

FYZIKÁLNO – CHEMICKÉ METÓDY

STANOVENIE KONCENTRÁCIE Fe^{2+} IÓNOV V SÉRE POMOCOU
 ANALYTICKEJ KRIVKY

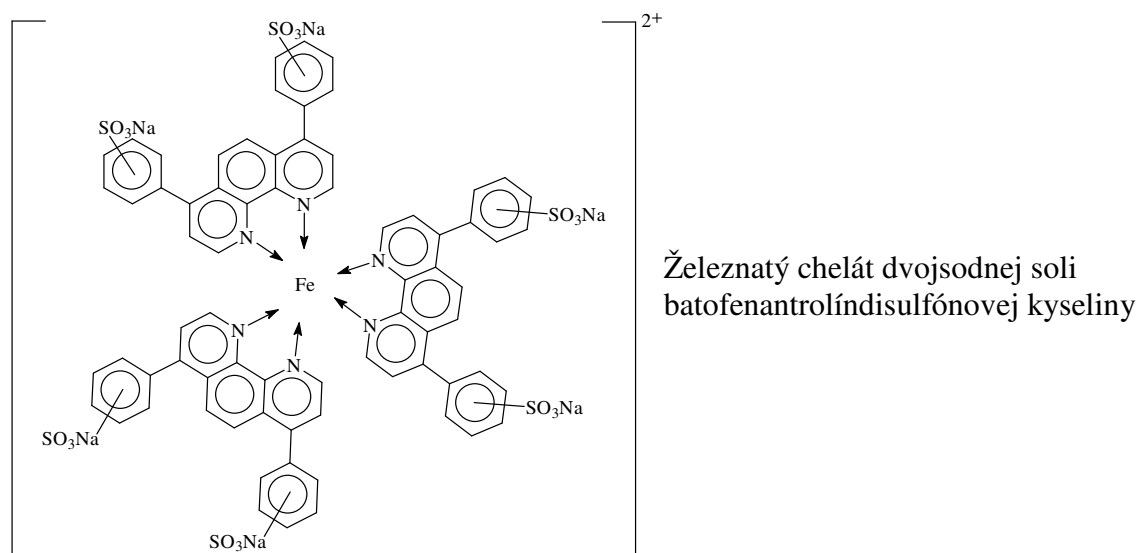
Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Roztok **batofenantrolínu** tvorí s iónmi Fe^{2+} stabilný, červeno sfarbený komplex, vhodný na spektrofotometrické stanovenie s **absorpčným maximom** pri 535 nm.

Meranie absorbancie reakčných zmesí vzniknutých pridaním batofenantrolínu do roztokov iónov Fe^{2+} s rôznou známou koncentráciou (štandardných roztokov) umožní zostrojenie **analytickej krivky** – závislosti A_{535} od koncentrácie Fe^{2+} iónov. Neznámu koncentráciu Fe^{2+} iónov je potrebné odčítať z tejto krivky. Podmienkou je, aby sa pri analytickom postupe dodržali úplne rovnaké podmienky, t.j. vzorka aj štandardné roztoky sa spracovávajú paralelne.



Reagencie a pomôcky

- batofenantrolín (kyselina 4,7-difenyl-1,10-fenantrolín-3,6-disulfónová) $c = 0,46 \text{ mmol.l}^{-1}$, octan sodný $c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$, štandardný roztok Fe^{2+} (síran železnato-amónny) $c = 18 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$,
- spektrofotometer.

Postup

Štandardný roztok železnatej soli známej koncentrácie ($c = 18 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) sa riedi vodou podľa pracovnej tabuľky, pričom sa takto pripravujú roztoky rôznych, ale známych, koncentrácií iónov Fe^{2+} , za účelom zostrojenia analytickej krivky, $A = f(c)$.

Koncentrácie železnatých iónov v roztokoch, ktoré sa pripravia riedením zásobného štandardného roztoku Fe^{2+} ($c = 18 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) vypočítame z bilančnej rovnice zried'ovania (pozri roztoky):

Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$c_1 = 18 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

$$V_1 = 0,5; 1,0; 1,5 \text{ a } 2,0 \text{ ml}$$

$$c_2 = x$$

$$V_2 = 2,0 \text{ ml}$$

	štandardné roztoky				vzorka	blank
	1	2	3	4		
zásobný štand. roztok Fe^{2+} (ml)	0,5	1,0	1,5	2,0	-	-
H_2O (ml)	1,5	1,0	0,5	-	-	2,0
vzorka Fe^{2+} (ml)	-	-	-	-	2,0	-
čínidlo (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
v čase od 5-60 minút meriame A_{535} proti porovnávaciemu roztoku						
A_{535}						-
Fe^{2+} , c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				18		-

Hodnotenie

- a) Z vypočítaných hodnôt koncentrácií Fe^{2+} iónov v jednotlivých štandardných roztokoch zostrojíte analytickú krivku tak, že na os "x" naniesete koncentráciu v $\mu\text{mol/l}$ a na os "y" absorbancie príslušných roztokov Fe^{2+} . Ak je táto závislosť lineárna, platí v uvedenom rozsahu koncentrácií Lambertov-Beerov zákon. Keď zmeriate absorbanciu vzorky séra, môžete z analytickej krivky priamo odčítať koncentráciu iónov železa v sére.
- b) Koncentráciu iónov železa vypočítate tiež podľa nasledovného vzťahu:

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{št}} \cdot c_{št}$$

kde $A_{št}$ je absorbancia štandardu, A_{vz} absorbancia vzorky, $c_{št}$ je koncentrácia štandardu a c_{vz} koncentrácia vzorky.

- c) Porovnáte výsledky získané odčítaním z analytickej krivky s vypočítanými hodnotami a vyhodnotíte, či koncentrácia železnatých iónov v sére je vo fyziologickom rozsahu.

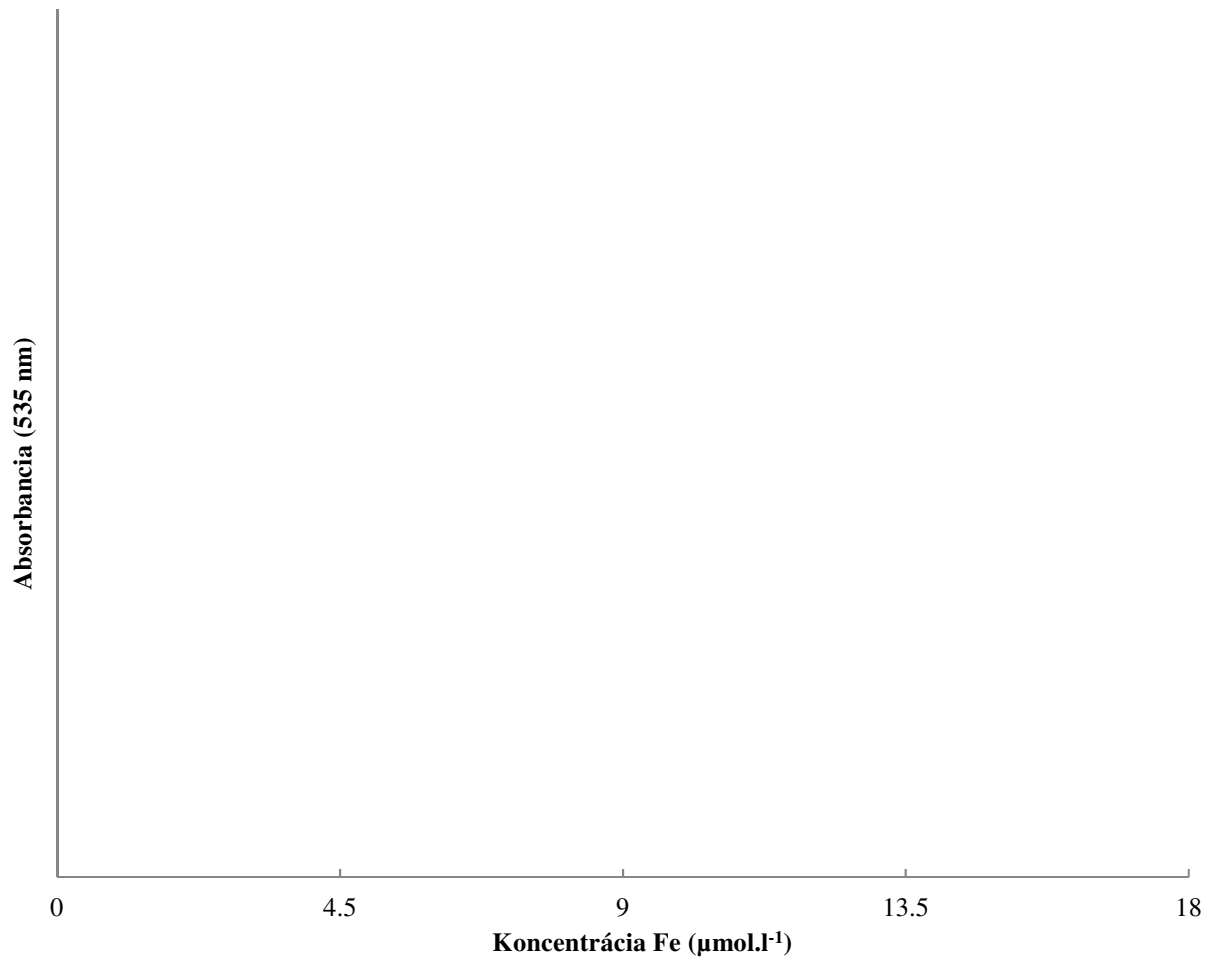
Fyziologické hodnoty:

$$c(\text{Fe}^{2+}) \text{ muži} = 9,6 - 30,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

$$c(\text{Fe}^{2+}) \text{ ženy} = 8,9 - 27,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

$$c(\text{Fe}^{2+}) \text{ deti} = 9 - 30 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

Výpočty



Záver

BIOGÉNNE PRVKY

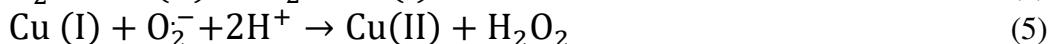
VPLYV IÓNOV KOVOV NA ELIMINÁCIU VOĽNÝCH RADIKÁLOV V BIOLOGICKOM MATERIÁLI

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

V organizme sa voľné radikály, najmä radikály odvodené od kyslíka (napr. superoxidový aniónový radikál, skrátene superoxid, O_2^-), tvoria fyziologicky, ale aj za mnohých patologických podmienok. Enzým *superoxiddismutáza* (SOD) katalyzuje premenu superoxidu na kyslík a H_2O_2 , a tým znižuje jeho toxicitu. Niektoré nízkomolekulové koordinačné zlúčeniny, najmä tie, v ktorých ako centrálny atóm vystupuje Cu(II), Mn(III) alebo Fe(III), majú schopnosť reagovať so superoxidom, a tak jeho zvýšenú tvorbu v organizme eliminovať. Superoxid vytvorený systémom xantín-xantínoxidáza (1) redukuje tetrazóliovú soľ INT (táto predstavuje detektor superoxidu) na monoformazán (2), ktorý má absorpčné maximum pri 510 nm a môžeme ho pri danej vlnovej dĺžke detegovať. SOD a Cu(II) komplex vycytávajú superoxid, a tým znižujú redukciiu detektora (3, 4 a 5).



Reagencie

- fosfátový tlmivý roztok, pH = 7,8 s koncentráciou 0,05 mol/l,
- xantín (X), $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l reakčnej zmesi,
- xantínoxidáza (XO), 10 U/l reakčnej zmesi,
- tetrazóliová soľ (INT), $c = 9,8 \cdot 10^{-5}$ mol/l reakčnej zmesi,
- SOD, $1,33 \cdot 10^{-7}$ g/l reakčnej zmesi,
- Cu(II) komplex: (2-metylimidazol)-(N-salicylidén-L-glutamáto)meďnatý komplex, [Cu(sal-L-glu)(2-metylimidazol)], $4 \cdot 10^{-7}$ g/l reakčnej zmesi.

Pracovný postup

skúmavka	1	2	3	4
tlmivý roztok pH 7,8 (ml)	1,2	1,1	1,1	2
xantín (ml)	0,1	0,1	0,1	-
SOD (ml)	-	0,1	-	-
Cu(II) komplex (ml)	-	-	0,1	-
INT (ml)	0,1	0,1	0,1	-
reakciu odštartovať pridaním <i>xantínoxidázy</i> v 20 sekundových intervaloch				
<i>xantínoxidáza</i> (ml)	0,1	0,1	0,1	-
inkubovať 10 min pri izbovej teplote. odmerať A ₅₁₀ v 20 sekundových intervaloch oproti tlmivému roztoku				
A ₅₁₀				-
% redukcie INT	100			-
% inhibície redukcie INT	0			-
dismutázová aktivita (U)	-			-

Hodnotenie

- Z hodnôt nameraných absorbancií vypočítajte **% redukcie INT** vytvoreným superoxidom:

redukcia INT superoxidom (absorbancia v skúmavke č.1)100 %
redukcia INT superoxidom v prítomnosti SOD, resp. Cu(II) komplexu..... x %

- Z hodnôt % redukcie INT vplyvom SOD alebo Cu(II) komplexu vypočítajte **% inhibície redukcie INT**:

$$\% I = 100 - x$$

- Z hodnôt % inhibície vypočítajte pre SOD aj pre Cu(II) komplex dismutázovú aktivitu v jednotkách U:

Definícia: Jedna jednotka dismutázovej aktivity U je definovaná ako schopnosť inhibovať redukciu INT na 50 %

1 U50 % I
napr. 35 % I predstavuje dismutázovú aktivitu 0,7 U

Výpočty a záver

SACHARIDY

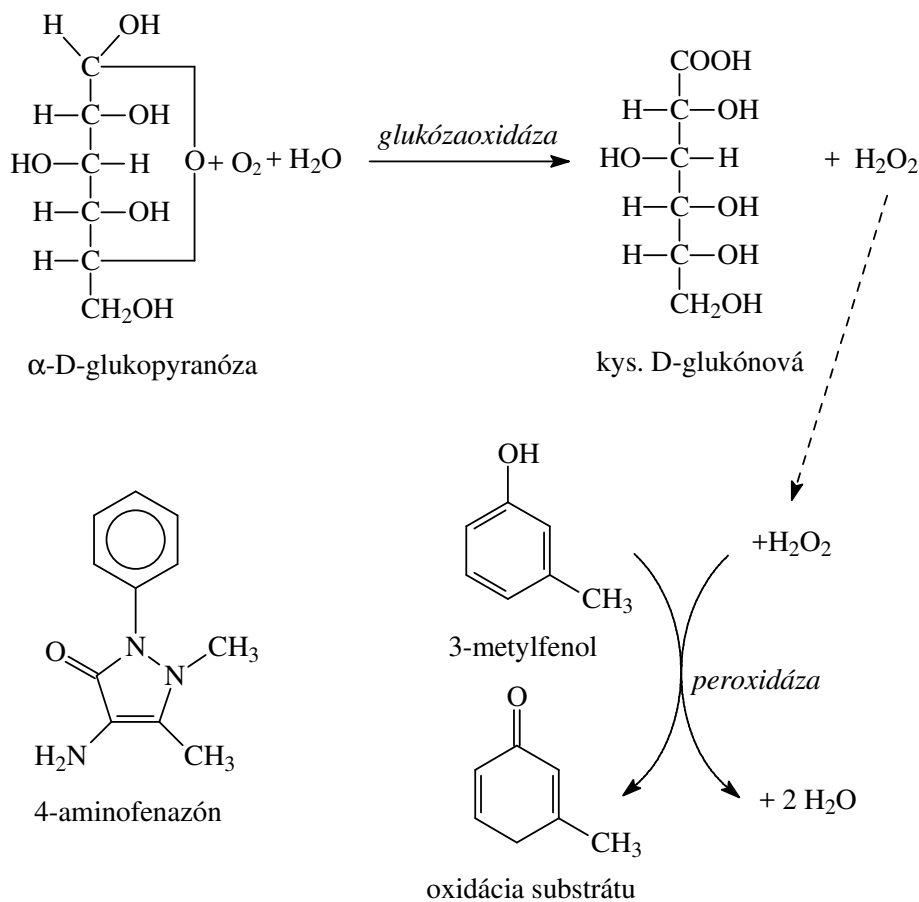
ENZÝMOVÉ STANOVENIE KONCENTRÁCIE GLUKÓZY V SÉRE

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Glukóza sa katalyticky oxiduje vzdušným kyslíkom účinkom *glukózaoxidázy* na peroxid vodíka a kyselinu glukónovú. Vytvorený peroxid vodíka sa stanovuje reakciou, ktorú katalyzuje *peroxidáza*. V tejto reakcii peroxid vodíka oxiduje vhodný donor vodíka - 3-metylfenol, ktorý kopuluje so 4-aminofenazónom na farebný produkt. Množstvo vzniknutého farebného produktu je úmerné koncentrácii glukózy (stanoví sa spektrofotometricky). Metóda je určená na stanovenie koncentrácie glukózy v biologickom materiáli - v krvi, v sére a v moči.



Reagencie

- súprava BIO-LA-TEST na stanovenie koncentrácie glukózy obsahuje: fosforečnanový tlmivý roztok ($0,140 \text{ mol.l}^{-1}$), *glukózaoxidázu* ($160 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$), *peroxidázu* ($16 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$), 3-metylfenol ($0,010 \text{ mol.l}^{-1}$), 4-aminofenazón ($0,001 \text{ mol.l}^{-1}$), štandardný roztok glukózy ($0,010 \text{ mol.l}^{-1}$).

Pracovný postup

Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

Pri stanovení koncentrácie glukózy v krvi alebo hemolytickom sére je potrebné biologický materiál najprv deproteinovať. Analyzované vzorky séra sú pre účely praktického cvičenia už deproteinované a koncentrácia glukózy sa stanoví podľa postupu uvedenom v pracovnej tabuľke:

	vzorka séra	štandardný roztok	blank
sérum (ml)	0,02	-	-
štandardný roztok glukózy (ml)	-	0,02	-
H ₂ O (ml)	-	-	0,02
čínidlo (ml)	2	2	2
<ul style="list-style-type: none"> - premiešať a inkubovať 20 - 30 minút pri izbovej teplote - alebo 15 minút vo vodnom kúpeli pri 37 °C - do 40 minút od skončenia inkubácie odmerať A₄₉₈ proti blanku 			
A₄₉₈			-
koncentrácia glukózy (mmol.l⁻¹)		10	-

Výpočet koncentrácie glukózy:

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times 10 \text{ [mmol.l}^{-1}\text{]}$$

Hodnotenie

Koncentrácia glukózy v krvi sa prostredníctvom hormónov udržiava v konštantnom intervale. Pri rôznych patologických stavoch sa mení, preto zistenie hodnoty koncentrácie glukózy v sére, tzv. glykémie, má dôležitý diagnostický význam (napr. pri diabete).

Fyziologické hodnoty: sérum 4,2 - 6,1 mmol.l⁻¹
celá krv 3,3 - 5,6 mmol.l⁻¹

Záver

LIPIDY

STANOVENIE KONCENTRÁCIE CELKOVÝCH LIPIDOV V SÉRE

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Lipidy krvného séra (vrátane neesterifikovaných mastných kyselín) po kyslej hydrolýze koncentrovanou kyselinou sírovou reagujú s vanilínom a kyselinou trihydrogénfosforečnou za vzniku červeného zafarbenia, ktorého intenzita je úmerná množstvu celkových lipidov v sére

Reagencie a pomôcky

- Súprava BIO-LA-TEST "CELKOVÉ LIPIDY":
- Činidlo (vanilín, $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$, H_3PO_4 , $c = 11,5 \text{ mol.l}^{-1}$).
- Štandardný roztok celkových lipidov (8 g.l^{-1}).
- Kyselina sírová (konc.).
- Sérum, vodný kúpeľ, spektrofotometer, kahan, skúmavky.

☛ **Pozor!! Činidlo a kyselina sírová sú silné žieraviny.**

Pracovný postup

	vzorka séra	štandardný roztok	blank
sérum (ml)	0,02	-	-
štandardný roztok lipidov (ml)	-	0,02	-
koncentrovaná H_2SO_4 (ml)	1,50	1,50	-
- premiešať a zohrievať v tenkostenných skúmavkách 10 minút vo vriacom vodnom kúpeli - obsah skúmaviek (hydrolyzát) ochladiť pod prúdom studenej vody a zo získaného hydrolyzátu odpipetovať do suchých skúmaviek:			
hydrolyzát (ml)	0,10	0,10	-
H_2SO_4 (ml)	-	-	0,10
činidlo (ml)	1,50	1,50	1,50
premiešať, nechať stáť 10-20 min a merať A_{530} vzorky a štandardu proti blanku			
A_{530}			-
celkové lipidy (g.l^{-1})		8	-

Hodnotenie

Z absorbancie vzorky a štandardu vypočítame obsah celkových lipidov v sére podľa vzťahu:

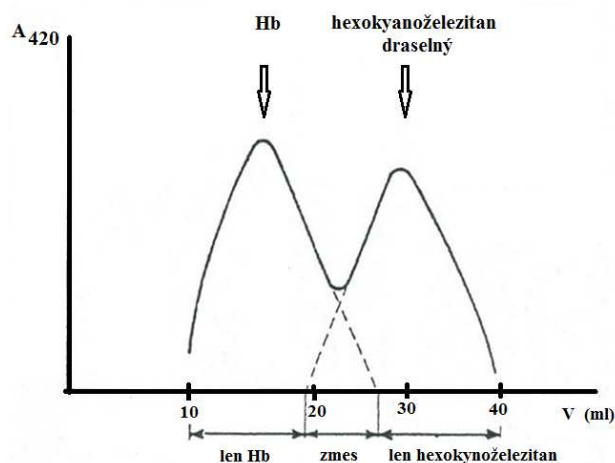
$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{št}} \cdot c_{št} \text{ (g} \cdot \text{l}^{-1}\text{)}$$

Fyziologické hodnoty: sérum: 4 - 8 g.l⁻¹ (nalačno)

Výpočet a záver

Hodnotenie

Z nameraných hodnôt zostrojíme graf závislosti absorpcie od elučného objemu. Graf obsahuje dva maximá – prvé maximum zodpovedá maximálnej koncentrácii hemoglobínu v daných frakciách, a druhé maximálnej koncentrácii hexokynoželezitanu draselného v zodpovedajúcich frakciách. Určíme, v ktorých frakciách je čistý hemoglobín a čistý $K_3[Fe(CN)_6]$. Podľa tvaru krivky vyhodnotíme účinnosť delenia.



Záver

Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

skúmavka	1	2	3	4	blank
laktát (ml) (rôzne koncentrácie pracovných roztokov)	0,4 (3 mM)	0,4 (2,2 mM)	0,4 (1,5 mM)	0,4 (0,75 mM)	-
tlmivý roztok, pH=8,5 (ml)	-	-	-	-	0,4
LDH (pridávať v 30 sek intervaloch)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Výsledná koncentrácia [S] v reakčnej zmesi (mmol.l ⁻¹)	2,0	1,5	1,0	0,5	0
inkubovať 5 min pri teplote 37 °C					
DNFH	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
premiešať a nechať stáť 10 min pri izbovej teplote					
NaOH	5	5	5	5	5
premiešať a nechať stáť 5 min pri izbovej teplote zmerať A ₅₀₅ proti blanku					
A ₅₀₅					-

Hodnotenie

Hodnoty absorbancie sú úmerné množstvu vytvoreného produktu (pyruvátu) v enzýmovej reakcii, preto sa rýchlosť reakcie môže vynášať do grafu priamo v hodnotách absorbancie. Výsledky zaznamenáme do tabuľky. Z hodnôt v tabuľke zostrojíme na milimetrový papier grafickú závislosť podľa Michaelis-Mentenovej a Lineweaver-Bürkovej rovnice. Z oboch grafov odčítame K_m pre LDH a porovnáme.

skúmavka	1	2	3	4
výsledná koncentrácia [S] v reakčnej zmesi (mmol.l ⁻¹)	2,0	1,5	1,0	0,5
rýchlosť reakcie „v“ (A ₅₀₅)				
1/[S]	0,5	0,67	1,0	2,0
1/V (= 1/A ₅₀₅)				

Výpočet

$$- 1/K_m = \text{„hodnota z grafu“} \Rightarrow K_m = ? \text{ (mmol.l}^{-1}\text{)}$$

Záver