

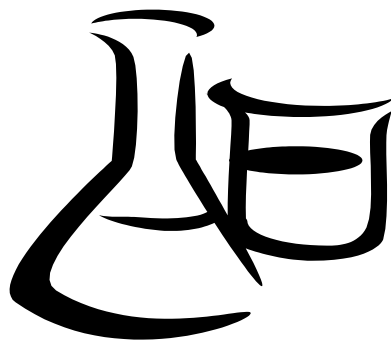
# Úvod do práce v laboratoři

Měření objemů, filtrace, centrifugace,  
rozpustnost, dělení směsí

---

Praktické cvičení z lékařské biochemie  
*Všeobecné lékařství*

Martin Vejražka



2023/24

## Obsah

### ÚLOHA 1 – DĚLENÍ SMĚSI CENTRIFUGACÍ 3

1. PRINCIP ÚLOHY 3
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 4
3. ÚKOLY 4

### ÚLOHA 2 – ROZDĚLENÍ SMĚSI VYTŘEPÁNÍM S CHLOROFORMEM 4

1. PRINCIP ÚLOHY 4
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 5
3. ÚKOLY 5

### ÚLOHA 3 – ADSORPCE ROZPUŠTĚNÉ LÁTKY AKTIVNÍM UHLÍM 6

1. PRINCIP ÚLOHY 6
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 7
3. ÚKOLY 7

### ÚLOHA 4 – SUBLIMACE KOFEINU Z KÁVY 7

1. PRINCIP ÚLOHY 7
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 8
3. ÚKOLY 8

### ÚLOHA 5 – ROZPOUŠTĚNÍ SLABÉ KYSELINY V PROSTŘEDÍ S RŮZNÝM PH 9

1. PRINCIP ÚLOHY 9
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 9
4. ÚKOLY 9

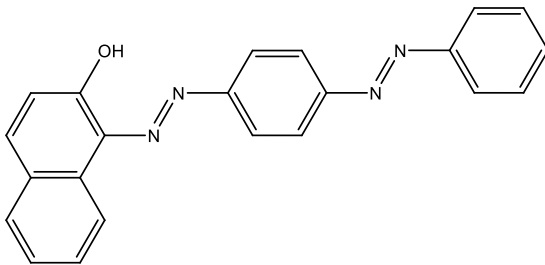
Cílem prvního praktického cvičení je seznámit se s laboratoří, nejběžnějšími pomůckami a přístroji v ní. Současně se seznámíte s některými separačními technikami, které se při zpracování biologických vzorků běžně používají – centrifugací, filtrací, dělení směsí vytřepáváním či adsorpcí. Podrobněji se diskutují vlastnosti látek a součástí směsí, na základě kterých se směsi těmito technikami dělí.

## Úloha 1 – Dělení směsi centrifugací

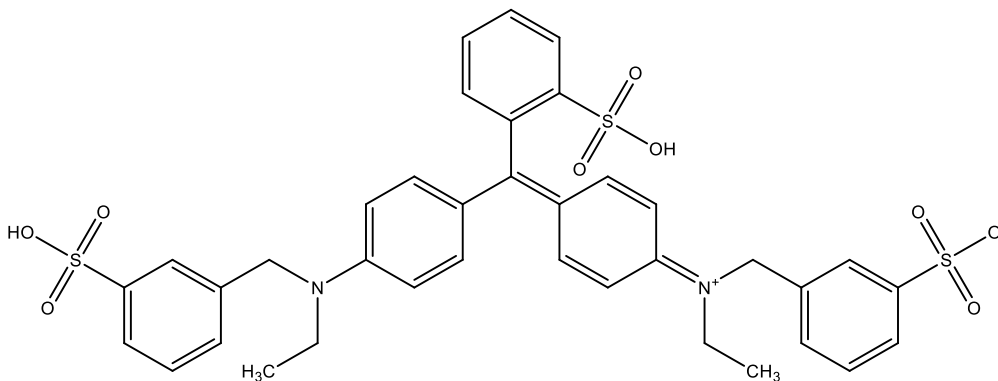
### 1. Princip úlohy

V tomto laboratorním cvičení použijeme jako modelovou směs zředěné mléko obarvené dvěma barvivy: červenou lipofilní látkou označovanou jako sudan III (Obr. 1) a hydrofilním modrým potravinářským barvivem, brilantovou modří (známou též pod kódovým označením E-133, Obr. 2). Mléko je emulze typu olej ve vodě: disperzní prostředí tvoří hydrofilní složka, dispergovaná součást je tvořena především tuky. Emulze je stabilní z velké části díky bílkovinám, jejichž molekuly mají hydrofilní i lipofilní část. V průběhu praktického cvičení se pokusíme modelovou směs rozdělit na její složky různými technikami. Žádnou technikou není možné rozdělit směs zcela. Pro izolaci různých složek se hodí různé postupy, každá technika také má jinou účinnost a má jiné nároky na čas či vybavení.

V první úloze se pokusíme rozdělit emulzi prostou centrifugací při dvou různých relativních centrifugačních silách: pomocí stolní mikrocentrifugy při přibližně 300× g a pomocí vysokootáčkové centrifugy při 30 000× g. Čas centrifugace bude v obou případech stejný.




Obrázek 1: Sudan III



Obrázek 2: Brilantová modř (E-133)


## 2. Provedení úlohy

1. Mléko
2. Čištěná voda
3. Sudan III  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v lihobenzínu 
4. Briliantová modř (E-133)  $0,25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v destilované vodě

### Pracovní postup

#### Příprava vzorku

Naředte mléko 1:2 čišťenou vodou: Do skleněné kádinky pipetujte skleněnou pipetou 5 ml mléka a 10 ml čišťené vody. Opatrně promíchejte.

K asi 10 ml zředěného mléka přidejte 10 kapek roztoku červeného barviva sudan v etanolu  a 10 kapek vodného roztoku modrého potravinářského barviva briliantové modři (E-133). Zkumavku uzavřete laboratorní fólií (Parafilm) a promíchejte pomocí vortexu.

#### Centrifugace

1. Napipetujte po 1 ml směsi do dvou mikrozkušavek, zkumavky uzavřete.
2. Jednu mikrozkušavku centrifugujte 10 minut na stolní mikrocentrifuze.
3. Druhou mikrozkušavku centrifugujte 10 minut při  $30\,000\times g$  ve vysokootáčkové centrifuze.

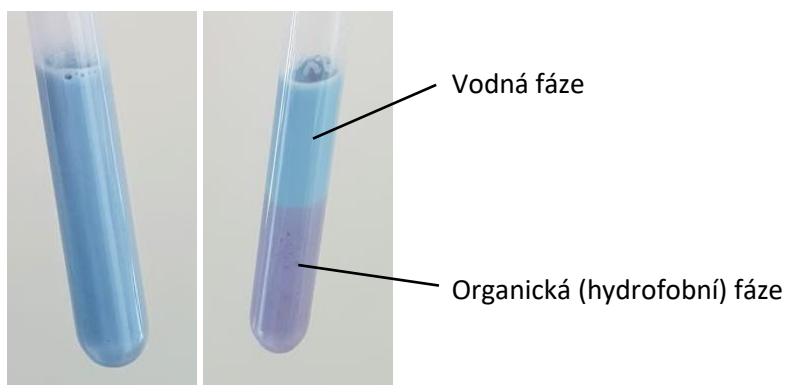
## 3. Úkoly

Porovnejte rozdělení směsi v obou případech a vysvětlete rozdíly.

## Úloha 2 – Rozdělení směsi vytřepáním s chloroformem

### 1. Princip úlohy

Směs různě polárních látek můžeme rozdělit mezi dvě vzájemně nemísitelné kapalně fáze. Chloroform je výrazně hydrofobní, nepolární organické rozpouštědlo. Je těžší než voda a s hydrofilními látkami se prakticky nemísí. Při třepání směsi hydrofilních a hydrofobních látek (v daném případě emulze, jejímž disperzním prostředím je voda a disperzním podílem jsou z velké části tuky) se hydrofobní součásti rozpustí v chloroformu, hydrofilní zůstanou ve vodné fázi.



**Obrázek 3: Dělení emulze třepáním s chloroformem.**

Vlevo emulze obarvená modrým hydrofilním a červeným hydrofobním barvivem během třepání s chloroformem, vpravo po oddělení fází.

## 2. Provedení úlohy

1. Zředěné mléko obarvené sudanem III a brilantovou modří z předešlé úlohy
2. Chloroform (trichlormethan)

### Pracovní postup:

1. Odměřte 4 ml zředěného obarveného mléka z předchozí úlohy do zkumavky se zábrusovou zátkou a přidejte 4 ml chloroformu .
2. Zkumavku uzavřete a třepete pomocí vortexu (nejvyšší počet otáček) třikrát po 30 sekundách. Obsah se musí pokaždé dokonale promísit.
3. Uzavřenou zkumavku nechejte stát ve stojánku, dokud se neoddělí vodná (horní) a chloroformová (dolní) fáze.

**Pozor:** Zbytky, které obsahují chloroform, se likvidují jako nebezpečný odpad.

## 3. Úkoly

1. Porovnejte vzhled obou fází. Srovnajte jejich zbarvení s původní směsí. Vysvětlete rozdíly.
2. Na strukturních vzorcích obou použitých barviv vysvětlete, které části jejich molekul jsou odpovědné za pozorované chování.

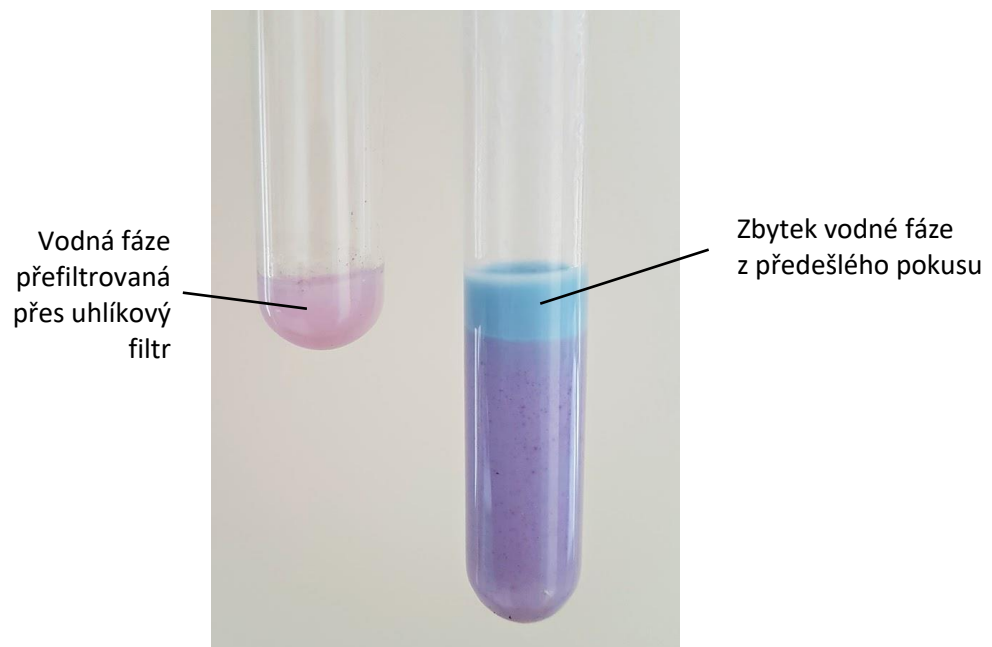
## Úloha 3 – Adsorpce rozpuštěné látky aktivním uhlím

### 1. Princip úlohy

Aktivní uhlí je čistý uhlík v podobě, která má mimořádně velký povrch. Tvoří jej částičky grafitu, v nichž jsou mikropóry (o velikosti řádově jednotek nanometrů až desítek nanometrů). Právě porozita částiček mnohonásobně zvyšuje jejich adsorpční povrch.

Aktivní uhlí nespecificky váže, adsorbuje, řadu látek. Obecně se uvádí, že adsorpce látek na uhlí roste s molekulovou hmotností, polaritou molekuly, počtem násobných vazeb a funkčních skupin.

Adsorpční uhlí se často používá k přečištění roztoků od malého množství kontaminantů. Zpravidla se do roztoku přidá jako prášek, vzniklá suspenze se po určitou dobu promíchává, aby proběhlo vyvázání kontaminujících látek, a pak se částičky uhlíku odfiltrují nebo odcentrifugují.



**Obrázek 4: Adsorpce aktivním uhlím**

Vpravo je zbytek směsi dělené třepáním v předchozím pokusu. Světle modré barvivo se při filtraci přes uhlíkový filtr adsorbovalo na aktivní uhlí (vlevo). Růžové zabarvení filtrátu je způsobené malým množstvím červeného hydrofobního barviva, které vodnou fázi kontaminuje a které se na aktivní uhlí adsorbuje mnohem hůře.

## 2. Provedení úlohy

1. Rozdělená směs z předchozí úlohy
2. Aktivní uhlí (prášek)
3. Skládáný filtr Filtrak 3b a pomůcky pro filtraci

### Pracovní postup

1. Kapátkem nasajte vodou fází z předchozí úlohy a přeneste ji do čisté zkumavky.
2. K vodné fázi přidejte odhadem asi 0,2 g aktivního uhlí. Směs promíchejte asi 1 min na vortexu při nejvyšší rychlosti.
3. Papírový filtr rozevřete a vložte do nálevky. Navlhčete jej čistou vodou.
4. Na navlhčený filtr nalijte směs vodné fáze s aktivním uhlím. Filtrát jímejte do čisté zkumavky.

## 3. Úkoly

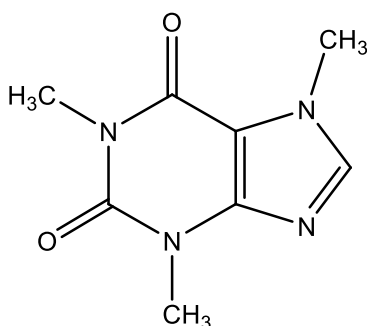
Porovnejte vzhled filtrátu s původní směsí a se zbytkem vodné fáze z předešlého pokusu. Srovnajte jej také se vzhledem zředěného mléka. Vysvětlete rozdíly.

## Úloha 4 – Sublimace kofeinu z kávy

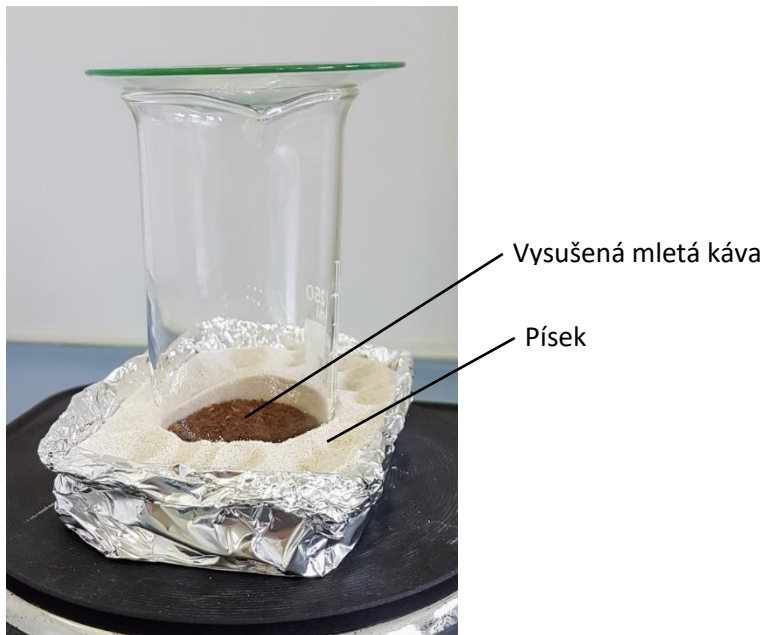
### 1. Princip úlohy

Některé látky lze oddělit ze směsi nebo přecistit pomocí destilace či sublimace. V obou případech se využívá toho, že látka, kterou se snažíme přecistit, má jinou teplotu varu než ostatní složky směsi. Zahříváním směsi dochází ke skupenské přeměně, izolovaná látka se mění v plyn. Ten se od směsi odvádí a ochlazuje, přičemž dochází ke kondenzaci zpět na kapalinu nebo pevnou látku. Pokud látku izolujeme z kapalně směsi, mluvíme o destilaci; v případě, že při zahřívání dochází k přeměně z pevného přímo na plynné skupenství, hovoříme o sublimaci.

V této úloze se pokusíme izolovat kofein z pražené mleté kávy. Využijeme toho, že kofein je relativně termostabilní a jeho bod varu je 178 °C. Bod tání je vyšší (kolem 235 °C), takže při zahřívání dochází snadno k sublimaci. Po ochlazení par se sráží v podobě bílých jehlicovitých krystalků.



Obrázek 5: Kofein



Obrázek 6: Sublimace kofeinu z kávy

## 2. Provedení úlohy

1. Pražená mletá káva vysušená při 120 °C
2. Mořský písek, hliníková fólie, kádinka 250 ml, hodinové sklo

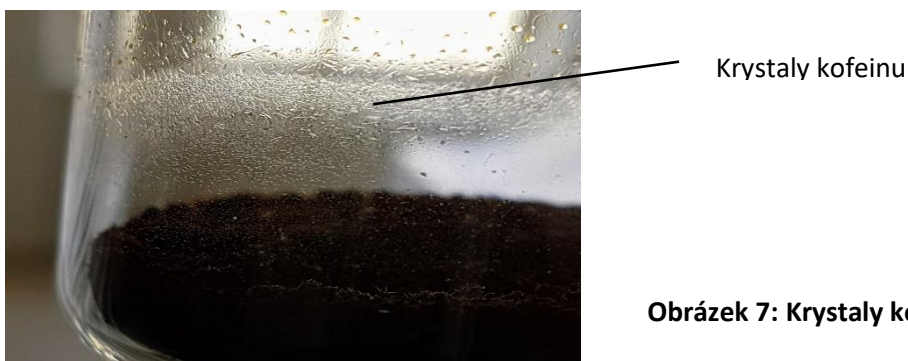
### Pracovní postup

1. Asi 7 g mleté kávy sušte 5 minut při 120 °C.
2. Připravte pískovou lázeň: Do misky ze silnější hliníkové fólie nasypete mořský písek. Umístěte na vařič v digestoři a ohřívejte asi na 200 °C (stupeň 3).
3. Do čisté a pečlivě vyleštěné kádinky přesypte usušenou mletou kávou. Kádinku zabořte do písku v pískové lázni a zakryjte ji pečlivě vyčištěným hodinovým sklem.
4. Nechejte probíhat sublimaci asi 5 minut. Pak kádinku s hodinovým sklem vyjměte a nechejte vychladnout.

**Pozor:** Kádinka i hodinové sklo jsou horké! Použijte kleště nebo izolační rukavici.

## 3. Úkoly

Pozorujte nálet krystalů kofeinu na stěně kádinky.



Obrázek 7: Krystaly kofeinu

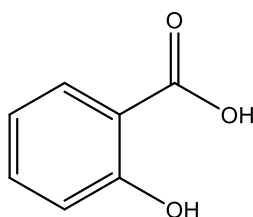


## Úloha 5 – Rozpouštění slabé kyseliny v prostředí s různým pH

### 1. Princip úlohy

Polarita organických kyselin a bází výrazně závisí na pH okolního prostředí. Například karboxylové kyseliny v zásaditém prostředí vytvářejí karboxylátové ionty; jsou tedy výrazně polární a budou se relativně snadno rozpouštět ve vodném prostředí. Naproti tomu v kyselém prostředí budou protonované, méně polární, a jejich rozpustnost ve vodě tak bude nižší. Tento jev je významný např. pro vstřebávání léků: většina léčivých látek má povahu slabých kyselin a/nebo zásad, pH prostředí se přitom liší v různých částech trávicího traktu.

V této úloze srovnáme rozpouštění kyseliny salicylové v kyselém, zásaditém a přibližně neutrálním prostředí.



Obrázek 8: Kyselina salicylová

### 2. Provedení úlohy

1. Krystalická kyselina salicylová
2. Kyselina chlorovodíková  $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
3. Hydroxid sodný  $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

#### Pracovní postup

1. Do tří zkumavek nasypete malé množství (do každé asi 0,1 g) kyseliny salicylové.
2. Do první zkumavky přidejte asi 2 ml čištěné vody, do druhé asi 2 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a do třetí asi 2 ml roztoku hydroxidu sodného.
3. Zkumavky promíchejte, pozorujte rychlost rozpouštění kys. salicylové.
4. Poté, co se ve zkumavce s hydroxidem kyselina zcela rozpustí, přidejte k tomuto roztoku asi 3 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a opatrně promíchejte. Pozorujte změnu směsi.  
**Pozor:** Při neutralizaci se směs může prudce zahřát, může začít vřít a může vystříknout. Pracujte tak, aby ústí zkumavky bylo odvrácené od vás i osob stojících v okolí!

### 4. Úkoly

1. Srovnajte rozpustnost kyseliny salicylové v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí.
2. Chemickými rovnicemi popište děje, které jste pozorovali.