

Masarykova univerzita

Pedagogická fakulta

Praktická cvičení z biochemie a bioorganické chemie II

Vybrané instrumentální úlohy

Mgr. Petr Ptáček, Ph.D.
doc. Mgr. Hana Cídllová, Dr.

Brno
2013

OBSAH

Úvodem.....	- 3 -
Biochemický význam vybraných iontů	- 4 -
<i>Ionty stanovované v laboratorním cvičení.....</i>	<i>- 4 -</i>
Rozbory vody.....	- 7 -
<i>Stanovení koncentrace Li^+ iontů ve vodě.....</i>	<i>- 7 -</i>
<i>Stanovení koncentrace NH_4^+ iontů ve vodě</i>	<i>- 9 -</i>
<i>Stanovení koncentrace Ca^{2+} iontů ve vodě</i>	<i>- 11 -</i>
<i>Stanovení koncentrace Cu^{2+} iontů ve vodě</i>	<i>- 13 -</i>
<i>Stanovení koncentrace Pb^{2+} iontů ve vodě</i>	<i>- 15 -</i>
<i>Stanovení koncentrace Cl^- iontů ve vodě.....</i>	<i>- 17 -</i>
<i>Stanovení koncentrace NO_3^- iontů ve vodě</i>	<i>- 18 -</i>
Úlohy zaměřené na práci s biologickým materiálem.....	- 19 -
<i>Stanovení koncentrace Li^+ iontů v rostlinném materiálu</i>	<i>- 19 -</i>
<i>Stanovení koncentrace Cl^- iontů v mase/masných výrobcích</i>	<i>- 22 -</i>
<i>Stanovení koncentrace NO_3^- iontů ve špenátu</i>	<i>- 24 -</i>
<i>Stanovení chlorofylů v listech zelených rostlin.....</i>	<i>- 26 -</i>
<i>Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu a potravinových doplňcích.....</i>	<i>- 28 -</i>
<i>Rychlost katabolické činnosti mikroorganismů.....</i>	<i>- 36 -</i>
Použité informační zdroje.....	- 40 -

ÚVODEM

Předkládaný učební text „Praktická cvičení z biochemie a bioorganické chemie II“ je souborem návodů pro vybrané instrumentální úlohy, prováděné posluchači v předmětu Laboratorní cvičení z biochemie na Pedagogické fakultě Masarykovy univerzity. Jeho posláním je vhodným způsobem doplnit spektrum úloh, které posluchači provádějí v rámci uvedeného povinného laboratorního cvičení.

Na rozdíl od předcházejícího dílu („Praktická cvičení z biochemie a bioorganické chemie“), přináší tento druhý díl dvě zásadní změny:

Jednak vyžaduje podstatně větší využití instrumentálních metod v úlohách zaměřených na kvantitativní měření, jednak se zde předpokládá podstatně větší „týmová“ spolupráce posluchačů. V jednom a téže vzorku tak různí posluchači stanoví obsah různých látek a celkové složení vzorku je tak výsledkem práce celého kolektivu. Konkrétní rozdělení práce bude dohodnuto přímo ve výuce se studenty.

Takové uspořádání části laboratorního cvičení z biochemie tak více odpovídá reálné situaci v praxi, kdy na rozborech daného materiálu často spolupracuje větší počet specializovaných pracovišť nebo alespoň specializovaných odborníků.

Přiblížení alespoň části laboratorních cvičení praxi bylo jedním z hlavních cílů autorů této publikace.

Přejeme vám příjemnou práci

Autoři

BIOCHEMICKÝ VÝZNAM VYBRANÝCH IONTŮ

V živých organismech je vázáno 27 z 90 prvků, které se vyskytují v přírodě. Kromě čtyř hlavních biogenních prvků (vodík, kyslík, uhlík a dusík) tvořících biomolekuly z 99 %, živý organismus využívá ke své funkci také prvky, které jsou složkou v potravě přijímaných minerálních solí. Mezi biologicky nejdůležitější kationty patří: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} . Z aniontů jsou nejvýznamnější: Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^- a I^- .

Přestože jsou některé z uvedených prvků v organismu zastoupeny v nepatrných množstvích (tzv. stopové prvky), jejich nedostatek může organismus vážně poškodit. Stopové prvky plní v organismu nejrůznější funkce jako např. regulace fyzikálně chemických poměrů (pH, iontová síla, osmotický tlak, elektrická vodivost...), dále mají katalytické, aktivační a inhibiční funkce.

Některé prvky (zejména těžké kovy) jsou ve své rozpustné formě pro organismy silně toxické (např. ionty kovů Pb, Hg, Cd...). Mají často kumulativní charakter. Pronikají do všech složek životního prostředí jako důsledek antropogenních aktivit (průmysl, zemědělství, doprava, těžba) a koloběhem potravních řetězců se vrací zpět k člověku.

Ionty stanovované v laboratorním cvičení

Lithné ionty

Lithium je z alkalických kovů relativně nejtoxičtější. Smrtelná dávka chloridu lithného je pro člověka několik gramů. Je to způsobeno jeho značnou podobností se sodíkem a draslíkem, které jsou biogenní, vytvářejí osmotickou rovnováhu a jsou též důležité při nervovém vzruchu. Lithium je zastoupit nemůže. Malá množství lithia, která nevedou k toxickému účinku, jsou přijímána pitnou vodou či potravou. Některé minerální vody (Zaječická, Mlýnský pramen, Vincentka) mají vysoký obsah lithia a mohou zvýšit jeho hladinu v těle. Metabolický význam iontů lithia nebyl dosud dostatečně prozkoumán, avšak objevily se studie vedoucí k hypotéze, že dlouhodobý příjem velmi nízkých dávek lithných iontů v pitné vodě „z kohoutku“ by mohl podporovat delší dobu života (ZARSE et al., 2011). V terapeutických dávkách se sloučenin lithia užívá v psychiatrii k tlumení centrální nervové soustavy. Uhlíčan lithný se používá při léčbě maniodepresivní psychózy, kdy tlumí chorobné výkyvy nálady, která kolísá od euforie po touhu po sebevraždě.

Amonné ionty

Rovnováha amoniak/amonné ionty je silně závislá na podmínkách v roztoku (hodnota pH), které mohou být proměnlivé. Řada prací zaměřených na biochemii či potravinářskou chemii proto mezi oběma formami striktně neodlišuje a hovoří např. souhrnně o amoniaku. Uvedený systém je součástí koloběhu dusíku v přírodě. Pro rostliny tento systém představuje zdroj dusíku pro biosyntézu dusíkatých biomolekul. Pro vodní živočichy (ryby) je však už v nízkých koncentracích toxický. Amonné ionty se dostávají do podzemních a povrchových vod jednak jako produkt mikrobiální činnosti, jednak formou splachu ze zemědělských ploch nebo z odpad-

ních průmyslových vod. Maximální povolené množství amonných iontů v pitné vodě je 0,5 mg/dm³.

Vápenaté ionty

Vápník je z kvantitativního hlediska hlavní minerální složkou v lidském těle. Jeho celkový obsah činí asi 1500 g, přičemž 99 % z tohoto množství je obsaženo v kostech a zubech jako fosforečnan vápenatý. K hlavním biologickým funkcím vápníku patří kromě stavební funkce také účast na nervové a svalové činnosti. Vápník je nezbytný i pro srážlivost krve. Řada metabolických dějů je regulována Ca²⁺ ionty prostřednictvím jejich vazby na sérový polypeptid kalmodulin, který ovlivňuje aktivitu některých enzymů (adenylátcyklasy, ATPasy). Doporučená denní dávka vápníku je 400-500 mg u dětí do jednoho roku, 800 až 1200 mg u starších dětí a adolescentů, 800 mg u dospělých a 1200 mg u těhotných a kojících žen.

Měďnaté ionty

Měď je esenciálním prvkem pro člověka i ostatní živočichy. Ionty Cu²⁺ jsou součástí aktivních center řady životně důležitých enzymů (cytochrom-c-oxidasa, aminooxidasy, hydroxylasy, fenoloxidas...). Toxicita mědi pro savce je poměrně nízká (LD₅₀ pro perorální podání u krys je 300 mg/kg tělesné hmotnosti). Vysoce toxické jsou měďnaté ionty pro ryby. Doporučená denní dávka mědi je 0,4-0,7 mg pro děti do 1 roku, 0,7-2,0 mg pro děti od 1 roku do 10 let, 1,5-3 mg pro dospělého člověka.

Olovnaté ionty

Olovo patří svými toxickými účinky mezi nejvýznamnější těžké kovy. Vstupuje do organismu nejen v potravě prostřednictvím gastrointestinálního traktu, ale také plírcemi. Vstřebané olovo se transportuje krví do jater, ledvin a kostí, kde se kumuluje. Olovo poškozují ledviny, játra, kostní dřeň, nervový a kardiovaskulární systém, inhibuje syntézu porfyrinů (pokles množství hemoglobinu) a enzymů důležitých pro syntézu hemu. Nejnebezpečnější je intoxikace dětského organismu (ohrožení mentálního a fyzického vývoje, snížení intelektu, poruchy imunity), neboť u dětí je schopnost resorpce olova oproti dospělému člověku 5× vyšší.

Chloridy

Chlor je nezbytnou složkou potravy. V organismu se vyskytuje ve formě aniontů, které se spolu se sodnými protiionty nacházejí v cytoplasmě buněk a extracelulárních tekutinách (krev, žaludeční šťáva, moč). Jejich hlavní úlohou je udržovat osmotický tlak. V žaludeční šťávě jsou chloridy protiionty vodíkových iontů v kyselině chlorovodíkové, která se vylučuje žaludeční stěnou. Chlor je přijímán potravou převážně jako NaCl v množství 3–12 g za den. Minimální potřebná denní dávka chloridů je pro dospělého člověka 75 mg, pro děti do 1 roku 180-300 mg a pro děti od 1 do 9 let 350-600 mg.

Dusičnany

Mezi nejvýznamnější zdroje dusičnanů v lidské stravě patří zelenina a pitná voda, dále masné výrobky, nakládaná masa, tvrdé sýry, ryby a konzervy. Při potravinářském zpracování jsou do nich totiž přidávány dusičnany a dusitany jako konzervační aditiva. Hlavním toxikologickým problémem dusičnanů je jejich redukce na dusitany, z nichž následně v gastrointestinálním traktu a během metabolické detoxikace v játrech vznikají N-nitrososloučeniny, u nichž byly prokázány karcinogenní účinky. U kojenců vyvolává zvýšený příjem dusičnanů vznik tzv. methemoglobinemie, tzn. blokády hemoglobinu erytrocytů, což může vést k poškození mozku, či ohrozit život. Maximální povolené množství NO_3^- iontů v pitné vodě je 50 mg/dm^3 (v kojenecké vodě 15 mg/dm^3).

ROZBORY VODY

Úkol

- Ve spolupráci s ostatními studenty vaší laboratorní skupiny provést rozbor vody z hlediska obsahu iontů: Li^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cl^- a NO_3^- .
- Po stanovení koncentrace jednotlivých iontů ve vzorku vody a po získání výsledků od spolužáků je dalším úkolem vyjádřit se ke kvalitě vody a k případným zdravotním rizikům.
- Pokud vedoucí laboratorního cvičení posluchačům sdělil, že vzorek je běžně dostupná minerální voda, pokusí se posluchači na základě zjištěného obsahu jednotlivých iontů určit, o kterou minerální vodu se jedná.

Postup

Studenti obdrží vzorek vody určený k rozboru. Po vzájemné domluvě a konzultaci s vyučujícím si rozdělí práci tak, aby během týdne byl stanoven obsah všech iontů z výše uvedeného seznamu, přičemž pracovní skupina (tj. 1-2 studenti) stanovuje obsah 1-2 iontů ve vodě. V dané lekci pracují současně dvě pracovní skupiny studentů. Předpokládá se, že během týdne probíhají dvě paralelní laboratorní cvičení z biochemie.

Návody ke stanovení obsahu jednotlivých iontů z výše uvedeného seznamu jsou uvedeny v následujících kapitolkách.

Stanovení koncentrace Li^+ iontů ve vodě

Teorie

Koncentrace Li^+ iontů ve vodě bude stanovena s využitím kombinované lithiové iontové selektivní elektrody. Je vhodná pro stanovení Li^+ iontů v biologických, zemědělských a potravinářských vzorcích, v hnojivech, půdách, krmivech, nápojích, vodách a minerálních vodách, výzkumných a průmyslových vzorcích. Elektrodu je možno používat v prostředí vodných roztoků, avšak přítomnost organických rozpouštědleh nebo lipofilních organických látek drasticky snižuje její životnost.

Chemikálie

- $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- lithiová kombinovaná ISE
- pH-milivoltmetr
- 5 odměrných baněk 50 ml
- pipeta 5 ml
- kádinky 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Uvedení elektrody do provozu

Před použitím musí být elektroda namočená do roztoku LiCl o koncentraci $1\cdot 10^{-3}$ až $1\cdot 10^{-4}$ mol/dm³ na cca 1 hod. Na membráně elektrody nesmí být vzduchová bu-

blinka – ani následně při měření! Po přepravě elektrody, kdy byla v jiných polohách než svislé, se může stát, že je sloupec vnitřního elektrolytu přerušen vzduchovou bublinkou a tím je přerušen elektrický kontakt mezi vnitřní referenční elektrodou a membránou. Tato závada se projeví nestabilní hodnotou měřené elektromotorické síly článku, stejně jako při ulpění vzduchové bublinky na vnějším povrchu membrány.

Sloupec elektrolytu se spojí poklepáním elektrody způsobem „sklepávání rtuti teploměru“.

2. Kalibrace

Pro přípravu kalibračních roztoků se používá přesně odvážené množství monohydrátu chloridu lithného, vysušeného 1 hod při 90 °C. Hmotnost 0,302 g tohoto vysušeného $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ rozpustíme v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 50 ml a doplníme po rysku. Tím získáme roztok LiCl o koncentraci $0,100 \text{ mol/dm}^3$. Jeho ředěním destilovanou vodou připravíme do 50ml odměrných baněk kalibrační roztoky LiCl o c $1\cdot 10^{-2}$, $1\cdot 10^{-3}$, $1\cdot 10^{-4}$ a $1\cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$.

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného připraveného kalibračního roztoku LiCl , ponoříme do něj kombinovanou lithiovou ISE (předem omytou destilovanou vodou a šetrně osušenou buničitou vatou – pozor na membránu) a změříme elektromotorické napětí daného článku. Stejným způsobem měříme zbývající roztoky. Po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou.

3. Kalibrační graf

Kalibrační graf se sestojí vynesení závislosti naměřeného potenciálu na záporně vzatém dekadickém logaritmu koncentrace iontů Li^+ , neboli $U = f(-\log c(\text{Li}^+))$. Závislost je lineární, lze využít metodu lineární regrese.

4. Stanovení

Při měření vzorků se postupuje stejně jako u kalibračních roztoků. Koncentrace Li^+ iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

5. Uchovávání elektrody

Krátkodobě má být elektroda uchovávána namočená čidlem do kalibračního standardu $c = \text{cca } 1\cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Při uchovávání delším než týden je doporučeno elektrodu očistit opláchnutím demineralizovanou vodou a uložit do transportního kontejnerku s několika kapkami demineralizované vody. Při opětovném aktivování je nutno elektrodu kondicionovat jako při prvním uvedení do provozu.

Stanovení koncentrace NH_4^+ iontů ve vodě

Teorie

Koncentrace NH_4^+ iontů ve vodě bude stanovena potenciometricky postupem vycházejícím z normy ČSN ISO 6778. Prvním krokem stanovení je alkalizace vzorku, aby se ionty NH_4^+ převedly na amoniak. Ten se pak stanoví membránovou ISE, která reaguje na parciální tlak amoniaku v roztoku. Součástí úpravy vzorku před měřením je kromě alkalizace také přidavek komplexotvorného činidla. Cílem je převést v roztoku případně přítomné ionty kovů do stabilních koordinačních sloučenin, neboť v opačném případě by se na ně jako ligand navázal amoniak, což by způsobovalo chybu měření. Potenciál ISE elektrody je v souladu s Nernstovou rovnicí lineární funkcí logaritmu koncentrace iontů NH_4^+ .

Chemikálie

- **čerstvá destilovaná voda bez amoniaku** (získaná metodou výměny iontů za použití kolony se silně kyselým měničem kationtů ve vodíkovém cyklu) najímaná do skleněné láhve opatřené dobře těsnící zabroušenou zátkou.
- **alkalický tlumivý roztok** obsahující současně NaOH o koncentraci 1 mol dm^{-3} a EDTA o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Roztok se uchovává v polyethylenové lahvi. Při stanovení nízkých koncentrací amonných iontů (méně než $< 0,5 \text{ mg dusíku na } 1 \text{ dm}^{-3}$) by se měl tento roztok asi 20 min povařit a před zředěním zchladit.
- **skladovací roztok**: vodný roztok NH_4Cl o koncentraci přibližně $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$
- **standardní roztok NH_4Cl o koncentraci 1000 mg dusíku na 1 dm^{-3}** . Roztok se uchovává v uzavřené skleněné lahvi. Je stálý alespoň jeden měsíc.
- **standardní roztok NH_4Cl o koncentraci 100 mg dusíku na 1 dm^{-3}** . Roztok se uchovává v uzavřené skleněné lahvi. Je stálý jeden týden.
- **laboratorní vzorky** v polyethylenových nebo skleněných lahvích; analyzují se co nejdříve; jinak se uchovávají do doby rozboru při teplotě $2-5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Přístroje a pomůcky

- **amoniaková membránová elektroda**
- **pH-milivoltmetr** měřící s přesností na $0,2 \text{ mV}$
- **magnetická míchačka** s míchadélky potaženými polytetrafluorethylenem (PTFE) nebo polypropylenem
- **kónické baňky** na 100 ml
- **pipeta** 5 ml , 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalibrace

Nejprve je nutno připravit vhodným ředěním standardních roztoků NH_4Cl alespoň tři kalibrační roztoky amonných iontů v rozsahu očekávaného koncentračního rozmezí v neznámém vzorku. Roztoky mají být vytemperované na laboratorní teplotu. Pak se pipetou odměří 50 ml kalibračního roztoku nejnižší koncentrace do suché kónické* baňky na 100 ml . Roztok se mírně míchá magnetickou míchačkou, počet

* Je sice možné přípustné použití i kádinku, ale vhodnější je kónická baňka s hrdlem právě tak širokým, aby pojalo elektrodu, neboť se tím snižují ztráty amoniaku.

otáček je 250-350 rpm ("rotate per minute" = počet otáček za minutu). Aby motor míchačky nezahřival vzorek, vloží se mezi baňku a míchačku tenká fólie izolačního materiálu. Do roztoku se ponoří špička amoniakové elektrody a dbá se na to, aby se na jejím konci nenachytaly bublinky. Potom se pipetou přidá 5 ml alkalického tlumivého roztoku. Po ustálení signálu se zaznamená hodnota změřeného potenciálu. Elektroda se vyjme z roztoku a opláchne se destilovanou vodou. Další kalibrační roztoky se měří postupně v řadě rostoucích koncentrací.

Již použité kalibrační roztoky nelze použít opakovaně, neboť se z nich uvolňuje tolik amoniaku, že po 5 až 10 min by naměřené hodnoty již nebyly přesné.

2. Kalibrační graf

Kalibrační graf se sestaví vynesáním hodnot naměřeného potenciálu ISE v závislosti na hodnotách dekadických logaritmů koncentrace amoniakových iontů (lze vyjádřit v miligramech dusíku na 1 dm³).

3. Stanovení

Před stanovením se laboratorní vzorky vytemperují na teplotu místnosti (teplota vzorku by měla být stejná jako teplota kalibračních roztoků). Odpipetuje se 50 ml vzorku do kónické baňky na 100 ml a postupuje se stejně jako v případě kalibračních roztoků. Koncentrace NH₄⁺ iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

4. Uchovávání amoniakové elektrody

V době mezi analýzami se amoniaková elektroda ukládá do jednoho z kalibračních roztoků, který se zalkalizuje tlumivým roztokem.

Pro delší skladování (např. přes noc) se elektroda ukládá ponořená dolním koncem do skladovacího roztoku NH₄Cl. Dolní konec elektrody se před použitím důkladně opláchne.

Stanovení koncentrace Ca^{2+} iontů ve vodě

Teorie

Koncentrace Ca^{2+} iontů ve vodě bude stanovena s využitím kombinované vápnikové iontově selektivní elektrody. Je vhodná pro stanovení vápenatých iontů ve vodných roztocích v biologických, zemědělských a potravinářských vzorcích, v hnojivech, půdách, krmivech, nápojích, vodách a minerálních vodách a pro mnoho dalších aplikací. Použití kombinované vápnikové ISE v organických rozpouštědlech nebo ve vzorcích obsahujících lipofilní organické látky drasticky snižuje její životnost.

Chemikálie

- CaCl_2 p.a. pevný (bezvodý) nebo $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný nebo $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný.
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- vápniková kombinovaná ISE
- pH-milivoltmetr
- 3 odměrné baňky 50 ml
- dělená pipeta 1 ml
- kádinky 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Uvedení elektrody do provozu

Před použitím musí být elektroda namočena do roztoku CaCl_2 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ na cca 1 hod. Na membráně elektrody nesmí být vzduchová bublinka, a to ani následně při měření! Po přepravě elektrody, kdy byla v jiných polohách než svislé, se může stát, že je sloupec vnitřního elektrolytu přerušen vzduchovou bublinkou a tím je přerušen elektrický kontakt mezi vnitřní referentní elektrodou a membránou. Tato závada se projeví nestabilní hodnotou měřené elektromotorické síly článku, stejně jako při ulpění vzduchové bublinky na vnějším povrchu membrány. Sloupec elektrolytu se spojí poklepáním elektrody způsobem „sklepávání rtuti teploměru“.

2. Kalibrace

Pro přípravu kalibračních roztoků se používá přesně odvážené množství pevné substance: buď 0,555 g bezvodého CaCl_2 nebo 0,735 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nebo 1,095 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, které se doplní na 50 ml deionizovanou vodou.

Tím získáme roztok CaCl_2 o koncentraci $0,100 \text{ mol/dm}^3$. Jeho ředěním destilovanou vodou připravíme do 50 ml odměrných baněk kalibrační roztoky CaCl_2 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$.

Poznámka:

Vzhledem ke kolísajícímu obsahu vody v použitých vápenatých solích se pro přípravu přesnějšího kalibračního standardu doporučuje stanovení obsahu vápníku chelatometrickou titrací.

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného připraveného kalibračního roztoku, ponoříme do něj kombinovanou vápnickovou ISE (předem omytou destilovanou vodou a šetrně osušenou buničitou vatou – pozor na membránu) a změříme elektromotorické napětí daného článku. Stejným způsobem měříme zbývající roztoky. Po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou.

3. Kalibrační graf

Kalibrační graf sestojíme vynesáním závislosti změřeného potenciálu na záporně vzatém dekadickém logaritmu koncentrace iontů Ca^{2+} , neboli $U = f(-\log c(\text{Ca}^{2+}))$. Závislost je lineární, lze využít metodu lineární regrese.

4. Stanovení

Při měření vzorků se postupuje stejně jako u kalibračních roztoků. Koncentrace Ca^{2+} iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

5. Údržba a uchovávání elektrody

Při výrazném poklesu hladiny referentního elektrolytu v referentní části elektrody nebo při výrazné změně napětí článku v kalibračních roztocích je nutno elektrolyt vysát injekční stříkačkou (po sejmutí plastové krytky z plnicího otvoru), doplnit nový roztok KCl o $c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ a plnicí otvor opět překrýt krytkou.

Krátkodobě má být elektroda uchovávána namočená čidlem do kalibračního standardu o koncentraci přibližně $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Při uchovávání delším než týden je doporučeno elektrodu očistit opláchnutím demineralizovanou vodou, překrýt čidlo transportní krytkou s několika kapkami demineralizované vody a uložit na sucho do původní krabičky. Při opětovném aktivování je nutno elektrodu kondicionovat jako při prvním uvedení do provozu.

Stanovení koncentrace Cu^{2+} iontů ve vodě

Teorie

Koncentrace Cu^{2+} iontů ve vodě bude stanovena s využitím měděné iontové selektivní elektrody. Elektroda nesmí být použita v nevodných prostředích.

Elektroda se trvale poškozuje v koncentrovaných roztocích amoniaku, kyanidů, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny dusičné a kyseliny chloristé.

Měděná ISE je podle údajů výrobce použitelná v oboru pH 1-13. Pro potenciometrická stanovení se však tento obor zužuje na oblast kyselou (pH 2-5), neboť v alkalické oblasti dochází ke srážení $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

Měření interferuje řada iontů:

Kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin, ionty "následujících kovů: Ni, Co, Cd, Zn, Pb, Fe, Ag, Hg, z aniontů pak např. Cl^- , Br^- , I^- , OH^- .

Chemikálie

- $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný
- NaNO_3 p.a. pevný.
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- měděná ISE
- referentní elektroda
- pH-milivoltmetr
- 3 odměrné baňky 50 ml
- dělená pipeta 1 ml
- kádinky 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalibrace

Pro přípravu kalibračních roztoků se používá přesně odvážené množství pevné substance: 1,208 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a., které se doplní na 50 ml deionizovanou vodou.

Tím získáme roztok o koncentraci $0,100 \text{ mol/dm}^3$. Jeho ředěním destilovanou vodou připravíme do 50 ml odměrných baněk kalibrační roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$.

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného připraveného kalibračního roztoku a změříme elektromotorické napětí daného článku složeného z měděné ISE a referentní elektrody. Takto proměříme postupně všechny kalibrační roztoky. Při proměřování roztoků o různém obsahu Cu^{2+} je nutné mezi jednotlivými měřeními elektrodu vždy opláchnout destilovanou vodou a opatrně osušit buničitou vatou. Rovněž po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou.

Poznámka 1: Odezva měděné ISE je při vyšších koncentracích prakticky okamžitá, u nižších koncentrací dochází ke zpoždění. Aby toto zpoždění bylo co nejmenší, doporučuje se míchání vzorku. Musí být ovšem zajištěno míchání s kons-

tantní rychlostí u všech vzorků a kalibrační graf musí být pořízen za stejných podmínek.

Poznámka 2: Pro lepší stabilitu potenciálu se doporučuje upravit iontovou sílu na hodnotu $I = 1$ roztokem $5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaNO}_3$.

2. Kalibrační graf

Kalibrační graf sestojíme vynesáním závislosti změřeného potenciálu na záporně vzatém dekadickém logaritmu koncentrace iontů Cu^{2+} , neboli $U = f(-\log c(\text{Cu}^{2+}))$. Závislost je lineární, lze využít metodu lineární regrese.

3. Stanovení

Při měření vzorků se postupuje stejně jako u kalibračních roztoků. Koncentrace Cu^{2+} iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

4. Údržba a uchovávání elektrody

Elektroda se přechovává po důkladném očištění deionizovanou vodou v suchu.

Stanovení koncentrace Pb^{2+} iontů ve vodě

Teorie

Koncentrace Pb^{2+} iontů ve vodě bude stanovena s využitím olověné iontově selektivní elektrody. Elektroda nesmí být použita v nevodných prostředích. Při měření se doporučuje roztoky míchat konstantní rychlostí.

Vliv pH:

Olověná ISE dává odezvu pouze na aktivitu Pb^{2+} iontů v roztoku. Nereaguje na olovnaté ionty přítomné ve sraženinách nebo komplexech vzniklých vlivem různé acidity roztoku.

Měření interferuje řada iontů:

Ionty Ag^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , S^{2-} , Fe^{2+} nesmí být přítomny. Ruší také následující ionty: Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} .

Pro měření s olověnou ISE se doporučuje při přímých stanoveních připravovat tzv. modelové standardy, v nichž osnova (iontové složení s výjimkou Pb^{2+} iontů) standardů odpovídá osnově vzorku. Naměřené hodnoty jsou pak přesnější.

Přímé měření olovnatých iontů tedy klade větší nároky na přípravu roztoků i samostatné elektrody. Elektrodu lze však velmi dobře použít k indikaci bodu ekvivalence při titračních stanoveních.

Chemikálie

- $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný
- KNO_3 p.a. pevný
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- olověná ISE
- referentní kalomelová elektroda: musí být opatřena můstkem plněným KNO_3 o koncentraci 1 mol/dm^3 .
- pH-milivoltmetr
- 4 odměrné baňky 50 ml
- dělená pipeta 1 ml
- kádinky 50 ml
- laboratorní míchačka
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalibrace

Pro přípravu kalibračních roztoků se používá přesně odvážené množství 2,300 g pevného $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. se doplní na 50 ml deionizovanou vodou.

Tím získáme roztok o koncentraci $0,100 \text{ mol/dm}^3$. Jeho ředěním destilovanou vodou připravíme do 50 ml odměrných baněk kalibrační roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$.

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného připraveného kalibračního roztoku a změříme elektromotorické napětí daného

člátku složeného z olověné ISE a referentní elektrody. Odečítání hodnoty napětí se provádí po zamíchání roztoku. Takto proměříme postupně všechny kalibrační roztoky. Při proměřování roztoků o různém obsahu Pb^{2+} je nutné mezi jednotlivými měřeními elektrodu vždy opláchnout destilovanou vodou a opatrně osušit buničitou vatou. Rovněž po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou.

2. Kalibrační graf

Kalibrační graf sestojíme vynesáním závislosti změřeného potenciálu na záporně vzatém dekadickém logaritmu koncentrace iontů Pb^{2+} , neboli $U = f(-\log c(\text{Pb}^{2+}))$. Závislost je lineární, lze využít metodu lineární regrese.

3. Stanovení

Při měření vzorků se postupuje stejně jako u kalibračních roztoků. Koncentrace Pb^{2+} iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

4. Údržba a uchovávání elektrody

Elektroda se přechovává po důkladném očištění deionizovanou vodou v suchu. Při dlouhodobějším skladování i při dlouhodobém máčení elektrody v roztocích se povrch čidla pasivuje. Je proto nutné čidlo občas přeleštit, aby měření nebylo zkreslené.

Stanovení koncentrace Cl^- iontů ve vodě

Teorie

Ke stanovení koncentrace chloridů ve vzorku vody využijeme potenciometrické měření s chloridovou iontově selektivní elektrodou. Ke kvantitativnímu stanovení využijeme metodu kalibrační závislosti: $U = f(\text{pCl})$, kde $\text{pCl} = -\log c(\text{Cl}^-)$.

Chemikálie

- destilovaná voda
- standardní roztoky KCl o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³.
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- chloridová ISE
- pH-milivoltmetr
- kádinky na 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalibrace a stanovení

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného standardního roztoku KCl, ponoříme do něj chloridovou ISE a referentní elektrodu (předem omyté destilovanou vodou a šetrně osušené buničitou vatou) a změříme elektromotorické napětí daného článku. Stejným způsobem měříme zbývající roztoky včetně laboratorního vzorku. Po ukončení měření opláchneme elektrody důkladně destilovanou vodou. Koncentrace Cl^- iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

2. Kalibrační graf

Kalibrační graf se sestaví vynesáním hodnot naměřeného potenciálu ISE v závislosti na hodnotách dekadických logaritmů koncentrace chloridových iontů.

3. Uchovávání chloridové elektrody

Elektrodu je vhodné uchovávat po důkladném očištění deionizovanou vodou v suchu (v „její“ krabičce), případně krátkodobě ponořenou v roztoku KCl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Není-li elektroda trvale přechovávána v roztoku, namáčí se před každým použitím.

Stanovení koncentrace NO_3^- iontů ve vodě

Teorie

Ke stanovení koncentrace dusičnanů ve vzorku vody využijeme potenciometrické měření s dusičnanovou iontově selektivní elektrodou. Ke kvantitativnímu stanovení využijeme metodu kalibrační závislosti: $U = f(\text{pX})$, kde $\text{pX} = -\log c(\text{NO}_3^-)$.

Chemikálie

- destilovaná voda
- standardní roztoky KNO_3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.
- laboratorní vzorek

Přístroje a pomůcky

- chloridová iontově selektivní elektroda
- pH-milivoltmetr
- Kádinky na 50 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalibrace a stanovení

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného roztoku KNO_3 , ponoříme do něj kombinovanou dusičnanovou ISE (předem omytou destilovanou vodou a šetrně osušenou buničitou vatou – pozor na membránu) a změříme elektromotorické napětí daného článku. Stejným způsobem měříme zbývající roztoky včetně laboratorního vzorku. Po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou. Koncentrace NO_3^- iontů se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí.

2. Kalibrační graf

Kalibrační graf se sestaví vynesáním hodnot naměřeného potenciálu ISE v závislosti na hodnotách dekadických logaritmů koncentrace dusičnanových iontů.

3. Poznámky k elektrodě

Kombinovaná dusičnanová ISE je určena pro měření vodných roztoků. Použití v organických rozpouštědlech nebo ve vzorcích obsahujících lipofilní organické látky drasticky snižuje její životnost. Je vhodná pro stanovení dusičnanových iontů v biologických, zemědělských a potravinářských vzorcích, v hnojivech, půdách, krmivech, nápojích, vodách a minerálních vodách.

ÚLOHY ZAMĚŘENÉ NA PRÁCI S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM

Stanovení koncentrace Li^+ iontů v rostlinném materiálu

Teorie

Biochemický význam Li^+ iontů

Uvedená problematika již byla diskutována na str. 4.

Výskyt Li^+ iontů v potravinách

Informací o obsahu Li^+ iontů v potravinách je dostupných prozatím poměrně málo, neboť donedávna nebyly lithné ionty pokládány za biochemicky „zajímavé“. Proto např. na stránkách Centrum pro databázi složení potravin (2013) není obsah lithných iontů v potravinách sledován. Dostupné informační zdroje se však shodují v tom, že největší obsah Li^+ iontů je v mléce a vejcích, za kterými následují rajčata, houby a okurky (u všech se udává obsah přibližně 0,5-0,8 mg/100 g). V případě rostlinných materiálů obsah Li^+ iontů do značné míry závisí na konkrétním složení půdy, na které daná rostlina vyrostla. Některé informační zdroje uvádějí jako významný zdroj Li^+ iontů též maso mořských ryb.

Stanovení kovů v organických látkách

Nejjednodušší způsob stanovení většiny kovů v organických látkách je stanovení popela. Látka se naváží do platinového nebo porcelánového kelímku, na vzduchu se opatrně spálí a zbytek vyžihá. Stříbro, zlato a platina jsou po vyžihání v elementární formě, zatímco hořčík, měď, hliník, železo, chrom, kadmium, olovo a cín poskytnou definované oxidy. Alkalické kovy a kovy alkalických zemin se po spálení látky v kelímku převádějí obvyklým způsobem na sírany odkouření s kyselinou sírovou.

Sloučeniny, z nichž při spalování uniká těkavý oxid kovu, nebo které mají v molekule zároveň halogen a může z nich při spalování unikat těkavý halogenid kovu, resp. látky explozivně se rozkládající je nutno mineralizovat na mokré cestě. Nejčastější je způsob podobný kjedahlizaci, při němž se používá směsi kyselin někdy ještě s přísadou peroxidu vodíku.

Konečné stanovení kovů se děje vhodnými postupy anorganické analýzy.

Výběr metody stanovení Li^+ iontů pro laboratorní cvičení

Lithné ionty v rostlinném materiálu budou v této úloze stanoveny potenciometricky za využití lithiové ISE. Protože tato elektroda se poškozuje v přítomnosti organických rozpouštědleh nebo lipofilních organických látek, bude vzorek organického materiálu nejprve mineralizován a lithné ionty následně stanoveny v mineralizátu. Z různých možností mineralizace bylo pro laboratorní cvičení z biochemie vybráno spálení vzorku a odkouření popela s kyselinou sírovou. Nejobvyklejší způsob mineralizace (Kjedahlova metoda) není v daném případě příliš vhodný, protože vzorek by byl po mineralizaci extrémně kyselý a mohl by poškozovat elektrodu. Jeho neutralizace na hodnotu přijatelnou pro iontově selektivní elektrodu ($\text{pH} = 3-10$) by znamenala zanesení dalších iontů do vzorku, které by následně interferovaly stanovení.

Úkol

- určit pomocí lithiové ISE obsah Li^+ iontů v zadaném rostlinném materiálu;
- zvážit, zda odpovídá teoretickým hodnotám (viz Teorie);
- porovnat svoje výsledky s výsledky jiných studentů a vyjádřit se k otázce, nakolik se obsah Li^+ iontů liší v závislosti na konkrétním vzorku.

Chemikálie

- $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ p.a. pevný
- **laboratorní vzorek** (plod rajčete)
- **koncentrovaná kyselina sírová**
- KOH , 1 mol/dm³

Přístroje a pomůcky

- **lithiová kombinovaná ISE**
- **pH-milivoltmetr**
- **5 odměrných baněk** 50 ml
- **pipeta** 5 ml
- **kádinky** 50 ml
- **trojnožka, kahan, trianql**
- **keramický kelímek**
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup

1. Příprava vzorku

Plod rajčete očistíme, osušíme a zvážíme. Rajče nad kelímkem ostrým nožem rozkrojíme tak, aby šťáva odkapávala pokud možno do kelímku. Kelímek na trianqlu nejprve mírně zahříváme (šťáva nesmí z kelímku stříkat nebo kypět), po vysušení šťávy pokročíme ke spalování. To se musí dít POMALU, přičemž kelímek je umístěn šikmo v trojhranu a je zahříván malým plaménkem umístěným pod okrajem kelímku. Teprve když zmizí poslední zbytky uhlí, postavíme kelímek v trojhranu kolmo, poklopíme NAHRÁTÝM víčkem a zvyšujeme postupně teplotu. Vysušení a částečného spálení vzorku lze dosáhnout i tím, že porcelánový kelímek se vzorkem postavíme na keramickou sítku a zahříváme ji středně velkým plamenem Bunsenova kahanu. Výhoda je v tom, že takto lze sušit na jedné síťce současně více kelímků.

Po úplném vyžihání a vychladnutí obsahu kelímku přidáme několik kapek koncentrované kyseliny sírové. Na keramickou sítku položíme trianql a na ni kelímek. Pomalu zahříváme až k úplnému vypaření. Vzorek nesmí při varu stříkat. Odpařování kyselin (a odkuřování amonných solí) je třeba vždy provádět v digestoři!

Po úplném vychladnutí obsah kelímku rozpustíme v destilované vodě a zkontrolujeme pH. Pokud je vzorek příliš kyselý (pH menší než 3), je nutné jej zneutralizovat přídatkem KOH (několik kapek). Následně pokud možno kvantitativně převedeme do odměrné baňky 50 ml a doplníme destilovanou vodou po rysku.

2. Stanovení obsahu Li^+ iontů ve vzorku

Stanovení obsahu lithných iontů ve vzorku (včetně kalibrace) provedeme stejným způsobem, jako je popsáno na str. 7. Z časových důvodů musí být samotné stanovení provedeno v jiném cvičení než příprava vzorku, případně může vzorek k ana-

lyže připravit jedna skupina studentů a analýzu provést jiná skupina v následujícím paralelním cvičení.

Protokol

Obsah lithných iontů přepočteme na původní rostlinný materiál a převedeme na jednotky mg/100 g.

Porovnáme s teoretickými údaji.

Porovnáme též s výsledky jiných studentů.

Stanovení koncentrace Cl^- iontů v mase/masných výrobcích

Teorie

U masných výrobků klademe při analýze kromě jiného důraz na zjištění obsahu chloridových a dusitanových iontů. Důvodem je nutnost ověřování množství chloridu sodného a dusitanu sodného (je součástí dusitanových solických směsí), přidávaných do masných výrobků kvůli chuti, vybarvení a údržnosti.

Vzorek masa (masný výrobek) se nejprve homogenizuje. Pak je třeba jej naředit vodou, zfiltrovat, filtrát vyčeřit a následně ve vyčeřeném filtrátu merkurimetry stanovit chloridy. Reakci vystihuje rovnice $2 \text{Cl}^- + \text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{HgCl}_2$. Dosažení ekvivalence lze indikovat pomocí difenylkarbazidu, který vytváří s nadbytečnými rtuťnatými kationty v přítomnosti kyseliny dusičné modrofialově zbarvené komplexy.

Stanovení je relativně náročné na počet vážení a na následný výpočet týkající se převodu výsledku na hmotnost originálního vzorku (maso/masný výrobek). Při práci je proto bezpodmínečně nutné si hmotnosti zapisovat a pečlivě značit, čeho se konkrétní číselné údaje týkají. Označení hmotnosti, které je v návodu uvedeno v závorkách, se vždy týká hmotnosti VZORKU, ne např. kádinky nebo filtrační baňky.

Chemikálie

- **destilovaná voda bez chloridů** (ke 100 cm^3 vody se přidá 1 cm^3 roztoku AgNO_3 ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) a $5 \text{ cm}^3 \text{HNO}_3$ (4 mol dm^{-3}). Nesmí vzniknout sraženina.
- **15% roztok $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$** ve vodě (Carrezův roztok I)
- **30% roztok síranu zinečnatého** ve vodě (Carrezův roztok II)
- **HNO_3** (koncentrovaná)
- **difenylkarbazid** (1% roztok v ethanolu)
- $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ **$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$**
- **vzorek masného výrobku** k analýze

Přístroje a pomůcky

- **mixer**
- **pH-milivoltmetr**
- **pipeta 50 ml**
- **kádinky**
- **filtrační papír a vybavení pro filtraci**
- **2 filtrační baňky**
- **odměrný válec 100 ml a 10 ml**
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Příprava vzorku

Přibližně 50 g vzorku masného výrobku (zváženého s přesností na desetiny gramu: m_1) vložíme do mixeru a přidáme pipetou 450 ml vody. Nádobu uzavřeme, míjeme celkem 2 minuty při postupně zvyšovaných otáčkách mixeru.

2. Odebrání homogenizátu k analýze

Ihned po mixování odebereme přibližně 50 ml vzorku do vytárované kádinky a stanovíme přesnou hmotnost tohoto vzorku (m_2). Přefiltrujeme do zvážené filtrační baňky, určíme přesnou hmotnost filtrátu (m_3).

Odvážíme přibližně 10 g filtrátu vzorku (m_4) do vytárované 100 ml kádinky, vyčeříme přidáním 5 ml roztoku činidla Carrez I a následně 5 ml roztoku činidla Carrez II. Promícháme a doplníme destilovanou vodou na přibližně 100 ml. Zvážíme (m_5).

Filtrujeme do zvážené filtrační baňky (m_6) a odebereme cca 10 g filtrátu do zvážené titrační baňky ke stanovení (m_7).

3. Provedení titrace

Vzorek v titrační baňce okyselíme několika kapkami koncentrované HNO_3 , přidáme 5 kapek roztoku difenylkarbazidu a titrujeme roztokem $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ do modrofialového zbarvení.

4. Slepý vzorek

50 ml destilované vody napipetujeme do kádinky na 250 ml. Dále postupujeme stejně jako v bodech 2 (odebrání homogenizátu k analýze) a 3 (provedení titrace).

Stanovení koncentrace NO_3^- iontů ve špenátu

Teorie

Ke stanovení koncentrace dusičnanů využijeme potenciometrické měření s dusičnanovou iontově selektivní elektrodou. Ke kvantitativnímu stanovení využijeme metodu kalibrační závislosti: $U = f(pX)$, kde $pX = -\log c(\text{NO}_3^-)$.

Chemikálie

- destilovaná voda
- pevný KNO_3
- $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ – vyluhovací roztok (10 g/dm^3),
- 10% H_2O_2
- špenát

Přístroje a pomůcky

- chloridová ISE
- pH-milivoltmetr
- Kádinky na 50 ml
- mixer
- filtrační papír a vybavení pro filtraci
- odměrný válec 100 ml a 10 ml
- odměrná baňka 50 ml (3 ks), 250 ml (1 ks)
- pipeta 5 ml
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Příprava kalibračních roztoků

Připravíme 50 ml standardního roztoku KNO_3 o $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ (rozpuštění KNO_3 i doplňování na objem 50 ml provádíme **vyluhovacím roztokem**). Ředěním standardního roztoku KNO_3 vyluhovacím roztokem připravíme do 50ml odměrných baněk kalibrační roztoky KNO_3 o koncentracích $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$.

2. Příprava vzorku

V kádince k asi 50 g rozmixovaného vzorku špenátu (přesnou hmotnost si poznačíme) přidáme odměrným válcem 70 ml vyluhovacího roztoku, 10 ml 10% H_2O_2 a roztok zahříváme tak dlouho, až je objem poloviční. Vzorek zfiltrujeme, filtr 3x promyjeme vyluhovacím roztokem, filtrát převedeme kvantitativně do 250ml odměrné baňky a doplníme po ochlazení vyluhovacím roztokem po rysku.

3. Kalibrace a stanovení

Do suché a čisté kádinky na 50 ml nalijeme asi 30 ml nejméně koncentrovaného roztoku KNO_3 , ponoříme do něj kombinovanou dusičnanovou ISE (předem omytou destilovanou vodou a šetrně osušenou buničitou vatou – pozor na membránu) a změříme elektromotorické napětí daného článku. Stejným způsobem měříme zbývající kalibrační roztoky včetně cca 30 ml filtrátu ze špenátu. Po ukončení měření opláchneme elektrodu důkladně destilovanou vodou. Koncentrace NO_3^- iontů (v jednotkách mol/dm^3 se zjistí z kalibračního grafu a příslušné změřené hodnoty napětí. Zjištěný obsah dusičnanů pak přepočteme na mg NO_3^- na 1 kg špenátu.

4. Kalibrační graf

Kalibrační graf se sestojí vynesemím hodnot naměřeného potenciálu ISE v závislosti na hodnotách dekadických logaritmů koncentrace dusičnanových iontů.

5. Poznámky k elektrodě

Kombinovaná dusičnanová ISE je určena pro měření vodných roztoků. Použití v organických rozpouštědlech nebo ve vzorcích obsahujících lipofilní organické látky drasticky snižuje její životnost. Je vhodná pro stanovení dusičnanových iontů v biologických, zemědělských a potravinářských vzorcích, v hnojivech, půdách, krmivech, nápojích, vodách a minerálních vodách.

Stanovení chlorofylů v listech zelených rostlin

Teorie

Téměř všechny živé organismy na Zemi (výjimku tvoří např. chemolithotrofní bakterie) využívají ve svých metabolických procesech chemickou energii, která byla přeměněna z energie světelného záření v procesu fotosyntézy. Z hlediska života na Zemi patří tedy chlorofyly ke klíčovým látkám.

Chlorofyly existují ve dvou formách (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*), přičemž tyto formy se v přírodě vyskytují v hmotnostním poměru 3:1 (chlorofyl *a* : chlorofyl *b*). Jsou dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (ethanol, aceton, benzen...).

Úkoly

- 1) Z určeného rostlinného materiálu vyextrahovat směs chlorofylů.
- 2) Určit obsah každé z obou forem chlorofylu v daném rostlinném materiálu (vyjádřit v hmotnostních procentech živé váhy daného rostlinného materiálu).

Chemikálie

- listy kopřivy, řepy, špenátu nebo kukuřice
- uhličitan vápenatý
- mořský písek
- aceton

Přístroje a pomůcky

- třecí miska s tloučkem
- vybavení pro filtraci
- odměrná baňka 50 ml
- pipety a odměrné baňky pro případně potřebné další ředění vzorku
- spektrofotometr a kyvety
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Extrakce

Odvážíme 2 g čerstvých listů, rozstříháme je na menší kousky a ve třecí misce je rozetřeme s menším množstvím mořského písku a uhličitanu vápenatého (na špičku nože) a několika mililitry acetonu. Směs zfiltrujeme přes malý filtr smočený acetonem do 50 ml odměrné baňky. Dalšími dávkami acetonu převedeme barviva kvantitativně do filtrátu (odbarvení třecí misky i filtračního papíru) a objem doplníme acetonem po značku.

2. Fotometrické stanovení chlorofylů

Odměřené množství extraktu listových barviv vhodně zředíme acetonem a v kyvetě o optické dráze 1 cm změříme absorbanci při 663 nm a při 645 nm. Slepý vzorek (blank) je aceton, nikoli voda.

3. Vyhodnocení a diskuse výsledků

- Koncentraci obou chlorofylů v jednotkách mg chlorofylu na 1 dm³ roztoku vypočítáme podle vztahů

$$C_a = 12,70 A_{663} - 2,69 A_{645}$$

$$C_b = 22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}$$

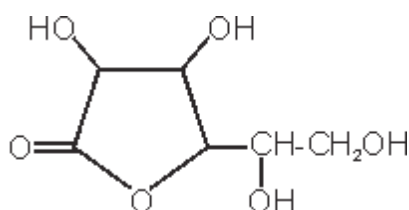
- Zjištěné množství obou chlorofylů převedeme na jednotku hmotnosti původní rostlinné tkáně (listy) a uvedeme ve hmotnostních procentech čerstvé hmotnosti.
- Jaký je poměr hmotnosti chlorofylu *a* ku hmotnosti chlorofylu *b* ve Vámi rozebíraném materiálu? Odpovídá tento poměr teoreticky udávaným hodnotám?
- Porovnejte svoje výsledky s výsledky Vašich spolužáků. Jak se liší obsah chlorofylů u různých rostlin rozebíraných v rámci laboratorního cvičení?

Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu a potravinových doplňcích

V následující části skript jsou uvedeny laboratorní úlohy využívající Landoltův efekt a potenciometrii pro stanovení obsahu askorbové kyseliny (vitamínu C) v potravinách.

Vlastnosti askorbové kyseliny

Vitamín C krystalizuje v bezbarvých destičkách s bodem tání 190-192 °C, dobře ve vodě rozpustných, v alkoholu se rozpouští podstatně méně, v benzenu, chloroformu, etheru a tucích rozpustná není. Ve vodných roztocích se chová jako středně silná dvojsytná kyselina s disociačními exponenty $pK_1 = 4,17$ a $pK_2 = 11,57$. Je opticky aktivní. Má silné redukční vlastnosti.



vzorec askorbové kyseliny

Askorbová kyselina je na vzduchu nestálá, snadno se oxiduje na dehydroaskorbovou kyselinu. Tato oxidace je jako všechny chemické reakce urychlována zvýšenou teplotou. Z toho důvodu je třeba např. ovoce a zeleninu konzumovat nejlépe v syrovém stavu, v případě nutnosti tepelné úpravy dáváme přednost co nejkratší době trvání tepelné úpravy (např. vařené brambory askorbovou kyselinu ještě obsahují, avšak bramborové knedlíky připravené vařením těsta připraveného z vařených brambor již vitamín C neobsahují téměř vůbec), nápoje obsahující vitamín C je po otevření vhodné uchovávat v chladničce apod. Také vzorky určené ke stanovení obsahu askorbové kyseliny je zapotřebí uchovávat v chladnu a bez přístupu vzduchu a odebírání vzorku i analýzu samotnou je zapotřebí provádět pokud možno rychle.

Snadné oxidace askorbové kyseliny využívají i některé analytické metody jejího stanovení.

Výskyt askorbové kyseliny v rostlinných a živočišných tkáních

Askorbová kyselina je normální součástí rostlinných i živočišných tkání. V těle dobře živého člověka je zásoba asi 1500 mg askorbové kyseliny, zejména v játrech, svalstvu a mozku. Z ní může organismus po určité době čerpat. Zásoby askorbové kyseliny si člověk musí doplňovat z potravy. Zvláště bohaté na vitamín C jsou některé plody.

Obsah vitamínu C v ovoci a zelenině dle různých informačních zdrojů

Druh ovoce či zeleniny	Obsah vitamínu C mg/100 g (Lewin, 1976)	Obsah vitamínu C mg/100 g (Knobloch, 1996)
Ananas	24	–
Banán	12	10
Borůvka	16	–
Broskev	8	–
Citron	40	50
Černý rybíz	110	180
Červený rybíz	35	58
Grapefruit	40	40
Hruška	8	–
Jablko	8	12
Jahody (zahradní)	60	35
Kiwi	–	–
Malina	24	30
Mandarinka	40	40
Meruňka	8	9,5
Ostružina	24	–
Pomeranč	52	41
Rajče	25 až 35	30
Švestka	8	–
Brambory nové	24	35
Brambory staré	12	15
Paprika zelená	120	–
Květák	55	70
Hrách zelený	15 až 24	20
Křen	200	136
Zelí bílé	25 až 35	25

I v rámci jednotlivých druhů ovoce (zeleniny) však existují značné rozdíly v obsahu vitamínu C podle odrůdy, vyzrálosti, délky a charakteru skladování a způsobu zpracování. Údaje v ta-bulkách 5.1, 5.2 je proto třeba chápat jen jako průměry ze značné variační šíře individuálních hodnot. Různé informační zdroje udávají různé hodnoty. Z toho plyne, že složení biologického materiálu není vhodné udávat v konkrétních číslech, ale spíše v intervalech (rozsahu hodnot) a musí se počítat s nejednotností literárních údajů. Bylo by proto nevhodné např. děti ve škole nutit, aby se taková data učily zpaměti.

Obsah askorbové kyseliny ve farmaceutických preparátech a ve vitamínově obohacených nápojích

S ohledem na nutnost přesného řízení terapie je nezbytně nutné, aby obsah léčivých látek v lécích byl co nejpřesněji znám a neměl by se s časem příliš měnit. Proto se dá očekávat, že experimentálně stanovený obsah askorbové kyseliny ve farmaceutických preparátech bude velmi dobře souhlasit s údajem výrobce.

V případě vitamínově obohacených nápojů je situace poněkud odlišná. Tyto nápoje nejsou většinou míněny jako léčiva, ale především jako zákazníkům žádané zboží. Je zdánlivým paradoxem, že právě u kvalitnějších nápojů s velkým obsahem ovocné složky experimentálně zjištěný obsah askorbové kyseliny často neodpovídá údajům výrobce. Nebývá však menší (v důsledku samovolné oxidace askorbové kyseliny), ale nečekaně vyšší. Příčinou je skutečnost, že askorbová kyselina je obsažena již ve výrobní surovině (ovoci), avšak její obsah je proměnlivý, závislý na druhu ovoce, stáří, stupni zralosti, době skladování, přesném postupu přípravy ovocné šťávy, ... Průběžné stanovování konkrétního obsahu askorbové kyseliny v rostlinné složce by bylo časově i finančně náročné. Proto výrobci často uvádějí nikoliv skutečnou koncentraci askorbové kyseliny v nápoji, nýbrž koncentraci pouze té askorbové kyseliny, kterou do nápoje během výroby přidali. Stabilita askorbové kyseliny v nápojích bývá podstatně menší než v léčících. Doporučený způsob a doba skladování nápoje po otevření obalu bývají na výrobcích napsány.

Význam askorbové kyseliny

Askorbová kyselina je biologicky velmi významná látka. Může příznivě ovlivňovat přenos nervových vzruchů, zasahuje do detoxikace histaminu, řady farmak a cizorodých látek v organismu, spolu s vitamínem E inhibuje tvorbu nitrosaminu, stimuluje imunitní systém organismu, snižuje obsah cholesterolu v krvi a účastní se také biologických procesů, které se podílejí na rezistenci proti nádorovému bujení.

Askorbová kyselina bývá označována také jako tzv. „antiskorbutický faktor“. Skorbut (kurděje) je onemocnění vyznačující se bolestí svalů a kloubů, únavou, krvácením, onemocněním dásní a v dřívějších dobách byl častým nebezpečným onemocněním námořníků, jejichž přísun askorbové kyseliny během plavby bez zásob ovoce a zeleniny byl po dlouhou dobu zcela nepostačující.

Doporučená denní dávka askorbové kyseliny

Názory odborníků na doporučenou denní dávku se různí. V České republice je současný doporučený příjem askorbové kyseliny 60 mg na den a např. v Íránu je 70 mg na den. Je však velmi zajímavé, že doporučené množství jeví časem mírně rostoucí tendenci.

Hypervitaminóza vitamínem C sice není známa, avšak podávání nadměrných dávek vitamínu C bývá spojeno se střevními a jinými potížemi, případně se zvýšeným rizikem tvorby močových kamenů. A konečně není jisté, zda na velké dávky vitamínu C nevzniká návyk, takže po jejich přerušení by na tom člověk byl hůře, než když je začal užívat[†].

[†] Jsou známy případy, kdy matka v těhotenství záměrně přijímala vysoké dávky askorbové kyseliny pro udržení zdraví svého i plodu, avšak její dítě po narození bylo proti očekávání více nemocné než ostatní, stejným způsobem stravované děti, jejichž matky však nadbytek askorbové kyseliny v těhotenství nepřijímaly.

Kineticko-spektrofotometrické stanovení askorbové kyseliny

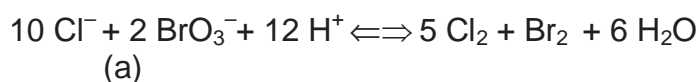
Teorie

Metodám aplikujícím zákonitosti chemické kinetiky pro účely chemické analýzy je v poslední době věnována značná pozornost. Stejně jako ostatní metodiky analytické chemie nejsou ani kinetické metody obecně použitelné pro jakékoliv analýzy. Existuje však řada stanovení, kde kinetický způsob řešení je výhodnější než využití rovnovážných metod.

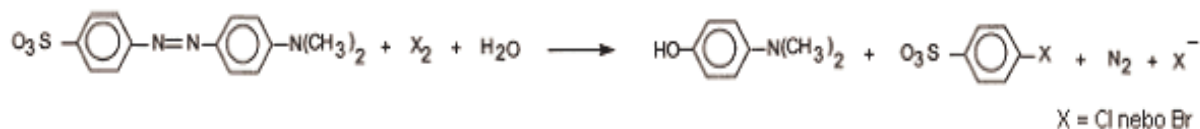
V této úloze bude využita indukční perioda chemické reakce, což je doba uplynulá od smíchání výchozích látek, během které reakce zdánlivě neprobíhá. Po svém objeviteli se tento jev nazývá Landoltův efekt. Většinou se Landoltův efekt projevuje u pomalých dějů oxidačně-redukčních, ve kterých reagují halogeny v různých oxidačních stupních. Ke vzniku indukční periody dochází zejména u reakcí probíhajících ve více krocích.

Metoda použitá v této laboratorní úloze je založená na inhibičním vlivu askorbové kyseliny na reakci mezi bromičnanem a kyselinou chlorovodíkovou. Produkty této reakce odbarvují methyloranž, což může být sledováno spektrofotometricky při 510 nm.

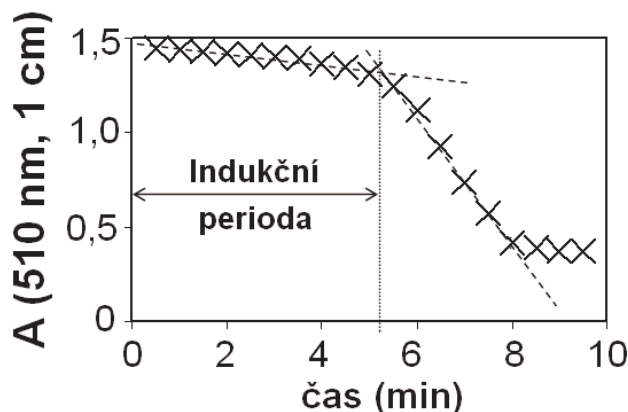
Nejprve bromičnan reaguje s kyselinou chlorovodíkovou:



Vzniklé plyny (Br_2 a Cl_2) reagují s methyloranží, což vede k jejímu odbarvení:



Tento děj může být sledován spektrofotometricky měřením poklesu absorbance reakční směsi při 510 nm. Askorbová kyselina přednostně reaguje s produkty reakce (brom, chlor), což způsobuje vznik indukční periody (odpovídá času potřebného na zreagování přítomné askorbové kyseliny. Až je askorbová kyselina z roztoku vyčerpána, reaguje další vznikající brom a chlor s methyloranží a odbarvuje ji. Indukční perioda vzrůstá s rostoucí koncentrací askorbové kyseliny ve vzorku. Závislost absorbance na čase má typický tvar:



Indukční periodu zjistíme tak, že lineárními úseky prvních dvou částí grafu vedeme přímkou. Čas odpovídající průsečíku těchto přímek je indukční perioda.

Závislost indukční periody na koncentraci askorbové kyseliny při dané teplotě je nelineární. Naměření kalibrační závislosti je časově náročné a přesahuje časové možnosti laboratorního cvičení z biochemie, proto koncentraci askorbové kyseliny vypočteme ze stanovené indukční periody řešením regresní funkce, tj. kvadratické rovnice

$$t = -0,0082 c^2 + 0,6085 c \quad (\text{platí pro } 25 \text{ } ^\circ\text{C}) \quad , \text{ kde}$$

t indukční perioda (min),

c koncentrace askorbové kyseliny (mg/100 ml).

Úkol

Kineticko-spektrofotometrickou metodou stanovit obsah askorbové kyseliny ve vybraném farmaceutickém preparátu (na začátku semestru si jedno balení opatří celá laboratorní skupina).

Chemikálie

- $1,44 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KBrO}_3$
- **roztok methyloranže v HCl** (vzniklý z $27,3 \text{ cm}^3$ $4 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$ a 25 cm^3 methyloranže o $c = 125 \text{ mg/dm}^3$ doplněním do 250 cm^3 destilovanou vodou),
- vzorek k analýze

Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr,
- kvety,
- pipety a odměrné baňky na zředění vzorku
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

- Zapneme spektrofotometr a nastavíme vlnovou délku 510 nm. Přístroj necháme žhavit.
- Podle údajů výrobce zjistíme teoretický obsah askorbové kyseliny ve vzorku (mg/100ml). Máme-li analyzovat tuhý farmaceutický preparát, nejprve jej kvantitativně převedeme do roztoku.

- Vzorek zředíme na očekávanou koncentraci askorbové kyseliny přibližně 7 mg/100 ml. Výpočet si necháme zkontrolovat vyučujícím.
- Pak kineticko-spektrofotometrickou metodou stanovíme koncentraci askorbové kyseliny ve zředěném vzorku:
 - o Do kyvety o optické dráze 1 cm napipetujeme 1,6 cm³ roztoku methyloranže v HCl.
 - o Mikropipetou přidáme 200 µl zředěného roztoku vzorku (pipetu po vytlačení vzorku v kyvetě důkladně propláchneme tím, že při ponoření špičky několikrát stiskneme ovladač a opět uvolníme).
 - o Pak kyvetu umístíme do držáku kyvet ve spektrofotometru a zapneme režim auto-matického měření po 15 sekundách.
 - o Do mikropipety nabereme 200 µl $1,44 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KBrO}_3$.
 - o Přesně v okamžiku zvukového signálu přístroje vyprázdníme obsah pipety do kyvety a obsah kyvety promícháme tím, že špičku v roztoku v kyvetě 10× propláchneme (celá operace smí trvat nanejvýš 10 sekund).
 - o Pak uzavřeme spektrofotometr a po každém zvukovém signálu zaznaménáme absorbanci až se zastaví pokles absorbance (cca 10-20 minut).
 - o Měření třikrát opakujeme.

Protokol

- Přesné informace výrobce o zkoumaném vzorku (název výrobku, složení, teoretický obsah askorbové kyseliny, záruka, datum výroby, čas otevření, výrobce).
- Graf závislosti absorbance na čase, z něj odečtená indukční perioda.
- Dosazením indukční periody do kalibrační rovnice vypočteme koncentraci askorbové kyseliny ve zředěném vzorku a pak ve vzorku původním.
- Každé měření kineticko-spektrofotometrickou metodou vyhodnotíme zvlášť a vypočteme průměrnou koncentraci.
- Výsledek srovnáme s údajem výrobce.

Potenciometrické stanovení askorbové kyseliny v ovocném nápoji

Teorie

Potenciometrické stanovení askorbové kyseliny je založeno na skutečnosti, že kyselina askorbová je poměrně silným redukčním činidlem. Proto ji lze titračně stanovit roztokem jodu. Askorbová kyselina přitom přechází na dehydroaskorbovou kyselinu.

Úkol

Potenciometricky stanovit obsah vitamínu C ve vzorku ovoce nebo zeleniny.

Chemikálie

- 0,4 % roztok škrobu
- **odměrný roztok jodu** o koncentraci takové, aby 1 cm³ I₂ ztitroval přibližně 1,1 mg vitamínu C (přesná koncentrace je uvedena na láhvi)
- 0,2 mol.dm⁻³ roztok **octanového pufru**,
- vzorek (ovocný nápoj) dle instrukcí vyučujícího.

Přístroje a pomůcky

- pipety a odměrné baňky na odběr a případné ředění vzorku
- dělená pipeta 2 ml
- kádinky
- mikropipeta na 20 – 200 µl,
- ionmetr,
- indikační platinová elektroda, referentní kalomelová elektroda,
- elektromagnetická míchačka, plastové míchadélko
- pyknometr
- Obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

- Před samotnou potenciometrickou titrací provedeme orientační stanovení (titrací roztokem jodu s vizuální indikací pomocí škrobu). Do kádinky o objemu 50 cm³ napipetujeme takové množství vzorku, aby obsahovalo přibližně 2 mg askorbové kyseliny (vypočteme podle údajů výrobce). Přidáme tři kapky 0,4% roztoku škrobu, vložíme míchací tělíčko, kádinku umístíme do středu magnetické míchačky a zapneme míchání. Do pipety o objemu 2 cm³ nasajeme roztok I₂ (o koncentraci uvedené na reagenční láhvi) po rysku. Pipetu držíme ve svislé poloze, do kádinky vypouštíme roztok jodu a pozorujeme změnu zbarvení. Titrujeme do modrofialového zbarvení.
- Ze spotřeby přidaného odměrného roztoku jodu úměrou vypočítáme potřebný objem vzorku pro následující potenciometrickou titraci tak, aby spotřeba roztoku jodu při potenciometrické titraci byla přibližně 0,2 – 0,4 cm³.
- Potenciometrickou titraci provedeme následujícím způsobem:
 - o Do kádinky o objemu 50 cm³ napipetujeme vypočítané množství vzorku (ovocného nápoje), vložíme míchací tělíčko, umístíme ji do středu magnetické míchačky a do roztoku ponoříme elektrody (srovnávací kalomelovou a indikační platinovou) omyté destilovanou vodou a osušené tampónem. Elektrody připojíme k ionmetru a zapneme míchání.

- Nejprve jednorázově přidáme mikropipetou 100 μl odměrného roztoku jodu a změříme napětí. Pak přidáváme po 10 μl a měříme napětí. Skončíme nejméně 10 přídavků za bodem ekvivalence. Titrujeme 3 \times .
- Po skončení titrace vypneme míchání, vyjmeme elektrody, opláchneme a osušíme. Referentní elektrodu zakryjeme krytkou.
- Hustotu nápoje určíme pyknometricky.

Protokol

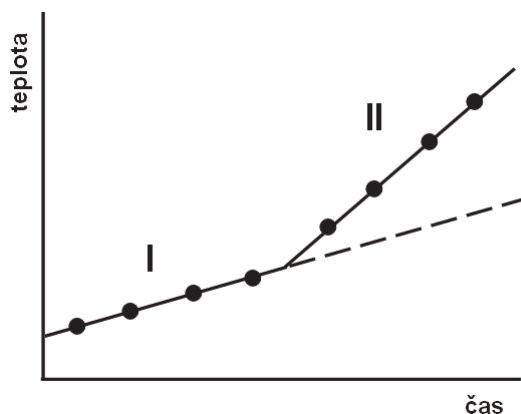
- 1) Přesné informace výrobce o zkoumaném vzorku (název výrobku, složení, teoretický obsah askorbové kyseliny, záruka, datum výroby, čas otevření, výrobce).
- 2) Tabulka s objemy odměrného roztoku jodu a naměřenými hodnotami napětí.
- 3) Určení bodu ekvivalence graficky.
- 4) Obsah askorbové kyseliny přepočtený na 100 gramů originálního nápoje.
- 5) Srovnání získaného výsledku s údaji výrobce.

Rychlost katabolické činnosti mikroorganismů

Teorie

Katabolické štěpení vazeb substrátu je vždy soustava exotermních reakcí. Uvolněné množství tepla je úměrné celkovému rozsahu reakce. Dále bylo zjištěno, že skladné (anabolické) reakce (např. ukládání zásobního substrátu v buňkách), jsou endotermní reakce provázené tak malými tepelnými změnami, že je lze ve srovnání s teplem uvolněným při katabolickém štěpení substrátu zanedbat. V případě provedení reakce v Dewarově nádobě uvolněné teplo zahřívá obsah nádoby, přičemž teplota roztoku je přímo úměrná uvolněnému teplu. Proto lze využít naměřené závislosti teploty na čase k vystižení kinetiky odbourávání substrátu.

Uvažujme situaci, kdy čistou kulturu mikroorganismů, vypěstovanou v nadbytku substrátu, přeneseme do pufru bez substrátu. Mikroorganismy v takové situaci tráví zásobní substrát (I). Po dodatečném přidavku substrátu se produkce tepla zvýší (II), přičemž proces II je složen jednak z trávení zásobního substrátu, jednak ze spalování vnějšího substrátu. Pomocí výpočtu na základě rovnice Michaelise-Mentenové lze odvodit, že oba procesy (I, II) se při dostatečném množství substrátu řídí kinetikou nultého řádu a že tedy rychlost obou dějů je vůči substrátu nultého řádu. Pak je závislost tepla/teploty na čase lineární, jak znázorňuje následující obrázek.



Příklad závislosti teploty na čase

Předpokládá se, že po přidání substrátu oba tyto procesy probíhají v buňkách současně a jen velmi málo se ovlivňují. Proto lze proces I extrapolovat (v obrázku čárkovaná čára). Pokud děj I probíhá rychlostí v_I a děj II rychlostí v_{II} (obě rychlosti jsou v souladu s kinetikou nultého řádu konstantní), pak rychlost spalování vnějšího substrátu

$$v_{EX} = v_{II} - v_I \quad (1)$$

Rychlost chemických dějů v této úloze zjednodušeně vyjádříme jako rychlost uvolňování tepla činností mikroorganismů, tj.

$$v = \frac{d\Delta Q}{dt} = C \frac{d\Delta T}{dt}, \text{ kde } \frac{d\Delta T}{dt} \text{ je směrnice závislosti teploty na čase.} \quad (2)$$

Jako snadno dostupný vzorek mikroorganismů budeme v laboratorním cvičení používat kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské droždí), jako substrát bude použita sacharóza.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* dovedou sacharózu odbourávat dvěma způsoby současně. Aerobně dýcháním a anaerobně kvašením. Pro zjednodušení situace v experimentu záměrně potlačíme dýchání (pomocí přídavku 2,2-dinitrofenolu), takže bude sacharóza přeměňována pouze kvašením.

Teplo vyprodukované kvasinkami se využije na zahřátí reakční nádoby, přičemž uvolněné teplo Q (záporně vzatá reakční enthalpie H) je přímo úměrné vzrůstu teploty T uvnitř kalorimetru:

$$Q = C\Delta T = -\Delta H, \text{ kde} \quad (3)$$

C je tepelná kapacita kalorimetru. Postup jejího stanovení byl podrobně vysvětlen např. ve skriptech CÍDLOVÁ, Hana. *Laboratorní cvičení z fyzikální chemie*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2003. 124 s. ISBN 80-210-3300-2 na str. 61-62.

Úkol

Určit rychlost spalování zásobních látek v_i a rychlost spalování externího substrátu v_{EX} při anaerobním katabolismu sacharózy u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Chemikálie

- **pekařské droždí** (kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*)
- **fosfátový pufr o pH = 7**
- **sacharóza**
- **2,2-dinitrofenol**

Přístroje a pomůcky

- **odměrný válec** 150-250 ml
- **váženka**
- **pipeta** 50 ml
- **stopky**
- **lžička, navažovací lodička**
- **voltmetr, ampérmetr**
- **vodiče, krokosvorky, klíč**
- **zdroj stejnosměrného elektrického napětí** o velikosti přibližně 9 V,
- **Dewarova nádoba** se zátkou s otvory pro vybavení (topení, míchadlo, Beckmannův teploměr a dávkovač substrátu)
- **Výše uvedené vybavení kalorimetru (Dewarovy nádoby)**
- obvyklé laboratorní vybavení

Postup práce

1. Kalorimetrie katabolismu

Přesvědčíme se, že sloupec rtuti je ve spodní třetině stupnice Beckmannova teploměru. Není-li tomu tak, informujeme vedoucího cvičení, neboť je zapotřebí nastavit teploměr na pracovní teplotu.

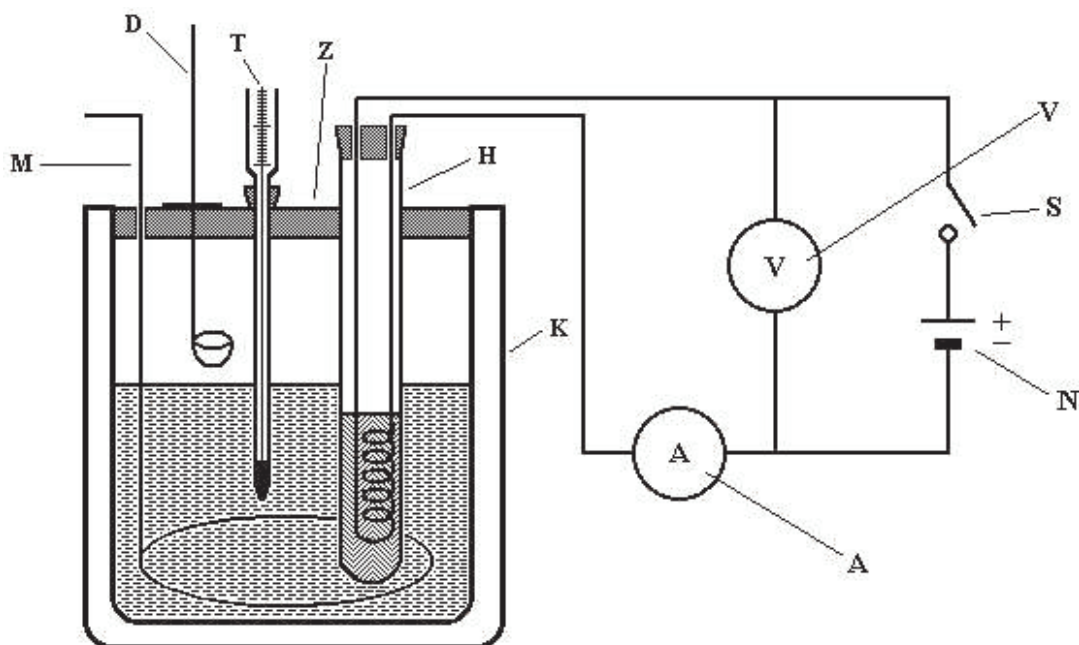
Odvážíme 2 g jemně rozdrobeného droždí na předvážkách a rozpustíme je ve 100 ml fosfátového pufru (pipetovat) v kalorimetrické nádobě, velmi opatrně zamícháme. Necháme stát přibližně 15 minut.

Zatím navážíme přibližně 0,2 g substrátu (sacharózy) s přesností na mg. Odvážíme asi 5 mg 2,4-dinitrofenolu a vsypeme do pufru s kvasinkami. Opatrně zamícháme.

Do dávkovače substrátu (lžička s otvorem pro zarážku) vsypeme naváženou sacharózu, dávkovač zajistíme v horní poloze drátkem a po vsunutí míchadla do otvoru v zátce uzavřeme kalorimetr.

Nakonec opatrně vložíme Beckmannův teploměr a kalorimetr **opatrně** uzavřeme, aniž by se sacharózy vysypala do roztoku. Topidlo i banička teploměru musí být ponořeny.

Sestavíme elektrický obvod podle níže uvedeného obrázku. Krátkým sepnutím klíče (nejvýše několik sekund) ověříme správnost zapojení (proud desetiny ampéru, napětí jednotky voltů).



Reakční aparatura

V voltmetr
 A ampérmetr
 S klíč
 N zdroj napětí
 M míchadlo

H topení
 T Beckmannův teploměr
 D dávkovač
 K kalorimetr
 Z zátka

Za občasného opatrného míchání měříme teplotu v tříminutových intervalech po dobu 30 minut. Pak odstraníme zarážku z dávkovače, zasuneme jej na dno Dewarovy nádoby (tím ke kvasinkám přidáme substrát) a opatrně mícháme dávkovačem (lžičkou) místo míchadlem. Nadále měříme teplotu v tříminutových intervalech po dobu dalších 30 minut. Celá doba měření je tedy 60 minut.

2. Stanovení tepelné kapacity kalorimetru

Do čistého suchého kalorimetru napipetujeme 100 ml fosfátového pufru a kalorimetr uzavřeme zátkou s příslušenstvím.

Po ustálení teploty sepne elektrický obvod a necháme jej zapnutý tak dlouho, až teplota vzroste přibližně o 0,5 až 1 stupeň. Po celou tuto dobu obsah kalorimetru promícháváme a po 30 vteřinách zapisujeme teplotu. Zapišeme velikost proudu a napětí v obvodu a dobu (s přesností na vteřiny), po kterou obvodem procházel proud. Teplotu ve třicetivteřinových intervalech zapisujeme i po vypnutí proudu tak dlouho, dokud se teplota neustálí.

Protokol

- Stručně princip úlohy a postup měření
- Výpočet tepelné kapacity kalorimetru dle (3)
- Graf závislosti teploty na čase
- Určení směrnice obou částí grafu
- Vyčíslení rychlostí v_I , v_{II} a v_{EX} dle (2) a (1)

POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

CALLAHAN, Susan M. Lithium-Rich Foods--Why You Need Them In Your Diet. *COLLECTIVE WIZDOM.COM* [online]. November 25, 2013 [cit. 2013-12-18]. Dostupné z: <http://collectivewizdom.com/Lithium-LithiumRichFoods.htm>

Centrum pro databázi složení potravin. Ústav zemědělské ekonomiky a informací a Výzkumný ústav potravinářský Praha. *On-line databáze složení potravin ČR, verze 4.13* [online]. 2013 [cit. 2013-12-18]. Dostupné z: <http://www.czfcdb.cz>.

CÍDLOVÁ, Hana. *Laboratorní cvičení z fyzikální chemie*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2003. 124 s. ISBN 80-210-3300-2

Elektrochemické Detektory, spol. s.r.o. Kombinovaná dusičnanová iontově selektivní elektroda typ, 25-31+.

Elektrochemické Detektory, spol. s.r.o. Amoniová kombinovaná iontově selektivní elektroda, typ 25-10+.

Elektrochemické Detektory, spol. s.r.o. Vápníková kombinovaná iontově selektivní elektroda, typ 25-20+.

Elektrochemické Detektory, spol. s.r.o. Lithiová iontově selektivní elektroda, typ 25-03+.

FISCHER, Oldřich a Libuše TRNKOVÁ. Pokročilé cvičení z fyzikální chemie pro posluchače biologie. Univerzita J. E. Purkyně v Brně: Brno, 1993.

Knobloch E.: Fyzikálně chemické metody stanovení vitamínů. ČSAV (Praha), 300 (1996).

Kolektiv autorů Oddělení fyziologie a anatomie rostlin, MU Brno. *Fyziologie rostlin - cvičení : Stanovení obsahu chlorofylů a a b spektrofotometricky* [online]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/chlorofyly.htm>

Lewin S.: Physiochemical properties. Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential. Academic Press Inc. (London) Ltd., 6–22 (1976).

MACHOLÁN, L., L. SKURSKÝ, L. a P. ZBOŘIL. *Laboratorní cvičení z biochemie I*. 2. vyd. Brno : Univerzita J. E. Purkyně, 1975.

Monokrystaly, s.r.o. OLOVĚNÁ iontově selektivní elektroda typ 82-37 : PRACOVNÍ NÁVOD.

Monokrystaly, s.r.o. MĚDĚNÁ iontově selektivní elektroda typ 29-37 : PRACOVNÍ NÁVOD.

Monokrystaly, s.r.o. CHLORIDOVÁ iontově selektivní elektroda typ 17-37 : PRACOVNÍ NÁVOD.

ROUBAL, Jiří. *Základy analytické chemie* [online]. Dostupné z:
http://www.chesapeake.cz/chemie/download/skripta/analyticka_chemie.pdf

STRAKA, I. a L. MALOTA. *Chemické vyšetření masa: (klasické laboratorní metody)*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 2006, 94 s. ISBN 80-86659-09-7.

TOMÍČEK, Oldřich. *Kvantitativní analýsa*. III. rozšířené a přepracované vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954.

URNER, Z. a K. VOLKA. *Anorganická kvalitativní semimikroanalýza: Laboratorní příručka* [online]. Ústav analytické chemie VŠCHT Praha: Laboratoř kvalitativní analýzy VŠCHT Praha, 16. 3. 2010 [cit. 2013-12-18]. Dostupné z:
<http://www.vscht.cz/anl/kvalita/kvalita.pdf>

VŘEŠŤÁL, J., A. JÍLEK, J. HAVÍŘ. *Příspěvek k merkurimetrii chloridů*. Chemical Papers 7 (10) 605–610 (1953). Dostupné z:
http://www.chempap.org/file_access.php?file=710a605.pdf

ZARSE, Kim, Takeshi TERAŌ; Jing TIAN, Noboru IWATA, Nobuyoshi ISHII, Michael RISTOW. Low-dose lithium uptake promotes longevity in humans and metazoans. *European Journal of Nutrition* 50 (5) 387-389 (2011). DOI: 10.1007/s00394-011-0171-x.

ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. 4. upr. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988, 2 sv.