

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

Praktická cvičení z chemie pro studenty středních škol **Techniky používané v chemických laboratořích**

1. Odměrování v chemii
2. Spektrofotometrie
3. Tenkovrstevná chromatografie
4. Enzymologie

1. Odměrování v chemii

1.1 Váhy a vážení

Ke stanovení váhového množství látky se používají v chemické laboratoři váhy. Princip vážení je porovnání neznámé hmotnosti předmětu (navažovací lodička, vzorek) se známou hmotností standardu (závaží). Mechanické zařízení je založeno na docílení rovnováhy na páce a má tvar známých miskových vah. Na stejném principu byly dříve konstruovány i analytické váhy (postupné přidávání závaží).

V současné době se již užívají jednomiskové váhy používající promítací stupnice na stínítko. V laboratoři se používají pro přesné navážení látek analytické váhy a pro méně přesné vážení předvážky.

1.2 Odměrování roztoků

K odměrování objemů kapalin slouží odměrné válce, pipety, byrety a odměrné baňky (Obr.1).

Odměrné válce (Obr. 1-a) se používají jen k přibližnému odměrování kapalin. Na přesnější měření objemů se používají pipety buď pouze pro určitý objem, nebo dělené a byrety u nichž je možno kohoutkem regulovat vytékání kapaliny. Při plnění pipet je třeba vždy dbát toho, aby ústí pipety bylo stále ponořeno pod hladinou kapaliny (jinak by se nasál vzduch do pipety). Po nasátí kapaliny nad rysku označující požadovaný objem uzavřeme horní konec pipety ukazovákem – ne palcem. A opatrným uvolňováním prstu po kapkách vypouštíme kapalinu. Při odečítání je nutno mít oko ve stejné úrovni se značkou. Odečítáme vždy spodní okraj menisku. Tyto skleněné pipety, do kterých se nasává tekutina ústy nebo pomocí balonku se dnes už v moderních laboratořích nepoužívají, jsou nahrazeny automatickými pipetami, které mohou být konstruovány na určitý fixní objem, nebo jsou nastavitelné v určitém rozsahu objemů.

Automatické pipety jsou vyráběny pro různé rozsahy objemů (5-1 mL, 1000-200 μ L, 200-20 μ L, 20-2 μ L a 2-0,2 μ L). Objem se nastavuje otočením šroubu na stupnici. Nasávání a vypouštění kapaliny přes nasaditelnou špičku je ovládáno pístem, který má tři polohy – klidovou, pro nasávání a pro vypouštění (obr. 2).

Odměrné baňky (Obr. 1-b), stejně jako pykometry jsou kalibrovány na dolítí – to znamená, že při jejich naplnění obsahují právě požadovaný objem. Hrdlo odměrných baněk je poměrně úzké a je opatřené ryskou. Plní se tak, aby se spodní okraj menisku dotýkal rysky a při plnění musíme mít oko v úrovni rysky. Odměrné

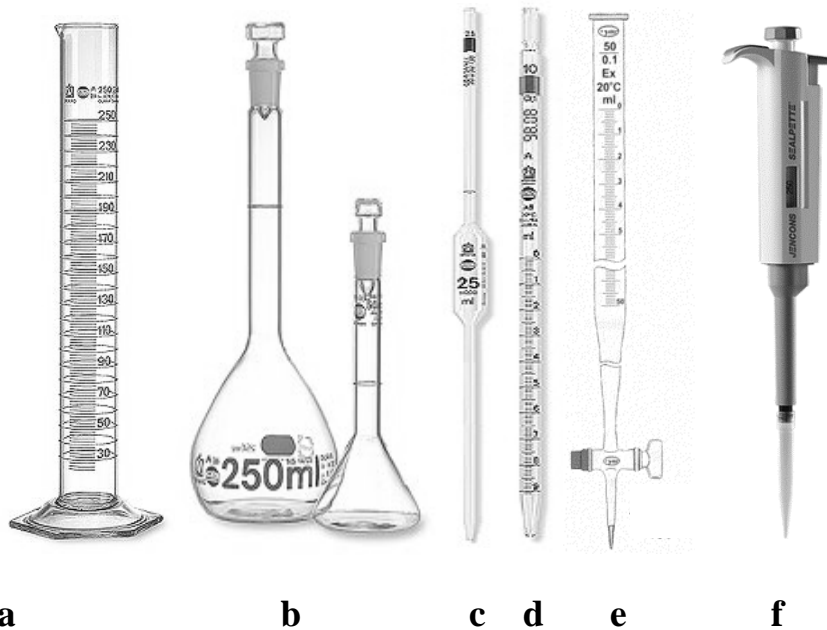
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

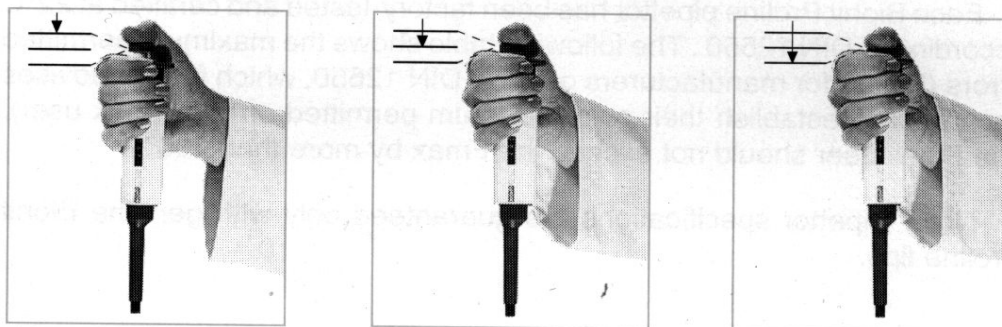
CZ.1.07/1.1.00/14.0016

baňky se vyrábějí v objemech od 5 mL do 2 L. Odměrné baňky se používají k přípravě roztoků o přesné koncentraci. Byrety, sloužící k odběru kapalin při titracích (Obr. 1-e), jsou to skleněné trubice opatřené dělicími značkami. Před výtokem je umístěn kohoutek nebo pružná tlačka s hadičkou.

Obr. 1 Pomůcky k měření objemů (a- odměrný válec, b- odměrná baňka, c- skleněná pipeta nedělená, d - skleněná pipeta dělená, e - byreta, f - automatická pipeta)



Obr. 2 Práce s automatickou pipetou





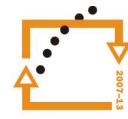
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

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

1.3 Experimentální část

V praktické části cvičení se seznámíte s analytickými váhami a naučíte se vážit na předvážkách. Vaším úkolem bude co nejpřesněji napipetovat 10 x 5 ml (resp. 1 ml) destilované vody do kádinky. Hustotu vody budeme pro jednoduchost považovat rovnu 1 g/ml. Počet gramů bude odpovídat počtu odměřených ml.

Na začátku měření si zvažte prázdnou suchou kádinku (váhu kádinky si zaznamenejte do tabulky). Poté napipetujte 10 x 5 ml nebo 10 x 1 ml do kádinky. Poté předvážky vynulujte a zvažte kádinku s napipetovanou vodou. V tabulce odečtete váhu kádinky.

Tabulka 1: Pipetování

Hmotnost kádinky (g)	
Hmotnost kádinky a vody (g)	
10 x 1 ml	10 x 5 ml
Hmotnost vody (g)	
Chyba stanovení (%)	

2. Spektrofotometrie

2.1. Teoretický úvod

Viditelné záření tvoří malý úsek z oblasti elektromagnetického vlnění v rozmezí délek 400-700 nm. Přilehlá oblast rozmezí vlnových délek 200-400 nm se nazývá blízká ultrafialová oblast, 700-2000 nm se pak nazývá blízká infračervená oblast. Celá oblast vlnových délek se také nazývá oblastí elektronových spekter.

Přístroje, které měří spektrální veličiny se nazývají spektrofotometry. Téměř všechny biologicky zajímavé látky kromě sacharidů mají v oblasti UV-VIS (200 - 700 nm) charakteristické absorpční pásy a jejich koncentrace se tak dá stanovit na základě jejich spektrálních vlastností.

Interakcí záření s atomy a molekulami, dochází k jeho absorpci, tj. k přijetí kvanta energie a atom nebo molekula se dostane do stavu excitovaného. Interakce záření s hmotou se sleduje na absorpčním spektru (závislostí množství absorbovaného záření na jeho vlnové délce).

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

Vztah mezi absorbancí a koncentrací látky vyjadřuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde A se nazývá absorbance, jedná se o bezrozměrnou veličinu, l je délka kyvety, ve které se měří (obvykle 1 cm), c je koncentrace látky v mol.l⁻¹ a ε je konstanta úměrnosti, která se nazývá molární absorpční koeficient.

Při měření koncentrace látek se porovnává intenzita paprsku, který není oslaben absorpcí (referenční) a paprsku, který prošel kyvetou se vzorkem. V laboratořích se běžně používají jednopaprskové přístroje, kdy se nejprve proměří absorbance referenčního vzorku a poté se proměří absorbance vzorku. Moderní spektrofotometry uloží intenzitu záření referenčního vzorku (jinak také slepý vzorek či blank) do paměti a při proměřování vzorků se pak na display objevují hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků.

2.2 Experimentální část

Úkol: Stanovení koncentrace Ni²⁺ v neznámém vzorku

Materiál a chemikálie

Spektrofotometr, kyvety, kádinky, velké zkumavky, pipety, 0,5 M síran nikelnatý, 0,5 M chlorid kobaltnatý.

Postup

Připravte si sadu 5 roztoků síranu nikelnatého o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 a 0,3 M přesným ředěním zásobního roztoku o koncentraci 0,5 M. Postupujte tak, že do zkumavek napipetujete 5 mL automatickou pipetou vypočtené množství zásobního roztoku 0,5 M síranu nikelnatého podle tabulky 2 a přidáte odpovídající množství vody opět dle tabulky 2. Roztoky promíchejte na vortexu. Poté na spektrofotometru proměříte absorbanci připravených vzorků a zapíšete do tabulky 2.

Tabulka 2: Spektrofotometrické stanovení nikelnatých iontů

koncentrace Ni ²⁺ (mol.l ⁻¹)	ml 0,5 M NiSO ₄	ml 0,5 H ₂ O	A
0,5	-	-	
0,3	6	4	
0,2	4	6	
0,1	2	8	
0,05	1	9	
0,025	0,5	9,5	
NV č.	-	-	

Koncentrace neznámého vzorku č..... je:



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

Kalibrační přímka

Závislost absorpance na vlnové délce pro Ni^{2+} a Co^{2+} SPEKTRA

Zakreslete spektrální záznamy pro nikelnaté a kobaltnaté ionty. Poté zakreslete závislost směsi Ni^{2+} a Co^{2+} (směs byla připravena s 1 ml 0,5 M síranu nikelnatého a 1 ml chloridu kobaltnatého).

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

3. Tenkovrstevná chromatografie

3.1 Teoretický úvod

Adsorpční chromatografie je jedna z nejstarších chromatografických metod. Pevný adsorbent je obtékán vhodným rozpouštědlem, který unáší analyzovanou směs. Na povrchu adsorbentu dochází k dělení. Adsorpci látky na povrchu pevné fáze určuje adsorpční izoterma. Jako adsorbenty se používají látky pórovité struktury. Adsorbenty se dělí na polární (silikagel, oxid hlinitý, hydroxyapatit) a nepolární (aktivní uhlí). Podle způsobu provedení rozlišujeme sloupcovou chromatografii a tenkovrstevnou chromatografii (TLC).

Pro důkaz alkaloidů a léčiv v moči se využívá tenkovrstevná chromatografie. Léčiva a alkaloidy se extrahují z upravené moči (kyselá či zásaditá) pomocí etheru. Etherové extrakty se odpaří do sucha na vodní lázni. Sušina se rozpustí v 0,5 ml ethanolu a vzorky se nanášejí na chromatografickou desku. Desky se vyvíjejí v chromatografické komoře nasycené parami vyvíjecí směsi. Když čelo mobilní fáze dosáhne vzdálenosti 2 cm od horního okraje desky, desku vyjmeme a po vysušení postříkáme jednotlivými detekčními činidly.

3.2 Experimentální část

Úkol: Detekce alkaloidů a léčiv pomocí tenkovrstevné chromatografie

Materiál a chemikálie

chromatografické desky – plastické folie silikagel 60 F254 (firma Merck), třecí misky, žluté špičky, tužka, pravítko, chromatografická vana, rozprašovač, ependorfky

96 % ethanol, kofein, chinin, léčivo

vyvíjecí soustava: ethylacetát : methanol : amoniak (34 : 4 : 2),

detekční činidla:

1. **konc. H_2SO_4 : ethanol (1:1)** (činidlo připravovat v ledové lázni, po kapkách přidávat kyselinu do vychlazeného ethanolu).

2. **Dragendorffovo činidlo**:

Roztok I : Dusičnan bismutitý (850 mg) se rozpustí v 10 ml kyseliny octové a 40 ml vody.

Roztok II: Jodid draselný (8 g) se rozpustí ve 20 ml vody.

Oba roztoky se smísí a uchovávají se v hnědé láhvi i několik měsíců. Před použitím se 10 ml tohoto zásobního roztoku zředí 20 ml kyseliny octové a 100 ml vody.

Pracovní postup

Příprava standardů: Léky v tabletové formě rozetřeme v třecí misce na prášek. Preparáty kofeinu a chininu navážeme na analytických vahách přímo do připravených ependorfeček a rozpustíme v ethanolu. Pokud je povrch tablety pokryt obalem nebo glazurou, musíme obal odstranit nebo smýt. Odvážíme požadované množství substancí (množství závisí na jednotlivých důkazech a metodách – nejčastěji 10–200 mg). Naváženou substanci rozpustíme v odpovídajícím objemu rozpouštědla (u léků se nejčastěji používá alkohol–ethanol). Standardní roztok přeneseme do lahvičky a označíme jej datem přípravy. Skladujeme ve tmě a chladu (0-4°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

Pro praktické cvičení budou standardy připraveny k nanesení na TLC.

Tenkovrstevná chromatografie

Na připravenou tenkou vrstvu pomocí pravítka a měkké tužky vyznačíme místa startů. Vzdálenost mezi nanášenými vzorky nesmí být menší než 15 mm a průměr nanášených skvrn nesmí být větší než 5 mm. Pomocí žluté špičky nanese na místa startů 1-4 kapky jednotlivých standardů. V průběhu nanášení skvrny vysušujeme teplým vzduchem z fenu. Nejméně 10 minut před vyvíjením nalijeme do chromatografické komory vyvíjecí směs, a to takový objem, aby hladina byla níže, než místo startu vzorku na chromatografické desce. Komoru uzavřeme sklem. Po nasycení komory parami vyvíjecí směsi vložíme chromatografickou desku do komory a provedeme vzestupné vyvíjení. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne vzdálenosti 2 cm od horního okraje desky, desku z komory vyjmeme a čelo fáze označíme měkkou tužkou. Chromatografickou desku vysušíme volně na vzduchu a postříkáme detekčními činidly. Skvrny pozorujeme pod UV lampou nebo pomocí oka.

Vyhodnocení chromatogramu:

Tužkou si zakreslete čelo mobilní fáze a obkreslete velikost skvrny. U jednotlivých skvrn vypočítejte hodnotu R_f (tzv. retenční faktor). Retenční faktor udává poměr vzdálenosti středu skvrny látky od startu (V_M) ku vzdálenosti čela mobilní fáze (V_R), tj. vzdálenost kam až doputuje mobilní fáze.

$$R_f = V_M / V_R$$

Chromatogram můžete překreslit nebo přilepit.

Tabulka 3: Detekce alkaloidů a léčiv pomocí TLC

látka	R_f
kofein	
chinin	
léčivo:	



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

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

4. Enzymologie

4.1. Teoretická část: Charakterizace enzymů α -amylasy a sacharasy

Amylasy se vyskytují u člověka, zvířat, rostlin i mikroorganismů. Využívají se v lihovarnictví, pivovarnictví, pekařství apod. Zdrojem amylas může být naklíčený ječmen (slad). Směs sladových amylas se nazývá diastasa. Amylasy patří do skupiny enzymů hydrolas, které štěpí substráty za účasti vody. Amylasy štěpí polysacharidy jako jsou škrob, glykogen a dextriny. Konečným produktem je disacharid maltosa. U člověka a zvířat se α -amylasa vyskytuje ve slinách a v pankreatu (slinivce břišní). U rostlin se nachází pouze v semenech (např. v ječmeni). Také některé mikroorganismy produkují amylasy (např. *Bacillus subtilis*).

Konečným produktem štěpení škrobu je redukující cukr disacharid maltosa. Přítomnost škrobu lze dokázat reakcí s jódem (Lugolův roztok). Modré zbarvení signalizuje přítomnost škrobu (více jak 30 glukosových jednotek) a světle žluté zbarvení potvrzuje úplné rozštěpení škrobu (4-6 glukosových jednotek).

Dalším enzymem, se kterým budeme v této úloze pracovat je sacharasa známá také pod názvem invertasa. Sacharasa se nachází např. v pekařských kvasnicích. Katalyzuje hydrolýzu sacharosy na D-glukosu a D-fruktosu. Tato reakce má značný průmyslový význam, neboť směs glukosy a fruktosy je podstatně sladší než ekvivalentní množství sacharosy. Sacharasa je glykoprotein lokalizovaný na vnější straně kvasničné buňky.

Charakteristické vlastnosti obou enzymů si ověříme prakticky v laboratoři: α -Amylasy obsažené ve slinách a v mikroorganismech (*Bacillus subtilis*) odbourává škrob za vzniku dextrinů a maltosy. Vůbec však nepůsobí na cukr sacharosu. Naproti tomu sacharasa rychle hydrolyzuje sacharosu, ale je zcela neaktivní vůči škrobu. Účinky obou enzymů lze snadno sledovat Fehlingovou reakcí (důkaz vznikajících redukujících cukrů) nebo reakcí s jódem (škrob dává modré zbarvení).

4.2 Experimentální část

Materiál a chemikálie:

škrob, sacharosa, kvasnice, Lugolův roztok, 0,1 M-fosfátový pufr, pH 7,2, stojan se zkumavkami, Pasterovy pipety, váženka, lžička, stříčka s destilovanou vodou, špachtle, hrnec, termostat, vaříč.

Fehlingovo činidlo:

roztok I: 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ rozpustíme v 500 ml vody a doplníme do 1 litru vodou.

roztok II: 200 g Seignettovy soli (vinan sodnodraselný - $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a 150 g NaOH se rozpustí v menším množství vody a doplní na 1 litr.

(pro urychlení úlohy je roztok připraven předem)



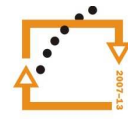
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

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

Příprava roztoku škrobu:

1 g škrobu rozsuspendujeme ve 100 ml 0,1 M-fosfátového pufru, pH 7,2 a 5 minut povaříme.

(pro urychlení úlohy je roztok připraven předem)

Příprava sacharosy:

1 g sacharosy rozpustíme v 50 ml destilované vody.

(pro urychlení úlohy je roztok připraven předem)

Příprava enzymů:

- ✓ 20 mg mikrobiální α -amylasy rozpustíme ve 100 ml 0,1 M fosfátového pufru. (pro urychlení úlohy je roztok připraven předem).
- ✓ 10 ml pitné vody vložíme do úst, ponecháme v ústech po dobu 1 minuty a poté vrátíme do připraveného plastového kelímku. Roztok bude sloužit jako slinná amylasa.
- ✓ 0,1 g pekařských kvasnic resuspendujeme ve 20 ml vody (enzym sacharasa)

Pracovní postup:

Podle schématu v tabulce 1 napipetujeme do 7 označených zkumavek po 2 ml substráty (sacharosu a škrob) a přidáme 1 ml enzymových preparátů (α -amylasy, sacharasy). Všechny zkumavky inkubujeme 20 minut při 38 °C v termostatu.

Tabulka 4: Charakterizace enzymů

zkumavka č.	Substrát (2 ml)	enzym-zdroj	Fehlingova r.	zbarvení jódem
1	1% škrob	amylasa-sliny (1 ml)		
2	1% škrob	amylasa z <i>Bacillus subtilis</i>		
3	1% škrob	sacharasa (1 ml)		
4	2% sacharosa	sacharasa (1 ml)		
5	2% sacharosa	1 ml dest. vody		
6	1% škrob	1 ml dest. vody		
7	pufr	1 ml dest. vody		

Po ukončení inkubace odebereme 1 ml reakční směsi z každé zkumavky do nové čisté zkumavky, kterou si předem označíme stejným číslem. K reakční směsi přidáme 1 ml Fehlingova činidla I a 1 ml Fehlingova činidla II a zkumavky povaříme 5 minut na vroucí vodní lázni. Původní zkumavky doplníme destilovanou vodou 1 cm pod okraj a přidáme kapku Lugolova roztoku (roztok jódu).

Výsledky obou zkoušek zapíšeme do tabulky. Vyhodnotíme z hlediska substrátové specifity enzym obsažený ve slinách a enzym produkovaný mikroorganismem (*Bacillus subtilis*) a enzym z pekařských kvasnic.



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