

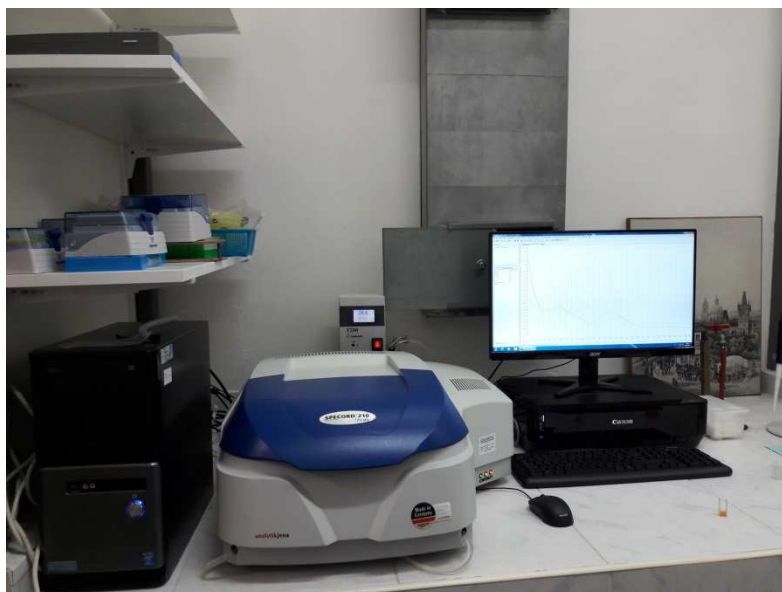
Z projektu Fondu F nově pořízené přístroje v laboratoři Katedry chemie a didaktiky chemie



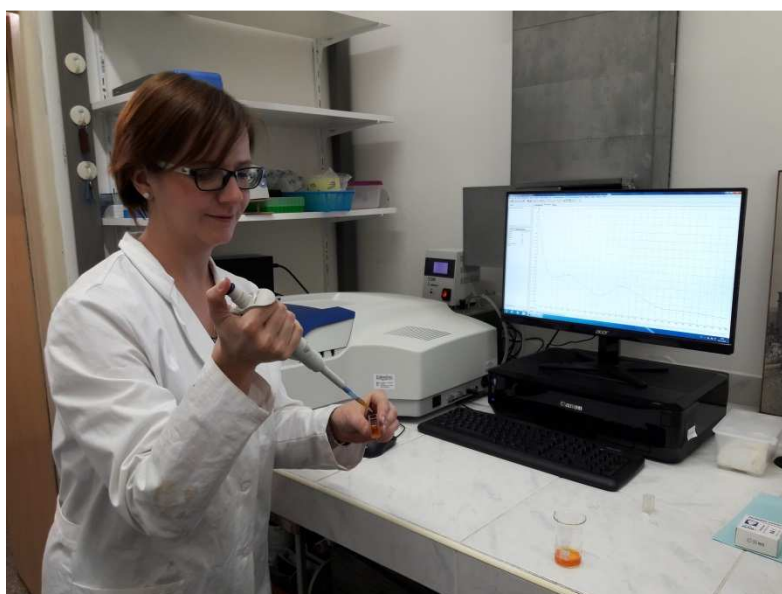
Vakuová odparka Rotavapor R-100 používaná především v laboratořích z organické chemie.



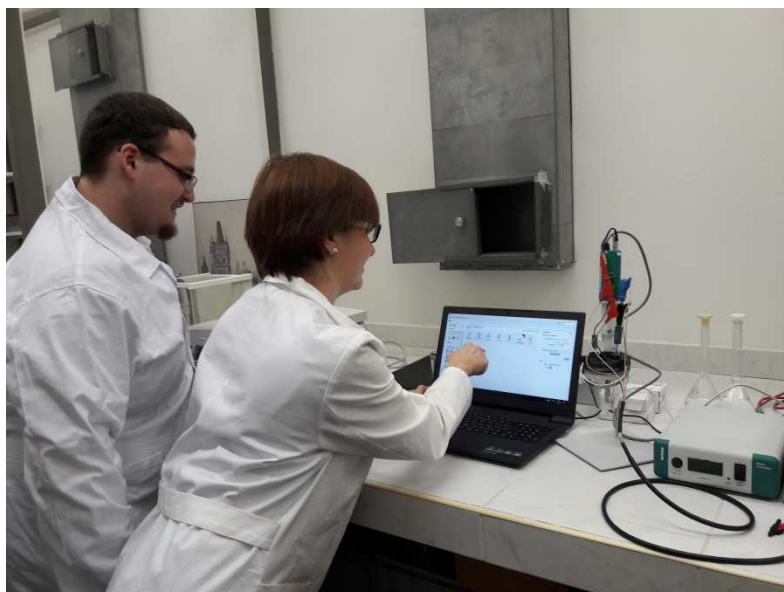
Nová centrifuga Eppendorf 5430 využívaná v laboratořích z organické chemie, analytické chemie a instrumentálních metod.



UV-Vis spektrofotometr Specord® 210 PLUS s nově zakoupenou teplotní celou VARIALUX T200.



Absolventka učitelství chemie Mgr. Iva Bílková-Metelková měří UV-Vis spektra barevných změn pH indikátoru methylčerveně v závislosti na pH



Absolventi učitelství chemie Mgr. Iva Bílková-Metelková a Mgr. Karel Vojř měří voltametrické křivky na nově zakoupené elektrochemické sestavě PGSTAT101

Příklady laboratorních úloh s nově pořízenými přístroji

Téma: Spektrofotometrické metody

Studium vlivu teplotní denaturace na strukturu fykoobiliproteinů ze spiruliny pomocí UV-Vis spektrofotometrie

Úkol: Připravte roztok proteinu ze spiruliny a sledujte jeho strukturální změny vyvolané teplotní denaturací pomocí UV-Vis spektrofotometrie.

Teorie:

Funkce proteinu je dána jeho strukturou a konformací, kterou stabilizují nekovalentní síly a některé slabé kovalentní vazby, jako jsou disulfidové vazby. Nekovalentní síly zahrnují vodíkové vazby, elektrostatické interakce, síly van der Waals a hydrofobní interakce. Zánik nekovalentních sil může změnit konformaci proteinu a způsobit jeho denaturaci. Existuje několik faktorů, které jsou zodpovědné za denaturaci bílkovin, např. teplota, pH, přidání organických rozpouštědel a chaotropních činidel, jako je močovina a thiokyanatan draselný.

Spirulina (sladkovodní sinice) je fotosyntetický organismus, který je považován za slibný zdroj proteinů a je rovněž považována za zdroj bílkovin, které jsou vhodné pro studium strukturálních změn, ke kterým dochází v důsledku denaturace. Má fotosyntetickou membránu, která obsahuje část absorbující světlo tvořenou různými třídami proteinů, včetně dvou fykobiliproteinů nazývaných alofykocyanin a fykocyanin. Oba tyto proteiny obsahují chromofor nazývaný fykocyanobilin, který je v rovinné konformaci, když je protein ve své nativní formě. Když je protein denaturován, tento chromofor prochází konformační změnou, což vede ke změně absorpčního spektra, které se zaznamenává pomocí UV-Vis spektrofotometru. Při denaturaci fykocyanobilinu dochází ke změně konformace, což vede k poklesu absorbance při vyšší vlnové délce (při 625 nm) a ke zvýšení absorbance v blízkosti ultrafialových vlnových délek. Tento experiment zkoumá strukturální změny, ke kterým dochází u fykobiliproteinů při teplotní denaturaci za použití UV-Vis spektrofotometrie.

UV-Vis spektrofotometrie

Pro získání absorbančních spekter látek rozpuštěných v roztoku se používá UV-Vis spektrofotometrie, kdy je vzorek ozařován světlem z ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického spektra, díky čemuž dochází k přechodu elektronů mezi orbitály. Část záření projde přes vzorek a část se absorbuje. Absorbovaná záření je zakreslena proti vlnové

délce a nazýváme jej absorpční spektrum. UV-Vis spektrum závisí na určitých faktorech, jako je rozpouštědlo, ve kterém je vzorek rozpuštěn, koncentraci a tloušťce kyvety.

UV-Vis spektrofotometrická data mohou poskytnout kvalitativní a kvantitativní informace o dané sloučenině nebo molekule. Je nutné použít referenční vzorek (slepý vzorek) k vynulování přístroje pro rozpouštědlo, v němž je sloučenina rozpuštěna. Pro kvantitativní informace lze aplikovat Lambertův-Beerův zákon ($A=c \cdot l \cdot \epsilon$, kde A – absorbance, c – molární koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), l – tloušťka kyvety (cm), ϵ – absorpční koeficient ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Přístroje:

Centrifuga Eppendorf 5430, UV-Vis spektrofotometr Specord® 210 PLUS s **teplotní celou VARIALUX T200**

Materiál a pomůcky:

spirulina tablety, Erlenmeyerova baňka, 100 ml kádinka, kyvety, pipeta, sonikátor, špachtle, váhy

0,1 M fosforečnan draselný o pH 7

Práškový síran amonný

Pracovní postup:

1/ Příprava rostlinného extraktu

- Navažte 2 g práškové spiruliny a přeneste do 100 ml kádinky obsahující 0,1M fosforečnan draselný o pH 7. Dobře promíchejte.
- Po dobu 1 minuty 5 až 6krát za sebou (v intervalech 5 minut) sonikujte roztok spiruliny, aby došlo k rozbití buněk a uvolnění bílkovin do roztoku.
- Suspenzi centrifugujte v odstředivce při 24000 ot./min po dobu 20 minut při 40 °C.
- Supernatant převed'te do kádinky a doplňte na 100 ml přidáním 0,1M pufru fosforečnanu draselného.
- Do roztoku supernatantu přidejte 29,5 g síranu amonného, aby došlo k vysrážení fikobiliproteinů. Míchejte 15 minut.
- Centrifugujte roztok v odstředivce při 16000 ot./min po dobu 10 minut při 40 °C.
- Proteinovou peletu resuspenduje v 25 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7. Tento resuspendovaný proteinový roztok převed'te do Erlenmeyerovy baňky a použijte pro měření.

2/ Studie denaturace proteinů

- Napipetujte 3 ml 0,1M fosforečnanu draselného do kyvety, která se použije jako slepý vzorek.

- Napipetujte 3 ml fosforečnanu draselného do druhé kyvety.
- Do této druhé kyvety přidejte 100 µl proteinového roztoku z Erlenmeyerova baňky a dobře promíchejte pipetou.
- Obě kyvety vložte do UV-Vis spektrofotometru. Změřte absorbanci proteinového roztoku v rozsahu 400–780 nm při teplotách 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 a 60 °C.
- Vyjměte kyvety z UV spektrofotometru a řádně je umyjte.

Vyhodnocení:

Získané výsledky přehledně zpracujte a diskutujte.

Literatura

1. <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=64&sim=792&cnt=1>
2. <https://epub.ub.uni-muenchen.de/2574/1/2574.pdf>

Téma: Elektrochemické metody

Stanovení těžkých kovů (Pb, Cd) v rostlinném extraktu anodickou rozpouštěcí voltametrií

Úkol: Stanovte obsah Pb²⁺, Cd²⁺ v rostlinném extraktu anodickou rozpouštěcí voltametrií.

Naměřte a sestrojte kalibrační závislost pro Pb²⁺, Cd²⁺ v rozsahu 1.10⁻⁶ mol.l⁻¹ až 1.10⁻⁵ mol.l⁻¹.

Teorie:

Princip klasické voltametrie je založen na sledování proudu, který prochází elektrodami v závislosti na vloženém potenciálu. Tato nejcitlivější elektrochemická metoda využívá elektrolytické nahromadění stanovované látky na povrchu elektrody a její následné anodické rozpouštění. Při rozpouštění se mění potenciál elektrody lineárně s časem směrem k pozitivnějším hodnotám a zaznamenává se proudový pík. Rozpouštěcí voltametrické metody se běžně používají ke stanovení stopových množství těžkých kovů v půdách, vodách, biologickém materiálu apod.

Těžké kovy jsou stopové chemické prvky, které se kumulují v potravinovém řetězci a vyznačují se různou mírou toxicity a odlišným působením na živé organismy.

Přístroje: elektrochemická sestava PGSTAT101, voltametrický tříelektrodový systém s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, referentní argentchloridovou elektrodou a pomocnou

platinovou elektrodou; PC jednotka s řídicím softwarem Nova 2.1, **centrifuga Eppendorf 5430**, zdroj dusíku.

Materiál a pomůcky:

automatické pipety, Büchnerova nálevka, Erlenmeyerova baňka, kádinka, odměrná baňka, třecí miska, váženka, zkumavky eppendorf

octanový pufr, pH 4 (0,2M kyselina octová a 0,2M hydroxid sodný)

0,5M kyselina dusičná, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, standardní roztok Pb^{2+} , Cd^{2+} ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$)

mořský písek

Pracovní postup:

1/ Příprava rostlinného extraktu

- 1 g lyofilizovaného rostlinného materiálu v 5 ml octanového pufru třete s mořským pískem po dobu 10 min
- homogenát filtrujte s použitím Büchnerovy nálevky
- filtrát centrifugujte po dobu 20 min při 10 000 rpm
- supernatant okyselte 0,5M HNO_3 a použijte ke stanovení Pb^{2+} , Cd^{2+}

2/ Stanovení obsahu Pb^{2+} , Cd^{2+} v rostlinném extraktu rozpouštěcí voltametrií

- do polarografické nádoby napipetujte 10 ml octanového pufru (slepý vzorek)
- z octanového pufru probubláním dusíkem po dobu 5 min odstraňte kyslík
- nastavte parametry měření pro voltametrickou metodu (akumulační potenciál od -800 mV do -100 mV, akumulací čas 60 s, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms)
- zaznamenejte rozpouštěcí voltamogram pro slepý pokus, měření opakujte 3x
- ze standardních roztoků probubláním dusíkem po dobu 5 min odstraňte kyslík
- pro kalibrační závislost připravte standardní roztok Pb^{2+} , Cd^{2+} v rozsahu $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, měření opakujte 3x
- zaznamenejte rozpouštěcí voltamogramy pro standardní roztoky Pb^{2+} , Cd^{2+}
- do čisté polarografické nádoby napipetujte rostlinný extrakt
- z extraktu probubláním dusíkem po dobu 5 min odstraňte kyslík
- zaznamenejte rozpouštěcí voltamogram pro rostlinný extrakt, měření opakujte 3x

Vyhodnocení:

vyhodnoťte naměřené voltamogramy pro standardní roztoky Pb^{2+} , Cd^{2+} ;

sestrojte kalibrační přímky pro Pb^{2+} , Cd^{2+} ;

metodou kalibrační přímky vyhodnoťte obsah Pb^{2+} , Cd^{2+} v rostlinném extraktu.

Literatura:

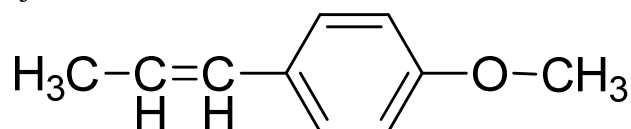
1. Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: Elektroanalytická chemie, Praha 2005
2. www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_01_38-47.pdf

Téma: Separální metody – extrakce

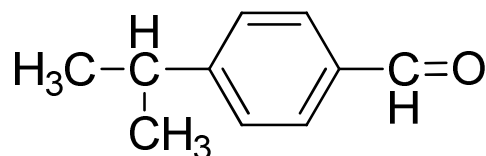
Úkol: Stanovte extrakcí obsah silic v kmínu nebo anýzu

Teoretická část:

Rostlinné silice jsou převážně tvořeny sloučeninami, které patří mezi terpeny. Hlavní složkou anýzové silice je anethol.



Hlavní složkou kmínové silice je kuminaldehyd



Obě látky patří mezi organické sloučeniny dobře se rozpouštějící v polárních rozpouštědlech (např. ethanol, aceton). Ethanolu může být použito pro extrakci silic z anýzu i kmínu. Z úbytku hmotnosti extrahovaného materiálu po ukončení separačního procesu se vypočítá obsah silic. Jednotlivé složky silic lze identifikovat na základě chromatografické analýzy nebo pomocí teploty tání derivátů. Anethol se převede reakcí s bromem na dibromderivát s charakteristickou teplotou tání t.t.= 65 °C. Tyto orientační testy slouží k důkazu přítomnosti vybraných sloučenin, komplexní analýza je složitá, protože silice jsou tvořeny směsí mnoha různých přírodních látek.

Pomůcky a chemikálie:

Soxhletův extraktor, destilační baňka (500 cm³), extrakční těleso, zpětný chladič, celulosová patrona, zkumavky, kádinky, pipety, laboratorní stojan, svorky, držáky, pryžové hadice, laboratorní zvedák, topné hnízdo, laboratorní váhy, anýz nebo kmín, ethanol, **vakuační odparník Rotavapor R-100**.

Postup:

1. Z destilační baňky (500 cm³), extrakčního tělesa a zpětného chladiče sestavte aparaturu Soxhletova extraktoru.
2. Do celulosové patrony odvažte 10 g drceného kmínu nebo anýzu.
3. Naplněnou patronu vložte do extrakčního tělesa.
4. Do destilační baňky extraktoru předložte 300 cm³ ethanolu a přidejte varné kamínky
5. Zahřívejte obsah baňky k varu a sledujte kondenzaci par rozpouštědla v chladiči. Kondenzát musí vtékat přímo do patrony s extrahovaným materiálem.
6. Pozorujte zbarvení rozpouštědla při extrakci (u kmínu většinou zelené, u anýzu žluté).
7. Po cca 2 hodinách extrakce vypněte a odstavte topné hnízdo v okamžiku, kdy veškeré rozpouštědlo je zpět přečerpáno z extrakčního tělesa do baňky.
8. Pomocí laboratorních kleští vyjměte opatrně patronu s extrahovaným materiálem a vysušte jej do konstantní váhy.
9. Ze snížení hmotnosti přírodního materiálu vypočtete obsah silic.
10. Z ethanolového extraktu oddestilujte ethanol na vakuové odparce
11. Destilační zbytek použijte k identifikaci některých látek, např. anetholu chromatografií na tenké vrstvě

Závěr:

Vyhodnoťte a diskutujte obsah silic v přírodním materiálu. Zdůvodněte zbarvení extraktu.

Otázky a úkoly:

- 1/ Rozhodněte jakého rozpouštědla je možné použít pro extrakci oleje z máku.
- 2/ Uveďte, jakým způsobem je možné dokázat sacharosu ve vodném extraktu řepných řízků.