

FYZIKÁLNO – CHEMICKÉ METÓDY

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

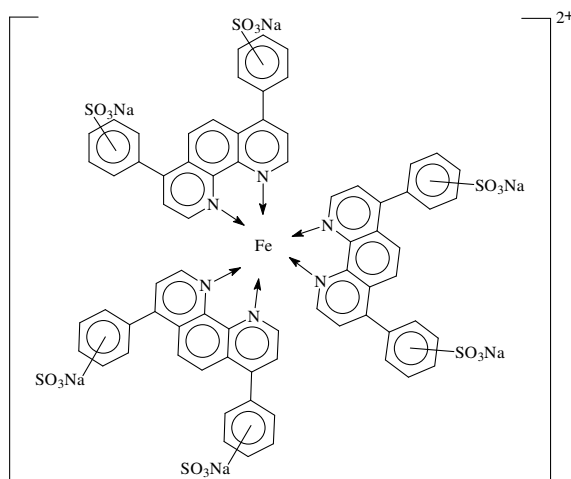
Meno, študijná sk.:

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.



Železnatý chelát dvojsodnej soli
batofenantrolíndisulfónovej kyseliny

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):

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

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

$$c_2 = x$$

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

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

	štandardné roztoky				vzorka	blank
	1	2	3	4		
zásobný štand. roztok Fe ²⁺ (ml)	0,5	1,0	1,5	2,0	-	-
H ₂ O (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 (μmol.l ⁻¹)				18		-

Hodnotenie

- a) Z vypočítaných hodnôt koncentrácií Fe²⁺ iónov v jednotlivých štandardných roztokoch zostrojíte analytickú krivku tak, že na os "x" nanesiete koncentráciu v μmol/l a na os "y" absorbancie príslušných roztokov Fe²⁺. 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.

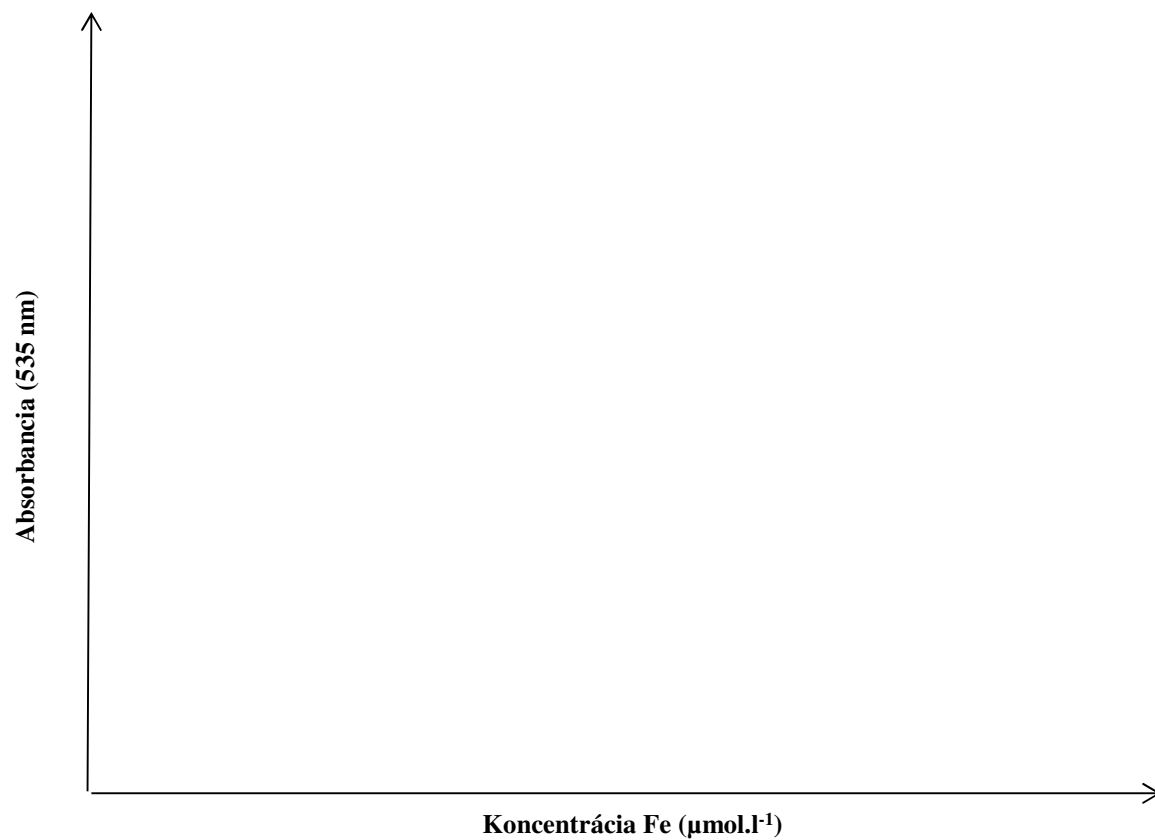
Fyziologické hodnoty:

c (Fe²⁺) muži = 9,6 – 30,2 μmol.l⁻¹

c (Fe²⁺) ženy = 8,9 – 27,3 μmol.l⁻¹

c (Fe²⁺) deti = 9 – 30 μmol.l⁻¹

Výpočty



Záver

ROZTOKY

PRÍPRAVA 250 ml ROZTOKU NaCl S KONCENTRÁCIOU 0,15 mol/l

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Pripravovať budeme roztok, ktorého koncentrácia je vyjadrená ako látková koncentrácia, určená podielom látkového množstva rozpustenej látky a celkového objemu roztoku. Pri výpočte použijeme vzorce:

$$c = \frac{n}{V} \qquad n = \frac{m}{M} \qquad m = c \cdot V \cdot M$$

Roztok pripravíme v odmernej banke s objemom 250 ml.

Reagencie a pomôcky

- NaCl p.a.(M = 58 g/mol),
- odmerná banka (250 ml), lievik, laboratórna lyžica, pipeta,
- filtračný papier,
- váhy.

Pracovný postup

Vypočítame hmotnosť NaCl potrebnú na prípravu 250 ml roztoku s koncentráciou 0,15 mol/l. Vypočítané množstvo NaCl odvážíme na technických váhach a prenesieme s použitím lievika do odmernej banky, rozpustíme v čiastočnom objeme destilovanej vody a následne doplníme objem vodou po značku na banke. Banku označíme štítkom s názvom látky, koncentráciou a dátumom prípravy.

Výpočty a záver

ROZTOKY

PRÍPRAVA 100 ml ROZTOKOV NaCl S KONCENTRÁCIAMI 0,075 mol/l A 0,1 mol/l RIEDENÍM ROZTOKU NaCl S KONCENTRÁCIOU 0,15 mol/l⁻¹

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Pre výpočet zmeny zloženia roztoku pridávaním rozpúšťadla, ak je zloženie roztoku vyjadrené látkovou koncentráciou, platí **bilančná zried'ovacia rovnica**:

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

Rovnica vyjadruje, že pri riedení roztoku rozpúšťadlom sa mení objem roztoku a jeho koncentrácia, pričom **látkové množstvo** zostáva rovnaké. Z definície látkovej koncentrácie vyplýva:

$$n_1 = c_1 \cdot V_1$$

$$n_2 = c_2 \cdot V_2$$

a keďže platí:

$$n_1 = n_2$$

po dosadení dostaneme: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

Napr. pre prípravu objemu 100 ml roztoku s koncentráciou 0,75 mol/l riedením fyziologického roztoku (0,15 mol/l) destilovanou vodou platí:

$$c_1 = 0,15 \text{ mol/l}$$

$$c_2 = 0,075 \text{ mol/l}$$

$$V_1 = ? \text{ ml}$$

$$V_2 = 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{0,075 \cdot 100}{0,15} = \mathbf{50 \text{ ml}}$$

Reagencie a pomôcky

- roztok NaCl, $c = 0,15 \text{ mol.l}^{-1}$,
- dve odmerné banky objemu 100 ml, pipety, odmerný valec, lievnik.

Pracovný postup

Vypočítame objemy fyziologického roztoku (0,15 mol/l) NaCl potrebného na prípravu 100 ml roztoku s koncentráciou 0,075 mol/l a 100 ml roztoku s koncentráciou 0,1 mol/l. V oboch prípadoch vypočítaný objem odmeriame odmerným valcom, prelejeme do odmernej banky, doplníme destilovanou vodou po značku, uzavrieme zátkou a dôkladne premiešame. Banku označíme štítkom s názvom látky, koncentráciou roztoku a dátumom prípravy.

Výpočty a záver

ROZTOKY

SLEDOVANIE HYPOTONICKEJ HEMOLÝZY (OSMOTICKEJ FRAGILITY) ERYTHROCYTOV

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

V hypotonickom prostredí erythrocyty podliehajú hemolýze. Osmotická rezistencia, alebo opačne osmotická fragilita, sa skúma sledovaním odolnosti erythrocytov voči hemolýze v hypotonickom prostredí.

Minimálna osmotická fragilita je určená takou koncentráciou roztoku NaCl, pri ktorej pozorujeme začínajúcu hemolýzu erythrocytov v tomto roztoku (po centrifugácii je supernatant nad sedimentom erythrocytov slaboružovo sfarbený uvoľneným hemoglobínom).

Maximálna osmotická fragilita sa udáva takou koncentráciou roztoku NaCl, pri ktorej dochádza k úplnej hemolýze erythrocytov (roztok má červenú farbu a na dne skúmavky po centrifugácii nepozorujeme žiaden sediment erythrocytov - podobné je pozorovanie v kontrolnej skúmavke s destilovanou vodou).

Sledovanie osmotickej fragility (alebo rezistencie) má diagnostický význam. Slúži na diagnostiku, ako aj diferenciáciu hemolytických ochorení. V klinickej praxi aj vo výskume, je na označenie sledovania hypotonickej hemolýzy viac zaužívaný termín osmotická fragilita než osmotická rezistencia. Aby sme si tieto pojmy nezamieňali, treba si uvedomiť len to, že koncentrácia, ktorá udáva maximálnu osmotickú fragilitu je súčasne údajom o minimálnej osmotickej rezistencii a koncentrácia udávajúca minimálnu osmotickú fragilitu je údajom o maximálnej osmotickej rezistencii.

Čím je erythrocyt osmoticky rezistentnejší (stabilnejší voči hemolýze), tým menej je osmoticky fragilný (menej citlivý voči hemolýze).

Materiál a reagentie

- 20% suspenzia premytých erythrocytov vo fyziologickom roztoku
- roztoky NaCl s koncentraciami: 0,075 mol/l, 0,1 mol/l a 0,15 mol/l.

Pracovný postup

Erythrocyty izolujeme z krvi odstredením (2000 ot./min, 10 min). Po oddelení plazmy odsávaním (pomocou kapiláry a vodnej vývevy) erythrocyty trojnásobne premyjeme izotonickým roztokom NaCl (20 %). Takto pripravenú suspenziu erythrocytov a roztoky NaCl rôznej koncentrácie pipetujeme do sady centrifugačných skúmaviek podľa pracovnej tabuľky. Po odstredení opatrne odpipetujeme do kyvety spektrofotometra 2 ml supernatantu a odmeriame absorbanciu pri vlnovej dĺžke 540 nm oproti vode a hodnoty zapíšeme do tabuľky. Supernatant je kvapalná časť nad sedimentom erythrocytov.

skúmavka	1	2	3	4
erytrocyty (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
H ₂ O (ml)	5	-	-	-
NaCl 0,075 mol/l (ml)	-	5	-	-
NaCl 0,1 mol/l (ml)	-	-	5	-
NaCl 0,15 mol/l (ml)	-	-	-	5
- zmes opatrne premiešať pomocou alobalu - inkubovať 10 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C - centrifugovať 5 minút pri 2500 ot./min - odmerať A₅₄₀ oproti vode				
A ₅₄₀				
% hemolýzy	100			

Hodnotenie

V skúmavkách po odstredení pozorujeme, že objem sedimentu (erytrocyty) je priamo úmerný koncentrácii roztoku NaCl. V skúmavkách s číslom 1, 2 a 3 (hypotonické prostredie) pozorujeme hemolýzu, preto má supernatant červené sfarbenie (roztok hemoglobínu). V skúmavke č. 4 je roztok NaCl izotonický s prostredím v erytrocytoch, preto za normálnych okolností (čerstvé erytrocyty, absencia hemolytického ochorenia) hemolýzu nepozorujeme.

Hemolýzu vyhodnotíme kvantitatívne tak, že vypočítame percento hemolýzy pri rôznych koncentráciách NaCl. Ako 100 % hemolýzy berieme hodnotu A₅₄₀ v skúmavke s vodou (skúmavka č. 1), pretože vo vode prebehne úplná hemolýza erytrocytov.

Hypotonickú hemolýzu znázorníte aj graficky (stĺpcovým grafom).

U zdravého človeka: hemolýza začína v roztoku NaCl s koncentráciou 0,078-0,086 mol/l
úplná hemolýza nastáva v roztoku NaCl s koncentráciou 0,052-0,057 mol/l

Zvýšená osmotická fragilita je spojená s vrodenou alebo získanou sférocytózou (ochorenie, pri ktorom erytrocyty majú vrodený defekt membránových proteínov, čo spôsobuje presun vody a sodíka do erytrocytov, pričom erytrocyty strácajú bikonkávny tvar a získavajú guľatý tvar).

O zníženej osmotickej fragilitate hovoríme vtedy, ak k úplnej hemolýze erytrocytov v roztoku NaCl s koncentráciou 0,052-0,057 mol/l nedošlo, čiže sú viac rezistentné voči hypotonickému roztoku. Znížená osmotická fragilita je spojená s chronickým ochorením pečene, anémiou z nedostatku železa, talasémiou, hyponatriémiou (koncentráciou Na⁺ v sére <130 mmol/l) alebo kosáčikovitou anémiou po splenektómii (odstránení sleziny).

Záver

BIOCHEMICKY VÝZNAMNÉ REAKCIE ORGANICKÝCH ZLÚČENÍN

STANOVENIE KONCENTRÁCIE MOČOVINY V SÉRE A V MOČI

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Močovina tvorí s diacetylmonooxímom v silne kyslom prostredí za prítomnosti tiosemikarbazidu a iónov Fe^{3+} červeno sfarbený komplex vhodný na spektrofotometrické stanovenie pri 525 nm.

Reagencie

- štandardný roztok močoviny (20 mmol.l^{-1}); roztok činidla, ktorý obsahuje diacetylmonooxím (5 mmol.l^{-1}), tiosemikarbazid ($0,9 \text{ mmol.l}^{-1}$), H_2SO_4 ($0,9 \text{ mol.l}^{-1}$) a Fe^{3+} ($25 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), vzorky séra a 100x riedeného moču.

Pracovný postup

	štandardný roztok	vzorka séra	vzorka moča	blank
štandardný roztok močoviny (ml)	0,01	-	-	-
sérum (ml)	-	0,01	-	-
moč (100x riedený) (ml)	-	-	0,01	-
H_2O (ml)	-	-	-	0,01
činidlo (ml)	2	2	2	2
- premiešať, 10 min zahrievať vo vriacom vodnom kúpeli, - ochladiť a odmerať A_{525} oproti blanku				
A_{525}				-
koncentrácia močoviny (mmol.l^{-1})	20			-
množstvo močoviny (mmol/24 hod.)	-	-		-

Hodnotenie

Vypočítajte koncentráciu močoviny v sére a v moči (pri výpočte koncentrácie v moči výsledok vynásobte zriedením moča). Vypočítajte množstvo vylúčenej močoviny za 24 hodín (pri zadaní diurézy – objemu moča vylúčeného za 24 hodín) a hodnoty porovnajte s fyziologickými hodnotami.

Fyziologické hodnoty: $c(\text{sérum}) = 2,5 - 8,3 \text{ mmol.l}^{-1}$
 $c(\text{moč}) = 125 - 400 \text{ mmol.l}^{-1}$
 $n = 320 - 568 \text{ mmol/24 hod}$

Výpočty a záver

SACHARIDY

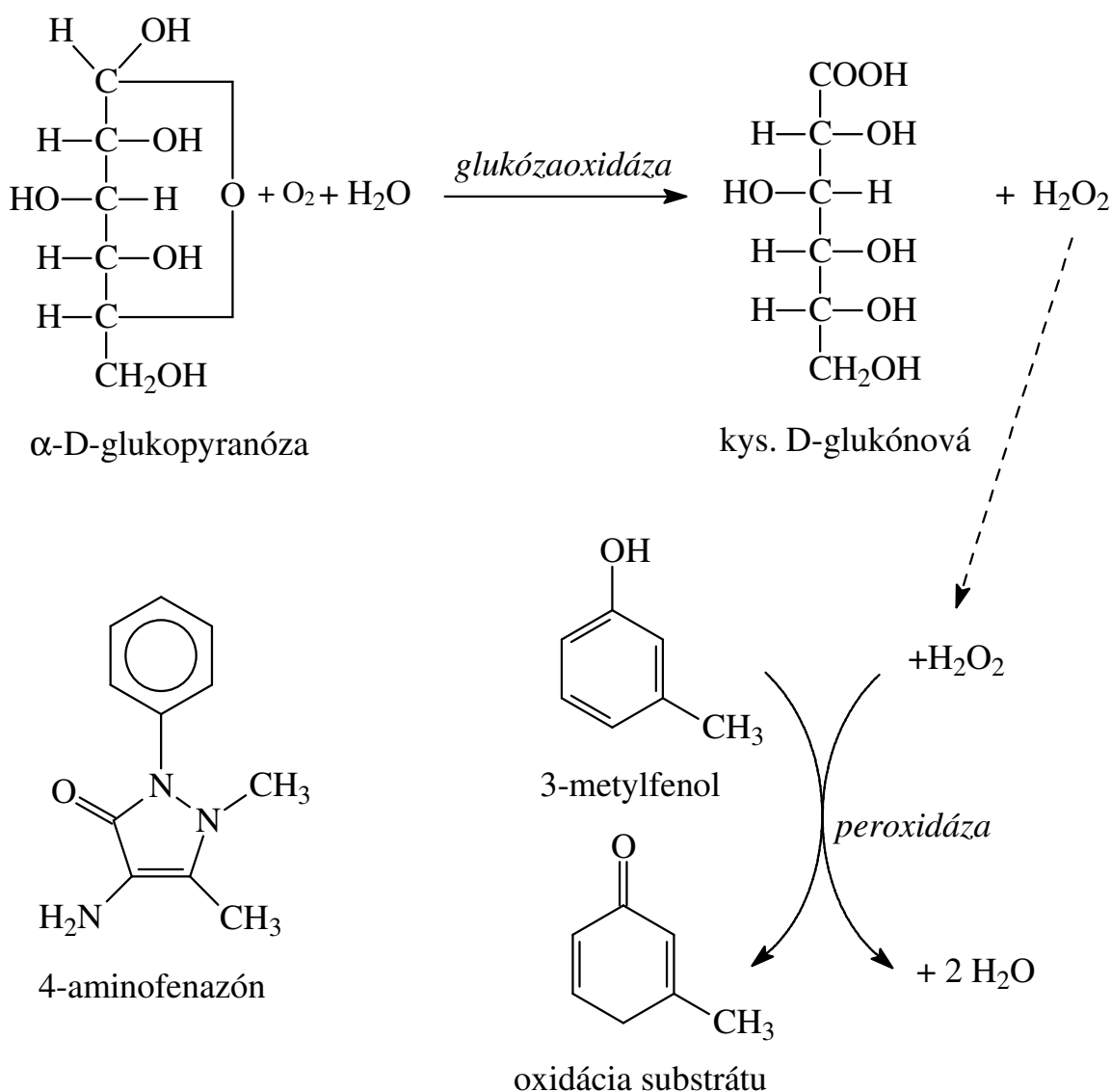
ENZÝMOVÉ STANOVENIE KONCENTRÁCIE GLUKÓZY V SÉRE

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-metylphenol, 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 mol.l⁻¹), glukózaoxidázu (160 μkat.l⁻¹), peroxidázu (16 μkat.l⁻¹), 3-metylfenol (0,010 mol.l⁻¹), 4-aminofenazón (0,001 mol.l⁻¹), štandardný roztok glukózy (0,010 mol.l⁻¹).

Pracovný postup

Pri stanovení koncentrácie glukózy v krvi alebo hemolytickom sére je potrebné biologický materiál najprv deproteínovať. Analyzované vzorky séra sú pre účely praktického cvičenia už deproteínované 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
- 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:

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

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

SACHARIDY

DETEKCIA PRÍTOMNOSTI REDUKUJÚCICH SACHARIDOV V MOČI

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Dôkaz prítomnosti redukujúcich sacharidov v moči je založený na ich schopnosti sa oxidovať na aldónové kyseliny, čím redukujú iné látky. Najprv uskutočníme v moči Fehlingovu skúšku (a), ktorá predstavuje iba stanovenie prítomnosti redukujúcich sacharidov, tzv. kvalitatívne stanovenie. Princípom tejto reakcie je redukcia iónov Cu^{2+} , prítomných vo Fehlingovom činidle, na Cu^+ za vzniku žltočervenej až červenej zrazeniny oxidu meďného (Cu_2O).

Aby sme zistili, či sacharid (alebo iná redukujúca látka) v uvedenom moči je glukóza, použijeme semikvantitatívne stanovenie pomocou diagnostického prúžku GlukoPHAN (b). Tieto diagnostické prúžky sú určené k rýchlemu a špecifickému stanoveniu prítomnosti glukózy v moči, ako aj orientačnému stanoveniu koncentrácie glukózy v moči. Ich indikačná zóna obsahuje enzýmy *glukózaoxidázu* a *peroxidázu* so špeciálnym chromogénnym systémom, ktorý sa v prítomnosti glukózy oxiduje na produkt zelenej farby

Reagencie

- roztoky Fehling I ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a Fehling II (vínan sodno-draselný),
- čerstvý moč 1 a 2, roztok glukózy ($w = 1\%$),
- diagnostické prúžky GlukoPHAN.

Pracovný postup

a) Fehlingova skúška

K 2 ml vzorky (moč 1, moč 2 a roztok glukózy) sa pridá rovnaký objem Fehlingovho činidla, ktorý sa pripravuje zmiešaním roztokov Fehling I a Fehling II v pomere 1:1 v osobitnej skúmavke. Reakčná zmes sa zahrieva cca 3 minúty vo vriacom vodnom kúpeli. Reakcia je pozitívna, ak vznikne žltočervená až červená zrazenina oxidu meďného (Cu_2O), ktorá sa usadí na dne skúmavky. Roztok glukózy slúži ako pozitívna kontrola, teda v reakcii bude vznikať zrazenina Cu_2O . Citlivosť tejto reakcie je približne 10 mmol/l. Redukčné skúšky je potrebné robiť v čerstvom, nezakalenom moči. Ak moč obsahuje bielkoviny, musí sa pred skúškou deproteinovať.

b) Dôkaz a semikvantitatívne stanovenie glukózy diagnostickými prúžkami "GlukoPHAN"

Dôkaz vykonáme len v tom moči, v ktorom bola dokázaná prítomnosť redukujúcej látky Fehlingovou skúškou. Diagnostický prúžok GlukoPHAN sa na chvíľu (1-2 sek) namočí do zásobnej fľaše vyšetrovaného moču. Po jeho vytiahnutí sa test hodnotí po troch minútach porovnaním intenzity vzniknutého sfarbenia s farebnou stupnicou na štítku tuby s prúžkami.



Test zachytí vznikom zeleného sfarbenia prítomnosť zvýšeného množstva glukózy približne od koncentrácie 2 mmol/l.

Hodnotenie

V prípade pozitívnej Fehlingovej reakcie sa presvedčte, či je redukujúcou látkou glukóza, a to špecifickou skúškou pomocou prúžkov GlukoPHAN. Výsledky zapíšte do pripravenej tabuľky.

	moč 1	moč 2
Fehlingova skúška		
GlukoPHAN glukóza (mmol/l)		

Záver

LIPIDY

STANOVENIE KONCENTRÁCIE 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:

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

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

Výpočet a záver

AMINOKYSELINY

SEPARÁCIA AMINOKYSELÍN TENKOVRSŤOVOU CHROMATOGRAFIOU (TLC)

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

TLC je chromatografická metóda. Jej princípom je rozdelenie jednotlivých zložiek vzorky na základe rozdielneho charakteru adsorbčných síl zložiek vzorky medzi pohyblivú - mobilnú fázu (rozpúšťadlo) a pevnú - stacionárnu fázu (tenkú vrstvu) chromatografického systému. Stacionárna fáza je tvorená tenkou vrstvou jemnozrnného adsorbentu, ktorý je buď voľne sypaný alebo vhodne fixovaný na podložke (hliníková fólia, sklenená platnička). Mobilná fáza, tzv. vyvíjacia sústava, je zmes organických rozpúšťadiel. V dôsledku rôznej afinity jednotlivých zložiek vzorky k adsorbentu dochádza k deleniu vzorky na jednotlivé zložky. Detekcia rozdelených zložiek sa uskutočňuje postrekom vhodným detekčným činidlom a zložky sa charakterizujú podľa ich retenčných faktorov.

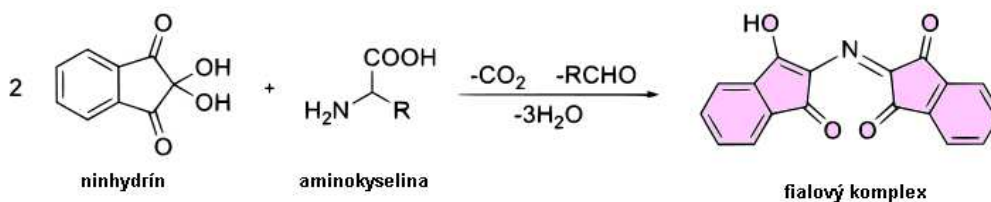
Na detekciu voľných α -aminokyselín sa väčšinou používa citlivá farebná reakcia s ninhydrínom (2-dihydroxy-1,3-indandión). Pri reakcii sa ninhydrín redukuje a aminokyselina sa deaminuje a dekarboxyluje za vzniku aldehydu. Uvoľnený amoniak reaguje s jednou molekulou redukovaného ninhydrínu a ďalšou molekulou nezmeneného ninhydrínu na fialovomodrý komplex. Aminokyseliny prolín a hydroxyprolín dávajú pri tejto reakcii žlté sfarbenie a arginín oranžové. Reakcia nie je špecifická len pre aminokyseliny. Dávajú ju tiež estery aminokyselín, oligopeptidy, aminosacharidy a pod.

Reagencie a pomôcky

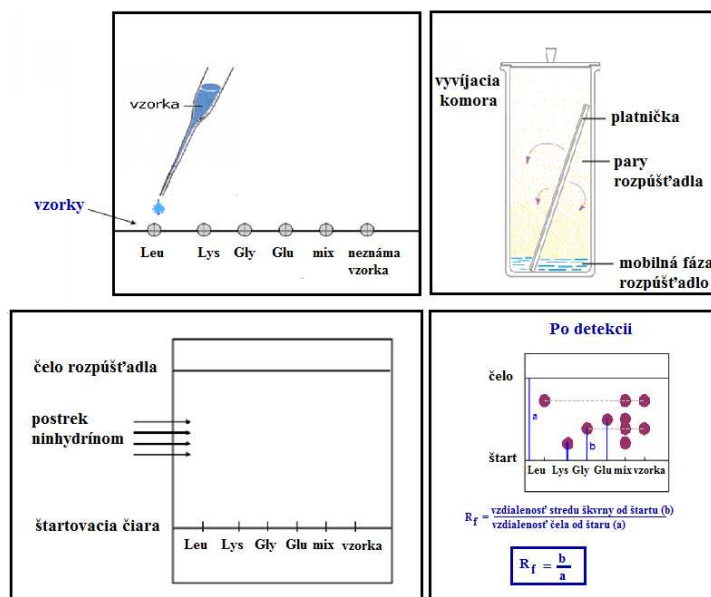
- roztoky aminokyselín: leucín, lyzín, glycín, glutamát, ich zmes a vzorky neznámych aminokyselín (w = 1%)
- silufolová platňa, chromatografická komora
- rozprašovač s roztokom ninhydrínu v acetóne (w = 0,4)
- vyvíjacia sústava: n-butanol - kyselina octová- voda (4:1:5)

Postup

Vzorky známych aminokyselín (leucín, lyzín, glycín, glutamát), ich zmes a vzorky neznámych aminokyselín sa nanesú vo forme malej škvrny (cca 10-20 μ l) na tenkú vrstvu silufolovej platne. Platňa sa vysuší a vloží do komory nasýtenej parami vyvíjacej sústavy. Komora sa uzatvorí a zmes zložiek na platni sa nechá deliť, kým čelo rozpúšťadla dosiahne vzdialenosť 1-2 cm od vrchného okraja platne. Platňu vyberieme, obyčajnou ceruzkou označíme čelo rozpúšťadla a vysušíme v sušiarňi pri 100 °C. Vzorky detegujeme postrekom roztokom ninhydrínu, ktorý reaguje s aminokyselinami za vzniku farebných škvŕn podľa reakcie:



Obrysy vzniknutých škvŕn obkreslíme a označíme stred škvŕny.



Hodnotenie

Z polohy škvŕn aminokyselín vypočítame hodnoty **retenčného faktora** R_f podľa vzorca

$$R_f = \frac{b}{a}$$

kde b je vzdialenosť stredu škvŕny od štartu, a je vzdialenosť čela rozpúšťadla od štartovacej čiary.

Hodnoty vypočítaných retenčných faktorov zapíšeme do tabuľky. Na základe R_f jednotlivých aminokyselín určíme príslušné 2 aminokyseliny v neznámych vzorkách. Identifikované aminokyseliny v neznámej vzorke zapíšeme do tabuľky formou krížika.

Tabuľka: R_f hodnoty vybraných aminokyselín

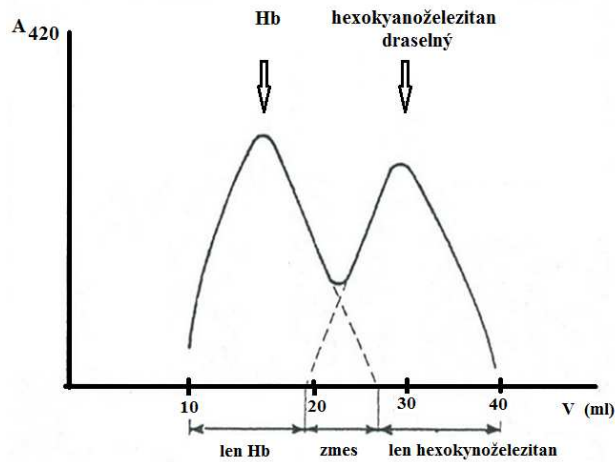
Aminokyselina	Hodnota R_f	Hodnoty R_f			
		vzorka č.1	vzorka č.2	vzorka č.3	vzorka č.4
Leucín					
Lyzín					
Glycín					
Glutamát					

Výpočet a záver

[illegible]

Hodnotenie

Z nameraných hodnôt zostrojíme graf závislosti absorbancie 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

BIOGÉNNE PRVKY

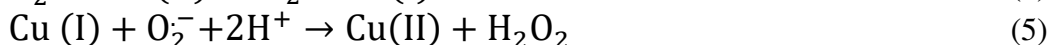
VPLYV IÓNOV KOVOV NA ELIMINÁCIU VOĽNÝCH RADIKÁLOV V BIOLOGICKOM MATERIÁLI

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 vychytávajú superoxid, a tým znižujú redukciu 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, $[Cu(\text{sal-L-glu})(2\text{-metylimidazol})]$, $4 \cdot 10^{-7}$ 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 U 50 % I
 napr. 35 % I predstavuje dismutázovú aktivitu 0,7 U

Výpočty a záver

ENZÝMY I

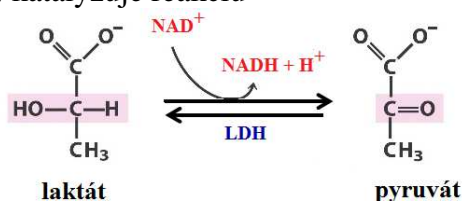
STANOVENIE MICHAELISA-MENTENOVEJ KONŠTANTY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY

Meno, študijná sk.:

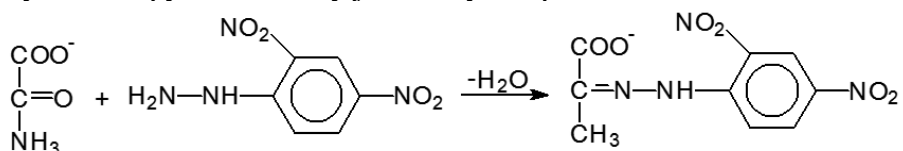
Dátum:

Princíp

Laktátdehydrogenáza (LDH) katalyzuje reakciu



Pri rôznych koncentráciách substrátu (laktátu) uvedená reakcia prebieha rôznou rýchlosťou, ktorá je úmerná množstvu vytvoreného produktu (pyruvátu). Pyruvát reaguje v alkalickom prostredí s činidlom 2,4-dinitrofenylhydrazínom (DNFH) za vzniku hnedooranžového 2,4-dinitrofenylhydrazónu pyruvátu, ktorý je vhodný na spektrofotometrické stanovenie.



Reagencie a pomôcky

- komerčná súprava na stanovenie LDH
- roztok laktátu ($c = 3 \text{ mmol.l}^{-1}$) v tlmivom roztoku TRIS-HCl
- tlmivý roztok TRIS-HCl ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 8,5), na riedenie laktátu, na porovnávací roztok
- roztok 2,4-dinitrofenylhydrazínu (DNFH) ($w = 0,02\%$): 200 mg DNFH sa rozpustí v 100 ml HCl ($c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$), zohreje sa do rozpustenia a po ochladení sa doplní destilovanou vodou do 1000 ml
- roztok NaOH ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)
- spektrofotometer, vodný kúpeľ

Pracovný postup

Podľa riediacej tabuľky pripravíme rôzne pracovné koncentrácie substrátu (laktátu)

skúmavka	1	2	3	4
štandard laktátu (ml)	2,0	1,5	1,0	0,5
tlmivý roztok (ml)	-	0,5	1,0	1,5
Koncentrácia laktátu (mmol.l^{-1})	3,0	2,2	1,5	0,75

Z takto pripravených pracovných roztokov substrátu (laktátu) ďalej pipetujeme podľa nasledujúcej schémy

*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 izbovej teplote					
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

ENZÝMY II

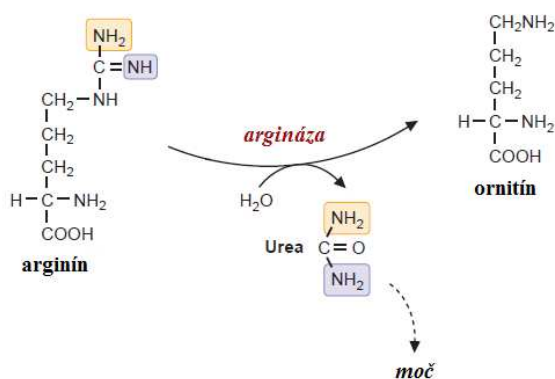
SLEDOVANIE VPLYVU AKTIVÁTOROV A INHIBÍTOROV NA AKTIVITU ENZÝMU. STANOVENIE AKTIVITY ARGINÁZY V HOMOGENÁTE PEČENE.

Meno, študijná sk.:

Dátum:

Princíp

Argináza I katalyzuje posledný krok cyklu močoviny (urey), v ktorom je arginín hydrolyticky štiepený za vzniku ornitínu a močoviny:



Mierou aktivity *arginázy* je množstvo vytvorenej močoviny. Koncentráciu močoviny stanovíme reakciou s diacetylmonoxímom v silne kyslom prostredí za prítomnosti tiosemikarbazidu a železitých iónov, pri ktorej vzniká červený komplex vhodný na spektrofotometrické stanovenie.

Cyklus tvorby močoviny predstavuje sled biochemických reakcií, pri ktorých dochádza k odstraňovaniu toxického amoniaku uvoľneného pri degradácii bielkovín. *Argináza I* je homotrimerický proteín lokalizovaný v cytoplazme hepatocytov, kde každá podjednotka obsahuje aktívne miesto a dva ióny Mn^{2+} . Aktivátormi enzýmu sú Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} . V ich neprítomnosti sa aktivita enzýmu znižuje. Medzi kompetitívne inhibítory patrí L-ornitín a L-lyzín, ktoré súťažia s arginínom o väzbu v aktívnom mieste enzýmu. Vysoká koncentrácia substrátu potláča inhibičný účinok kompetitívneho inhibítora. Nekompetitívnymi inhibítormi *arginázy* sú monoaminokyseliny.

Reagencie a pomôcky

- súprava BIO-LA-TEST na stanovenie močoviny
- tlmivý roztok TRIS-HCl ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 9,7)
- aktivátor MnCl_2 v tlmivom roztoku pH 9,7 ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)
- inhibítor L-lyzín vo vode ($w = 1\%$)
- homogenát hovädzej pečene ako zdroj *arginázy* ($w = 5\%$)
- L-arginín v TRIS-HCl tlmivom roztoku ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 9,7)
- štandardný roztok močoviny ($c = 8,3 \text{ mmol.l}^{-1}$)
- zriedený roztok H_2SO_4 : do 100 ml odmernej banky sa dá 60 ml destilovanej vody a 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej, po ochladení sa doplní destilovanou vodou po značku
- zásobný roztok činidla sa pripraví rozpustením 1 tablety zo súpravy v 50 ml destilovanej vody (pri izbovej teplote je roztok stabilný niekoľko týždňov), pracovný roztok činidla: 1 ml zásobného roztoku činidla a 1 ml zriedenej kyseliny sírovej (pripravuje sa čerstvý roztok)

- roztok kyseliny trichlóroctovej (TCA) (w = 5 %)
- vodný kúpeľ, varič, centrifúga, spektrofotometer

Pracovný postup

skúmavka	1	2	3	4	blank
tlmivý roztok pH 9,7 (ml)	1,0	1,4	0,4	1,6	1,6
homogenát pečene (zdroj <i>arginázy</i>) (ml)	0,2	0,2	0,2	-	0,2
aktivátor (roztok MnCl ₂) (ml)	0,4	-	0,2	-	-
inhibítor (L-lyzín) (ml)	-	-	0,8	-	-
substrát (L-arginín) (ml)	0,2	0,2	0,2	-	-
štandardný roztok močoviny (8,3 mmol.l ⁻¹) (ml)	-	-	-	0,2	-
inkubovať 5 minút pri izbovej teplote					
TCA (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
centrifugovať 5 minút pri 3000 ot/min					
supernatant (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
pracovný roztok činidla (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
zmes zohriať 5 min vo vriacom vodnom kúpeli, ochladiť v studenej vode a do 15 min zmerať A ₅₂₅ proti blanku					
A ₅₂₅					

Hodnotenie

Namerané absorbancie a vypočítané výsledky zaznačíme do tabuľky

Skúmavka	1 E + MnCl ₂	2 E - MnCl ₂	3 E + I
A ₅₂₅			
c (mmol.l ⁻¹) močoviny v homogenáte/5 min			
aktivita <i>arginázy</i> (mkat/l)			
špecifická aktivita <i>arginázy</i> (mkat/g tkaniva)			
Aktivita (%)	100		
Inhibícia (%)	0		

Aktivita enzýmu je definovaná ako aktivita, ktorá premení 1 mol substrátu za sekundu. Pretože *argináza* premení 1 mol arginínu na 1 mol močoviny (viď rovnicu reakcie), jej aktivitu môžeme vypočítať z množstva vzniknutého produktu – močoviny. Koncentráciu močoviny vypočítame z nameraných absorbancií a známej koncentrácie štandardného roztoku podľa vzorca

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

Získaná koncentrácia zodpovedá koncentrácii premeneného substrátu - arginínu (mmol.l⁻¹ homogenátu). Množstvo premeneného arginínu (mmol.l⁻¹) za 5 minút sa prepočíta na množstvo arginínu premeneného za 1 sekundu. Prepočtom sa získa aktivita enzýmu (mkat/l). Z aktivity *arginázy* v 5 % homogenáte pečene vypočítame aktivitu 1 g tkaniva (mkat/g tkaniva).

Vplyv aktivátora a inhibítora na aktivitu *arginázy* sa posúdi na základe výpočtu aktivity a inhibície enzýmu. Za 100 % aktivitu enzýmu sa považuje hodnota aktivity enzýmu s aktivátorom a bez inhibítora (skúmovka č.1). Aktivitu (A%) môžeme vypočítať priamo z absorbancií, pretože tieto sú úmerné množstvu premeneného substrátu. Inhibíciu (%) vypočítame podľa vzťahu

$$I (\%) = 100 - A (\%)$$

Výpočet a záver