

Úvod do práce v laboratoři, bezpečnost práce, fotometrie.

Praktická cvičení z chemie a biochemie

Všeobecné lékařství

Jan Ševčík



2025/26

Obsah

Úloha 1 – Identifikace neznámé látky pomocí absorpčního spektra

Úloha 2 – Fotometrická kvantifikace látky v roztoku

Úloha 1 – Identifikace neznámé látky pomocí absorpčního spektra

Stanovení absorpčního maxima standardních roztoků a neznámého vzorku, pomocí spektrofotometrie. Na základě porovnání výsledků následně identifikovat neznámou látku ve vzorku. Tento typ analýzy lze provést pouze v případě, že vzorek obsahuje jednu látku, v našem případě barvu, jejíž absorpční spektrum se významně nepřekrývá s absorpčním spektrem jiné látky. Pokud by vzorek obsahoval více látek, je nutným krokem před kvalitativní analýzou, například s využitím fotometrie, rozdělení jednotlivých analytů do samostatných frakcí. Velmi častou separační metodou je v takovém případě chromatografie.

Reagencie

Vodné roztoky modrých potravinářských barev E131, E132 a E133 – 7,5 µg/ml

Pracovní postup:

1. Na spektrofotometru zvolte z nabízených možností „applications“ měření „wave scan“ a potvrďte volbu.
2. Nastavte rozsah vlnové délky od (min) 400 nm do (max) 700nm.
3. Pomocí automatické pipety naplňte kyvetu 1 ml destilované vody a vložte do spektrofotometru.
4. Vynulujte spektrofotometr stisknutím tlačítka „OT“.
5. Z kyvety vylijte veškerou vodu (slepý vzorek) a naplňte jí 1 ml analyzovaného nápoje.
6. Změřte spektrum vzorku a zapište vlnovou délku odpovídající absorpčnímu maximu:
 $\lambda_{A_{max}}$
Pomocí šipek > < na ovládacím panelu spektrofotometru nastavte indikační čáru na vlnovou délku odpovídající absorpčnímu maximu.
7. Z kyvety vylijte veškerý vzorek, několikrát jí propláchněte destilovanou vodou a pomocí automatické pipety naplňte 1 ml standardu barviva E131. Změřte spektrum vzorku a zapište vlnovou délku odpovídající absorpčnímu maximu. Stejným způsobem analyzujte i zbývající vzorky barviv E132 a E133.
8. Porovnáním výsledků spektrofotometrické analýzy neznámého vzorku a standardů, identifikujte barvivo obsažené ve vzorku.
9. S použitím informací z přehledového článku z databáze PubMed zhodnoťte možná rizika spojená s použitím identifikovaného syntetického barviva v potravinách.



Úloha 2 – Fotometrická kvantifikace látky v roztoku

U známé látky, s jasně definovaným spektrem, lze v případě pravých roztoků ke kvantifikaci využít skutečnost, že absorbance závisí přímo úměrně na koncentraci. Ze sady kalibračních roztoků o známé koncentraci sestojíme kalibrační křivku, ze které můžeme přesně odečíst koncentraci neznámého vzorku.

Reagencie:

Vodný zásobní roztok modři o koncentraci 7,5 µg/ml.

Pracovní postup:

1. Do čistých skleněných zkumavek pomocí automatických pipet připravte ze zásobního roztoku modři a destilované vody sadu pracovních roztoků (A, B, C, D a blank) podle návodu v tabulce. Každý vzorek, kromě blanku, připravte v tripletu. Před použitím každý roztok pomocí vortexu krátce promíchejte.

<i>Označení vzorku</i>	<i>Blank</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
<i>Objem zásobního roztoku</i>	<i>0 ml</i>	<i>2 ml</i>	<i>1 ml roztoku A</i>	<i>1 ml roztoku B</i>	<i>1 ml roztoku C</i>
<i>Objem ředícího roztoku</i>	<i>1 ml</i>	<i>0 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>

2. Doplňte do tabulky koncentraci příslušných pracovních roztoků a jejich zředění v porovnání s pracovním roztokem.
3. Nastavte na spektrofotometru optimální vlnovou délku pro kvantifikaci látky, identifikované v úloze 1.
4. Vynulujte spektrofotometr pomocí blanku.
5. Změřte postupně absorbance připravených pracovních roztoků A, B, C a D. Výsledky zapište do tabulky 2.
6. Z naměřených výsledků sestojte kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci.
7. Změřte absorbanci vzorku nápoje.
8. Ze sestrojené kalibrační křivky odečtěte koncentraci modři v analyzovaném nápoji.
9. Vypočtěte celkové množství modři v 0,5 l nápoje.