkém rozmezí, což je např. běžné v klinické biochemii při analýze séra, mozkomíšního moku a dalších tělních tekutin. V tomto případě se připraví standard, jehož koncentrace obvykle odpovídá normální hodnotě sledované složky. Standard i vzorky se zpracují stejným způsobem a za stejných podmínek se změří absorbance. Pak platí:

$$A_v = \varepsilon \cdot c_v \cdot l$$

$$A_{st} = \varepsilon \cdot c_{st} \cdot l$$

Odtud:

$$\frac{A_v}{A_{st}} = \frac{c_v}{c_{st}}$$

$$c_v = \frac{A_v}{A_{st}} \cdot c_{st}$$

17. úloha:

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 roztok acidobazického indikátoru ve vodě (pH = 7). Pomocí roztoku kyseliny sírové nebo tetraboritanu sodného převedete indikátor do kyselé, resp. zásadité formy. Ve zkumavce označené **K** smícháte 1 ml vzorku a 1 ml roztoku H₂SO₄ (c = 0,05 mol/l), ve zkumavce **Z** smícháte 1 ml vzorku a 1 ml roztoku Na₂B₄O₇ (c = 0,05 mol/l).
- Měření spektra provedete na spektrofotometru Spekol 11 (viz návod k obsluze), jako porovnávací roztok použijete destilovanou vodu. Změříte absorbance v rozsahu vlnových délek 400 až 700 nm. Hodnoty budete plynule zvyšovat po 20 nm, v oblasti maxima zvolíte intervaly menší (10 nm, v oblasti vrcholu 5 nm).
- Na milimetrový papír naneste na osu x vlnovou délku (1 cm na grafu ≈ 20 nm), na osu y naneste nalezenou absorbanci. Body plynule spojíte. Získáte absorpční spektrum indikátoru, v němž odečtete polohu maxima (v nm). Křivku pro kyselou a zásaditou formu narýsujte do jednoho grafu odlišnými barvami.
- V atlasu spekter vyhledáte indikátor, jehož maxima se pro obě formy nacházejí při stejných vlnových délkách jako u vašeho vzorku.
- K protokolu přiložíte graf a uvedete název indikátoru.

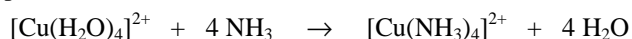
Použité roztoky a činidla:

1. Kyselina sírová (c = 0,05 mol/l), pH = 1
2. Tetraboritan sodný (c = 0,05 mol/l), pH = 9,2
3. Roztoky acidobazických indikátorů ve vodě

18. úloha:

Spektrofotometrické stanovení koncentrace iontů měďnatých

Hydratované ionty [Cu(H₂O)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 připravíte suché zkumavky a označíte čísly:
 - 0: porovnávací (slepý) roztok
 - 1 až 10: kalibrační roztoky
- Podle tabulky si připravíte 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
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 přidáte ke všem kalibračním roztokům 5 ml roztoku amoniaku. Použijte automatický dávkovač.
- Současně si připravíte porovnávací roztok smícháním 5 ml vody a 5 ml amoniaku a také roztoky vzorků (5 ml předloženého vzorku smícháte s 5 ml amoniaku).
- Všechny roztoky promícháte opakovaným převrácením zkumavek. Necháte 10 minut stát.
- Vyhledáte optimální vlnovou délku. Měření provedete na spektrofotometru Spekol (viz obsluha přístroje):
 - Ze vzorku číslo 5 odlijete potřebné množství do jedné kyvety a druhou naplníte porovnávacím roztokem. Vložíte do spektrofotometru a zjistíte absorbance pro vlnové délky 450, 500, 550, 600 a 650 nm. Podrobnějším měřením v okolí maxima zjistíte optimální vlnovou délku, při níž provedete měření kalibrační křivky.
- Nastavíte zjištěnou vlnovou délku a proti porovnávacímu roztoku proměříte postupně všechny kalibrační roztoky i připravené vzorky.
- Kalibrační křivku narýsujete na milimetrový papír. Na osu x nanese koncentraci $c(\text{Cu}^{2+})$ v mmol/l, na osu y nanese zjištěnou absorbanci a nalezenými body proložíte přímkou. 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 koncentraci předložených vzorků.
- Kalibrační křivku a výsledky přiložíte k protokolu.

Použité roztoky a činidla:

1. Základní roztok Cu^{2+} ($c = 25 \text{ mmol/l}$): 6,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ rozpustit vodou na 1 l roztoku
2. Amoniak ($c = 3 \text{ mol/l}$)
3. Destilovaná voda

Refraktometrie

Prochází-li světelný paprsek určitým prostředím, překonává odpor, který mu prostředí klade. Velikost odporu je závislá na optické hustotě prostředí (složení a koncentraci roztoku). Přejíždí-li paprsek z jednoho prostředí do druhého, mění se na rozhraní těchto prostředí jeho průniková rychlost a tím i směr pronikání. Paprsek se láme. Poměr rychlostí v prvním (c_1) a druhém prostředí (c_2) se nazývá **index lomu (n)**.

$$n = \frac{c_1}{c_2}$$

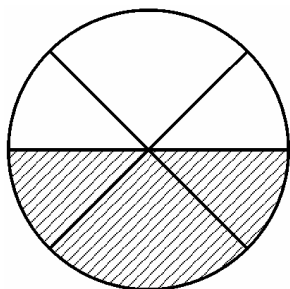
Rychlost průniku však nelze v praxi dost dobře měřit, proto se index lomu vyjadřuje pomocí poměru sinu úhlu dopadu v prvním prostředí ($\sin \alpha$) ku sinu úhlu lomu ve druhém prostředí ($\sin \beta$). Úhly se měří ke kolmici vztyčené na rozhraní prostředí.

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Index lomu je funkcí aditivní, tzn. že výsledná hodnota je součtem dílčích hodnot všech rozpuštěných složek v roztoku. I přes tuto nevýhodu je měření indexu lomu v analytice využíváno. Výhodou je, že vzorek není třeba před měřením zvlášť upravovat, jeho malá spotřeba, rychlost a jednoduchost provedení. V klinické biochemii se metoda využívá při stanovení koncentrace plasmatických bílkovin a to zejména v těch případech, kdy jde o průběžné sledování léčby. Na refrakci se podílejí i ostatní složky plasmy (zejména cholesterol, glukosa a močovina), což může zkreslit výsledek, pokud dochází k výkyvům od jejich běžných koncentrací. V tom případě je vhodnější zvolit jinou metodu, např. spektrofotometrii (BIO-LA-test).

Obsluha refraktometru (Zeiss Jena, typ Abbé)

- Lampu refraktometru zapojíte do sítě a zrcátkem seřídíte osvětlení.
- Obsluhu si nacvičíte s destilovanou vodou. Odklopíte hranol a pomocí stříčky nanasete několik kapek destilované vody tak, aby byl povrch hranolu zcela zvlhčen.
- Hranol uzavřete a pozorujete obraz v okuláru. Pokud je rozhraní barevné, otáčením postranního šroubu na pravé straně přístroje nastavíte pouze černobílý rozdíl.
- Pomocí šroubu vlevo posunete rozhraní do středu nitkového kříže a v levém okuláru odečtete index lomu vody (1,333).
- Pak odklopíte hranol, destilovanou vodu pečlivě otřete kouskem buničité vaty a můžete přistoupit k vlastnímu měření.



*Zorné pole
refraktometru*

19. úloha:

Stanovení koncentrace plasmatických bílkovin refraktometricky

- Na hranol refraktometru nanese pomocí automatické pipety kapku standardního roztoku séra a změříte jeho index lomu. Pak sérum z povrchu hranolu setřete, nanese vzorek (použijete novou špičku!) a opět změříte index lomu.
- Koncentraci vzorku zjistíte pomocí kalibrační křivky. Do stojánku si připravíte očíslované, suché (!) malé zkumavky a podle tabulky do nich napipetujete standardní sérum. Po výměně špičky napipetujete fyziologický roztok a obsah ve zkumavkách protřepáním promícháte. Změříte index lomu všech kalibračních roztoků a zapíšete do tabulky.
- Pro sestavení kalibrační křivky použijete hodnoty indexu lomu pro destilovanou vodu, pro standardní roztok a dále pro kalibrační roztoky (osa y), na osu x nanese koncentraci (g/l). Při konstrukci křivky je třeba zvolit na osách vhodná měřítka tak, aby výsledná přímka svírala s osou x úhel přibližně 45° .
- Z kalibrační křivky odečtete koncentraci plasmatických bílkovin v předloženém vzorku a porovnáte je s normálními hodnotami. Snížení (hypoproteinemie) bývá nejčastěji u onemocnění ledvin a u těžkých poruch jaterní činnosti. Zvýšení (hyperproteinemie) doprovází stavy těžké dehydratace organismu a rovněž některá nádorová onemocnění (např. myelom).

Normální hodnoty: 62 - 82 g/l

Číslo roztoku	Standard (ml)	Fyziologický r. (ml)	Zředění	Koncentrace bílkovin (g/l)	Index lomu
1	0,05	0,20	1:5		
2	0,05	0,15	1:4		
3	0,05	0,10	1:3		
4	0,10	0,10	1:2		
5	0,10	0,05	2:3		
6	0,15	0,05	3:4		
7	0,20	0,05	4:5		

Použité roztoky a činidla:

1. Standardní roztok bílkovin
2. Fyziologický roztok (9,0 g NaCl/l)
3. Vzorky séra

Polarimetrie

Látky, které se nazývají **opticky aktivní**, mají schopnost otáčet rovinu polarizovaného světla. Jsou to většinou organické sloučeniny, které mají ve své molekule asymetrický uhlík, ale patří sem i řada anorganických látek s asymetrickou molekulou a rovněž všechny krystaly s výjimkou krychlové soustavy. V dalších úvahách se budeme zabývat pouze roztoky.

Podle smyslu otáčení se rozdělují opticky aktivní látky na **pravotočivé (+)** a **levotočivé (-)**. Úhel otočení souvisí se strukturou látky a je závislý na její koncentraci. Konstanta charakterizující každou opticky aktivní látku se nazývá **měrná otáčivost**. Je to úhel otočení roviny polarizovaného světla při jednotkové tloušťce vrstvy roztoku (1 dm) a při jednotkové koncentraci (1 g/ml). Pro přesná měření je nutný monochromatický zdroj světla, nejčastěji se používá sodíková výbojka (dublet D). Otáčivost je závislá i na teplotě, běžně se uvádí pro 20°C. Hodnoty měrných otáčivostí $[\alpha]_D^{20}$ se uvádějí v tabulkách.

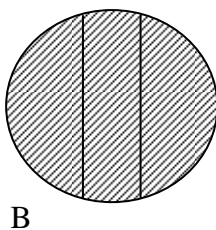
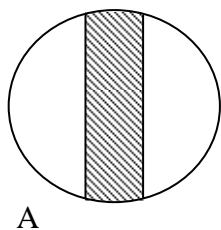
Měření optické otáčivosti se provádí na polarimetrech. Při jejich konstrukci se využívá dvojlomu islandského vápence vhodně zabroušeného do tzv. nikolu. Na něm dochází k rozštěpení záření na paprsek řádný a mimořádný a současně se oba paprsky polarizují. Řádný paprsek je pohlcen černým obalem nikolu, k měření se využívá pouze paprsek mimořádný. První nikol je pevný a nazývá se polarizátor. Druhý nikol (analyzátor) je otočný a dopadá na něj záření prošlé kyvetou s opticky aktivní látkou. Jeho otáčením se kompenzuje optická aktivita zkoumané látky. Ze zjištěného úhlu otočení roviny polarizovaného světla je možno vypočítat látkovou koncentraci opticky aktivní látky v roztoku.

$$c = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot M} \cdot 1000 \quad [\text{mol/l}],$$

kde je	α	...	nalezený úhel otočení (ve stupních)
	$[\alpha]_D^{20}$...	měrná otáčivost
	l	...	délka kyvety (v dm)
	M	...	molární hmotnost (v g/mol)

Obsluha polarimetru (Zeiss Jena)

- Zapnete sodíkovou výbojku a necháte ji asi 5 minut zářit, aby se ustálil světelný tok.
- Naplníte měrnou trubici (kyvetu):
Trubicí na jedné straně otevřete, opatrně sejmete sklíčko a naplníte destilovanou vodou (použijte stříčku) tak, aby se nad horním okrajem vytvořil meniskus, který „seříznete“ suchým sklíčkem. Pak trubici uzavřete a přesvědčíte se, zda se uvnitř nevytvořily vzduchové bubliny. Pokud se objeví, musíte plnění zopakovat a bubliny odstranit.
- Trubicí otřete a suchou vložíte do tubusu polarimetru. Zaostříte okulár a zkontrolujete nulovou hodnotu. Na stupnici s noniovým měřítkem na levé straně přístroje nastavíte úhel 0,00° a při pohledu do okuláru pozorujete jednotné zorné pole, v němž nejsou patrné žádné rozdíly mezi jednotlivými úsečemi.



Zorné pole
polarimetru

- Vodu vylijete do připravené odpadní nádoby, trubici vypláchnete malým množstvím vzorku a pak naplníte vzorkem podle výše uvedeného postupu.
- Suchou trubici vložíte do tubusu a v okuláru pozorujete kruhové pole rozdělené středním pruhem na úseče různé intenzity (obr. A). Šroubem analyzátoru otáčíte tak dlouho, až se intenzita světelného pole všech úsečí vyrovná (obr. B). Úhel otočení se odečte na stupnici. Na levé straně se odčítají celé stupně, na noniovém měřítku vpravo desetiny a setiny. Odečítání na stupnici usnadňuje zabudovaná lupa.

20. úloha:

Stanovení koncentrace glukosy v moči polarimetricky

Cukry (monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy) mají ve své molekule alespoň jeden tzv. asymetrický uhlík, který váže čtyři různé substituenty. Molekula tím ztrácí jakýkoliv prvek symetrie a otáčí rovinu polarizovaného světla. Toho se využívá ke stanovení koncentrace.

Polarimetrického stanovení koncentrace cukrů se nejvíce využívá v potravinářské chemii, v klinické biochemii lze tuto metodu využít pro stanovení glukosy v moči při glukosurii. Vzorek moči pro toto měření musí být čirý a bezbarvý. Upravuje se nejčastěji protřepáním s vhodným adsorbentem a následnou filtrací nebo centrifugací. Jako adsorbent se osvědčilo aktivní uhlí nebo přípravek na bázi hydroxidu hlinitého (*ALBIL*), vyráběný speciálně pro tyto účely. Výsledek mohou ovlivnit některé další přítomné cukry, např. galaktosa, sacharosa, fruktosa, pentosa, aj. a rovněž bílkoviny (proteinurie). I přes tato omezení lze v praxi polarimetrii využít zejména pro sledování průběhu a léčby chorob, které jsou provázeny poruchami sacharidového metabolismu. Hodnotí se rozdíl mezi množstvím sacharidů přijatých potravou a množstvím nezžitkované glukosy vyloučené močí za 24 hodin (tzv. sacharidová tolerance).

Provedení:

- Na pracovním stole máte připraven roztok glukosy imitující upravený vzorek moči pacienta s glukosurií. Máte změřit optickou otáčivost a vypočítat koncentraci přítomné glukosy (v mmol/l).

$$M(\text{glukosa}) = 180,2 \text{ g/mol}, [\alpha]_{\text{D}}^{20} = +52,5^{\circ}$$

Použité roztoky

1. Destilovaná voda
2. Upravený vzorek moči (imitace)

21. úloha:

Kyselina L-askorbová (vitamin C)

Kyselina L-askorbová je sacharidový derivát odvozený od kyseliny L-gulonové. Endiolové hydroxyskupiny na uhlících C(2) a C(3) způsobují její kyselý charakter ($pK_A = 4,2$) a silné redukční vlastnosti ($E_0 = 0,08$ V). Se svým oxidačním produktem, kyselinou L-dehydroaskorbovou, tvoří redoxní systém, který při biochemických reakcích účinkuje jako neenzymový přenašeč vodíku.

1. Redukční vlastnosti kyseliny L-askorbové

a) Redukce Fe^{3+} kyselinou L-askorbovou

Kyselina L-askorbová redukuje železité ionty na železnaté ($E_0 = 0,77$ V), které poskytují s roztokem hexakvanoželezitanu draselného sytě modré zbarvení tzv. berlínské modři (viz Praktická cvičení z lékařské chemie I). Zelené zbarvení reakční směsi není pozitivním výsledkem.

Provedení:

- Do tří zkumavek připravte reakční směs podle tabulky.

zkumavka	1	2	3
roztok Fe^{2+} ($c = 0,4$ mmol/l) ml	1	-	-
roztok Fe^{3+} ($c = 0,4$ mmol/l) ml	-	1	1
roztok kyseliny askorbové ml	-	1	-
destilovaná voda ml	1	-	1
roztok $K_3[Fe(CN)_6]$ ml	3 kapky	3 kapky	3 kapky
zbarvení			

- Pozorujte, ve kterých zkumavkách dojde k pozitivní reakci, výsledky запиšte do tabulky.

b) Redukce Fehlingova činidla kyselinou L-askorbovou

Kyselina L-askorbová redukuje komplexně vázaný kation měďnatý na oxid měďný ($E_0 = 0,17$ V) mnohem snáze než glukosa. Při důkazu glukosy Fehlingovým činidlem je nutno reakční směs zahřát k varu, zatímco kyselina L-askorbová reaguje již za studena. Tento rozdíl v podmínkách reakce umožňuje rozlišit při kvalitativním důkazu redukujících látek v moči, zda je v moči přítomna glukosa (glukosurie) nebo jiný monosacharid (glykosurie) či jde o kyselinu L-askorbovou, která se do moči vyloučila po nadměrném příjmu vitamínu C.

Provedení:

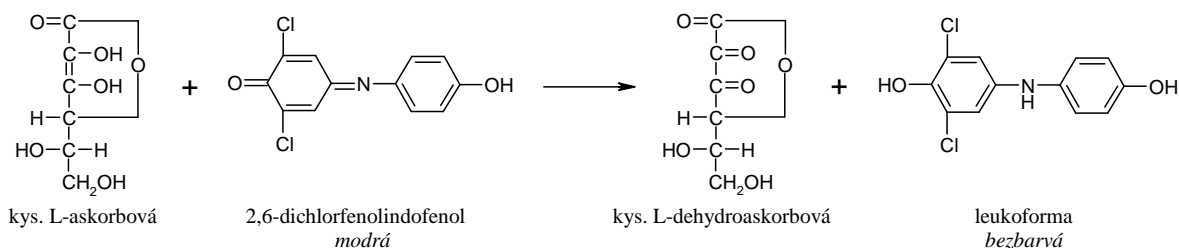
- Do dvou zkumavek připravte reakční směs podle tabulky

zkumavka	1	2
Fehlingův roztok I (ml)	1	1
Fehlingův roztok II (ml)	1	1
roztok kyseliny L-askorbové (ml)	1	-
roztok glukosy (ml)	-	1
výsledek		

- Obsah obou zkumavek dobře promíchejte a pozorujte, ve které zkumavce dojde k redukci Fehlingova činidla za studena. Pak zkumavku 2 zahřejte k varu. Zapište výsledky do tabulky.

2. Stanovení ekvivalentu kyseliny L-askorbové

Titrační stanovení kyseliny L-askorbové je založeno na její snadné oxidovatelnosti za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbové. Jako odměrné činidlo se používá roztok sodné soli 2,6-dichlorfenolindofenolu ($E_0 = 0,22 \text{ V}$), která je v neutrálním a alkalickém prostředí modrá. Redukcí kyselinou L-askorbovou přechází na bezbarvou leukoformu. Bod ekvivalence je určen růžovým zbarvením titrovaného roztoku, protože nezredukováná sodná sůl 2,6-dichlorfenolindofenolu je v kyselém prostředí růžová:



Provedení:

- Do titrační baňky napipetujte 2 ml roztoku kyseliny L-askorbové.
- Titrujte odměrným roztokem sodné soli 2,6-dichlorfenolindofenolu ($c = 1 \text{ mmol/l}$) do růžového zbarvení.
- Titraci proveďte třikrát a vypočítejte průměrnou spotřebu odměrného činidla.
- Získané hodnoty запиšte do tabulky a vypočítejte ekvivalent kyseliny L-askorbové (1 ml odměrného činidla = ? mmol kys. L-askorbové = ? mg kys. L-askorbové). Údaj použijte v následujících výpočtech. M (kys. askorbová) = 176,1 g/mol

spotřeba činidla (ml)			
průměrná spotřeba (ml)			
mmol kys. L-askorbové ve 2 ml			
ekvivalent kys. L-askorbové	1 ml činidla =	mmol =	mg

3. Stabilita kyseliny L-askorbové

Kyselina L-askorbová je v kyselém prostředí poměrně stálá, ale přítomnost i malého množství kovových iontů, např. Fe^{3+} , Cu^{2+} , nebo zvýšená teplota katalyzují její oxidaci vzdušným kyslíkem za současného vzniku peroxidu vodíku.

a) Katalýza oxidace kyseliny L-askorbové ionty Fe^{3+}

- Do titrační baňky odpipetujte 2 ml roztoku kys. L-askorbové, přidejte 0,5 ml chloridu železitého ($c = 4 \text{ mmol/l}$), promíchejte a nechte stát 5 minut.
- Po 5 minutách ztitrujte odměrným roztokem do růžového zbarvení.
- Ze spotřeby odměrného činidla, stanoveného ekvivalentu a výchozí koncentrace kys. L-askorbové vypočítejte její procentuální úbytek v roztoku po přidání iontů Fe^{3+} .
- Výsledek запиšte do tabulky.

b) Sledování stability roztoku kyseliny askorbové při zahřívání

- Do kalibrované zkumavky odměřte 5 ml roztoku kys. L-askorbové, ústí zkumavky uzavřete hliníkovou folií a zahříváte 15 minut ve vroucí vodní lázni.
- Zkumavku s roztokem nechte ve stojánku vychladnout a pak doplňte destilovanou vodou na původní objem 5 ml. Promíchejte.

- Odpipetujte 2 ml tohoto roztoku do titrační baňky a titrujte odměrným roztokem do růžového zbarvení.
- Ze spotřeby činidla, stanoveného ekvivalentu a koncentrace výchozího roztoku kys. L-askorbové vypočítejte její procentuální úbytek po povaření.
- Výsledek zapište do tabulky.

	po přidání Fe ³⁺	po povaření
spotřeba odměrného činidla (ml)		
množství kys. L-askorbové ve 2 ml roztoku (mmol)		
úbytek kys. L-askorbové ve 2 ml roztoku (mmol)		
úbytek kys. L-askorbové (%)		

4. „Saturační test“

Kyselina L-askorbová (vitamin C) je účinné redukční činidlo, na kterém jsou závislé hydroxylační reakce, např. při syntéze kolagenu. Nízká saturace organismu vitaminem C je považována za příčinu zvýšené vnímavosti vůči infekcím, obecný význam této látky však zatím není uspokojivě vysvětlen.

Prekursorem kyseliny L-askorbové je u rostlin a některých živočichů kyselina L-gulonová (vzniká z kyseliny D-glukuronové). Pro primáty (včetně člověka) a morčata, kteří nejsou schopni kyselinu L-askorbovou syntetizovat, je tato sloučenina vitaminem.

Lidský organismus má velkou potřebu vitaminu C (denně 50 – 75 mg), přičemž zásoba činí 1,5 g (nejvíce v nadledvinách). Proto je nutný trvalý přívod potravou, především rostlinnou. Rozhodujícím potravinovým zdrojem je kyselé zelí, brambory a ovoce.

V tomto pokuse je sledována saturace organismu vitaminem C stanovením množství kyseliny L-askorbové vyloučené močí během 3 hodin po vypití 1 g této látky. Organismus je saturován vitaminem C, vyloučí-li se během tříhodinové periody více než 50 mg kyseliny L-askorbové.

Pro zvýšení stability kyseliny L-askorbové je moč nutno okyselit, v konečném objemu moči má být 5% (objemových) kyseliny octové.

Provedení:

- Při zahájení testu (po vymočení) vypijte 1 g kyseliny L-askorbové (2 tablety šumivého Celaskonu) rozpuštěné v 200 ml vody.
- Přesně po třech hodinách od vypití roztoku se vymočte a objem moče změřte v odměrném válci (95%).
- Vypočítejte objem odpovídající 100% a doplňte příslušným množstvím koncentrované kyseliny octové, promíchejte. Celkový objem okyselené moče zapište do tabulky.
- Zjistěte, zda je přítomnost kyseliny L-askorbové prokazatelná Fehlingovou zkouškou (dle návodu 1.b). Výsledek zapište do tabulky.
- Pro stanovení kyseliny L-askorbové v moči odpipetujte 2 ml okyselené moči do titrační baňky.
- Titrujte odměrným roztokem do růžového zbarvení. Spotřebu odměrného činidla zapište do tabulky.
- Ze spotřeby odměrného činidla, stanoveného ekvivalentu kyseliny L-askorbové (v mg) a objemu okyselené moči vypočítejte celkové množství kyseliny L-askorbové (v mg) vyloučené během 3 hodin. Výsledek zapište do tabulky.

- Zhodnoťte saturaci organismu vitaminem C.

objem okyselené moči (ml)	
Fehlingova zkouška	
spotřeba odměrného činidla (ml)	
množství kys. L-askorbové ve 2 ml moče (mg)	
celkové množství kys. L-askorbové (mg)	
saturace organismu	

5. Stanovení koncentrace vitaminu C v ovocné šťávě

- Do titrační baňky odpipetujte 2 ml ovocné šťávy (10x zředěné vodou) a titrujte odměrným roztokem do růžového zbarvení.
- Ze spotřeby odměrného roztoku a stanoveného ekvivalentu kyseliny L-askorbové (v mg) vypočítejte koncentraci vitaminu C ve zředěné ovocné šťávě (v mg/l).
- Získané údaje zapište do tabulky a porovnejte s údajem výrobce.

spotřeba odměrného činidla (ml)	
množství kys. L-askorbové ve 2 ml zředěné šťávy (mg)	
koncentrace kys. L-askorbové ve zředěné šťávě (mg/l)	
koncentrace kys. L-askorbové ve původní šťávě (mg/l)	
údaj výrobce (mg/l)	

Použitá literatura:

Bubnová E., Buděšínská A., Křemen J., Stříbrná J.: Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie III., Karolinum, Praha, 1998

Použité roztoky a činidla:

1. Kyselina L-askorbová (c = 1,25 mmol/l v 5% kys. octové)
2. FeSO₄ (c = 0,4 mmol/l)
3. FeCl₃ (c = 0,4 mmol/l)
4. FeCl₃ (c = 4 mmol/l)
5. K₃[Fe(CN)₆] (c = 0,1 mol/l)
6. Glukosa (c = 1,25 mmol/l)
7. Fehling I (70 g CuSO₄ rozpustit vodou na 1 l roztoku)
8. Fehling II (250 g NaOH a 350 g vlnanu sodno-draselného rozpustit vodou na 1 l roztoku)
9. Titrační roztok (sodná sůl 2,6-dichlorfenolindofenol, c = 1 mmol/l)
10. Kyselina octová (konc.) Pozor, žíravina!
11. Ovocná šťáva

Potenciometrie

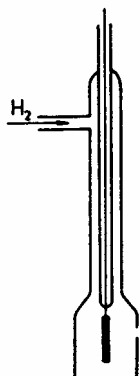
Potenciometrické metody jsou založeny na měření potenciálového rozdílu mezi **indikační** (měrnou) a **referentní** (srovnávací) elektrodou. Změřený potenciálový rozdíl může být využit **přímo**, např. pro zjištění koncentrace vodíkových iontů (pH) nebo (s použitím iontově selektivních elektrod) i řady dalších iontů. V **nepřímých** metodách se využívá potenciometrických měření pro účely tzv. **potenciometrické titrace**.

Ponoříme-li kovovou elektrodu do roztoku, v němž jsou rozpuštěny ionty tohoto kovu, může dojít ke dvěma dějům. Atomy kovu se snaží z povrchu elektrody přecházet v podobě iontů do okolí, na elektrodě se zvyšuje hustota elektronů a po dosažení rovnováhy získá elektroda vůči roztoku určitý záporný potenciál. Kationty z roztoku se také mohou vylučovat na elektrodě jako atomy, přičemž hustota elektronů na elektrodě klesá a po dosažení rovnováhy získá elektroda vůči roztoku naopak určitý kladný potenciál. Velikost potenciálu závisí na několika faktorech, avšak z hlediska analytické chemie je nejdůležitější závislost na koncentraci iontů v roztoku. Hodnotu potenciálu lze určit pomocí **Nernstovy rovnice**:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln c(\text{Me}^{n+}),$$

kde	E	je potenciál elektrody (ve voltech)
	E_0	je standardní elektrodový potenciál ($c(\text{Me}^{n+}) = 1 \text{ mol/l}$, $t = 25^\circ\text{C}$)
	R	je molární plynová konstanta ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
	T	je teplota (v kelvinech)
	n	je iontový náboj (počet uvolňovaných elektronů)
	F	je Faradayova konstanta ($F = 96\,487 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$)
	$c(\text{Me}^{n+})$	je látková koncentrace iontů Me^{n+} (v mol/l)

Potenciál elektrod nelze měřit přímo. Postupuje se proto tak, že se měří rozdíl potenciálů mezi elektrodou indikační a elektrodou referentní, jejíž potenciál je stálý, nezávislý na koncentraci iontů v roztoku.



Jako standard pro vzájemné srovnání standardních potenciálů různých elektrod (E_0) byla zvolena tzv. **standardní vodíková elektroda**, kterou představuje platinový plíšek pokrytý platinovou černí, sycený za dané teploty plynným vodíkem pod tlakem 0,1 MPa a ponořený do roztoku vodíkových iontů o látkové koncentraci 1 mol/l. Potenciál této elektrody má dle konvence při 25°C hodnotu 0,00 V.

K měření rozdílu elektrodových potenciálů (tj. elektrického napětí) se používají milivoltmetry s vysokým vstupním odporem.

Přístroje pro měření pH se nazývají **pH-metry**, které mají kromě stupnice cejchované v mV i stupnici v jednotkách pH vzhledem k platnosti vztahu:

$$E = k \cdot \text{pH}$$

Pro měření koncentrace iontů se používají **ionometry**, kde je kromě stupnice v mV i stupnice pro stanovení jednotlivých iontů (kationtů i aniontů). Přístroje se vyrábějí v analogovém i digitálním provedení. Vzhledem k závislosti elektrodového potenciálu na teplotě jsou některé přístroje vybaveny teplotním čidlem pro automatické přepočítání hodnoty na údaj odpovídající 25°C.

Nezbytnou součástí všech přístrojů jsou **elektrody**, kterým je třeba věnovat velkou pozornost a pravidelnou péči, neboť právě s nimi jsou spojeny nejčastější příčiny poruch, nepřesností a zkreslení výsledků.

Měrné elektrody

U měrných elektrod je, jak vyplývá z Nernstovy rovnice, potenciál závislý na koncentraci iontů v roztoku. Vodíková elektroda je vzhledem k náročnému provedení a složité obsluze pro běžná měření nevhodná. Rovněž další elektrody založené na redoxních dějích (antimonová, chinhydronová) se dnes používají jen vyjíměčně.

V současnosti nejčastěji užívanou elektrodou pro měření pH a pro neutralizační potenciometrické titrace je elektroda **skleněná**. Postavení této elektrody je poněkud vyjíměčné, neboť u ní vznik potenciálu není výsledkem jen redoxních dějů, nýbrž i dějů membránově výměnných, které probíhají v závislosti na pH. Je dodávána spolu s přesnými údaji o jejích vlastnostech a s pokyny pro práci a údržbu. V podstatě je to malá skleněná baňka (průměr 7 až 12 mm) zhotovená ze speciálního skla, do níž zasahuje stříbrná elektroda na povrchu pokrytá vrstvičkou AgCl. U vysokoohmové elektrody je baňka naplněna roztokem HCl

($c = 0,1 \text{ mol/l}$), u nízkoohmové elektrody pufrem s hodnotou pH mezi 4 až 8. Vzniku potenciálu bylo věnováno mnoho pozornosti a byla vytvořena řada teorií. Potenciál je závislý na výměnných a difúzních pochodech a při jistém zjednodušení lze říci, že se vytváří při výměně sodných iontů ze skla za vodíkové ionty z roztoku. Aby k iontovým výměnám došlo, musí být elektroda stále vlhká (ve skle baňky se vytváří gel), a proto je nutno elektrodu chránit před vyschnutím. Elektroda se běžně používá v rozsahu pH 2 až 12, v silně kyselé oblasti se projevuje tzv. *kyselá (negativní) chyba*, v silně alkalických roztocích vzniká *alkalická (pozitivní) chyba*. Obě chyby souvisejí s vlastnostmi skla a povahou probíhajících pochodů. Životnost dobře udržované elektrody se pohybuje okolo 1 až 2 let.

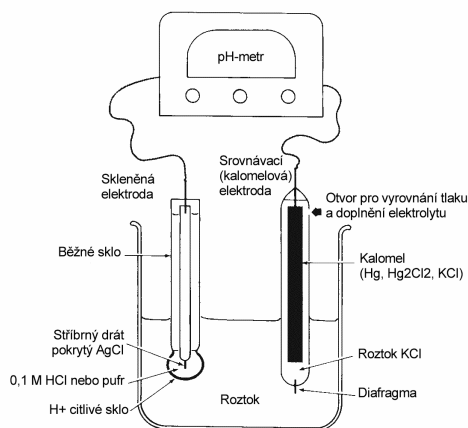


schéma pH-metru se skleněnou a kalomelovou elektrodou

Srovnávací elektrody

Nejčastěji se používá elektroda **kalomelová**, kterou sestavil a popsal W. Ostwald již v roce 1890. Elektroda je tvořena rtuť, chloridem rtuťným (*kalomelem*) Hg_2Cl_2 a roztokem KCl (nejčastěji se používá nasycený roztok). Vodivé spojení s měřeným roztokem je zprostředkováno diafragmou. Elektroda má stálý potenciál $+0,241 \text{ V}$ (při 25°C).

Kromě kalomelové elektrody se v praxi používá rovněž elektroda **argentchloridová**, tvořená stříbrným plíškem nebo drátkem pokrytým chloridem stříbrným v roztoku chloridu draselného známé koncentrace. Potenciál elektrody s nasyceným roztokem KCl je $+0,197 \text{ V}$ (při 25°C).

V případech, kdy při měření vadí chloridové ionty, které mohou difundovat z elektrody kalomelové nebo argentchloridové, se doporučuje použít elektrodu **merkurosulfátovou** (rtuť v nasyceném roztoku Hg_2SO_4 s elektrolytem K_2SO_4). Potenciál této elektrody nemá požadovanou přesnost, hlavním zdrojem chyb je hydrolyza síranu rtuťného v roztoku K_2SO_4 . Proto bývá někdy síran draselný nahrazován roztokem H_2SO_4 ($c = 1 \text{ mol/l}$), ale ani pak nejsou výsledky výrazně lepší. Potenciál merkurosulfátové elektrody je $+0,653 \text{ V}$ (nasycený roztok K_2SO_4), event. $+0,680 \text{ V}$ (s kyselinou sírovou) při 25°C .

Kombinované elektrody

Z praktických důvodů jsou často měrná a srovnávací elektroda spojeny do jednoho celku. Tyto elektrody se nazývají kombinované a dosahují stejné přesnosti a citlivosti jako oddělený elektrodový systém. Např. pH kombinovaná elektroda se nejčastěji skládá ze skleněné a kalomelové elektrody.

Mikroelektrody

V současnosti jsou vyráběny i speciální elektrody pro malá množství vzorku ($20 - 30 \mu\text{l}$) a pro měření za anaerobních podmínek. Jimi jsou vybaveny např. speciální přístroje pro měření pH krve.

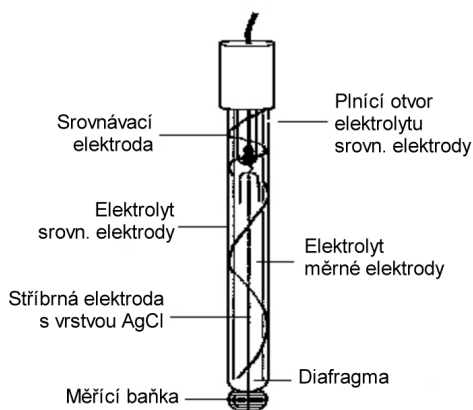


schéma kombinované pH-elektrody

22. úloha:

Potenciometrické měření pH

K určení pH lze použít velmi jednoduché metody (indikátorové papírky, kolorimetrické metody), avšak pro exaktní práci je přesnost těchto stanovení nedostatečná. Proto jsou laboratoře vybaveny **pH-metry**, jimiž lze dosáhnout běžně přesnosti $\pm 0,01$ pH, u dražších přístrojů i vyšší.

Při potenciometrickém měření pH se provede nejprve kalibrace pH-metru, pak se uskuteční vlastní měření. **Kalibrace pH-metru**, při níž se dvěma hodnotám napětí naměřeného při použití kalibračních pufrů přiřadí příslušné hodnoty pH (platí pro dvoubodovou kalibraci), se uskuteční ve dvou krocích. Nejdříve se provede kalibrace na **nulový bod elektrody**. Použije se pufr s hodnotou pH, která se shoduje s hodnotou pH vnitřního pufru skleněné elektrody (nejčastěji $\text{pH} = 7$). K nastavení příslušné hodnoty pH se použije potenciometr „BUFFER“, tím se eliminuje tzv. asymetrický potenciál (charakteristická hodnota každé elektrody, která udává rozdíl mezi teoretickou a skutečně ustavenou hodnotou elektrodového potenciálu). Pak se použije druhý pufr, pomocí kterého se potenciometrem „SLOPE“ kalibruje „*strmost*“ (závislost napětí na pH). Hodnota pH druhého pufru se volí s ohledem na očekávané hodnoty pH měřených vzorků, nejčastěji $\text{pH} = 4$ (pro kyselou oblast) a $\text{pH} = 9$ (pro zásaditou oblast). Po kalibraci přístroje se pak provádí **vlastní měření pH**.

Provedení:

Kalibrace pH-metru:

- Seznámíte se s návodem k obsluze pH-metru a funkcí jednotlivých ovládacích prvků.
- Zkontrolujete připojení elektrod, zapojíte přístroj do sítě a zapnete hlavní vypínač.
- Připravíte přístroj k měření a vyčkáte asi 10 minut potřebných k ustálení vstupních hodnot.
- Mezitím si orientačně (pomocí indikátorových papírků) zjistíte pH předloženého vzorku. Podle toho zvolíte druhý kalibrační roztok.
- Do kádinky nalijete první kalibrační pufr ($\text{pH} = 7$), vyjmete elektrody z ochranného krytu, stříčkou s destilovanou vodou opláchnete, opatrně otřete buničitou vatou a ponoříte do kalibračního roztoku. Elektrody se nesmí dotýkat dna ani stěn kádinky.
- Podle návodu k obsluze přístroje provedete nastavení pH (nulový bod).
- Elektrody vyjmete, stříčkou s destilovanou vodou opláchnete a opět lehce otřete. Kalibrační roztok vrátíte zpět do zásobní lahvičky.
- Do čisté kádinky nalijete druhý kalibrační roztok (pufr $\text{pH} = 4$ pro kyselý vzorek, pufr $\text{pH} = 9$ pro zásaditý vzorek) a elektrody ponoříte do tohoto kalibračního roztoku.
- Podle návodu k obsluze přístroje provedete nastavení pH (strmost).
- Elektrody vyjmete, stříčkou s destilovanou vodou opláchnete a lehce otřete. Kalibrační roztok vrátíte zpět do zásobní lahvičky.

Měření pH:

- Do čisté kádinky přelijete vzorek, ponoříte elektrody a na pH-metru odečtete hodnotu pH.
- Před měřením dalšího vzorku elektrody opláchnete destilovanou vodou a otřete buničitou vatou.
- Po změření všech vzorků elektrody důkladně opláchnete destilovanou vodou, otřete a vložíte zpět do ochranného krytu se skladovacím roztokem. Přístroj vypnete hlavním vypínačem.

Použité roztoky a činidla:

1. Kalibrační roztok pH = 4,01
Hydrogenftalan draselný ($c = 0,05 \text{ mol/l}$)
10,211 g $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ se rozpustí vodou na 1 l roztoku a přidá se několik kapek indikátoru (*p*-dimethylaminoazobenzen), aby vzniklo světle žluté zbarvení.
2. Kalibrační roztok pH = 6,86
Fosfátový pufr ($c = 0,05 \text{ mol/l}$)
6,804 g KH_2PO_4 a 7,098 g Na_2HPO_4 (resp. 17,906 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$) se rozpustí vodou na 1 l roztoku a přidá se několik kapek indikátoru (fenolová červeň), aby vzniklo světle červené zbarvení.
3. Kalibrační roztok pH = 9,18
Tetraboritan sodný ($c = 0,05 \text{ mol/l}$)
19,068 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ se rozpustí na 1 l roztoku a přidá se několik kapek indikátoru (bromkresolová zeleň), aby vzniklo světle modré zbarvení.
4. Vzorky pro měření pH

Potenciometrická titrace

Při potenciometrické titraci se sleduje závislost potenciálu (u neutralizačních titrací i závislost pH) na objemu titračního činidla. Průběh titrací neutralizačních, srážecích, komplexních i redoxních je podobný a výsledná titrační křivka má charakteristický esovitý tvar. Spotřeba titračního roztoku v ekvivalentním bodě se odečte z grafu nebo se získá výpočtem. Výhodou takto prováděných titrací je jejich objektivita, nezávislost na volbě indikátoru a možnost titrovat roztoky zakalené i barevné. Stanovení lze provádět, je-li to nutné, i v inertní atmosféře, je možné provádět mikrostanovení a v současné době se stále významněji uplatňuje i automatizace. Limitujícím faktorem, který se nejvýznamněji podílí na přesnosti stanovení, je (stejně jako u vizuálních titrací) spolehlivé a přesné měření objemů.

23. úloha:

Stanovení titrační křivky vzorku kyseliny

Pro neutralizační titrace je možno použít elektrody vhodné pro měření pH, např. kombinaci elektrody skleněné a kalomelové. Obecně není třeba pH-metr při potenciometrické titraci kalibrovat, neboť pro určení ekvivalentního bodu je rozhodující změna potenciálu, nikoliv jeho absolutní hodnota. S ohledem na požadavek úlohy určit pH v bodech ekvivalence však kalibraci proveďte.

Provedení:Kalibrace pH-metru:

- viz úloha 22

Potenciometrická titrace:

- Odpipetujete do kádinky přesně 10,0 ml předloženého vzorku kyseliny, vložíte míchací tělísko a kádinku postavíte na elektromagnetickou míchačku.
- Byretu naplníte titračním roztokem NaOH a umístíte ji tak, aby bylo možno přidávat titrační roztok do kádinky se vzorkem.

- Elektrody vložíte do kádinky se vzorkem tak, aby byly měrné plochy zcela ponořeny v roztoku. Bude-li to nutné, zvýšíte hladinu přidáním destilované vody. Elektrody se nesmí dotýkat dna ani stěn nádoby.
- Zapnete míchání a seřídíte rychlost. Tělísko se musí volně otáčet, nesmí narážet do elektrod ani stěn kádinky.
- Na stupnici odečtete výchozí hodnotu pH a zahájíte titraci. Budete přidávat titrační roztok po 0,5 ml a titraci ukončíte, až bude docházet po přidání titračního činidla k minimálním změnám pH. Důležité je, abyste zachytili celý průběh titrační křivky a neukončili titraci předčasně.
- Titraci provedete s tímž vzorkem ještě jednou, na začátku titrace (v oblasti malých změn pH) budete přidávat titrační roztok po 0,5 ml, v oblasti „skoku“, která se projevuje velkými změnami pH, budou přidávané objemy menší (0,2 ml), na konci titrace opět objemy zvětšíte na 0,5 ml.
- Po získání všech potřebných hodnot vypnete míchání, vyjmete elektrody, pečlivě je opláchnete a po osušení vložíte zpět do ochranného krytu se skladovacím roztokem. Přístroj vypnete a odpojíte ze sítě.

Vyhodnocení:

Určení koncentrace vzorku (silná a slabá kyselina):

- Titrační křivku příslušné kyseliny sestrojíte na milimetrový papír. Na osu x nanese objem titračního roztoku (ml), na osu y nanese pH a nalezenými body proložíte plynulou křivku. Měřítka na osách zvolíte tak, aby se na křivce projevil strmý skok.
- Metodou podle *Kohna a Zítka* nebo grafickou metodou (viz Praktická cvičení I.) určíte bod ekvivalence, z něhož určíte přibližnou spotřebu titračního činidla a hodnotu pH. Přesnou hodnotu spotřeby, kterou použijete pro výpočet koncentrace vzorku, určíte početně.
- Do tabulky si zapíšete hodnoty objemu titračního roztoku a odpovídající hodnoty pH v okolí ekvivalentního bodu. Vypočítáte rozdíl po sobě jdoucích hodnot pH (tzv. první diference) a pak rozdíl těchto diferencí (tzv. druhá diference). Spotřeba v ekvivalentním bodě se vypočítá ze vztahu:

$$V_t = V^+ + \frac{\Delta^2 \text{pH}^+}{\Delta^2 \text{pH}^+ + \Delta^2 \text{pH}^-} \cdot \Delta V,$$

kde V_t je hledaná spotřeba
 V^+ je objem titračního roztoku odpovídající poslední kladné druhé diference
 $\Delta^2 \text{pH}^+$ je poslední kladná druhá diference
 $\Delta^2 \text{pH}^-$ je první záporná druhá diference
 ΔV je rozdíl objemů TR, mezi nimiž se provádí interpolace, tj. rozdíl objemů mezi poslední kladnou a první zápornou druhou diferencí

- Pro výpočet látkové a hmotnostní koncentrace vzorku použijete známé vztahy:

$$c_v \cdot V_v = c_t \cdot V_t \cdot f \qquad \mu_v = c_v \cdot M_v$$

Ukázka výpočtu spotřeby titračního roztoku:

V_{NaOH} (ml)	pH	ΔpH	$\Delta^2\text{pH}$
4,5	2,35	0,27	+ 0,55
4,7	2,62	0,82	
4,9	3,44	7,74	+ 6,92
5,1	11,18	0,35	- 7,39
5,3	11,53	0,18	- 0,17
5,5	11,71		

$$V_t = 4,90 + \frac{6,92}{6,92 + 7,39} \cdot (5,10 - 4,90) = 5,00 \text{ ml}$$

Spotřeba titračního roztoku v ekvivalentním bodě je 5,00 ml.

- Do protokolu uvedete všechny získané a vypočítané údaje seřazené v přehledné tabulce, graf titrační křivky s ekvivalentním bodem a odpovídající hodnotou pH a výpočet látkové a hmotnostní koncentrace vzorků.

Určení izoelektrického bodu aminokyseliny:

- Titrační křivku předložené aminokyseliny sestrojíte na milimetrový papír. Na osu x nanese objem titračního roztoku (ml), na osu y nanese pH. Nalezenými body proložíte plynulou křivku. Měřítka na osách zvolíte tak, aby se na křivce projevil strmý skok.
- Metodou podle *Kohna a Zítka* nebo grafickou metodou (viz Praktická cvičení I.) určíte bod ekvivalence, z něhož určíte hodnotu pH, která odpovídá izoelektrickému bodu (IEB) dané aminokyseliny.
- Do protokolu uvedete všechny naměřené údaje seřazené v přehledné tabulce, graf titrační křivky s ekvivalentním bodem a odpovídající hodnotou pH v IEB.

Použité roztoky a činidla:

1. Titrační roztok NaOH ($c = 100 \text{ mmol/l}$)
2. Vzorky kyselin: - silná kyselina (HCl)
- slabá kyselina (kys. octová)
- aminokyselina (hydrochlorid aminokyseliny)

Dialýza

Dialýza je dělicí metoda, při níž se uplatňuje difúze a současně polopropustnost membrány. **Difúze** je nevratný děj, při kterém dochází k transportu částic (iontů, molekul) v prostředí tak, aby došlo k vyrovnání složení ve všech místech této soustavy. Difúze je důsledkem neustálého neuspořádaného pohybu částic hmoty a postupuje ve směru koncentračního spádu, tedy i proti zemské tíži. Rychlost difúze je kromě závislosti na povaze částic rozpuštěné látky a rozpouštědla přímo úměrná koncentračnímu gradientu (koncentračnímu spádu, rozdílu koncentrací).

Polopropustná (semipermeabilní) membrána je taková membrána, jejímiž póry mohou projít pouze některé ionty nebo molekuly přítomné v daném prostředí. Membrána je tvořena nejčastěji nabobtnalým celofánem nebo podobnými deriváty celulózy.

K difúzi dochází i v případě, je-li roztok určité látky oddělen od čistého rozpouštědla polopropustnou membránou, kterou dané rozpuštěné částice mohou procházet. Rychlost a směr pohybu difundujících částic přes membránu závisí na rozdílu koncentrací dané látky na obou stranách membrány. Látky difundují z místa vyšší koncentrace do místa nižší koncentrace. Dojde-li k vyrovnání koncentrací, ustaví se dynamická rovnováha a děj se „zastaví“.

Obsahuje-li roztok (tzv. **dialyzát**) směs rozpuštěných látek, z nichž jen některé membránou procházejí do rozpouštědla (tzv. **difuzátu**), lze tímto způsobem směsi dělit a metoda se nazývá dialýza. Umožňuje vzájemné dělení malých a velkých molekul, často se tak dělí roztoky solí od velkých polymerních molekul (např. polysacharidů, polypeptidů, bílkovin, apod.). Hlavním praktickým využitím dialýzy v medicíně je hemodialýza pacientů se selháním ledvin.

K urychlení dělení elektrolytů od neutrálních molekul může být použito elektrické pole (elektrodialýza). Působí-li na dialyzovaný roztok tlak, hovoříme o ultrafiltraci. Na tomto principu vzniká tzv. glomerulární filtrát (primární moč) v ledvině při glomerulární filtraci.

24. úloha

Sledování dialyzační rychlosti chloridů přes celofánovou membránu

V úloze se sleduje dialyzační rychlost chloridů a současně dělení vysokomolekulární a nízkomolekulární látky (škrob a NaCl). Dialyzační membránu bude tvořit celofán, který vytváří póry o průměru 3 až 4 nm. Jimi snadno projdou ionty, jejichž velikost je i s hydratačním obalem okolo 0,5 nm. Makromolekuly škrobu jsou podstatně větší a membránou neprojdou.

Provedení:

Příprava dialyzační nádoby:

- Z připraveného celofánu vystříhnete kruh o průměru 18 cm, který za okraje upevníte ke skleněné trubici. Vzniklou dialyzační nádobku připevníte svorkami do stojanu.
- Do kádinky (objem 250 ml) odměříte 150 ml destilované vody, vložíte míchací tělíčko, postavíte na elektromagnetickou míchačku a nastavíte přiměřenou rychlost míchání.
- Do dialyzační nádoby napipetujete 5 ml 1% roztoku škrobu a 10 ml roztoku NaCl ($c = 1,5 \text{ mol/l}$). Připravíte si stopky, zapnete míchání a v okamžiku, kdy ponoříte dialyzační nádobku do kádinky, začnete měřit čas.

Sledování dialyzační rychlosti:

- V čase 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 minut a dále pak v desetiminutových intervalech z kádinky odebíráte vzorky o objemu 2,5 ml (použijete automatickou pístovou pipetu), které budete průběžně merkurimetry titrovat. Pokus ukončíte, jsou-li tři po sobě jdoucí spotřeby stejné (cca po 90 minutách).

Stanovení chloridů:

Chloridy se stanoví *merkurimetrickou titrací*. Merkurimetrie patří mezi komplexotvorné metody. Titrační roztok $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ tvoří se vzorkem (ionty Cl^-) rozpustný, ale nedisociovaný komplex $[\text{HgCl}_2]$:



Ekvivalentní bod indikuje bílá sraženina $\text{Hg}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, která vzniká s indikátorem (nitroprusid sodný) až po převedení všech iontů Cl^- do komplexu. Titruje se (nejlépe proti černému pozadí) do vzniku prvního bílého zákalu (nikoliv mléčně bílé sraženiny). Při titraci dodržujte bezpečnostní opatření, protože roztok $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ je toxický!

- K odebranému vzorku přidáte 2,5 ml destilované vody a 3 kapky indikátoru $[\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]]$ a ztitrujete roztokem $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ do vzniku prvního bílého zákalu. Z nalezených spotřeb vypočítáte koncentraci jednotlivých vzorků a látkové množství chloridů prošlých celofánovou membránou (v mmol):

$$c_v = \frac{c_t \cdot V_t \cdot f_t}{V_v} \quad [\text{mmol/l}]$$

$$n_v = c_v \cdot V_{\text{dif}} \quad [\text{mmol}],$$

za V_{dif} se dosazuje objem difuzátu (v litrech), který se průběžně (po odběru vzorků) mění.

Průkaz škrobu:

- Po ukončení dialýzy odeberete do zkumavky 2,5 ml roztoku difuzátu a do druhé zkumavky 2,5 ml roztoku dialyzátu. Do obou zkumavek přidáte 3 kapky Lugolova roztoku (roztok jodu) a porovnáte zbarvení. (Škrob se jodem barví modře.) Výsledek pokusu zhodnotíte.

Vyhodnocení rychlosti dialýzy:

Vyhodnocení provedete graficky. Na milimetrový papír naneste na osu x čas (v minutách), na osu y látkové množství chloridů (mmol). Vynesenými body proložíte optimální křivku (*dialyzační křivka*). Osu x rozdělíte na pětiminutové intervaly (čas t_1, t_2, t_3, \dots) a k těmto hodnotám přiřadíte z dialyzační křivky odpovídající látkové množství chloridů (n_1, n_2, n_3, \dots), které odečtete na ose y . (Pro $t_0 = 0$ je $n_0 = 0$).

Dialyzační rychlost (v) udává látkové množství Cl^- prošlé celofánovou membránou za minutu.

$$v_1 = (n_1 - n_0) : 5 \quad [\text{mmol Cl}^-/\text{min}]$$

$$v_2 = (n_2 - n_1) : 5$$

$$v_3 = (n_3 - n_2) : 5, \text{ atd.}$$

Sestrojíte graf dialyzační rychlosti: na osu x naneste čas (min), na osu y vypočítanou rychlost (mmol Cl^-/min). V místě, kde křivka protíná osu x odečtete čas, kdy se vyrovnaly osmotické poměry na obou stranách membrány (dialýza skončila). Dále křivku prodloužíte (extrapolujete) tak, aby protla osu y a odečtete v_0 (tzv. **počáteční rychlost**). Tuto hodnotu nelze přímým měřením zjistit. Může sloužit jako charakteristika daného dialyzačního systému.

Grafy spolu s celkovým zhodnocením a vysvětlením výsledků přiložíte k protokolu.

Použité roztoky a činidla:

1. 1% roztok škrobu
2. roztok NaCl ($c = 1,5 \text{ mol/l}$)
3. titrační roztok $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 12,5 \text{ mmol/l}$)
4. $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ (10% roztok, připravuje se čerstvý)
5. Lugolův roztok (4 g KI rozpustit ve 100 ml vody a přidat 1,3 g jodu)

Osmóza

Jsou-li dva různě koncentrované roztoky od sebe odděleny semipermeabilní membránou propustnou pouze pro molekuly rozpouštědla, dochází k tomu, že část rozpouštědla přejde z místa menší koncentrace do místa vyšší koncentrace tak, aby se rozdíl koncentrací vyrovnal. Tento jev se nazývá **osmóza**.

Osmózu lze kvantifikovat pomocí **osmotického tlaku (Π)**, tlaku, který je nutno vyvinout na koncentrovanější roztok, aby se zabránilo osmóze. Mechanismus vzniku osmotického tlaku není zatím zcela jasný, není však vyvolán přímo rozpuštěnou látkou, ale snížením aktivity rozpouštědla přítomností rozpuštěné látky v roztoku. Osmotický tlak závisí především na počtu částic rozpuštěných v roztoku a prakticky nezávisí na jejich druhu, velikosti a náboji. Pro vyjádření osmotických poměrů v roztoku se proto zavádí pojem **osmolalita**, druh koncentrace nezávislý na teplotě a na vlastnostech rozpuštěných látek (velikosti molekul). Osmolalita vyjadřuje celkové **látkové množství všech osmoticky aktivních částic** rozpuštěných v jednotkové hmotnosti čistého rozpouštědla. Jednotkou je mol/kg, resp. mmol/kg, pro něž se ve starší literatuře používalo označení Osmol/kg, resp. mOsmol/kg.

1 mol látky v 1 kg vody představuje roztok s osmolalitou:

glukosa	1 mol/kg
NaCl (při 100% disociaci)	2 mol/kg
NaCl (při 86% disociaci v krevní plasmě)	1,86 mol/kg
AgCl (nerozpuštěný ve vodě)	0 mol/kg

Osmolalitě 1 mol/kg odpovídá osmotický tlak 2,7 MPa. Velikost osmotického tlaku jednotlivých součástí biologických systémů a roztoků, které se do nich aplikují, se obvykle posuzuje vzhledem k určitému „standardu“, kterým byla v lidské fyziologii zvolena krevní plasma. K vyjádření rozdílu osmotického tlaku se často používá termín **tonicita**. Roztok, který má stejný osmotický tlak jako plasma, se nazývá **izotonický**, roztok s nižším osmotickým tlakem **hypotonický** a s vyšším osmotickým tlakem **hypertonický**.

Osmóza má nesmírný význam v biologických soustavách, neboť se podílí na transportu vody mezi buňkou a extracelulární tekutinou. Rostliny navíc osmózou přijímají vodu. U živočichů reaguje každá buňka na osmotickou změnu prostředím změnou svého objemu. Nachází-li se buňka v hypertonickém prostředí, dochází k přechodu vody z buňky do okolí, což má za následek její smršťování a současně se obsah buňky koncentruje. Tento jev byl ne zcela vhodně nazván plasmolýza. Nachází-li se buňka naopak v hypotonickém, dochází k „nasávání“ vody do buňky, plasma se tím zředí a buňka současně zvětšuje svůj objem, může dojít až k destrukci buněčné membrány. V případě erytrocytů se tento jev nazývá **hemolýza**.

Biologické membrány však nelze považovat za ideální semipermeabilní membrány, ale jsou to složité dvojvrstvy a vícevrstvy, kterými některé látky volně prostupují a jiné jsou přenášeny aktivním transportem.

Osmotické poměry se v medicíně často zkoumají v souvislosti se zachováním stálosti vnitřního prostředí organismu a zjišťují se v krevní plasmě nebo v moči. Osmolalita plasmy je za fyziologických podmínek 285 ± 10 mmol/kg vody, čemuž odpovídá osmotický tlak 0,78 MPa. Osmotický tlak odpovídající bílkovinné složce plasmy má název **onkotický tlak** a činí cca 0,3 % celkového osmotického tlaku plasmy. Osmolalita moči se nachází v podstatně širším rozmezí (50 – 1400 mmol/kg vody), protože stálost osmotických poměrů v organismu udržují především ledviny.

Praktický význam má i tzv. **reverzní osmóza**. Při tomto ději se působí tlakem na roztok, který je od čistého rozpouštědla oddělen polopropustnou membránou. Při dostatečném tlaku dochází k opačnému toku rozpouštědla než u osmózy, rozpouštědlo (nejčastěji voda) přechází z prostředí roztoku do prostředí rozpouštědla. Tímto způsobem je možno připravovat tzv. deionizovanou vodu, která nahrazuje vodu destilovanou.

Přítomnost osmoticky aktivní látky v roztoku mění i další, tzv. koligativní vlastnosti (vlastnosti prakticky závislé pouze na počtu částic), např. snížení tenze par nad roztokem, zvýšení bodu varu roztoku (ebulioskopický efekt), snížení bodu tuhnutí roztoku (kryoskopický efekt). Toho se využívá při měření osmolality pomocí přístrojů – osmometrů.

25. úloha:

Demonstrace osmózy

a) Demonstrace osmózy na celofánové membráně

- Na širší skleněnou trubici upevníte připravený celofán a do trubice vlijete 50 ml roztoku sacharózy.
- Trubicí umístíte do kádinky s destilovanou vodou tak, aby hladiny kapalin v kádince a trubici byly ve stejné úrovni, a necháte 3 hodiny stát v klidu.
- Srovnáte úrovně hladin.

b) Demonstrace osmózy na erythrocytu

- Bříško prstu desinfikujete a pak na podložní sklíčko odeberete kapku kapilární krve.
- 10 μl krve přenesete na druhé podložní sklíčko s 50 μl fyziologického roztoku a pipetováním promícháte.
- Preparát překryjete krycím sklíčkem a sledujete tvar a velikost erythrocytů pod mikroskopem se zvětšením 400x.
- Na jeden kraj sklíčka napipetujete 10 μl destilované vody a sledujete chování erythrocytů v tomto prostoru.
- Na protější kraj sklíčka napipetujete 10 μl nasyceného roztoku NaCl a opět pozorujete chování erythrocytů.
- Zhodnotíte chování erythrocytu v hypotonickém, izotonickém a hypertonickém roztoku.

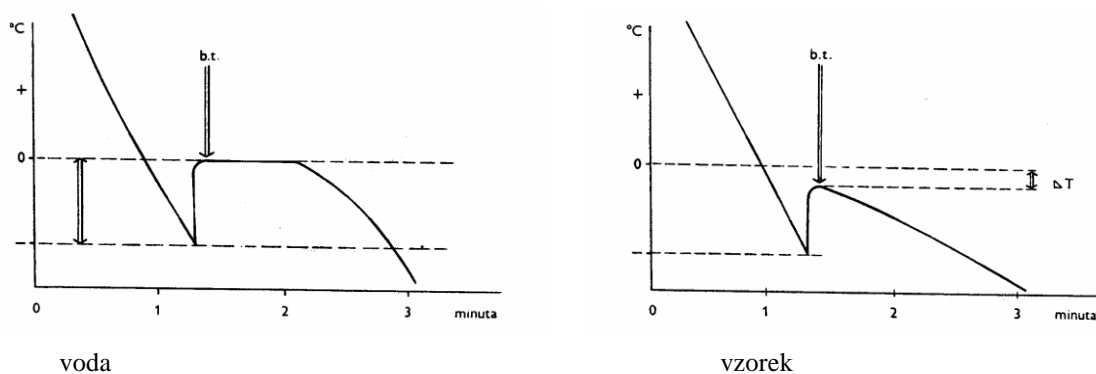
Použité roztoky a činidla:

1. nasycený roztok sacharózy
2. fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl)
3. roztok NaCl (nasycený)

26. úloha:

Stanovení osmolality na principu kryoskopického efektu

V současné době je většina osmometrů založena na principu měření kryoskopického efektu. Měřící komůrka osmometru se naplní rozpouštědlem (destilovanou vodou) a termoelektricky se pomocí Peltierova článku ochladí pod bod tuhnutí. V okamžiku, kdy vyšetřovaná voda začne tuhnout, vystoupí přesně sledovaná teplota k jejímu bodu tuhnutí (uvolňuje se skupenské teplo tuhnutí) a teprve pak pokračuje ochlazování zmrzlé vody. Stejný postup se opakuje s vyšetřovaným roztokem. Pokles bodu tuhnutí roztoku proti bodu tuhnutí čistého rozpouštědla je přímo úměrný osmolalitě. Teplotní křivky obou měření ukazuje obrázek.



Provedení:

Stanovení teploty tuhnutí vody a roztoku bude provedeno ionometrem MS 31, který je uzpůsoben i k měření teploty a vybaven teplotním čidlem Pt 100 (platinová odporová sonda s elektrickým odporem 100Ω při $0 \text{ } ^\circ\text{C}$). Tímto přístrojem lze měřit teplotu s rozlišením $0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Určení bodu tuhnutí vody:

- Zapněte přístroj hlavním vypínačem na zadní straně, na přední straně zvolte příslušným tlačítkem režim měření teploty.
- Připravte si chladicí lázeň: do kádinky (400 ml) vložte rozdrcený led, přidejte 1 větší lžící soli a dobře promíchejte. Kádinku vložte do polystyrenového izolačního pouzdra.
- Měrnou zkumavku naplňte ke značce destilovanou vodou a vložte ji na uzávěr s upevněným teplotním čidlem a rotačním míchadlem.
- Potenciometrem „STIRRER“ nastavte vhodné otáčky míchadla.
- Vložte měrnou zkumavku s teplotním čidlem do chladicí lázně a začněte měřit čas pomocí přiložených stopek.
- V desetisekundových intervalech odečítejte teplotu vody ve zkumavce, dokud její hodnota nezůstane aspoň po dobu 2 minut konstantní.
- Závislost teploty na čase vynesete do grafu, z něhož určíte bod tuhnutí vody.

Určení bodu tuhnutí vyšetřovaného roztoku:

- Zkumavku kryoskopu naplňte po rysku vyšetřovaným roztokem.
- Stejným postupem jako u vody zjistěte teplotu tuhnutí vyšetřovaného roztoku.

Určení osmolality:

- Z bodů tuhnutí vody a vyšetřovaného roztoku vypočítáte snížení bodu tuhnutí vzorku (ΔT).
- Určíte osmolalitu (c_m) vyšetřovaného vzorku podle vzorce:

$$c_m = \frac{\Delta T \cdot 1000}{1,86} \quad ,$$

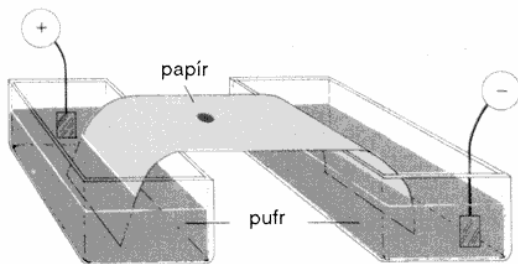
kde c_m je osmolalita roztoku (v mmol/kg) a ΔT je snížení bodu tuhnutí roztoku (v °C).

Použité roztoky a činidla:

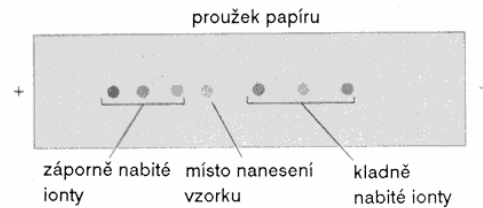
1. vzorek (roztok NaCl)

Elektroforéza

Elektroforéza je metoda umožňující dělení látek na základě jejich různé pohyblivosti v elektrickém poli. Směs dělených látek se nanese do prostoru mezi elektrody, které jsou pak připojeny ke zdroji elektrického napětí a vzniklé elektrické pole způsobuje pohyb elektricky nabitých částic. Dělit lze obecně různé směsi nabitých částic, ale prakticky se elektroforéza nejvíce využívá k frakcionaci **bílku** a **nukleových kyselin**. Je používána jak v kvalitativním, tak i kvantitativním provedení (složení dělené směsi), a také jako metoda preparativní (izolace složky dělené směsi).



Elektroforéza



Elektroferogram

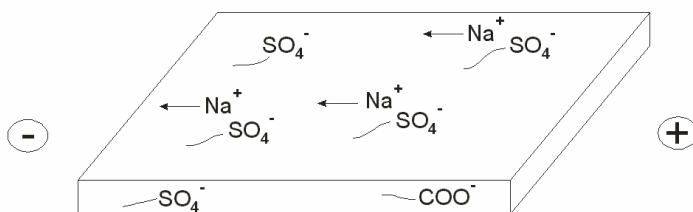
Rychlost migrace nabitých částic závisí na **hodnotě jejich náboje**, na **velikosti částic** (molekulové hmotnosti) a na **jejich tvaru**.

Rychlost pohybu částic dále závisí na **vlastnostech prostředí** a na vloženém **napětí**. Použití vyššího napětí, při němž probíhá dělení rychleji, je limitováno maximální použitelnou hodnotou elektrického proudu. Protékající proud po připojení elektrického napětí závisí podle Ohmova zákona ($I = U / R$) na elektrickém odporu elektroforetického prostředí. Při průchodu elektrického proudu vodičem (i kapalným) se uvolňuje tzv. Jouleovo teplo, které je úměrné protékajícímu proudu ($Q = R \cdot I^2 \cdot t$). Může být tedy použit pouze takový elektrický proud, který nezpůsobí přehřátí prostředí, což by zvýšilo difúzi částic (a tím zhoršilo kvalitu dělení), způsobilo by rychlé odpařování elektrolytu a precipitaci dělených látek.

Podle provedení se elektroforéza dělí na volnou a zónovou. Při **volné elektroforéze** dělení probíhá přímo v roztoku volného elektrolytu, ale vzhledem k rušivým vlivům (proudění kapaliny) je provedení technicky velmi náročné a kromě kapilární elektroforézy se běžně nepoužívá. Při **zónové elektroforéze**, prováděné na nosičích, k volnému pohybu elektrolytu nedochází. Nosič může být inertní (papír, acetát celulosy) nebo může s dělenými molekulami vykazovat specifické interakce (agarový, agarosový a polyakrylamidový gel).

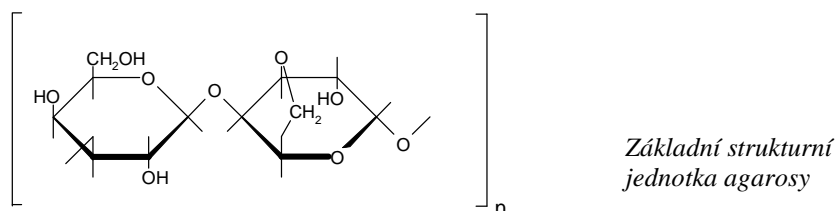
Elektroforéza na papíře (nosičem je chromatografický papír zvlhčený elektrolytem), která byla historicky první, je v současné době nahrazena efektivnějšími způsoby dělení. Hlavními nevýhodami je nutnost používat vysoké napětí, dlouhá doba provedení (4 - 5 hodin) a neostře rozdělení. Kvantitativní vyhodnocení je zdlouhavé a málo přesné. Proto ji v současné době v klinické biochemii nahrazuje **elektroforéza na acetátu celulosy**, jejíž výhodou je ostré dělení, krátký čas provedení (15 - 30 minut), použití malého množství vzorku, snadná příprava nosiče (komerčně dodávaná fólie se pouze nasatí elektrolytem) a možnost densitometrického vyhodnocení.

Elektroforéza na agarovém gelu využívá jako nosič agar izolovaný z mořských řas (směs polysacharidů agarosy a agaropektinu). Agar obsahuje vázané záporně nabitě skupiny, s kterými následně asociují kationty elektrolytu. Tyto vázané kationty se v elektrickém poli uvolňují a způsobují tok elektrolytu směrem ke katodě, **elektroendoosmózu (EEO)**. Tento děj působí proti pohybu záporně nabitých částic a u pomalu migrujících částic může způsobit i jejich přesun za start („pohybují“ se ke katodě).



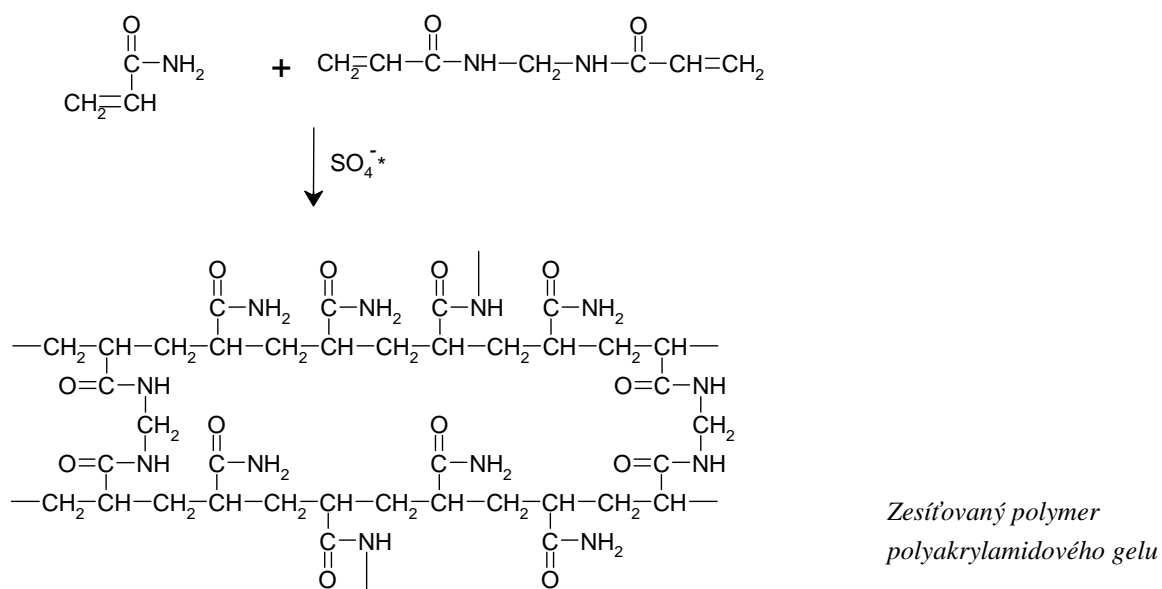
elektroendoosmóza

Další široce používanou analytickou metodou je **elektroforéza na agarosovém gelu**, která má nízkou elektroendoosmózu a ve srovnání s acetátem celulosy vyšší rozlišovací schopnost při zachování ostatních výhod. Dělicí schopnost gelu se ovlivňuje koncentrací agarosy (obvykle 0,5 - 6%), čemuž odpovídá velikost pórů od 300 do 100 nm. Chemicky je agarosa polykondenzátem agarobiosy, disacharidu tvořeného β -D-galaktopyranosou (1,3-vazba) a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosou (1,4-vazba).



V některých případech se osvědčila i **elektroforéza na škrobovém gelu**. Používá se např. pro rozlišení a identifikaci typu haptoglobinu při paternitních sporech. Dělení se provádí ve speciálních rámečcích naplněných gelem, který se připravuje z pufovaného, částečně hydrolyzovaného škrobu.

Vysokou rozlišovací schopnost má **elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE)**. Gel vzniká polymerací základního monomeru - akrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) a síťovacího monomeru - N, N'-metylen-bis-akrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$).



Složením polymerační směsi lze ovlivnit zesíťování polymeru, tedy velikost ok v gelu. Pomocí PAGE lze dělit menší proteiny, RNA a kratší úseky DNA. Výhodou polyakrylamidového gelu je snadná příprava, dobré mechanické vlastnosti, průhlednost, absence elektricky nabitých skupin, z čehož vyplývá nízká adsorpce a elektroendoosmóza. Poskytuje nejlepší rozlišení (lidské sérum děleno až na 35 frakcí). Nevýhodou gelu je jeho toxicita.

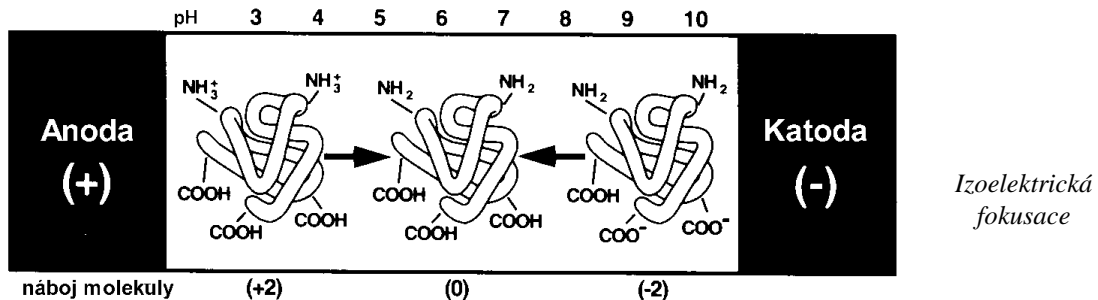
Modifikací metody při dělení proteinů je **elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s laurylsíranem sodným (SDS-PAGE)**. Laurylsíran sodný (dodecylsulfát sodný, SDS) je detergent, který způsobuje silnou denaturaci proteinů (mění tvar do válcovité podoby) a navíc se váže s proteiny v konstantním hmotnostním poměru (1,4 g SDS/1 g proteinu, tj. 1 molekula SDS na 2 aminokyselinové zbytky). Vzhledem k vysokému náboji vázaného SDS lze zanedbat vlastní náboj proteinu. Protože mají všechny molekuly přibližně stejný tvar a náboj odpovídající velikosti proteinu (vlivem vázaného SDS), použitím SDS-PAGE se rozdělí podle své molekulové hmotnosti.

Podle uspořádání se elektroforéza dělí na horizontální, vertikální a kapilární (CE). **Horizontální elektroforéza** se používá pro detekce na agarosových gelech, polyakrylamidových gelech větší tloušťky s nízkým zesíťováním a pro izolaci rozdělených frakcí na preparačních gelech. **Vertikální elektroforéza** se používá především pro analytické účely. Výhodou je homogenní polymerace gelu, tenkost gelu a tedy potřeba malého množství vzorku a možnost paralelního provedení ve více drahách. **Kapilární elektroforéza** se provádí ve velmi tenkých a dlouhých kapilárách (průměr 0,05 - 0,1 mm, délka až 1 m) plněných polyakrylamidovým gelem nebo analytickým pufrem. Vzhledem k vyššímu elektrickému odporu prostředí se

dělení provádí při vysokém napětí. K detekci se používá nejčastěji UV-fotodetektor umístěný na konci kapiláry. Výhodou je rychlost, vysoká rozlišovací schopnost, nízká spotřeba vzorku a možnost značné automatizace.

Pro lepší rozlišení frakcí vzorku v gelu (ostrost zón) se používá tzv. **diskontinuální (disková) elektroforéza**, při níž se současně používají dva typy gelů. V prvním gelu se vzorky zkoncentrují do úzkých proužků, ve druhém gelu probíhá vlastní dělení.

Dalším vylepšením elektroforetických metod je použití gradientových gelů – gelů, v nichž se určitá vlastnost postupně mění. Využívají se gely s **gradientem hustoty gelu** (velikosti pórů), gely s **gradientem iontové síly gelu** (mění se pohyblivost částic v elektrickém poli) nebo (pro proteiny) **gely s gradientem pH**, tzv. izoelektrická fokusace (IEF). Při izoelektrické fokusaci se dělené látky pohybují od katody (-), kde je nejvyšší pH, k anodě (+), kde je pH nejnižší. Při dosažení izoelektrického bodu jsou navenek elektroneutrální a ztratí pohyblivost.



Kombinací SDS-PAGE a IEF je dvourozměrná elektroforéza. Nejprve se pomocí IEF složky rozdělí podle izoelektrického bodu, pak se v kolmém směru pomocí SDS-PAGE rozdělí podle molekulové hmotnosti.

Detekce elektroferogramu se provádí selektivním barvením. Vhodně zvolené barvivo je pevně adsorbováno v místě výskytu vzorku a při následném odbarvování se barvivo uvolní pouze z okolí. Barvivo tedy zůstává zachyceno pouze v místě výskytu vzorku a intenzita zbarvení odpovídá množství vzorku. Elektroferogram lze vyhodnocovat jak kvalitativně, tak i kvantitativně a to **densitometricky**. Densitometr je fotometr speciálně konstruovaný pro měření intenzity zbarvení jednotlivých zón („proužků“) elektroferogramu na průhledném nosiči.

Elektroforéza je základním nástrojem metod molekulární biologie a studia proteinů. V klinické biochemii se elektroforéza používá především k analýzám proteinů (vyšetření plasmatických bílkovin, vyšetření lipoproteinů, dělení izoenzymů, analýza moči při proteinurii, vyšetření bílkovin mozkomíšního moku).

27. úloha:

Elektroforetické dělení plasmatických bílkovin na agarosovém gelu

Bílkoviny jsou biopolymery vzniklé polykondenzací asi dvaceti základních aminokyselin. Funkční skupiny některých aminokyselin (Asp, Glu, Lys, Arg, His) nacházející se v postranním řetězci proteinu mohou při vhodném pH disociovat a bílkovina tím získá určitý iontový náboj. Za fyziologických podmínek při pH krve 7,40 je v plasmě 15 až 17 mmol/l záporných proteinátových nábojů.

Plasmatické bílkoviny tvoří podstatnou a zcela specifickou součást krve. Normální hladina je 62 až 82 g/l. Mají důležitou roli transportní (např. bilirubinu, lipidů, některých hormonů aj.), podílejí se na udržování osmotických poměrů, na iontové i acidobazické rovnováze, na imunitních dějích a v krizových stavech mohou mít i význam nutriční. Jejich spektrum je širší než počet jejich elektroforetických frakcí, neboť nelze mezi sebou rozlišit látky se stejnou elektroforetickou pohyblivostí.

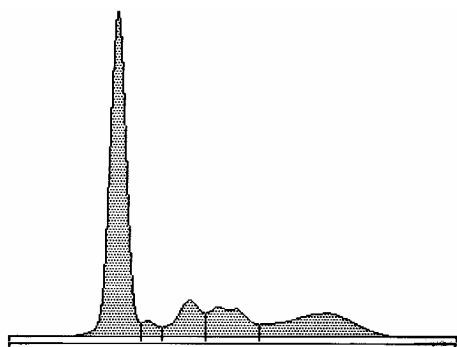
Při dělení v alkalickém prostředí (pH = 8,6) lze získat tyto elektroforetické frakce:

- (+)
- | | |
|--------------------------|----------|
| 1. albuminy | 53 - 65% |
| 2. α_1 -globuliny | 2 - 4% |
| 3. α_2 -globuliny | 8 - 13% |
| 4. β -globuliny | 9 - 16% |
| 5. γ -globuliny | 11 - 19% |

(-) **start**

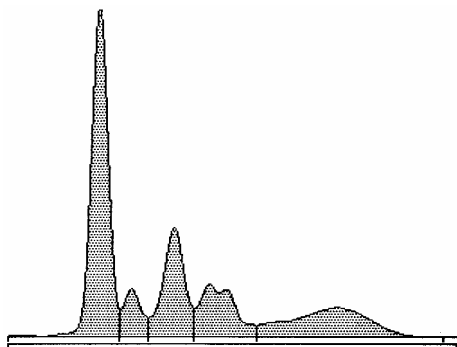
Hodnotí se rovněž poměr albuminové a globulinové frakce (tzv. *albumino-globulinový koeficient* A/G, normální hodnota - vyšší než 1,2)

Vyhodnocení se provádí na densitometrech, které zaznamenají rozložení frakcí, odečtou na elektroforeogramu jejich plochu a vyjádří ji ve vzájemném poměru. Při různých závažných patologických stavech (akutní a chronické záněty, onemocnění ledvin a jater, imunitní problémy, poruchy v oblasti lipoproteinů, nádorová onemocnění aj.) je provedení elektroforetického dělení nezbytnou součástí posouzení stavu vyšetřované osoby.



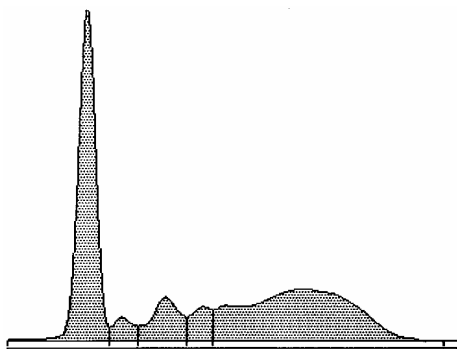
Elektroferogram – normální nález

Plasmatické bílkoviny		
vzorek: 1	datum: 17.5.1999	
A/G: 1,35		
Název	%	Normální hodnoty
alb	57,4	53 - 65
α_1	2,6	2 - 4
α_2	9,7	8 - 13
β	11,8	9 - 16
γ	18,5	11 - 19



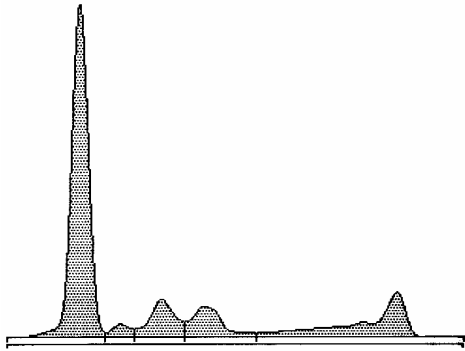
Elektroferogram – akutní zánět

Plasmatické bílkoviny		
vzorek: 2	datum: 11.5.1999	
A/G: 0,76		
Název	%	Normální hodnoty
alb	43,2	53 - 65
α_1	6,5	2 - 4
α_2	17,9	8 - 13
β	14,2	9 - 16
γ	18,2	11 - 19



Elektroferogram – chronický zánět

Plasmatické bílkoviny		
vzorek: 3	datum: 13.4.1999	
A/G: 0,69		
Název	%	Normální hodnoty
alb	40,9	53 - 65
α_1	3,4	2 - 4
α_2	8,7	8 - 13
β	4,8	9 - 16
γ	42,2	11 - 19



Plasmatické bílkoviny

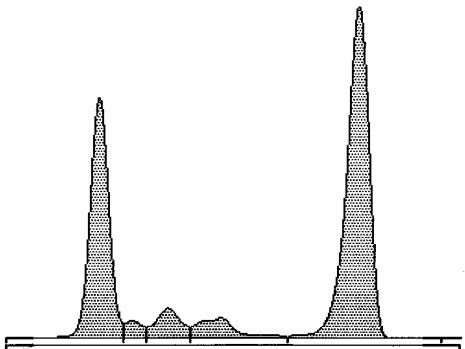
vzorek: 4

datum: 4.11.1998

A/G: 1,39

Název	%	Normální hodnoty
alb	58,1	53 - 65
α 1	2,6	2 - 4
α 2	10,1	8 - 13
β	10,1	9 - 16
γ	19,1	11 - 19

Elektroferogram – monoklonální hypergammaglobulinémie (myelom)



Plasmatické bílkoviny

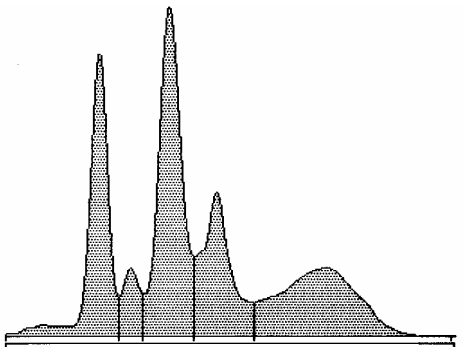
vzorek: 5

datum: 11.3.1999

A/G: 0,48

Název	%	Normální hodnoty
alb	32,5	53 - 65
α 1	2,2	2 - 4
α 2	5,59	8 - 13
β	5,8	9 - 16
γ	54,0	11 - 19

Elektroferogram - monoklonální hypergammaglobulinémie (myelom – pokročilé stádium)



Plasmatické bílkoviny

vzorek: 6

datum: 26.2.1999

A/G: 0,30

Název	%	Normální hodnoty
alb	23,0	53 - 65
α 1	4,8	2 - 4
α 2	31,6	8 - 13
β	17,3	9 - 16
γ	23,3	11 - 19

Elektroferogram – nefrotický syndrom

Provedení:

- Skleněnou desku s agarosovým gelem osušíte filtračním papírem.
- Na spodní třetinu gelu (asi 2 cm od okraje) přiložíte nanášecí šablonu. Otvory šablony naplníte vzorkem séra zředěného pufrům v poměru 1 : 3 a necháte 5 minut vsakovat. Pak odsajete přebytek séra proužkem filtračního papíru a sejmete šablonu.
- Desku vložíte do připravené elektroforetické komory naplněné pufrům agarosovou vrstvou dolů na můstky ze složeného chromatického papíru a lehce přitisknete.
- Komoru přikryjete víkem a připojíte zdroj napětí. (Provádí laborantka!)
- Dělení necháte probíhat 25 minut při napětí 100 V.
- Odpojíte zdroj napětí, sejmete víko a vyjmete gel. (Provádí laborantka!)
- Fixace a barvení:
 - 5 minut fixujete v kyselém alkoholu
 - 8 minut barvíte v barvicí lázni amidočerně
- Odbarvení
 - 15 minut odbarvujete v 5% kyselině octové
 - 2 minuty fixujete v kyselém alkoholu
 - 10 minut odbarvujete v 5% kyselině octové (nový roztok)
- Gel přenesete ze skla na filtrační papír, zvolna usušíte a přiložíte k protokolu.

Použité roztoky a činidla

1. Pufr: 2,76 g kyseliny diethylbarbiturové a 15,40 g diethylbarbiturátu sodného rozpustit na 1500 ml roztoku
2. Agarosový gel: 1,0 g agarosy a 0,6 g arabské gumy rozvařit ve 100 ml pufru (roztok 1) na vodní lázni
3. Fixační roztok: 600 ml ethanolu a 100 ml konc. kyseliny octové doplnit vodou na objem 1000 ml
4. Barvicí roztok: 1,0 g amidočerně, 30 ml konc. kyseliny octové a 6,8 g octanu sodného doplnit vodou na objem 1000 ml
5. Odbarvovací roztok - kyselina octová (5% roztok)
6. Krevní sérum
7. Skleněné desky s agarosovým gelem
Mezi dvě skleněné desky (10x10 cm) se vloží gumový rámeček, skla se stisknou svorkami a mezi ně se pipetou pomalu nalije asi 8 ml horké agarosy (roztok 2) tak, aby byl prostor mezi skly zcela vyplněn. Nesmí vzniknout vzduchové bubliny. Nechá se při laboratorní teplotě ztuhnout (asi 30 minut), pak se uvolní svorky a opatrně se stáhne horní sklo. Deska se vloží do vlhké komůrky a uloží do chladničky. Takto se může uchovávat 5 dnů.

Imunochemické metody

Tyto velmi citlivé a vysoce specifické metody jsou založeny na reakci antigenu s protilátkou. Pronikne-li cizorodá látka (antigen) do živého organismu, vyvolá tvorbu specifické protilátky, která se na antigen naváže. Tvorba protilátek probíhá výhradně *in vivo*, avšak reakci antigenu s protilátkou lze vyvolat i mimo organismus (*in vitro*).

Vazba antigenu s protilátkou nemá chemickou povahu. Je tvořena hlavně van der Waalsovými silami a pravděpodobně i vodíkovými můstky. Aby došlo k interakci, musí dojít ke kontaktu na poměrně velké ploše. Vlastní reakce se uskuteční v tzv. vazebném místě, které má odpovídající strukturu u obou látek. Tím je dána vysoká specifita probíhajících dějů. Imunochemické metody našly velké uplatnění při výzkumu a byly rovněž vyvinuty biochemické metody, které se používají v klinické biochemii a imunologii k identifikaci bílkovin, hormonů apod.

Imunoprecipitace

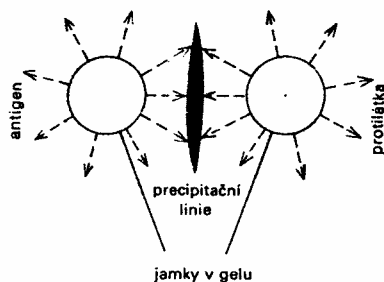
K průkazu vazby [antigen-protilátka] lze využít řady fyzikálně-chemických metod (ohyb světla, precipitace, radiometody), velmi rozšířená je zejména precipitace prováděná na gelovém nosiči. V první fázi proběhne vlastní reakce (navázání) antigenu a protilátky bez vnějších změn. Zviditelnění se provede pomocí precipitace, kterou lze vyvolat vlivem elektrolytů nebo změnou vnějších podmínek. Reakce je velmi citlivá, lze prokázat antigen v koncentraci 10^{-3} až 10^{-4} mg/ml.

Protilátky se získávají imunizací vhodných laboratorních zvířat potřebným antigenem. Nejčastěji se používá antisérum koňské nebo králičí.

28. úloha:

Imunoprecipitace lidského séra koňským antisérem

V této úloze bude využito metody dvojité difúze na agarovém gelu. Do malého otvoru v agarové vrstvě se nanese sérum a proti němu v určité vzdálenosti koňské antisérum. Obě látky difundují do okolí a v místě jejich styku se vytvoří precipitační linie. Pokud se nanese vedle sebe několik vzorků sér, lze tak posuzovat jejich identitu.



Vznik precipitační linie metodou dvojité difúze

Provedení:

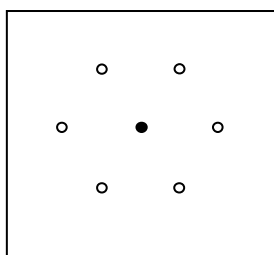
Příprava sklíček s agarovým gelem:

- Každý student ve skupině si připraví dvě sklíčka (5 x 5 cm). Jedno sklíčko se použije pro imunoprecipitaci, další pro následující úlohu. Sklíčka označíte na spodní straně svou značkou (použijte vodou nesmyvatelný značkovač). Společně si připravíte dvě sklíčka navíc (pro nácvik techniky a pro úlohu 29).

- Na stole máte připravenou baňku se ztuhlým pufrovaným agarem (pH = 8,6). Baňku vložíte do vroucí vodní lázně a za stálého míchání skleněnou tyčinkou zahříváte až do úplného rozpuštění gelu.
- Sklíčka seřadíte na vodorovnou plochu. Do dělené pipety (objem 5 ml) nasajete horkou vodu, chvíli v pipetě ponecháte a pak vyfouknete. Pipetu zvenčí otřete. Tím se sklo zahřeje a nedojde k srážení gelu na stěnách pipety. Pak nasajete 3 ml gelu a pipetou zvolna objíždíte hrany skla. Gel nesmí přetéci! Musí se vytvořit jednotná vrstva (bez vzduchových bublin) na celé ploše sklíčka. Poslední kapku agaru nevyfukujete. Po skončení práce pipetu několikrát propláchnete horkou vodou, aby zbylý gel neztuhl ve špičce.
- Gel necháte na skle ztuhnout při laboratorní teplotě a pak vložíte na 5 minut do chladničky.

Příprava vzorků:

- Zkušební sklíčko s dobře ztuhlým agarem vložíte do šablony a zkusíte si vyříznout důlky. Po zacvičení zpracujete každý své sklo určené pro imunoprecipitaci.
- K vyříznutí důlků použijete injekční jehlu s hadičkou a vyměnitelným náustkem. Jehlu vložíte kolmo do otvoru v šabloně, přitisknete, pootočíte na obě strany, pak odsajete vypíchnutý kousek gelu a jehlu lehce vyjmete. Tak pokračujete u všech důlků. Přitom si palcem levé ruky přidržujete sklo v šabloně, aby se během práce nepohybovalo. Důlek musí být ostrý, gel kolem nesmí být porušen.
- Plnění důlků si opět nacvičíte na zkušebním skle s destilovanou vodou. Do *Pasteurovy pipetky* nasajete vodu do výšky 2 až 3 cm a konec otřete o buničitou vatu. Pak vložíte kolmo do vyříznutého otvoru a lehkým uvolněním ukazováčku za současného vytažení kapiláry naplníte důlek tak, aby povrch kapaliny splýval s povrchem okolního gelu. Řez v gelu se úplně ztratí. Kapalina nesmí být rozlita okolo důlku! Malé množství kapaliny je možno odsát kouskem filtračního papíru.
- Po zvládnutí techniky nanášení zpracujete vlastní označená skla. Máte připraveny vzorky sér, které nanese do otvorů na obvodu, do středu nanese antisérum. Při práci je nutná absolutní čistota! Jednotlivé pipetky nesmí být zaměněny! Došlo by k znehodnocení sér i antiséra.



Gel pro imunoprecipitaci

- - jamka s antisérem
- - jamka s vyšetřovaným vzorkem séra

Imunoprecipitace:

- Do spodní *Petriho misky* dáte na dno 2 až 3 kruhové filtrační papíry a zvlhčíte asi 2 ml destilované vody. Počkáte, až se papíry úplně prosytí a zbytek vody vylijete.
- Do takto připravené vlhké komůrky vložíte označené sklo, přikryjete horní miskou a uložíte do stolu. Po 48 hodinách se provede další zpracování.
- Z vlhké komůrky se odstraní filtrační papíry a sklo se přelije fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Misku vložíte zpět do stolu a ponecháte 24 hodin, aby se vyplavily nesrážené bílkoviny.

Barvení:

- Z misek vylijete fyziologický roztok a sklíčka přelijete barvicím roztokem. Necháte 5 minut působit, pak slijete barvivo zpět do zásobní láhve. Sklíčka přelijete odbarvovací roztokem a odbarvovací lázeň několikrát vyměníte, dokud nedojde k úplnému odbarvení pozadí.
- Gel přenesete („stáhnete“) na filtrační papír a mezi několika vrstvami filtračního papíru krátce zalisujete. Pak necháte zvolna uschnout a přiložíte k protokolu.

Použité roztoky a činidla:

1. Pufř (pH = 8,6): 2,0 g kyseliny diethylbarbiturové a 10,0 g diethylbarbiturátu sodného rozpustit za horka vodou na 1 l roztoku.
2. Agarový gel: 3,8 g agaru rozvařit v 250 ml pufřu (roztok 1)
3. Fyziologický roztok: 9,0 g NaCl rozpustit vodou na 1 l roztoku
4. Barvicí lázeň: 1,0 g amidočerně, 30,0 ml konc. kyseliny octové a 6,8 g octanu sodného rozpustit vodou na 1 l roztoku
5. Odbarvovací roztok: 50 ml konc. kyseliny octové zředit vodou na 1 l roztoku
6. Koňské antisérum
7. Vzorky lidských sér

Imunoelektroforéza

Imunoprecipitaci lze kombinovat s elektroforézou na gelovém nosiči. Nejprve se provede elektroforetické dělení, při němž se bílkoviny krevního séra rozdělí na základní frakce: albuminy, α_1 -, α_2 -, β - a γ -globuliny. Frakce jsou složeny z řady bílkovin stejné elektroforetické pohyblivosti. Nechá-li se nyní proti těmto frakcím difundovat koňské antisérum, získané imunizací koně lidským sérem (polyvalentní antisérum), objeví se pro každou bílkovinnou složku charakteristický precipitační oblouk. Tímto způsobem je možno identifikovat až 30 bílkovin krevního séra a lze zjistit i bílkoviny, které se vyskytují jen za patologických stavů.

Bylo-li zvíře imunizováno pouze jednou složkou séra (např. některým z imunoglobulinů), získá se tzv. monovalentní antisérum a při precipitaci se objeví pouze precipitační oblouk příslušné složky. Metodu lze upravit i pro kvantitativní stanovení.

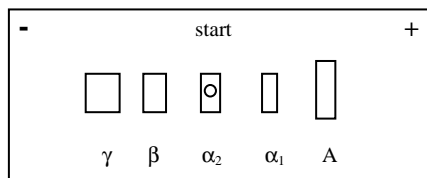
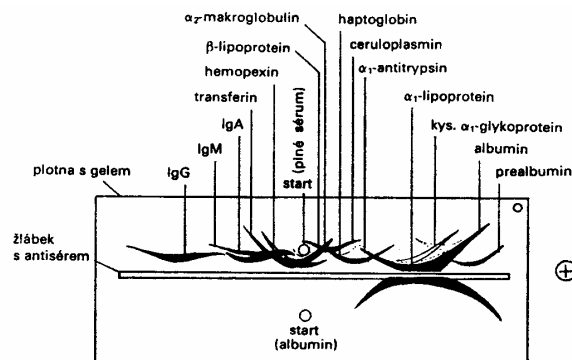


Schéma elektroferogramu



Imunoelektroferogram

29. úloha:

Elektroforéza a imunoelektroforéza na agarovém gelu

V této úloze použijete sklíčka s pufovaným agarovým gelem (pH = 8,6), která byla připravena podle návodu popsaného v předchozí úloze. Na jednom z nich provedete pouze elektroforetické dělení, na druhém zkombinujete elektroforézu s následnou imunoprecipitací.

Provedení:

Příprava sklíčků:

- Použijte dvě další sklíčka připravená v předchozí úloze (imunoprecipitace), případně si je zhotovíte podle návodu uvedeného v této úloze.
- Vychlazená sklíčka s dobře ztuhlým gelem vložíte do šablony pro elektroforézu a stejnou technikou jako u imunoprecipitace na obou sklech vyříznete důlky uprostřed rámečku. Podélné žlábků zatím nevyřezáváte.
- Do připravených důlků naneste vzorky séra. Dodržujete stejné metodické pokyny jako v předchozí úloze. Přesnost a kvalita práce je nezbytným předpokladem dobrých výsledků!

Elektroforetické dělení:

- Elektroforetické kyvety se naplní puftrem (pH = 8,6).
- Připravená skla se vloží mezi kyvety, s nimiž se vodivě spojí pomocí papírových můstků zhotovených z chromatografického papíru. Elektroforetická komora se uzavře víkem.
- Laborantka připojí komoru ke zdroji stejnosměrného proudu.
- Dělení se provádí při proudové hustotě 3,5 mA/cm, tj. 17,5 mA na jedno sklíčko, po dobu 40 minut. Po tuto dobu kontrolujte a podle potřeby regulujte proudové hodnoty.
- Laborantka vypne zdroj napětí a odpojí komoru od zdroje. Sejmeme víko, vyjmete skla a vložíte na 5 minut do chladničky.

Vyhodnocení elektroforézy:

- Sklíčko určené pro elektroforézu obarvíte stejným způsobem, jak bylo popsáno v předchozí úloze (imunoprecipitace).
- Ze sklíčka opatrně sejmeme gel na připravený filtrační papír, krátce pod závažím zalisujete mezi vrstvou několika filtračních papírů a pak necháte na vzduchu zvolna usušit. Lze rozlišit základní bílkovinné frakce, od kladného pólu k zápornému postupně: albuminy, α_1 -, α_2 -, β - a γ - globuliny. Frakce popíšete a elektroferogram přiložíte k protokolu.

Imunoelektroforéza:

- Sklíčko určené pro imunoelektroforézu s vychlazeným a dobře ztuhlým gelem po elektroforéze vložíte opět do šablony a skalpelem naříznete po obou stranách důlků žlábků. Pak injekční jehlou odstraníte naříznutý gel. Doporučuje se vyzkoušet si techniku na zkušebním skle.
- Vyříznuté žlábků se naplní antisérem.
- Takto připravené sklo se vloží do vlhké komůrky, jejíž příprava byla popsána u imunoprecipitace.

- Další zpracování je stejné jako u imunoprecipitace: necháte 48 hodin probíhat difúzi, pak sklíčka přenesete do misky s fyziologickým roztokem a necháte 24 hodin vymývat nevysrážené bílkoviny.
- Provedete barvení: 5 minut v barvicí lázni, pak několikeré odbarvování v odbarvovací lázni, následuje stažení gelu, lisování a sušení.
- Určíte hlavní precipitační linie. Výsledek přiložíte k protokolu.

Použité roztoky a činidla

Stejně jako v úloze 28.

Obsah

Úvod	3
Pravidla bezpečnosti a ochrany zdraví při práci	5
První pomoc při úrazech v laboratoři	6
Práce s mechanickými dávkovacími pipetami	7
Grafické vyhodnocení experimentálních dat	8
1. Vyšetření žaludeční sekrece	9
2. Vyšetření mozkomíšního moku	11
3. Analýza močových konkrémentů	15
Stanovení iontů v séru	20
4. Stanovení chloridů v séru merkurimetrickou titrací	20
5. Spektrofotometrické stanovení chloridů v séru	21
6. Stanovení vápníku v séru chelatometrickou titrací	22
7. Spektrofotometrické stanovení vápníku v séru	23
Dělicí metody	25
Chromatografie	25
Adsorpční chromatografie	27
8. Dělení směsi barviv sloupcovou adsorpční chromatografií	27
9. Dělení rostlinných pigmentů chromatografií na tenké vrstvě	28
Papírová chromatografie	30
10. Vzestupná papírová chromatografie aminokyselin	30
11. Radiální papírová chromatografie	31
Gelová chromatografie	33
12. Dělení barevné směsi gelovou chromatografií	33
Afinní chromatografie	34
13. Stanovení glykovaného hemoglobinu	34
Iontové výměnná chromatografie	35
14. Stanovení kapacity katexu	36
15. Stanovení jodového čísla tuků podle Hanuše	38
16. Stanovení peroxidového čísla tuků	40
Optické metody	42
Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti	42
17. Identifikace acidobazického indikátoru pomocí absorpčního spektra	47
18. Spektrofotometrické stanovení koncentrace iontů měďnatých	47
Refraktometrie	49
19. Stanovení koncentrace plasmatických bílkovin refraktometricky	50
Polarimetrie	51
20. Stanovení koncentrace glukosy v moči polarimetricky	52
21. Kyselina L-askorbová (vitamin C)	54
Potenciometrie	58
22. Potenciometrické měření pH	60
23. Stanovení titrační křivky vzorku kyseliny	61
Dialýza	64
24. Sledování dialyzační rychlosti chloridů přes celofánovou membránu	64
Osmóza	66
25. Demonstrace osmózy	67
26. Stanovení osmolality na principu kryoskopického efektu	68
Elektroforéza	70

27. Elektroforetické dělení plasmatických bílkovin na agarosovém gelu	72
Imunochemické metody	76
28. Imunoprecipitace lidského séra koňským antisérem	76
29. Elektroforéza a imunoэлектроforéza na agarovém gelu	79

Praktická cvičení z lékařské chemie II.

RNDr. Alena Humlová
Mgr. Miroslav Balvín

Lektorovali: Doc. RNDr. Jindřich Sýkora, CSc.
MUDr. Alexandra Steinerová, CSc.

Ústav biochemie LF UK v Plzni
Vedoucí: Prof. MUDr. Jaroslav Racek, CSc.

Vydala Univerzita Karlova – nakladatelství Karolinum Praha 1, Ovocný trh 3
Praha 1999, jako učební text pro posluchače Lékařské fakulty Univerzity Karlovy
v Plzni

Dáno do tisku: červen 1999

Vytiskla tiskárna nakladatelství Karolinum

AA - VA 1. vydání – Náklad 300 výtisků