

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

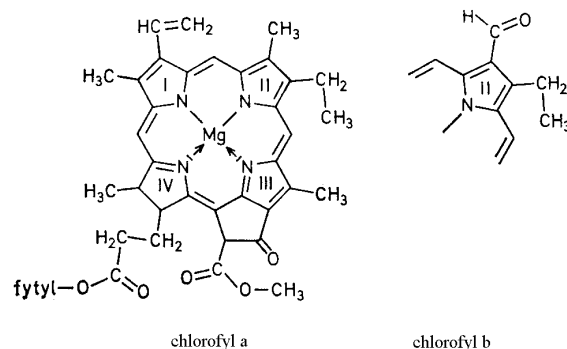
Praktické cvičení z chemie

- 1) Stanovení lipofilních listových barviv pomocí adsorpční chromatografie.
- 2) Stanovení proteinů v roztoku.
- 3) Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku a stanovení proteinů v homogenátu.
- 4) Stanovení pH roztoků

1. Stanovení lipofilních listových barviv pomocí adsorpční chromatografie

V listech zelených rostlin se vyskytuje větší počet lipofilních barviv, jejichž charakteristickou vlastností je rozpustnost v tucích a tukových rozpouštědlech. Pro fotosyntézu mají rozhodující význam chlorofyly **a** a **b** a karotenoidy. Jsou značně citlivé vůči vzdušnému kyslíku a na světlo. Rychlého rozdělení listových barviv lze dosáhnout chromatografií na Silufolu.

Obr. 1. Vzorce chlorofylu a a chlorofylu b.



Materiál: extrakt ze špenátu, špičky žluté, Silufol, tužka, pravítko, kádinka, krycí sklo.

Roztoky a chemikálie: vyvíjecí směs: benzín : isopropanol : voda (100 : 10 : 0,25)

Příprava extraktu ze špenátu: bude připraven

Příprava extraktu (bude k dispozici připravený extrakt)

Odvážíme 2 g listů špenátu, které rozetřeme v třecí misce s malým množstvím mořského písku a uhličitanu vápenatého (na špičku nože) a několika ml acetonu. Směs zfiltrujeme přes malý filtr smočený acetonem do 25 ml odměrné baňky. Dalšími dávkami acetonu převedeme barviva kvantitativně do filtrátu a objem doplníme acetonem po značku.

Asi 10 ml extraktu odpaříme do sucha na vodní lázni a po ochlazení rozpustíme v několika kapkách acetonu.

Pracovní postup:

Zahuštěný extrakt ze špenátu nanese na startovní čáru asi 2 cm od okraje silufolové desky. Desku vložíme do vyvíjecí nádoby s vyvíjecí směsí. Jakmile čelo soustavy dosáhne horního okraje desky, desku vyjmeme a obyčejnou tužkou nejprve označíme čelo mobilní fáze a poté

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

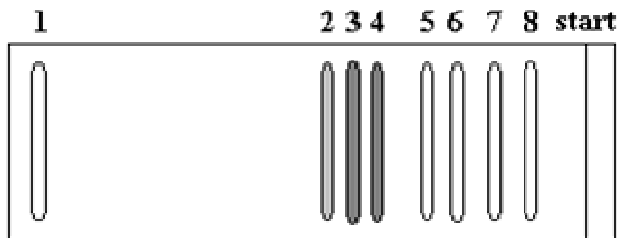
Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

rychle obtáhneme zóny barviv. Chromatogram zakreslíme, neboť některé skvrny na světle rychle blednou

Obr.2 Lokalizace listových barviv po rozdělení na desce silufolu. Vytvíjecí směs benzín : isopropanol : voda (100 : 10 : 0,25).

Legenda k obrázku: 1 - β -karoten, 2 - feofytin, 3 - chlorofyl a, 4 - chlorofyl b, 5 - lutein, 6 - lutein-5,6-epoxid, 7 - violaxanthin, 8 - neoxanthin.



Zakreslete výsledek:

2. Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Proteiny ve vzorku lze stanovovat celou řadou metod. Jednak jsou to metody založené na interakci proteinů s ionty mědi (Biuretova metoda, Lowryho metoda nebo Bicinchoninová metoda), pak metody založené na vazbě proteinů s barvivem Coomassie blue a také metody stanovení proteinů z UV spektra.

Coomassie barvivo (Brilliant blue G250) se váže na proteinové molekuly v kyselém pH dvěma způsoby. Trifenylmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu a anion sulfoskupiny se váže na vedlejší řetězce aminokyselin nesoucí kladný náboj (např. arginin a lysin). Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. Reakce je velmi citlivá u albuminu a řady globulárních proteinů.

Úkol:

- Vytvořte kalibrační přímkou pro stanovení proteinů metodou Bradfordové
- Z pomocí kalibrační přímkou stanovte koncentraci proteinů v homogenátu (viz úkol č. 3)

Materiál: skleněné kyvety do spektrofotometru (1 cm), stojan se zkumavkami, pipety, stříčka s destilovanou vodou, kádinky, špachtle.

Roztoky:

standardní roztok BSA (hovězí sérový albumin) $25\mu\text{g.ml}^{-1}$

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

čínidlo Bradfordové (100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (0,01% w/v), 50 ml 95% ethanolu (5% konečná koncentrace), 100 ml 85% kyseliny fosforečné, doplnit do 1 L vodou).

Přístroje: spektrofotometr, vortex.

Pracovní postup:

- Pomocí standardního roztoku proteinu si připravíme sadu zkumavek obsahujících 1 ml roztoku proteinu o vzrůstající koncentraci proteinu 5 - 25 μg . Slepý vzorek obsahuje 1 ml vody. (1 ml standardu obsahuje $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
- Ke každé zkumavce přidáme 2 ml činidla Bradfordové, rychle promícháme na vortexu.
- Po 5 minutách měříme absorbanci při 595 nm.
- Stejným způsobem změříme obsah proteinů v neznámém vzorku.

Výsledky:

Tabulka 3

koncentrace BSA($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	5	10	15	20	25	NV1	NV1
BSA (μl)	200	400	600	800	1000		
voda (μl)	800	600	400	200	0		
absorbance							

Kalibrační přímka:



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Výpočet koncentrace neznámých vzorků:

NV1:

3. Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku a stanovení proteinů v homogenátu.

Pro homogenizaci rostlinného materiálu lze zvolit celou řadu metod. Rostliny můžeme homogenizovat (rozmělnit) pomocí přístrojů homogenizátorů, které obsahují ostré nože, které rotují velkou rychlostí. Nahradit je může i obyčejný kuchyňský mixér. V laboratoři se často homogenizuje rostlinný materiál v třecí misce za přisypání mořského písku. Elegantní jednoduchý způsob jak materiál zhomogenizovat spočívá v použití tekutého dusíku, který materiál hluboce zmrazí a způsobí jeho rozpad na prach.

Rostlinný materiál: listy, květy, stonky rostlinného materiálu

Pomůcky a chemikálie: třecí miska a tlouček, Pasteurovy pipety, endorfky, stojánek na endorfky, tekutý dusík, 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,2.

Přístroje: stolní centrifuga, vortex

Pracovní postup:

Na předvázkách si odvážíme 0,5 g rostlinného materiálu, který vložíme do třecí misky. Opatrně přilijeme tekutý dusík a pomocí tloučku se snažíme rostlinný materiál rozbít na prach. Poté přidáme 2 ml fosfátového pufru pH 7,2. Vzniklý homogenát přepipetujeme do endorfky a pomocí vortexu ještě řádně promícháme. Poté centrifugujeme pomocí stolní centrifugy 5 minut (endorfky v centrifuze musí být vyváženy). Supernatant přepipetujeme do čisté endorfky a stanovíme v něm obsah proteinů (neznámý vzorek).

4. Stanovení pH roztoků

Jedním z kritérií dělení roztoků je jejich rozdělení podle kyselosti. Rozděluje je tedy na roztoky kyselé, neutrální a zásadité.

Jednotkou kyselosti je pH, která je definována jako záporný logaritmus koncentrace oxoniových iontů při teplotě 25° C.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

1.1 Určení pH připravených roztoků pomocí pH papírku a pomocí přírodního indikátoru

Úkol: Pomocí pH papírku určete přibližnou hodnotu pH připravených roztoků a zapište ji do tabulky. Zjistěte zabarvení připravených roztoků po přidání přírodního indikátoru z červeného zelí. Určete hodnotu pH neznámého vzorku.

Zkoumané roztoky: 0,1 M kyselina chlorovodíková, 8% ocet, 0,1 M kyselina citronová, citronová šťáva, 0,1 M kyselina octová, 0,1 M hydrogenuhličitan sodný, 0,1 M fosforečnan draselný, 0,1 M hydroxid sodný.

Pracovní pomůcky: skleněné zkumavky, Pasteurovy pipety, pH papírky, skleněná tyčinka, stojan na zkumavky, indikátor z červeného zelí

Pracovní postup:

a) Naneseme kapku zkoumaného roztoku skleněnou tyčinkou na univerzální pH papírek a porovnáme získaný odstín s nabízenou barevnou škálou rozsahu pH (od červenofialové po modrou). Odhadneme hodnotu pH.

Výsledky zapište do tabulky 1.

b) Pomocí Pasteurovy pipety napipetujte 1 ml zkoumaného roztoku do připravených skleněných zkumavek a přikápněte 5 kapek indikátoru z červeného zelí, směs promíchejte na vortexu a vzniklé zabarvení zapište do tabulky.

c) pomocí obou metod se pokuste zjistit pH neznámého vzorku.

Tabulka 1

roztok	pH metr	pH - papírek	Indikátor ČZ
0,1 M HCl			
8% ocet			
0,1 M kyselina citronová			
citronová šťáva			
0,1 M CH ₃ COOH			
0,1 M NaHCO ₃			
0,1 M K ₃ PO ₄			
0,1 M NaOH			
neznámý vzorek			



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

1.2 Stanovení pH neznámých roztoků pomocí pH-metru

Změřte kyselost označených vzorků a výsledky запиšte do tabulky. Zkoumané vzorky seřaďte podle vzrůstající hodnoty pH.

Tabulka 2

V	P	I	Á	E1	U	E2	O	S	R	K	N

Písmena po seřazení:

Příprava indikátoru z červeného zelí:

Červené zelí nakrájíme na malé kousky, vložíme do kádinky a zalijeme destilovanou vodou. Směs povaříme asi 15 minut. Po vychladnutí zfiltrujeme směs přes papírový filtr a zakonzervujeme ji bronopolem (25 mg/l) nebo azidem sodným.