

Błażej GIERCZYK, Grzegorz SCHROEDER

*Fizykochemiczne podstawy
życia*

materiały do ćwiczeń

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii

Poznań 2001

Autorami rozdziału 2 są **Krystian Eitner i Jakub Grajewski**

Recenzenci: **dr Bogusława Łęska, prof. dr hab. Władysław Boczoń**

ISBN 83-915657-2-6

SPIS TREŚCI

1	Regulamin pracowni	9
2	Praca i bezpieczeństwo pracy w laboratorium chemicznym	10
2.1	Zasady ogólne	10
2.1.1	Przed przystąpieniem do pracy	10
2.1.2	W czasie wykonywania ćwiczenia.....	10
2.1.3	Po zakończeniu ćwiczenia.....	10
2.2	Postępowanie w razie wypadku	10
2.2.1	Požary, wybuchy, oparzenia termiczne.....	10
2.2.2	Oparzenia chemiczne i zatrucia oraz sposoby udzielania pierwszej pomocy.....	11
2.2.3	Porażenie prądem elektrycznym	12
2.2.4	Skaleczenia.....	12
2.2.5	Krótkotrwała utrata przytomności.....	13
2.2.6	Nagłe zatrzymanie czynności serca, krążenia i oddychania	13
2.2.7	Wyposażenie apteczki laboratoryjnej	13
2.3	Wyposażenie laboratorium chemicznego	13
2.3.1	Praca z odczynnikami chemicznymi	13
2.3.2	Oznaczenia na odczynnikach	14
2.3.2.1	Piktogramy	14
2.3.2.2	Symbole literowe R (risks) i S (safety).....	14
2.3.3	Oznaczenia instalacji.....	19
2.3.4	Oznaczenia na gaśnicach.....	19
2.4	Sprzęt laboratoryjny	19
2.4.1	Waga laboratoryjna	19
2.4.2	Sprzęt szklany	21
2.4.2.1	Ogólne uwagi o pracy ze sprzętem szklanym	21
2.4.2.2	Ważniejszy sprzęt szklany stosowany w laboratorium.....	21
2.4.3	Sprzęt metalowy	32
2.4.4	Sprzęt elektryczny	36
2.4.4.1	Ogólne zasady bezpiecznej pracy na stanowiskach z prądem elektrycznym	36
2.4.4.2	Ważniejszy sprzęt elektryczny stosowany w laboratorium	36
2.4.5	Sprzęt porcelanowy	39
3	Wybrane techniki laboratoryjne	41
3.1	Chromatografia.....	41
3.1.1	Podział chromatografii zależnie od dominującego mechanizmu procesu rozdziału	41
3.1.2	Podział chromatografii w zależności od sposobu przeprowadzania rozdziału	41
3.1.3	Wykonanie chromatogramu cienkowsarstwowego	42
3.2	Analiza miareczkowa	43
3.2.1	Przygotowanie do miareczkowania.....	43

3.2.2 Miareczkowanie	43
4 Ćwiczenie 1	45
4.1 Równowagi w roztworach elektrolitów – wstęp teoretyczny	45
4.1.1 Elektrolity, dysocjacja elektrolityczna	45
4.1.2 Aktywność i współczynnik aktywności	46
4.1.3 Iloczyn rozpuszczalności, efekt solny, efekt wspólnego jonu	47
4.1.4 Iloczyn jonowy wody, wykładnik stężenia jonów wodorowych	49
4.1.5 Wskaźniki kwasowo-zasadowe, pehametr	49
4.1.6 Roztwory buforowe	52
4.1.7 Hydroliza	53
4.1.8 Teorie kwasów i zasad	55
4.1.8.1 Teoria Arrheniusa	55
4.1.8.2 Teoria Lowry’ego-Brönsteda	55
4.1.8.3 Teoria Lewisa	56
4.2 Równowagi elektrolityczne w roztworach – część ekperymentalna	57
5 Ćwiczenie 2	61
5.1 Reakcje utleniania - redukcji – wstęp teoretyczny	61
5.1.1 Procesy utleniania-redukcji	61
5.1.2 Potencjały normalne utleniania-redukcji	61
5.1.3 Stałe równowagi reakcji utleniania-redukcji	62
5.1.4 Wskaźniki red-ox (utleniania-redukcji)	63
5.2 Reakcje utleniania-redukcji – część ekperymentalna	65
6 Ćwiczenie 3	69
6.1 Kinetyka reakcji chemicznych – wstęp teoretyczny	69
6.1.1 Szybkość reakcji	69
6.1.2 Rzędowość i cząsteczkowość reakcji	69
6.1.3 Równania kinetyczne	69
6.1.4 Czynniki wpływające na szybkość reakcji	71
6.1.4.1 Wpływ temperatury	71
6.1.4.2 Wpływ stężenia	71
6.1.4.3 Wpływ ciśnienia	71
6.1.4.4 Wpływ środowiska	71
6.1.5 Teoretyczne podstawy kinetyki	72
6.1.5.1 Teoria zderzeń	72
6.1.5.2 Teoria stanu przejściowego	72
6.2 Kinetyka reakcji chemicznych – część ekperymentalna	75
7 Ćwiczenie 4	77
7.1 Termodynamika i statyka chemiczna – wstęp teoretyczny	77
7.1.1 Pierwsza zasada termodynamiki. Entalpia tworzenia	77
7.1.2 Ciepło reakcji. Prawo Kirchhoffa. Prawo Hessa	77

7.1.3 Druga i trzecia zasada termodynamiki. Entropia	78
7.1.4 Entalpia swobodna i energia swobodna	79
7.1.5 Statyka chemiczna.....	79
7.2 Statyka chemiczna – część eksperymentalna	81
8 Ćwiczenie 5	83
8.1 Kataliza – wstęp teoretyczny.....	83
8.1.1 Katalizatory i inhibitory	83
8.1.2 Kataliza homogeniczna, heterogeniczna i autokataliza	83
8.1.3 Mechanizm procesów katalitycznych	84
8.2 Kataliza i termodynamika chemiczna – część eksperymentalna	85
9 Izomeria.....	87
10 Ćwiczenie 6	93
10.1 Aminokwasy i białka – wstęp teoretyczny.....	93
10.1.1 Aminokwasy.....	93
10.1.2 Właściwości kwasowo – zasadowe aminokwasów	98
10.1.3 Wiązanie peptydowe	99
10.1.4 Peptydy, białka	100
10.1.5 Klasyfikacja protein	105
10.1.5.1 Podział białek ze względu na rozpuszczalność.....	105
10.1.5.2 Klasyfikacja na podstawie kształtu	105
10.1.5.3 Klasyfikacja ze względu na budowę.....	106
10.1.6 Reakcje aminokwasów i białek	107
10.1.6.1 Reakcja z ninhydriną.....	107
10.1.6.2 Odczyn ksantoproteinowy.....	107
10.1.6.3 Odczyn Millona.....	107
10.1.6.4. Odczyn biuretowy	108
10.1.6.5 Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa (odczyn na tryptofan)	108
10.1.6.6 Odczyn Sakugachiego na argininę.....	108
10.1.6.7 Odczyn Pauliego na histydyne	108
10.1.6.8 Reakcje aminokwasów siarkowych	109
10.1.7 Strącanie, denaturacja i wysalanie białek.....	109
10.2 Aminokwasy i białka – część eksperymentalna.....	111
11 Ćwiczenie 7	115
11.1 Sacharydy – wstęp teoretyczny	115
11.1.1 Monosacharydy	115
11.1.2 Oligosacharydy.....	118
11.1.3 Pochodne monosacharydów, monosacharydy o nietypowej budowie.....	119
11.1.4 Polisacharydy	122
11.1.5 Glikozydy (heterozydy).....	125
11.1.6 Reakcje cukrów	127

11.1.6.1 Odczyny kondensacyjne.....	127
11.1.6.2 Tworzenie kompleksów z jonami miedzi	127
11.1.6.3 Odczyny redukcyjne.....	128
11.1.6.4 Epimeryzacja sacharydów.....	128
11.1.6.5 Hydroliza sacharydów.....	129
11.1.6.6 Reakcje polisacharydów z jodem.....	129
11.2 Sacharydy – część eksperymentalna	131
12 Ćwiczenie 8	133
12.1 Lipidy – wstęp teoretyczny	133
12.1.2 Kwasy tłuszczowe.....	133
12.1.2 Tłuszcze proste	134
12.1.3 Tłuszcze złożone	135
12.1.4 Sterole.....	140
12.1.5 Napięcie powierzchniowe, związki powierzchniowo czynne, micelle.....	141
12.1.6 Koloidy.....	142
12.1.7 Reakcje lipidów	143
12.1.7.1 Wykrywanie gliceryny	143
12.1.7.2 Zmydlanie tłuszczów.....	143
12.1.7.3 Wykrywanie wiązań podwójnych w lipidach	144
12.1.7.4 Reakcja cholesterolu	145
12.2 Lipidy – część eksperymentalna	147
13. Ćwiczenie 9	149
13.1 Otrzymywanie i chromatografia lipidów złożonych.....	149
14 Ćwiczenie 10	151
14.1 Kwasy nukleinowe – wstęp teoretyczny	151
14.1.1 Zasady azotowe, nukleozydy, nukleotydy	151
14.1.2 Kwasy nukleinowe	153
14.2 Kwasy nukleinowe – część eksperymentalna	159
15. Ćwiczenie 11	161
15.1 Barwniki naturalne – wstęp teoretyczny	161
15.1.1 Teoria barwy	161
15.1.2 Podstawy fotokolorymetrii.....	162
15.1.3 Ważniejsze klasy barwników naturalnych.....	163
15.1.3.1 Karotenoidy	163
15.1.3.2 Barwniki porfiryne i pirolowe.....	166
15.1.3.3 Flawonoidy.....	169
15.1.3.4 Inne barwniki roślinne.....	172
15.1.3.5 Inne barwniki zwierzęce.....	176
15.2 Barwniki naturalne – część eksperymentalna	179
16. Ćwiczenie 12	181

16.1 Reakcje enzymatyczne – wstęp teoretyczny	181
16.1.1 Enzymy	181
16.1.2 Klasyfikacja enzymów	181
16.1.3 Charakterystyka poszczególnych klas enzymów	182
16.1.4 Kinetyka reakcji enzymatycznych.	183
16.1.5 Wpływ inhibitorów i aktywatorów na szybkość reakcji enzymatycznych. Enzymy allosteryczne.	184
16.1.6 Wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów.	184
16.2 Reakcje enzymatyczne – część eksperymentalna	185
17 Ćwiczenie 13	187
17.1 Procesy utleniania-redukcji w organizmach żywych – wstęp teoretyczny	187
17.1.1 Biologiczne układy utleniania-redukcji	187
17.1.2 Barwniki hemowe	188
17.2 Procesy utleniania-redukcji w organizmach żywych – część eksperymentalna	191
18. Tablice i wiadomości uzupełniające	193
18.1 Sposoby wyrażania zawartości składników w mieszaninach i roztworach	193
18.2 Roztwory kwasów i zasad	193
18.3 Wartości stałych dysocjacji ważniejszych kwasów i zasad	194

Różnorodność pracy w laboratorium stwarza o wiele większe ryzyko wystąpienia wypadku niż podczas ściśle opracowanych procesów produkcyjnych. Z tego względu należy przestrzegać przepisów BHP. Każde laboratorium posiada szczegółowy regulamin uwzględniający specyfikę pracy i warunków tam panujących.

1 Regulamin pracowni

1. Studenci przebywają na pracowni wyłącznie w dniach i godzinach przewidzianych planem zajęć.
2. Student na pracowni zobowiązany jest przebywać w kitlu oraz w okularach ochronnych.
3. Zabrania się wykonywania doświadczeń nie umieszczonych w harmonogramie ćwiczeń oraz wynoszenia odczynników w z pracowni.
4. Na stanowiskach pracy należy zachować porządek. Na stole laboratoryjnym mogą znajdować się tylko przedmioty i rzeczy związane z bezpośrednim wykonywaniem ćwiczenia, ubrania wierzchnie należy zostawiać w szatni.
5. Studentów obowiązuje oszczędzanie odczynników, wody destylowanej, gazu oraz energii elektrycznej.
6. Zabrania się spożywania posiłków oraz picia napojów podczas pobytu na pracowni.
7. Palenie tytoniu jest zabronione w całym gmachu Collegium Chemicum.
8. W przypadku powstania pożaru należy natychmiast zaalarmować prowadzących ćwiczenia oraz zgodnie z ich wskazówkami, opuścić salę ćwiczeń.
9. Zaistniałe poparzenia lub skaleczenia należy natychmiast zgłaszać prowadzącym ćwiczenia.
10. W przypadku wystąpienia objawów zatrucia należy zgłosić się do osoby prowadzącej ćwiczenia. Jeśli takie objawy zostaną zauważone po godzinach ćwiczeń należy natychmiast zgłosić się do lekarza.
11. Zabrania się pipetowania wszelkich cieczy ustami.
12. Warunkiem otrzymania zaliczenia jest wykonanie ćwiczeń przewidzianych programem oraz rozliczenie się ze sprzętu.
13. Rażąco przekroczenie obowiązujących przepisów może pociągnąć za sobą usunięcie z pracowni oraz inne konsekwencje dyscyplinarne przewidziane regulaminem studiów.

TELEFONY ALARMOWE

Pogotowie ratunkowe 999

Straż pożarna 998

2 Praca i bezpieczeństwo pracy w laboratorium chemicznym

2.1 Zasady ogólne

2.1.1 Przed przystąpieniem do pracy

Praca w laboratorium powinna być poprzedzona odpowiednimi przygotowaniem:

- szczegółowe zapoznanie się z rozmieszczeniem sprzętu gaśniczego i instrukcjami jego użycia, apteczki laboratoryjnej, telefonu alarmowego oraz wyjść ewakuacyjnych;
- zaznajomienie się z częścią teoretyczną zagadnienia;
- poznanie właściwości stosowanych odczynników, sposobów bezpiecznego obchodzenia się z nimi, ich utylizacji oraz udzielania pierwszej pomocy w razie wypadku;
- poznanie aparatury używanej podczas wykonywania pracy;
- sprawdzenie czystości miejsca pracy oraz jego okolic, należy także sprawdzić sprawność instalacji, które używane będą w czasie eksperymentu;
- sprawdzenie kompletności wyposażenia potrzebnego do pracy.

2.1.2 W czasie wykonywania ćwiczenia

W celu bezpiecznego przeprowadzenia eksperymentu należy:

- bezwzględnie stosować się do zaleceń prowadzącego ćwiczenia;
- nigdy nie pracować w laboratorium samemu;
- zachowywać porządek w miejscu pracy, zwracając uwagę na rodzaje powstających odpadków i związanych z nimi zagrożeń;
- używać fartuchów ochronnych; powinny one być białe, bawełniane, zapinane z przodu, w czasie wykonywania czynności laboratoryjnych powinny być one związane;
- cały czas nosić okulary ochronne lub inne osłony twarzy osłaniające oczy zarówno z przodu jak i z boku;
- wszystkie niebezpieczne doświadczenia przeprowadzać pod dyktando ze sprawnym wyciągiem;
- unikać gromadzenia większej ilości odczynników na stole laboratoryjnym;
- ewentualne wyjścia z pracowni podczas zajęć należy zgłaszać prowadzącemu zajęcia.

2.1.3 Po zakończeniu ćwiczenia

Przed opuszczeniem laboratorium należy:

- umyć i pochować wszystkie używane naczynia;
- sprawdzić, czy wszystkie instalacje zostały wyłączone;
- zabezpieczyć używane substancje chemiczne;
- zutylizować resztki odczynników według wskazówek prowadzącego.

2.2 Postępowanie w razie wypadku

Nie wolno bagatelizować żadnego wypadku. Nawet błaha z pozoru obrażenia mogą nieść za sobą nieodwracalne skutki. O zdarzeniu należy zawsze powiadomić prowadzącego zajęcia laboratoryjne lub kierownika laboratorium. W przypadku utraty przytomności bezwzględnie sprawdzić drożność dróg oddechowych u poszkodowanego, stwierdzić czy oddycha, zbadać tętno, położyć na boku, z nisko ułożoną głową.

2.2.1 Pożary, wybuchy, oparzenia termiczne

Powodem pożaru może być przeskoczenie płomienia w palniku lub nieostrożne obchodzenie się z substancjami łatwopalnymi. W celu uniknięcia takich wypadków należy dokładnie sprawdzać szczelność aparatury, reakcje niebezpieczne przeprowadzać pod wyciągiem, nie dopuszczać do przegrzania cieczy łatwopalnych podczas ich ogrzewania, a używanie otwartego ognia na laboratorium ograniczyć do minimum. Substancje palne (rozpuszczalniki organiczne) ogrzewać za pomocą elektrycznych łaźni wodnych, olejowych lub piaskowych, bądź czasz grzejnych. Należy także pamiętać o groźbie wystąpienia pożaru w sąsiedztwie substancji łatwopalnych o dużej prężności par. W razie pożaru nie można dopuścić do paniki. W miarę możliwości należy

usunąć z sąsiedztwa butle ze sprężonymi gazami oraz substancje łatwopalne. Gdy płonie ubranie uszkodzonego nie należy dopuścić do biegnięcia po laboratorium, co może spowodować rozprzestrzenienie się ognia. Ogień należy gasić przez szczelne owinięcie kocem gaśniczym.

W celu uniknięcia następstw wybuchów należy reakcje groźące eksplozją przeprowadzać w oddzielnych pomieszczeniach, przy zgaszonych palnikach i wyłączonych urządzeniach elektrycznych. Należy pamiętać o możliwości wystąpienia implozji podczas użytkowania eksyktorów próżniowych, wyparek, przeprowadzania destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem.

Przy oparzeniach istotne jest stwierdzenie, czy nie doszło do uszkodzenia dróg oddechowych, co może prowadzić do niemożności oddychania. Należy wówczas podawać tlen. Przy oparzeniach I i II stopnia zaczerwienioną skórę należy przemywać zimną wodą (nawet około 30 min.) lub solą fizjologiczną, pokryć jałową gazą. Na miejsce oparzenia można nałożyć Pantenol w aerozolu. Nie wolno smarować tłustymi maściami, oliwą czy spirytusem. Nie należy przekłuwać powstałych pęcherzy. Oparzenia III stopnia przykrywa się jałowym opatrunkiem, konieczny jest kontakt z lekarzem.

2.2.2 Oparzenia chemiczne i zatrucia oraz sposoby udzielania pierwszej pomocy

Należy pamiętać, że każda substancja jest potencjalną trucizną. Efekt toksyczny związany jest z dawką oraz okresem stężności toksyny. Oprócz toksyczności danej substancji należy uwzględniać także wpływ na organizm produktów jej rozpadu i przekształceń metabolicznych.

Najczęściej zatrucie w laboratorium dokonuje się poprzez układ oddechowy. Po przedostaniu się do płuc trucizna rozchodzi się w krótkim okresie po całym ciele za pomocą układu krwionośnego. W przypadku kontaktu z gazami, pyłami lub parami należy stosować maski z odpowiednimi pochłaniaczami, pracować tylko pod sprawnym wyciągiem.

Wiele substancji szkodliwych i trujących łatwo wchłania się przez skórę. Należy również zwracać uwagę nawet na najmniejsze skaleczenia, gdyż ułatwiają one przedostanie się trucizny do krwioobiegu. Zawsze powinno się unikać bezpośredniego kontaktu z odczynnikami, gdyż nawet substancje nie reagujące z pozoru ze skórą przy dłuższej ekspozycji powodują uczulenia, może nawet dojść do miejscowej nekrozy skóry. Ponadto w laboratorium skóra jest narażona na różnorodne oparzenia substancjami żrącymi. Najbardziej podatne na poparzenia są błony śluzowe i oczy. Dla tego nie dozwolone jest wciąganie cieczy do pipety ustami oraz badanie na smak, tarcie oczu brudnymi rękami.

Stosunkowo rzadkim jest w laboratorium zatrucie poprzez układ pokarmowy. Spowodowane jest na przykład przez wprowadzenie trucizny wraz z jedzeniem bez uprzedniego mycia rąk.

Postępowanie w wypadku zatrucia związane jest z rodzajem toksyny. Pierwszą czynnością powinno być odcięcie chorego od źródła trucizny i zabezpieczenie jej przed innymi użytkownikami laboratorium. W wypadku zatrucia gazami należy wyprowadzić uszkodzonego na świeże powietrze (w tym przypadku nie stosować bezpośrednio sztucznego oddychania). Gdy trucizna nie jest znana stosuje się odtrutkę uniwersalną opartą na węglu aktywnym, tlenku magnezu i kwasie taninowym. Przy zatruciach substancjami żrącymi podaje się białko, mleko lub olej parafinowy. Środków wymiotnych nie stosuje się przy zatruciach kwasami lub zasadami.

Najczęściej zatrucia w laboratorium spowodowane są przez substancje wymienione w Tabeli 1

Tabela 1. Najczęściej spotykane w laboratorium substancje trujące

Przyczyna zatrucia	Sposób udzielania pierwszej pomocy
ACETON	– należy spowodować wymioty, podać odtrutkę uniwersalną, nie pozwolić zasnąć;
ALDEHYDY	– podawać białko, mleko, środki pobudzające;
ALKOHOL METYLOWY	– stosować płukanie żołądka wodą, podawać alkohol etylowy, wskazane wyprowadzenie chorego na świeże powietrze, w razie potrzeby stosować sztuczne oddychanie;
ARSZENIK I ZWIĄZKI ARSENU	– spowodować wymioty;
BENZEN I JEGO HOMOLOGI	– w razie kontaktu wynieść chorego na świeże powietrze, podać środki pobudzające, witaminę C;
BROM	– spowodować wymioty, podać roztwór skrobi, mleko, środki pobudzające;
CHLOROFORM	– w razie potrzeby stosować sztuczne oddychanie;
CYJANKI	– spowodować wymioty, podać 10 ml 3% wody utlenionej, tlen, zawiesinę Fe(OH) ₂ , w razie potrzeby zastosować sztuczne oddychanie;
FENOL	– spowodować wymioty, podać natychmiast alkohol etylowy, białko jajka, olej mineralny;
GAZY TRUJĄCE (CO ₂ , CS ₂ , H ₂ S, acetylen, etylen, tlenki azotu)	– chorego wynieść na świeże powietrze, w razie potrzeby podać tlen;
GAZY ŻRĄCE (NH ₃ , Cl ₂ , Br ₂ , HCl, HF, SO ₂)	– wynieść poszkodowanego na świeże powietrze, przy zatruciu amoniakiem podawać do wdychania kwas octowy, a roztwór rozcieńczonego amoniaku przy zatruciach Cl ₂ , Br ₂ , HCl;
KWASY MINERALNE	– podać natychmiast wodę wapienną luba tlenek magnezowy, dużą ilość wody, nie powodować wymiotów;
NADMANGANIANY	– spowodować wymioty, podawać mleko, białko jajka;
NITROBENZEN	– podać 100 ml 3% kwasu octowego, dużo wody, spowodować wymioty;
PIRYDYNA	– spowodować wymioty;
RTEŃ I JEJ ZWIĄZKI	- podać 4g Na ₂ S ₂ O ₃ w 450 ml wody;
ZASADY	- zastosować 5% roztwór kwasu octowego, sok z cytryny, mleko.

Uwaga! Omówienie wszystkich substancji z którymi można spotkać się w laboratorium jest niemożliwe, należy więc przed każdym doświadczeniem zapoznać się szczegółowo z właściwościami stosowanych odczynników.

2.2.3 Porażenie prądem elektrycznym

Podstawową sprawą przy ratowaniu porażonego jest odizolowanie go od źródła prądu. Oparzenia skóry traktować jako termiczne. Gdy poszkodowany jest w szoku należy okryć poszkodowanego kocem, podawać ciepłe płyny (zapobieganie utracie ciepła, ale bez aktywnego ogrzewania ciała), zapewnić spokój.

Przed użyciem urządzeń elektrycznych należy sprawdzić ich stan, stan izolacji przewodów elektrycznych, kontaktów i gniazdek. Wszystkie aparaty elektryczne powinny być uziemione, nie wolno samemu dokonywać ich napraw.

2.2.4 Skaleczenia

Przy zwykłych skaleczeniach ranę należy delikatnie oczyścić, zdezynfekować i założyć opatrunek. W przypadkach, gdy uszkodzona została tętnica krwotok należy tamować opatrunkiem uciskowym zakładanym w miejscu krwawienia. Pierwsza pomoc w skaleczeniach oczu polega na usunięciu szkła poprzez długotrwałe

przemywanie oczu wodą lub roztworem soli fizjologicznej (0.9% NaCl). Nie należy wyjmować odłamków wbitych w tkankę. Nie wolno pocierać oka. Nałożyć na oko jałowy opatrunek i udać się do lekarza. Większość skaleczeń w laboratorium spowodowanych jest przez sprzęt szklany. W związku z tym należy zawsze przed pracą sprawdzić stan szlifów, występowanie rys, niejednorodności szkła. Czynności te należy przeprowadzać szczególnie dokładnie przed pracą pod zmniejszonym lub zwiększonym ciśnieniem.

2.2.5 Krótkotrwała utrata przytomności

Może wystąpić po urazie głowy, często towarzyszy jej niepamięć wsteczna, dezorientacja. Przez okres około doby chory powinien zostać pod opieką osoby trzeciej, a nawet lekarza, gdyż nie można wykluczyć powstania krwiaka nadoponowego i innych poważnych następstw urazu.

2.2.6 Nagłe zatrzymanie czynności serca, krążenia i oddychania

W razie zaniku akcji serca należy przeprowadzić sztuczne oddychanie (około 10 razy na minutę poprzez umiarkowanie głębokie wdechy) połączone z masażem serca (częstość około 60 razy na minutę), podawać środki pobudzające, sprawdzić drożność dróg oddechowych przez odgięcie głowy do tyłu i uniesienie żuchwy, usunięcie ewentualnych ciał obcych z jamy ustnej, ułożenie poszkodowanego w pozycji bezpiecznej. Ważne jest, by przywrócić przepływ mózgowy przed upływem ok. 4 minut, by nie doszło do nieodwracalnego uszkodzenia kory mózgowej.

2.2.7 Wyposażenie apteczki laboratoryjnej

Wyposażenie apteczki laboratoryjnej zależy od rodzaju prac wykonywanych w laboratorium i możliwości wystąpienia związanych z nimi wypadków. Zapas leków należy przechowywać w osobnej, łatwo dostępnej szafce i uzupełniać w miarę zużycia. Wszystkie leki powinny być zaopatrzone w czytelny opis i datę ważności. Do podstawowego wyposażenia apteczki należą:

- środki opatrunkowe (bandaże, gaza jałowa, plastry: zwykły i z opatrunkiem, wata higroskopijna);
- środki dezynfekcyjne (alkohol etylowy, jodyna, woda utleniona);
- leki różne: aspiryna, kodeina, zasyпка pabiamidowa; leki związane z ratownictwem w wypadkach specyficznych; środki nasercowe: kofeina, kardiamid, krople walerianowe;
- środki stosowane przy zatruciach i oparzeniach: roztwory kwaśnego węgla sodowego, węgla sodowego, amoniaku, kwasu borowego, kwasu cytrynowego, kwasu octowego, nadmanganianu potasu, siarczanu miedziowego, siarczanu sodowego, siarczanu magnezowego, olej rycynowy, oliwa jadalna, woda wapienna, skrobia, tlenek magnezu;
- sprzęt pomocniczy: nożyczki, pinceta, termometr.

2.3 Wyposażenie laboratorium chemicznego

2.3.1 Praca z odczynnikami chemicznymi

Praca w laboratorium chemicznym wymaga spokoju, skupienia i ciszy. Wszelkie czynności należy wykonywać spokojnie i rozważnie, zwracać uwagę na jakość wykonywanej pracy, przestrzegać porządku i czystości. Przed przystąpieniem do wykonywanego ćwiczenia sprawdzić, czy wszystko jest przygotowane do odpowiedniego wykonania zadania (odczynniki, sprzęt itd.).

Odczynniki chemiczne znajdują się w opakowaniach szklanych bądź plastikowych. Nigdy nie należy przechowywać w laboratorium opakowań nieopisanych jak również używać do przechowywania odczynników pojemników przeznaczonych do przechowywania żywności (butelek, słoików) gdyż może to prowadzić do pomyłki a w efekcie, do wypadku. Wszystkie opakowania zawierające chemikalia powinny być szczelnie zamknięte (za wyjątkiem odczynników które, przechowywane, wytwarzają gazowe produkty rozpadu, mogące przyczynić się do rozsadzenia naczynia). Należy pamiętać, by pobierać je i odmierzać (odważać) za pomocą odpowiednich przyrządów miarowych (cylindry miarowe, pipety, łyżki, szpatułki, naczynka wagowe itp.) oraz w sprzyjających ku temu warunkach (w przypadku substancji łatwopalnych, stężonych roztworów kwasów, zasad itp. pod wyciągiem) zachowując należyne zasady bezpieczeństwa. Należy pamiętać, że większość odczynników chemicznych jest szkodliwa dla zdrowia człowieka, dlatego też wszelkie czynności z nimi związane należy wykonywać w taki sposób, aby do minimum zmniejszyć możliwość przenikania ich do organizmu poprzez skórę, usta, drogi oddechowe, czy przewód pokarmowy (fartuch, rękawice i okulary ochronne). Po pobraniu określonej ilości, pojemnik w którym się znajduje odczynnik należy zamknąć i odstawić na właściwe miejsce










oraz zostawić czystość w miejscu jego poboru. Przed przystąpieniem do pobierania, przelewania, rozpuszczania itd. łatwopalnych cieczy należy pogasić wszystkie znajdujące się w pobliżu płomienie palników.

2.3.2. Oznaczenia na odczynnikach

Na opisach odczynników znajdują się zawsze symbole oznaczające rodzaj i stopień niebezpieczeństwa

2.3.2.1 Piktogramy

Tabela 2. Piktogramy

	E – wybuchowe
	C – silnie żrące
	O – utleniacz; substancja samozapalna lub mogąca wywołać pożar
	F – łatwopalne
	F+ - bardzo łatwopalne
	T – toksyczne
	T+ - bardzo toksyczne
	X – szkodliwe
	Xi - drażniące

2.3.2.2 Symbole literowe R (risks) i S (safety)

R (risks):

- R1 – możliwość wybuchu gdy suchy;
- R2 – ryzyko eksplozji na skutek wstrząsu, uderzenia, zetknięcia z ogniem;
- R3 – wysokie ryzyko eksplozji na skutek wstrząsu, uderzenia, zetknięcia z ogniem;
- R4 – tworzy wybuchowe związki metaliczne;
- R5 – podgrzewanie może wywołać wybuch;
- R6 – wybuchowe zarówno z dostępem jak i bez dostępu powietrza;
- R7 – stanowi zagrożenie pożarowe;
- R8 – może wywołać płomień przy kontakcie z materiałami palnymi;
- R9 – wybuchowe w połączeniu z materiałami palnymi;
- R10 – łatwopalny;
- R11 – bardzo łatwopalny;
- R12 – wyjątkowo łatwopalny;
- R13 – szczególnie łatwopalny skroplony gaz;
- R14 – gwałtownie reaguje z wodą;
- R15 – w kontakcie z wodą wydziela łatwopalne gazy;
- R16 – wybuchowy w połączeniu z utleniaczami;
- R17 – samozapalny na powietrzu;
- R18 – tworzy wybuchową mieszaninę z powietrzem;
- R19 – może tworzyć wybuchowe nadtlenki;
- R20 – niebezpieczny przy wdychaniu;
- R21 – niebezpieczny przy kontakcie ze skórą;
- R22 – niebezpieczny po połknięciu;
- R23 – trujący przy wdychaniu;
- R24 – trujący w kontakcie ze skórą;
- R25 – trujący przy połknięciu;
- R26 – szczególnie trujący przy wdychaniu;
- R27 – szczególnie trujący w kontakcie ze skórą;
- R28 – szczególnie trujący przy połykaniu;
- R29 – kontakt z wodą uwalnia trujący gaz;

R30 – może stać się łatwopalny w czasie użycia;
R31 – kontakt z kwasami uwalnia toksyczny gaz;
R32 – kontakt z kwasami uwalnia bardzo toksyczny gaz;
R33 – niebezpieczny z powodu kumulowania się efektów toksycznych;
R34 – powoduje oparzenia ;
R35 – powoduje ciężkie oparzenia;
R36 – drażniący oczy;
R37 – drażni układ oddechowy;
R38 – drażniący dla skóry;
R39 – niebezpieczeństwo wystąpienia nieodwracalnych efektów;
R40 – możliwe wystąpienie nieodwracalnych efektów;
R41 – ryzyko ciężkiego uszkodzenia oczu;
R42 – może powodować uczulenie przy wdychaniu;
R43 – może powodować uczulenie przy kontakcie ze skórą;
R44 – niebezpieczeństwo wybuchu podczas ogrzewania w zamkniętym naczyniu;
R45 – rakotwórczy;
R46 – może powodować wady genetyczne;
R48 – przy dłuższym kontakcie powoduje ciężkie uszkodzenia;
R49 – rakotwórczy przy inhalacji;
R50 – bardzo toksyczny dla organizmów żyjących w wodzie;
R51 – toksyczny dla organizmów żyjących w wodzie;
R52 – szkodliwy dla organizmów żyjących w wodzie;
R53 – może powodować długotrwałe niekorzystne skutki dla środowiska wodnego;
R54 – toksyczny dla roślin;
R55 – toksyczny dla zwierząt;
R56 – toksyczny dla organizmów żyjących w glebie;
R57 – toksyczny dla pszczoł;
R58 – niebezpieczny dla środowiska;
R59 – niebezpieczny dla warstwy ozonowej;
R60 – może zaburzać proces zapłodnienia;
R61 – powoduje uszkodzenia płodu;
R62 – możliwe zagrożenia procesu zapłodnienia;
R63 – może powodować uszkodzenia płodu;
R64 – może powodować uszkodzenia u dzieci karmionych piersią;
R65 – uszkadza płuca przy spożyciu;
R66 – wielokrotny kontakt może powodować wysuszenie i pękanie skóry
R67 – opary mogą wywoływać senność i zawroty głowy

S (safety):

S1 – przechowywać w zamknięciu;
zastosowanie: substancje toksyczne;
zakres stosowalności: dla substancji toksycznych używanych przez ogół społeczeństwa.
S2 – przechowywać poza zasięgiem dzieci;
zastosowanie: wszystkie substancje niebezpieczne;
zakres stosowalności: dla wszystkich niebezpiecznych substancji do których dostęp może mieć ogół społeczeństwa.
S3 – przechowywać w chłodnym miejscu;
zastosowanie: nadtlenki organiczne, substancje o temperaturze wrzenia poniżej 40°C;
zakres stosowalności: dla nadtlenków organicznych, jeżeli nie obowiązuje zwrot S47, dla innych niebezpiecznych substancji o temperaturze wrzenia poniżej 40°C.
S4 – przechowywać z dala od pomieszczeń mieszkalnych;
zastosowanie: substancje toksyczne;
zakres stosowalności: substancje toksyczne, gdy istnieje ryzyko np. inhalacji.
S5 – przechowywać zawartość w...;
zastosowanie: substancje samorzutnie zapalne w stanie stałym na skutek kontaktu z powietrzem;
zakres stosowalności: np. sól, potas, biały fosfor.
S6 – przechowywać pod gazem obojętnym;
zastosowanie: substancje, które muszą być przechowywane w atmosferze gazu obojętnego;
zakres stosowalności: związki metaloorganiczne, rozkładające się w obecności powietrza.

S7 – przechowywać opakowanie szczelnie zamknięte;
zastosowanie: nadtlarki organiczne, substancje wydzielające toksyczne lub łatwopalne pary (np. w kontakcie z wilgocią), wysoce łatwopalne substancje stałe;
zakres stosowalności: organiczne nadtlarki, substancje rozkładające się pod wpływem wilgoci.

S8 – przechowywać opakowanie w suchym miejscu;
zastosowanie: substancje gwałtownie reagujące z wodą, wydzielające toksyczne lub łatwopalne gazy;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone dla rodzajów zastosowań wymienionych powyżej.

S9 – przechowywać opakowanie w dobrze przewietrzonym miejscu;
zastosowanie: nadtlarki organiczne, substancje lotne, uwalniające toksyczne opary, łatwopalne cieczy i gazy;
zakres stosowalności: dla substancji wymienionych powyżej.

S12 – nie przechowywać pojemnika zaplombowanego;
zastosowanie: substancje mogące uwalniać gazy, rozerwać pojemnik;
zakres stosowalności: tylko w szczególnych przypadkach.

S13 – przechowywać z dala od produktów spożywczych;
zastosowanie: substancje toksyczne i szkodliwe;
zakres stosowalności: dla substancji powszechnego użytku.

S14 – przechowywać z dala od substancji łatwopalnych;
zastosowanie: nadtlarki organiczne; utleniacze
zakres stosowalności: używane w szczególnych przypadkach dla substancji wyżej wymienionych.

S15 – przechowywać z dala od źródeł ciepła;
zastosowanie: substancje lotne, rozkładające się lub reagujące pod wpływem ciepła;
zakres stosowalności: monomery, substancje lotne, samozapalne.

S16 – przechowywać z dala od ognia;
zastosowanie: łatwopalne cieczy i gazy;
zakres stosowalności: dla substancji wymienionych wyżej.

S17 – przechowywać z dala od substancji palnych;
zastosowanie: substancje mogące tworzyć wybuchowe lub samozapalające się mieszaniny z substancjami palnymi;
zakres stosowalności: szczególne przypadki.

S18 – trzymać i otwierać ostrożnie pojemnik;
zastosowanie: substancje zdolne wytworzyć nadciśnienie w pojemniku i tworzące wybuchowe nadtlarki;
zakres stosowalności: wypadki szczególne, gdy występuje zagrożenie dla oczu.

S20 – podczas używania nie jeść i nie pić;
zastosowanie: substancje toksyczne i żrące;
zakres stosowalności: dla substancji wymienionych powyżej.

S21 – podczas używania nie palić;
zastosowanie: substancje lotne, palne oraz tworzące toksyczne produkty podczas spalania lub pirolizy;
zakres stosowalności: np. chlorowcopochodne.

S22 – nie wdychać pyłu;
zastosowanie: niebezpieczne substancje w stanie stałym;
zakres stosowalności: dla substancji stałych mogących zostać wchłoniętych przez inhalację.

S23 – nie wdychać oparów;
zastosowanie: wszystkie niebezpieczne substancje ciekłe lub gazowe;
zakres stosowalności: gdy istnieje niebezpieczeństwo związane z wdychaniem substancji, zalecane dla substancji w formie aerozoli.

S24 – unikać kontaktu ze skórą;
zastosowanie: wszystkie substancje niebezpieczne (trujące, drażniące);
zakres stosowalności: zagrożenie związane z kontaktem ze skórą, substancje mogące wywołać uczulenia.

S25 – unikać kontaktu z oczami;
zastosowanie: substancje drażniące lub żrące;
zakres stosowalności: substancje wywołujące oparzenia, działające drażniąco na oczy i błony śluzowe.

S26 – w przypadku kontaktu z oczami przemyć wodą i skonsultować się z lekarzem;
zastosowanie: substancje drażniące lub żrące;
zakres stosowalności: gdy istnieje ryzyko poważnego oczu.

S27 – natychmiast zdjąć zabrudzoną odzież;
zastosowanie: substancje toksyczne, żrące, nadtlarki;
zakres stosowalności: zalecane dla substancji toksycznych łatwo absorbowanych przez skórę, dla substancji żrących.

S28 – przemyć dużą ilością... po kontakcie ze skórą;
zastosowanie: substancje toksyczne, żrące, wchłaniające się przez skórę;
zakres stosowalności: szczególnie gdy woda nie jest najbardziej właściwym płynem przemylającym.

S29 – nie wylewać do zlewu;
zastosowanie: ciecze wysoce łatwopalne;
zakres stosowalności: ciecze łatwopalne nie mieszające się z wodą.

S30 – nie dodawać wody;
zastosowanie: substancje gwałtownie reagujące z wodą;
zakres stosowalności: metale alkaliczne, substancje typu H_2SO_4 .

S33 – przeciwdziałać wyładowaniom elektrostatycznym;
zastosowanie: substancje wysoce łatwopalne;
zakres stosowalności: dla substancji wymienionych powyżej.

S34 – uderzać wstrząsów i uderzeń;
zastosowanie: substancje wybuchowe;
zakres stosowalności: substancje mogące gwałtownie reagować na skutek uderzenia.

S35 – dzielić ostrożnie;
zastosowanie: substancje wybuchowe, toksyczne;
zakres stosowalności: zalecane dla substancji wybuchowych.

S36 – nosić odpowiednią odzież ochronną;
zastosowanie: substancje żrące, toksyczne;
zakres stosowalności: substancje toksyczne łatwo wchłaniane przez skórę, mogące wywołać zagrożenie dla zdrowia przy przewlekłym kontakcie.

S37 – nosić rękawice ochronne;
zastosowanie: substancje żrące, toksyczne, organiczne nadtlenki;
zakres stosowalności: dla substancji drażniących, łatwo wchłanianych przez skórę, nadtlenków organicznych.

S38 – w przypadku niewystarczającej wentylacji nosić maskę przeciwgazową;
zastosowanie: substancje toksyczne;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone do specjalnych przypadków.

S39 – zabezpieczyć oczy / twarz;
zastosowanie: substancje toksyczne, żrące, drażniące;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone do przypadków substancji toksycznych, gdy istnieje ryzyko popryskania.

S40 – umyć podłogę i wszystkie przedmioty przy użyciu..., które miały kontakt z tą substancją;
zastosowanie: substancje niebezpieczne;
zakres stosowalności: zwykle z wyszczególnieniem środka czyszczącego w przypadku, gdy woda nie jest wskazana.

S41 – w przypadku pożaru nie wdychać dymów;
zastosowanie: substancje uwalniające toksyczne gazy podczas spalania;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone do specjalnych przypadków.

S42 – przy rozpylaniu nosić maskę gazową;
zastosowanie: substancje przeznaczone do rozpylania, jednak niebezpieczne przy wdychaniu;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone do specjalnych przypadków (przemysł, rolnictwo).

S43 – w przypadku zapalenia nie używać wody;
zastosowanie: substancje palne;
zakres stosowalności: dla substancji nie mieszających się z wodą lub z nią reagujących.

S44 – skontaktować się z lekarzem w przypadku złego samopoczucia;
zastosowanie: substancje toksyczne;
zakres stosowalności: zwykle ograniczone do specjalnych przypadków (gdy istnieje ryzyko trwałej utraty zdrowia).

S45 – w razie wypadku skontaktować się natychmiast z lekarzem;
zastosowanie: substancje toksyczne;
zakres stosowalności: dla substancji bardzo toksycznych.

S46 – po połknięciu natychmiast kontaktować się z lekarzem i pokazać etykietę i opakowanie;
zastosowanie: wszystkie substancje niebezpieczne;
zakres stosowalności: dla wszystkich substancji niebezpiecznych, szczególnie, gdy istnieje ryzyko połknięcia przez dzieci.

S47 – przechowywać w temperaturze nie przekraczającej stopni Celsjusza;
zastosowanie: substancje nietrwałe termicznie;
zakres stosowalności: zwykle ograniczony, np. nadtlenki organiczne, substancje niskowrzące;

S48 – trzymać wilgotne;
zastosowanie: substancje, które po wyschnięciu stają się wybuchowe, wrażliwe na iskrzenie;
zakres stosowalności: zwykle ograniczony (zastosowania przemysłowe).

S49 – przechowywać tylko w oryginalnym pojemniku;
zastosowanie: substancje wrażliwe na rozkład katalityczny;
zakres stosowalności: substancje wyżej wymienione.

S50 – nie mieszać z;
zastosowanie: substancje mogące gwałtownie reagować z , uwalniać toksyczne gazy;
zakres stosowalności: dla nadtlenu, dla substancji wyżej wymienionych.

S51 – używać tylko w dobrze wentylowanych miejscach;
zastosowanie: substancje mogące stanowić zagrożenie przy wdychaniu, wydzielające łatwopalne pary;
zakres stosowalności: zalecane gdy niewłaściwe użycie jest zwrotu S38, gdy substancje są ogólnodostępne.

S52 – nie od użytku wewnętrznego lub na dużych powierzchniach;
zastosowanie: lotne substancje szkodliwe i toksyczne;
zakres stosowalności: gdy możliwe jest działanie toksyczne przy dłuższym wchłanianiu.

S53 – unikać kontaktu z substancją, zapoznać się ze specjalistyczną instrukcją w tym zakresie;
zastosowanie: kancerogeny, mutageny, substancje teratogenne;
zakres stosowalności: gdy kontakt może być przyczyną uszkodzeń genetycznych, może być przyczyną raka.

S56 – odpady i pojemnik muszą być oddane do odpowiedniego punktu utylizacji;
zastosowanie: zalecane dla substancji toksycznych, mogących spowodować długotrwałe zmiany w środowisku;
zakres stosowalności: dla wyżej wymienionych.

S57 – wykorzystać właściwy pojemnik, by uniknąć skażenia środowiska;
zastosowanie: zalecane dla substancji toksycznych dla organizmów wodnych;
zakres stosowalności: substancje szkodliwe dla fauny, flory, mikroorganizmów.

S58 – odpady traktować jako ryzykowne;
zastosowanie: odpady ryzykowne, postępować według instrukcji;
zakres stosowalności: odpady które nie powinny być utylizowane w klasyczny sposób.

S59 – zastosować się do wskazówek producenta odnośnie wtórnego wykorzystania;
zastosowanie: substancje niebezpieczne dla środowiska;
zakres stosowalności: dla odpadów szkodliwych dla warstwy ozonowej, fauny, flory, mikroorganizmów, pszczoł, mogących powodować zmiany w środowisku.

S60 – odpady substancji i pojemnik muszą być składowane jako substancje niebezpieczne;
zastosowanie: gdy możliwe jest wywołanie długotrwałych szkodliwych zmian w środowisku;
zakres stosowalności: dla substancji toksycznych, niebezpiecznych dla środowiska.

S61 – unikać wydzielania do środowiska, postępować zgodnie z właściwą instrukcją;
zastosowanie: substancje niebezpieczne dla środowiska;
zakres stosowalności: dla wszystkich substancji stanowiących zagrożenie dla środowiska, którym nie przypisano zwrotów S56 – S60.

S62 – jeśli substancja została spożyta nie powodować wymiotów, natychmiast skontaktować się z lekarzem;
zastosowanie: substancje i mieszaniny w stanie płynnym, zawierające węglowodory alifatyczne i alkicykliczne lub aromatyczne w ilości powyżej 10%;
zakres stosowalności: dla wyżej wymienionych, zwłaszcza w przemyśle.

2.3.3 Oznaczenia instalacji

W celu łatwiejszej identyfikacji przewody instalacji rurowych pomalowane są na określony kolor. Wg polskiej normy PN/M-01085 używanymi kolorami są:

- dla wody - zielony;
- dla gazu - żółty;
- dla próżni - szary;
- dla powietrza - błękitny;
- dla pary - czerwony.

2.3.4 Oznaczenia na gaśnicach

Na gaśnicach znajdują się zawsze: atest, data ważności oraz symbole literowe oznaczające zakres ich stosowania:

- A – do gaszenia pożarów ciał stałych pochodzenia organicznego;
- B – do gaszenia cieczy palnych i substancji topiących się pod wpływem ciepła;
- C – do gaszenia gazów;
- D – do gaszenia metali;
- E – do gaszenia materiałów należących do grup A-D znajdujących się pod napięciem.

Gaszenie urządzeń pod napięciem powinno odbywać się z odległości przynajmniej jednego metra.

2.4 Sprzęt laboratoryjny

2.4.1 Waga laboratoryjna

Ważenie - określanie masy próbki, jest jedną z najważniejszych czynności w każdym oznaczaniu.

Rozdzielczość – ilość wszystkich możliwych wskazań wagi w zakresie (0 – Max) – waga może być opisana jako $1 \text{ kg (Max)} \times 0,1 \text{ g}$ (działka elementarna). Rozdzielczość takiej wagi wynosi 10 000.

Powtarzalność – ta sama masa położona wielokrotnie na szalce powinna dać ten sam (lub prawie ten sam) odczyt za każdym razem, w warunkach stałych.

Liniiowość – zdolność wagi do zachowania określonych tolerancji nie tylko w punktach kalibracji, ale w całym przedziale ważenia.

Działka elementarna [d] – wartość różnicy między kolejnymi wskazaniami wyrażona w jednostkach masy.

Działka legalizacyjna [e] – wyrażona w jednostkach masy, umowna wartość, która jest podstawą do klasyfikacji wag i określania błędów granicznych dopuszczalnych wagi.

Obciążenie minimalne [Min] – wartość obciążenia, poniżej której wynik ważenia może być obarczony dużym błędem względnym.

Kalibracja wagi – zbiór operacji ustalających relacje między wartością wskazaną przez wagę a masą wzorca (odważnika kalibracyjnego), stanowiącego obciążenie wagi oraz dokonujących korekcji wskazania, jeżeli zachodzi taka potrzeba. Kalibracja wagi może być wewnętrzna (z odważnikiem kalibracyjnym wbudowanym w wagę) oraz zewnętrzna (z odważnikiem kalibracyjnym stanowiącym wyposażenie wagi).

Tabela 3. Klasyfikacja wag laboratoryjnych

Klasyfikacja wag				
Klasa dokładności, oznaczenie	Wartość działki legalizacyjnej (e)	Liczba działek legalizacyjnych $n = \text{Max} / e$		Obciążenie minimalne Min.
		Minimalna	maksymalna	
Klasa 1 Specjalna I	$e < 1 \text{ mg}$ $e \geq 1 \text{ mg}$	$N < 50\,000$ $N \geq 50\,000$	-	100 d
Klasa 2 Wysoka II	$0,001\text{g} \leq e \leq 0,05\text{g}$ $0,1\text{g} \leq e$	100 5 000	100 000 100 000	20 d 50 d
Klasa 3 Średnia III	$e < 1 \text{ mg}$ $e \geq 1 \text{ mg}$	100 500	10 000 10 000	20 d 20 d
Klasa 4 Zwykła III	$e < 1 \text{ mg}$ $e \geq 1 \text{ mg}$	100	1 000	10 d
<p>OZNACZENIA: d – działka elementarna e – działka legalizacyjna n – liczba działek legalizacyjnych Min – obciążenie minimalne Max – obciążenie maksymalne</p> <p>WYMAGANIA DODATKOWE: $1d \leq e \leq 10d$ (nie dotyczy wag klasy I) $d = e$ (dla wag klasy III do rozliczeń handlowych)</p>				

Podstawowe zasady ważenia:

- należy dostosować rodzaj używanej wagi do wymaganej w ćwiczeniu dokładności i wielkości naważki;
- nie wolno przeciążać wagi;
- przy pracy wymagającej dużej dokładności wszystkie ważenia należy wykonywać na tej samej wadze;
- w przypadku korzystania z wag elektronicznych nie należy wyłączać ich po ważeniu (wynika to z faktu iż wiele ich typów wymaga po włączeniu długiego czasu stabilizacji i każdorazowej kalibracji);
- ważąc na wagach szalkowych (technicznych i analitycznych) należy zwrócić uwagę aby wszelkie zmiany obciążenia belki wagi (zmianę masy odważników, dosypywanie substancji, zdejmowanie naważki z szalki) wykonywać przy zablokowanej wadze;

2.4.2 Sprzęt szklany

2.4.2.1 Ogólne uwagi o pracy ze sprzętem szklanym

Ze względu na dużą różnorodność używanego na pracowniach sprzętu laboratoryjnego należy zawsze pamiętać o kilku zasadach, które są wspólne dla wszystkich szklanych elementów z którymi stykamy się na pracowni chemicznej:

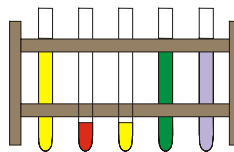
- szkła nie należy suszyć w piecu do prażenia;
- nie należy ogrzewać naczyń szklanych mokrych lub zawilgoconych po zewnętrznej stronie którą ogrzewamy (odparowująca ciecz schładza punktowo szkło, a to z kolei ze względu na małą rozszerzalność cieplną może pęknąć);
- nie ogrzewać oraz nie suszyć w suszarkach szkła miarowego;
- elementów wykonanych z tworzywa sztucznego towarzyszących kolbom miarowym i innej aparaturze nie należy suszyć w suszarkach razem ze szkłem (ulegają z reguły stopieniu, a w najlepszym przypadku odkształceniom);
- z racji faktu że szkło to materiał niezmiernie kruchy należy unikać uderzania nim o metalowe wyposażenie pracowni, lub obijania i zderzania się szkła w szafkach;
- należy unikać pracy ze sprzętem wyszczerbionym, pękniętym lub posiadającym wyraźne zarysowania, w szczególności kiedy pracujemy w warunkach podwyższonej temperatury (ogrzewanie) lub obniżonego ciśnienia („próżnia”).

2.4.2.2 Ważniejszy sprzęt szklany stosowany w laboratorium

Probówka



A

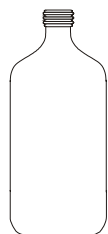


B

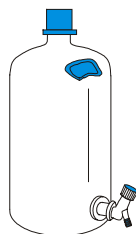
Probówka (A) to szklane naczynie, w którym przeprowadzamy reakcje, ogrzewamy niewielkie ilości cieczy lub ciał stałych. W pracy z nią musimy uważać, aby jej ujścia nie kierować w kierunku własnej twarzy oraz osób nam towarzyszących na pracowni, gdyż zdarza się że ogrzewana w probówce ciecz wypryskuje z naczynia lub też że zaczyna zachodzić w niej niespodziewana reakcja. Podczas pracy należy zwrócić uwagę, czy probówki przez nas używane nie mają otworów w dnie. Probówki nie należy także przegrzewać w płomieniu palnika gdyż może pęknąć. Aby temu zapobiec ogrzewając probówką należy nią delikatnie kołysać w płomieniu, co zapobiega przegrzewaniu się cieczy oraz szkła. Probówek wirówkowych (z dnem stożkowym) nie należy w ogóle ogrzewać w płomieniu palnika.

Stojak (B) służy do przechowywania probówek, może być drewniany, bądź plastikowy.

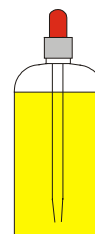
Butelki



A



B



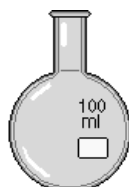
C

Butelki (A, B, C) służą głównie do przechowywania cieczy. Podczas pracy laboratoryjnej należy unikać korzystania z butelek przeznaczonych do przechowywania napojów. Korzystając z butelek należy pamiętać że nie należy ich nigdy ogrzewać.

- butelki z kółpakiem – wykorzystywane do przechowywania łatwo lotnych cieczy (np.: brom);

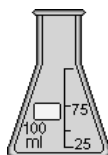
- butelki z tubusem (B) – służą do przechowywania wody destylowanej (coraz częściej wypierane są przez pojemniki wykonane z tworzyw sztucznych);
- butelki z pipetą (C) – bardzo wygodne pojemniki posiadające zamiast korka mniej lub bardziej dopasowaną wkładkę składającą się z pipety i korka szklanego, gumowego lub wykonanego z tworzywa sztucznego z wywierconym otworkiem na pipetę.

Kolba okrągłodenna



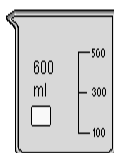
– naczynie to przeznaczone jest do ogrzewania cieczy lub mieszaniny reakcyjnej; współczesne kolby okrągłodenne posiadają wyjście doszlifowane, służące szczelnemu łączeniu ich z innymi elementami aparatury szklanej (chłodnice, nasadki destylacyjne, reduktory); w pracy z kolbą okrągłodenną należy unikać wyszczerbionych szlifów oraz zarysowań szkła, gdyż powoduje to naprężenia podczas ogrzewania mogące spowodować jego pęknięcie.

Kolba Erlenmeyera - stożkowa



– służy do ogrzewania cieczy, miareczkowania, suszenia roztworów niewodnych

Zlewka



– naczynie to służy do ogrzewania, odparowywania cieczy, prowadzenia reakcji, wykorzystywane są także jako łaźnie grzewcze dla mediów o różnych temperaturach wrzenia (łaźnia wodna, olejowa). Doprowadzając ciecz w zlewce do wrzenia musimy mieć na uwadze aby nie wypryskiwała z niej, gdyż zalanie zlewki po zewnętrznej – ogrzewanej stronie spowoduje jej pęknięcie i wydostanie się zawartości na urządzenie grzewcze. Kładąc zlewkę na ciepłą kuchenkę lub płytkę do ogrzewania należy osuszyć szmatką lub bibułą jej zewnętrzną część (odparowująca szybko ciecz schładza ścianki naczyń szklanych powodując pęknięcie naczyń)

Krystalizator



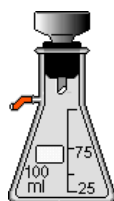
– można porównać go do spłaszczonej szerokiej zlewki, ale jak sama nazwa wskazuje, naczynie to służy do prowadzenia procesów krystalizacji (dlatego jest szersze od zlewki). Krystalizator służy także do odparowywania rozpuszczalnika z krystalizującej mieszaniny.

Szkiełko zegarkowe



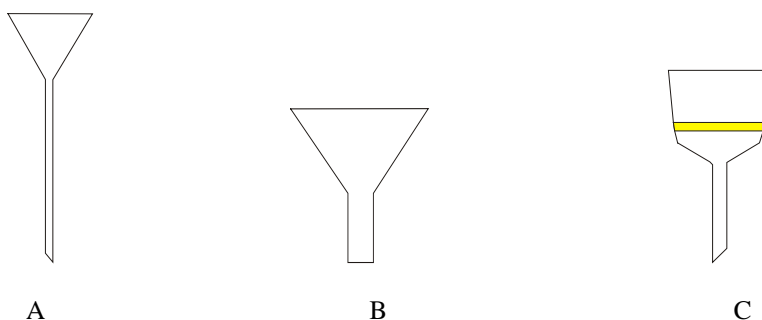
– służy do prowadzenia reakcji kroplowych na tle dowolnej barwy oraz do przykrywania naczyń (zlewek, krystalizatorów – pod warunkiem, że jest odpowiednio dopasowane). Można dokonywać odważania ciał stałych na szkiełku zegarkowym.

Kolba próżniowa (ssawkowa)



– w naczyniu tym utrzymujemy warunki mocno obniżonego ciśnienia, celem sączenia osadów i wykrystalizowanej substancji. Używamy również kolby ssawkowej jako bufora pośredniczącego w obniżeniu ciśnienia w innej aparaturze (wyparka, pistolet do suszenia); w pracy z kolbą ssawkową należy zwrócić uwagę na wszelkie zarysowania jej powierzchni, gdyż mogą spowodować implozję kolby. Kolb ssawkowych nie należy ogrzewać.

Lejki



– służą do sączenia i wlewania cieczy do naczyń o wąskich szyjkach (kolby miarowe, butelki, biurety); stosuje się lejki analityczne (**A**), lejki zwykłe (**B**), lejki z dnem porowatym, które stanowi porowata spieczona masa szklana o dokładnie dobranej wielkości porów (**C**);

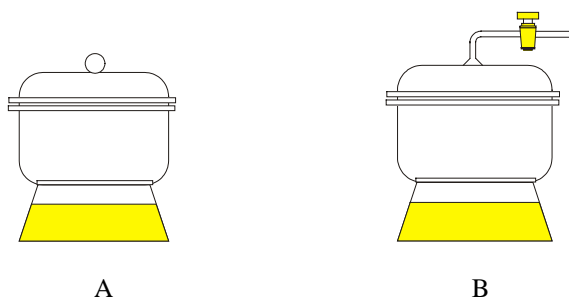
Lejki analityczne posiadają wąski długi wylot, który służy zassaniu cieczy sączonej i przyspieszeniu sączenia; lejki zwykłe charakteryzują się szerszym wylotem i służą podręcznym pracom laboratoryjnym – sączeniu i przelewaniu. Lejkom tego typu towarzyszą sączki (rysunek poniżej **A** i **B**);

Lejki z dnem porowatym (nucze) nie wymagają w swojej obsłudze sączków, a ich zadanie spełnia szklana porowata masa wtopiona w światło przewodu sączenia



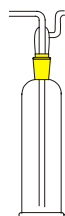
Szalka Petry’ego – docelowo jest to szkło dla zastosowań hodowlanych wykorzystywane przez biologów, biochemików i biotechnologów dla rozmnażania kultur bakteryjnych; chemicy zrobili jednak z tego szkła pożytek i znalazło ono zastosowanie jako podstawka do odważania substancji, krystalizacji z niewielkich ilości roztworów oraz przykrycie dla zlewek.

Eksykatory (A, B)



- służą do zapewnienia bezwodnych warunków substancjom, które przechowujemy, studzimy lub osuszamy. Wypełnienie eksykatora powinno zapewniać możliwie najmniejsze ciśnienie cząstkowe pary wodnej wewnątrz. Istnieją także eksykatory próżniowe (B), które mają dodatkowo tubus wtopiony z boku lub w pokrywę. Zapewniają one wtedy obniżenie ciśnienia wewnątrz, a co za tym idzie zwiększają intensywność odparowania wody, która z kolei zostaje pochłonięta przez środek suszący. Eksykatorów, jako naczyń grubościennych, nie wolno ogrzewać.

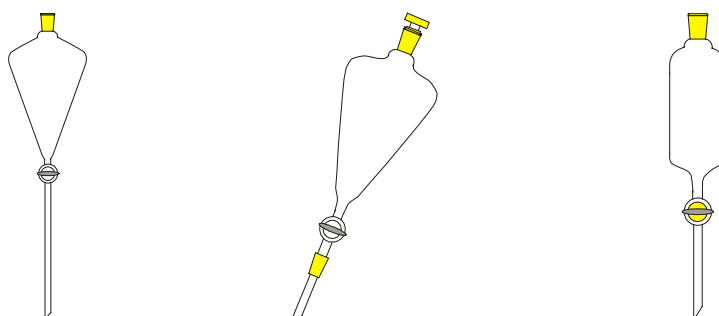
Płuczka



- służy do przemywania gazów z wytwornicy gazu cieczą, która pochłania niepożądane składniki uboczne lub osusza gaz; w płuczce absorbuje się także gazy dla potrzeb reakcyjnych.

Pompka wodna – zasada działania została opisana pod tym samym hasłem w rozdziale o sprzęcie metalowym. Szklany odpowiednik pompki wodnej jest stabilniejszy w działaniu i nie ulega odkształceniom pod wpływem ciśnienia wody. Ze względu na tworzywo z jakiego została wykonana jest jednak o wiele bardziej delikatna niż jej metalowy odpowiednik.

Rozdzielacz



- służą do rozdzielania dwóch nie mieszających się cieczy np.: przy prowadzeniu ekstrakcji w układzie ciecz – ciecz; przy korzystaniu z rozdzielaczy należy pamiętać, że dolną ciecz spuszcza się przez dolny spust odkręcając kran, a górną frakcję odlewamy przez górny wylot korka. Należy także uważać, by podczas wytrząsania cieczy odpowietrzać układ od czasu do czasu, otwierając kran, po uprzednim obróceniu rozdzielacza nóżką do góry, lub przekręcając korek w położenie pokrycia się otworu wykonanego w korku i otworu lub szczeliny wykonanej w otworze wylotowym – górnym rozdzielacza (w szczególności należy zwrócić uwagę na regularne odpowietrzanie kiedy pracujemy z łatwo lotnymi rozpuszczalnikami takimi jak eter dietylowy, chlorek metylenu).

Wkraplacz



– w odróżnieniu od rozdzielacza, przystosowany jest do połączenia z kolbą dwu- lub trój szyjną albo naczyniem reakcyjnym za pomocą połączenia doszlifowanego oraz posiada czasem rurkę boczną do wyrównywania ciśnienia, jeżeli zachodzi konieczność prowadzenia reakcji odizolowanej od zewnętrznej atmosfery.

Kolby miarowe



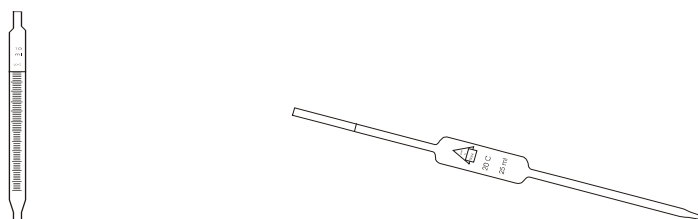
- służą do odmierzania ściśle określonych ilości cieczy. Możemy wyróżnić kolby miarowe na 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml. Skalę kolby miarowej określa trwale zarysowane kalibracyjne kolby umiejscowione na jej długiej szyjce; w pracy z kolbą miarową należy pamiętać, że nie można suszyć kolb miarowych w suszarkach, gdyż równoznaczne byłoby to z ich rozkalibrowaniem. Kolby te należy po umyciu pozostawić do samodzielnego wyschnięcia. Trzeba także zaznaczyć, że kolby miarowe są bardziej narażone na zniszczenie z powodu zarysowania kalibracyjnego, wzdłuż którego, uderzone, najczęściej pękają.

Cylindry miarowe



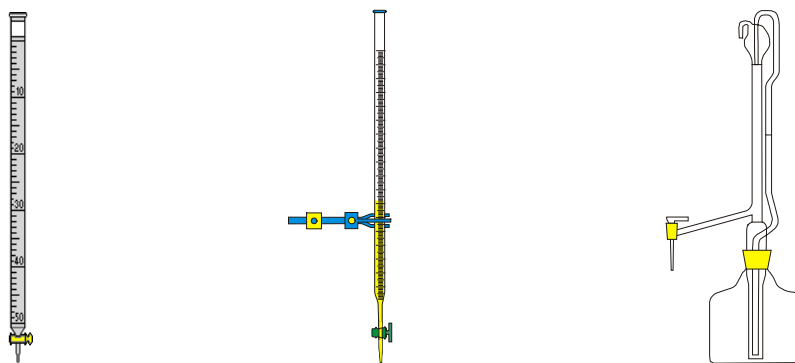
– wykorzystywane są do odmierzania określonych ilości cieczy w szerokim zakresie objętości określonym skalą wyznaczoną na zewnętrznej ścianie cylindra. Objętość ta jest jednak odmierzana z mniejszą dokładnością niż w kolbach miarowych. Przy korzystaniu z cylindrów miarowych obowiązują takie same zasady, jak przy posługiwaniu się kolbami miarowymi.

Pipety



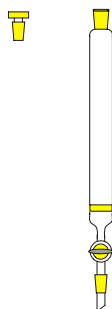
– posługujemy się nimi przy szybkim odmierzaniu niewielkich ilości cieczy. Wyróżniamy przy tym pipety wielomiarowe (z podziałką na ścianie) oraz jednomiarowe (z zarysowaniem kalibracyjnym wyznaczającym przypisaną pipecie objętość). Pipety wielomiarowe posiadają skalę zaczynającą się u wylotu pipety a kończącą się (posiadającą maksymalną wartość) na górnej jej części – w odróżnieniu od biurety.

Biurety



– służą do miareczkowania określonymi objętościami cieczy. Ich skala zaczyna się u góry biurety, a kończy u wylotu. Biuretę umieszcza się na statywie i nalewa ciecz, po czym spuszcza aż do kreski, od której chcemy zacząć miareczkowanie. Trzeba pamiętać przy posługiwaniu się biuretą, że w wylocie cieczy nie powinny pozostawać bąbelki powietrza, gdyż wprowadza to błąd miareczkowania. Podobnie należy zadbać o szczelność przylegania i prawidłowe funkcjonowanie kurka regulującego wypływ cieczy gdyż ma on tendencje do przeciekania. Istnieją jeszcze biurety automatyczne zintegrowane z naczyniem – zasobnikiem cieczy, którą miareczkujemy. Obsługa takich biuret jest o tyle prostsza, że napełnienie i miareczkowanie odbywa się w jednym cyklu i nie wymaga dodatkowych lejeków i naczyń do jej uzupełniania.

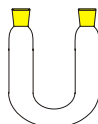
Kolumny chromatograficzne



– kiedy zachodzi potrzeba rozdzielania mieszaniny substancji zawartej w fazie ciekłej wykorzystujemy kolumny chromatograficzne, zbudowane z rury szklanej o różnej długości ograniczonej, u dołu, spiekim ze szkła, zakończonej kurkiem służącym do spuszczenia cieczy. Niekiedy stosuje się odprowadzenie boczne, także zakończone kurkiem, służące do podłączenia próżni. Wypełnienie kolumny stanowią ośrodki adsorpcyjne (Al_2O_3 , SiO_2 , celuloza), dobierane tak, aby zachodził najwydajniejszy rozdział – podobnie należy dobierać eluent którym wmywamy substancję.

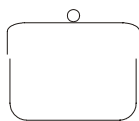
Tryskawka szklana – jest wychodzącym z mody i zastępowanym przez analogi wykonane z tworzywa sztucznego podręcznym zasobnikiem wody destylowanej.

U-rurka



- wykorzystywana do wybiórczej adsorpcji gazów przy przepływowej ich analizie a także jako naczynie do umieszczania środka suszącego.

Naczynie wagowe i pipeta wagowa



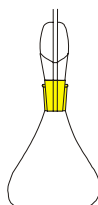
A



B

- pomimo wielu zastępczych środków wykorzystywanych do odważania substancji, szkłem, docelowo przeznaczonym to tej operacji jest naczynie wagowe pokazane na rysunku (**A**). Do odważania cieczy łatwo lotnych służy tzw. pipeta wagowa (**B**), która zapewnia szczelne domknięcie naczynia podczas operacji ważenia, a boczny wylot posiadający mały i szczelnie dopasowany kołpak służy przelewaniu takiej cieczy. Procedura ważenia jest następująca: do odważonego naczynia wysypujemy ważoną substancję po czym wyznaczamy masę; a następnie przenosimy substancję do naczynia docelowego i znowu ważymy naczynie wagowe (na jego ściankach zawsze zostają przyklejone ślady ważonej substancji), z różnicy mas otrzymujemy dokładną masę (z dokładnością określoną czułością wagi) ważonej substancji.

Piknometr



– jest naczyniem szklanym służącym wyznaczaniu wielkości fizycznej, jaką jest gęstość cieczy. Piknometrem realizujemy pomiar wagowy w ściśle określonej temperaturze. Najpierw napełniamy go cieczą odniesienia, której gęstość znamy w określonych warunkach i ważymy. Następnie wykonujemy taki sam pomiar dla cieczy badanej, od obydwu pomiarów odejmujemy masę pustego piknometu i korzystamy z proporcji:

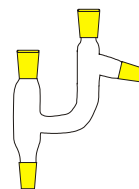
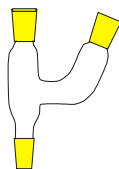
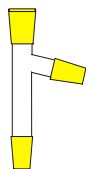
$$\frac{m_x}{m_{cieczy}} = \frac{d_x}{d_{cieczy}}$$

gdzie:

$m_{x, cieczy}$ - to masa zważonej cieczy badanej i cieczy odniesienia;

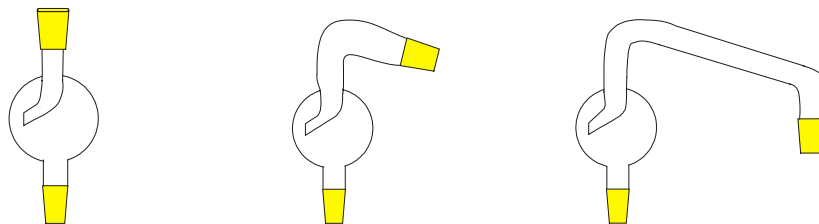
$d_{x, cieczy}$ - to gęstość cieczy badanej i cieczy odniesienia.

Nasadki destylacyjne



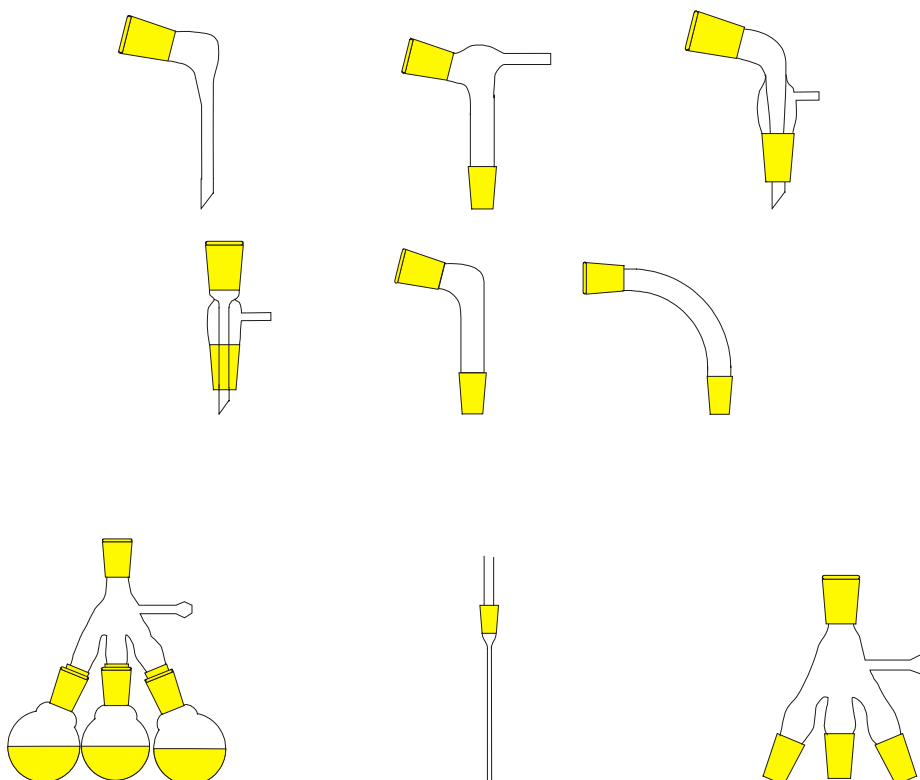
- szklane elementy służące do połączenia naczynia destylacyjnego, jakim jest kolba destylacyjna okrągłodenna z chłodnicą, nazywamy nasadkami destylacyjnymi. Mają one różne kształty w zależności od zastosowań z pojedynczym otworem dla termometru lub z dwoma otworami dla termometru i kapilary (w przypadku destylacji próżniowej) albo też wkraplacza (dla syntezy połączonej z oddestylowaniem rozpuszczalnika lub produktu).

Deflegmatory



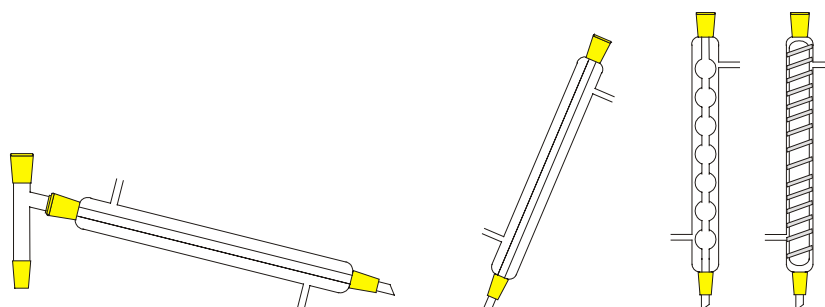
- dla cieczy, które się pienią i mają tendencje do wypryskiwania poza naczynie destylacyjne stosuje się nasadki z łapaczem kropeł (tzw. deflegmatory).

Odbieralniki, łączniki, reduktory



Zakończeniem chłodnicy jest odbieralnik który łączymy z chłodnicą – połączenia te także mają różne kształty – proste odprowadzenia (mające zapewnić aparaturze sztywność i szczelność - nie zapominając, że układ do destylacji atmosferycznej musi być układem otwartym, zabezpieczonym przed wilgocią jedynie suszką), lub bardziej wymyślne np.: z bocznym odprowadzeniem dla par wydzielających się podczas destylacji lub też podłączenia pompy próżniowej. W aparaturze destylacyjnej lub służącej do syntez, stosuje się różnego rodzaju i kształtu łączniki, które mają zapewnić jej właściwe funkcjonowanie w zależności od zastosowań; odbieralniki także muszą spełniać określone kryteria: w prostej destylacji odbieralnikiem może być zwykła kolba Erlenmeyera lub zlewka, w destylacji w której musimy zadbać o brak dostępu wilgoci czy dwutlenku węgla stosujemy układy otwarte zabezpieczone suszką z odpowiednim wypełnieniem (środki suszące tj.: chlorek wapnia, wodorotlenek sodu, chloran magnezu, sita molekularne). Innym zagadnieniem jest destylacja pod próżnią w której stosujemy układ destylacyjny działający w warunkach mocno obniżonego ciśnienia – stosujemy w nim kapilarę zapewniającą regulację wrzenia, odbieralniki kuliste (zapewniające bezpieczeństwo pracy – a w szczególności zabezpieczające przed implozją, której nie mogą przeciwstawić się naczynia płaskodenne); odbieralniki w destylacji próżniowej łączy się z chłodnicą poprzez tzw. „krówkę”, która zapewnia zmianę odbieralnika dla poszczególnych frakcji podczas destylacji, bez konieczności odizolowywania układu i wyłączenia próżni.

Chłodnice



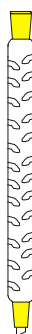
– elementami wyposażenia aparatury szklanej mającymi za zadanie odprowadzanie nadmiaru ciepła są chłodnice o różnej konstrukcji i przeznaczeniu. Na przykład do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną potrzeba chłodnic mających kanał chłodzący o kształcie zapewniającym możliwie największą powierzchnię wymiany ciepła, kanałem tym może być węzownica szklana zapewniająca zwiększenie długości kanału. Do destylacji wymaga się, aby kanał był prosty i aby nie zalegała w nim oddestylowywana ciecz. Jeżeli zachodzi potrzeba odizolowania destylatu od wilgoci atmosferycznej lub dwutlenku węgla, stosuje się suszki z odpowiednim wypełnieniem.

Suszka



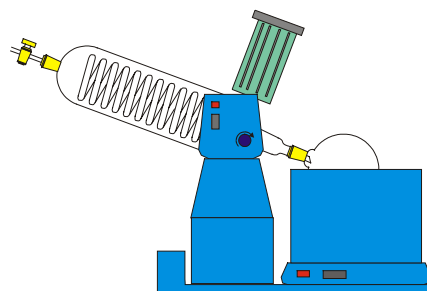
- należy zwrócić uwagę aby całe światło suszki było wypełnione absorbentem. Wypełnieniem suszki, służącym pochłanianiu wody są najczęściej: wodorotlenek sodu lub potasu, sita molekularne lub chlorek wapnia. Należy zwrócić uwagę aby wypełnienie suszki nie było zbite i aby umożliwiała swobodny przepływ powietrza.

Kolumna rektyfikacyjna



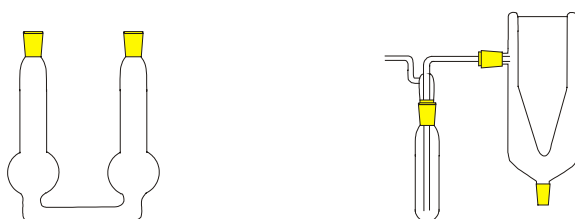
– jeżeli zachodzi potrzeba dokładnego rozdzielenia lub oczyszczeniu rozpuszczalnika stosujemy kolumny rektyfikacyjne, których zadaniem jest ustalenie równowagi para – ciecz destylowanej substancji, a co za tym idzie dokładniejsze jej oczyszczenie; stosujemy zatem kolumny z wypełnieniem (w formie drobnych kulek, paciorków, helisek lub kółek szklanych) lub też kolumny jednolite wykonane z szkła o powierzchni zwiększonej przez wewnętrzne wypustki.

Wyparka próżniowa



– jeżeli chcemy odparować rozpuszczalnik, to nie stosujemy zestawu destylacyjnego ale wyparkę próżniową, która pozwala nam proces ten przeprowadzić szybko i bez ryzyka termicznego zniszczenia substancji; proces odparowywania prowadzimy pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wymrażacz

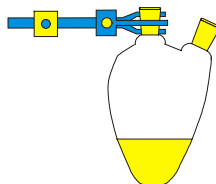


– dla związków łatwo lotnych, których pary jest trudno odzyskać w procesie destylacji stosujemy wymrażacze w których kondensacja par substancji odbywa się na powierzchni silnie schłodzonej, np. za pomocą suchego lodu lub ciekłego azotu.

Kolby dwu- i trój szyjne



– kiedy zachodzi potrzeba wkraplania lub mieszania mieszaniny reakcyjnej stosujemy kolby wieloszyjne. Kolby dwuszyjne stosujemy także wtedy, kiedy zachodzi potrzeba destylacji próżniowej i należy wprowadzić kapilarę. Kolby destylacyjne oraz inne naczynia w których prowadzi się reakcje lub ogrzewanie przymocowujemy do statywów za pomocą łapy która ma za zadanie utrzymanie jej przyłączeniu z chłodnicą; nigdy nie należy ogrzewać kolby bezpośrednio włożonej do czaszy grzewczej i nie przymocowanej łapą. Zachodzi bowiem obawa, że w razie pęknięcia którejkolwiek części szklanej, nie ma możliwości rozebrania zestawu i odsunięcia źródła ciepła;

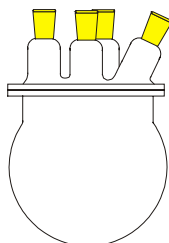


Termometr



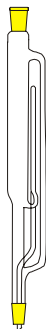
– do pomiaru temperatury służą termometry; w pracy z nimi należy pamiętać o stosowaniu termometrów z odpowiednio dobraną skalą; w razie uszkodzenia i wypłynięcia rtęci należy ją zebrać, a miejsce gdzie się rozlała posypać siarką lub cynkiem. Nie stosować termometrów do mieszania cieczy.

Reaktor laboratoryjny



– pomimo, że większość reakcji chemicznych przeprowadzamy w kolbach, do prowadzenia syntezy laboratoryjnej przeznaczone są także reaktory laboratoryjne, posiadające pokrywę przymocowaną klamrami, a połączenie pomiędzy dnem a pokrywą, realizuje się poprzez powierzchnię doszlifowaną. Zasadniczą zaletą reaktorów jest wygodniejszy dostęp do przestrzeni reakcyjnej (ma to znaczenie przy oczyszczaniu naczynia) oraz duży wybór pokryw, posiadających wiele wyjść.

Aparat do ekstrakcji Soxletha

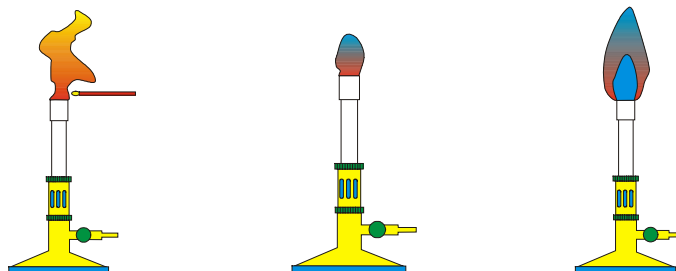


– do wydzielenia substancji z fazy stałej służy aparat Soxletha. Do komory tego aparatu wkłada się tubkę wykonaną z sączka wypełnioną substancją ekstrahowaną, od dołu podłącza się kolbę z rozpuszczalnikiem wmywającym (eluentem), a od góry chłodnicę zapewniającą zawracanie rozpuszczalnika. W czasie procesu eluent zapełnia komorę ekstrakcyjną (ustala się równowaga ekstrakcyjna). Po zapełnieniu następuje przelanie i znów napełnianie; w ten sposób substancja ekstrahowana zostaje przemieszczona do kolby z eluentem, a ten z kolei zostaje odparowany i zawraca do komory ekstrakcyjnej.

2.4.3 Sprzęt metalowy

Na pracowni laboratoryjnej wykorzystujemy dużą ilość sprzętu metalowego. Najczęściej są to metalowe łapy, połączenia, stojaki które nie stwarzają większego zagrożenia. Operujemy także palnikami, które ze względu na zastosowanie powinny być utrzymywane w dobrym stanie technicznym, a także pompkami próżniowymi. W tej części czytelnik znajdzie opis najczęściej spotykanych elementów metalowych wyposażenia pracowni.

Palnik Bunsena



-palnik służy do ogrzewania i spalania substancji. Palnik Bunsena jest w swojej konstrukcji najmniejszym i najprymitywniej skonstruowanym palnikiem. Składa się z kominka, od dołu zasilanego przez dyszę gazem, a dopływ powietrza regulowany jest cylindrowatym kołnierzem nałożonym na kominek. Dopływ gazu ograniczony jest kurkiem. W celu zapalenia palnika zamykamy dopływ powietrza, przystawiamy zapalniczkę lub zapalniczkę i otwieramy dopływ gazu (płomień jest kopcący – niecałkowite spalanie), następnie regulujemy dopływ gazu do odpowiadającej nam wielkości płomienia, a na samym końcu regulujemy dopływ gazu tak, aby płomień składał się z części redukującej (niebieska), przejściowej (czerwona) oraz utleniającej (błado niebieska – posiadająca największą temperaturę). Z uwagi na fakt, iż w laboratorium chemicznym pracujemy często z substancjami palnymi należy przestrzegać następujących zasad:

- nigdy nie należy ogrzewać substancji palnych za pomocą palnika gazowego
- wszystkie operacje z użyciem palnika (otwartego ognia) można prowadzić po uprzednim upewnieniu się że w bezpośrednim sąsiedztwie nikt nie pracuje z palnymi i lotnymi odczynnikami
- nie należy pozostawiać zapalonego palnika bez kontroli, po pierwsze z powodu możliwości zgaśnięcia płomienia, w następstwie czego dochodzi do ulatniania się gazu, po drugie ze względu na to, że płomień palnika gazowego w jasno oświetlonym pomieszczeniu jest praktycznie niewidoczny, co sprzyja wypadkom.

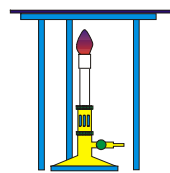
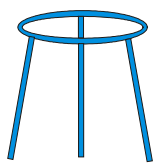
Palnik Teklu – palnik ten jest nieco większy od palnika Bunsena i można za jego pomocą uzyskiwać nieco większe temperatury (do 900°C). Różni się także konstrukcją zasilania powietrzem – w palniku Teklu dokonuje się regulacji za pomocą dużej płaskiej nakrętki osadzonej centralnie na gwincie wbudowanej w palnik.

Palnik Meckera



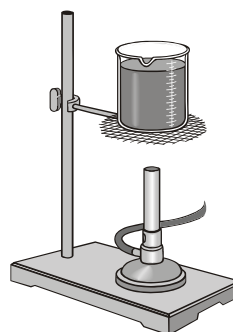
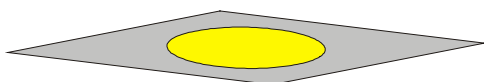
jest największym przedstawicielem stosowanych palników laboratoryjnych, a osiągnięta przez niego temperatura dochodzi do 1200°C. Jego konstrukcja różni się od poprzednich tym, że zakończenie komina stanowi siatka (stalowa lub niklowa) z jednej strony zapobiegająca przeskokowi płomienia do otworu zasilania powietrzem, z drugiej zaś dzieli płomień na dziesiątki małych, stabilnych płomyczków o dobrych parametrach spalania gazu, co zapewnia tak dużą temperaturę.

Trójnóg



– trzy punkty w przestrzeni kartezjańskiej zawsze tworzą płaszczyznę, a ta, jak wiadomo, wyklucza kiwanie się oraz inne niestabilne ruchy zagrażające naszemu szklanemu wyposażeniu. Zasada ta zapewne przyświecała twórcom trójnoga stanowiącego podstawę płytki do ogrzewania. Pomimo, że nogi trójnoga zawsze wyznaczają stabilną płaszczyznę, okrąg je trzymający może znajdować się pod kątem różnym od 0° w stosunku do płaszczyzny stołu i należy o tym pamiętać, zanim zdecydujemy się we własnym zakresie wyginać nogi trójnoga.

Siatka azbestowa i płytka metalowa

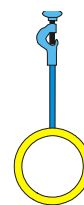


– naczyń szklanych nigdy nie należy podgrzewać bezpośrednio palnikiem (wyjątek stanowią próbki które podgrzewamy bezpośrednio, pamiętając aby nie grzać ich punktowo cały czas, tylko poruszając nimi w płomieniu i raz po raz wyjmując je z niego), ponieważ szkło mające niską wartość współczynnika rozszerzalności cieplnej, ogrzewane płomieniem, pęka. Jako medium rozpraszające w miarę równomiernie ciepło po podstawach naczyń szklanych stosujemy siatki azbestowe (z przyczyn zdrowotnych unikane na pracowniach) oraz płytki metalowe. Zaletą płytek azbestowych jest niewątpliwie lepszy i równomierniejszy rozkład ciepła na jej powierzchni; płytki metalowe mają tę wadę, że podczas długotrwałego stosowania wyginają się i stanowią niestabilne podłoże dla ogrzewanych naczyń (należy o tym pamiętać w czasie opuszczania stanowiska pracy).

Stojaki i statywy

– stanowią sprzęt służący zamocowaniu całych zestawów laboratoryjnych; składają się z pręta metalowego ($\varnothing 10 - 12$) przymocowanego do podstawy stalowej, na tyle ciężkiej aby zapewnić stabilność zmontowanych zestawów.

Łapy, kółka



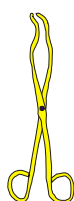
– sprzętem metalowym mającym bezpośredni kontakt ze szkłem są łapy, służące mocowaniu kolb i chłodnic oraz kółka, które utrzymują na odpowiedniej wysokości lejki czy rozdzielacze. Dokręcając śrubę łapy należy mieć na uwadze wytrzymałość mechaniczną szkła, zamocowane kolba powinna dać się jeszcze w łapie obracać, lecz nie powinna z niej wypadać. Mocując sprzęt należy także zaopatrzyć palce łapy w materiał zabezpieczający przed bezpośrednim kontaktem metalu ze szkłem, zapobiegnie to powstawaniu zarysowań na szkłe oraz powstawaniu naprężeń termicznych.

Łączniki



- łapy czy kółka należy oczywiście przymocować do statywów za pomocą łączników, zapewniających sztywność i bezpieczeństwo połączenia. Łączniki zbudowane są z bloku metalowego posiadającego odpowiednie wyżłobienia, w których umieszczone są śruby mocujące. Od stanu technicznego tych śrub zależy bezpieczeństwo połączenia, a zatem należy zwracać uwagę, czy gwinty nie są zerwane (tzn. czy śruba się nie kręci i nie zmienia położenia).

Szczypce



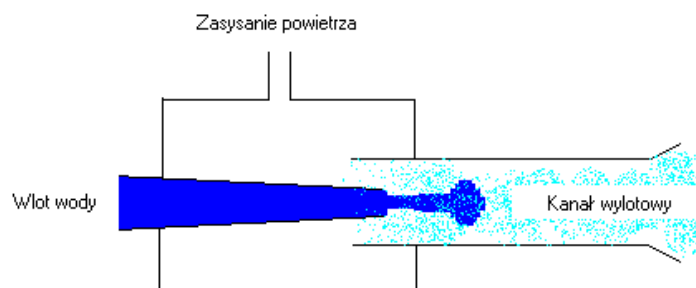
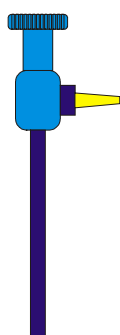
– szczypce laboratoryjne służą przenoszeniu elementów aparatury, tygli, parownic, których nie możemy przenieść przez wzgląd na ich zbyt wysoką temperaturę lub ich np.: zanieczyszczenie.

Podnośniki



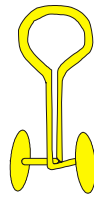
– służą umieszczaniu sprzętu grzewczego, odbieralników na zakładanej przez nas wysokości. Zasada działania podnośnika opiera się na użyciu śruby o dwóch gwintach (lewym i prawym), która umieszczona w gwintach zamocowanych na odpowiedniej konstrukcji platformach powoduje ich przemieszczanie.

Pompka wodna



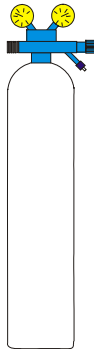
– bardzo praktycznym w zastosowaniach urządzeniem metalowym na pracowniach jest pompka próżniowa, której zasada działania opiera się na zasysaniu powietrza przez strumień wody (patrz rysunek). Istnieje również szklana wersja pompki wodnej, jednak ze względu na jej niewielką trwałość o wiele częściej spotykamy się z jej wersją metalową lub wykonaną z tworzywa sztucznego (pompka szklana jest za to stabilniejsza w działaniu).

Ściskacze



– służą zaciskaniu profilu węża elastycznego i są stosowane między innymi na wylotach butli z wodą destylowaną.

Butla stalowa na sprężone gazy



– stosuje się do przechowania zgromadzonego gazu pod dużym ciśnieniem. Na zawór butli zakłada się reduktory mające za zadanie opróżnianie butli z założonym ciśnieniem i prędkością. Nie należy samodzielnie manipulować przy butlach ze sprężonymi gazami.

2.4.4 Sprzęt elektryczny

2.4.4.1 Ogólne zasady bezpiecznej pracy na stanowiskach z prądem elektrycznym

Wszelkie urządzenia elektryczne załączać do źródła prądu dopiero po zmontowaniu i połączeniu wszystkich części połączeń (transformatory i odbiorniki prądu: czasze grzejne, mieszadła itp.).

Rozłączanie zestawów, w których wykorzystujemy prąd elektryczny rozpoczynać od odłączenia źródła zasilania prądem.

Przy stosowaniu napięcia sieciowego (220V) w obwodach prądu przemiennego:

- nie dotykać nie izolowanych części obwodu elektrycznego;
- wystrzegać się zawilgożenia elementów sprzętu elektrycznego;
- nie stosować uszkodzonych przewodów elektrycznych, zwrócić uwagę na stan wtyczek i kontaktów.

W przypadku porażenia prądem:

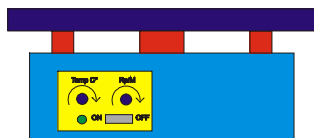
- przerwać dopływ prądu;
- w przypadku ustania oddechu zastosować pierwszą pomoc, polegającą na stosowaniu sztucznego oddychania, aż do przybycia pomocy lekarskiej.

Największe niebezpieczeństwo podczas porażenia prądem elektrycznym tkwi w fakcie skurczowego działania prądu elektrycznego na mięśnie. Szczególnie niebezpieczne jest chwytanie otwartą dłonią, gdyż podczas porażenia nie istnieje możliwość otwarcia dłoni i oderwania się od źródła porażenia.

Zalanie instalacji elektrycznej - niejednokrotnie zdarza się rozchłapywanie wody czy innych rozpuszczalników w momencie uszkodzenia aparatury laboratoryjnej lub rozłączenia przewodów zasilających chłodzące elementy aparatury, wtedy też istnieje możliwość zalania urządzeń elektrycznych, przewodów, tablicy prądu. W przypadku zalania, czy zauważenia cieczy wokół urządzeń elektrycznych pod żadnym pozorem nie wolno ich dotykać. Należy zorientować się, w jakim miejscu znajdują się najbliższe wtyczki, kontakty wyłączniki i odciąć zasilanie upewniwszy się, że nie są zawilgożone. Po odcięciu źródła zasilania prądem, należy osuszyć urządzenia elektryczne i po upewnieniu się, że nie stanowią zagrożenia można ponownie je stosować. Takie urządzenia jak czasze grzejne z wnęką azbestową czy transformatory należy pozostawić do osuszenia na parę dni, gdyż ich samodzielne osuszenie nie jest możliwe.

2.4.4.2 Ważniejszy sprzęt elektryczny stosowany w laboratorium

Czasze grzejne i piecyki elektryczne



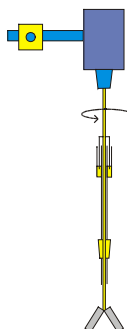
piecyk elektryczny

- są jednym z najczęściej wykorzystywanych urządzeń elektrycznych na pracowni chemicznej. W pracy z nimi należy zawsze pamiętać, że podczas korzystania mają one temperaturę mogącą powodować groźne poparzenia skóry. Urządzenia te powinny być zawsze ustawiane w taki sposób, aby manipulacje wokół nich wykluczały ich osunięcie, samoistne przemieszczenie, czy spadanie i zalanie. Naczynia stawiane na czaszach i piecykach nie mogą być zawilgożone w miejscu stykania szkła z metalem, czy azbestem, ponieważ odparowująca woda obniża punktowo temperaturę szkła (szkło jest złym przewodnikiem energii cieplnej), a różnica temperatur na powierzchni może spowodować jego pęknięcie i zalanie urządzenia elektrycznego. W momencie zalania czaszy grzejnej należy bezzwłocznie odciąć źródło zasilania prądem poprzez wyjęcie wtyczki z kontaktu. Jeżeli istnieje jednak jakiegokolwiek ryzyko, że wtyczka mogła ulec zalaniu lub zawilgożeniu, należy odciąć źródło zasilania poprzez wyłączenie prądu wyłącznikiem na tablicy zasilającej.

Transformatory - urządzenia te służą do redukcji napięcia podawanego na odbiornik prądu. Zagrożenia wynikające z ich korzystania, to przede wszystkim zalanie transformatorów cieczą i zniszczone izolatory transformatora powodujące przebicia prądu elektrycznego. Należy zwrócić uwagę przy korzystaniu z nich na stan kontaktu oraz wtyczki i na fakt, czy obudowa ich nie nosi śladów zalania.

Mieszadło magnetyczne - urządzenie to składa się z rotora magnetycznego, który w czasie obracania wywołuje wirowanie elementu magnetycznego umieszczonego w naczyniu reakcyjnym. Stosowane mieszadła magnetyczne są często zintegrowane z urządzeniem grzejnym. Przy korzystaniu z mieszadeł należy zwrócić uwagę, czy wszystkie przyciski i pokręta są na swoim miejscu. Mieszadła wyposażone w urządzenia grzejne mogą być przyczyną poparzeń.

Mieszadło mechaniczne



- w skład tego urządzenia wchodzi silnik połączony z wrzecionem mocującym mieszadło. Połączenie między wrzecionem a mieszadłem może być realizowane na dwa sposoby: bezpośrednie połączenie "na sztywno" lub poprzez elastyczne przewód. W pracy z mieszadłem mechanicznym nie należy stosować zbyt dużych prędkości rotora, gdyż niewielkie odchylenia od osi mieszadła mogą spowodować jego odkształcenie lub złamanie w przypadku mieszadeł szklanych i rozpryskiwanie się szkła (oraz, w konsekwencji, obrażenia ciała).

Pistolet do suszenia - w skład tego zestawu szklanego wchodzi urządzenie podgrzewające rozpuszczalnik organiczny do wrzenia. Zestawy współczesne posiadają kolbę z wtopioną w szkło spiralą grzejną. Podczas pracy z tym zestawem należy pilnować, aby wrzenie cieczy nie było zbyt intensywne oraz by rozpuszczalnik nie osiągnął zbyt niskiego poziomu, co mogłoby grozić przepaleniem spirali, pęknięciem jej szklanej ochrony, a w konsekwencji zniszczeniem sprzętu. Temperatura suszenia jest determinowana przez temperaturę wrzenia rozpuszczalnika.

Suszarka - to urządzenie grzewcze służy do utrzymywania temperatur w zakresie ~ 30 - $\sim 250^{\circ}\text{C}$. Z uwagi, że przeznaczeniem suszarki jest pozbywanie się śladów wody i innych rozpuszczalników z preparatów, czy suszenie naczyń szklanych i porcelanowych, należy pamiętać, że niektóre łatwo lotne rozpuszczalniki mogą spowodować eksplozję tegoż urządzenia. Do suszarki nie należy wkładać papieru (chyba, że temperatura nie przekracza 80°C - przekroczenie tej temperatury powoduje rozkład celulozy) i korków wykonanych z tworzyw sztucznych o niskich temperaturach mięknięcia. W pracy z suszarką należy pamiętać, że urządzenie to pracuje w dość szerokim zakresie temperatur i może być także przyczyną poparzeń termicznych.

Piec - piec elektryczny jest urządzeniem w którym utrzymujemy wysokie temperatury (w stosowanych najczęściej dochodzą one do 1500°C). Podstawowym zagrożeniem ze strony tych urządzeń są poparzenia termiczne, gdyż w tak wysokich temperaturach zbliżanie rąk do okna pieca powoduje szybkie ich nagrzewanie, podobnie zbliżenie twarzy może spowodować uszkodzenie termiczne oczu czy skóry. Podczas wkładania wszelkich elementów szklanych lub porcelanowych należy używać rękawic ochronnych i specjalnych szczypiec (nie gumowych lecz wykonanych ze skóry (rękawice spawalnicze), czy z grubego materiału (rękawice robocze) lub azbestu). Należy zwrócić uwagę, by wszelkie naczynia porcelanowe - łopatkę, tygły, rynienki porcelanowe, szklane oraz substancje przed włożeniem do pieca były suche, tzn. wysuszone wstępnie w suszarce pozbawione wilgoci.

Łaźnia wodna - urządzenie to stwarza wysokie niebezpieczeństwo, gdyż w komorze wypełnionej cieczą umieszczone są grzałki i czujniki temperatury, a całość jest w obudowie zawierającej instalację termostatującą, istnieje zatem ryzyko kontaktu cieczy z instalacją. Przy pracy z tym urządzeniem, należy zwrócić uwagę na to, czy z łaźni nie wycieka ciecz oraz czy pokręta i wyłączniki nie są zalane.

Wirówka - urządzenie to posiada rotor o regulowanej szybkości obrotów. Współczesne wirówki posiadają zabezpieczenia przed zalaniem cieczą oraz zabezpieczenie przed otwarciem trakcie pracy, natomiast starsze typy wirówek w trakcie pracy których można otwierać klapę komory wirowania, stwarzają niebezpieczeństwo mechanicznego uszkodzenia ciała. Zakazane jest zatrzymywanie ręką lub jakimkolwiek przedmiotami rotora - rotor po odłączeniu od źródła zasilania musi zatrzymać się sam. Należy zadbać o równomierne rozłożenie obciążenia wokół osi obrotu.

Wyparka próżniowa - jest to jedno z urządzeń elektrycznych w skład którego wchodzi także instalacja wodna. W pracy z tym urządzeniem, należy zwracać uwagę na to, by podłączenie wyparki do źródła prądu odbywało się w izolacji od wody czy pary wodnej.

Tablica prądu - składa się z gniazd elektrycznych, gniazd bezpiecznikowych, wyłącznika prądu, licznika poboru mocy. Nie należy manipulować przy tablicy prądu samodzielnie poza załączaniem i wyłączaniem prądu; niedozwolona jest również samodzielna naprawa bezpieczników. Należy zwrócić szczególną uwagę na to, by w czasie wykonywania doświadczenia ciecze nie wypryskiwały na tablicę oraz na to, by wyloty wytwornic pary wodnej nie były skierowane w ich kierunku (jest to jedno z potencjalnych źródeł zawilgocenia urządzeń elektrycznych).

Przewody zasilające i przesyłające prąd - należy zwrócić szczególną uwagę na to, czy przewód elektryczny nie jest przetarty, przegrzany oraz czy nie wystają z niego żadne metalowe druciki wchodzące w jego skład. Gniazda prądu i wtyczki przed załączeniem powinny zostać sprawdzone, czy nie są zawilgocone, pęknięte lub uszkodzone.

2.4.5 Sprzęt porcelanowy

Lejek sitowy (Buchnera) – jest przeznaczony do sączenia pod próżnią. Posiada przestrzeń zakończoną dnem dziurkowanym. Na to dno kładziemy dopasowany sączek przylegający szczelnie i dopiero wtedy umieszczamy go na kolbie ssawkowej i dokonujemy sączenia.

Łopatki



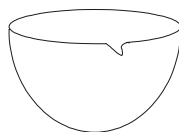
– ten sprzęt porcelanowy służy do nabierania substancji ze szkiełek oraz przenoszenia ich do naczyń docelowych.

Moździerz z tłuczkiem



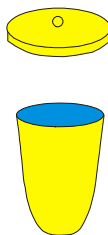
służy do rozdrabniania niewielkich ilości substancji. W moździerzu uciera się za pomocą tłuczka. Należy pamiętać jednak, że nie wszystkie substancje są odporne na ucieranie i mogą rozkładać się wybuchowo.

Parownica



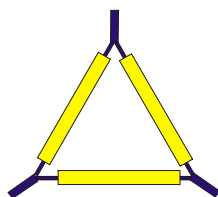
jak sama nazwa wskazuje, naczynie to służy do odparowywania rozpuszczalników (ze względu na fakt, iż parownice ogrzewa się za pomocą palnika, nie wolno odparowywać w niej rozpuszczalników palnych).

Tygiel



– służy do długotrwałej termicznej obróbki termicznej substancji w piecach, w których temperatura może dochodzić do 2000 °C (w zależności od materiału z jakiego wykonany jest tygiel). W pracy z tygłem należy pamiętać, że nie należy wkładać wilgotnego tygla do gorącego pieca, a substancje w nim się znajdujące powinny być wstępnie osuszone w temperaturze około 120 °C w celu pozbycia się wody nie związanej chemicznie (wilgotne tygły zawsze pękają). Przy wkładaniu i wyjmowaniu tygla z pieca należy używać długich szczypięć przeznaczonych do obsługi pieca (korzystanie z krótkich grozi oparzeniem termicznymi – przy temperaturach jakie utrzymujemy w piecach materiał jego ścian emitują promieniowanie podczerwone o natężeniu które jest przyczyną odczuwanych zmian ciepła).

Trójkąt do tygli



– prażenie niewielkich ilości substancji w stosunkowo krótkim czasie można dokonać korzystając z palnika laboratoryjnego. Na trójnog kładziemy wówczas trójkąt do osadzania tygli. Po prażeniu należy odczekać, aż trójkąt wystygnie i nie należy go zdejmować chwytając za metalowy drut, gdyż jest on nagrany (metale dobrze przewodzą ciepło).

3 Wybrane techniki laboratoryjne

3.1 Chromatografia

Chromatografia jest techniką analityczną i preparatywną wykorzystującą rozdzielanie mieszanin substancji na poszczególne składniki, bądź ich grupy (frakcje), dzięki różnicom w zachowaniu się tych składników w układzie dwóch faz, w których jedna nie zmienia swego położenia (faza nieruchoma, stacjonarna), druga zaś porusza się względem pierwszej w określonym kierunku (faza ruchoma, roztwór rozwijający).

3.1.1 Podział chromatografii zależnie od dominującego mechanizmu procesu rozdziału

Ze względu na mechanizm podziału wyróżniamy następujące typy chromatografii:

a. adsorpcyjną - gdy fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a nieruchomą ciało stałe o właściwościach adsorbujących i odpowiednim rozdrobnieniu (np. żel krzemionkowy, tlenek glinowy, węgiel aktywny itp.). Rozdział jest powodowany różnicami współczynników adsorpcji.

b. podziałową - gdy fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a stacjonarną - ciecz zatrzymana na odpowiednim nośniku (bibuła, ziemia okrzemkowa, kulki szklane itp.). Rozdział jest wynikiem różnic współczynników podziału.

c. jonowymienną - gdy fazą ruchomą jest ciecz, a stacjonarną wymienniacz jonowy. Rozdział zależy od różnic w sile wiązania składników przez wymienniacz.

d. żelową - gdy fazą ruchomą jest ciecz, a nieruchomą granulowany, jednorodny spęczniały żel. Rozdział jest powodowany różnicami w zdolnościach dyfundowania do cząsteczek żelu, a więc różnicami w wielkości cząsteczek składników.

3.1.2 Podział chromatografii w zależności od sposobu przeprowadzania rozdziału

Ze względu na sposób prowadzenia rozdziału wyróżniamy następujące typy chromatografii:

a. bibułową - w której fazą nieruchomą jest odpowiednio przygotowana (np. zaimpregnowana) specjalna bibuła chromatograficzna pocięta na arkusze, paski lub krążki. W pobliżu krawędzi arkusza bądź paska lub środka krążka nanosi się na tzw. punkt startowy (krople badanego roztworu), a następnie powoduje się przepływ fazy ruchomej, co prowadzi do rozdzielania składników mieszaniny (tzw. rozwijanie chromatogramu). Proces odbywa się w odpowiednim szczelnym naczyniu tzw. komorze chromatograficznej. Po zakończeniu rozwijania otrzymuje się plamy (lub pasma) chromatograficzne poszczególnych składników (lub frakcji), które uwidacznia się, np. przez przeprowadzenie reakcji barwnych (tzw. wywoływanie chromatogramu), obserwację w świetle nadfioletowym itp. Przez porównanie z analogicznie wykonanym chromatogramem mieszaniny substancji wzorcowych identyfikuje się poszczególne składniki, a przez porównanie wielkości intensywności plam uzyskuje się wyniki ilościowe.

b. cienkowarstwową - w której fazą nieruchomą nanosi się w postaci cienkiej równomiernej warstewki na płytkę szklaną, arkusik folii aluminiowej czy tworzywa sztucznego. Dalsze postępowanie jest podobne jak w chromatografii bibułowej.

c. kolumnową - kolumnę (najczęściej szklaną) wypełnia się fazą nieruchomą (adsorbentem, nośnikiem nasyconym ciekłą fazą nieruchomą, jonitem, granulowanym żelem) i na jej szczyt wprowadza badany roztwór, a następnie fazą ruchomą (eluent). Zachodzi rozdzielanie składników, które bądź pozostają w kolumnie (tworząc oddzielne pasma) lub są kolejno wymywane (elucja). W poszczególnych porcjach wycieku (eluatu) przeprowadza się oznaczenia rozdzielanych składników, np. przez miareczkowanie, pomiar refrakcji itd.

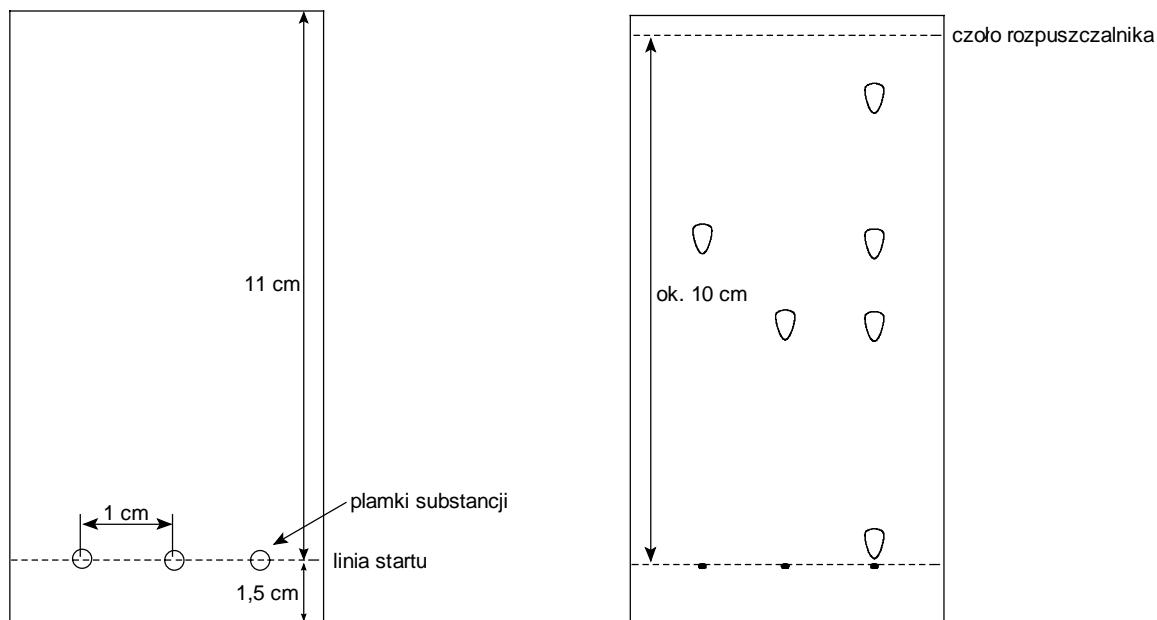
d. gazową - w której fazą ruchomą jest gaz, a faza nieruchoma jest umieszczona w kolumnie. Próbkę (gaz, ciecz) wstrzykuje się przed kolumną do strumienia przepływającego z określoną prędkością i pod określonym ciśnieniem gazu nośnego. Za kolumną znajduje się detektor czuły na zmiany składu gazu, którego sygnały są

zapisywane w postaci chromatogramu. Chromatografię gazową wykonuje się w chromatografach gazowych wyposażonych w urządzenia sterujące przepływem gazów, temperaturą pracy, różnego typu detektory itp. W ustalonych warunkach pracy czas wyjścia składnika z kolumny umożliwia jego identyfikację, a powierzchnia piku jest proporcjonalna do jego zawartości. Chromatografia gazowa jest stosowana powszechnie do celów analitycznych (chromatografia gazowa analityczna); do otrzymywania czystych substancji (chromatografia gazowa preparatywna) oraz w badaniach fizykochemicznych.

e. cieczową - w której fazą ruchomą jest ciecz przepływająca przez kolumnę sposób ciągły i pod ciśnieniem do kilkudziesięciu MPa. Wykonuje się ją w chromatografach cieczowych działających podobnie jak chromatograf gazowy.

3.1.3 Wykonanie chromatogramu cienkowarstwowego

Wykonanie chromatogramu cienkowarstwowego rozpocząć należy od przygotowania komory chromatograficznej (którą najczęściej jest zlewka przykryta szalką Petriego lub szkiełkiem zegarkowym). Na dno komory wlewamy niewielką ilość (warstwę o wysokości ok. 0,5-1 cm) rozpuszczalnika, a następnie komorę pozostawiamy na co najmniej 15 min. w celu wysycenia parami rozpuszczalnika. W przypadku rozpuszczalników trudno lotnych proces ten można przyspieszyć umieszczając we wnętrzu zlewki cylinder z bibuły filtracyjnej, przylegający do ścianek naczynia. W czasie wysycania komory przygotowujemy płytki chromatograficzne. Szerokość płytki dostosowujemy do ilości nanoszonych substancji (przyjmuje się że odstęp pomiędzy punktami startowymi powinny wynosić ok. 1 cm) pamiętając dodatkowo o zachowaniu min. 1 cm marginesów na jej brzegu. Wysokość dobieramy tak aby pomiędzy linią startu a górną krawędzią płytki był odstęp 10,5-11 cm. Płytkę wycinamy ostrymi nożyczkami uważając aby nie zarysować jej powierzchni, nie uszkodzić warstwy sorbentu na obrzeżu oraz nie dotknąć jej powierzchni palcami. Na dolnym brzegu wyciętej płytki, około 1,5 cm od krawędzi, cienkim ołówkiem rysujemy kreskę, nazywaną linią startu. Następnie na linii startu zaznaczamy punktu startowe (zachowując 1 cm odstępy pomiędzy nimi oraz od boków płytki). Na punkty startowe наносimy za pomocą kapilar rozcieńczone roztwory wzorców oraz próbki badane, starając się, aby średnica plamki nie przekraczała 5 mm. Następnie płytkę umieszczamy w pozycji pionowej, w komorze chromatograficznej uważając aby brzegi płytki nie stykały się ze ściankami naczynia i pozwalamy strefie rozpuszczalnika wędrować w górę absorbentu. Po osiągnięciu przez czoło cieczy poziomu o około 0,5 cm niższego od górnego skraju płytki rozwinięty chromatogram wyciągamy, suszymy i wywołujemy zgodnie z zaleceniami zawartymi w ćwiczeniu. Na rysunku przedstawiono przykładowy chromatogram przed i po rozwinięciu.



3.2 Analiza miareczkowa

Analiza miareczkowa polega na tym, że do roztworu oznaczanej substancji wprowadza się niewielkimi porcjami - "miareczkami" - równoważną chemicznie ilość odczynnika w postaci roztworu mianowanego, tj. roztworu o dokładnie znanym stężeniu. W celu rozpoznania momentu, w którym to wprowadzona ilość odczynnika jest równoważna chemicznie ilości składnika oznaczanego, dodaje się do miareczkowanego roztworu wskaźnika (indykatora) odpowiedniego dla danego rodzaju oznaczenia.

Moment, w którym wskaźnik zmienia barwę, nazywa się punktem końcowym miareczkowania. Zawartość oznaczanej substancji oblicza się na podstawie dokładnie zmierzonej objętości zużytego roztworu mianowanego. Istnieją także inne metody oznaczania punktu końcowego.

3.2.1 Przygotowanie do miareczkowania

1. Dokładnie umyć biuretę tak, aby woda spływała równomiernie po ściankach, nie pozostawiając kropeł. Skrupulatne przestrzeganie czystości obowiązuje w odniesieniu do wszystkich naczyń miarowych, ponieważ pozostające na ściankach krople roztworu mianowanego mogą być źródłem poważnych błędów przy odmierzaniu objętości.
2. Kran biurety po wysuszeniu należy pokryć cienką warstwą wazeliny. Nasmarowany kran powinien być przezroczysty, a nie matowy.
3. Przemycić biuretę 2-3 razy niewielkimi ilościami roztworu mianowanego, starając się przy tym, aby po każdym przemyciu roztwór wyciekł z biurety możliwie całkowicie. Tym sposobem przeciwdziała się rozcieńczeniu roztworu mianowanego wodą, pozostającą zwykle na ściankach i w końcówce biurety.
4. Umieścić biuretę w statywie w położeniu dokładnie pionowym.
5. Napełnić biuretę nieco powyżej kreski zerowej roztworem mianowanym. Roztwór można wlewać przez poprzednio przepłukany lejek, pamiętając jednak o wyjęciu lejka zaraz po nalaniu roztworu, aby w czasie miareczkowania nie spływały z niego do biurety krople roztworu. Lepiej jednak wlewać roztwór bezpośrednio z butelki, co przy odrobinie ostrożności, nie jest trudne.
6. Całkowicie usunąć powietrze z końcówki biurety, zastępując je roztworem. W biuretach z wężykiem gumowym osiąga się to przez zgięcie wężyka, skierowanie końcówki szklanej w górę i ostrożne otwarcie ściskacza, natomiast w biuretach z kranem, poprzez otwarcie kranu. Pozostawienie w rurce powietrza, które w czasie miareczkowania może się wydostać na zewnątrz, grozi błędem kilku dziesiątych cm^3 przy odczycie objętości.
7. Doprowadzić poziom roztworu w biurecie dokładnie do kreski zerowej, wylewając nadmiar roztworu do podstawionego naczynia. Jeśli na końcu biurety pozostaje jeszcze kropla roztworu, usunąć ją przez dotknięcie ścianki tegoż naczynia.
8. Każde miareczkowanie zaczynać od poziomu zerowego. W ten sposób unika się pomyłek w odczytach objętości oraz zmniejsza się błędy wynikające z niedokładności podziałki.

3.2.2 Miareczkowanie

1. Nie wylewać roztworu z biurety zbyt szybko, ponieważ łatwo zdarzyć się może „przemiareczkowanie”, a przy tym pewna ilość cieczy pozostanie na ściankach biurety, skutkiem czego objętość zużytego roztworu będzie pozornie większa. Roztwór powinien wypływać z biurety kroplami (a nie strumieniem) z jednakową szybkością (3-4 krople na sekundę).
2. Szybkość wypływu cieczy z biurety oraz objętość kropli zależy od wielkości otworka w końcówce. Aby określić objętość jednej kropli, należy wypuścić z biurety 100 krople roztworu i na podstawie zmiany położenia menisku określić ich objętość sumaryczną. Następnie podzielić otrzymaną objętość przez 100 i otrzymuje się objętość jednej kropli.
3. Całość miareczkowania przeprowadzić przy jednorazowym napełnieniu biurety. Nie dopełniać biurety w trakcie miareczkowania.

Uwaga! W trakcie sporządzania roztworów mianowanych naważka analityczna nie musi być równa obliczonej teoretycznie masie substancji potrzebnej do przygotowania roztworu. Do obliczeń stosujemy rzeczywistą (naważoną) masę substancji.

4 Ćwiczenie 1

4.1 Równowagi w roztworach elektrolitów – wstęp teoretyczny

4.1.1 Elektrolity, dysocjacja elektrolityczna

Wartości ciśnienia osmotycznego, prężności pary nad roztworem lub też obniżenia temperatury topnienia, mierzone dla roztworów kwasów, zasad czy też soli, są większe niż wielkości wyliczone z praw Roulta i van't Hoffa. Ponieważ wartości te zależą tylko od ilości niezależnych cząsteczek znajdujących się w danej objętości roztworu (tzw. *wielkości koligatywne*) wnioskować można, że cząsteczki powyższych związków ulegają, pod wpływem rozpuszczalnika, rozpadowi na większą ilość niezależnych fragmentów. Proces ten nazywamy dysocjacją elektrolityczną, powstające fragmenty jonami (naładowane dodatnio – kationami, ujemnie – anionami).

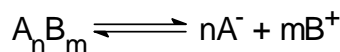
W silnie rozcieńczonych roztworach soli typu AB (np.: NaCl, KCl, AgNO₃) wielkości koligatywne są około dwukrotnie większe niż oczekiwane, w roztworach soli typu A₂B lub AB₂ (np.: Na₂SO₄, CaCl₂) trzykrotnie większe itd. Zależności te są słuszne dla roztworów mocnych elektrolitów, w których równowaga dysocjacji przesunięta jest bardziej w stronę jonów. Do elektrolitów mocnych należą wszystkie sole, kwasy i zasady w których przeważa jonowy charakter wiązania między wodorem lub metalem a resztą wodorotlenową lub kwasową. Mocne elektrolity, w odróżnieniu od elektrolitów słabych, dobrze przewodzą prąd elektryczny. W roztworach o dużym stężeniu silne elektrolity pozostają nadal całkowicie zdysocjowane na jony, jednakże, na skutek oddziaływań międzyjonowych powodujących ograniczenie swobody ruchów, zauważa się zmniejszenie właściwości koligatywnych jonów. Sprawia to wrażenie niepełnej dysocjacji mocnych elektrolitów, efekt ten nazywa się pozornym stopniem dysocjacji. Jest to wynik tworzenia się par i trójek jonowych (⊕⊖; ⊕⊖⊕; ⊖⊕⊖).

Pozorne stałe dysocjacji prezentuje Tabela 1. Wpływ stężenia na dysocjację kwasu octowego, będącego słabym elektrolitem jest zaniedbywalny, jednakże wyraźnie widoczny dla roztworów silnych elektrolitów: KCl i MgSO₄.

Tabela 4. Stała dysocjacji kwasu octowego i pozorne stałe dysocjacji chlorku potasu i siarczanu magnezu

Elektrolit	Stężenie [mol*dm ⁻³]			
	0,0001	0,001	0,01	0,1
CH ₃ COOH	1,3*10 ⁻⁵	1,5*10 ⁻⁵	1,7*10 ⁻⁵	1,7*10 ⁻⁵
MgSO ₄	2,3*10 ⁻³	6,0*10 ⁻³	13,3*10 ⁻³	33,3*10 ⁻³
KCl	1,3*10 ⁻²	4,5*10 ⁻²	15,1*10 ⁻²	53,5*10 ⁻²

Zjawisko dysocjacji jest procesem równowagowym, możemy zatem wyrazić je ilościowo za pomocą stałej dysocjacji, oznaczanej symbolem K_D lub K.



Dla powyższego procesu równanie na wartość K przyjmuje następującą formę:

$$K_D = \frac{[A^-]^n [B^+]^m}{[A_n B_m]}$$

Wartość K_D wyznaczona dla stężonych roztworów mocnych elektrolitów, odbiegająca od wartości rzeczywistej, nosi nazwę pozornej stałej dysocjacji.

Wartość K wyraża się często jako pK, czyli ujemny logarytm dziesiętny z wartości K. Wprowadza się ponadto pojęcie *stopnia dysocjacji* (α), zdefiniowanego jako stosunek ilości cząsteczek zdysocjowanych (n_d) do początkowej ilości cząsteczek (n).

$$\alpha = \frac{n_d}{n}$$

Dla elektrolitów których dysocjacja przebiega wielostopniowo wprowadza się dodatkową wielkość, zwaną *ogólną stałą dysocjacji*, będącą iloczynem kolejnych wartości K_D, opisujących kolejne etapy jonizacji molekuly.

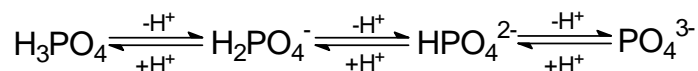
W roztworach słabych elektrolitów, np. postaci HA, zdysocjowanych w stopniu α , z C_0 moli związku powstaje $C_0\alpha$ moli jonów H^+ i tyle samo anionów A^- . Reszta, wyrażona jako $C_0 - C_0\alpha$, stanowi kwas niezdisocjowany. Po podstawieniu powyższych wartości do równania na stałą równowagi K_D , otrzymujemy zależność, zwaną *prawem rozcieńczeń Ostwalda*:

$$K_D = \frac{C_0\alpha * C_0\alpha}{C_0 - C_0\alpha} = \frac{C_0\alpha^2}{1 - \alpha} \approx C_0\alpha^2$$

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_D}{C_0}}$$

Jak widać, stopień dysocjacji słabego elektrolitu zależy przede wszystkim od wartości stałej dysocjacji i stężenia. Analogiczne rozważania prowadzi się dla roztworów słabych zasad. Wartość α jest kryterium podziału elektrolitów ze względu na ich moc; do elektrolitów mocnych zalicza się te, których stopień dysocjacji w roztworze o stężeniu 0,1 M jest większy niż 90% ($K_D > 10$), elektrolity słabe charakteryzują się stopniem dysocjacji mniejszym niż 0,1% ($K_D < 10^{-4}$), pozostałe zalicza się do elektrolitów średniej mocy.

Pamiętać należy jednak, iż w przypadku większości elektrolitów ulegających dysocjacji z wytworzeniem więcej niż dwóch jonów, proces ten jest wieloetapowy i jego opis przy użyciu jednej wartości K jest niemożliwy. Przykładem związku ulegającego kilkustopniowemu rozpadowi na jony może być kwas fosforowy(V).



Wartości K_1 , K_2 i K_3 wyrażają się odpowiednio wzorami:

$$K_{D1} = \frac{[H^+] * [H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} = 7,6 * 10^{-3}$$

$$K_{D2} = \frac{[H^+] * [HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 6,2 * 10^{-8}$$

$$K_{D3} = \frac{[H^+] * [PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} = 1,0 * 10^{-12}$$

Stężenia poszczególnych form (dla roztworu 0,1 mola kwasu fosforowego(V) w 1 dm³) wynoszą zatem: $c[H_3PO_4] = 0,0759 \text{ mol} * \text{dm}^{-3}$, $c[H_2PO_4^-] = 0,0240 \text{ mol} * \text{dm}^{-3}$, $c[HPO_4^{2-}] = 6,19 * 10^{-7} \text{ mol} * \text{dm}^{-3}$, $c[PO_4^{3-}] = 2,58 * 10^{-17} \text{ mol} * \text{dm}^{-3}$. Różnice w wartościach kolejnych stałych dysocjacji wynikają z kilku czynników:

- energia potrzebna na oderwanie protonu z fragmentu naładowanego ujemnie (anion) jest większa niż niezbędna do oderwania go z obojętnej cząsteczki;
- powstałe w poprzednich stadiach dysocjacji protony wpływają na stan równowagi, przesuwając go w lewo (głównym źródłem jonów H^+ w roztworach kwasów wieloprotonowych jest pierwszy stopień dysocjacji)
- inny jest czynnik statystyczny, opisujący prawdopodobieństwo oderwania kolejnego protonu od już zdeprotonowanej cząsteczki.

Dla zasad i innych elektrolitów charakteryzujących się kilkoma stopniami dysocjacji można przeprowadzić rozumowanie analogiczne.

4.1.2 Aktywność i współczynnik aktywności

Jak wspomniano, na skutek różnorodnych procesów, takich jak przyciąganie jonów różnoimiennych, tworzenie się par i trójek jonowych czy hydratacji, roztwór mocnego elektrolitu zachowuje się tak, jakby jego stężenie było mniejsze od rzeczywistego. To zmniejszone, efektywne stężenie jonów w roztworze, określa się mianem *aktywności* a_i . Parametr ten jest zależny od stężenia. Wraz z rozcieńczaniem roztworu jego wartość zbliża się do rzeczywistego stężenia, w roztworze nieskończenie rozcieńczonym obie te wartości są sobie równe.

W roztworach bardzo stężonych, w których, na skutek rozbijania przez jony elektrolitu asocjacji wody, aktywność cząsteczek wody wzrasta, aktywność elektrolitu może być większa od jego rzeczywistego stężenia. Stosunek aktywności (a) do stężenia (c) i-tego jonu nazywamy współczynnikiem aktywności (f).

$$f_i = \frac{a_i}{c_i}$$

Aktywność jonów zależy również od obecności innych indywidualów naładowanych w roztworze. Elektrolity typu AB (KCl, AgNO₃) w identyczny sposób wpływają na aktywność innych jonów w roztworze, natomiast wpływ jonów o wyższym ładunku jest znacznie większy. Wpływ wszystkich jonów obecnych w roztworze wyraża wielkość zwaną *siłą jonową* (a – aktywność jonu, c – stężenie jonu, z – ładunek jonu).

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

Z powyższej zależności wyprowadzić można wartość współczynnika aktywności:

$$\log f_i = -0,509 z_i^2 \sqrt{I}$$

Na podstawie pomiarów fizykochemicznych, prowadzonych dla roztworów elektrolitów (potencjały elektrod, przewodnictwo) wyznaczyć możemy jedynie średni współczynnik aktywności elektrolitu, związany z aktywnościami poszczególnych jonów:

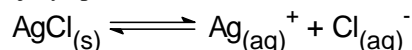
$$(f_{\pm})^{m+n} = f_+^m f_-^n$$

gdzie f_+ i f_- oznaczają współczynniki aktywności kationu i anionu elektrolitu A_mB_n.

4.1.3 Iloczyn rozpuszczalności, efekt solny, efekt wspólnego jonu

W roztworach mocnych elektrolitów, których cząsteczki są całkowicie zdysocjowane, nie możemy stosować prawa działania mas (mianownik w równaniu na stałą równowagi wynosi zero, zatem wielkość ta traci sens fizyczny), jednakże, w pewnych warunkach, a mianowicie dla nasyconych roztworów słabo rozpuszczalnych soli znajdujących się w stanie równowagi z osadem, prawo działania mas może być stosowane.

Rozważmy proces rozpuszczania chlorku srebra w wodzie. Proces dysocjacji (dla układu w stanie równowagi) przedstawia się w następujący sposób:



W nasyconych roztworach trudno rozpuszczalnych soli prawo zachowania mas zachowuje swoje znaczenie i w przypadku powyższego równania ma postać:

$$K_D = \frac{[\text{Ag}^+][\text{Cl}^-]}{[\text{AgCl}]}$$

Ponieważ wartość K i stężenie chlorku srebra w osadzie jest stałe iloczyn stężeń jonów zdefiniować możemy jako nową stałą, zwaną *iloczynem rozpuszczalności L*:

$$L_{\text{AgCl}} = [\text{Ag}^+][\text{Cl}^-] * f_{\text{Ag}^+} * f_{\text{Cl}^-}$$

Zależność ta mówi, że w nasyconym roztworze soli trudno rozpuszczalnej iloczyn stężeń produktów dysocjacji pozostaje stały. Dla soli o wzorze ogólnym A_nB_mC_o... powyższy wzór przyjmuje postać:

$$L = [A]^n [B]^m [C]^o \dots * f_A^m * f_B^n * f_C^o * \dots$$

Dla AgCl rozpuszczalność wynosi 1,1*10⁻⁵ mol*dm⁻³, zatem L=1,2*10⁻¹⁰. W większości przypadków wartości f możemy przyjąć za równe 1.

W przypadku w którym iloczyn stężeń jonów powstałych na skutek dysocjacji związku, jest równy iloczynowi rozpuszczalności mówimy o roztworze nasyconym. Jeśli wartość ta jest wyższa od wartości L mamy do czynienia z roztworem przesyconym. Układy przesycone są niestabilne energetycznie dlatego też mają skłonność, bądź to pod wpływem czynników zewnętrznych (mieszanie, wahania temperatury) bądź spontanicznie, do „usuwania” nadmiaru rozpuszczonej substancji z roztworu. Proces ten nazywamy krystalizacją lub strącaniem. W pierwszym przypadku wydzielanie związku z roztworu przebiega względnie powoli, z wytworzeniem poprawnie zdefiniowanych kryształów substancji. Ma miejsce na ogół w przypadku związków dobrze rozpuszczalnych w danym rozpuszczalniku. Strącanie jest procesem bardziej gwałtownym; wydzielona substancja ma często charakter bezpostaciowy lub koloidalny, czasami drobnokrystaliczny. Proces ten obserwujemy najczęściej w przypadku związków o niewielkiej rozpuszczalności oraz w roztworach bardzo silnie przesyconych.

Rozpuszczalność trudno rozpuszczalnych soli w roztworach elektrolitów jest inna niż w czystej wodzie. Rozważyć należy dwa przypadki:

- elektrolit posiada jon(y) wspólne z osadem

Konieczność zachowania stałej wartości iloczynu rozpuszczalności L , niezależnie od środowiska, pociąga za sobą w tym przypadku zmniejszenie rozpuszczalności soli trudno rozpuszczalnej. Prześledźmy to na przykładzie rozpuszczania $AgCl$ w 1 M roztworze KCl . Stężenie jonów chlorkowych w roztworze jest równe sumie stężeń KCl i $AgCl$, zatem:

$$L_{AgCl} = [Ag^+] \{ [Cl^-]_{AgCl} + [Cl^-]_{KCl} \} = [Ag^+]^2 + [Ag^+] [Cl^-]_{KCl} = [Ag^+]^2 + [Ag^+] * 1$$

$$[Ag^+] = [AgCl] = 1,2 * 10^{-10} M$$

Zjawisko to nosi nazwę *efektu wspólnego jonu*.

- elektrolit nie posiada jonów wspólnych z osadem

Wprowadzenie do roztworu soli trudno rozpuszczalnej, znajdującego się w równowadze z osadem, elektrolitu z którym nie posiada ona wspólnych jonów, pociąga za sobą wzrost jej rozpuszczalności. Efekt ten wynika ze zmiany siły jonowej roztworu, a co za tym idzie, współczynników aktywności, co pociąga za sobą zmianę stężeń jonów. Załóżmy, że do układu $AgCl_{(s)}/AgCl_{(aq)}$ wprowadzamy KNO_3 , osiągając stężenie 1 M. Siła jonowa tego roztworu wynosi zatem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 = \frac{1}{2} (c_{K^+} z_{K^+}^2 + c_{Cl^-} z_{Cl^-}^2) = 1M$$

Współczynnik aktywności jonów w takim roztworze jest mniejsza niż pod nieobecność elektrolitu i wynosi:

$$f_{Ag^+} = f_{Cl^-} = 10^{-0,509 z^2 \sqrt{I}} = 0,3$$

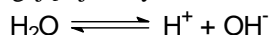
Wartość iloczynu rozpuszczalności musi pozostać stała, zatem wzrosnąć muszą stężenia jonów srebrnych i chlorkowych w tym układzie.

$$[Ag^+] = [Cl^-] = \sqrt{\frac{L_{AgCl}}{f_{Ag^+} * f_{Cl^-}}} = 3,6 * 10^{-5}$$

Zjawisko to nosi nazwę *efektu solnego*.

4.1.4 Iloczyn jonowy wody, wykładnik stężenia jonów wodorowych

Dla reakcji dysocjacji wody przebiegającej w myśl równania:



możemy oczywiście zapisać wzór na stałą dysocjacji (pamiętać należy że jon H^+ występuje w formie indywiduów hydratowanych, tzw. *jonów hydroniowych*, o strukturach odpowiadających stechiometrii H_3O^+ czy H_9O_4^+):

$$K_D = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$$

wartość K wynosi około $1,80 \cdot 10^{-16}$, co przy podstawieniu za $c[\text{H}_2\text{O}] = 55,4$ (stężenie „wody w wodzie”, obliczone po podstawieniu do wzoru na stężenie molowe, masy 1 dm^3 wody i jej masy molowej) daje nam wartość licznika powyższego ułamka:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1,00 \cdot 10^{-14}$$

wielkość ta nazywana jest *iloczynem jonowym wody*, obrazującym stan równowagi pomiędzy uwodnionym jonem wodorowym a jonem wodorotlenowym i nie zależy od tego, czy mamy do czynienia z czystą wodą, czy też z roztworami elektrolitów (oczywiście w zakresie stężeń, w którym wpływu na stężenie tych jonów nie zaczynają mieć inne procesy, i w którym stężenie wody nie różni się bardzo od wartości $55,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wielkość tego iloczynu zależy silnie od temperatury i przyjmuje wartość $0,13 \cdot 10^{-14}$ w 0°C , $1,00 \cdot 10^{-14}$ w 25°C osiągając $4,8 \cdot 10^{-13}$ w temperaturze wrzenia wody.

Charakterystyczne właściwości kwasów i zasad są zależne od ich cech donorowo-akceptorowych, a ich miarą jest stała dysocjacji. Dysocjacja kwasów jest więc źródłem jonów wodorowych w roztworze, zasad zaś, źródłem anionów wodorotlenowych. Miarą kwasowości bądź zasadowości roztworu jest stężenie tych jonów, zależne od mocy kwasu (zasady) i ich stężenia. Stężenia jonów wodorotlenowych i wodorowych w układach wodnych są ze sobą sprzężone, zatem aby je wyrazić, wystarczy podać wartość jednego z nich. Przyjęło się za miarę kwasowości (zasadowości) roztworu podawać wartość stężenia kationów H^+ . Stężenia jonów OH^- obliczyć można dzieląc iloczyn jonowy wody przez stężenie jonów wodorowych:

$$[\text{OH}^-] = \frac{1 \cdot 10^{-14}}{[\text{H}^+]}$$

Roztwory z przewagą jonów H^+ nazywamy kwaśnymi, z przewagą OH^- zasadowymi. Aby ułatwić operowanie wartościami stężeń, $c[\text{H}^+]$ przyjęło się podawać w formie ujemnego logarytmu dziesiętnego i oznaczać jako pH (wykładnik stężenia jonów wodorowych):

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

Z własności logarytmów obliczyć można łatwo wykładnik stężenia jonów wodorotlenowych, pOH :

$$\text{pOH} = -\log_{10}\left(\frac{1 \cdot 10^{-14}}{[\text{H}^+]}\right) = -\log_{10} 10^{-14} + \log_{10}[\text{H}^+] = 14 - \text{pH}$$

Roztwory o $\text{pH} < 7$ nazywamy kwaśnymi, $\text{pH} = 7$ – obojętnymi, $\text{pH} > 7$ – zasadowymi. Pamiętać należy, iż stosuje się to wyłącznie do roztworów o temperaturze 25°C .

Powyższe rozważania dotyczą stężeniowej wartości pH . Wartość termodynamiczna jest mniejsza od stężeniowej o logarytm dziesiętny ze współczynnika aktywności jonów wodorowych. Pominięcie tego efektu nie rzutuje zazwyczaj na wynik pomiaru, gdyż w zakresie siły jonowej od 0 do 0,5 wartość $\log f$ nie przekracza 0,10.

4.1.5 Wskaźniki kwasowo-zasadowe, pehametr.

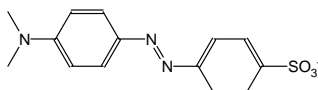
Najprostszy, a w skutek tego najczęściej używany sposób pomiaru pH polega na stosowaniu wskaźników. Pomiar ten obarczony jest dużą niedokładnością, wynoszącą ok. 1 jednostki pH (w szczególnych przypadkach 0,2 jednostki). Wskaźniki (indykatory) są to związki organiczne, charakteryzujące się zdolnością

do zmiany barwy pod wpływem kwasu lub zasady. Budowa związków z tej grupy jest różnorodna. Ich cechą wspólną jest to, że w roztworach wodnych ulegają dysocjacji kwasowej bądź zasadowej i są słabymi elektrolitami. Równanie ogólne dysocjacji indykatorów ma postać:

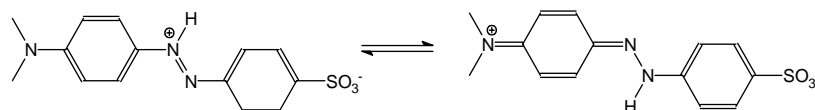


gdzie HIn i In⁻ oznaczają odpowiednio formę kwasową i zasadową wskaźnika. Samemu procesowi dysocjacji rzadko towarzyszy zmiana barwy, jednakże dla złożonych cząsteczek organicznych protonowanie/deprotonowanie związane jest z silnymi zmianami elektronowymi, konformacyjnymi czy też strukturalnymi cząsteczki. Prześledźmy te procesy na przykładzie dwóch najczęściej stosowanych indykatorów: fenoloftaleiny i oranżu metylowego.

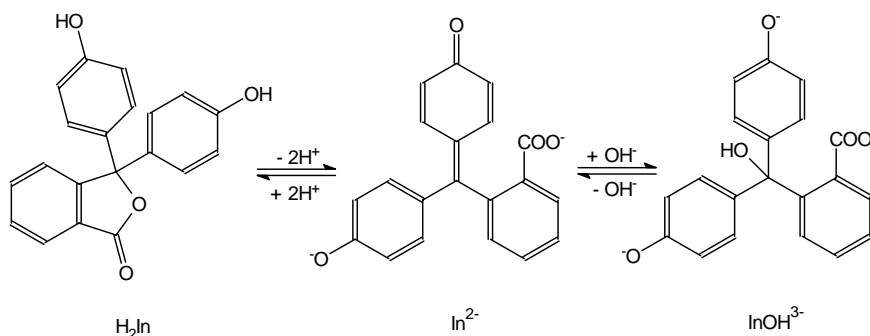
Oranż metylowy, przedstawiciel wskaźników dwubarwnych, występuje w środowisku zasadowym w postaci żółtego anionu (In⁻) o wzorze:



w środowisku kwaśnym następuje przyłączenie protonu i powstaje czerwony produkt (HIn) o strukturze:



Fenoloftaleina, która jest bezbarwna w roztworze kwaśnym, a czerwona w roztworach zasadowych jest wskaźnikiem jednobarwnym. Oprócz reakcji protonowania/deprotonowania, ulegać może reakcji przyłączania jonu OH⁻, co powoduje jej odbarwienie (z procesem tym możemy mieć do czynienia w roztworach silnie zasadowych). Zmiany barwy są następstwem następujących reakcji:



Stała równowagi procesów protonowania wskaźników ma postać:

$$K_{In} = \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]}$$

O zabarwieniu roztworu decyduje stosunek stężeń obu postaci wskaźnika.

$$\frac{[In^-]}{[HIn]} = \frac{K_{In}}{[H^+]}$$

Dla różnych wskaźników, w zależności od barw obu form, ich intensywności, stosunek ten, decydujący o zmianie barwy roztworu, może być różny. Zwykle przyjmuje się że gdy [In⁻]/[HIn] jest większy niż 1:10, roztwór ma barwę formy kwasowej, w zakresie od 1:10 do 10:1 barwę mieszaną, która przy stosunku 10:1 przechodzi w barwę postaci zasadowej. Zmiana stosunku stężeń z 1:10 na 10:1 wiąże się ze stukrotną zmianą stężenia jonów wodorowych, musi wynikać zatem ze zmiany pH o dwie jednostki. Na podstawie powyższych zależności dla wskaźników dwubarwnych wyprowadzić można równanie na zakres pH przy którym następuje zmiana barwy:

$$pH = pK_{In} + \log_{10} \frac{[In^-]}{[HIn]}$$

Jak widać, wartość ta zależy tylko od stosunku stężeń przy którym następuje zmiana barwy, nie zależy natomiast od ilości dodanego indykatora. Dla wskaźników jednobarwnych równanie powyższe ma następującą postać:

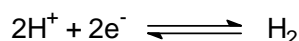
$$pH = pK_{in} + \log_{10} \frac{[In^-]}{[HIn]} = pK_{in} + \log_{10} \frac{[In^-]}{C_{in} - [In^-]}$$

gdzie C_{in} oznacza początkowe stężenie wskaźnika. Stężenie formy anionowej jest znacznie mniejsze od początkowego stężenia indykatora, zależność powyższą można zatem uprościć.

$$pH = pK_{in} + \log_{10} \frac{[In^-]}{C_{in}} = pK_{in} + \log_{10} [In^-] - \log_{10} C_{in}$$

Jak widać, wartość pH przy którym zaczyna się zmieniać barwa roztworu zależy w tym przypadku od ilości wprowadzonego wskaźnika, należy zatem, stosując indykatory jednobarwne, starać się wprowadzać tę samą ilość indykatora do roztworu. Na zakres zmiany barwy wpływać będzie oczywiście również aktywność jonów H^+ , wynikająca z obecności elektrolitów obojętnych w układzie.

Do dokładniejszych pomiarów pH stosuje się pomiary pehametryczne, wykonywane za pomocą pehametrów. Istotą ich działania jest pomiar różnic potencjału, a zatem siły elektromotorycznej ogniwa, pomiędzy elektrodami z których jedna jest wrażliwa na stężenie jonów wodorowych. Jako podstawową elektrodę pomiarową stosuje się elektrodę wodorową, zbudowaną z blaszki platynowej zanurzonej w badanym roztworze, omywanej przez strumień gazowego wodoru pod ściśle określonym ciśnieniem. Powstający potencjał jest efektem reakcji utleniania-redukcji zachodzącej na tej elektrodzie:



który jest określony równaniem Nernsta:

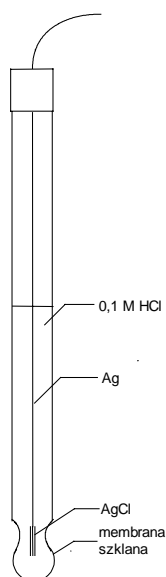
$$E = E^0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{(a_{H^+})^2}{a_{H_2}}$$

gdzie: R - stała gazowa, T - temperatura, F - stała Faradaya, a_i - aktywności wodoru i jonów wodorowych, E^0 - potencjał normalny elektrody wodorowej wynoszący, niezależnie od temperatury $E^0=0$.

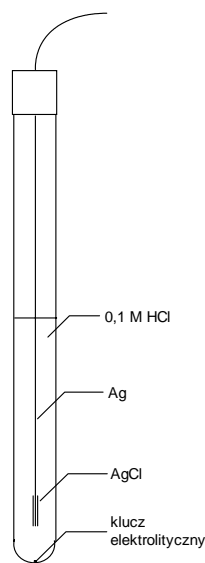
Przy stałym ciśnieniu gazowego wodoru, wynoszącym 10^5 Pa zależność powyższa ulega uproszczeniu:

$$E = E^0 + \frac{RT}{2F} \ln(a_{H^+})^2 = \frac{RT}{F} \ln a_{H^+} = \frac{2,303 * RT}{F} \log_{10} a_{H^+} = - \frac{2,303 * RT}{F} pH$$

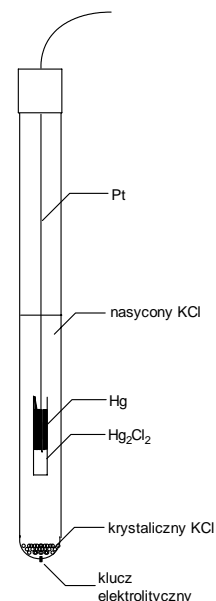
Potencjał elektrody analitycznej mierzy się względem standardowej elektrody wodorowej, zbudowanej w analogiczny sposób, przy czym blaszka platynowa w układzie odniesienia umieszczona jest w 1M roztworze HCl. Analityczna elektroda platynowa wykazuje liniową zależność potencjału od pH. Stosowanie elektrod wodorowych do pomiaru pH jest kłopotliwe ze względu na konieczność używania gazowego wodoru. Jako elektrodę pomiarową stosuje się obecnie najczęściej elektrodę szklaną, zbudowaną z rurki ze szkła o ściśle określonym składzie, zakończonej cieniutką szklaną membraną. Wewnątrz elektrody szklanej znajduje się drut srebrny pokryty warstwą chlorku srebra, zanurzony w 0,1 M roztworze HCl. Potencjał półogniwa wewnętrznego ($Ag | AgCl | HCl$) jest zatem stały (wynosi 0,222V). Zmiany potencjału całej elektrody szklanej wynikają ze zmian potencjałów na granicach faz roztworu i membrany szklanej. Powierzchniowa faza membrany w kontakcie z roztworem wodnym ulega hydratacji i przebiegają w niej procesy wymiany jonowej między szkłem a roztworem oraz dyfuzja jonów H^+ wewnątrz hydratowanej części membrany. Jej zaletą jest łatwość użycia i niewrażliwość na obecność innych substancji w roztworze. Elektrodą odniesienia jest najczęściej elektroda kalomelowa lub chlorosrebrowa. Budowa tej drugiej jest taka sama jak półogniwa wewnętrznego elektrody szklanej. Nasycona elektroda kalomelowa zbudowana jest a drutu platynowego, zapewniającego kontakt elektryczny, zanurzonego w kropli rtęci pokrytej warstwą Hg_2Cl_2 , będącej w kontakcie z 1M lub nasyconym roztworem KCl. Potencjał normalny wynosi odpowiednio 0,2800V lub 0,2415 V. Kontakt elektrolitu ze środowiskiem odbywa się przez wtopiony w szkło klucz elektrolityczny, zbudowany z włókna azbestowego nasyconego roztworem KCl.



ELEKTRODA SZKLANA



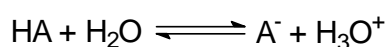
ELEKTRODA CHLOROSREBROWA



ELEKTRODA KALOMELOWA

4.1.6 Roztwory buforowe

Jeżeli zmieszymy ze sobą dwa roztwory, jeden zawierający słaby kwas HA drugi sprzężoną z nim zasadą A^- , to równowagę w tym układzie określa reakcja:



Stałą równowagi powyższej reakcji jest stała dysocjacji kwasowej kwasu HA, równa:

$$K_D = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}$$

Z powyższego wyrażenia wynika, że pH roztworu zależy od stężenia kwasu i sprzężonej z nim zasady:

$$pH = pK_D + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_D + \log_{10} \frac{C_A}{C_{HA}}$$

Wykładnik stężenia jonów wodorowych w tak przygotowanym roztworze obliczyć można przyjmując za stężenie kwasu oraz sprzężonej z nim zasady wartości równe stężeniom początkowym składników (obniżenie stężenia HA i A^- na skutek dysocjacji elektrolitycznej można zaniedbać z powodu niewielkich wartości pK_D dla słabych kwasów i zasad). Przykładem układów o których mowa są roztwory słabego kwasu (np.: CH_3COOH , H_3BO_3) i jego soli (np.: CH_3COONa , $Na_2B_4O_7$) lub słabej zasady (np.: $NH_3(aq)$) i jej soli (np.: NH_4Cl). Roztwór o takim składzie nazywamy *roztworem buforowym*. Cechą roztworów buforowych jest zdolność utrzymywania stałego pH roztworu, niezależnie od dodania niewielkich ilości kwasu lub zasady bądź też umiarkowanego rozcieńczenia roztworu. Mechanizm działania buforu jest prosty. Jeśli do roztworu dodamy substancji zawierającej jony wodorotlenowe, to przereagują one z cząsteczkami kwasu wchodzącego w skład buforu z wytworzeniem sprzężonej z nim zasady i wody. Stężenie jonów wodorowych pozostanie więc praktycznie stałe. Podobnie, dodanie do roztworu buforowego kwasu spowoduje wiązanie jonów wodorowych z jonami (cząsteczkami) obecnej w buforze zasady i wytworzenie sprzężonego z nią kwasu, co z kolei zapobiegnie dużej zmianie pH. Na przykład, pH roztworu buforowego, zawierającego 0,5 mola octanu sodu i 0,5 mola kwasu octowego w litrze wynosi 4,768. Dodanie do tej objętości 1 cm^3 1M HCl lub NaOH spowoduje zmianę pH o 0,002 jednostki. Ta sama ilość kwasu solnego lub wodorotlenku sodu dodana do litra wody spowoduje zmianę pH o 4 jednostki (z 7,0 odpowiednio na 3,0 i 11,0). Zdolność buforu do przeciwdziałania zmianie pH wywołanej

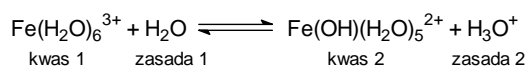
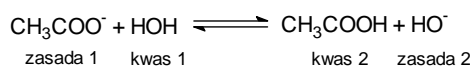
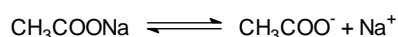
dodaniem kwasu lub zasady wyraża się poprzez *pojemność buforową*, zdefiniowaną jako stosunek stężenia dodanego kwasu lub zasady do zmiany pH:

$$\beta = \frac{\Delta C_{HA(B)}}{\Delta pH}$$

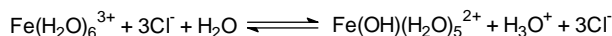
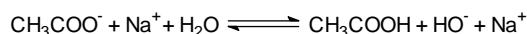
Pojemność opisanego buforu wynosi zatem 0,5.

4.1.7 Hydroliza

Efektom dysocjacji soli (np.: octanu sodu, chlorku żelaza(III)), są odpowiednie kationy metali i aniony reszt kwasowych. Z punktu widzenia teorii kwasów i zasad Brönsteda anion octanowy, zdolny do przyłączenia protonu, jest zasadą, natomiast hydratowany kation Fe^{3+} jest kwasem zdolnym do oddania protonu. Jednocześnie w układzie znajdują się cząsteczki wody, zachowujące się bądź jak kwas, oddające proton zasadzie - anionowi octanowemu, lub też jak zasada, przyłączająca proton pochodzący od kwasu - hydratowanego jonu żelaza(III).



Powstające w pierwszym przypadku jony wodorotlenowe powodują alkalizację roztworu, jony wodorowe tworzące się w przypadku soli roztworu soli żelaza(III) decydują o jego kwaśnym odczynie. Wykazywanie przez roztwory obojętnych związków odczynu kwaśnego lub zasadowego, obserwowane we wszystkich roztworach soli słabego kwasu i mocnej zasady lub słabej zasady i mocnego kwasu, nazywamy *hydrolizą*. Równania ogólne dla powyższych procesów mają postać:



Dla procesów tych możemy oczywiście zapisać stałą równowagi K_h , np.:

$$K_h = \frac{[CH_3COOH][OH^-]}{[CH_3COO^-]}$$

(stężenia jonów sodu nie uwzględniamy, gdyż jest ono niezmiennie po obu stronach równania). Analogicznie do procesu dysocjacji, zdefiniować możemy *stopień hydrolizy* jako stosunek liczby cząsteczek zhydrolizowanych (lub stężenia formy zhydrolizowanej), do początkowej liczby molekuł (lub stężenia początkowego).

$$\beta = \frac{C_h}{C_0}$$

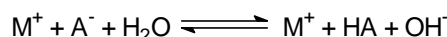
Podobnie jak podczas formułowania prawa rozcieńczeń Ostwalda, do równania na stałą hydrolizy podstawić możemy wartości C_h uzyskane po przekształceniu zależności opisującej wartość stopnia hydrolizy:

$$K_h = \frac{[CH_3COOH][OH^-]}{[CH_3COO^-]} = \frac{C_0\beta * C_0\beta}{C_0(1-\beta)} = \frac{C_0\beta^2}{1-\beta} \approx C_0\beta$$

a stąd:

$$\beta = \sqrt{\frac{K_h}{C_0}}$$

Octan sodu należy do soli słabego kwasu i mocnej zasady. Rozważmy ogólny proces hydrolizy soli tego typu:



Wykładnik stężenia jonów wodorowych w tym układzie obliczyć można przekształcając równanie na stałą hydrolizy.

$$K_h = \frac{[HA][OH^-]}{[A^-]} = \frac{[HA] \frac{K_w}{[H^+]}}{[A^-]} = \frac{[HA] * K_w}{[A^-][H^+]} = \frac{K_w}{K_D}$$

$$[HA] = [OH^-]$$

$$K_h = \frac{[HA][OH^-]}{[A^-]} = \frac{\frac{K_w^2}{[H^+]^2}}{[A^-]} = \frac{K_w}{K_D}$$

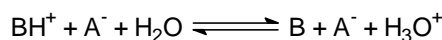
$$[A^-] = C_0$$

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_D * K_w}{C_0}}$$

$$pH = \frac{1}{2} K_D + \frac{1}{2} K_w + \frac{1}{2} \log_{10} C_0$$

Roztwór soli słabego kwasu i mocnej zasady ma zatem odczyn zasadowy.

Podobne wyprowadzenie przeprowadzić możemy dla soli słabej zasady i mocnego kwasu (np.: NH_4Cl). Schemat hydrolizy ma postać:



Analogicznie do powyższego wyprowadzenia, zapisać możemy:

$$K_h = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} = \frac{[B] \frac{K_w}{[OH^-]}}{[BH^+]} = \frac{K_w}{K_D}$$

$$[B] = [H^+]$$

$$[BH^+] = C_0$$

$$K_h = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} = \frac{[H^+]^2}{[BH^+]}$$

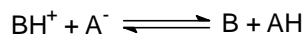
$$[H^+]^2 = K_h * C_0 = \frac{K_w * C_0}{K_D}$$

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_w * C_0}{K_D}}$$

$$pH = \frac{1}{2} pK_w - \frac{1}{2} pK_D - \frac{1}{2} \log_{10} C_0$$

Odczyn tak uzyskanego roztworu jest kwaśny.

Trzecim możliwym do rozważenia przypadkiem jest hydroliza soli słabego kwasu i słabej zasady.



Wartość pH takiego roztworu obliczyć możemy z równań dysocjacji kwasu HA i zasady B:

$$K_{D_{kw}} = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

$$K_{D_{zas}} = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]}$$

$$[A^-] = [BH^+]$$

$$[B] = [HA]$$

$$\frac{K_{D_{zas}}}{K_{D_{kw}}} = \frac{[BH^+][OH^-][HA]}{[A^-][H^+][B]} = \frac{[OH^-]}{[H^+]} = \frac{K_w}{[H^+]^2}$$

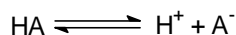
$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_w * K_{D_{kw}}}{K_{D_{zas}}}}$$

$$pH = \frac{1}{2} pK_w + \frac{1}{2} pK_{D_{kw}} - \frac{1}{2} pK_{D_{zas}}$$

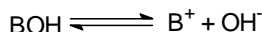
4.1.8 Teorie kwasów i zasad

4.1.8.1 Teoria Arrheniusa

Na podstawie teorii dysocjacji elektrolitycznej skonstruowana została teoria kwasów i zasad Arrheniusa. Według tej teorii kwasy to substancje, które w roztworach wodnych odszczepiają jon wodorowy,



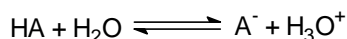
zasadami są zaś substancje odszczepiające jon wodorotlenowy.



Teoria Arrheniusa dobrze tłumaczy zachowanie kwasów i zasad w roztworach wodnych, zawodzi jednak w przypadku roztworów obojętnych soli ulegających hydrolizie, których roztwory na skutek tego procesu wykazują odczyn kwaśny lub zasadowy i są zdolne do reagowania jak typowe kwasy lub zasady. Nie tłumaczy również zachowania substancji w wielu roztworach niewodnych, np.: mocznika, który rozpuszczony w wodzie nie wykazuje cech kwasu ani zasady (w rozumieniu Arrheniusa), w ciekłym amoniaku zachowuje się jak kwas, natomiast w kwasie octowym jak zasada. Podobnie kwas azotowy zmienia radykalnie swoje właściwości po rozpuszczeniu we fluorowodorze, w którym zachowuje się jak zasada.

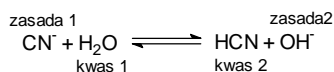
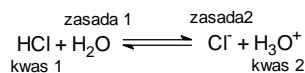
4.1.8.2 Teoria Lowry'ego-Brönsteda

Rozwinięciem niedoskonałej teorii Arrheniusa stała się teoria Lowry'ego-Brönsteda, zakładająca, że dysocjacja nie polega na prostym rozpadzie na jony, lecz jest bardziej złożonym procesem związanym z reakcją substancji rozpuszczonej z rozpuszczalnikiem. Jon wodorowy, powstający podczas dysocjacji kwasów w roztworze wodnym jest w rzeczywistości hydratowany przez jedną lub cztery cząsteczki wody. Hydratacji ulegają również kationy metali, aniony wodorotlenowe i resztki kwasowych. Zachowanie się w wodzie substancji zwanych kwasami nie polega zatem na oddysocjowaniu protonu lecz na przekazaniu go do cząsteczki wody:



W teorii protonowej Lowry'ego-Brönsteda kwasem jest substancja zdolna do oddania protonu (protonodonor, np.: HA), zasadą związek zdolny do jego wiązania (protonoakceptor, np.: woda). Przejścia protonu od donora do akceptora zależne jest od tendencji odszczepiania go przez cząsteczkę kwasu i wiązania kationu wodorowego przez zasadę. Moc różnych kwasów porównywać można tylko względem tej samej zasady, podobnie jak porównanie różnych zasad możliwe jest tylko w odniesieniu do jednego kwasu. Woda, w zależności od wprowadzonej substancji, może zatem być albo zasadą (akceptorem protonów, np.: w roztworze HCl), albo zasadą (donorem protonu, np.: w roztworach cyjanków). Związki zachowujące się bądź jako zasada, bądź jako

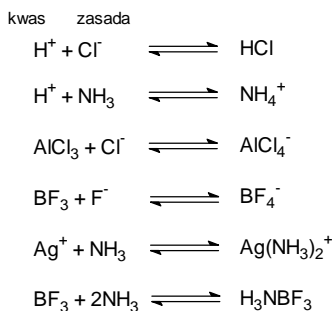
kwasy (amfoteryczne w sensie Lowry'ego-Brönsteda), nazywamy *amfiprotonowymi*. W wyniku reakcji kwasu z zasadą powstaje sprzężona z kwasem zasada i sprzężony z zasadą kwas. W roztworze HCl w wodzie kwasem jest chlorowódor (jest zdolny do oddania jonu H⁺) jak również jon hydroniowy, zasadami, woda i jon chlorkowy (zdolne do przyjęcia protonu).



Mocny kwas (np.: HNO₃) cechuje się silnymi tendencjami protonodonorowymi, sprzężona z nim zasada (anion azotanowy(V)), słabymi właściwościami protonoakceptorowymi (jest zatem słabą zasadą). Podobnie, kwas sprzężony do silnej zasady jest słabym kwasem.

4.1.8.3 Teoria Lewisa

Ogłoszona w 1923 roku przez Lewisa teoria kwasów i zasad jest uogólnieniem teorii Lowry'ego-Brönsteda. W myśl tej koncepcji kwasem jest każdy związek będący akceptorem pary elektronowej, zasadą jej donator. Wszystkie cząsteczki będące kwasami wg teorii Lowry'ego-Brönsteda są zarazem kwasami Lewisa, zasady Lowry'ego-Brönsteda są zasadami Lewisa. Teoria Lewisa rozszerza jednak pojęcie kwas (zasada) na związki których teorie Arrheniusa oraz Lowry'ego-Brönsteda nie dotyczyły. Chlorowódor, a ściślej rzecz ujmując wchodzący w jego skład jon H⁺, jest kwasem Lewisa, gdyż jest zdolny do przyjęcia pary elektronowej od zasady, którą jest cząsteczka wody, z wytworzeniem jonu hydroniowego. Podobnie, akceptorem pary elektronowej mogą być inne cząsteczki, nie zawierające protonu, np.: BF₃, AlCl₃, SO₃, Ag⁺. Wszystkie one tworzyć mogą połączenia z donorami par elektronowych, takimi jak cząsteczki wody, amoniaku, aminami, eterami czy anionami reszt kwasowych. Przykłady reakcji pomiędzy kwasami i zasadami w sensie Lewisa przedstawiono poniżej:



4.2 Równowagi elektrolityczne w roztworach – część ekperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie się z pojęciem pH i wskaźnikami kwasowo-zasadowymi, właściwościami roztworów buforowych oraz zjawiskami dysocjacji i hydrolizy związków chemicznych.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Pojęcie pH, iloczyn jonowy wody, aktywność jonu, siła jonowa roztworu, stała równowagi, stała i stopień hydrolizy, roztwory buforowe, pojemność buforu, teorie kwasów i zasad, dysocjacja elektrolityczna, stała i stopień dysocjacji, słabe i mocne elektrolity, wskaźniki pH, mechanizm działania indykatorów, iloczyn rozpuszczalności, efekt solny, efekt wspólnego jonu.

ODCZYNNIKI

NaOH	CH ₃ COOH	NaNO ₃ nasycony
HCl	CH ₃ COONa	PbCrO ₄
NH ₄ OH	KCl 10%	Pb(NO ₃) ₂ nasycony
NH ₄ Cl	Mg(ClO ₄) ₂ 20%	Zn(CH ₃ COO) ₂ nasycony
Fe(NO ₃) ₃ , ZnCl ₂ , Cu(NO ₃) ₂ , K ₂ HPO ₄ , MgCl ₂ , KI, K ₂ CO ₃ , K ₂ SO ₄ , AlCl ₃ , NaCl, KNO ₃		

Indykatory: fenoloftaleina, oranż metylowy, błękit bromotymolowy, czerwień metylowa, purpura bromokrezolowa, papierki wskaźnikowe.

UWAGA: Wodorotlenki sodu i amonu oraz stężone kwasy: solny i octowy, są silnie żrące. Pracując z nimi obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Roztwory wskaźników są silnie plamiące. Sole ołowiu są silnie trujące.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotować:

100 cm³ 0,1 M roztworu NaOH
100 cm³ 0,1 M roztworu HCl

OPIS ĆWICZENIA

a. Indykatory kwasowo-zasadowe

Przygotuj 15 probówek. Do pięciu nalej po około 2 ml wody, do kolejnych pięciu po 2 ml 0.1 M roztwór kwasu solnego, do pozostałych taką samą ilość 0.1 M roztworu NaOH. Zbadaj zależność barwy indykatora od pH roztworu dodając po 1 kropli każdego ze wskaźników kolejno, do roztworu kwaśnego, zasadowego i obojętnego (woda destylowana). Sprawdź także wpływ pH na barwę papierka uniwersalnego i lakmusowego nanosząc na nie roztwór kwasu, wodorotlenku i wodę za pomocą bagietki szklanej.

b. Roztwory buforowe

Przygotuj 200 cm³ roztworu buforowego (bufor octanowy lub amonowy) o stężeniu i pH podanym przez prowadzącego. Przygotuj 7 zlewek. W pierwszej umieść 50 ml wody destylowanej, w drugiej 50 ml wody i 5 ml 0,1 M HCl, w trzeciej 50 ml H₂O i 5 ml 0,1 mol NaOH. W kolejnych trzech zlewkach przygotuj roztwory w sposób opisany powyżej używając zamiast wody roztwór buforowy. Do siódmej zlewki wlej 25 ml buforu i 25 ml wody destylowanej. Zmierz pH roztworów za pomocą pH-metru. Oblicz pojemność buforową otrzymanego buforu.

UWAGA: ZASADY PRACY Z pH-METREM:

- **Przed użyciem pH-metr należy skalibrować zgodnie ze wskazówkami laboranta lub prowadzącego ćwiczenia. Należy uważać aby nie zanieczyścić roztworów buforowych używanych do kalibracji!**

- Po każdym pomiarze pH, przed zanurzeniem w kolejnym roztworze, zarówno podczas wykonywania ćwiczenia jak i podczas kalibracji przyrządu, elektrody należy opłukać dokładnie wodą destylowaną a następnie osuszyć czystą bibułą filtracyjną. Mycie i osuszanie elektrody należy wykonać również przed wykonaniem ćwiczenia (po wyjęciu elektrody z roztworu w którym jest przechowywana) oraz po jego zakończeniu.
- Końcówka elektrody jest zakończona delikatną, cienkościenną banieczką szklaną dlatego należy posługiwać się nią delikatnie, nie uderzać o ścianki naczynia. W żadnym przypadku nie należy mieszać roztworu elektrodą pH-metryczną!

c. *Hydroliza soli*

Przygotuj w 11 zlewkach o pojemności 100 cm³ po 50 cm³ 1 molowych roztworów azotanu(V) potasu, azotanu(V) żelaza(III), azotanu(V) wapnia, chlorku cynku, chlorku magnezu, chlorku glinu, chlorku sodu, węglanu potasu, wodorofosforanu(V) potasu, jodku potasu oraz siarczanu(VI) potasu w wodzie destylowanej. Następnie zmierz, za pomocą pH-metru pH otrzymanych roztworów. Zapisz równania reakcji oraz spróbuj oszacować wartości stałych hydrolizy dla badanych związków.

d. *Wpływ temperatury na stopień hydrolizy*

W dwóch probówkach umieść niewielką ilość octanu sodu a następnie rozpuść go w niewielkiej ilości wody destylowanej. Do pierwszej próbki dodaj kroplę fenolftaleiny, do drugiej kroplę roztworu błękitu bromotymolowego. Probówki ogrzej w płomieniu palnika. Zaobserwuj zmiany w probówkach po ogrzaniu a następnie po ochłodzeniu roztworu. Zapisz równanie reakcji hydrolizy. Czy proces hydrolizy octanu sodu jest egzo- czy endoenergetyczny.

e. *Efekt wspólnego jonu*

I.

Niewielką ilość chromianu(VI) ołowiu(II) (ok. 0,5 g) umieść w zlewce zawierającej 50 cm³ wody destylowanej a następnie ogrzej do wrzenia. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej roztwór przesącz przez sącdek z bibuły filtracyjnej a następnie dodaj niewielką ilość (ok. 1 cm³) nasyconego wodnego roztworu azotanu(V) ołowiu(II).

II.

Do 10 cm³ nasyconego roztworu octanu cynku dodaj kilka kryształków octanu sodu. Zaobserwuj zmiany zachodzące w próbówce.

f. *Efekt solny*

W dwóch probówkach umieść po 5 cm³ roztworu chlorku potasu o stężeniu 10%. Następnie do obu probówek dodaj kilka kropli 20% roztworu chloranu(VII) magnezu w takiej ilości, aby w probówkach wystąpiło lekkie zmętnienie (**UWAGA: Do obu probówek należy dodać taką samą ilość kropli roztworu Mg(ClO₄)!**). Następnie do pierwszej próbki wlewaj porcjami po 0,5 cm³, nasycony wodny roztwór azotanu(V) sodu do momentu całkowitego rozpuszczenia wytrąconego osadu. Do dodaniu każdej porcji zawartość próbki dokładnie zamieszaj. Do drugiej próbki dodawaj, zamiast roztworu NaNO₃, wodę destylowaną, postępując w sposób analogiczny jak w przypadku pierwszej próbki. Porównaj objętości roztworu NaNO₃ oraz wody potrzebne do rozpuszczenia osadu KClO₄.

g. *Amfoteryczność*

W zlewce umieść 5 cm³ 1M roztworu azotanu(V) glinu a następnie, mieszając roztwór, wlej 15 cm³ 1 M roztworu NaOH. Roztwór wraz z wytrąconym osadem przenieś do probówek wirówkowych i odwiruj. Zlej supernatant a do osadu dodaj parę mililitrów wody destylowanej, starannie wytrząśnij i ponownie odwiruj osad wodorotlenku glinu. Przygotuj dwie probówki, jedną zawierającą stężony kwas solny, drugą zawierającą 20% roztwór NaOH (probówki napełnij do ok. ½ objętości). Do obu probówek wrzuc niewielką ilość otrzymanego wcześniej Al(OH)₃ i starannie zamieszaj zawartość próbki bagietką. Co obserwujesz? Zapisz równania reakcji.

h. *Miareczkowanie alkacymetryczne*

Otrzymań od prowadzącego ćwiczenia próbkę kwasu solnego rozcieńcz w kolbie miarowej do objętości 100 cm^3 i dokładnie wymieszaj. Biuretę napełnij mianowanym roztworem wodorotlenku sodu. Z kolby miarowej pobierz, za pomocą pipety, 10 cm^3 roztworu HCl, przenieś go do kolby stożkowej o pojemności $250\text{--}300\text{ cm}^3$, dodaj ok. 50 cm^3 wody destylowanej oraz kilka kropli roztworu oranżu metylowego a następnie miareczkuj za pomocą roztworu NaOH do zmiany barwy z czerwonej na żółtą. Wykonaj minimum trzy miareczkowania (różnica objętości zużytego wodorotlenku nie mogą przekraczać $0,1\text{ cm}^3$), oblicz średnią ilość zużytego NaOH a następnie oblicz ilość gramów HCl w analizowanej próbce.

5 Ćwiczenie 2

5.1 Reakcje utleniania - redukcji – wstęp teoretyczny

5.1.1 Procesy utleniania-redukcji

Reakcjami utleniania-redukcji nazywamy procesy chemiczne, którym towarzyszy zmiana stopnia utlenienia. Procesem utlenienia nazywamy przemianę związaną z oddawaniem elektronów, redukcją – z ich pobieraniem. Reagent oddający elektrony (ulegający utlenieniu) nazywamy reduktorem, pobierający elektrony (ulegający redukcji) – utleniaczem. Pamiętać należy iż procesy te są ściśle ze sobą powiązane, tj. procesowi utleniania jakiegoś atomu (zwiększeniu jego stopnia utlenienia), zawsze towarzyszy proces redukcji innego atomu (zmniejszenia jego stopnia utlenienia). Stopniem utlenienia nazywamy liczbę elektronów, związanych z atomem danego pierwiastka w związku chemicznym, które stanowią nadmiar lub niedomiar elektronów w stosunku do liczby atomowej tego pierwiastka. W jednoatomowych jonach nadmiar elektronów nazywamy ujemnym stopniem utlenienia, niedomiar – dodatnim stopniem utlenienia. Ponadto, wszystkie pierwiastki w stanie wolnym (atomowym bądź cząsteczkowym), mają stopień utlenienia równy zeru. Jednak w jonach kompleksowych lub w związkach cząsteczkowych stopień utlenienia musi być obliczony z ładunków jonowych i stopni utlenienia innych, obecnych w danym związku, pierwiastków. W celu ułatwienia takich obliczeń należy zwrócić uwagę na fakt, iż w związkach pewna liczba pierwiastków charakteryzuje się zawsze tylko jednym stopniem utlenienia, różnym od zera, np.:

- tlen ma stopień utlenienia -2 (z wyjątkiem nadtlenków)
- wodór ma stopień utlenienia $+1$ (z wyjątkiem wodorków)
- metale alkaliczne (litowce) mają stopień utlenienia $+1$
- metale ziem alkalicznych (berylowce) mają stopień utlenienia $+2$

Korzystając z faktu, że stopień utlenienia obojętnej cząsteczki wynosi zero, a jonu kompleksowego jest z kolei równy jego wartościowości, można obliczyć stopnie utlenienia dowolnych atomów w cząsteczce. Pamiętać należy o możliwości występowania w cząsteczce tego samego pierwiastka na dwu różnych stopniach utlenienia (np.: w jonie tiosiarczanowym $S_2O_3^{2-}$ atomy siarki występują na stopniach utlenienia -2 i $+6$).

Każda reakcja utleniania-redukcji może być zapisana w formie dwóch reakcji połowicznych (połówkowych), z których jedna przedstawia proces utleniania, druga redukcji. Zapis taki pozwala w łatwy sposób znaleźć współczynniki stechiometryczne, mnożąc oba równania połowkowe przez czynniki prowadzące do zbilansowania ilości wymienianych elektronów (ilość elektronów oddawanych w procesie redukcji musi być równa ilości elektronów pobieranych w procesie utlenienia).

5.1.2 Potencjały normalne utleniania-redukcji

Często potrzebujemy informacji o zdolnościach oksydacyjno-redukcyjnych dwu substancji. Potrzebny jest zatem parametr pozwalający określić i porównywać moc utleniającą (redukującą) substancji. Nie jest możliwe określenie bezwzględnej tendencji do utleniania (redukcji), łatwo jednakże możemy określić względną zdolność do ulegania tego typu reakcjom. Normalny potencjał utleniania-redukcji jest wartością różnicy potencjałów elektrycznych standardowego półogniwa, w którym zachodzi interesujący nas proces utleniania-redukcji, względem standardowej elektrody wodorowej. Połówiczne reakcja redukcji ma ten sam, co do wartości, potencjał normalny co analogiczne reakcja utleniania, lecz różny co do znaku. Szeregiem elektrochemicznym metali nazywamy tablicę potencjałów normalnych, zestawionych w kolejności malejących wartości E_0 , ograniczających się do metali i wodoru.

Wartość potencjału utleniania-redukcji w oczywisty sposób zależy od stężenia i temperatury. Wartości potencjałów normalnych odnoszą się do 298 K i stężeń (aktywności) substancji utleniającej (redukującej) wynoszących 1 M. Potencjał dla układu w innej temperaturze i przy innych stężeniach reagentów obliczamy z równania:

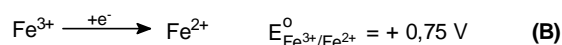
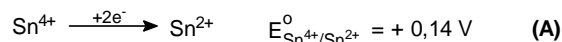
$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{prod}}{a_{substr}}$$

gdzie E_0 – potencjał normalny, R – stała gazowa, T – temperatura, F – stała Faradaya, a – aktywności substratów lub produktów, n – ilość elektronów wymienianych w reakcji utleniania (redukcji).

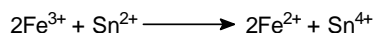
Wartości potencjałów normalnych pozwalają przewidzieć kierunek reakcji utleniania-redukcji.

- Porównując dwie reakcje połowkowe (1 i 2) o potencjałach normalnych E_0^1 i E_0^2 możemy stwierdzić, że jeśli $E_0^1 > E_0^2$ to postać utleniona z równania 2 będzie utleniała postać zredukowaną z

równania 1 a jeśli $E_o^2 > E_o^1$, to postać utleniona z równania 1 będzie utleniała postać zredukowaną z równania 2. Dla zobrazowania tych zależności rozpatrzmy następujące połowiczne procesy utleniania-redukcji:



Wartość potencjału normalnego dla reakcji (A) jest niższa niż w przypadku reakcji (B). Wnioskować możemy zatem, że postać utleniona z równania (B) (jony Fe^{3+}) będą utleniać postać zredukowaną występującą w równaniu (A) (jony Sn^{2+}). Równanie ogólne procesu przyjmie zatem postać:



co jest zgodne z wynikiem eksperymentalnym; reakcja odwrotna nie zachodzi.

- Suma potencjałów normalnych obu reakcji połowkowych, w przypadku reakcji samorzutnych, musi być dodatnia, jeśli jest ujemna to zachodzi reakcja w kierunku przeciwnym, o ile przebiegu reakcji nie wymusi się dostarczając energię z zewnątrz.

5.1.3 Stałe równowagi reakcji utleniania-redukcji

W stanie równowagi reakcji utleniania-redukcji potencjały wyliczone dla obu procesów połowkowych muszą być równe. Otrzymujemy zatem:

$$E_1 = E_2$$

$$E_1 = E_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{a_{\text{prod}}^1}{a_{\text{subst}}^1}$$

$$E_2 = E_2^0 + \frac{RT}{n_2 F} \ln \frac{a_{\text{prod}}^2}{a_{\text{subst}}^2}$$

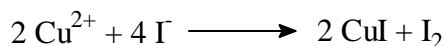
$$K = \frac{a_{\text{prod}}^2 a_{\text{subst}}^1}{a_{\text{subst}}^2 a_{\text{prod}}^1}$$

$$\lg K = \frac{(E_1^0 - E_2^0) n_1 n_2}{0,059}$$

Wartości K dla reakcji utleniania-redukcji są na ogół bardzo duże i wynoszą zazwyczaj $10^{20} - 10^{80}$, co świadczy o praktycznie całkowitym przesunięciu równowagi w kierunku produktów. Wartości stałych równowagi wskazują na to, że reakcje te przebiegają w kierunku tworzenia słabszych utleniaczy i reduktorów z mocniejszych. Reakcje utleniania-redukcji mogą być odwracalne jedynie w przypadku, jeśli wartości potencjałów normalnych obu reakcji połowkowych są zbliżone.

Na potencjał utleniania-redukcji duży wpływ mają procesy kompleksowania oraz wytrącania osadów, którym ulega jedna z form (utleniona bądź zredukowana) układu. Na przykład, jony Fe^{3+} tworzą trwałe kompleksy fluorkowe, FeF_6^{3-} , dlatego dodatek fluorków do roztworu zawierającego jony żelaza(II) i (III), zmniejsza znacznie zawartość jonów Fe^{3+} , co powoduje znaczne obniżenie potencjału utleniającego układu $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Obniżenie to jest tak duże, że łatwo przebiegająca w zwykłych warunkach reakcja utleniania jonów I jonami żelaza(III) może być zahamowana.

Przykładem wpływu procesów strącania na potencjał utleniania-redukcji może być reakcja jonów miedzi(II) z jonami jodkowymi przebiegająca zgodnie z równaniem:



Normalny potencjał utleniania-redukcji układu $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ wynosi 0,17 V, natomiast potencjał normalny układu $\text{I}_2/2\text{I}^-$ wynosi 0,53 V. Należało by zatem oczekiwać, że jony miedzi(I) powinny być utleniane przez jod do miedzi(II). Reakcja przebiega jednak w odwrotnym kierunku, czego przyczyną jest bardzo mała rozpuszczalność jodku miedzi(I) w wodzie.

Iloczyn rozpuszczalności CuI wynosi 10^{-12} , zatem stężenie jonów Cu^+ w 0,1 M roztworze jodku potasu wyniesie:

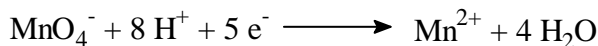
$$[\text{Cu}^+] = \frac{K_s(\text{CuI})}{[\text{I}^-]} = \frac{10^{-12}}{0,1} = 10^{-11} \text{ M}$$

Wobec tak niewielkiego stężenia potencjał utleniania-redukcji układu $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ wyniesie:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{red}]}{[\text{ox}]} = -0,17 + \frac{0,059}{1} \lg \frac{0,1}{10^{-11}} = 0,76 \text{ V}$$

Dzięki takiemu wzrostowi potencjału jony Cu^{2+} utleniają jony jodkowe do jodu.

W przypadku gdy w reakcji biorą udział jony H^+ lub OH^- na przebieg reakcji utleniania-redukcji duży wpływ ma pH roztworu. Na przykład, reakcja redukcji jonów nadmanganianowych(VII) w środowisku kwaśnym ma postać:



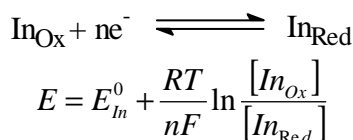
równanie na potencjał wygląda zatem następująco:

$$E = E^0 + \frac{0,059}{5} \lg \frac{[\text{MnO}_4^-][\text{H}^+]^8}{[\text{Mn}^{2+}]} = E^0 + 0,096 \text{ pH} + \frac{0,059}{5} \lg \frac{[\text{MnO}_4^-]}{[\text{Mn}^{2+}]}$$

Widzimy zatem, iż potencjał normalny jest funkcją pH, i maleje liniowo wraz z jego wzrostem.

5.1.4 Wskaźniki red-ox (utleniania-redukcji)

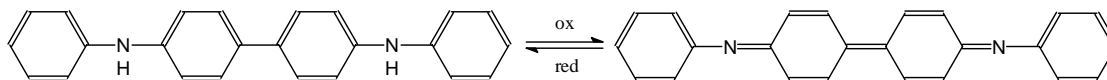
Wskaźnikami utleniania-redukcji nazywamy substancje barwne które tworzą układy utleniająco-redukujące, przy czym barwa utleniona wskaźnika (In_{Ox}) ma inne zabarwienie niż zredukowana (In_{Red}). Układ utlenianiacz-reduktor utworzony przez wskaźnik ma potencjał określony wzorem:



przy czym E_{In}^0 określa potencjał przy którym $[\text{In}_{\text{Ox}}] = [\text{In}_{\text{Red}}]$. Brawa wskaźnika zależy od stężeń postaci utlenionej i zredukowanej. Podobnie jak w przypadku wskaźników alkacymetrycznych, zabarwienie pochodzące tylko od jednej z form obserwuje się w przypadku gdy stężenie tej formy jest ponad dziesięciokrotnie większe niż drugiej, co prowadzi do wniosku, że zakres zmiany barwy wskaźnika red-ox opisuje zależność:

$$E = E_{\text{In}}^0 \pm \frac{0,059}{n}$$

Przykładem przemian chemicznych towarzyszących zmianom barwy wskaźników red-ox mogą być reakcje difenylobenzydyny w środowisku utleniającym, która przy potencjale utleniania-redukcji wynoszącym 0,76 V z formy bezbarwnej przechodzi w intensywnie fioletową.



5.2 Reakcje utleniania-redukcji – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z pojęciem reakcji utleniania-redukcji i układaniem równań chemicznych dla tych procesów.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Pojęcie utleniania i redukcji, utleniacz, reduktor, stopień utlenienia, potencjał normalny, szereg elektrochemiczny, stała równowagi reakcji utleniania-redukcji, wskaźniki red-ox, układanie równań w reakcjach utleniania-redukcji.

ODCZYNNIKI

1M Cr(NO ₃) ₃	Na ₂ SO ₃	MnSO ₄
2M NaOH	K ₃ Fe(CN) ₆ rozcieńczony	KOH
1M NaOH	0,01 M NaOH	Cu drut
10% H ₂ O ₂	0,1 M CH ₃ COOH	skrobia
0,5 M K ₂ CrO ₄	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	glukoza
0,5 M Fe(NO ₃) ₃	CuCl ₂	NaOH
1 M Mn(NO ₃) ₂	Zn pył	indygokarmin
2 M HNO ₃	KIO ₃	błękit metylenowy 0,5%
0,1 M AgNO ₃	NaCl	agar
1 M FeSO ₄	H ₂ SO ₄ stęż.	drut miedziany
1 M H ₂ SO ₄	HNO ₃ stęż.	folia aluminiowa
0,2 M KMnO ₄	kwask malonowy	

UWAGA: Wodorotlenek sodu i potasu, nadtlenek wodoru oraz stężone kwasy: solny, siarkowy(VI) i azotowy są silnie żrące. Pracując z nimi obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Roztwory azotanu srebra, indygokarminu oraz błękitu metylenowego są silnie plamiące.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotować:

50 cm³ 5 % roztworu CuCl₂

50 cm³ 5% roztworu ZnCl₂

OPIS ĆWICZENIA

a. Barwne reakcje utleniania-redukcji

Utlenianie Cr(III) do Cr(VI)

Do próbki z 2 ml 1 M roztworem azotanu chromu(III) dodawaj powoli 2 M roztwór NaOH, aż do rozpuszczenia strącającego się początkowo wodorotlenku chromu(III), po czym dodaj około 1 ml 10% roztworu nadtlenu wodoru i ogrzewaj do zmiany barwy z zielonej, pochodzącej od jonów Cr³⁺ na żółtą (jony CrO₄²⁻).

Redukcja Cr(VI) do Cr(III).

Do 2 ml 0,5 M roztworu chromianu potasu dodaj 0,5 ml 1M roztworu kwasu siarkowego a następnie szczyptę siarczanu(IV) sodu. Zaobserwuj zmianę barwy.

Utlenianie Fe(II) do Fe(III)

Do 1 ml 0,5 M roztworu Fe(NO₃)₂ dodaj 0,5 ml 2 M roztworu NaOH, a następnie 0,5 ml 10% roztworu nadtlenu wodoru.

Utlenianie Mn(II) do Mn(VII).

Do 0,5 ml 1 M roztworu azotanu manganu(II) dodaj roztwór sporządzony ze szczypty nadsiarczanu amonu, 2 ml wody, 1 ml 2 M kwasu azotowego i 1 ml 0,1 M roztworu azotanu srebra. Tak sporządzony roztwór ogrzać.

Redukcja Mn(VII) do Mn(II)

Do 1M roztworu FeSO₄ zakwaszonego kilkoma kroplami 1 M kwasu siarkowego dodawaj kroplami 0.2 M roztwór nadmanganianu potasu. Obserwuj zmiany barwy.

b. Redukcja Cu²⁺ do Cu⁰

Umieść w zlewce 50 cm³ 5 % roztworu CuCl₂. Wsyp małymi porcjami 3 g pyłu cynkowego. Zaobserwuj zachodzące zmiany. Następnie do zlewki zawierającej 50 cm³ 5% roztworu chlorku cynku wsyp ok. 3 g miedzi. Wytlumacz różnice w zachowaniu się zawartości obu zlewek, zapisz równania zachodzących reakcji.

c. Oscylacyjne reakcje utleniania-redukcji

• Roztwór A

3,25 g jodanu(V) potasu i 20,0 cm³ 1 M kwasu siarkowego(VI) rozpuścić w 200 cm³ wody destylowanej. Roztwór kwasu przygotuj przez rozcieńczenie 1,2 cm³ stężonego H₂SO₄ w 18,8 cm³ wody.

• Roztwór B

2,0 g kwasu malonowego, 3,0 g jednowodnego siarczanu(VI) manganu(II) i 20,0 cm³ 1% roztworu skrobi rozpuścić w 200 cm³ wody destylowanej. Roztwór skrobi przygotuj przez rozpuszczenie 0,2 g skrobi w 5,0 cm³ wrzącej wody i rozcieńczenie do objętości 20,0 cm³.

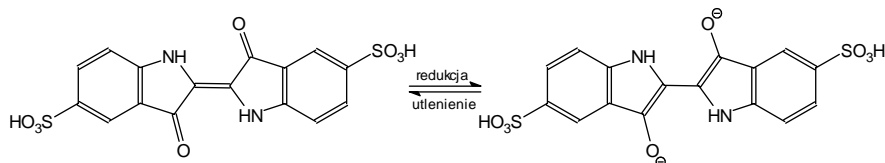
• Roztwór C

90,0 cm³ 30% nadtlenku wodoru rozpuść w 240 cm³ wody destylowanej.

Do zlewki o pojemności 1 dm³ wlej się jednocześnie roztwory A, B i C i mieszaj intensywnie mieszadłem magnetycznym. Po około 1 minucie rozpoczynają się oscylacje pomiędzy roztworem pomarańczowym a bezbarwnym. Po około 5 minutach w oscylacjach obok zabarwienia pomarańczowego pojawia się kolor niebieski.

d. Wskaźniki red-ox

I.



• Roztwór A

14 g glukozy rozpuścić w 700 cm³ wody destylowanej i ogrzać do 35⁰C.

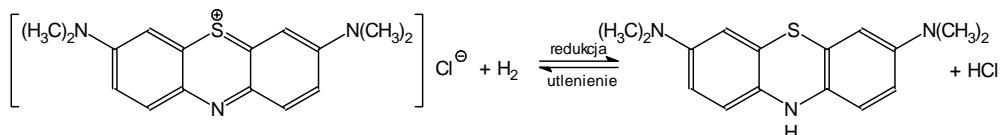
• Roztwór B

6 g wodorotlenku sodu rozpuścić w 200 cm³ wody destylowanej i ogrzać do 35⁰C.

Zlewkę o pojemności 2 dm³ napełnij roztworem glukozy, dodaj 0,04 g indygokarminu a następnie wlej roztwór B. Zawartość zlewki przybiera zielony kolor. Po krótkim czasie barwa zmienia się przez czerwoną do złotożółtej. Jeśli żółty roztwór przelejemy do drugiej zlewki z wysokości co najmniej 60 cm jego kolor zmieni się z powrotem na zielony a następnie na czerwony i złotożółty. Pokaz ten można powtórzyć kilkakrotnie.

UWAGA: Roztwór musi mieć temperaturę ok. 35⁰C, w przeciwnym wypadku reakcja nie zajdzie.

II.



Do kolby stożkowej z korkiem szlifowanym o pojemności 500 cm³ wlej się roztwór 15 g KOH oraz 5 g glukozy w 250 cm³ wody destylowanej. Następnie dodaj 1 kroplę 0,5% roztworu błękitu metylowego. Kolbę zatkać korkiem. Niebieski roztwór staje się stopniowo bezbarwny. Po wstrząśnięciu ponownie pojawia się niebieska barwa. Cykl można powtarzać aż do 10 godzin pod warunkiem okresowego otwierania kolby w celu dopuszczenia do niej tlenu. (UWAGA: Roztwory wodorotlenków rozpuszczają powoli szkło, powodując

„zapiękanie się” szlifów i uniemożliwiając w ten sposób otwarcie naczyń laboratoryjnych, dlatego po zakończeniu eksperymentu umyj szkło dokładnie wodą!

e. Wpływ pH na przebieg reakcji utleniania-redukcji

Do trzech probówek wlej po 1 cm^3 0,2 M roztworu nadmanganianu potasu a następnie do pierwszej probówki wlej kilka kropli 1M roztworu H_2SO_4 zaś do drugiej kilka kropli 1M roztworu NaOH. Po wymieszaniu zawartości każdej probówki wkraplaj powoli 10% nadtlenek wodoru (**UWAGA: Mieszanina może się silnie pieniać!**). Zaobserwuj zmiany w przebiegu i produktach reakcji. Zapisz równania zachodzących procesów.

f. Korozja

Przygotuj trzy stalowe, częściowo rozprostowane spinacze biurowe. Jeden z nich owiń w połowie długości skrawkiem folii aluminiowej, drugi odcinkiem niez izolowanego drutu miedzianego.

W zlewce o pojemności 250 cm^3 umieść 1 g chlorku sodu, kilka kropli roztworu fenoloftaleiny i kilka kropli roztworu $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Dodaj 50 cm^3 wody, roztwór ogrzej do wrzenia a następnie wsyp 0,5 g agaru i mieszaj do całkowitego rozpuszczenia. Mieszając dodawaj kroplami 0,01 M roztwór NaOH do wystąpienia blado różowego zabarwienia roztworu a następnie wkraplaj 0,1 M roztwór kwasu octowego do zaniku barwy (**UWAGA: Nie można dodać za dużo kwasu octowego!**). Roztwór przelej do szlaku Petriego i umieść w nim spinacze. Po 2-3 godzinach zaobserwuj zmiany. Wytłumacz różnice w wyglądzie otoczenia spinaczy.

g. Wpływ kompleksowania na reakcje utleniania-redukcji

W małej zlewce zmieszaj 5 cm^3 1 M roztworu siarczanu(VI) żelaza(II) i 5 cm^3 0,4 M roztworu chlorku żelaza(III). Mieszaninę podziel na dwie równe części i przenieś do probówek. Do jednej z probówek dodaj stężony roztwór fluorku sodu (do zaniku barwy pochodzącej od jonów żelaza), do drugiej wlej porównywalną ilość wody. Następnie do obu próbek wlej po 1 cm^3 1M roztworu jodku potasu. Zaobserwuj zmiany i podaj wyjaśnienie zjawiska wraz z zapisem zachodzących reakcji.

6 Ćwiczenie 3

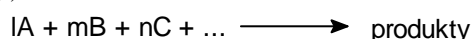
6.1 Kinetyka reakcji chemicznych – wstęp teoretyczny

6.1.1 Szybkość reakcji

Kinetyka chemiczna jest nauką zajmującą się badaniem przebiegu reakcji chemicznych w czasie, w zależności od warunków zewnętrznych (ciśnienie, temperatura, rozpuszczalnik, stężenie reagentów). Miarą przebiegu reakcji w czasie jest *szybkość reakcji* zdefiniowana jako zmiana stężenia substratu (produktu) w jednostce czasu.

$$v = \frac{dc}{dt}$$

Wartość ta jest proporcjonalna do iloczynu stężeń substratów biorących udział w reakcji (wzrost stężenia powoduje wzrost szybkości reakcji)



$$v = -\frac{dc}{dt} = [A]^L * [B]^M * [C]^N * \dots$$

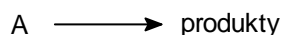
Jak można przypuszczać w miarę postępu reakcji, w związku ze spadkiem stężenia substratów, szybkość procesu maleje.

6.1.2 Rzędowość i cząsteczkowość reakcji

Sumę wykładników potęg, $r = L+M+N+\dots$, w zapisanym powyżej równaniu kinetycznym, nazywamy rzędowością reakcji chemicznej. Pamiętać należy iż wartości L, M, N... są wartościami wyznaczonymi eksperymentalnie i są zazwyczaj różne od współczynników stechiometrycznych l, m, n... równania reakcji. Cząsteczkowość reakcji wskazuje z kolei, ile cząsteczek bierze udział w najwolniejszym, determinującym szybkość reakcji, etapie. Cząsteczkowość reakcji przyjmuje oczywiście wartości całkowite, nie większe niż 3 (jednoczesne spotkanie więcej niż trzech cząsteczek, prowadzące do zajścia reakcji jest mało prawdopodobne). Wynika z tego, iż reakcje, w których po stronie substratów biorą udział więcej niż trzy cząsteczki, przebiegają w co najmniej dwóch etapach.

6.1.3 Równania kinetyczne

Reakcją pierwszego rzędu nazywamy proces samorzutnego rozkładu lub przemiany cząsteczek (atomów) jednego rodzaju:



Przykładem mogą być reakcje dysocjacji termicznej cząsteczek, rozpad promieniotwórczy, samoistne procesy izomeryzacji i inne. Równanie kinetyczne dla tego typu procesów wyprowadzić można w następujący sposób:

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc$$

$$-\frac{dc}{c} = kdt$$

$$-\int_{c_0}^c \frac{dc}{c} = k \int_0^t dt$$

$$\ln c_0 - \ln c = k(t-0)$$

$$\ln \frac{c_0}{c} = kt$$

$$k = t^{-1} \ln \frac{c_0}{c}$$

gdzie c_0 oznacza stężenie początkowe substratu, c – stężenie substratu po czasie t .

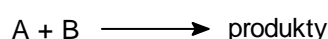
Dla reakcji pierwszego rzędu definiuje się często *okres półtrwania* $T_{1/2}$, określony jako czas w którym reakcji ulegnie połowa substancji:

$$c = 0,5 * c_0$$

$$T_{1/2} = k^{-1} \ln \frac{c_0}{0,5 * c_0} = k^{-1} \ln 2 = 0,69 * k^{-1}$$

Okres półtrwania nie zależy zatem od początkowego stężenia substratu.

Równie proste równania kinetyczne otrzymujemy dla reakcji drugiego rzędu.



Jeśli stężenia substratów A i B są równe uzyskujemy:

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc_A c_B$$

$$c_A = c_B$$

$$-\frac{dc}{dt} = kc^2$$

$$-\frac{dc}{c^2} = kdt$$

$$-\int_{c_0}^c \frac{dc}{c^2} = k \int_0^t dt$$

$$-\left(\frac{1}{c_0} - \frac{1}{c}\right) = k(t-0)$$

$$k = t^{-1} \left(\frac{1}{c} - \frac{1}{c_0}\right)$$

Powyższe rozważania prawidłowe są wyłącznie dla reakcji nieodwracalnych, tzn. biegnących w jednym kierunku aż do wyczerpania substratów. W przypadku reakcji odwracalnych ustala się stan równowagi określony przez stosunek stałych szybkości obu biegnących w przeciwnych kierunkach procesów. W tym wypadku powyższe równania kinetyczne opisują poprawnie wyłącznie początkowy przebieg reakcji odwracalnej.

6.1.4 Czynniki wpływające na szybkość reakcji

Różne reakcje chemiczne przebiegają z różnymi szybkościami. Najszybsze są reakcje przeniesienia elektronu, protonu oraz procesy zachodzące między jonami; do reakcji wolnych należy wiele procesów organicznych, takich jak np.: hydroliza, estryfikacja lub nitrowanie. Przykłady te świadczą o dużym wpływie charakteru i budowy reagujących ze sobą substancji na szybkość reakcji. Jednocześnie, te same substancje mogą reagować ze sobą z różną szybkością, zależnie od warunków. W przypadku reakcji konkurencyjnych, zmiana warunków, a co za tym idzie, zmiana szybkości reakcji, prowadzić może do zmiany kierunku przebiegu reakcji (np.: etanol w reakcji ze stężonym kwasem siarkowym w 120°C tworzy eter dietylowy, w 160°C, eliminuje cząsteczkę wody, tworzyć eten). Istnieje szereg czynników determinujących szybkość reakcji chemicznej. Przede wszystkim wymienić należy stężenie, temperaturę, ciśnienie, środowisko i katalizatory. Niektóre reakcje są wrażliwe na bardziej specyficzne czynniki, takie jak promieniowanie elektromagnetyczne (głównie z zakresu mikrofalowego i światła ultrafioletowego bądź widzialnego), promieniowanie jonizujące czy ultradźwięki.

6.1.4.1 Wpływ temperatury

Na ogół podwyższenie temperatury w znacznym stopniu zwiększa szybkość reakcji. Wpływ zmiany temperatury określany jest przez *współczynnik temperaturowy*, charakteryzujący przyśpieszenie reakcji po podgrzaniu układu o 10 K.

$$\alpha = \frac{k_{T+10}}{k_T}$$

Dla większości reakcji wartość α zawiera się pomiędzy 2 a 4, a dla wielu procesów biochemicznych wynosi około 7.

Zależność wartości k od temperatury określa *równanie Arrheniusa*:

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

gdzie A i E_a oznaczają stałe, przy czym E_a ma wymiar energii i nazywana jest *energią molową aktywacji reakcji*, A natomiast jest współczynnikiem proporcjonalności, nazywanym *współczynnikiem częstości*.

6.1.4.2 Wpływ stężenia

Wpływ stężenia na szybkość reakcji był tematem poprzednich punktów, dlatego ograniczymy się tylko do podsumowania dotychczasowych rozważań:

- szybkość reakcji chemicznej zależy od najwolniejszego jej etapu, czyli procesu elementarnego
- szybkość procesu elementarnego jest proporcjonalna do iloczynu stężeń substratów uczestniczących w tym procesie podniesionych do odpowiednich potęg, wynikających z liczby cząsteczek danego związku biorących udział w tym procesie:
 - dla reakcji pierwszego rzędu $v=kc$
 - dla reakcji drugiego rzędu $v=kc^2$ lub $v=kc_Ac_B$
 - dla reakcji trzeciego rzędu $v=kc^3$ lub $v=kc_Ac_B^2$ lub $v=kc_Ac_Bc_C$

6.1.4.3 Wpływ ciśnienia

W przypadku reakcji w fazie gazowej wpływ ciśnienia jest analogiczny do wpływu stężenia na szybkość reakcji w fazie ciekłej (stężenia w równaniach kinetycznych zastąpić należy wartościami ciśnień cząstkowych odpowiednich reagentów gazowych). Wpływ ciśnienia na reakcje w fazie ciekłej jest zaniedbywalny.

6.1.4.4 Wpływ środowiska

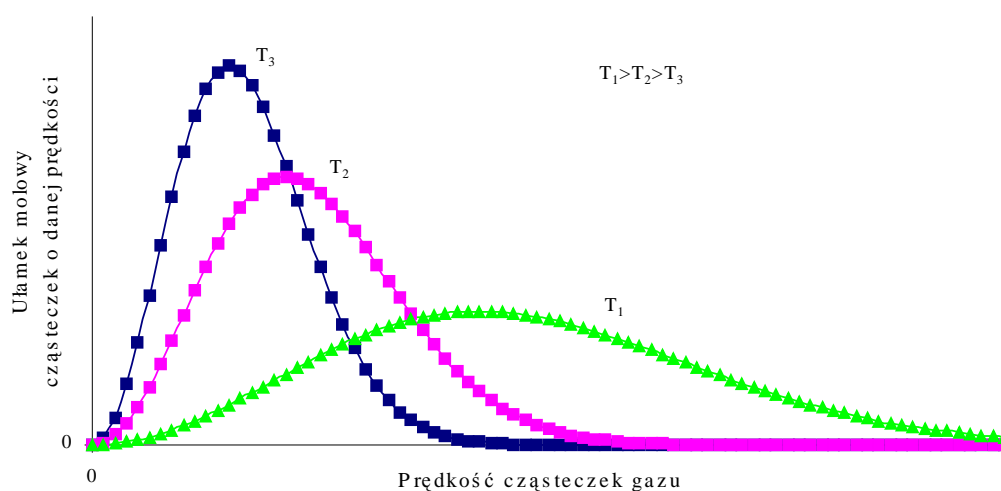
W fazie ciekłej cząsteczki reagujące ze sobą, jak również kompleks aktywny oraz produkty, są otoczone molekułami rozpuszczalnika (solwatacja). Pomiedzy rozpuszczalnikiem a rozpuszczoną substancją mają miejsce różnorodnego typu oddziaływania, takie jak wiązania wodorowe, wiązania Van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe, jonowe, elektrostatyczne, przeniesienia ładunku i inne. Oczywiście oddziaływania z różnymi rozpuszczalnikami mogą mieć odmienny charakter. Efektem tego jest różna reaktywność i szybkość reakcji w różnych mediach reakcyjnych. Szybkości reakcji mogą zmienić się, na skutek zmiany środowiska, o kilka rzędów wielkości. Ogólnie stwierdzić można że rozpuszczalniki polarne ułatwiają dysocjację wiązań i

zwiększają szybkość reakcji między cząsteczkami związków polarnych. Jeśli natomiast reagenty i produkty są molekułami niepolarnymi, reakcje będą szybciej w środowisku niepolarnym.

6.1.5 Teoretyczne podstawy kinetyki

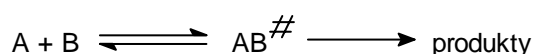
6.1.5.1 Teoria zderzeń

Arrhenius, korzystając z kinetycznej teorii gazów, stworzył model mechanizmów oraz kinetyki reakcji w fazie gazowej. Według tej teorii reakcji ulegają tylko te cząsteczki których suma energii kinetycznej ruchu translacyjnego jest większa od pewnej minimalnej, charakterystycznej dla każdej reakcji i środowiska, wartości zwanej energią aktywacji, niezbędnej do rozerwania starych i wytworzenia nowego wiązania chemicznego. Aktywację osiągnąć można nie tylko poprzez wzrost temperatury (wzrost szybkości cząsteczek na skutek ruchów termicznych), ale również przez pochłonięcie kwantów promieniowania elektromagnetycznego lub zderzenia z innymi, wysokoenergetycznymi cząstkami (np.: neutronami, elektronami, cząstkami α). Oprócz niezbędnej energii, potrzebnej do zajścia reakcji, cząsteczki muszą mieć właściwą orientację, tak, aby zderzenie mogło prowadzić do rozerwania i/lub wytworzenia wiązania. Parametry steryczne, determinowane przez geometrię reagujących ze sobą molekuł, składają się na współczynniki częstości – A , w równaniu Arrheniusa. Współczynnik ten zawiera w sobie również poprawkę na fakt, że nie wszystkie zderzenia o energii wyższej niż E_a i poprawnej orientacji przestrzennej prowadzą do produktów, możliwe wszakże jest rozdysocjowanie wytworzonego kompleksu reagujących molekuł na substraty. Rozszerzeniem teorii Arrheniusa jest model Lindemana, tłumaczący, w oparciu o teorię zderzeń, reakcje pierwszorzędowe. Zakłada on, że skutkiem zderzenia jest nie tylko zmiana energii kinetycznej, ale także elektronowej, oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczki. Molekuła wzbudzona ulega po pewnym czasie spontanicznemu rozkładowi wg mechanizmu jednocząsteczkowego lub przekazuje, na skutek zderzeń, nadmiar energii innym cząsteczkom. Zależność ułamka molowego cząsteczek w zależności od ich prędkości, a zatem energii, w różnych temperaturach prezentuje wykres.



6.1.5.2 Teoria stanu przejściowego

Teoria stanów przejściowych, opracowana przez Eyringa i Hinshelwoda jest zmodyfikowaną, dostosowaną do opisu fazy ciekłej, teorią Arrheniusa. Podobnie jak poprzednia uwzględnia konieczność pokonania przez cząsteczki bariery energetycznej jaką jest energia aktywacji. Ogólny zapis reakcji pomiędzy cząsteczkami substancji A i B zapisać można jako:

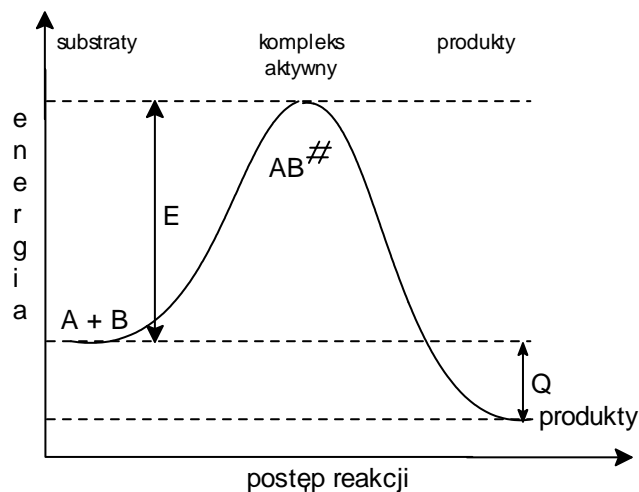


Zderzenie efektywne (pod względem sterycznym i energetycznym) prowadzi do powstania kompleksu aktywnego AB^{\ddagger} , który może ulec przekształceniu w produkty lub z powrotem w substraty. Współczynnik

sterczyny z równań teorii zderzeń nosi w tym przypadku miano entropii aktywacji (w teorii Eyringa wiąże się z termodynamicznymi właściwościami cząsteczek). Wartość stałej szybkości określona jest wzorem:

$$k = \frac{\sum_i e^{-\frac{\epsilon_i^\ddagger}{kT}}}{\prod_j \sum_i e^{-\frac{\epsilon_j^s}{kT}}}$$

gdzie ϵ^\ddagger oznacza energię kompleksu aktywnego, ϵ^s – energię kolejnych substratów.
Zależność energii układu od postępu reakcji przedstawić można w formie znanego wykresu:



Widoczną, słabą stroną teorii Eyringa, jest to, że wymaga ona, aby kompleks aktywny znajdował się w równowadze termodynamicznej z substratami reakcji. Dla wielu procesów, szczególnie takich, w których udział biorą wolne rodniki lub molekuly elektronowo wzbudzone, warunek ten jest nie do spełnienia.

6.2 Kinetyka reakcji chemicznych – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie ze pojęciem szybkości reakcji i warunkującymi ją czynnikami.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Szybkość reakcji chemicznej, energia aktywacji, czynniki wpływające na szybkość reakcji, równanie Arrheniusa, teoria zderzeń oraz stanu przejściowego, rząd i cząsteczkowość reakcji, stała szybkości, równania kinetyczne dla reakcji I i II rzędu.

ODCZYNNIKI

0,5 M Na ₂ S ₂ O ₃	skrobia	0,5M KI
1M H ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	5% HgCl ₂
KI	FeSO ₄	
Na ₂ S ₂ O ₃	CuSO ₄	

UWAGA: Stężony kwas siarkowy(VI) jest silnie żrący. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Sole rtęci są silnie toksyczne.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotować:

10 cm³ 5% roztworu skrobi (odważoną ilość skrobi rozpuścić w 2 cm³ wrzącej wody, następnie rozcieńczyć do objętości 10 cm³)

OPIS ĆWICZENIA

a. Wpływ stężenia na szybkość reakcji

W pięciu małych probówkach umieść kolejno:

- 2 krople 0,5 M Na₂S₂O₃ i 8 kropli wody
- 4 krople 0,5 M Na₂S₂O₃ i 6 kropli wody
- 6 kropli 0,5 M Na₂S₂O₃ i 4 kropli wody
- 8 kropli 0,5 M Na₂S₂O₃ i 2 kropli wody
- 10 kropli 0,5 M Na₂S₂O₃

Przygotuj stoper lub zegarek z sekundnikiem i do każdej probówki dodaj 2 krople 1 M roztworu kwasu siarkowego. Zmierz czas po którym pojawi się zmętnienie.

b. Wpływ temperatury, stężenia i katalizatora na szybkość reakcji

W kolbie miarowej o pojemności 250 cm³ umieść 12,5 g jodku potasu, 22 mg tiosiarczanu sodu oraz dodaj 2,5 cm³ 5 % roztworu skrobi. Całość rozpuść w niewielkiej ilości wody destylowanej i rozcieńcz do kreski. Do drugiej kolby (250 ml) nasyp 1,25 g nadsiarczanu amonu (**UWAGA: Przed wykonaniem ćwiczenia skonsultuj z prowadzącym wielkość naważki, gdyż ze względu na nietrwałość nadsiarczanu amonu jej wielkość może ulec zwiększeniu**), dodaj małą ilość wody destylowanej a następnie, po rozpuszczeniu soli, dopełnij do kreski. Katalizator przygotuj przez rozpuszczenie w jednej probówce niewielkiej ilości siarczanu(VI) żelaza(II), w drugiej zaś odrobiny siarczanu(VI) miedzi(II) w niewielkich ilościach wody destylowanej a następnie zmieszanie obu roztworów.

Wlej do zlewki po 100 cm³ wody destylowanej i dodaj, intensywnie mieszając, po 20 cm³ roztworów KI i nadsiarczanu amonu, zmierz czas po którym pojawi się barwa. Następnie wykonaj pomiar używając 120 cm³ wody, 10 cm³ roztworu KI i 10 cm³ roztworu nadsiarczanu amonu oraz dla trzeciej próby, złożonej z 10 cm³ KI, 110 cm³ wody destylowanej i 20 cm³ (NH₄)₂S₂O₈.

Do czterech probówek wlej po 10 ml wody i 1 cm³ roztworu jodku potasu. W kolejnych czterech umieść po 10 ml wody i 1 cm³ roztworu nadsiarczanu amonu. Pierwszą parę probówek umieść w łaźni wodnej o temperaturze 20⁰C. Po wyrównaniu temperatury zmieszaj zawartość obu probówek i zmierz czas pojawienie się niebieskiego zabarwienia. Analogiczny pomiar przeprowadź dla roztworów o temperaturze 30, 40 i 50⁰C.

Do 20 cm³ roztworu nadsiarczanu amonu dodaj kroplę roztworu katalizatora, 100 cm³ wody destylowanej a następnie 20 cm³ roztworu KI. Zmierz czas zmiany barwy.

c. Wpływ szybkości reakcji na rodzaj produktu

Przygotuj dwie czyste probówki. Do pierwszej wlej 4 cm³ 5% roztworu chlorku rtęci(II), do drugiej 4 cm³ wody i pięć kropli roztworu HgCl₂. Zawartość drugiej probówki dokładnie wymieszaj. Następnie, nie mieszając zawartości, do obu probówek wlej po 5 kropli 0,5M roztworu jodku potasu. Co obserwujesz? Jak zmienia się zawartość probówek po kilku minutach?

7 Ćwiczenie 4

7.1 Termodynamika i statyka chemiczna – wstęp teoretyczny

7.1.1 Pierwsza zasada termodynamiki. Entalpia tworzenia.

Pierwsza zasada termodynamiki głosi, iż suma wszystkich zmian energii zachodzących podczas dowolnego procesu musi być równa zero. Energię zawartą w układzie charakteryzują dwie funkcje. Pierwszą, bardziej podstawową, nazywamy energią wewnętrzną U . Składają się na nią takie rodzaje energii jak energia jądrowa, kinetyczna cząsteczek, oscylacyjna, elektronowa i inne.

$$\Delta U = \Delta Q + w$$

Jeśli proces fizykochemiczny przebiega bez wymiany ciepła z otoczeniem, mówimy, że jest to *proces adiabatyczny*. W tym wypadku zmiana ciepła (ΔQ) układu jest równa zero, zatem zmiana energii wewnętrznej wynika wyłącznie z pracy wykonanej na, lub wykonanej przez, układ ($\Delta U=w$). W procesie izochorycznym (przy stałej objętości) zmiana energii wewnętrznej zależy wyłącznie od ciepła pobranego lub oddanego przez układ, gdyż iloczyn $p\Delta V$ jest równy zero. Procesem izobarycznym nazywamy proces zachodzący pod stałym ciśnieniem. Ciepło reakcji pod stałym ciśnieniem wynosi:

$$w = -p\Delta V$$

$$Q_p = \Delta U + p\Delta V = U_2 - U_1 + p(V_2 - V_1) = (U_2 + pV_2) - (U_1 + pV_1)$$

Sumę energii wewnętrznej i iloczynu objętości i ciśnienia układu nazywamy entalpią H . Jest to druga ze wspomnianych na wstępie, funkcji charakteryzujących energię w układzie. Ciepło procesu fizykochemicznego pod stałym ciśnieniem jest równe zmianie entalpii.

$$H = U + pV$$

$$Q_p = H_2 - H_1 = \Delta H$$

Entalpia, podobnie jak energia wewnętrzna, jest funkcją stanu, co oznacza, iż jej wielkość zależy tylko od stanu układu, a nie od drogi, na której układ ów stan osiągnął. Zmiany entalpii dla procesów izobarycznych zależą wyłącznie od zmian energii wewnętrznej i pracy objętościowej którą wykonał układ.

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V$$

Dla reakcji w fazie stałej lub ciekłej zmiany ciśnienia i objętości są na ogół zaniedbywalne, zatem dla tych procesów zmiana entalpii jest równa efektowi cieplnemu reakcji.

Dla procesów egzoenergetycznych (związanych z wydzielaniem ciepła) wartości zmiany entalpii są ujemne, dla procesów endoenergetycznych (związanych z pobieraniem ciepła), dodatnie. Z rozważań tych wynika, że każda substancja, w określonej temperaturze i pod określonym ciśnieniem, charakteryzuje się pewną określoną wartością entalpii. Wyznaczenie tych bezwzględnych wartości jest jednakże niemożliwe, dlatego przyjmuje się że entalpia wszystkich substancji prostych (pierwiastków), w warunkach standardowych, jest równa zero. Zarazem definiuje się standardową entalpię tworzenia (ciepło tworzenia), będącą zmianą entalpii towarzyszącą syntezie 1 mola związku z substancji prostych. Parametr ten oznacza się najczęściej symbolem ΔH_{298}° . W przypadku pierwiastków stan standardowy odnosi się do najtrwalszej, w warunkach standardowych, odmiany alotropowej substancji prostej (np.: stanem standardowym wodoru jest jego cząsteczka, a nie forma atomowa).

7.1.2 Ciepło reakcji. Prawo Kirchhoffa. Prawo Hessa

Ciepłem właściwym nazywamy energię cieplną potrzebną do podniesienia temperatury 1 g tej substancji o 1 K. Ciepło molowe to iloczyn masy molowej substancji i jej ciepła właściwego. Ponieważ ciepło nie jest funkcją stanu, mamy dwa rodzaje ciepła molowego, w zależności od tego, czy ogrzewanie prowadzimy przy stałej objętości, czy przy stałym ciśnieniu. Wartości te oznaczamy odpowiednio przez C_v i C_p . Dla gazów doskonałych wartości te są powiązane ze sobą następującym wzorem:

$$C_p - C_v = R$$

gdzie R oznacza stałą gazową.

Ciepłem reakcji Q , w warunkach standardowych (standardową entalpią reakcji), nazywamy różnicę pomiędzy standardowy ciepłem tworzenia produktów i substratów reakcji.

$$\Delta Q^{\circ} = \left(\sum n_i \Delta H_{i(tw)}^{\circ} \right)_{\text{produkty}} - \left(\sum n_i \Delta H_{i(tw)}^{\circ} \right)_{\text{substraty}}$$

gdzie n_i – liczba moli i -tego reagenta, biorąca udział w reakcji, $\Delta H_{i(tw)}^o$ – ciepło (entalpia) tworzenia tego reagenta (substratu lub produktu).

Procesy którym towarzyszy wydzielanie energii do otoczenia nazywamy egzoenergetycznymi. W procesach tych entalpia stanu początkowego jest wyższa niż stanu końcowego ($\Delta H < 0$). Procesy endoenergetyczne są związane z pobieraniem energii z otoczenia. Wynika z tego iż entalpia stanu początkowego jest niższa niż stanu końcowego ($\Delta H > 0$). W przypadku gdy energia jest wymieniana na sposób cieplny, mówimy o procesach egzo- bądź endotermicznych. Procesy te mogą mieć charakter chemiczny (reakcja chemiczna) bądź fizyczny (topnienie, wrzenia, przemiana polimorficzna). Prawo Kirchhoffa opisuje zmianę entalpii standardowej wraz ze zmianami temperatury:

$$\Delta H_T = \Delta H_{298}^o + C_p (T - 298)$$

Ciepła reakcji można z łatwością obliczyć pod warunkiem że są dostępne wszystkie potrzebne wartości liczbowe. Obliczenia te prowadzi się w oparciu o prawo Hessa, które głosi że ciepło wydzielone lub pochłonięte podczas dowolnej reakcji chemicznej jest stałe i nie zależy od tego, czy reakcja ta przebiega jedno- czy wielostopniowo (nie zależy od drogi reakcji). Pomocne może być także prawo Lavoisiera-Laplace'a, głoszące że efekt cieplny związany z rozkładem termicznym jakiegoś związku chemicznego jest równy ciepłu wydzielanemu podczas syntezy tego związku z produktów jego rozkładu.

7.1.3 Druga i trzecia zasada termodynamiki. Entropia.

Z wieloletnich obserwacji przyrody i otaczających nas zjawisk wysnuć można wniosek, że procesy zachodzące samoistnie (niewymuszone), wiążą się z oddaniem energii do otoczenia (są egzoenergetyczne). Wynika z tego, że każdy układ dąży do maksymalnego zmniejszenia swej energii, wydzielając ciepło bądź wykonując pracę aż do osiągnięcia najbardziej trwałego w danych warunkach stanu równowagi. Sformułowanie to, określające kierunek procesów samorzutnych, chociaż w istocie swojej słuszne, nie wyjaśnia wszystkich spotykanych w praktyce reakcji chemicznych i może prowadzić do nie zawsze słusznego wniosku, że jeżeli układ nie wykonuje pracy, to samorzutnie mogą przebiegać tylko reakcje egzotermiczne (hipotezę taką wysunął w XIX w. Francuski chemik Berthelot, stwierdzając, że miarą powinowactwa chemicznego, czyli „siły pędnej” reakcji samorzutnych, jest wielkość ciepła wydzielonego w reakcji). Znamy jednakże wiele reakcji i procesów fizykochemicznych, podczas których dochodzi do pobrania energii z otoczenia a zarazem przebiegają one spontanicznie (np.: rozpuszczaniu niektórych substancji w wodzie towarzyszy obniżenie temperatury roztworu). Zatem, skoro wydzielenie energii (spadek entalpii) nie jest warunkiem koniecznym i miarą samorzutnego przebiegu procesów, musi istnieć inna, bardziej ogólna „siła pędna” reakcji samorzutnych. Siłą tą jest entropia, będąca miarą nieuporządkowania układu, a co za tym idzie, określająca rozmieszczenie energii w układzie. Zgodnie z definicją Boltzmana entropia jest funkcją prawdopodobieństwa termodynamicznego, określającego prawdopodobieństwo znalezienia jakiegoś układu w określonym stanie energetycznym. Zmiana entropii molowej wiąże się ze zmianami energii wewnętrznej i temperatury:

$$\Delta S = S_2 - S_1 = \frac{U_2 - U_1}{T} = \frac{\Delta Q}{T}$$

gdzie ΔQ oznacza ilość ciepła pochłoniętego przez układ podczas przejścia ze stanu 1 do 2, przy czym przejście ma miejsce w temperaturze T . Ponieważ ciepło pochłonięte przez mol substancji podczas ogrzewania od temperatury zera bezwzględnego do T , jest równe:

$$\Delta Q = \int_0^T C_p dT$$

zatem całkowita entropia w temperaturze T wyniesie:

$$S = \int_0^T \frac{C_p}{T} dT$$

Drugą zasadę termodynamiki możemy sformułować na kilka równoważnych sposobów:

1. W układach izolowanych (o stałej energii) procesy samorzutne są nieodwracalne i są związane ze wzrostem entropii.
2. Całkowita wartość entropii otaczającego nas świata dąży do maksimum.
3. Ciepło nie może samorzutnie przejść od ciała zimniejszego do ciała cieplejszego.

Trzecia zasada termodynamiki, zwana także teorematem cieplnym Nernsta, głosi, że entropia każdej doskonałej substancji krystalicznej w temperaturze zera bezwzględnego wynosi zero. Podobnie jak w przypadku standardowej entalpii reakcji, możemy zdefiniować standardową entropię reakcji:

$$\Delta S^o = \left(\sum n_i S_i^o \right)_{\text{produkty}} - \left(\sum n_i S_i^o \right)_{\text{substraty}}$$

Jak wynika z II zasady termodynamiki, samorzutnie zachodzić będą procesy, dla których ΔS^o jest dodatnie.

7.1.4 Entalpia swobodna i energia swobodna

Zarówno zmiany entropii jak i entalpii w procesach izobarycznych lub energii wewnętrznej w procesach izochorycznych mogą być dodatnie lub ujemne, toteż prawdopodobieństwo przebiegu określonego procesu będzie zależało od algebraicznej sumy dwóch efektów: od zmiany entalpii (lub energii wewnętrznej, gdy $p=const$) oraz zmiany entropii. W wyrażeniu wiążącym oba efekty występuje nie sama entropia, a iloczyn $T\Delta S$, który ma ten sam wymiar co ΔH i ΔU . Zdefiniować zatem możemy dwie nowe funkcje stanu, energię swobodną (F) i entalpię swobodną (potencjał termodynamiczny, G). Oczywiście, z powodu niemożności bezwzględnego wyznaczenia H i U, również bezwzględne wartości G i F są poza zasięgiem naszych pomiarów, i ograniczyć się musimy jedynie do wyznaczania wartości zmian energii i entalpii swobodnej: ΔF i ΔG .

$$F = U - TS \quad v = const$$

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S$$

$$G = H - TS \quad p = const$$

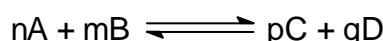
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

znak minus przed członem entropowym równań wynika z przeciwnego kierunku zmian ΔS i ΔU (ΔH) w procesach samorzutnych. Ujemne wartości entalpii (energii) swobodnej świadczą o samorzutności procesu, dodatnie, o tym iż jest to proces nieprawdopodobny (niewykluczony proces wymuszony). Wartość zero świadczy o tym iż układ znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej. Oczywiście zmianę wartości standardowej entalpii swobodnej obliczyć można z różnicy standardowych entalpii swobodnych produktów i substratów.

7.1.5 Statyka chemiczna

Statyka chemiczna jest nauką zajmującą się stanami równowagi. Znamy wiele reakcji chemicznych które nie zachodzą do końca, tj. w układzie zamkniętym po czasie dążącym do nieskończoności, stężenie produktów pozostaje stałe, lecz występują one obok substratów, które nie uległy całkowitemu przereagowaniu. Nagromadzone produkty reagują ze sobą, odtwarzając substraty, jednocześnie taka sama ilość substratów reaguje tworząc produkty. Jak widać zjawiska równowagi dotyczą wyłącznie procesów odwracalnych. W stanie równowagi stężenia reagentów nie ulegają zmianom w czasie (przy zachowaniu stałych warunków środowiska reakcji), nie jest to jednak stan spoczynku, lecz stan zrównoważonej aktywności. Dwie przeciwnie skierowane reakcje przebiegają nadal, lecz ich skutki się niwelują.

Rozpatrzmy reakcję odwracalną:



Szybkość reakcji przebiegającej w prawo opisuje równanie:

$$v_1 = k_1[A]^n[B]^m$$

reakcji odwrotnej:

$$v_2 = k_2[C]^p[D]^q$$

W stanie równowagi szybkości reakcji v_1 i v_2 są równe, wówczas:

$$k_1[A]^n[B]^m = k_2[C]^p[D]^q$$

Stąd:

$$\frac{[C]^p[D]^q}{[A]^n[B]^m} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Wyrażenie to określa prawo równowagi chemicznej. Wielkość K, będącą stosunkiem stałych szybkości reakcji chemicznej oraz stałej szybkości reakcji do niej odwrotnej, nazywamy kinetyczną stałą szybkości reakcji. Równanie to pozwala sformułować prawo równowagi chemicznej, brzmiące następująco: dla każdej reakcji odwracalnej w stanie równowagi stosunek iloczynu stężeń molowych produktów tej reakcji i iloczynu stężeń molowych reagentów, podniesionych do potęg odpowiadających współczynnikom określonym przez zależności stechiometryczne, jest równy pewnej stałej nazywanej stałą równowagi. W przypadku reakcji w stanie gazowym we wzorze ma wartość K zamiast stężeń występują ciśnienia cząstkowe.

Wpływ zmiany warunków na układ będący w stanie równowagi określa reguła Le Chatelier'a-Braun'a mówiąca, że każdy układ będący w stanie równowagi poddany jakiemuś oddziaływaniu zewnętrznemu ulega takim przemianom, które powodują zmniejszenie efektu tego oddziaływania. Jest to tzw. reguła przekory. Wynika z niej, iż wprowadzenie do układu substratów, a co za tym idzie, zwiększenie ich stężenia, spowoduje przesunięcie równowagi w prawo (wzrost stężenia produktów). Usunięcie z układu reakcyjnego części substratów spowoduje z kolei przemianę części produktów w substrat, a co za tym idzie, przesunięcie równowagi w lewo. W przypadku reakcji egzoenergetycznych, ogrzanie układu spowoduje przesunięcie równowagi w stronę substratów (pochłonięcie części energii cieplnej), ochłodzenie, wywoła z kolei wzrost stężenia produktów (a co za tym idzie wydzielanie energii cieplnej). Działanie takie, w stosunku do procesu endoenergetycznego, wywołają oczywiście efekty przeciwne. Zgodnie z regułą przekory zmiany ciśnienia wywołują zmianę stanu równowagi w przypadku gdy mamy do czynienia ze zmianą objętości reagentów w toku reakcji; ma zatem znaczenie wyłącznie w przypadku reakcji w układach w fazie gazowej, w których liczba cząsteczek po prawej stronie równania jest różna od ilości cząsteczek po jego lewej stronie. Na przykład, jeśli objętość substratów jest mniejsza od objętości produktów, wówczas wzrost ciśnienia spowoduje przesunięcie stanu równowagi w lewo (wzrost stężenia substratów spowoduje spadek objętości, co częściowo skompensuje działanie podwyższonego ciśnienia).

Zależność stałej równowagi opisuje równanie izochory van't Hoffa, wiążące ze sobą wartości stałej równowagi reakcji K_1 w pewnej temperaturze T_1 , z wartością stałej równowagi K_2 w temperaturze T_2 :

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

7.2 Statyka chemiczna – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z pojęciem równowagi i czynnikami mającymi wpływ na jej położenie.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Prawo działania mas, reguła przekory, reakcje odwracalne, stała równowagi chemicznej, wpływ czynników zewnętrznych na położenie stanu równowagi.

ODCZYNNIKI

1% fenoloftaleina	FeCl ₃	HNO ₃ stęż.
0,1 M AgNO ₃	KSCN	Cu drut
0,2 M KBr	KCl	mocznik
0,2 M KBrO ₃	FeSO ₄	β-cyklodekstryna
0,2 M KI	CuSO ₄	
0,2 M KIO ₃	1M Co(NO ₃) ₂	
NaOH	HCl stęż.	

UWAGA: Wodorotlenek sodu, kwas solny oraz azotowy są substancjami silnie żrącymi. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Azotan srebra jest substancją plamiącą.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

- 50 cm³ 10% roztworu KSCN
- 50 cm³ 10% roztworu KCl
- 50 cm³ 10% roztworu FeCl₃
- 100 cm³ 1M roztworu mocznika
- 100 cm³ 0,01 M roztworu NaOH (przez rozcieńczenie roztworu 1M)

OPIS ĆWICZENIA

a. Wpływ temperatury na stan równowagi

I.

Zatopioną ampułkę z ditlenkiem azotu umieść w zlewce z wodą w temperaturze pokojowej i lekko podgrzej (do około 50 stopni). Drugą umieść w zlewce z lodem. Zaobserwuj zmiany. Zapisz równanie reakcji.

UWAGA: Nie ogrzewać ampułki powyżej temperatury wskazanej w ćwiczeniu ze względu na niebezpieczeństwo eksplozji.

II.

W probówce umieść 5 cm³ nasyconego roztworu β-cyklodekstryny i dodaj 2 krople roztworu fenoloftaleiny. Po wymieszaniu dodaj 0,5 cm³ 0,5 % roztworu NaOH. Obserwuj zmiany barwy mieszaniny podczas ogrzewania i chłodzenia w łaźni lodowej. β-Cyklodekstryna to cykliczny oligosacharyd posiadający zdolność do kompleksowania w swoim wnętrzu wielu cząsteczek organicznych. Związana molekuła fenoloftaleiny nie jest wrażliwa na obecność jonów OH⁻ w roztworze. Po ogrzaniu kompleks rozkłada się a uwolniona fenoloftaleina zmienia, pod wpływem pH środowiska, barwę. Czy proces kompleksowania fenoloftaleiny przez cyklodekstrynę jest endo- czy egzoenergetyczny.

III.

Do zlewki nalej ok. 70 cm³ 1M roztworu mocznika. Kilka kropli tego roztworu zmieszaj na szkiełku zegarkowym z kilkoma kroplami AgNO₃. Zaobserwuj wynik. Sprawdź pH roztworu mocznika w zlewce papierkiem uniwersalnym. Następnie ogrzewaj roztwór w zlewce do wrzenia przez 10 min. i ponownie wykonaj próbę z AgNO₃ i pomiar pH, najpierw z gorącym roztworem, a następnie po jego ochłodzeniu. Wytlumacz zmiany.

b. Wpływ zwiększenia stężenia jednego z reagentów

W kolbie umieść 500 cm³ wody destylowanej, 2,5 cm³ 10% roztworu chlorku żelaza(III) i 2,5 cm³ 10% roztworu rodanku potasu. Po 100 cm³ tego roztworu rozlewamy do czterech jednakowych kolbek stożkowych. Następnie do pierwszej dodaj 20 cm³ 10% roztworu FeCl₃, do drugiej tyle samo 10% roztworu KSCN a do trzeciej 20 cm³ 10% KCl. Czwartą dopełnij 20 ml wody i traktuj jako odnośnik. Zaobserwuj zmiany i zapisz równania reakcji.

c. Wpływ ciśnienia

Strzykawkę zaopatrz w krótki (15-20 cm) odcinek wężyka polipropylenowego. W probówce umieść ok. 1 g miedzi włóż ją do kolby stożkowej a następnie dodaj 5 cm³ stężanego kwasu azotowego (**UWAGA: W związku z powstawaniem trujących tlenków azotu ćwiczenie wykonuj pod dygestorium**). Kolbę przykryj szkiełkiem zegarkowym pozwalając na zebranie się w niej większej ilości NO₂. Umieść koniec wężyka w naczyniu i napełnij strzykawkę tlenkami azotu (**UWAGA: Nie należy zasysać roztworu z dna probówki**). Zdejmij wężyk a wylot strzykawki szczelnie zatkaj. Następnie spręż mocno i szybko gaz w strzykawce. Co obserwujesz zaraz po sprężeniu, co dzieje się po kilkudziesięciu sekundach? Następnie rozpręż gaz do jego pierwotnej objętości i ponownie obserwuj zmiany.

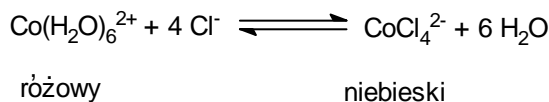
d. Równowaga w reakcjach utleniania-redukcji

Do czterech zlewek 1, 2, 3, 4 o pojemności 250 ml wlej po 80 cm³ wody, 2 krople 0,01 M NaOH i po 10 cm³ każdego z wymienionych roztworów:

Zlewka 1:	0,2 M KI i 0,04 M KIO ₃
Zlewka 2:	0,2 M KI i 0,04 M KBrO ₃
Zlewka 3:	0,2 M KBr i 0,04 M KBrO ₃
Zlewka 4:	0,2 M KBr i 0,04 M KIO ₃

Następnie do zlewek 1, 2 i 4 dodaj po 5 kropli 1M HCl, a do zlewki 3, 5 kropli stężonego HCl. Wytlumacz zmiany i zapisz równania reakcji.

e. Wpływ temperatury na równowagę procesu wymiany ligandów



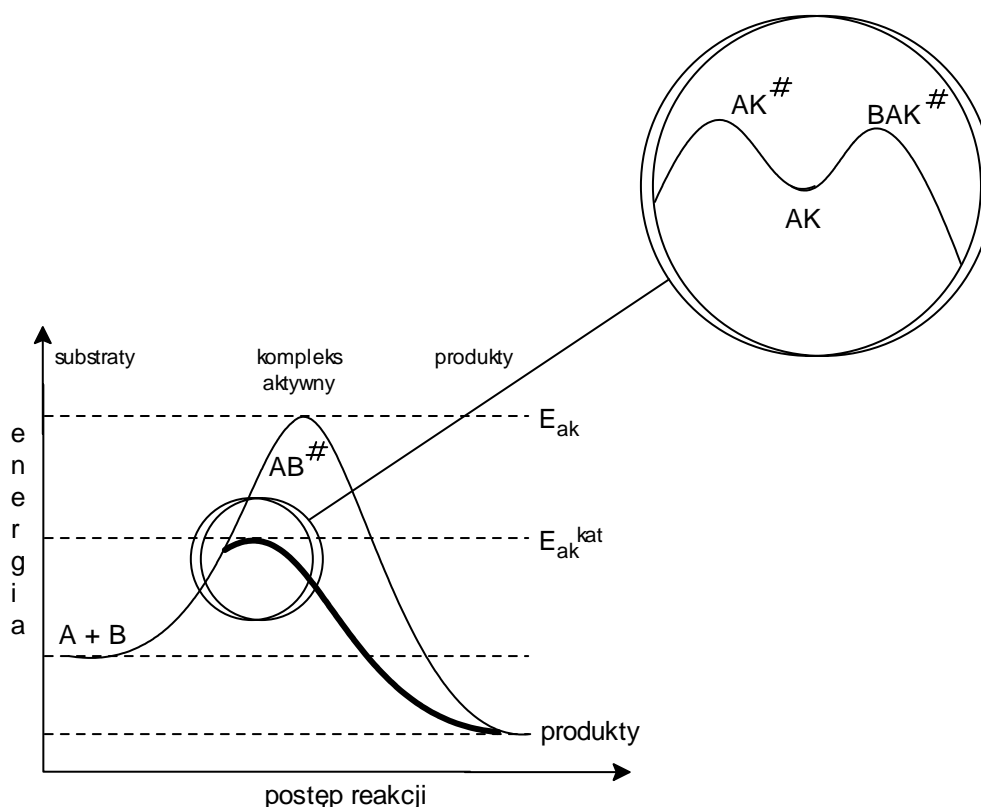
W zlewce o pojemności 100 cm³ umieść 50 cm³ roztworu azotanu(V) kobaltu(II). Następnie dodawaj powoli stężony roztwór kwasu solnego, aż do zmiany barwy z ciemnoróżowej na wyraźnie niebieską (**UWAGA: Należy uważać aby nie dodać nadmiernej ilości roztworu kwasu**). Zlewkę wraz z roztworem umieść w łaźni chłodzącej, zawierającej pokruszony lód z chlorkiem wapnia. Co obserwujesz? Czy obserwowana reakcja jest egzo- czy endoenergetyczna.

8 Ćwiczenie 5

8.1 Kataliza – wstęp teoretyczny

8.1.1 Katalizatory i inhibitory

Jak już wspomniano w paragrafie poświęconym kinetyce reakcji na wartość stałej szybkości, obok takich czynników jak temperatura czy charakter środowiska, wpływa obecność substancji zwanych katalizatorami. Katalizatorami nazywamy substancje chemiczne które zmieniają szybkość reakcji chemicznych nie ulegając zużyciu podczas przebiegu reakcji. W obecności katalizatora bariera energetyczna, jaką jest niezbędna w celu wytworzenia kompleksu aktywnego energia aktywacji, ulega obniżeniu i większa ilość cząsteczek w mieszaninie reakcyjnej posiada energię kinetyczną wystarczającą do zajścia zderzenia efektywnego, w następstwie którego zachodzi reakcja chemiczna (linia pogrubiona na wykresie poniżej). W rezultacie większej ilości zderzeń efektywnych, szybkość reakcji ulega zwiększeniu.



Katalizator należy odróżnić od induktora, który również wywołuje i przyspiesza reakcję chemiczną jest jednak w procesie indukcji zużywany. Przykładem induktorów mogą być związki łatwo wytwarzające wolne rodniki, inicjujące reakcje łańcuchowe.

Jakkolwiek główną rolę odgrywają katalizatory przyspieszające reakcje chemiczne, tzw. katalizatory dodatnie, znane są również katalizatory ujemne, inaczej inhibitory, zmniejszające szybkość reakcji. Efekt ten wynika ze zwiększenia wartości energii aktywacji reakcji. Podobnie, rozróżnić należy inhibitory od substancji których działanie polega na wychwytywaniu reaktywnych indywiduów (np.: wolnych rodników, karbokationów), przez co reakcja zostaje zahamowana. Substancje te, podobnie jak induktory (inicjatory), są zużywane w procesie reakcyjnym. Stężenia katalizatora lub inhibitora, niezbędne do wyraźnej zmiany szybkości reakcji jest na ogół bardzo niewielkie, kilka do kilkunastu rzędów wielkości mniejsze niż stężenie reagentów.

8.1.2 Kataliza homogeniczna, heterogeniczna i autokataliza.

Proces katalityczny zachodzić może w układzie jednofazowym lub wielofazowym. W pierwszym przypadku katalizator tworzy fazę wspólną z mieszaniną reakcyjną. Proces taki nazywamy katalizą homogeniczną. W przypadku gry proces katalityczny zachodzi na granicy faz pomiędzy powierzchnią

katalizatora i reagentami mamy do czynienia z katalizą heterogeniczną. Wszystkie znane katalizatory heterogeniczne są substancjami stałymi, często o bardzo rozbudowanej powierzchni właściwej. Katalizy heterogeniczne nie należy mylić z katalizą przeniesienia międzyfazowego. Zjawisko to zachodzi na granicy dwóch nie mieszających się ze sobą cieczy lub cieczy i nierozpuszczalnego w niej ciała stałego, jednakże katalizator jest w tym przypadku rozpuszczony w mieszaninie reakcyjnej, a jego funkcja polega na przenoszeniu cząsteczek reagentów przez granicę faz.

Pomimo iż katalizatory heterofazowe nie zmieniają w procesie katalitycznym swojego składu chemicznego, może mieć miejsce zmiana ich struktury fizycznej (zmiana formy krystalograficznej, pojawienie się defektów sieciowych, przejście w formę amorficzną bądź, przeciwnie, tworzenie krystalitów)

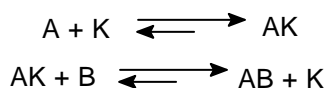
Ciekawym przypadkiem są reakcje autokatalityczne, w których katalizatorem reakcji są jej produkty. Biegająca początkowo wolno reakcja ulega zatem coraz większemu przyspieszeniu.

8.1.3 Mechanizm procesów katalitycznych

Chociaż mechanizm działania wielu katalizatorów nie został dotychczas należycie wyjaśniony a katalizatory do poszczególnych reakcji dobiera się eksperymentalnie, kataliza odgrywa doniosłą rolę w chemii. Większość procesów technologicznych stosowanych w przemyśle to właśnie reakcje katalityczne.

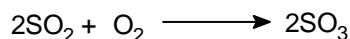
W przypadku katalizy heterogenicznej pierwszym etapem procesu katalitycznego jest zjawisko adsorpcji fizycznej lub chemicznej reagentów na powierzchni katalizatora. Przyjmuje się, że powierzchnia katalizatorów tego typu jest niejednorodna, a zjawisko katalizy ma miejsce na istniejących na niej centrach aktywnych. Pierwszym efektem adsorpcji substratów jest zwiększenie ich stężenia w bezpośrednim sąsiedztwie katalizatora, co już przyczynia się do wzrostu szybkości reakcji. Dalszym efektem jest deformacja chmury elektronowej cząsteczek substratu, co prowadzi do rozerwania wiązań w cząsteczce (np.: rozbicie cząsteczki H₂ na pojedyncze atomy na powierzchni katalizatora niklowego). W przypadku chemisorpcji cząsteczki reagentów tworzą wiązania z atomami katalizatora efektem czego jest całkowita zmiana ich reaktywności. Wiązania w molekułach substratów są rozrywane, a cząsteczki przechodzą w nowe, pośrednie indywiduala, istniejące jako jednocząsteczkowa warstwa na powierzchni katalizatora. Potem, w procesie desorpcji tworzą się nowe wiązania, prowadzące do tworzenia się cząsteczek produktów.

W katalizie homogenicznej katalizator reaguje z cząsteczkami jednego z substratów, tworząc produkt pośredni, atakujące następnie cząsteczkę drugiego substratu, z odtworzeniem molekuly katalizatora (patrz wykres). Proces ten można zapisać schematycznie jako:

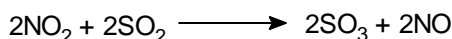
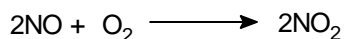


Przykładem katalizy homogenicznej może być utlenianie tlenku siarki(IV) do tlenku siarki(VI). Pod nieobecność katalizatora proces ten przebiega powoli. Użycie tlenku azotu(II) jako katalizatora przyspiesza znacznie ten proces.

1. Niekatalizowane utlenianie (proces powolny)



2. Katalizowane utlenianie (proces szybki)



Procesy katalityczne odgrywają olbrzymią rolę, zarówno w przemyśle chemicznych, ochronie środowiska jak i w organizmach żywych (procesy enzymatyczne).

8.2 Kataliza i termodynamika chemiczna – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z zagadnieniem katalizy homo- i heterogenicznej oraz z procesami endo- i egzoenergetycznymi.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Szybkość reakcji chemicznej, energia aktywacji, wpływ katalizatora na szybkość reakcji, kataliza i jej rodzaje, katalizator a inicjator, inhibitor, termodynamika, równanie termodynamiczne, energia wewnętrzna, parametry stanu, funkcje stanu, ciepło reakcji, prawo Hessa, jednostki ciepła.

ODCZYNNIKI

3% $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	CaO
5% CuSO_4	MnO_2	$\text{Ba}(\text{OH})_2$
0,001 M KMnO_4	Pt drut	NH_4SCN
3% H_2O_2	Cu drut	mocznik
NH_4OH	MnCl_2	błękit bromotymolowy
$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	H_2SO_4 stęż.	

UWAGA: Wodorotlenek amonu, tlenek wapnia oraz kwas siarkowy i szczawiowy są silnie żrące. Wodorotlenek baru jest toksyczny. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Azotan srebra jest substancją palącą.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

10 cm³ 3% roztworu tiosiarczanu sodu

100 cm³ 2% roztworu kwasu szczawiowego

OPIS ĆWICZENIA

a. Kataliza heterogeniczne

I.

Do trzech probówek wprowadź po 2 cm³ 3% roztworu nadtlenu wodoru. Do pierwszej probówki dodaj szczyptę MnO_2 , do drugiej wrzuć kawałek drutu platynowego. Zawartość trzeciej probówki służy do porównania. Obserwuj różnice w szybkości wydzielania się gazu.

UWAGA: Myjąc probówki nie wyrzuć drutu platynowego do zlewu.

II.

W probówce przygotuj roztwór zawierający równe objętości 3% nadtlenu wodoru i roztworu amoniaku o stężeniu 2 M. Po wymieszaniu do roztworu wprowadź drut miedziany. Zaobserwuj różnicę w wydzielaniu się gazu w obecności i pod nieobecność miedzi.

b. Autokataliza

Do dwóch zlewek wlej po 25 cm³ 2% roztworu kwasu szczawiowego. Do obu powoli wlej, mieszając roztwór, po 0,7 cm³ stężonego kwasu siarkowego a następnie dodaj 8 cm³ 0,001 M roztworu KMnO_4 . Do jednej ze zlewek wrzuć kryształek chlorku manganu(II). Po zamieszaniu roztworów zaobserwuj czas zaniku barwy w obu zlewkach. Zapisz równania reakcji.

c. Kataliza homogeniczna

Do dwóch probówek nalej po około 5 cm³ roztworu siarczanu żelaza(III) i amonu o stężeniu 3%. Do jednej z nich dodaj 2 krople 5% roztworu siarczanu miedzi(II). Do obu probówek nalej szybko po 5 cm³ 3% roztworu tiosiarczanu sodu. Po wymieszaniu zawartości zmierz czas odbarwienia się roztworów. Zapisz równania reakcji.

d. Katalityczne utlenianie amoniaku

Po kolbki stożkowej o pojemności 100 cm³ wlej stężony amoniak (tak aby utworzył około na dnie warstwę o grubości 1 cm). Kolbkę przykryj małą zlewką i wstaw do ciepłej wody (ok. 50⁰ C). Po ok. 5 minutach wyjmij kolbę z łaźni wodnej. W płomieniu palnika rozgrzej spiralną z drutu platynowego do czerwoności i wprowadź do kolby. Wytlumacz zachodzące zjawisko.

e. Enzymatyczny rozkład mocznika

Przygotuj 100 cm³ 10% wodnego roztworu mocznika. 10 g nasion soi lub pestek dyni starannie rozdrobnij i podziel na dwie równe części. Jedną połowę umieść w probówce, dodaj kilka mililitrów wody i ogrzewaj do wrzenia w płomieniu palnika przez 2 minuty. Do trzech małych zlewek wlej po ok. 30 cm³ otrzymanego roztworu mocznika i do każdej z nich dodaj kilka kropli roztworu błękitu bromotymolowego. Pierwszą zlewką pozostaw jako kontrolną, do drugiej wsyp utarte nasiona, do trzeciej wlej zawiesinę nasion przegotowanych. Co obserwujesz?

f. Reakcja tlenku wapnia z wodą.

W zlewce o pojemności 250 cm³ umieść 50 g CaO. W zlewce umocuj termometr tak, aby zbiorniczek rtęci dotykał dna naczynia. Następnie dodaj 15 ml wody destylowanej. Zaobserwuj procesy zachodzące podczas reakcji oraz zapisz równania.

UWAGA: Reakcję prowadź pod dygestorium. Załóż okulary ochronne. CaO i produkt jego reakcji z wodą działają parząco na skórę.

g. Reakcja wodorotlenku baru z rodankiem amonu.

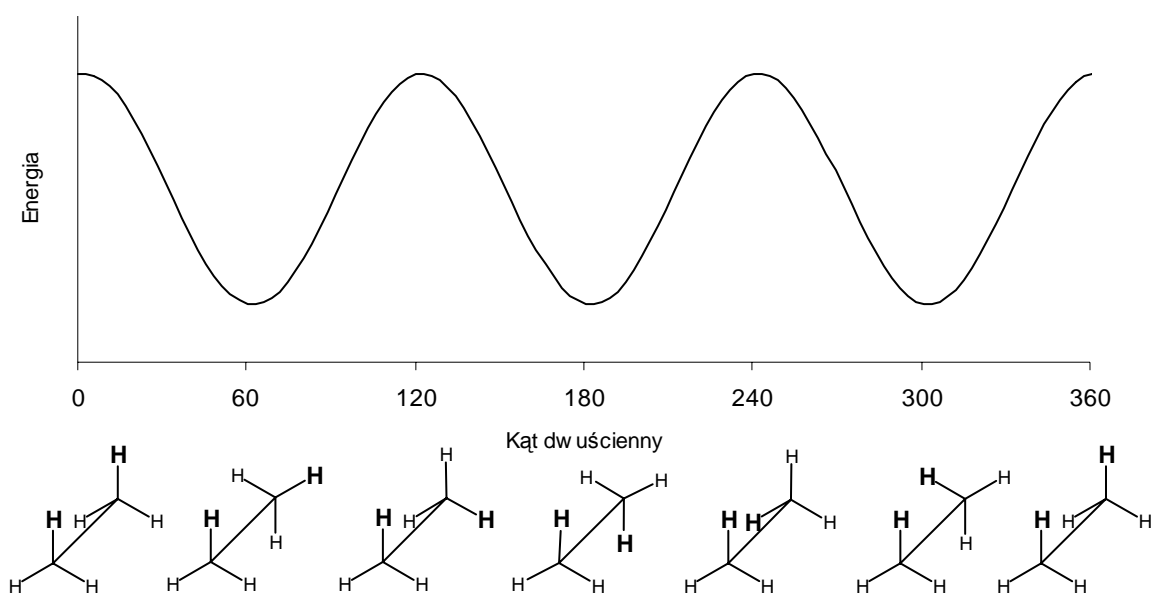
W zlewce o pojemności 200 cm³ umieść 15 g wodorotlenku baru i wymieszaj go dokładnie z 15 g rodanku amonu. W zlewce umieść termometr. Obserwuj zachodzące zmiany.

UWAGA: Podczas reakcji wydzielają się niewielkie ilości amoniaku. Reakcję prowadź pod wyciągiem.

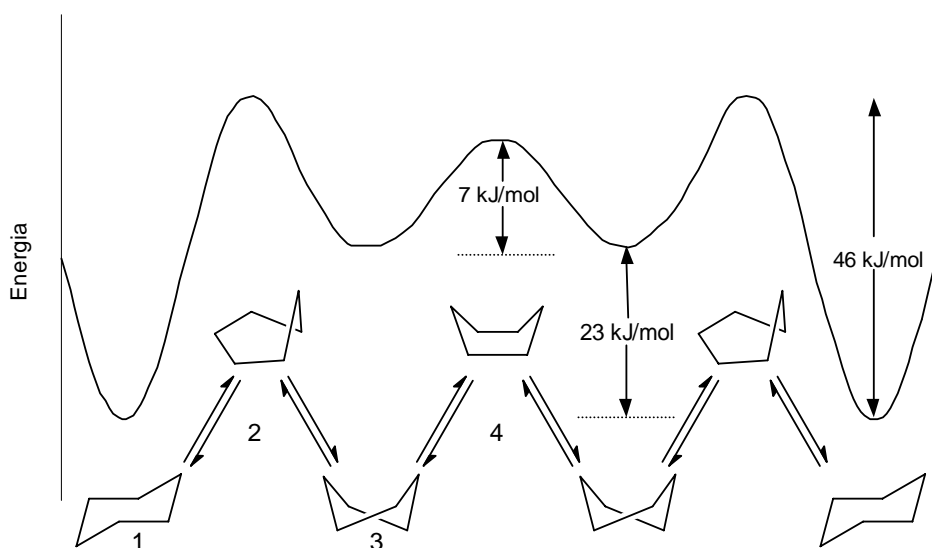
9 Izomeria

Zjawisko polegające na występowaniu związków chemicznych o jednakowym składzie chemicznym i tej samej masie cząsteczkowej (a co za tym idzie, tym samym wzorze sumarycznym), lecz różniących się ułożeniem atomów w cząsteczce lub przestrzeni nazywamy izomerią. Rozróżniamy trzy zasadnicze typy izomerii:

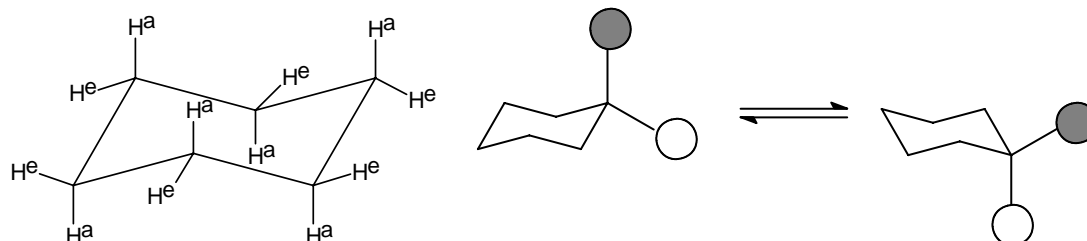
- ❖ konformeria – typ izomerii, związany z nierównocześnieścią energetyczną indywidualnych związków związanych z rotacją wokół wiązań pojedynczych. Z nieskończonej ilości konformacji wyróżnia się najtrwalszą, w przypadku której oddziaływania pomiędzy podstawnikami (lub ich brak) prowadzą do najmniejszej energii układu, oraz najmniej trwałą, w której energia, na skutek oddziaływań sterycznych i elektronowych, osiąga maksimum. Dla etanu proces rotacji wokół wiązania C-C powoduje następujące zmiany energii:



Kątom 0° , 120° , 240° odpowiada konformacja, w której protony leżą na jednej linii. Sytuacji tej nazywanej naprzeciwległą, inaczej synperiplanarną, odpowiada maksimum energii (jest najmniej trwała). Konformacje najbardziej trwałe odpowiadają kątom dwuściennym wynoszącym 60° , 180° i 300° . Nazywamy je naprzemianległymi (antyperiplanarnymi), gdyż atomy wodoru są od siebie maksymalnie oddalone. Wyróżniamy zatem dwie, skrajnie różne konformacje. Oczywiście, dla podstawionych pochodnych etanu lub węglowodorów o dłuższych łańcuchach, wyróżniamy więcej konformerów. Z izomerią konformacyjną mamy również do czynienia w przypadku cykloalkanów.



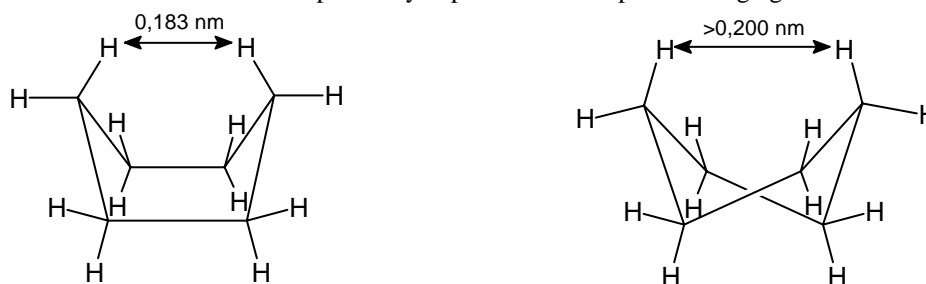
W cykloheksanie zaobserwować możemy 4 konformery. Najtrwalszy, o najniższej energii, nazywamy krzesłowym (1), mniej trwałe są konformery łodziowy (4) i zdeformowany (skręcony) łodziowy (3), najmniej trwałym, półkrzesłowym (wyplaszczonym krzesłowym) (2). Konformacja krzesłowa jest najuboższa energetycznie z powodu braku naprężeń, oraz z faktu że wszystkie protony znajdują się w położeniach naprzemianległych. Atomy wodoru (lub podstawniki) w konformerze krzesłowym dzielimy na aksjalne (H^a), znajdujące się w osi prostopadłej do płaszczyzny pierścienia, oraz ekwatorialne (H^e), leżące, w przybliżeniu, w płaszczyźnie cząsteczki. Efektem szybkiej przemiany konformacyjnej jest, w przypadku niepodstawionych i wielu podstawionych pochodnych cykloheksanu, nierozróżnialność położenia aksjalnego i ekwatorialnego (podstawnik aksjalny staje się, na skutek inwersji pierścienia, ekwatorialnym, i odwrotnie).



Warunkiem rozróżnialności tych form jest duża różnica energii pomiędzy pochodnymi z podstawnikami w obu położeniach. Można to na przykład wykazać dla t-butylocykloheksanu, w którym, ze względów sterycznych, obserwuje się wyłącznie ułożenie ekwatorialne (podstawnik tert-butyłowy jest grupą zajmującą dużą objętość, zatem jego ułożenie w pozycji aksjalnej jest energetycznie bardzo niekorzystne).



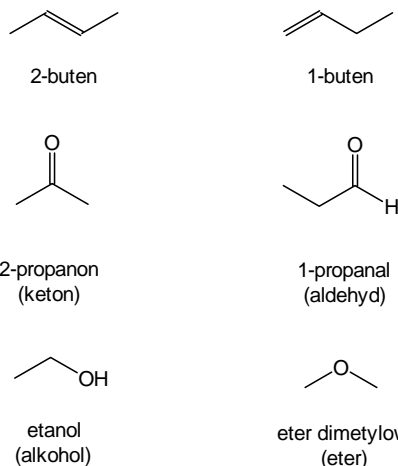
Drugim, wolnym od naprężeń sterycznych ułożeniem atomów w cząsteczce cykloheksanu jest konformacja łódkowa. Jest ona jednak mniej trwała z powodu niekorzystnego położenia atomów względem siebie. Szczególnie niekorzystnie ułożone są dwa protony w pozycjach 1 i 4, które muszą się do siebie zbliżyć na mniej niż 0,2 nm, co wywołuje pojawienie się silnych oddziaływań odpychających. Częściowe zniesienie tych sił zapewnia przyjęcie przez układ konformacji skręconej łódki, gdyż powoduje to oddalenie od siebie pozycji 1 i 4 oraz zbliżenie ułożenia pozostałych protonów do naprzemianległego.



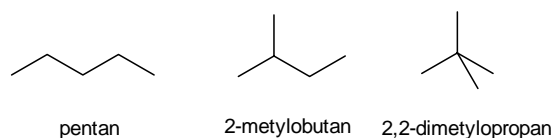
- ❖ izomeria konstytucyjna – zwana także izomerią strukturalną, jest zjawiskiem polegającym na różnicach we wzajemnym połączeniu atomów w cząsteczkach o tym samym wzorze sumarycznym.
- ❖ stereoisomeria – izomeria przestrzenna, jest zjawiskiem polegającym na tym, że związki o tym samym składzie i wzajemnym powiązaniu atomów różnią się jedynie przestrzennym ułożeniem atomów.

Każdy typ izomerii dzielimy na kilka podtypów.

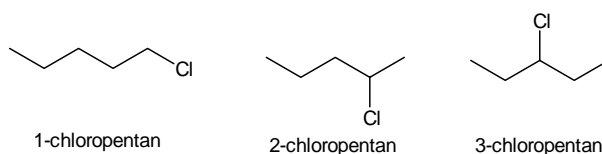
- ❖ metameria – jest typem izomerii konstytucyjnej, polegającym na występowaniu dwóch lub więcej związków o tym samym składzie chemicznym, ale różniących się grupami funkcyjnymi lub położeniem wiązań wielokrotnych w cząsteczce. Metamery wykazują na ogół duże różnice we właściwościach fizykochemicznych i są łatwe do rozdzielania. Nie obserwuje się nigdy równowag pomiędzy różnymi metamerami (nie przechodzą one spontanicznie jedne w drugie). Przykładem metamerii mogą być:



- ❖ izomeria łańcuchowa – jest typem izomerii konstytucyjnej, polegającym na występowaniu związków o tym samym składzie i grupach funkcyjnych ale o różnej budowie łańcucha węglowodorowego (prosty lub rozgałęziony), np.:

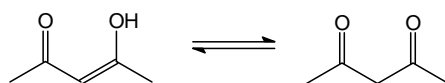


- ❖ izomeria podstawienia – trzeci typ izomerii strukturalnej, polegający na różnym położeniu grupy funkcyjnej w cząsteczce, np.:

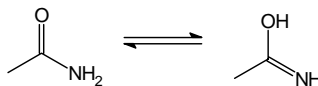


- ❖ tautomeria – jest osobliwym typem izomerii konstytucyjnej. Obejmuje związki różniące się grupami funkcyjnymi, lecz będących w stanie równowagi dynamicznej, zdolne do swobodnego przechodzenia jednych w drugie. Związana jest zwykle z przenoszeniem protonu (czasem innego podstawnika) i migracją wiązania podwójnego (ewentualnie otwieraniem i zamykaniem pierścienia). Najczęściej spotykane typy tautomerii to.:

1. Tautomeria keto-enolowa – zjawisko przekształcania się nienasyconego alkoholu (enolu) w związek karbonylowy (keton lub aldehyd). Procentowy udział tautomerów zależy od ich budowy i warunków środowiska, dla układu etanal/alkohol winylowy stosunek enol/aldehyd wynosi 10^{-7} , dla układu fenol/2,4-cykloheksadien-1-on aż 10^{14} .

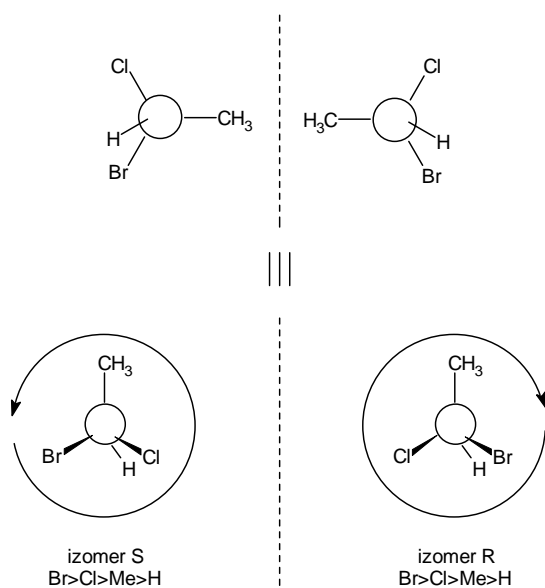


2. Tautomeria amido-imidowa – polega na występowaniu dynamicznej równowagi pomiędzy amidem a jego postacią imidową.



- ❖ izomeria *cis-trans* – typ izomerii przestrzennej, polegający na różnym rozmieszczeniu atomów lub grup funkcyjnych względem płaszczyzny odniesienia, w przypadku gdy atomy te są częścią sztywnej struktury. Izomery *cis-trans* różnią się właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Ten typ izomerii występuje powszechnie w związkach nienasyconych (alkenach) oraz pierścieniowych. W alkenach, na skutek zahamowania rotacji wokół wiązania C=C, rozpatrywać możemy ułożenie atomów względem płaszczyzny odniesienia przechodzącej przez wiązania podwójne, prostopadłej do płaszczyzny w której znajdują się podstawniki. O izomerze *cis* mówimy, jeśli obie grupy leżą po tej samej stronie płaszczyzny prostopadłej do wiązania podwójnego, o izomerze *trans*, jeśli leżą po różnych stronach.

Chiralność jest warunkiem koniecznym wystąpienia enancjomerii, zwanej także izomerią optyczną. Enancjomerem nazywamy każde z pary odbić lustrzanych danej molekuly. Posiadają one zdolność do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego (jeden z izomerów optycznych każdego związku skręca ją w lewo, oznaczamy go jako izomer *l* lub (-), drugi, oznaczany przez *d* lub (+), skręca ją o ten sam kąt w prawo). Izomery optyczne mają te same wzory strukturalne, różnią się jedynie ułożeniem atomów w przestrzeni. Mieszanina równej ilości enancjomeru lewo- i prawoskrętnego nie skręca płaszczyzny polaryzacji światła. Mówimy, że jest nieczynna optycznie, i nazywamy ją mieszaniną racemiczną bądź racematem. “Siała” skręcania płaszczyzny polaryzacji jest charakterystyczna dla danego związku i definiowana jest jako skręcalność właściwa substancji $[\alpha]_D$, określona przez wartość (kąt) skręcenia światła o długości fali 589 nm (linia D sodu) po przejściu przez roztwór substancji badanej o stężeniu 1 g/cm³ i grubości warstwy pomiarowej wynoszącej 10 cm. W celu nomenklatury enancjomerów wykorzystuje się wspomniane wyżej reguły pierwszeństwa podstawników CIP. W tym celu orientuje się cząsteczkę w przestrzeni tak, aby najmniej ważny podstawnik (np.: atom wodoru) znajdował się z tyłu w stosunku do obserwatora. Przez pozostałe trzy podstawniki prowadzi się strzałkę, zaczynając od grupy o największej, w świetle reguł CIP, ważności, kończąc na najmniej, spośród tej trójki, ważnym. Jeśli strzałka ta ma kierunek zgodny z kierunkiem ruchu wskazówek zegara, mówimy o izomerze R, jeśli przeciwny do ruchu wskazówek zegara, o izomerze S, np.:

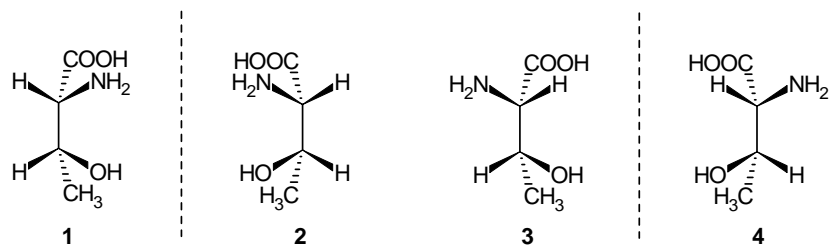


Położenie podstawników względem centrum chiralności, oznaczone przez R i S, nazywamy konfiguracją absolutną. Nadal stosuje się także, w stosunku do niektórych związków, nomenklaturę przyjętą w czasach gdy nie istniały metody pozwalające na ustalenie konfiguracji absolutnej wokół chiralnego atomu węgla. Przyjęto wówczas iż wszystkie związki, które można otrzymać z aldehydu (+)-glicerynowego na drodze reakcji biegnących według mechanizmów zapewniających niezmienną konfigurację, oznacza się jako D, natomiast otrzymane z lewoskrętnej formy tego aldehydu, jako L.

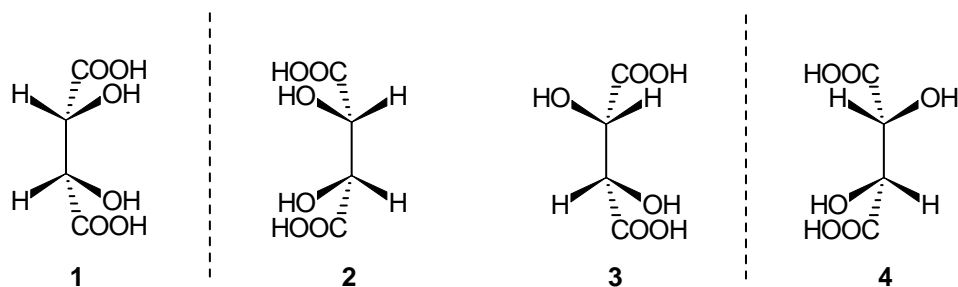
Związki chiralne występują powszechnie w przyrodzie, przy czym enancjomery różnią się na ogół właściwościami biologicznymi. Na przykład, wszystkie aminokwasy wchodzące w skład białek mają konfigurację L na atomie węgla α (co odpowiada konfiguracji absolutnej S, z wyjątkiem cysteiny i cystyny, gdyż grupa CH_2S ma pierwszeństwo nad podstawnikiem COOH), z kolei naturalne sacharydy występują w formie D co odpowiada konfiguracji R na atomie węgla najbardziej oddalonym od grupy karbonylowej.

Należy pamiętać, iż konfiguracja absolutna nie determinuje znaku skręcalności, tzn. R enancjomery różnych związków mogą być zarówno lewo jak i prawoskrętne. Co więcej, w przypadku wielu związków znak skręcalności oraz jej wielkość zależą od warunków środowiska w których prowadzono pomiar.

- ❖ diastereoizomeria – gdy związek zawiera więcej niż jedno centrum chiralności możliwe jest występowanie większej liczby stereoizomerów niż w przypadku związków z jednym atomem chiralnym, kiedy to mamy do czynienia tylko z dwoma izomerami (enancjomerami). Na przykład, dla aminokwasu treoniny możliwe są 4 stereoizomery:



Możemy wśród nich wyróżnić dwie pary enancjomerów (1 i 2 oraz 3 i 4, odpowiednio 2R,3R; 2S,3S oraz 2R,3S oraz 2S, 3R), ale żadna struktura z pierwszej pary nie jest nakładalną, ani nie jest odbiciem lustrzanym, związków z drugiej pary. Relację pomiędzy stereoizomerami, które nie są enancjomerami (np.: 2R,3R i 2R,3S) nazywamy diastereoizomerią. Diastereoizomery różnią się konfiguracją na jednym (w przypadku związków zawierających dwa centra stereogenne) lub więcej atomach węgla ale mają tę samą konfigurację na pozostałych atomach chiralnych. Liczba stereoizomerów związków o dwóch atomach asymetrycznych lecz posiadających płaszczyznę symetrii, wynosi trzy, co można prześledzić na pochodnych kwasu winowego.



Związki 3 i 4 (2S,3S i 2R,3R) są względem siebie enancjomerami, będąc zarazem diastereoizomerami związków 1 i 2 (2R,3S i 2S,3R). Jednakże bliższe przyjrzenie się strukturom 1 oraz 2 wykaże, iż obie cząsteczki są identyczne (oba wzory są nakładalne). Jest to efekt występowania płaszczyzny symetrii w poprzek wiązania C-C. Cząsteczki posiadające centra stereogenne a zarazem zawierają płaszczyznę symetrii, co powoduje ich achiralność, nazywamy formami *mezo*. Formy *mezo* są optycznie nieczynne. Diastereoizomery różnią się właściwościami chemicznymi i fizycznymi.

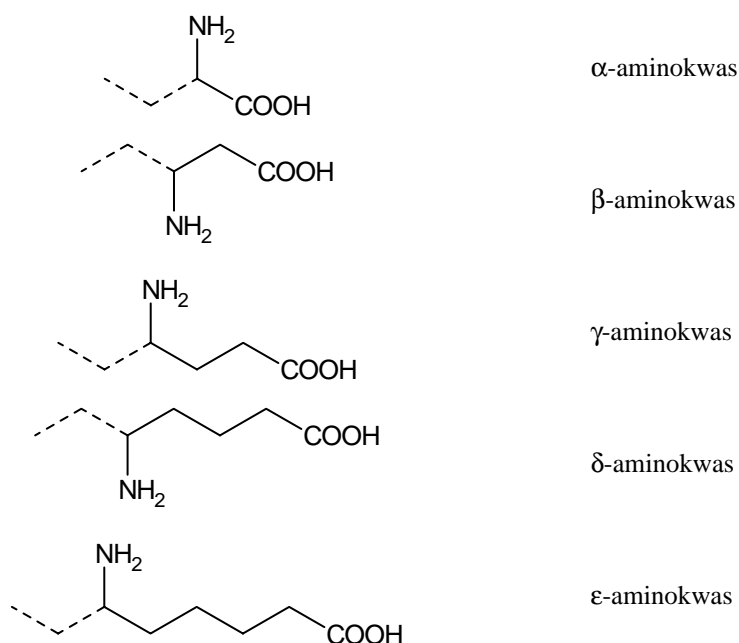
10 Ćwiczenie 6

10.1 Aminokwasy i białka – wstęp teoretyczny

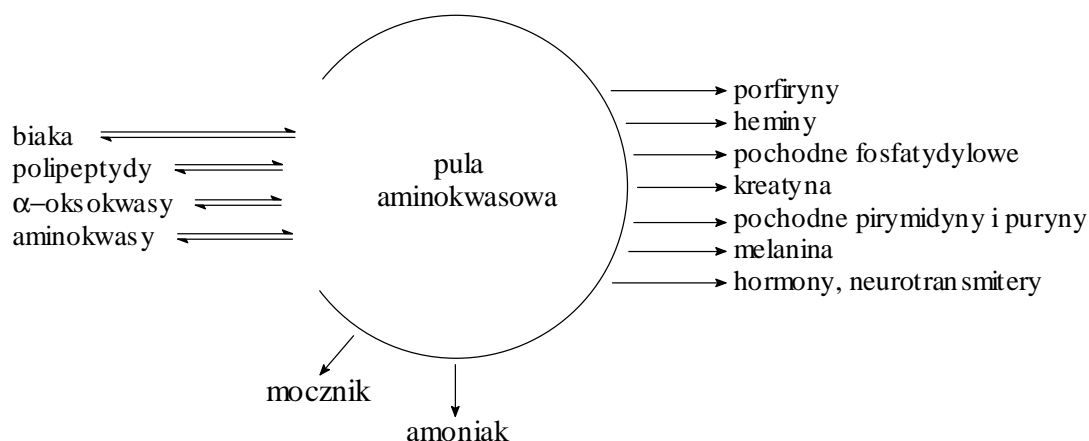
10.1.1 Aminokwasy

Badania mikroorganizmów w skamielinach wykazują, że aminokwasy istniały już trzy miliardy lat temu, wykrywa się je również w niewielkich ilościach w materiałach pochodzenia meteorytowego, jak również w skałach księżycowych.

Aminokwasy są prostymi związkami organicznymi. Na ich właściwości fizyczne i chemiczne wpływa obecność grupy aminowej i karboksylowej. W zależności od wzajemnego usytuowania tych podstawników w cząsteczce, mówimy o α -aminokwasach (grupa aminowa i karboksylowa przy tym samym atomie węgla), β -aminokwasach (grupy $-\text{NH}_2$ i $-\text{COOH}$ znajdują się przy sąsiednich atomach węgla), γ -aminokwasach (grupy funkcyjne oddalone o trzy węgle) itd. Pojęciem ω -aminokwas określa się związki zawierające grupę aminową przyłączoną do atomu węgla maksymalnie oddalonego od podstawnika karboksylowego.



Aminokwasy występujące w białkach to zazwyczaj kwasy α -aminokarboksylowe. Wiele aminokwasów, występujących w formie niezwiązanej, pełni ważne funkcje biochemiczne, biorąc udział w biosyntezie innych składników żywego organizmu, pełniąc funkcje regulatorowe i semiochemiczne (znamy ponad 150 naturalnych aminokwasów). Zasób wolnych aminokwasów w ustroju nosi nazwę puli aminokwasowej. Podstawowe przemiany aminokwasów ilustruje diagram:



Rośliny i wiele mikroorganizmów jest w stanie wytwarzać wszystkie aminokwasy potrzebne do budowy białek własnych komórek. Zwierzęta natomiast wytwarzają tylko 15 aminokwasów. Pozostałe muszą być zatem dostarczone wraz z pożywieniem lub wytworzone przez symbiotyczną mikroflorę jelitową. Aminokwasy takie nazywamy egzogennymi (w odróżnieniu od syntezowanych samodzielnie – endogennych). Liczba i rodzaj aminokwasów których dostarczanie wraz z pożywieniem jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu jest różne i zależne od stopnia rozwoju i stanu organizmu. Na przykład, niektóre aminokwasy potrzebne ssakom w okresie wzrostu, przestają być niezbędne dla osobników dorosłych. Zapotrzebowanie na niektóre z nich wzrasta w okresie ciąży i karmienia czy też w przypadku stanów patologicznych. Glicyna, aminokwas endogenny dla ssaków, musi być dostarczany wraz z pokarmem w przypadku ptaków, które nie są zdolne do jego biosyntezy. U przeżuwaczy wszystkie aminokwasy egzogenne są dostarczane, przy dostatecznym zaopatrzeniu w związki azotu, przez mikroorganizmy symbiotyczne bytujące w przewodzie pokarmowym.

Wzory ważniejszych aminokwasów białkowych zamieszczono w Tabeli 5.

Tabela 5. Aminokwasy białkowe

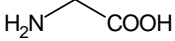
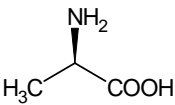
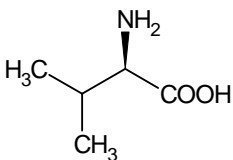
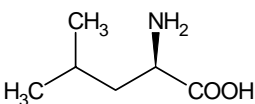
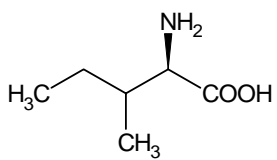
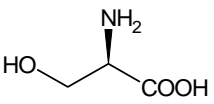
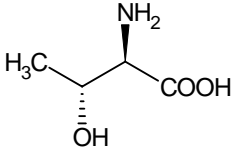
Aminokwasy	Nazwa	Oznaczenie trój i jednoliterowe	Struktura	Zawartość w wybranych białkach	Uwagi
Alifatyczne obojętne	glicyna	Gly G		fibroina jedwabiu 43,6 % żelatyna 25,7 %	endogenny; nie chiralny
	alanina	Ala A		fibroina jedwabiu 29,7 %	endogenny
	walina	Val V		elastyna 17,6 %	egzogenny
	leucyna	Leu L		albumina surowicy 12,8 % zeina 19,0 %	egzogenny
	izoleucyna	Ile I		albumina surowicy 2,6 % globulina 4,3 %	egzogenny
Alifatyczne hydroksyaminokwasy	seryna	Ser S		fibroina jedwabiu 16,2 %	endogenny
	treonina	Thr T		keratyna (człowiek) 8,5 % awidyna 10,5 %	egzogenny

Tabela 5. Aminokwasy białkowe (c.d.)

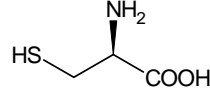
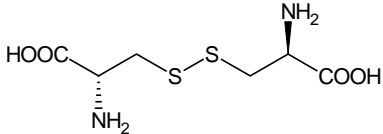
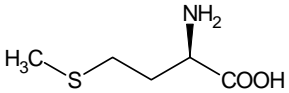
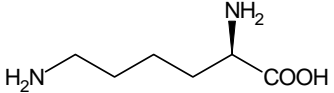
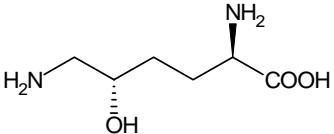
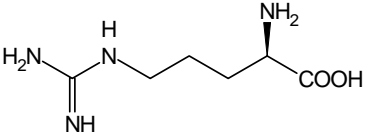
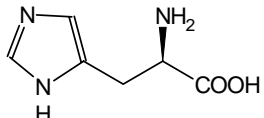
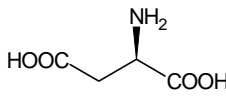
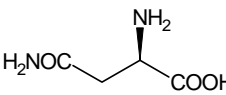
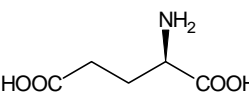
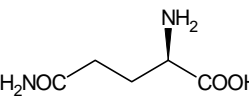
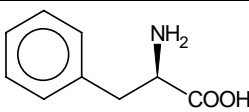
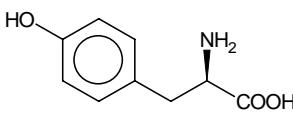
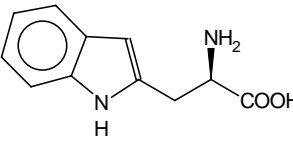
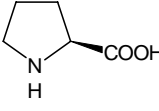
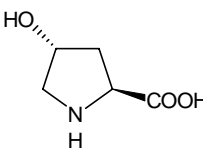
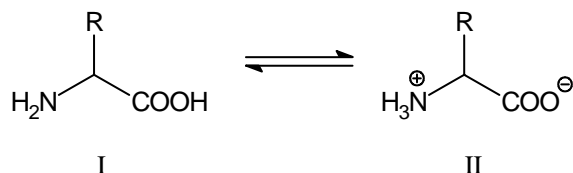
Aminokwasy zawierające siarkę	cysteina	Cys C		keratyna (człowiek) 14,4 % keratyna (pióra) 8,2 % keratyna (wełna) 11,9 %	endogenny
	cystyna	Cys-Cys		keratyna (człowiek) 18,0 %	endogenny
	metionina	Met M		γ-kazeina 4,1 % owoalbumina 5,2 %	egzogenny
Zasadowe	lizyna	Lys K		mioglobina 15,5 % albumina surowicy 12,8 %	egzogenny
	hydroksylizyna	Hyl		żelatyna 2,0 % kolagen 0,93 %	endogenny; aminokwas nie kodowany w DNA, powstaje w wyniku hydroksylowania lizyny wcześniej wbudowanej w peptyd
	arginina	Arg R		salmina 86,4 % żelatyna 8,3 % histony 15,9 %	egzogenny
	histydyna	His H		hemoglobina 7,0 %	egzogenny

Tabela 5. Aminokwasy białkowe (c.d.)

Kwaśne i ich monoamidy	kwask asparaginowy	Asp	D		globuliny (jęczmień) 10,3 %	endogeny
	asparagina	Asn	N			endogeny
	kwask glutaminowy	Glu	E		gliadyna (pszenica) 39,2 % gliadyna (żyto) 37,7 % zeina 22,9 %	endogeny
	glutamina	Gln	Q			endogeny
Aromatyczne i heteroaromatyczne	fenyloalanina	Phe	F		albumina surowicy 7,8 % γ-globulina 4,6 %	egzogeny
	tyrozyna	Tyr	Y		fibroina jedwabiu 12,8 %	egzogeny
	tryptofan	Trp	W		lizozym 10,6 % α-laktoalbumina 7,0 %	egzogeny
Iminokwasy	prolina	Pro	P		salmina 6,9 % kazeina 10,6 % żelatyna 16,3 %	endogeny
	hydroksyprolina	Hyp			żelatyna 13,6 % kolagen 12,8 %	endogeny; aminokwas nie kodowany w DNA, powstaje w wyniku hydroksylowania proliny wcześniej wbudowanej w peptyd

10.1.2 Właściwości kwasowo – zasadowe aminokwasów

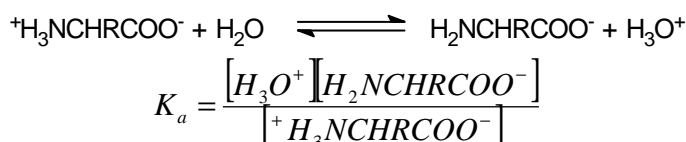
Aminokwasy, posiadające w swojej cząsteczce zarówno grupy kwasowe jak i zasadowe, mogą występować w formie jonu obojnego. Jonem obojnym nazywamy cząsteczkę obojętną, w obrębie której występuje grupa o ładunku dodatnim oraz grupa o ładunku ujemnym, przy czym oba ładunki równoważą się.



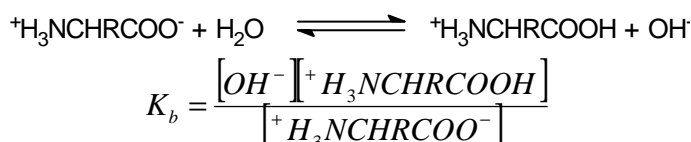
W przypadku glicyny stosunek formy (I) do (II) ma się jak 1 do 260000. Zachowanie takie determinuje wiele właściwości fizykochemicznych aminokwasów:

- aminokwasy, w przeciwieństwie do amin i kwasów karboksylowych o podobnej długości łańcucha są nielotnymi ciałami stałymi, topiącymi się z rozkładem w wysokich temperaturach
- aminokwasy są nierozpuszczalne w niepolarnych rozpuszczalnikach, rozpuszczają się natomiast w wodzie
- wartości stałych kwasowości i zasadowości dla grup $-\text{COOH}$ i $-\text{NH}_2$ są zaskakująco małe. Na przykład, glicyna ma $K_a = 1,6 \cdot 10^{-10}$ a $K_b = 2,5 \cdot 10^{-12}$, podczas gdy K_a dla większości kwasów karboksylowych wynosi około 10^{-5} natomiast K_b dla amin alifatycznych jest rzędu 10^{-4}
- wodne roztwory aminokwasów zachowują się jak roztwory substancji o bardzo dużym momencie dipolowym

W rzeczywistości zatem wartość K_a nie jest stałą dysocjacji grupy $-\text{COOH}$ lecz odnosi się do kwasowości protonowanej grupy aminowej $-\text{NH}_3^+$, i wyraża się wzorem:

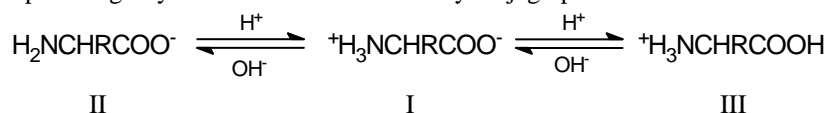


Wartość K_b zasady sprzężonej do kwasu o stałej dysocjacji K_a (jonu amoniowego $-\text{NH}_3^+$), czyli zasadowość grupy $-\text{NH}_2$, można obliczyć z zależności $K_a \cdot K_b = 10^{-14}$. Uzyskujemy zatem, dla wolnej grupy aminowej, wartość stałej dysocjacji rzędu 10^{-5} , co zgadza się z wartościami dla amin alifatycznych. Podobnie, wartość K_b glicyny (czy innego aminokwasu), nie odpowiada zasadowości grupy $-\text{NH}_2$, lecz odnosi się do zasadowości anionu karboksylanowego $-\text{COO}^-$, i wyraża się wzorem:



Podobnie jak poprzednio wyliczyć możemy kwasowość K_a kwasu sprzężonego z tą zasadą. Jest nim grupa karboksylowa, $-\text{COOH}$ i, po skorzystaniu z wzoru $K_a \cdot K_b = 10^{-14}$, uzyskujemy stałą dysocjacji grupy $-\text{COOH}$ wynoszącą około 10^{-3} , co nie jest sprzeczne z wartościami uzyskiwanymi dla kwasów karboksylowych (bliskie sąsiedztwo grupy aminowej, wyciągającej elektrony, zwiększa kwasowość)

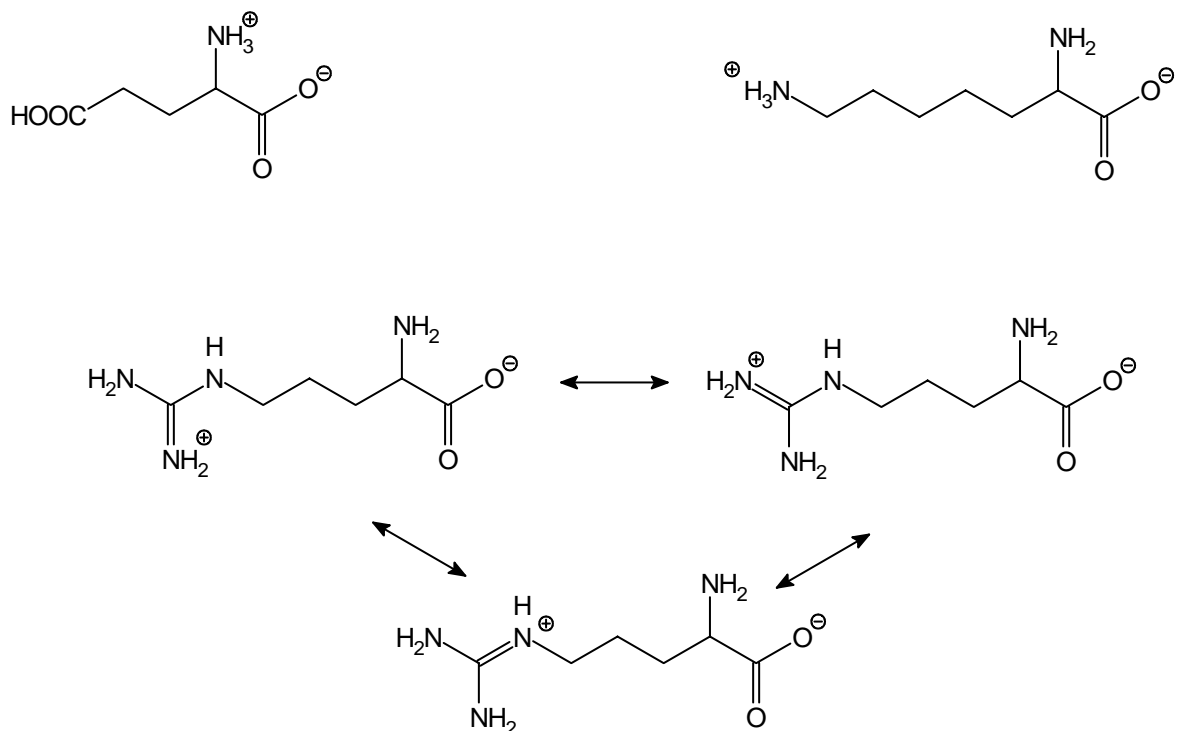
Zawartość poszczególnych form w roztworze zależy od jego pH:



Wzrost zasadowości powoduje zwiększenie udziału formy (II), wzrost kwasowości z kolei, wzrost stężenia formy (III).

W roztworach zasadowych, w których przeważa udział formy (II), cząsteczki aminokwasu migrują, po umieszczeniu próbki w polu elektrycznym, do anody. W środowisku kwaśnym, z powodu przewagi jonów (III), zachodzi migracja do katody. Przy pH przy którym udział form (II) i (III) pewnego aminokwasu jest równy nie obserwuje się żadnej migracji. Punkt ten nazywamy punktem izoelektrycznym danego aminokwasu (pH_i). W punkcie izoelektrycznym stężenie jonów obojnych jest największe. Współczynnik pH równy pH_i odbiega na ogół od wartości 7, odpowiadającej roztworowi obojętnemu. Na przykład, dla glicyny, obserwuje się przewagę właściwości kwasowych ($K_a > K_b$). Po rozpuszczeniu w wodzie, udział formy II będzie nieznacznie większy niż formy III, w związku z tym, aby osiągnąć stan równowagi, do roztworu należy dodać niewielką ilość kwasu. Stąd $\text{pH}_i \neq 7,0$ i punkt izoelektryczny znajduje się przy $\text{pH}=6,1$.

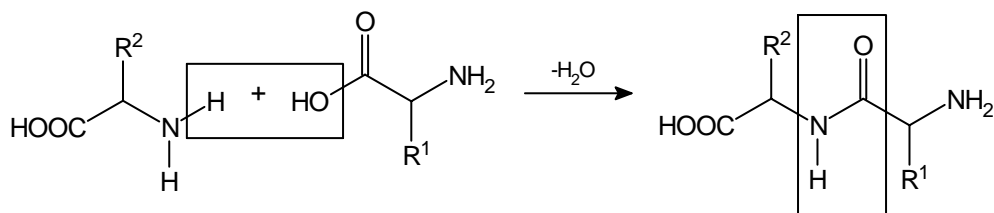
W aminokwasach kwaśnych lub zasadowych, w związku z obecnością dodatkowej grupy $-\text{COOH}$ lub $-\text{NH}_2$ mamy do czynienia z większą ilością równowag. Grupa aminowa w lizynie czy też guanidynowa w argininie są bardziej zasadowa niż grupy α -aminowa tych aminokwasów, zatem to one uczestniczą w tworzeniu jonu obojnego. Z kolei grupy α -karboksylowe wykazują silniejszy charakter kwasowy, co powoduje iż ich udział w tworzeniu form jonowych jest istotniejszy.



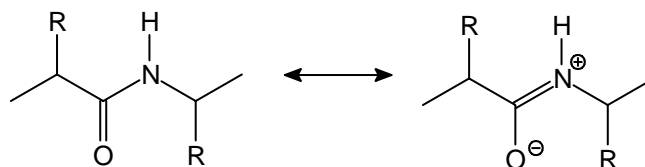
Charakter jonów obojnych lub polijonów wykazują także białka, ze względu na obecność wolnych grup aminowych i karboksylowych. Z tego powodu możemy mówić także o punkcie izoelektrycznym peptydów i białek.

10.1.3 Wiązanie peptydowe

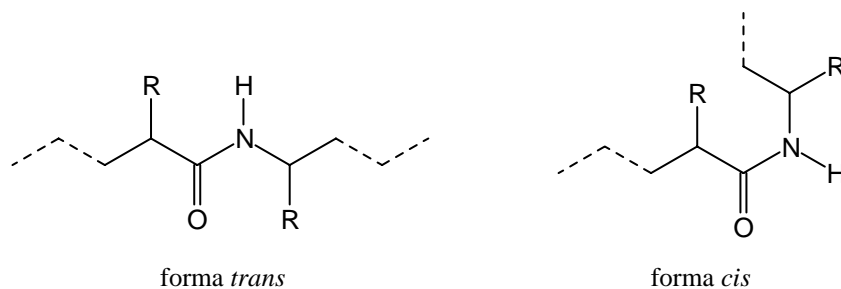
Aminokwasy są zdolne do tworzenia międzycząsteczkowych wiązań amidowych pomiędzy grupami α -aminową i α -karboksylową. Tak wytworzone wiązanie ($-\text{CO}-\text{NH}-$) nazywamy wiązaniem peptydowym.



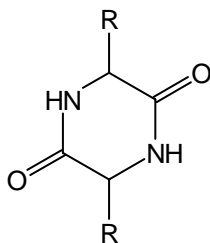
Długość wiązania $\text{C}-\text{N}$ w wiązaniu peptydowym jest krótsza niż normalne pojedyncze wiązanie $\text{C}-\text{N}$, np.: w aminach. Jest to efekt mezomerycznego charakteru wiązania peptydowego, które ma charakter częściowo podwójny (ok. 50%). Jest ono zatem płaskie, a dodatkowym efektem charakteru podwójnego jest utrudniona rotacja wokół tego wiązania, a co za tym idzie, stabilizacja dwu płaskich struktur, *cis* i *trans*.



mezomeria wiązania peptydowego



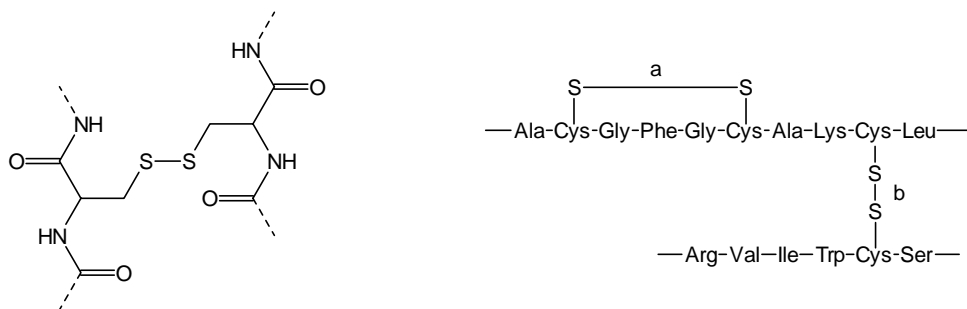
W naturalnych peptydach występuje wyłącznie forma *trans* wiązania peptydowego. Wynika to z oddziaływań sterycznych i elektrostatycznych, efektem których jest mniejsza energia takiego układu, a co za tym idzie, większa stabilność. Wiązanie *cis* występuje wyłącznie w niewielkich peptydach cyklicznych, w których z oczywistych względów, tego typu struktura jest wymuszona.



10.1.4 Peptydy, białka

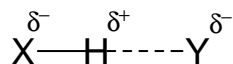
Peptydy są amidami utworzonymi w wyniku reakcji tworzenia wiązań peptydowych pomiędzy dwu lub więcej aminokwasami. W zależności od ilości reszt aminokwasowych w cząsteczce peptydu jest on nazywany dipeptydem (2 reszty), tripeptydem (3 reszty), tetrapeptydem (4 reszty), itd. aż do polipeptydów. Przyjmuje się, że cząsteczki poli(aminokwasowe) o masie do 10000 u są uznawane za peptydy, o masach większych – za białka. Właściwości tego typu połączeń zależne są wyłącznie od natury i porządku aminokwasów wchodzących w ich skład. Oprócz wiązań peptydowych za strukturę białek lub peptydów odpowiedzialne są także inne typy oddziaływań kowalencyjnych bądź niekowalencyjnych.

- wiązania disiarczkowe (disulfidowe) – są drugim, ważnym wiązaniem kowalencyjnym spotykanym w cząsteczkach peptydów, będących dla nich swoistym. Jest to efekt utleniania grup –SH reszt cysteiny wchodzących w skład łańcucha polipeptydowego. Rozróżniamy wewnątrzłańcuchowe (a) wiązania disiarczkowe, które występują pomiędzy resztami cysteiny w obrębie tego samego łańcucha peptydowego, oraz międzyłańcuchowe (b) wiązania disiarczkowe, łączące dwa oddzielne łańcuchy białkowe. Energia wiązania wynosi około $210 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.



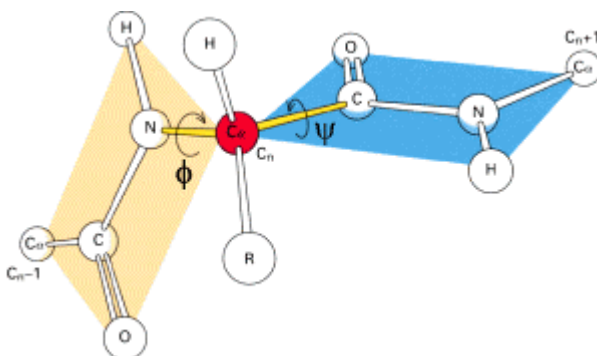
- wiązania wodorowe – są to oddziaływania międzycząsteczkowe lub wewnątrzcząsteczkowe atomu wodoru w grupie X–H (gdzie X jest atomem elektroujemnym, np.: O, N, S) z grupą elektrodonorową Y, typu $X \cdots H \cdots Y$. Grupę XH nazywamy protonodonorem, grupę Y, protonoakceptorem. Typowe wiązania wodorowe występujące w białkach, to: $\text{OH} \cdots \text{O}$; $\text{OH} \cdots \text{N}$; $\text{NH} \cdots \text{O}$; $\text{NH} \cdots \text{N}$. Jest to oddziaływanie w dużej mierze elektrostatyczne. Atom X, silnie elektroujemny, wywołuje polaryzację wiązania X–H, w skutek czego na atomie wodoru pojawia się cząstkowy ładunek dodatni. Elektroujemny atom Y charakteryzuje się cząstkowym ładunkiem ujemnym, co prowadzi z kolei do coulombowskiego oddziaływania atomu wodoru z atomem Y. W peptydach i białkach istnieje wiele elementów zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych, zarówno wewnątrzcząsteczkowych, odpowiedzialnych za wiele aspektów strukturalnych polipeptydów, jak również międzycząsteczkowych, odpowiedzialnych za strukturę czwartorzędową, wiązanie substratów do

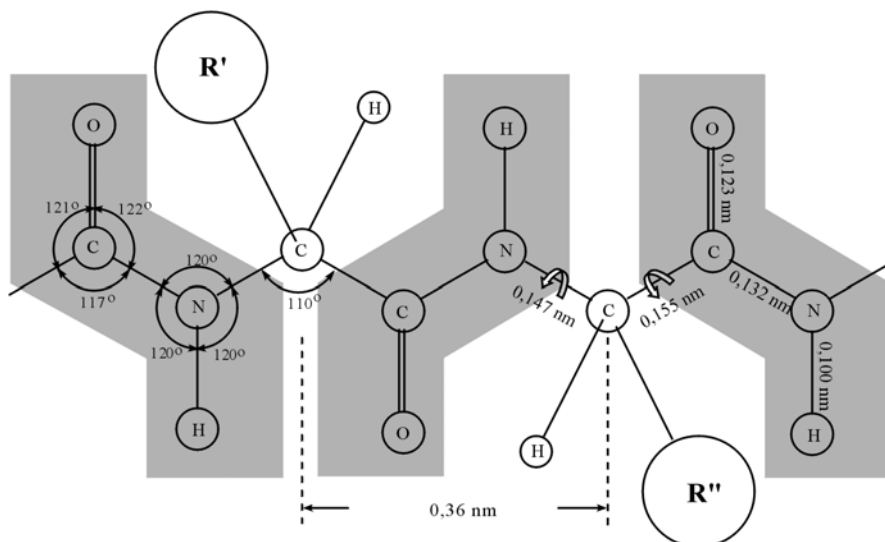
enzymów, oddziaływanie z receptorami, hydratację itd. W tworzeniu wiązań wodorowych uczestniczą zarówno grupy NH i CO wiązań peptydowych, jak też podstawniki protonodonorowe bądź akceptorowe łańcuchów bocznych aminokwasów. Energia tych wiązań wynosi 12-29 kJ*mol⁻¹.



- oddziaływania hydrofobowe – jest to oddziaływanie pomiędzy niepolarnymi resztami aminokwasów alifatycznych, będące efektem sił dyspersyjnych (wiązań Van der Waalsa). Jest szczególnie istotne w przypadku reszt waliny, leucyny i izoleucyny. Pomimo niewielkiej mocy biorą udział w stabilizacji struktury wielu białek. Dodatkowo oddziaływania hydrofobowe są wzmacniane na skutek oddziaływań z cząsteczkami wody. Wokół grup niepolarnych molekule wody tworzą „grona”, związane ze sobą wiązaniami wodorowymi. Zwiększa to lokalnie ich stopień uporządkowania i, co za tym idzie, zwiększa energię swobodną w otoczeniu reszt niepolarnych. Z drugiej strony wzajemna asocjacja reszt alifatycznych zmniejsza przestrzeń hydrofobową dostępną dla cząsteczek wody. To z kolei minimalizuje ich uporządkowanie, co powoduje wzrost entropii i spadek energii swobodnej, w efekcie stabilizując takie ułożenie podstawników. Moc wiązania 4-8 kJ*mol⁻¹.
- wiązania jonowe – są efektem oddziaływań elektrostatycznych zjonizowanych reszt aminowych i karboksylanowych. Stwarzają one dodatkową możliwość stabilizacji struktury peptydu. Mogą mieć charakter przyciągający (między grupami różnoimiennie naładowanymi) lub odpychający (między grupami naładowanymi równoimiennie). Moc wiązania 160-460 kJ*mol⁻¹.
- oddziaływania typu π - π – w białkach występują aminokwasy aromatyczne (Phe, Tyr, Trp, His). Oddziaływania elektronów π dwóch różnych reszt aminokwasowych stanowi słaby, aczkolwiek istotny, element determinujący strukturę białka.
- oddziaływania elektrostatyczne – pomiędzy grupami nie obdarzonymi całkowitym ładunkiem elektrycznym, lecz posiadającymi ładunki cząstkowe będące efektem polaryzacji wiązań, dochodzi często do oddziaływań coulombowskich, które, pomimo niewielkiej siły, grają pewną rolę w determinowaniu struktur białek.

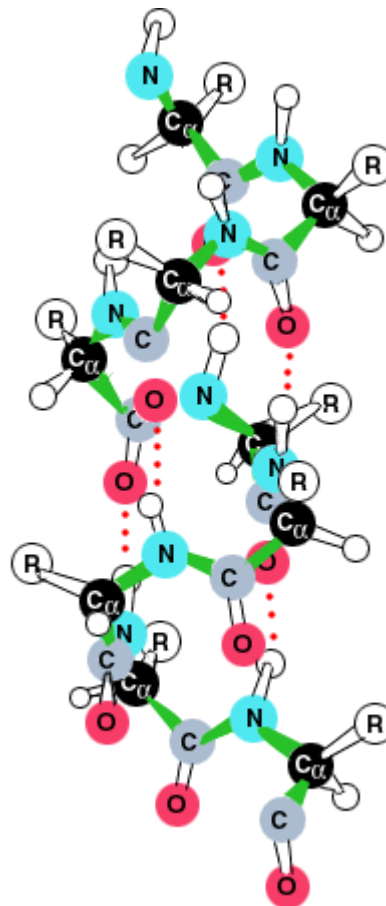
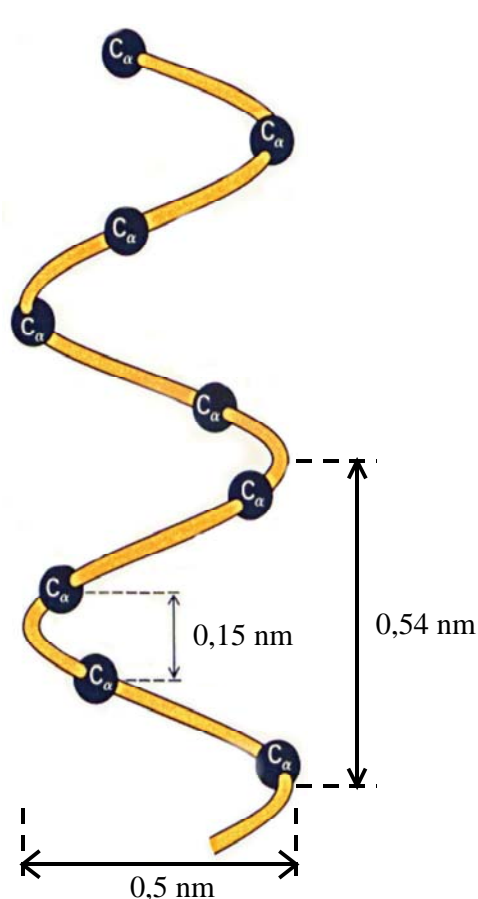
Pierwszorzędową strukturę peptydu (białka) określa liczba, budowa chemiczna i kolejność reszt aminokwasowych. Jest ona zatem determinowana przez wiązania peptydów pomiędzy aminokwasami. W ramach struktury pierwszorzędowej uwzględnia się także położenie wiązań disiarczkowych. Jak wiadomo wiązanie peptydowe, ze względu na częściowy charakter podwójny, jest płaskie. Może jednak mieć miejsce swobodny obrót wokół wiązań pomiędzy węglem alfa a grupą karbonylową i amidową. Struktura łańcucha polipeptydowego jest zatem półsztywna, pewne jej fragmenty są koplanarne, inne posiadają swobodę obrotu, stabilizacja jednej z możliwych konformacji jest efektem wiązań niekowalencyjnych. Konformację łańcucha opisuje się przez podanie wartości kątów dwuściennych wiązań pomiędzy C^α-CO (kąt ψ) oraz C^α-NH (kąt ϕ). Geometrię łańcucha polipeptydowego prezentują rysunki (kolorem zaznaczono obszary planarne).



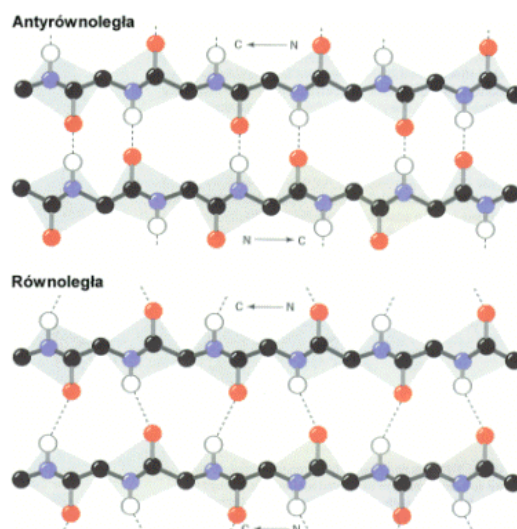
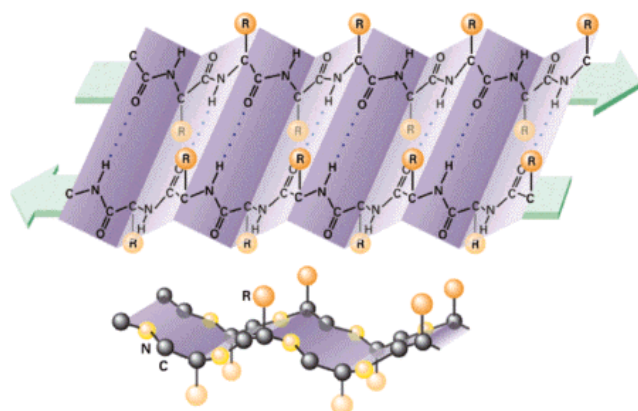


Efektom rotacji wokół wiązań C^{α} -N i C^{α} -CO jest przyjmowanie przez łańcuch polipeptydowy różnych konformacji przestrzennych. Pod pojęciem struktury drugorzędowej rozumiemy przestrzenne współzależności między aminokwasami w łańcuchu. W zależności od środowiska w którym znajduje się białko oraz oddziaływań niekowalencyjnych, łańcuch może przyjmować strukturę od całkowicie nieuporządkowanej do silnie skręconej helisy. Z punktu widzenia strukturalnej chemii protein istotne są dwie stabilne konformacje. Pierwszą z nich jest α -heliks. W strukturze tej łańcuchy boczne aminokwasów wystają na zewnątrz od centrum helisy, natomiast łańcuch główny (-NH-CO-C-NH-CO-) przyjmuje strukturę śrubową. Na jeden skok helisy, wynoszący 0,54 nm, przypada 3,6 reszty aminokwasowej, odstęp przypadający na jedną resztę wynosi 0,15 nm; średnica kanału utworzonego przez heliks wynosi 5 nm. Właściwości α -helisy są następujące:

- Strukturę α -helisy stabilizują międzyaminokwasowe wiązania wodorowe, występujące pomiędzy grupą NH wiązania peptydowego jednego aminokwasu a grupą CO aminokwasu oddalonego o cztery reszty w strukturze pierwszorzędowej. Należy pamiętać iż każde wiązanie peptydowe obszaru helikalnego uczestniczy w tworzeniu wiązań wodorowych.
- Zaangażowanie wszystkich atomów azotu i tlenu łańcucha peptydowego w ten typ oddziaływań znacznie zmniejsza charakter hydrofilowy tego regionu.
- Heliks prawozwojowy jest bardziej stabilny niż lewozwojowy.
- Helisa formuje się spontanicznie, ponieważ stanowi najbardziej stabilną konformację łańcucha polipeptydowego (najniższej energetycznej)
- Resztami destabilizującymi helisę są aminokwasy o elektrycznie nieobojętnych lub dużych łańcuchach bocznych, które na skutek oddziaływań elektrostatycznych lub sterycznych przeszkadzają w utworzeniu struktury helikalnej. Fragmenty helikalne kończy prolina lub hydroksypolina, która, na skutek wbudowania grupy aminowej w pierścień, nie posiada możliwości rotacji wokół wiązania C^{α} -N.

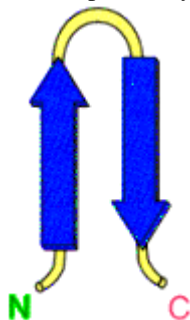


Drugim, strukturalnie i biochemicznie istotnym, typem struktury drugorzędowej jest tak zwana struktura β nazywana również harmonijką β . W konformacji tej łańcuch pozostaje prawie całkowicie rozprostowany. Struktura β nosi nazwę antyrównoległej (przeciw równoległej), jeśli dwa sąsiednie łańcuchy biegną w przeciwnych kierunkach. Jeśli łańcuchy podążają w tym samym kierunku mamy do czynienia ze strukturą równoległą, nie występującą w naturalnych peptydach. Struktura harmonijkowa może mieć postać kilku łańcuchów równoległych do siebie. Wiązania wodorowe, stabilizujące strukturę β , występują pomiędzy odległymi od siebie, w sensie struktury pierwszorzędowej, fragmentami cząsteczki, leżącymi równoległe do siebie. Mogą również tworzyć się między różnymi łańcuchami polipeptydowymi. Odległość sąsiednich aminokwasów wzdłuż osi cząsteczki wynosi 0,35 nm.

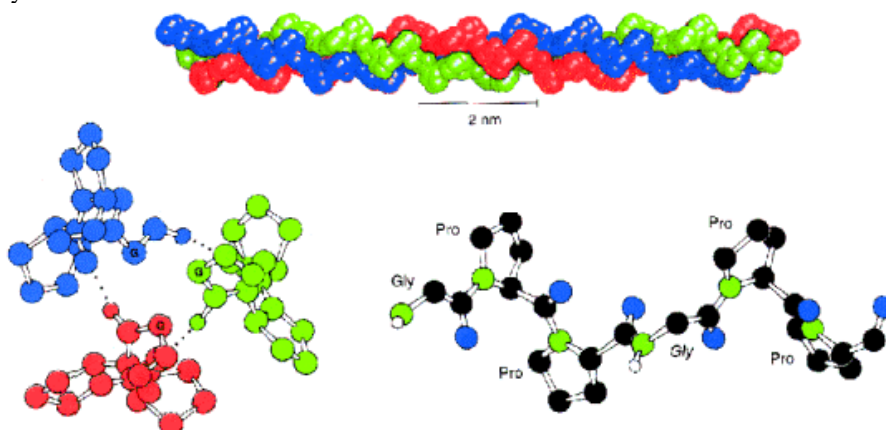


Ostre zmiany kierunku łańcucha peptydowego są możliwe dzięki tak zwanym zakrętom β (strukturom spinki do włosów), ciasnym pętłom, w których tlen grupy karbonylowej jednej reszty aminokwasowej tworzy wiązanie wodorowe z protonem amidowym aminokwasu oddalonego o 3 reszty do przodu. W zakrętach β często

występuje prolina i glicyna, pierwsza ze względu na strukturalne wymuszenie konformacji sprzyjającej zmianie kierunku, druga, gdyż podstawniki wodorowe ze względu na steryczne nie przeszkadzają w tworzeniu takiej konformacji a ponadto może działać jako giętki zawias pomiędzy zakretem a resztą peptydu.



Czasami do zagadnień związanych ze strukturą drugorzędową zalicza się tworzenie trimetycznych struktur helikalnych, występujących w cząsteczce kolagenu. Tworzą ją trzy łańcuchy polipeptydowe, zawierające w swojej cząsteczce regularnie powtarzające się sekwencje. Co trzecim aminokwasem peptydu jest glicyna, poprzedzające na ogół resztę prolina i często poprzedzona resztą hydroksyproliny. W obrębie pojedynczej nici nie tworzą się wiązania wodorowe, natomiast helikalność każdego z trzech łańcuchów jest determinowana przez odpychające oddziaływania pierścieni pirolidynowych i hydroksypirolidynowych wchodzących w skład Pro lub Hyp. Na jeden aminokwas przypada 0,286 nm a na jeden skręt helisy przypadają trzy aminokwasy. Tworzenie trójniciowej superstruktury determinowane jest z kolei przez oddziaływania wodorowe pomiędzy aminokwasami trzech różnych łańcuchów. Trzy jednakowe nici, skręcające się wokół siebie tworzą strukturę superhelikalnej liny, o dużej odporności mechanicznej i elastyczności. Struktura kolagenu jest czasami zaliczana do struktur czwartorzędowych.



Mówiąc o strukturze trzeciorzędowej, mamy na myśli ułożenie łańcucha białkowego, uorganizowanego już w strukturę drugorzędową (*alfa*-helisa lub *beta*-harmonijka) w przestrzeni. Ułożenie regionów lub domen względem siebie jest często trudne do rozgraniczenia od wzajemnego ułożenia aminokwasów, czyli od struktury drugiego rzędu. Jednakże, pomimo nieostrej granicy, przyjmuje się, iż struktura trzeciorzędowa dotyczy fragmentów znacznie od siebie oddalonych w sensie budowy pierwszorzędowej. Istnieje wiele motywów strukturalnych, zliczanych do uporządkowania trzeciego rzędu, powtarzających się w wielu biologicznie ważnych peptydach. Struktura trzeciorzędowa jest determinowana przez oddziaływania kowalencyjne (mostki disiarczkowe) lub niekowalencyjne. Duże znaczenie w stabilizacji tej struktury odgrywa specyficzna forma oddziaływań hydrofobowych. Jest ona efektem oddziaływania reszt aminokwasowych z rozpuszczalnikiem. Ostateczna konformacja białek rozpuszczalnych w wodzie jest taka, że większość apolarnych reszt aminokwasowych koncentruje się we wnętrzu cząsteczki, wypychając z niej wodę, natomiast reszty polarne - niosące ładunek elektryczny wysuwają się na zewnątrz i ulegają hydratacji. Cząsteczka białka jest otoczona warstwą związanej wody hydratacyjnej.

Struktura czwartorzędowa jest charakterystyczna dla białek oligomerycznych. (zawierających kilka podjednostek). Podjednostki białek są to niezależnie sfaldowane łańcuchy polipeptydowe lub całe białka, będące tylko składnikiem dużego kompleksu białkowego. Nazywamy je także monomerami lub protomerami. Jeśli podjednostki mają tę samą strukturę pierwszorzędową, mówimy o homogennej strukturze czwartorzędowej oligomeru, jeśli zaś podjednostki różnią się między sobą, mamy do czynienia ze strukturą heterogenną. Oddziaływania pomiędzy poszczególnymi łańcuchami są efektem sił elektrostatycznych, wiązań wodorowych, wiązań jonowych czy Van der Waalsa. Niektórzy zaliczają tutaj również oddziaływania disiarczkowe, jednakże przyjmuje się, iż w tworzeniu struktur czwartego rzędu mogą uczestniczyć wyłącznie wiązania niekowalencyjne,

a podjednostki muszą, przynajmniej potencjalnie, dać się rozdzielić bez niszczenia wiązań kowalencyjnych. W tworzeniu się form oligomerycznych wydatnie uczestniczą również oddziaływania o naturze hydrofobowej. Powierzchnie styku poszczególnych podjednostek oligomeru zawierają dużą ilość aminokwasów niepolarnych. Efektem tego jest "sklejenie" podjednostek i "uszczelnienie" przed wniknięciem rozpuszczalnika. Białka oligomeryczne odgrywają szczególną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowej ponieważ monomery, na skutek oddziaływań z czynnikami środowiska, mogą przyjmować różne ułożenie względem siebie, co często prowadzi do istotnych zmian w ich właściwościach. Najmniejsze białka oligomeryczne zawierają po 2 podjednostki (dimery, np.: laktoglobulina), największe, po kilka tysięcy cząsteczek monomeru (wirus mozaiki tytoniowej, 2130 podjednostek).

10.1.5 Klasyfikacja protein

Przyjmuje się kilka różnych sposobów klasyfikacji związków poli(aminokwasowych). Do ważniejszych należą następujące sposoby podziału: na podstawie rozpuszczalności, ze względu na kształt cząsteczek, ze względu na budowę, na podstawie funkcji fizjologicznych.

10.1.5.1 Podział białek ze względu na rozpuszczalność

Podział ze względu na rozpuszczalność należy do najstarszych prób klasyfikacji białek i jest nadal, choć w ograniczonym stopniu, stosowany w biochemii klinicznej, jednakże rozgraniczenia pomiędzy poszczególnymi klasami nie są ostre i przekonujące.

- ◆ **albuminy** – białka o niewielkich masach cząsteczkowych, łatwo krystalizujące, rozpuszczalne w wodzie i roztworach soli o pH mieszczącym się w przedziale 4-8,5. Nie zawierają żadnych szczególnych aminokwasów. Do grupy tej zaliczamy na przykład albuminy surowicy, laktoalbuminę, owoalbuminę i albuminy roślinne.
- ◆ **globuliny** – są białkami słabo rozpuszczalnymi w wodzie ale dobrze rozpuszczalnymi w roztworach soli. W swojej strukturze nie zawierają żadnych szczególnych aminokwasów. Mają większe masy molowe niż albuminy. Do klasy tej zaliczyć można wiele białek plazmy, wiele enzymów, przeciwciał, białek mleka i roślinnych białek zapasowych (np.: edestina z konopi, zeina z kukurydzy, arachidyna z orzechów ziemnych, glicynina z soi).
- ◆ **prolaminy** – rozpuszczalne w 70-80% etanolu, nierozpuszczalne w wodzie i etanolu absolutnym. Są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Zawierają duże ilości kwasu glutaminowego i proliny. Przykładami mogą być gliadyna (pszenica i żyto) oraz hordeina (jęczmień). Nie ulegają koagulacji podczas ogrzewania.
- ◆ **histony** – rozpuszczalne w roztworach soli i kwasów organicznych zasadowe białka o małych masach molowych (100-250 reszt aminokwasowych). Spotyka się je we wszystkich tkankach organizmów eukariotycznych, gdzie stanowią istotny składnik chromatyny.
- ◆ **protaminy** – rozpuszczalne w wodzie i kwasach białka o niewielkich cząsteczkach. Są bardzo silnie zasadowe, zawierają duże ilości aminokwasów zasadowych: argininy i lizyny. Występują w dużych ilościach w spermie, zarówno w płynie nasiennym jak i samych plemnikach, jądrach komórkowych, krwinkach. Punkt izoelektryczny przypada na 9,8-12.
- ◆ **gluteiny** – nierozpuszczalne w wodzie, alkoholu i roztworach soli, rozpuszczalne w roztworach kwasów i zasad. Nie koagulują podczas ogrzewania. Występują w nasionach zbóż (aweniana w owsie, oryzeina w ryżu).
- ◆ **skleroproteiny** – nierozpuszczalne w wodzie, roztworach soli, kwasów i zasad, odporne na działanie enzymów białka występujące w organizmach zwierzęcych. Wzbogacone w glicynę, alaninę i prolinę. Należą do nich kolagen, elastyna, kreatyna, fibroina.

10.1.5.2 Klasyfikacja na podstawie kształtu

Na podstawie stosunku osiowego cząsteczki białka (stosunek długości do szerokości) możemy wyodrębnić dwie grupy. **Białka globularne**, dla których wartość tego stosunku jest mniejsza od 10 i na ogół nie przekracza 3-4, mają łańcuchy polipeptydowe silnie pofalowane i zwinięte. Należą do nich albuminy, globuliny osocza, insulina, wiele enzymów. **Białka włóknkowe (fibrylarne)**, dla których wartość stosunku osiowego jest większa niż 10, zawierają odcinki łańcuchów polipeptydowych zwiniętych śrubowo. Ich przedstawicielami są kolagen oraz kreatyna.

10.1.5.3 Klasyfikacja ze względu na budowę

Ogólnie, substancje białkowe podzielić możemy na dwie grupy: białka proste i białka złożone. Do pierwszej, nazywanej proteinami, zaliczamy te spośród białek, których cząsteczki są zbudowane wyłącznie z aminokwasów. Oczywiście jest to grupa szalenie zróżnicowana, którą możemy dzielić dalej, na przykład ze względu na rozpuszczalność czy funkcje. Do drugiej zaliczamy związki zbudowane z łańcuchów polipeptydowych oraz zawierające dodatkowo wbudowane substancje lub grupy niebiałkowe. Klasę tą nazywamy proteidami. Grupę niebiałkową nazywamy często także grupą prostetyczną, albo, jeśli łatwo oddysocjowuje od części białkowej, koenzymem. Grupa prostetyczna może być związana z komponentem białkowym w różnym stopniu, silniej lub słabiej, dzięki występowaniu różnego typu oddziaływań. Ze względu na różnorodność grup nieaminokwasowych proteidy dzielimy na:

- ◆ **fosfoproteidy** – są to białka zawierające resztę kwasu fosforowego, zwykle połączoną wiązaniem estrowym z grupą hydroksylową seryny lub, rzadziej, treoniny. Do grupy tej należy wiele ważnych fizjologicznie białek, na przykład kazeiny i witeliny. Stopień fosforylacji może być, w różnych białkach, różny.
- ◆ **chromoproteidy** – białka te zawierają chromoforową (barwną) grupę prostetyczną. Część barwna może mieć różną strukturę: karotenoidową, flawonoidową, porfiryновую i inne. Do ważnych chromoproteidów należą hemoproteidy, zawierające jako grupy prostetyczne porfirynowe kompleksy żelaza. Wiele białek z tej grupy pełni ważne funkcje w łańcuchu oddechowym.
- ◆ **lipoproteidy** – są kompleksami białek z lipidami. Pełnią ważne funkcje fizjologiczne, związane z transportem lipidów, sterydów i witamin lipofilnych w ustroju. Wchodzą w skład błon cytoplazmatycznych. Dzieli się je, w zależności od wielkości cząsteczek oraz proporcji białko/lipid, na kilka podgrup.
- ◆ **glikoproteidy** – są to pochodne białek, zawierające fragmenty oligosacharydowe przyłączone do łańcuchów bocznych niektórych aminokwasów wiązaniami glikozydowymi. Możliwe jest przyłączenie reszty cukrowej na kilka różnych sposobów:
 1. za pomocą wiązań O-glikozydowych do reszt hydroksylowych Thr, Ser lub Tyr
 2. poprzez wiązania N-glikozydowe do wolnych grup aminowych Lys lub reszt N-końcowych oraz azotu amidowego Asn i Gln
 3. poprzez wiązania estrowe z wolnymi resztami karboksylowymi aminokwasów kwaśnych oraz C-końcowych.

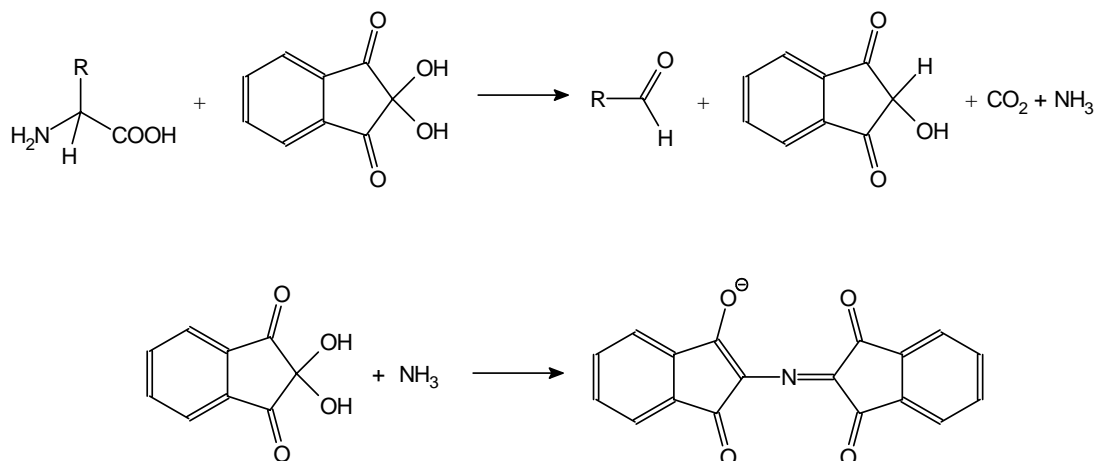
Fragmenty węglowodanowe zawierają głównie heksozy, heksozoaminy i kwas ślajowy. Łańcuchy oligosacharydowe są zwykle krótkie, zawierające 8-10 reszt sacharydowych. Glikoproteidy mogą zawierać jeden fragment węglowodanowy (np.: owoalbumina), znane są również takie, które zawierają znacznie większą ich ilość (np.: glikoproteid podszczękowy owcy zawiera 800 fragmentów oligosacharydowych). Łańcuchy cukrowe wprowadzane są do cząsteczek białka w fazie posttranslacyjnej przy udziale specyficznych glikozylotransferaz. Brak kontroli genetycznej na tym etapie prowadzi niekiedy do mikroheterogeniczności materiału. Glikoproteidy są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Są składnikami błon, enzymami, przeciwciałami, czynnikami grupowymi krwi, hormonami, wchodzą w skład śluzów, białek plazmy. Są często odpowiedzialne za transport aktywny.

- ◆ **nukleoproteidy** – są kompleksami kwasów nukleinowych i białek. Składnik białkowy ma na ogół charakter silnie zasadowy. Występują we wszystkich komórkach roślinnych jak i zwierzęcych, zarówno w jądrach komórkowych jak i w cytoplazmie. Odgrywają ważną rolę w replikacji DNA i kontroli genetycznej. Czystymi nukleoproteidami są fitofagi.
- ◆ **metaloproteidy** – są kompleksami metali z białkami. Zdolność wiązania jonów niektórych metali z proteinami jest efektem oddziaływań z grupami aminowymi, karboksylanowymi, tiolowymi i imidazolowymi. Najczęściej wiązany metalami są żelazo, miedź, chrom, mangan, molibden, cynk i wapń. Nie należy mylić metaloproteidów z chromoproteidami zawierającymi jony metali. W metaloproteidach wiązanie metalu odbywa się bezpośrednio z cząsteczką białka, w chromoproteidach jon związany jest z niebiałkowym ligandem, np.: porfiryną, a dopiero tak uzyskany kompleks wiąże się z łańcuchem polipeptydowym.

10.1.6 Reakcje aminokwasów i białek

10.1.6.1 Reakcja z ninhydriną

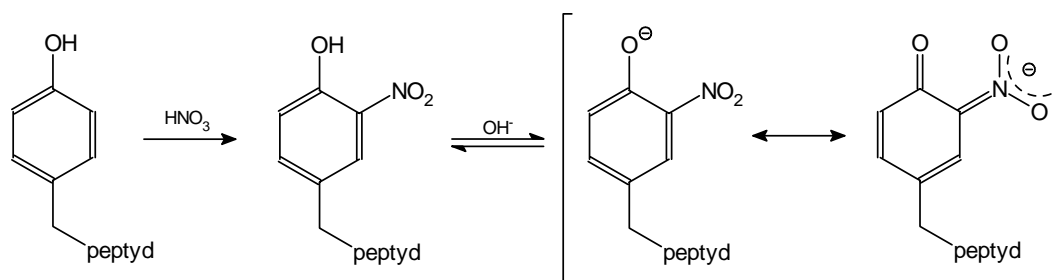
Wolne grupy aminowe aminokwasów reagują z ninhydriną z uwolnieniem amoniaku i dwutlenku węgla. Aminokwas w tych warunkach utlenia się do odpowiedniego aldehydu, natomiast ninhydryna, w obecności powstającego amoniaku, ulega redukcji do niebieskofioletowego barwnika.



Metoda ta, ze względu na dużą czułość, stosowana jest do spektrofotometrycznego oznaczania aminokwasów oraz do ich szybkiego wykrywania. Oczywiście podobną reakcję wykazują peptydy co wiąże się z obecności wolnych grup aminowych (podczas reakcji z peptydami nie wydzielą się CO₂). Reakcja ta nie jest specyficzna, ulegają jej również aminocukry i niektóre inne związki aminowe.

10.1.6.2 Odczyn ksantoproteinowy

Efektom działania na peptydy, zawierające aminokwasy aromatyczne, kwasem azotowym jest proces nitrowania reszt arylowych tyrozyny. Powstała pochodna nitrofenolu, jak wiele związków nitrowych, wykazuje żółte zabarwienie. Dodanie do próbki roztworu zasady, prowadzące do zalkalizowania środowiska, wywołuje zmianę barwy na pomarańczową, będącą efektem deprotonowania fenolu, przebiegającym z wytworzeniem intensywnie barwnego jonu fenolanowego (zjawisko podobne do mechanizmu działania niektórych wskaźników pH)

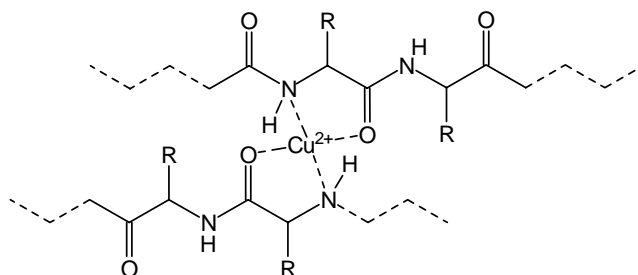


10.1.6.3 Odczyn Millona

W wyniku reakcji tyrozyny z kwaśnym roztworem azotanu(V) rtęci(II) tworzą się pochodne nitrofenoli, które w połączeniu z jonami Hg²⁺ wywołują ciemnoczerwone zabarwienie roztworu.

10.1.6.4. Odczyn biuretowy

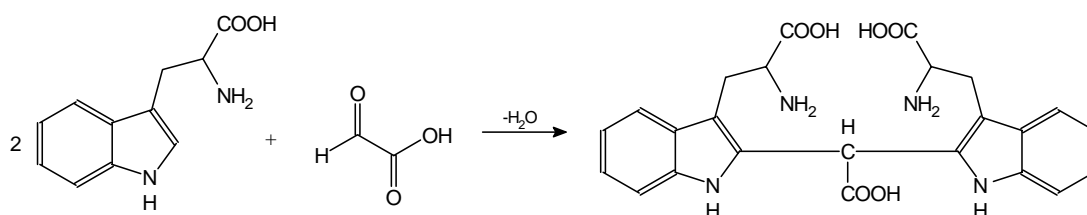
W wyniku reakcji związków zawierających wiązanie peptydowe z jonami miedzi(II) w środowisku zasadowym powstają barwne, niebieskofioletowe kompleksy. Podobną reakcję wykazuje mocznik, który, w obecności zasady, tworzy dimer zdolny do kompleksowania jonów miedzi w sposób podobny do peptydów.



Barwa jest tym intensywniejsza, im dłuższy jest peptyd (im więcej wiązań peptydowych wchodzi w skład cząsteczki)

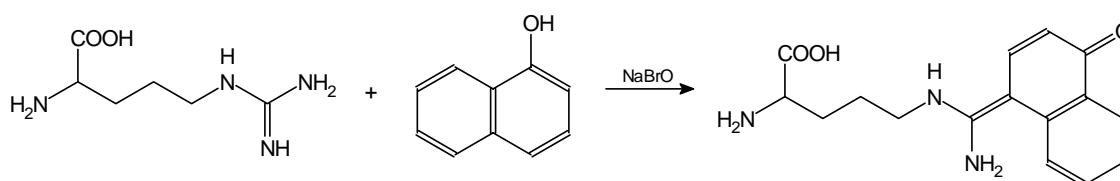
10.1.6.5 Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa (odczyn na tryptofan)

W środowisku kwaśnym tryptofan ulega sprzężeniu z aldehydami, dając barwne produkt kondensacji. Do wykrywania tryptofanu i białek go zawierających najczęściej wykorzystuje się kwas glioksalowy lub formalinę.



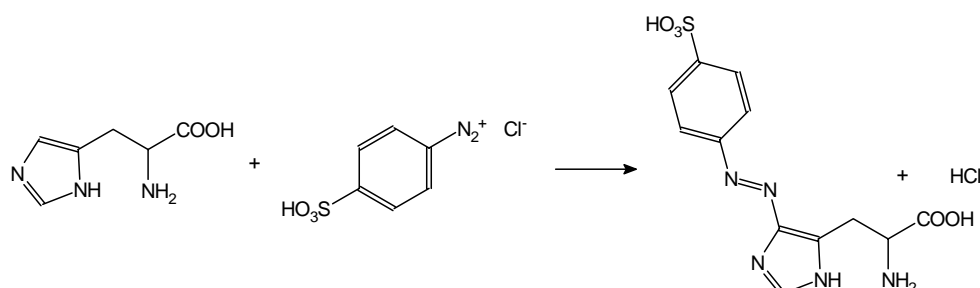
10.1.6.6 Odczyn Sakugachiego na argininę

Arginina i inne pochodne guanidyny pod wpływem podbrominu sodu utleniają się i ulegają sprzężeniu z α -naftolem do barwnych produktów. Dalsze utlenianie produktu prowadzi do odbarwienia roztworu na skutek rozpadu układu amidynowego.



10.1.6.7 Odczyn Pauliego na histydyne

Związki imidazolowe, w tym histydyna, dają czerwone produkty w reakcji diazowania z kwasem sulfanilowym. Powstałe produkty wykazują zmiany barwy w zależności od pH.



10.1.6.8 Reakcje aminokwasów siarkowych

W reakcji cysteiny lub cystyny z gorącym roztworem NaOH powstaje siarczek sodu który w obecności rozpuszczalnych soli ołowiu(II) tworzy czarny osad PbS.

10.1.7 Strącanie, denaturacja i wysalanie białek.

Białka wykazują dużą zmienność rozpuszczalności w zależności od pH roztworu, jego siły jonowej, stałej dielektrycznej rozpuszczalnika oraz temperatury.

Dodanie do wodnego roztworu białka mniej polarnego rozpuszczalnika, np.: etanolu czy acetonu, powoduje obniżenie względnej przenikalności elektrycznej układu. W efekcie obniża się stopień hydratacji i rozpuszczalność białek i peptydów. Wprowadzenie odpowiednio dużej ilości takiego rozpuszczalnika powoduje wytrącenie się białka.

Większość białek wykazuje najmniejszą rozpuszczalność w roztworze o pH bliskim ich punktowi izoelektrycznemu. W punkcie tym ładunek cząsteczki białka wynosi zero, zatem na cząsteczki nie działają odpychające siły elektrostatyczne (w pH różnym od punktu izoelektrycznego molekule białka są obdarzone ładunkiem, zatem, na skutek oddziaływań coulombowskich odpychają się), co sprzyja agregacji molekuł białka. Ze względu na występowanie w cząsteczkach białek aminokwasów zasadowych lub kwasowych, na powierzchni molekule tworzą się często centra (rejony), obdarzone lokalnym ładunkiem. By zapobiec oddziaływaniom przyciągającym miejscowych różnoimiennych ładunków pomiędzy molekułami protein, konieczna jest obecność w roztworze pewnej ilości jonów, które poprzez oddziaływania elektrostatyczne wiążą się z cząsteczkami białka, równoważąc w ten sposób ładunki lokalne, a co za tym idzie, zapewniając symetrię rozkładu potencjału elektrycznego i, gromadząc się na powierzchni cząsteczki, znoszą międzymolekularne oddziaływania elektrostatyczne, dodatkowo podwyższając stopień hydratacji, uniemożliwiając tym samym agregację i wytrącanie peptydu. Efekt ten, polegający na zwiększeniu rozpuszczalności białek w wyniku dodania pewnej ilości związków jonowych do roztworu obserwuje się szczególnie wyraźnie dla białek o dużej asymetrii rozkładu ładunków (np.: albuminy). Z drugiej strony, dodatek dużej ilości związków jonowych powoduje wytrącanie białek (tzw. wysalanie). Jest to spowodowane odciąganiem cząsteczek wody, solwatuującej molekule białka, przez wprowadzone do roztworu jony soli których hydratacja jest bardziej uprzywilejowana. Zniszczenie otoczki solwatacyjnej powoduje pojawienie się oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami białka i w następstwie ich aglomerację a w następstwie wypadanie z roztworu. Fakt, iż różne białka wytrącają się z roztworu przy różnym stężeniu czynnika wysalającego, stosowany jest do frakcjonowania mieszanin białek. Procesy wysalanie i wytrącania rozpuszczalnikami organicznymi nie mają większego wpływu na przestrzenną strukturę białka.

Denaturacją nazywamy takie procesy, przeprowadzone drogami fizycznymi lub chemicznymi, które prowadzą do zmiany w strukturze białka, co prowadzi do utraty bądź zmniejszenia aktywności lub innej cechy charakterystycznej tego białka, przy czym struktura pierwszorzędowa pozostaje niezmienną. Procesy denaturacji wiążą się ze zniszczeniem wiązań wodorowych, stabilizujących drugo- trzecio- i czwartorzędową strukturę proteiny, oraz, w warunkach redukujących, zerwaniem mostków (wiązań) disiarczkowych. W przypadku denaturacji łańcuch białkowy traci swoją, stabilizowaną niekowalencyjnymi oddziaływaniami oraz wiązaniami disulfidowymi, konformację i przechodzi, na skutek drgań termicznych, w strukturę nieuporządkowaną, o charakterze statystycznym (tzw. kłębek statystyczny). Forma taka nie wykazuje aktywności biologicznej. Usunięcie czynnika denaturującego powoduje wytworzenie wiązań wodorowych oraz disiarczkowych między różnymi miejscami łańcucha w sposób przypadkowy, a co za tym idzie ustabilizowanie nieaktywnej struktury. Umieszczenie białka w formie kłębaka statystycznego w buforze o pH fizjologicznym, odpowiedniej sile jonowej i w warunkach pozwalających na zerwanie nieprawidłowych mostków S-S, prowadzi zazwyczaj do powolnej odbudowy aktywnej formy proteiny. Czynnikiem stosowanym do zrywania wiązań wodorowych jest za zwyczaj stężony roztwór mocznika lub guanidyny (oba związki charakteryzują się wieloma centrami protonodonorowymi i protonoakceptorowymi, co w połączeniu z ich małymi rozmiarami umożliwia im konkurowanie z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi molekule białka). Niszczeniu struktury drugorzędowej wielu protein sprzyja także pH mocno kwaśne bądź mocno zasadowe. Do zrywania mostków disiarczkowych używa się merkaptoetanolu, który, sam tworząc dimer, oddaje protony cząsteczce białka. Denaturacja pociąga za sobą również zmiany rozpuszczalności oraz położenie punktu izoelektrycznego (wyeksponowanie nowych grup zjonizowanych). Do fizycznych metod denaturacji należą: ogrzewanie, naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym, rentgenowskim lub jonizującym, działanie ultradźwiękami oraz, w niektórych przypadkach, silne mieszanie.

Jony metali ciężkich również wytrącają białka z roztworu. Mechanizm tego procesu polega na tworzeniu soli oraz kompleksów metali ciężkich (np.: ołowiu, rtęci, srebra, miedzi, kadmu itd.) z białkami - białczanów. W tworzeniu tego typu wiązań uczestniczą wolne reszty karboksylanowe (aminokwasów kwaśnych

lub C-terminalnych), aminowe (aminokwasów zasadowych lub N-terminalnych), guanidynowe, imidazolowe i indolowe (Arg, His i Trp) oraz, w wiązaniu rtęci, ołowiu, złota, srebra i kadmu, reszty SH. Połączenia te charakteryzują się małymi wartościami stałych dysocjacji oraz niewielkimi iloczynami rozpuszczalności. W białczanach białko jest zatem anionem lub ligandem.

Właściwości kationowe cząsteczek białek wykorzystuje się podczas ich wytrącania za pomocą anionów. Tworzenie soli białek z jonami kwasów takich jak trichlorooctowy, sulfosalicylowy czy fosforowolframowy możliwe jest dzięki obecności w molekułe proteiny reszt aminowych, argininowych, imidazolowych i indolowych.

10.2 Aminokwasy i białka – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z podstawowymi reakcjami i właściwościami białek i aminokwasów.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Wzory aminokwasów, enancjomery, diastereoizomery, konformery, aminokwasy egzo- i endogenne, aminokwasy jako jony obojnacze, punkt izoelektryczny, reakcje charakterystyczne dla aminokwasów, wiązanie peptydowe, białka, koloidy, struktura I, II, III i IV rzędowa protein, reakcje charakterystyczne dla białek, wysalanie i denaturacja.

ODCZYNNIKI

15% HgSO ₄ w 3 M H ₂ SO ₄	1M CH ₃ COOH	formalina
30% NaOH	(NH ₄) ₂ SO ₄ nasycony roztwór	kwasy glioksalowy
0,1% ninhydryna w acetonie	5% HgCl ₂	tryptofan
50% NaOH	5% Cu(CH ₃ COO) ₂	H ₂ SO ₄ stęż.
0,01 M CuSO ₄	10% CCl ₃ COOH	arginina
10% NaOH	20% kwas sulfosalicylowy	histydyna
5% Pb(CH ₃ COO) ₂	30% kwas fosforowolframowy	kazeina
5% alfa-naftol w etanolu	0,1 M HCl	1M NaOH
podbromin sodu (roztwór Br ₂ w 10% NaOH)	0,9 % NaCl	błękit bromotymolowy
kwasy sulfanilowy w HCl	żelatyna	zieleń bromokrezolowa
20% NaOH	NaNO ₂	mocznik
	HNO ₃ stęż.	

UWAGA: Wodorotlenek sodu, kwas siarkowy, trichlorooctowy, solny, azotowy oraz formalina są silnie żrące. Sole rtęci i ołowiu są toksyczne. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

- 5 cm³ roztworu chlorowodoru argininy (rozpuść niewielką ilość aminokwasu w 5 cm³ 1 M HCl)
- 5 cm³ roztworu chlorowodoru histydyny (rozpuść niewielką ilość aminokwasu w 5 cm³ 1 M HCl)
- 5 cm³ roztworu chlorowodoru tryptofanu (rozpuść niewielką ilość aminokwasu w 5 cm³ 1 M HCl)
- 50 cm³ 1 % roztworu żelatyny (odważoną ilość żelatyny wsyp do 20 cm³ gorącej wody, pozostaw na 20 minut do spęcznienia, a następnie rozpuść w temperaturze wrzenia i rozcieńcz do 50 cm³)
- 50 cm³ ok. 3% roztworu albuminy (dopełnij białko jaja do objętości 50 cm³ a następnie dokładnie wymieszaj)
- 5 cm³ 5% roztworu azotynu sodu
- 10 cm³ 0,1 M roztworu HCl

OPIS ĆWICZENIA

a. Reakcja Millona

Do dwóch probówek nalej po 3 ml 2% roztwór albuminy i 1 % żelatyny. Dodaj 1 ml 15% roztworu siarczanu rtęci w 3M kwasie siarkowym i ogrzewaj na wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie dodaj 1 ml 1% roztworu azotynu sodu. Które z białek wykazuje intensywniejsze zabarwienie roztworu.

b. Odczyn ksantoproteinowy

Do 3 ml roztworów żelatyny i albuminy umieszczonych w dwóch probówkach dodaj po 1 ml stężonego kwasu azotowego i ogrzej do wrzenia nad palnikiem. Po ochłodzeniu dodawaj kroplami 30% roztwór NaOH do zalkalizowania roztworu. Co dzieje się po dodaniu kwasu, jak zachowuje się białko po ogrzaniu z HNO₃ a jak po zalkalizowaniu.

c. Reakcja ninhydrynowa

Do 3 ml roztworów białek dodaj 0,5 ml 0,1% roztworu ninhydryny w acetonie. Roztwory ogrzej do wrzenia i zanotuj wynik reakcji.

d. Odczyn biuretowy

Do 3 ml roztworów białek umieszczonych w 2 probówkach dodaj po 1 ml nasyconego roztworu NaOH i zamieszaj. Dodaj 1-5 krople 0,01 M roztworu siarczanu miedzi. Wystąpienie niebiesko-fioletowej barwy świadczy o obecności białek. Przeprowadź analogiczną reakcję używając roztworu mocznika zamiast białka.

e. Wykrywanie aminokwasów siarkowych

Do dwóch probówek wlej po 3 ml używanych poprzednio roztworów białek. Do daj po 3 ml 10% roztworu NaOH a następnie dodaj 2-3 krople 5% roztworu octanu ołowiu. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia. Czarne zabarwienie pochodzące od siarczku ołowiu świadczy o obecności siarki.

f. Wykrywanie tryptofanu (reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa)

Do 1 ml 1% roztworu tryptofanu dodaj 1 ml roztworu kwasu glioksalowego lub formaliny, zamieszaj i wprowadź, po ściance, 1 ml stężonego kwasu siarkowego. Reakcję powtórz z roztworem albuminy.

h. Wykrywanie argininy (odczyn Sakaguchiego)

Do 1 ml roztworu argininy dodaj 2-3 krople 5% roztworu α -naftolu w etanolu, zamieszaj a następnie dodawaj kroplami roztwór podbrominu sodu. Czerwone zabarwienie wskazuje na obecność argininy. Reakcję powtórz z roztworem albuminy.

i. Wykrywanie histydyny (odczyn Pauly'ego)

Do 1 ml roztworu histydyny dodaj 2 ml kwasu sulfanilowego (0,9 g kwasu sulfanilowego rozpuść w 9 ml stężonego HCl i rozcieńczyć wodą destylowaną do 100 ml) oraz 1 ml 5% roztworu NaNO₂ (świeżo przygotowanego), następnie zamieszaj i dodaj 1 ml 20% NaOH. Histydyna daje barwę żółto-czerwoną. Reakcję przeprowadź również dla roztworu albuminy.

j. Wytrącania izoelektryczne białek

Do probówki wlej 2 ml 2% roztworu albuminy i ogrzewaj na wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut, a następnie dodaj 2 krople 1 M roztworu kwasu octowego. Powstaje obfity osad wytrąconego białka.

k. Wytrącanie silnym elektrolitem

Do 2 ml roztworu albuminy wlej taką samą objętość nasyconego roztworu siarczanu amonu. Zaobserwuj zmiany.

l. Wytrącanie jonami metali ciężkich

Do 3 probówek wlej po 2 ml roztworu albuminy. Do pierwszej dodawaj kroplami 5% roztwór chlorku rtęci(II), do drugiej 5% roztwór octanu ołowiu a do trzeciej 5% roztwór azotanu miedzi. Po dodaniu każdej kropli mieszaj roztwór. Po ile kropeł każdego z roztworów trzeba dodać w celu uzyskania zmętnienia a ile w celu uzyskania osadu.

l. Wytrącania anionem

W trzech probówkach umieść po 2 ml roztworu albuminy a następnie dodawaj kroplami następujące odczynniki:

- 10% roztwór kwasu trichlorooctowego
- 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego
- 32% roztwór kwasu fosforowolframowego

Zanotuj, ile potrzeba kropli każdego z odczynników w celu uzyskania trwałego osadu.

m. Wytrącanie alkoholem

Do 2 ml roztworu albuminy dodaj 10 ml 96% etanolu i probówkę odstaw na 5-10 minut. Osad odwiruj i sprawdź jego rozpuszczalność w:

- wodzie destylowanej
- 0,9% roztworze NaCl
- 0,1 M roztworze HCl

n. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny

Do kolbki miarowej o pojemności 50 cm³ wsyp 0,25 g kazeiny i dodaj 25 ml wody destylowanej (ogrzej uprzednio do 40°C) oraz 5 cm³ 1 M roztworu NaOH. Zawartość naczynia mieszaj do całkowitego rozpuszczenia białka a następnie dodaj 5 cm³ 1 M roztworu CH₃COOH i uzupełnij wodą do kreski. Otrzymuje się w ten sposób roztwór kazeiny w 0,1 M roztworze octanu sodu.

Przygotuj 9 probówek. Do pierwszej odmierz 3,2 cm³ 1 M roztworu kwasu octowego i 6,8 cm³ wody a następnie dokładnie wymieszaj. Do pozostałych ośmiu probówek wlej po 5 cm³ wody destylowanej. Następnie przenieś 5 cm³ roztworu z pierwszej probówki do drugiej, a z niej, po wymieszaniu, przelej 5 cm³ do trzeciej itd. Następnie do każdej z probówek dodaj 1 cm³ otrzymanego na wstępie roztworu kazeiny i jej zawartość zamieszaj. Zaobserwuj zmiany w wyglądzie zawartości probówek zaraz po wymieszaniu oraz po 30 minutach. pH w buforze octanowego uzyskanego w dziewięciu kolejnych probówkach wynosi odpowiednio: 3,5; 3,8; 4,1; 4,4; 4,7; 5,0; 5,3; 5,6 oraz 5,9. W której probówce wystąpił najobfitszy osad białka? Ile wynosi punkt izoelektryczny kazeiny.

o. Właściwości amfoteryczne białek

Przygotuj cztery probówki. Do 1 i 3 wlej po 5 cm³ wody destylowanej natomiast do 2 oraz 4 taką samą objętość roztworu żelatyny. Następnie do 1 i 2 probówki dodaj 2-3 krople roztworu zieleni bromokrezolowej zaś do 3 i 4 roztwór błękitu bromotymolowego. Do próbek 1 i 2 wkraplaj (licząc ilość kropli dodanych do każdej z probówek) 0,01 M HCl do zmiany zabarwienia roztworu na żółte. Z kolei do probówek 3 i 4 dodawaj kroplami 0,01 M NaOH do momentu uzyskania barwy niebieskiej. Porównaj objętość roztworu kwasu oraz roztworu zasady potrzebne do wywołania zmiany barwy wskaźnika w probówkach zawierających wodę destylowaną oraz roztwór białka.

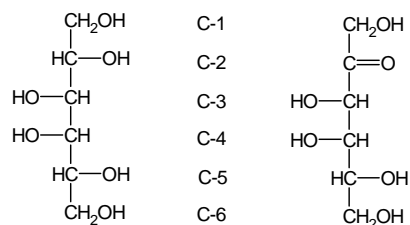
11 Ćwiczenie 7

11.1 Sacharydy – wstęp teoretyczny

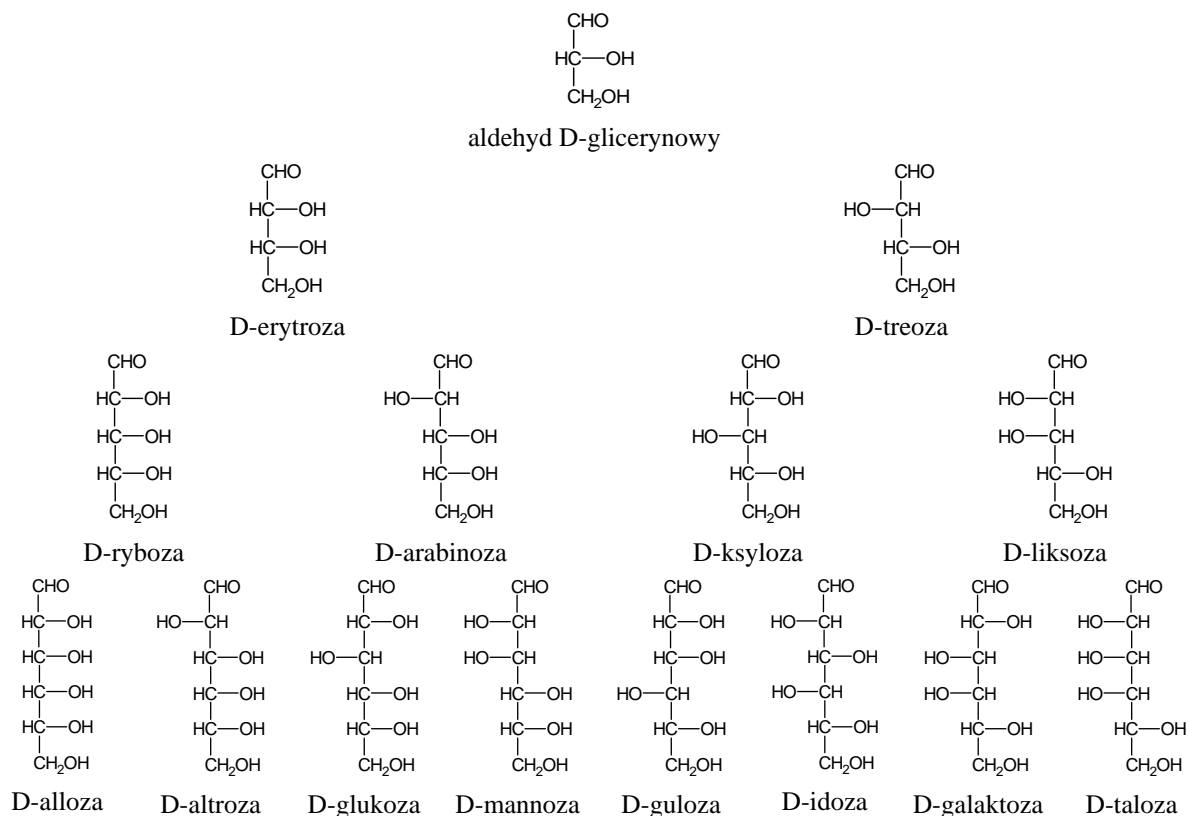
Sacharydy (węglowodany) to grupa związków organicznych, będących integralnymi składnikami komórek roślinnych i zwierzęcych, o charakterze alkoholi wielowodorotlenowych zawierających grupy aldehydowe bądź ketonowe. Sacharydy dzielimy na cukry proste (monosacharydy) i złożone (polisacharydy i oligosacharydy).

11.1.1 Monosacharydy

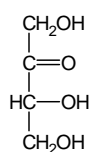
Monocukry, będące pod względem chemicznym wieloalkoholoaldehydami (aldozy) lub wieloalkoholoketonami (ketozy), dzielą się w zależności od liczby węgla w cząsteczce na triozy, tetrazy, pentozy, heksozy, heptozy itd. Mówimy zatem np. o aldotriozach, ketoheksozach itp. Numerację łańcucha węglowego węglowodanu rozpoczyna się od grupy aldehydowej (w przypadku aldoz) lub grupy hydroksymetylenowej połączonej z grupą ketonową (w przypadku ketoz).



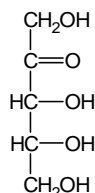
Grupa karbonylowa w naturalnych ketozach występuje na atomie węgla C-2. Wszystkie cukry posiadają w cząsteczkach centra chiralności zatem wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego wzrasta liczba możliwych izomerów. W zależności od konfiguracji przy przedostatnim (licząc od grupy karbonylowej) atomie węgla dzielimy je na D oraz L. Cukry proste możemy ułożyć w szereg, w zależności od liczby atomów węgla. Na poniższym rysunku przedstawiono szereg D aldoz.



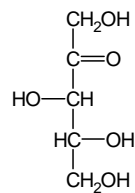
Podobny szereg utworzyć można dla ketoz



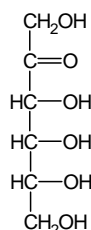
D-erytruloza



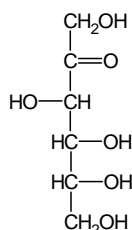
D-rybuloza



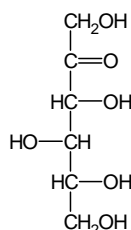
D-ksyluloza



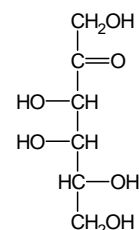
D-aluloza



D-fruktoza



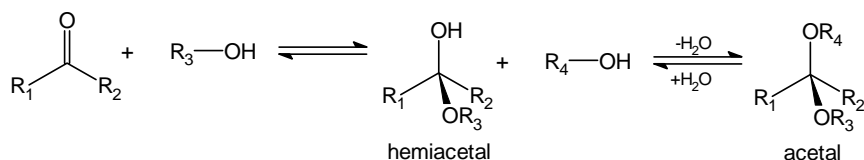
D-sorboza



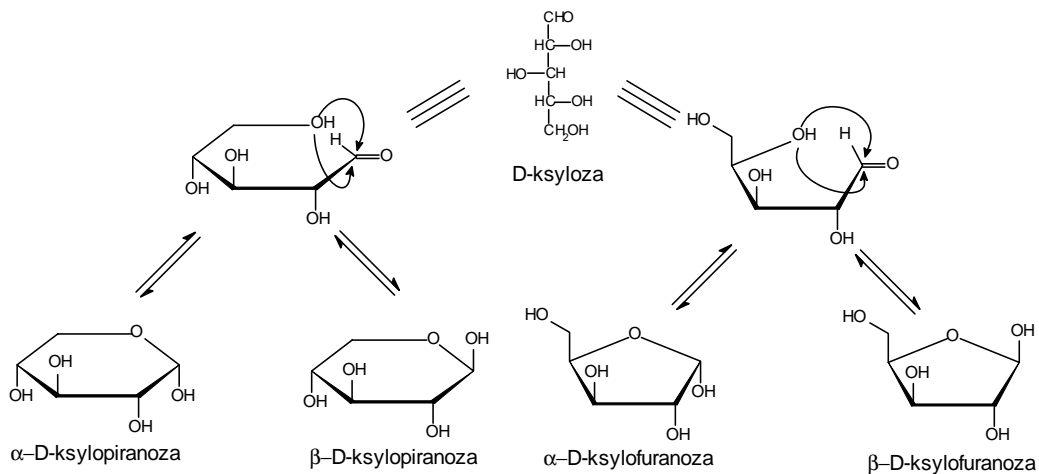
D-tagatoza

Związki o tej samej liczbie atomów węgla, należące do poszczególnych szeregów są względem siebie diastereoizomerami. Parę diastereoizomerów różniących się tylko konfiguracją wokół atomu węgla C-2 (w przypadku ketoz C-3) nazywamy epimerami. Parami epimerów są zatem np.: alloza i altoza, glukoza i mannoza, ksyloza i liksoza itd.

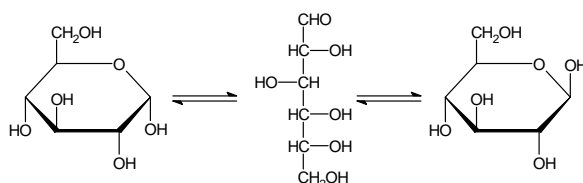
Znaną właściwością alkoholi jest uleganie szybkim, odwracalnym reakcjom addycji nukleofilowej do grup karbonylowych aldehydów i ketonów, dając hemiacetale i acetale.



Obecność, w cząsteczkach cukrów, grup hydroksylowych i karbonylowej umożliwia tworzenie się tego typu połączeń na skutek procesów wewnątrzcząsteczkowej addycji grupy -OH, oddalonej o cztery lub pięć atomów węgla od reszty C=O. Efektem tego procesu jest powstawanie hemiacetalowych form cyklicznych o pierścieniach pięcio- lub sześcioczłonowych, nazywanych odpowiednio furanozami lub piranozami.



Oczywiście atak grupy hydroksylowej na węgiel karbonylowy może odbywać się z dwu stron (od góry lub od dołu) płaszczyzny grupy karbonylowej, otrzymujemy zatem mieszaninę produktów (tzw. anomerów) z grupą hydroksylową, połączoną z pierwszym (w przypadku ketoz z drugim) atomem węgla, nazywanym centrum anomerycznym, skierowaną w górę (izomer β) lub ku dołowi (izomer α). W roztworach mamy zazwyczaj do czynienia z równowagą pomiędzy izomerami α i β form piranozowych i furanozowych. Aldopentozy i ketoheksozy występują zazwyczaj w formach pięciocłonowych, aldoheksozy zaś w formach sześciocłonowych. Pierścienie trój- i czterocłonowe, ze względu na efekty steryczne, nie tworzą się. Z reguły formy β sacharydów są bardziej trwałe (mają niższą energię) niż formy α , co powoduje iż przeważają one w roztworze. Szybkość przejść jednego anomeru w drugi jest często na tyle mała że możliwe jest ich rozseparowanie. Z punktu widzenia stereochemii anomery są diastereoizomerami, różnią się zatem wartościami współczynników skręcalności. Na przykład α -D-glukopiranoza ma skręcalność właściwą wynoszącą $[\alpha]_D^{20} = +112,2^0$, natomiast dla β -D-glukopiranozy wielkość ta wynosi $+18,7^0$. Jeśli rozpuścimy w wodzie czystą próbkę jednego z anomerów będziemy obserwować powolną zmianę skręcalności, aż do osiągnięcia wartości $+52,6^0$. Jest to efekt występowania równowagi pomiędzy formami cyklicznymi a formą liniową. Po rozpuszczeniu jednego z anomerów, na skutek rozpadu wiązania C-O tworzy się niewielka ilość formy łańcuchowej (w stanie równowagi około 0,5%), która może ulegać cyklizacji do jednej z dwu form anomerycznych.



W stanie równowagi, dla glukozy, stosunek izomeru β do α wynosi 64:36. Proces ustalania się równowagi pomiędzy formami anomerycznymi nazywamy mutarotacją.

Pierścienie cukrowe, podobnie jak cykloalkany, występują w kilku, różnych pod względem energetycznym konformacjach, pomiędzy którymi w roztworach ustala się równowaga. Stabilne są konformacje krzesłowe, przy czym najbardziej uprzywilejowana jest ta, w której maksymalna liczba podstawników znajduje się w położeniu ekwatorialnym, w szczególności zaś najbardziej objętościowa grupa hydroksymetylenowa. Spośród heksoz jedynie β anomer glukozy może przyjąć strukturę, w której wszystkie podstawniki znajdują się w tym położeniu, czym tłumaczy się wyjątkową trwałość i rozpowszechnienie glukozy w przyrodzie.

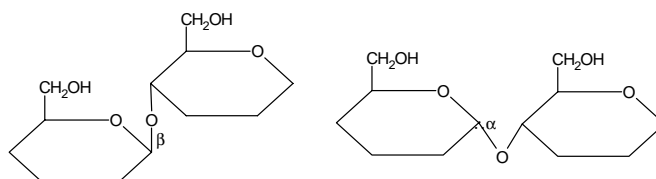
Monosacharydy pełnią ważne funkcje, zarówno w stanie wolnym, jak i w formie związanej.

Tabela 6. Ważniejsze monosacharydy i ich występowanie

Cukier	Występowanie	
	w stanie wolnym	w stanie związanym
L-Arabinoza	w rdzeniu drewna drzew iglastych (np.: <i>Picea</i>) oraz buka	glikozydy, hemicelulozy, gumy, polisacharydy bakteryjne, pektyny, lektyny
D-Ksyloza		gumy, śluzy, hemicelulozy, ksylany
D-Ryboza		kwasy nukleinowe, nukleotydy, koenzymy
D-Rybulozą	we wszystkich roślinach w niewielkich ilościach	fosforylasy
D i L-Ksyluloza	mocz chorych na pentozurię	
D-Galaktoza	owoce bluszczu, soja, kora wiązu, mocz i krew chorych na galaktozemię	glikozydy, glikolipidy, oligosacharydy mleka, hemicelulozy, śluzy
L-Galaktoza	nasiona lnu, łodygi kukurydzy	agar, śluzy nasion lnu, niektóre gumy
D-Glukozą	owoce, soki i tkanki roślinne, miód, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz	liczne oligosacharydy, celuloza, skrobia, glikogen, pektyny, laminaran, izolichenina
D-Mannoza	w pewnych gatunkach mchów i innych roślin torfotwórczych, łupiny pomarańczy	mannany, hemicelulozy, śluzy
D-Taloza		antybiotyki
D-Fruktoza	owoce, soki i tkanki roślinne, plazma nasienia, w moczu chorych na cukrzycę i fruktozurię	oligosacharydy, inulina, lewan
L-Sorboza	fermentujące owoce, owoce jarzębiny, niektóre porosty	porosty
Sedoheptuloza	we wszystkich roślinach	
D-Mannoheptuloza	owoce <i>Persea gratissima</i> , korzeń pierwiosnka wyniosłego	

11.1.2 Oligosacharydy

Jak wspomniano wcześniej, w wyniku reakcji grupy karbonylowej z grupą hydroksylową tworzą się hemiacetale. Związki te mogą reagować z kolejną cząsteczką alkoholu, tworząc acetale. Reakcja ta jest odpowiedzialna za łączenie się kilku cząsteczek monosacharydów, co prowadzi do powstania oligosacharydów i polisacharydów. O oligosacharydach mówimy w przypadku cząsteczek złożonych z mniej niż 10 fragmentów monocukrów (nazywamy je np.: mono-, di-, tri-, tetrasacharydami itd.). Związki o większych cząsteczkach nazywamy polisacharydami. Wiązanie pomiędzy dwoma molekułami monosacharydów nazywamy wiązaniem glikozydowym. W zależności od konfiguracji wokół węgla C-1, mówimy o wiązaniu β -glikozydowym (atom tlenu skierowany ponad płaszczyznę) lub o wiązaniu α -glikozydowym (atom tlenu skierowany pod płaszczyznę).



Wzory ważniejszych oligosacharydów prezentuje Tabela 7.

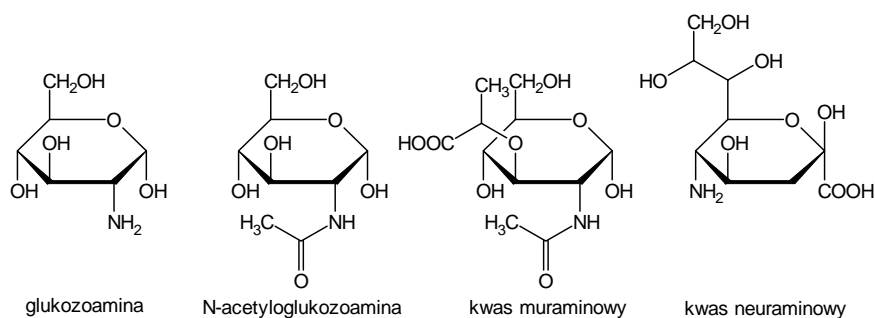
Tabela 7. Ważniejsze oligosacharydy i ich występowanie

	Wzór strukturalny	Nazwa zwyczajowa i systematyczna	Występowanie
DISACHARYDY		Maltoza 4-(α -D-glikozydo)-D-glukoza	produkt hydrolizy skrobi, występuje w wielu organach roślinnych (w szczególności w korzeniach), w owocach bananowca
		Celobioza 4-(β -D-glikozydo)-D-glukoza	produkt rozpadu celulozy i licheniny, składnik niektórych glikozydów
		Trehaloza 1-(α -D-glikozydo)- α -D-glukoza	rozpowszechniona wśród grzybów, glonów, bakterii, występuje w organizmach bezkręgowców
		Laktoza 4-(β -D-galaktozydo)-D-glukoza	główny cukier mleka, składnik pyłku niektórych roślin (np.: forsycji), składnik glikozydów
		Sacharoza 2-(α -D-galaktozydo)- β -D-fruktoza	składnik energetyczny trzciny cukrowej, buraka cukrowego oraz innych roślin

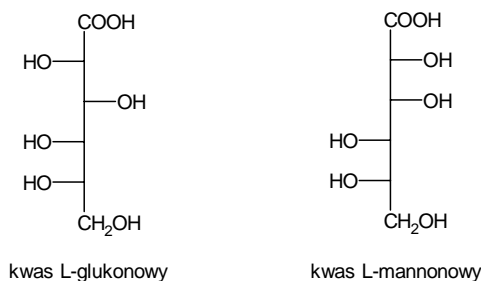
11.1.3 Pochodne monosacharydów, monosacharydy o nietypowej budowie

Produkty przemian monocukrów jak również monosacharydy o nietypowej budowie, występują powszechnie w tkankach roślinnych i zwierzęcych, w których gromadzą się często w dużych ilościach i pełnią ważne funkcje strukturalne i fizjologiczne. Możemy wyróżnić kilka zasadniczych grup pochodnych cukrów, w zależności od ich charakteru chemicznego:

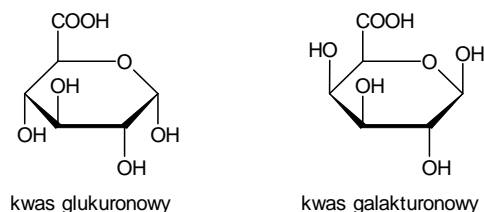
- **aminocukry** – są to związki o szkieletcie cukrowym, zawierające grupę aminową w miejsce hydroksylowej. Grupa $-NH_2$ jest często zacetylowana. Związki te wchodzi w skład wielu substancji wielkocząsteczkowych, np.: chityny czy mukopolisacharydów. Do najważniejszych związków z tej grupy należą glukozoamina i jej acetylopochodna, kwas muraminowy oraz kwas neuraminowy. Dwa ostatnie związki wchodzi w skład antygenów komórkowych, występują w wątrobie, nadnerczu, tkance nerwowej, nasieniu, mleku i ślinie żołądka. Są elementami budulcowymi niektórych hormonów glikopeptydowych.



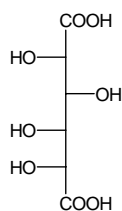
- **kwasy aldonowe** – są to związki powstające w wyniku utlenienia w cząsteczce aldozy grupy aldehydowej (C-1) do karboksylowej. W organizmach żywych występują stosunkowo rzadko, jednakże u większości organizmu stwierdzono istnienie aparatu enzymatycznego umożliwiającego przekształcanie cukrów (glukozy i galaktozy) w odpowiednie kwasy aldonowe. Produkowane są przez wiele gatunków bakterii i kryptofagi. Stanowią produkty pośrednie w procesach skracania łańcucha węglowego. Pochodne o charakterze kwasów aldonowych, powstałe z disacharydów nazywamy kwasami aldobionowymi. Ich funkcje w komórkach również nie są do końca wyjaśnione.



- **kwasy uronowe** – są efektem utlenienia końcowej grupy alkoholowej aldozy. Mają one znacznie większe znaczenie niż kwasy aldonowe. Biorą udział w procesach skracania łańcucha węglowego sacharydu, są produktami pośrednimi w syntezie polisacharydów oraz uczestniczą w wydalaniu metabolitów i detoksykacji organizmu.

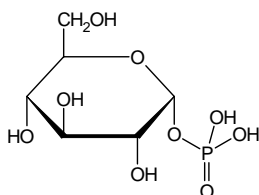


- **kwasy aldarowe** – są produktami powstałymi z aldoz na skutek utlenienia obu skrajnych atomów węgla. Przykładem może być kwas glukarowy.

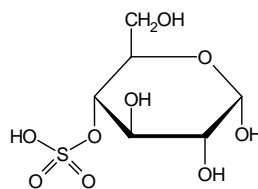


kwasy D-glukarowy

- **estry sacharydów** – na skutek estryfikacji grup hydroksylowych resztami kwasów nieorganicznych (głównie siarkowego(VI) i fosforowego(V)) powstają pochodne pełniące istotne funkcje metaboliczne i strukturalne. Fosforany monosacharydów stanowią intermedanty w wielu ważnych procesach biochemicznych (glikoliza, cykl Kelvina, glikoneogeneza) i są elementami wielu ważnych biologicznie cząsteczek (nukleozydy, ATP i inne wysokoenergetyczne związki fosforowe, NADH i inne koenzymy). W pentozach estryfikacji ulegają głównie pozycje C-1, C-5 oraz C-3, w heksozach C-1 i C-6. Siarczany(VI) występują jako składniki polisacharydów (agar, karnegina). Reszta kwasu siarkowego przyłączona jest zazwyczaj do grup hydroksylowych związanych z węglami C-5 lub C-6.

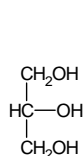


α -D-glukoza-1-fosforan

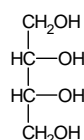


α -D-glukoza-5-siarczan

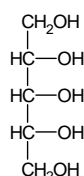
- **Alkohole wielowodorotlenowe** – związki z tej grupy są produktami redukcji grup aldehydowych lub ketonowych sacharydów. Alkoholowe pochodne cukrów dzieli się na alifatyczne (liniowe), czyli alditole, oraz cykliczne, traktowane jako pochodne cykloheksanu, czyli cyklitole. Alkohole poliowodorotlenowe powstają przez bezpośrednią redukcję wolnych monosacharydów z udziałem dehydrogenaz. Alkohole te mogą stanowić produkty pośrednie przemian aldoz w ketozy. Kilka z nich występuje powszechnie jako składniki substancji zawartych we wszystkich organizmach żywych, np.: glicerol wchodzący w skład lipidów, rybitol będący składnikiem koenzymów flavinowych. Niektóre stanowią materiały zapasowe. Wiele z nich występuje również w stanie wolnym jako składnik tkanek roślinnych (rzadziej zwierzęcych). Spośród tetrytoli i pentytoli (polialkoholi zawierających cztery lub pięć atomów węgla) wymienić należy erytrytol (produkt redukcji erytrozy) występuje w znacznych ilościach w glonach, grzybach, mchach i porostach, rybitol (powstaje z rybozy) jest substancją zapasową niektórych roślin wyższych (znaleziono go w bulwach tojadu oraz nadziemnych częściach miłka wiosennego), arabitol (substancjami macierzystymi są ksyloza i rybuloza) znaleziono w porostach, grzybach oraz niektórych roślinach wyższych. Z hekstyli najważniejszymi są mannitol (tworzy się przez redukcję fruktozy), występujący w tkankach roślin wyższych oraz u glonów i grzybów gdzie pełni funkcje substancji regulujących ciśnienie osmotyczne, gdyż ze względu na swoją nieaktywność fizjologiczną może gromadzić się w organizmach w dużych ilościach, nie wpływając na przebieg procesów biochemicznych. Znaleziono go również w formie związanej w wielu brunatnicach, gdzie występuje jako jeden z głównych produktów fotosyntezy. Sorbitol (powstaje z glukozy, sorbozy lub fruktozy) występuje w znacznych stężeniach w soku owoców oraz tkankach roślin z rodziny różowatych jak również w wielu glonach. Pełni funkcje zapasowe.



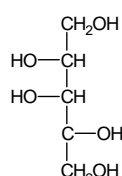
glicerol



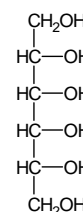
erytrytol



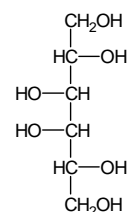
D-rybitol



D-arabitol



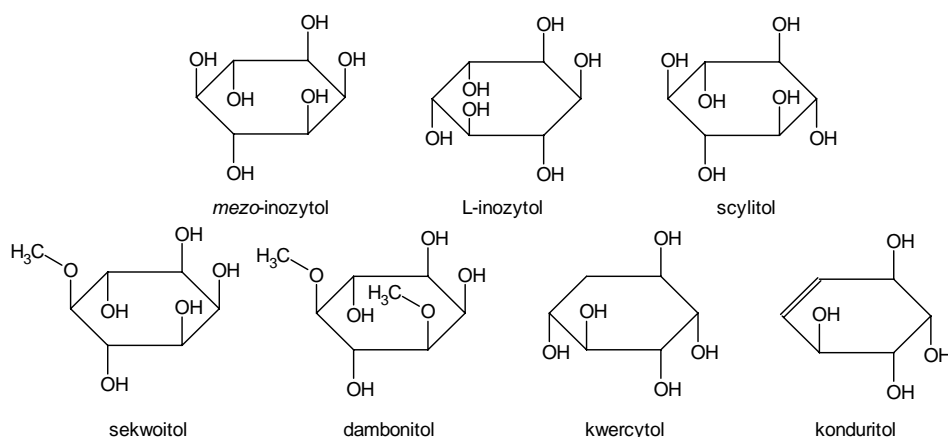
D-mannitol



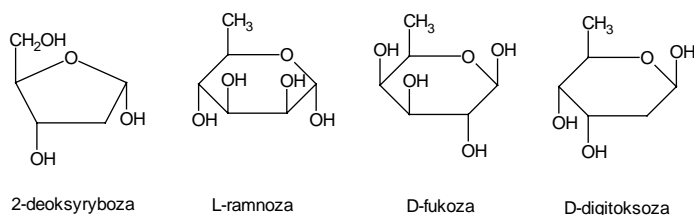
sorbitol

Cyklitole są substancjami o charakterze alkoholi, biogenetycznie pochodzące od 6-fosforanu glukozy. Są to pochodne wielohydroksycykloheksanu (liczba grup $-\text{OH}$ wynosi zazwyczaj 6, choć znane są również tetrahydroksy i pentahydroksypochodne). Związki z tej grupy są szeroko rozpowszechnione zarówno w świecie roślinnym jak i zwierzęcym. Odgrywają rolę jako składniki fosfolipidów oraz błon komórkowych.

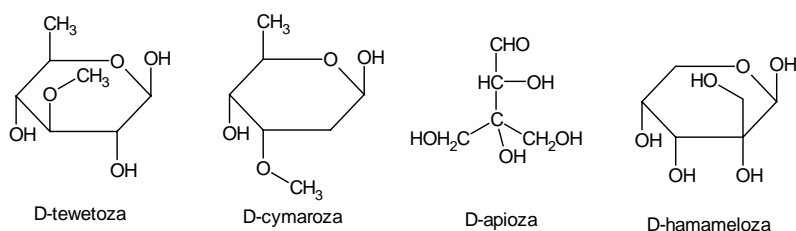
Ich pochodne fosforanowe (np.: kwas fitynowy) jest dla organizmów roślinnych rezerwuarem fosforu. Pełnią również funkcję materiałów zapasowych. Najbardziej rozpowszechniony jest *mezo*-inozytol, występujący we wszystkich organizmach żywych, Traktuje się go jako witaminę dla wielu gatunków zwierząt, jest również substancją wzrostową dla grzybów niższych. L-inozytol wchodzi w skład soku mlecznego wielu roślin (mniszek lekarski, mlecz polny, wilczomlecz), scylitol jest pospolity w tkankach palm i wielu innych roślin wyższych oraz krasnorostów. Produkty metylowania jednej (np.: sekwoitol) lub większej ilości grup hydroksylowych (np.: dambonitol) występują w drewnie i pyłku wielu gatunków drzew iglastych (sekwoja, sosna, cis), tkankach roślin kaucukodajnych i innych roślinach wyższych. Z deoksycyklitolii najbardziej znane są D-kwercytol (alkohol pięciowodorotlenowy) występujący w dębach oraz konduritol (4 grupy -OH).



- **Deoksycukry** – produktami redukcji sacharydów mogą być związki pozbawione jednej, lub większej ilości grup hydroksylowych. Do najważniejszych należy deoksyryboza, składnik DNA. Ramnoza występuje powszechnie w stanie wolnym (np.: liście sumaka jadowitego) oraz w formie związanej, jako składnik glikozydów, saponin, gum i śluzów roślinnych, polisacharydów roślin wyższych glonów bakterii i grzybów. Pełni funkcje zapasowe. W oligosacharydach mleka ssaków, polisacharydach bakteryjnych, glikoproteinach krwi wykryto inny deoksycukier – L-fukozę. Wchodzi ona ponadto w skład polisacharydów wielu glonów (tzw. fukozanów), np.: listownicy palczastej oraz gum roślinnych. Izomer D tego związku znaleziono jako składnik glikozydów roślinnych oraz saponin. Digitoksoza, sacharyd nie zawierający atomów tlenu przy dwóch atomach węgla występuje jako składnik oligosacharydów napatrstnicy.



- **Cukry o rozgałęzionym łańcuchu, etery metylowe sacharydów** – są składnikami oligo- i polisacharydów roślinnych. W stanie wolnym występują rzadko. Najczęściej spotyka się je w roślinach niższych, zwłaszcza bakteriami i grzybach. Przykładem może być tewetoza (składnik glikozydów barwinka i innych roślin), deoksycukier cymaroz (glikozydy w korzeniu napatrstnicy i barwinka). Interesującą strukturę ma apioza, pentoza występująca w glikozydach pietruszki, selera i ścianach komórkowych roślin wodnych oraz roślin kaucukodajnych. Hamameloza wchodzi w skład garbników oczaru.



11.1.4 Polisacharydy

Połączenie wiązaniami glikozydowymi większej ilości cząsteczek monosacharydów prowadzi do powstania liniowych bądź rozgałęzionych biopolimerów, zwanych polisacharydami. Pełnią one w organizmach roślinnych i zwierzęcych ważne funkcje strukturalne, zapasowe i fizjologiczne. W zależności od budowy polisacharydy dzielimy na homoglikany (jeśli składają się z powtarzających się jednakowych elementów) lub heteroglikany (w przypadku, gdy w ich składzie wyróżniamy więcej niż jeden typ monosacharydu). Większość polisacharydów pochodzenia naturalnego składa się z setek a nawet tysięcy merów (podjednostek monocukrowych). Polisacharydy tworzą, ze względu na duże masy cząsteczkowe, koloidy, które w efekcie występowania dużej liczby grup hydroksylowych na powierzchni cząsteczek, wykazują własności hydrofilowe. Cząsteczki policukrów różnią się kształtem. Sacharydy o cząsteczkach nitkowatych i nierozgałęzionych, na skutek tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, wykazują niską rozpuszczalność. Z drugiej strony struktury tego typu charakteryzują się dużą odpornością mechaniczną (np.: celuloza). Natomiast cukry wielkocząsteczkowe o strukturach rozgałęzionych mają mniejszą tendencję do asocjacji, co poprawia ich rozpuszczalność, jednakże obniża ich wytrzymałość mechaniczną. Ważniejsze polisacharydy zebrano w Tabeli 8.

Tabela 8. Ważniejsze polisacharydy i ich występowanie

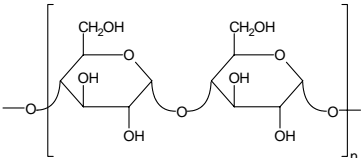
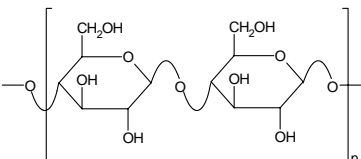
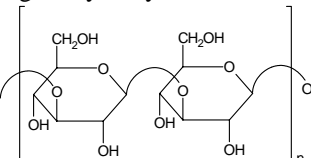
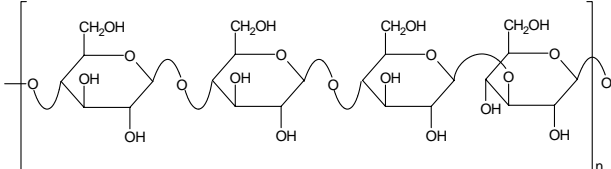
<p style="text-align: center;">Amyloza</p> <p>Jest liniowym polimerem złożonym z cząsteczek α-D-glukopiranozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi, średnia masa cząsteczkowa wynosi 10000-20000 u. Łańcuchy amylozy mają tendencję do tworzenia form spiralnie skręconych.</p> 	<p>Składnik skrobi (15-25 %). Pełni funkcje zapasowe</p>
<p style="text-align: center;">Celuloza</p> <p>Jest polisacharydem liniowym, zbudowanym z cząsteczek β-D-glukopiranozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Średnia masa cząsteczkowa tego biopolimeru wynosi 300000-600000 u. Strukturę celulozy stabilizują liczne wiązania wodorowe.</p> 	<p>Najczęściej występujący polisacharyd roślinny. Główny składnik ścian komórkowych.</p>
<p style="text-align: center;">Kaloza</p> <p>Tworzy liniowe cząsteczki powstałe z około 100 molekuł β-D-glukozy, połączonych wiązaniami 1,3-glikozydowymi.</p> 	<p>Składnik floemu (rurek sitowych), pojawia się także w tkankach przyranych.</p>
<p style="text-align: center;">Lichenina</p> <p>Jest polisacharydem liniowym, w skład którego wchodzi cząsteczki β-D-glukozy, połączone wiązaniami 1,3 oraz 1,4 glikozydowymi, przy czym te pierwsze stanowią 27% ogólnej liczby wiązań pomiędzy resztami cukrowymi. Niektóre źródła podają, że jest to sacharyd rozgałęziony. Zbudowana z 150-200 cząsteczek monocukru.</p> 	<p>Występuje w licznych porostach oraz roślinach wyższych.</p>

Tabela 8. Ważniejsze polisacharydy i ich występowanie (c.d.)

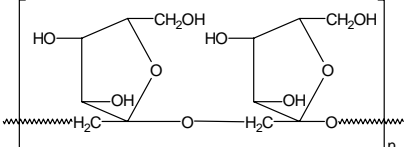
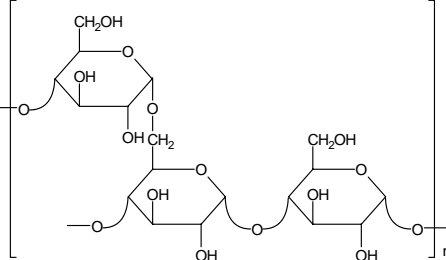
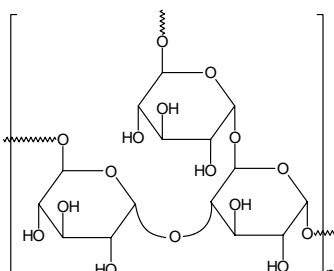
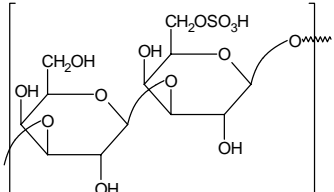
<p style="text-align: center;">Inulina</p> <p>Liniowy polisacharyd zbudowany z cząsteczek β-D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami 1,2-glikozydowymi. W większości przypadków każda cząsteczka tego cukru zawiera jedną cząsteczkę glukozy. Masa cząsteczkowa wynosi około 5000 u.</p> 	<p>Występują najczęściej w organach podziemnych, pełniących funkcje zapasowe wielu gatunków roślin wyższych (kosaciec, topinambur, mniszek pospolity, cykoria).</p>
<p style="text-align: center;">Amylopektyna</p> <p>Polisacharyd rozgałęziony, zbudowany, podobnie jak amyloza, z cząsteczek α-D-glukopiranozy, połączonych wiązaniami 1,4- oraz, w punktach rozgałęzień, 1,6-glikozydowymi. Masa molowa wynosi 200000-6000000 u. Każda cząsteczka zawiera około 50 punktów rozgałęzienia (średnio jedno rozgałęzienia na 25-30 reszt głównego łańcucha).</p> 	<p>Główny składnik skrobi (75-85%). Pełni funkcje zapasowe.</p>
<p style="text-align: center;">Glikogen</p> <p>Jest bardzo silnie rozgałęzionym polisacharydem, zbudowanym z cząsteczek α-D-glukopiranozy, połączonych wiązaniami 1,4- i 1,6- glikozydowymi (w miejscach rozgałęzienia). Na 10-18 reszt cukrowych głównego łańcucha przypada jedno rozgałęzienie. Masa oscyluje w granicach 1000000 do 5000000.</p> <p><i>(struktura jak w przypadku amylopektyny ale więcej rozgałęzień)</i></p>	<p>Zapasowy polisacharyd zwierzęcy, występujący w wątrobie i mięśniach.</p>
<p style="text-align: center;">Dekstran</p> <p>Polisacharyd rozgałęziony, złożony z cząsteczek α-D-glukopiranozy połączonych wiązaniami 1,6-glikozydowymi. W miejscach rozgałęzień występują wiązania typu 1,2-, 1,3- lub 1,4-. Cząsteczki o bardzo różnej wielkości, do kilkunastu milionów jednostek masy.</p> 	<p>Polisacharydy pochodzenia bakteryjnego.</p>
<p style="text-align: center;">Agaropektyna</p> <p>Polisacharyd liniowy, zawierający łańcuch reszt β-D-galaktopiranozy, połączonych wiązaniami 1,3-glikozydowymi, z których niektóre zestryfikowane są kwasem siarkowym. Nie wykazuje tendencji do żelowania.</p> 	<p>Składnik agaru, złożonego sacharydu produkowanego przez krasnorosty.</p>

Tabela 8. Ważniejsze polisacharydy i ich występowanie (c.d.)

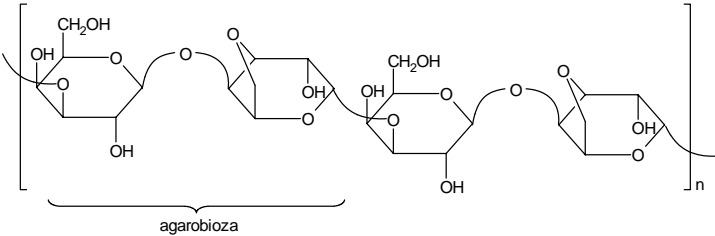
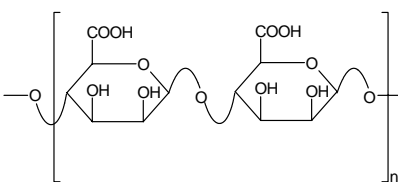
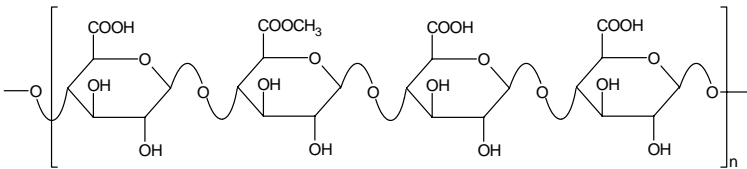
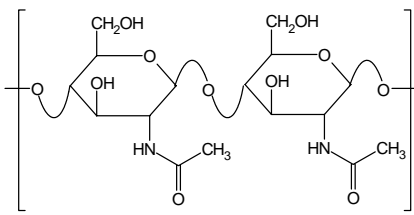
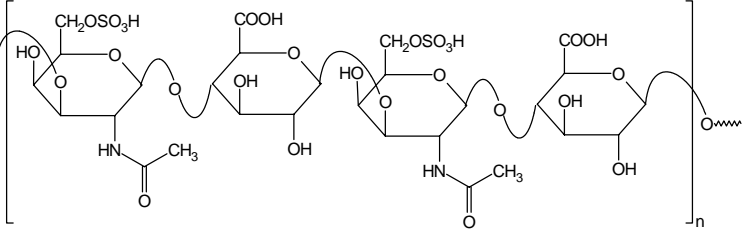
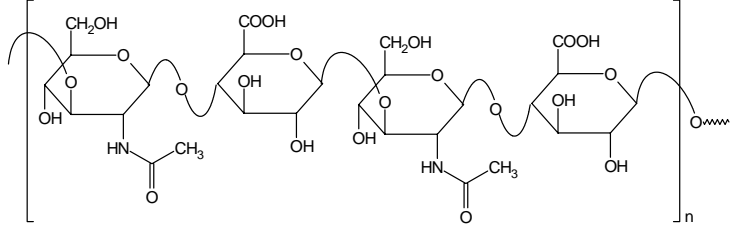
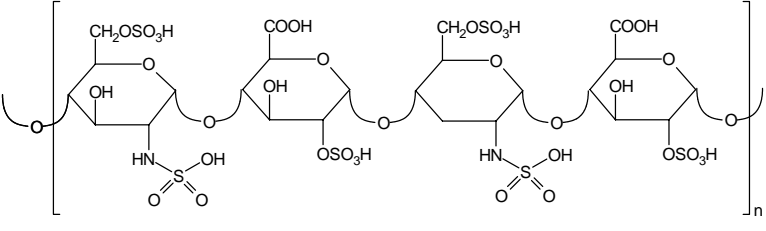
<p style="text-align: center;">Agaroz</p> <p>Jest polisacharydem liniowym, którego cząsteczka zbudowana jest z podjednostek zwanych agarobiozą, połączonych ze sobą wiązaniami 1,3-glikozydowymi. Fragmenty agarobiozy utworzone są z cząsteczki β-D-galaktopiranozy i 3,6-anhydro-α-L-galaktopiranozy pomiędzy którymi występuje wiązanie typu 1,4. Wykazuje tendencje do żelowania.</p>  <p>The diagram shows a repeating unit of agarose within large square brackets with a subscript 'n'. It consists of a β-D-galactopyranose ring connected via a 1,3-glycosidic bond to a 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose ring. The galactose ring has a CH₂OH group at C2 and an OH group at C4. The anhydro-galactose ring has a CH₂OH group at C2 and an OH group at C4. A 1,4-glycosidic bond connects the C4 of the galactose ring to the C1 of the anhydro-galactose ring. A bracket below the first two rings is labeled 'agarobioza'.</p>	<p>Składnik agaru, złożonego sacharydu produkowanego przez krasnorosty.</p>
<p style="text-align: center;">Kwas alginowy</p> <p>Liniowy polisacharyd zbudowany z podjednostek kwasu β-D-mannuronowego połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Masa molowa wynosi 12000-120000 u.</p>  <p>The diagram shows a repeating unit of alginate within large square brackets with a subscript 'n'. It consists of two β-D-mannuronic acid rings connected by a 1,4-glycosidic bond. Each ring has a COOH group at C2 and OH groups at C3 and C4.</p>	<p>Polisacharyd izolowany z brunatnic.</p>
<p style="text-align: center;">Kwasy pektynowe</p> <p>Zbudowane są z długich łańcuchów kwasu poli(β-D-glukuronowego), utworzonego z piranozowej formy kwasu β-D-glukuronowego, połączonej wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Część grup karboksylowych jest zestryfikowana metanolem. Istnieje również możliwość powiązania kilku łańcuchów kwasu pektynowego na skutek tworzenia wiązań diestrowych za pośrednictwem kwasu fosforowego, wiążącego grupy OH przy C-2 i C-3 (tzw. protopektyna). Kwas pektynowy posiada skłonność do tworzenia silnych, wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy grupami COOH i podstawnikami hydroksylowymi. Dodatkowo, w niektórych roślinach, wykazano możliwość estryfikacji grup 2-OH lub 3-OH kwasem octowym. Strukturę przestrzenną stabilizuje możliwość chelatowego wiązania jonów metali. Masy molowe wynoszą 25000 do 3600000 u. Wykazują skłonność do żelowania.</p>  <p>The diagram shows a repeating unit of pectic acid within large square brackets with a subscript 'n'. It consists of four β-D-glucuronic acid rings connected by 1,4-glycosidic bonds. The first and third rings have COOH groups at C2, while the second and fourth rings have COOCH₃ groups at C2. All rings have OH groups at C3 and C4.</p>	<p>Substancje zlepiające komórki roślinne w tkankach.</p>
<p style="text-align: center;">Chityna</p> <p>Jest liniowym poli(aminosacharydem). Zbudowana jest z podjednostek N-acetylo-2-amino-β-D-2-deoksyglukozy połączonych wiązaniami typu 1,4.</p>  <p>The diagram shows a repeating unit of chitin within large square brackets with a subscript 'n'. It consists of two N-acetyl-2-amino-β-D-2-deoxyglucopyranose rings connected by 1,4-glycosidic bonds. Each ring has a CH₂OH group at C2 and an NH-CO-CH₃ group at C2. OH groups are present at C3 and C4.</p>	<p>Jeden z najważniejszych sacharydów strukturalnych u bezkręgowców. Główny składnik skrzydeł owadów i pancerzy skorupiaków.</p>

Tabela 8. Ważniejsze polisacharydy i ich występowanie (c.d.)

<p style="text-align: center;">Kwas chondroitynosiarkowy A i C</p> <p>Heteroglikan liniowy, zbudowany z naprzemiennie występujących cząsteczek kwasu β-D-glukuronowego i N-acetylo-2-amino-β-D-2-deoksygalaktozy estryfikowanej kwasem siarkowym w pozycji 4 (typ A) lub 6 (typ C). Wiązania typu 1,4 i 1,3. Masa 5000 do 50000 u.</p> 	<p>Występują łącznie z kolagenem. Występują w tkance kostnej, chrzęstnej i rogówce. Pełnią też rolę substancji polianionowych wiążących mono- i polikationy.</p>
<p style="text-align: center;">Kwas hialuronowy</p> <p>Heteroglikan liniowy, zbudowany z naprzemiennie występujących cząsteczek kwasu β-D-glukuronowego i N-acetylo-2-amino-β-D-2-deoksyglukozy. Wiązania typu 1,4 i 1,3. Masa pomiędzy 4000 a 8000000 u.</p> 	<p>Wchodzą w skład płynu stawowego, tkanki łącznej, ciała szklistego, ułatwiają migrację komórek, są również odpowiedzialne za sprężystość chrząstek.</p>
<p style="text-align: center;">Heparyna</p> <p>Liniowy polisacharyd różnoskładnikowy, zbudowany z estryfikowanego kwasem siarkowym (w pozycji 2) kwasu α-D-glukuronowego, oraz estryfikowanych resztą SO_3H w pozycji 6 i sulfonowanych w pozycji 2 cząsteczek 2-amino-α-D-2-deoksyglukozy. Wiązania typu 1,4. Masa 6000 do 25000 u.</p> 	<p>Ma silne właściwości antykoagulacyjne. Wchodzi w skład błon komórkowych gdzie może działać jako receptory i uczestniczy w adhezji komórek oraz w oddziaływaniach komórka – komórka. Determinuje także selektywność filtracji kłębuszkowej zależną od ładunku. Jest składnikiem synaps.</p>
<p style="text-align: center;">Gumy roślinne</p> <p>Rozgałęzione sacharydy złożone z D-galaktozy, L-arabinozy, L-ramnozy, ksylozy, fukozy oraz kwasu D-glukuronowego. Przykładem może być guma arabska której zasadniczym elementem strukturalnym są łańcuchy poli(galaktozy), utworzone na skutek tworzenia wiązań 1,3-glikozydowych (α lub β). Pozostałe składniki są związane z pozycjami 6 głównego łańcucha.</p>	<p>Powstają zazwyczaj jako efekt zranienia tkanki.</p>
<p style="text-align: center;">Śluzы roślinne</p> <p>Są to polisacharydy, rozgałęzione w mniejszym stopniu niż gumy roślinne, złożone z pentoz, heksoz oraz kwasów cukrowych. W ich budowie można często wyróżnić homoglikanowy łańcuch (np.: złożony z cząsteczek mannozy w przypadku śluzów roślin motylkowatych) do którego w wybranych pozycjach (najczęściej 6) przyłączone są kolejne fragmenty mono- lub polisacharydowe.</p>	<p>Pełnią funkcję związków zapasowych i rezerwy wody. Stanowią koloid ochronny.</p>

11.1.5 Glikozydy (heterozydy)

Glikozydy powstają na skutek reakcji hydroksylu hemiacetalowego (związanego z węglem C-1 w aldozach lub węglem C-2 w ketozach) ze związkiem niecukrowym. Część niecukrową cząsteczki heterozydu nazywamy aglikonem lub geniną, cukrową zaś glikonem. W zależności od usytuowania tego podstawnika względem płaszczyzny pierścienia sacharydu, rozróżniamy α -glikozydy (genina znajduje się ponad płaszczyzną pierścienia) lub β -glikozydy (aglikon znajduje się pod płaszczyzną pierścienia).

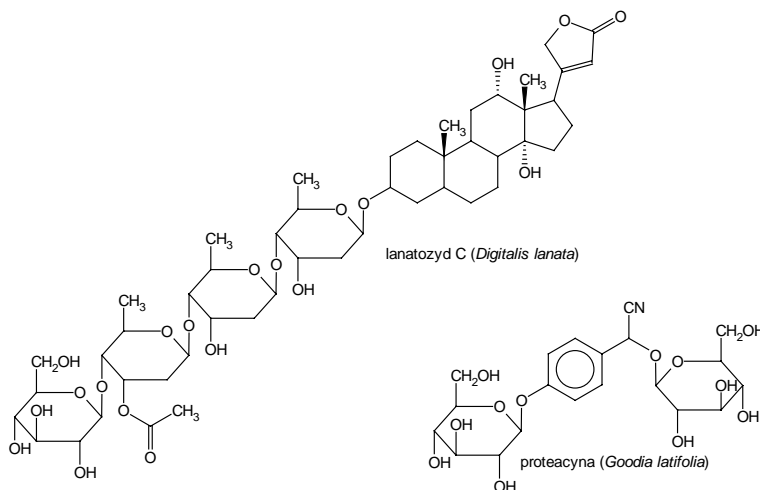


α-glikozyd

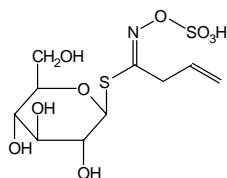
β-glikozyd

Z reguły pochodne typu β wykazują większą trwałość i są częściej spotykane w przyrodzie. W zależności od charakteru atomu części aglikonowej, związanego z glikonem, wyróżniamy:

- O-glikozydy, w których grupa cukrowa związana jest z grupą hydroksylową geniny. Jest to najczęściej występujący typ heterozydów.

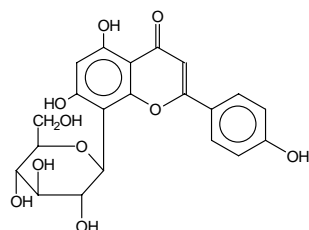


- S-glikozydy, w których połączenia glikozydowe występuje pomiędzy grupą tiolową (-SH) aglikonu a cukrem.



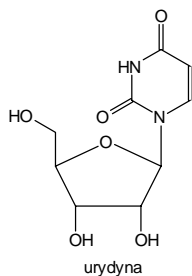
synigryna (*Brassica; Synapis*)

- C-glikozydy, inaczej połączenia C-glikozydowe, w których połączenia aglikonu z cukrem następuje poprzez atom węgla.



witeksyna (*Crataegi sp.*)

- N-glikozydy, reprezentowane przez nukleozydy, zawierają wiązanie pomiędzy azotem aglikonu a cukrem



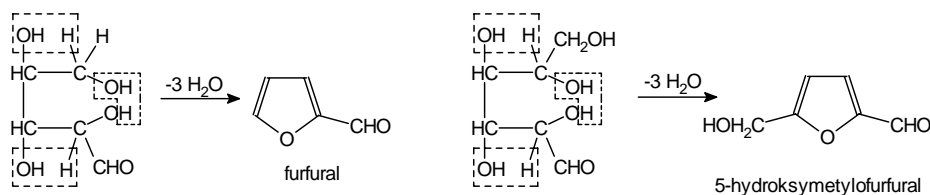
urydyna

Jak widać z powyższych przykładów, glikonem może być zarówno no mono-, jak i polisacharyd. Fragmenty cukrowe mogą być przyłączone do jednego lub kilku miejsc w cząsteczce geniny. Obok sacharydów w heterozydach, spotyka się także kwasy uronowe i alkohole cukrowe.

11.1.6 Reakcje cukrów

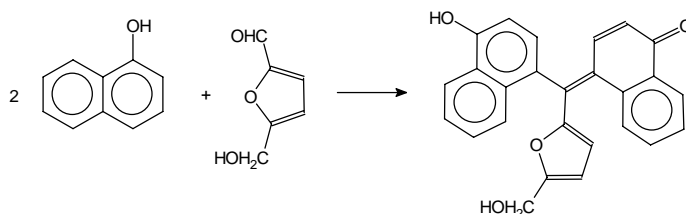
11.1.6.1 Odczyny kondensacyjne

Monosacharydy, ogrzewane ze stężonymi kwasami (octowym, siarkowym, solnym) mogą ulegać dehydratacji. Z pentoz powstaje wówczas furfural, z heksoz zaś 5-hydroksymetylofurfural. Najłatwiej odwodnieniu ulegają pentozy i ketoheksozy. W przypadku oligo- i polisacharydów proces ten, poprzedzony hydrolizą cukru, przebiega wolniej wraz ze wzrostem długości łańcucha sacharydowego.

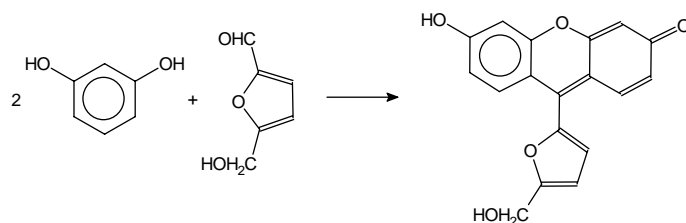


Powstałe aldehydy mogą kondensować z fenolami, tworząc barwne połączenia, np.:

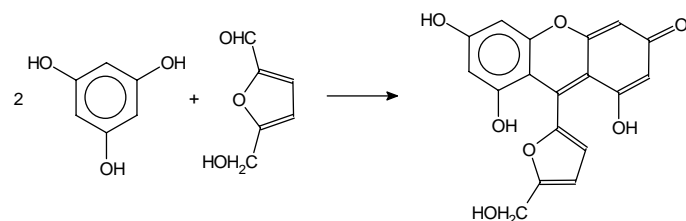
- z 1-naftolem (odczyn Molischa)



- z rezorcyną (odczyn Seliwanoffa)

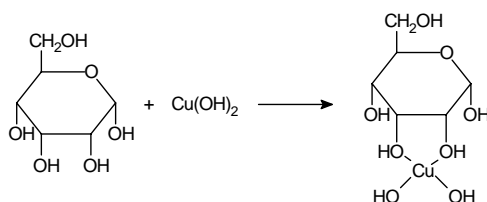


- z floroglucyną (odczyn Tollensa)



11.1.6.2 Tworzenie kompleksów z jonami miedzi

Obecność grup hydroksylowych w cząsteczkach cukrów umożliwia tworzenie rozpuszczalnych barwnych kompleksów z jonami miedzi w środowisku zasadowym.



11.1.6.3 Odczyny redukcyjne

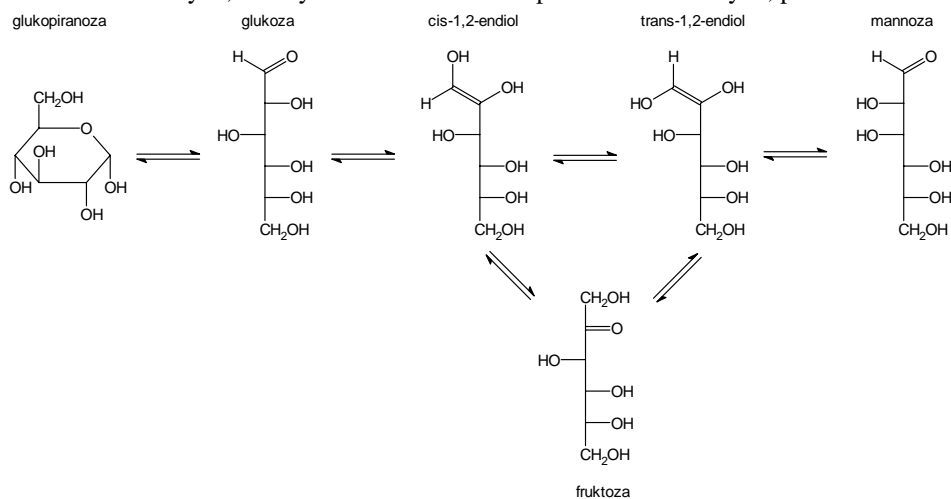
Jak już wcześniej wspomniano grupy aldehydowe lub ketonowe sacharydów uczestniczą w tworzeniu ugrupowań hemiacetalowych bądź hemiketalowych. W roztworach, na skutek równowagi pomiędzy formami łańcuchową i cykliczną istnieje jednakże niewielki odsetek molekuł danego cukru w formie liniowej, z wolną grupą karbonylową. W środowisku zasadowym udział tej formy jest jeszcze większy. Obecność wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej decyduje o redukujących własnościach cukrów. Przejawiają się one w reakcjach z łagodnymi utleniaczami, takimi jak jony metali ciężkich (Cu^{2+} , Bi^{3+} , Ag^+). Nie jest możliwe podanie organicznych produktów tych reakcji gdyż w środowisku zasadowym dochodzi do rozerwania łańcucha sacharydu na mniejsze fragmenty, wydaje się jednak, że pierwszym produktem jest kwas uronowy. Jony metali obecne są w roztworze w formie kompleksów ze związkami polihydroksylowymi (kwas winowy, glicerol) lub amoniakiem, co uniemożliwia ich wytrącenie (w formie wodorotlenków) w środowisku silnie zasadowym. Do najważniejszych odczynów redukujących należą:

- odczyn Fehlinga i Benedicta – w reakcji cukrów z jonami miedzi(II) (w formie kompleksu z winianem sodowo-potasowym lub cytrynianem trisodowym) w środowisku zasadowym powstaje, po ogrzaniu, ceglasty tlenek miedzi(I)
- odczyn Tollensa – w reakcji sacharydów z amoniakalnym roztworem wodorotlenku srebra(I) powstaje metaliczne srebro, wydzielające się w formie błyszczącego lustra na ściankach próbówki
- odczyn Nylandera – polega na reakcji cukrów redukujących z jonami bizmutu(III) w środowisku zasadowym (w formie kompleksu z kwasem winowym) w wyniku czego powstaje czarny osad metalicznego bizmutu

Cukry posiadające zablokowaną hemiacetalową grupę hydroksylową (w heterozydach lub oligosacharydach) nie wykazują odczynów redukcyjnych bez uprzedniej hydrolizy wiązania glikozydowego.

11.1.6.4 Epimeryzacja sacharydów

W środowisku zasadowym następuje wzrost ilości łańcuchowych form cukrów, kosztem struktur cyklicznych. Formy liniowe, z racji obecności grup karbonylowych, mogą ulegać, szczególnie w obecności jonów metali dwuwartościowych, zdolnych do tworzenia kompleksów chelatowych, procesowi enolizacji.



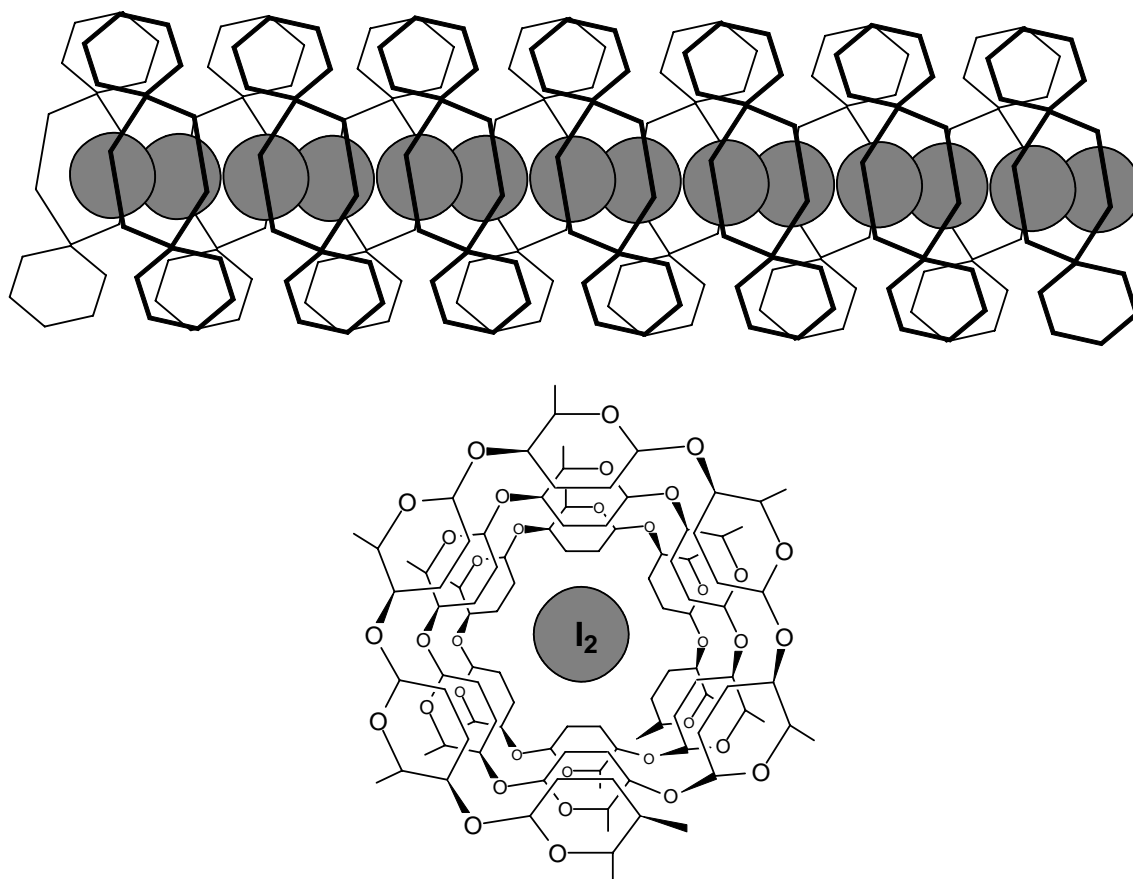
Zostają wówczas zniesione różnice pomiędzy węglem C-1 i C-2, co prowadzi, po cofnięciu się reakcji z odtworzeniem formy karbonylowej, do powstania mieszaniny odpowiednich epimerów formy aldolowej oraz ketozy (np.: z glukozy powstaje mannoza oraz fruktoza). Pomiędzy powstającymi produktami oraz substratem ustala się stan równowagi. W środowisku silnie zasadowym wiązanie enolowe może, na skutek izomeryzacji, przemieszczać się wzdłuż łańcucha węglowego, co prowadzi do powstania innych związków, zawierających grupę karbonylową przy węglu C-3, C-4 itd. W środowisku bardzo silnie zasadowym (2-5 molowy NaOH) powstają produkty rozerwania łańcucha węglowego: aldehyd glikolowy, triozy, tetrozy, formaldehyd oraz produkty ich polimeryzacji.

11.1.6.5 Hydroliza sacharydów

W wyniku reakcji sacharydów z wodą następuje zrywanie wiązań glikozydowych efektem czego jest powstanie oligosacharydów o krótszych łańcuchach, prowadzące w końcu do monosacharydów. Reakcja ta, nazywana hydrolizą sacharydów, przebiega szczególnie szybko w środowisku słabo kwaśnym (środowisko silnie kwaśne prowadzi do dehydratacji cukrów). Szczególnie łatwo pękaniu ulegają wiązania 1,1 oraz 1,2 glikozydowe (np.: w sacharozie).

11.1.6.6 Reakcje polisacharydów z jodem

Roztwory niektórych polisacharydów (skrobia, glikogen, agar, ksylany), pod wpływem wodnego roztworu jodu przyjmują intensywnie niebiesko-granatowy kolor. Jest to efekt adsorpcji jodu na cząsteczkach policukru. Proces ten nosi cech adsorpcji kanałowej, tj. cząsteczki dwuatomowe jodu wnikają do kanałów utworzonych przez spiralnie zwinięte molekuly cukru, pełniąc w tym wypadku rolę liganda. Na każdy skręt tak utworzonej spirali przypada około 6 reszt monosacharydowych wchodzących w skład łańcucha. Oddziaływanie pomiędzy ligandem a kompleksowanym jodem ma charakter niekowalencyjny, opiera się głównie na siłach Van der Waalsa i wiązaniach typu przeniesienia ładunku (*charge transfer*). Molekuly jodu we wnętrzu kanału tworzą łańcuchy wzdłuż których mogą przemieszczać się elektrony. Efektem tej delokalizacji jest silne pochłanianie światła przez powstały kompleks, co prowadzi do intensywnego zabarwienia. Podczas ogrzewania roztworu dochodzi do zniszczenia spiralnej struktury łańcuchów polisacharydu, w efekcie zaś do rozpadu kompleksu z jodem co objawia się zanikiem granatowej barwy. Po ochłodzeniu, na skutek samoorganizacji, pierwotna struktura przestrzenna cukru odtwarza się, co przywraca barwę.



W procesie częściowej hydrolizy skrobi tworzą się poli- i oligosacharydy o krótszych łańcuchach, dających inne zabarwienie z jodem. W pierwszym etapie powstają amylodekstryny wybarwiające się z jodem na fioletowo, następnie sacharydy o krótszych łańcuchach, erytrodekstryny dające czerwone zabarwienie, w końcu achrodekstryny, nie tworzące kompleksów z jodem. Te ostatnie hydrolizują do maltozy a w ostateczności do glukozy.

11.2 Sacharydy – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z podstawowymi reakcjami i właściwościami chemicznymi sacharydów.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Mono-, oligo- i polisacharydy, reakcje charakterystyczne dla cukrów, aldozy, ketozy, piranozy, furanozy, reakcje epimeryzacji, hydrolizy, enancjomery, diastereoizomery, wzory ważniejszych sacharydów (glukoza, galaktoza, sacharoza, fruktoza, maltoza, laktoza, ryboza, dezoksyryboza, skrobia, celuloza, glikogen), produkty pośrednie i końcowe hydrolizy skrobi.

ODCZYNNIKI

5% 1-naftol w etanolu	odczynnik Benedicta	skrobia
H ₂ SO ₄ stęż.	10% AgNO ₃	arabinoza
HCl stęż.	10% NaOH	fruktoza
2M NaOH	2M HCl	sacharoza
2% CuSO ₄	fenoloftaleina	floroglucyna
Ba(OH) ₂ nasycony roztwór	5% CH ₃ COOH	0,5 M H ₂ SO ₄
odczynnik Seliwanoffa	0,02 M I ₂ w 0,1 M KI	NH ₄ OH
odczynnik Fehlinga I	1M NaOH	
odczynnik Fehlinga II	glukoza	

UWAGA: Wodorotlenki sodu i baru, kwas siarkowy, octowy i solny są silnie żrące. Sole baru są toksyczne. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Roztwory jodu i azotanu srebra są silnie plamiące.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

- 100 cm³ 0,1M roztworu glukozy
- 10 cm³ 0,1M roztworu arabinozy
- 10 cm³ 0,1M roztworu sacharozy
- 10 cm³ 0,01M roztworu fruktozy
- 100 cm³ 1% roztworu skrobi (odważoną ilość skrobi rozpuścić w 10 cm³ wrzącej wody i rozcieńczyć do 100 cm³)

OPIS ĆWICZENIA

a. Reakcje ogólne wszystkich sacharydów-reakcja Molischa

Do 1 ml roztworu 0,1M glukozy dodaj 2 krople roztworu 1-naftolu (5% w etanolu) i wymieszaj. Następnie, przechyliwszy probówkę, wlej pipetą po ściance probówki 1 ml stężonego kwasu siarkowego. Na granicy roztworów tworzy się czerwono-fioletowy pierścień.

b. Wykrywanie pentoz

Do 1 ml roztworu arabinozy dodaj 1 ml stężonego kwasu solnego i kilka kryształków floroglucyny. Mieszaninę ogrzewaj do wrzenia przez kilkanaście sekund. Powtórz reakcję z roztworem glukozy. W obecności pentoz tworzy się zabarwienie różowe.

c. Wykrywanie grup -OH

Do 1 ml 2 M roztworu NaOH dodaj kilka kropli 2% roztworu siarczanu miedzi. Do wytrąconej zawiesiny wkraplać 0,1M roztwór glukozy. Powstanie szafirowego zabarwienie świadczy o obecności grup hydroksylowych.

d. Epimeryzacja heksoz

Przygotuj 5 probówek. Do trzech odmierz po 0,5 ml 0,1 M roztworu glukozy, do czwartej 0,5 ml 0,01 M roztworu fruktozy a do ostatniej 0,5 ml 0,1 M roztworu sacharozy. Do pierwszej i ostatniej probówki dodaj 0,5 ml wody, do pozostałych po 0,5 ml nasyconego roztworu wodorotlenku baru. Probówkę pierwszą i drugą ogrzewaj we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Po ochłodzeniu do każdej próbki dodaj 3,5 ml odczynnika Seliwanoffa (0,5% roztwór rezorcyny w 20% kwasie solnym), wstaw do wrzącej łaźni wodnej i obserwuj powstawanie zabarwienia.

e. Właściwości redukujące cukrów-reakcja Fehlinga oraz Tollensa

I.

W dwóch probówkach zmieszaj po 1 ml odczynników Fehlinga I i II a następnie dodaj, do pierwszej z nich, 2 ml roztworu glukozy (0,1M) a do drugiej 2 ml 0,1M roztworu sacharozy. Probówki umieść we wrzącej łaźni wodnej. Ceglasty osad Cu_2O świadczy o obecności substancji redukujących.

odczynnik Fehlinga I - 34,65 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w 500 ml wody

odczynnik Fehlinga II - 125 g NaOH oraz 173 g winianu sodu i potasu w 500 ml wody

II.

Przygotuj dwie probówki (**UWAGA: Użyj probówek dokładnie umytych chromianką**). Do pierwszej nalej 2 ml roztworu glukozy, do drugiej tyle samo roztworu sacharozy. Następnie do obu probówek wlej po 3 ml odczynnika świeżo przygotowanego Tollensa. Probówkę umieść w łaźni wodnej o temperaturze 60-70°C.

Odczynnik Tollensa przygotować przez zmieszanie równych objętości 10% roztworu azotanu srebra i 10% roztworu wodorotlenku sodu. Powstający osad wodorotlenku srebra rozpuszcza się dodając kroplami stężony roztwór amoniaku.

UWAGA: Resztki odczynnika oraz mieszaniny reakcyjnej po wykonaniu próby należy niezwłocznie wylać gdyż podczas stania w amoniakalnych roztworach wodorotlenku srebra powstaje silnie wybuchowy piorunian srebra.

f. Hydroliza sacharozy

Do 10 ml 2% roztworu sacharozy umieszczonego w kolbie stożkowej dodaj 2 ml 2 M roztworu kwasu solnego i ogrzewaj około 15 min. we wrzącej łaźni wodnej. Po oziębieniu w łaźni lodowej do mieszaniny dodaj kroplę fenoloftaleiny i wkraplaj 2 M roztwór NaOH do pojawienia się słabo różowej barwy a następnie powoli dodaj 5% kwas octowy do jej zaniku. Wykorzystaj otrzymany roztwór do reakcji na cukry redukujące (odczyn Fehlinga) oraz do odczynu Seliwanoffa.

g. Wykrywanie wielocukrów-odczyn Lugola

Do 1 ml roztworu skrobi dodaj 1 kroplę roztworu jodu w jodku potasu. Niebiesko-fioletowe zabarwienie świadczy o obecności skrobi. Roztwór ogrzej do wrzenia a następnie ochłódź w łaźni lodowej. Zaobserwuj zmiany barwy.

h. Hydroliza skrobi

Przygotuj 2 szeregi po 10 probówek. Do probówek pierwszego szeregu wlej po 1 kropli roztworu jodu, do probówek drugiego szeregu po 0,5 ml roztworu NaOH (1 M). W kolbie stożkowej umieść 30 ml 1 % roztworu skrobi (przygotować bezpośrednio przed ćwiczeniem) i 10 ml 0,5 M kwasu siarkowego. Z mieszaniny pobierz 2 ml roztworu i dodaj po 1 ml do pierwszych probówek obu szeregów. Kolbę wstaw do wrzącej łaźni wodnej. Pobieranie próbek powtarzaj co 2 minuty. Ogrzewanie kontynuuj do momentu gdy próbka nie będzie wykazywać zabarwienia z odczynnikiem Lugola. W probówkach z roztworem jodu wyróżnij kolejne etapy hydrolizy skrobi. Do probówek drugiego szeregu dodaj po 1 ml odczynnika Benedicta. Zawartość ogrzej we wrzącej łaźni wodnej. Zaobserwuj zmiany intensywności odczynu redukcyjnego.

odczynnik Benedicta - 173 g cytrynianu sodu, 90 g węglanu sodu i 17,3 g siarczynu miedzi w 1 dm³ roztworu

12 Ćwiczenie 8

12.1 Lipidy – wstęp teoretyczny

Lipidy (tłuszczowce) są to estry wyższych kwasów tłuszczowych i jedno- lub wielowodorotlenowych alkoholi. Dzielimy je na tłuszcze proste i złożone. Pierwsze z nich, zwane również tłuszczami obojętnymi, składają się wyłącznie z kwasów tłuszczowych i alkoholi, drugie zaś oprócz tych dwóch komponentów zawierają inne składniki, jak kwas fosforowy, zasady azotowe itd.

12.1.2 Kwasy tłuszczowe.

Kwasy tłuszczowe są kwasami jednokarboksylowymi, w większości wypadków składające się z liniowego, alifatycznego, nierozgałęzionego łańcucha o parzystej liczbie atomów węgla (od 4 do 26 atomów węgla). Kwasy tłuszczowe dzielimy na nasycone (łańcuch nie zawiera wiązań podwójnych) oraz nienasycone, przy czym te ostatnie dzielimy, ze względu na ilość ugrupowań alkenowych w cząsteczce, na jednonienasycone, dwunienasycone itd. Wiązania podwójne występują mogą oczywiście w formach *cis* lub *trans*. Forma *cis* jest najszerszej rozpowszechniona w naturze, izomery *trans* w lipidach naturalnych praktycznie nie występują, powstają natomiast na skutek izomerizacji z kwasów o konfiguracji *cis* pod wpływem czynników zewnętrznych. Jedynie w lipidach mleka i tkanek przeżuwaczy stwierdzono obecność większych ilości tych izomerów. Powstają one w efekcie działania enzymu izomerazy, produkowanego przez mikroflorę bakteryjną układu pokarmowego tych zwierząt. Większe ilości izomerów *trans* wykrywa się z tłuszczach poddanych katalitycznemu utwardzaniu (np.: w margarynie). Izomery *trans* pełnią jedynie funkcje energetyczne, gdyż nie mogą być zużyte przez organizmy do produkcji związków fizjologicznie czynnych (np.: prostaglandyn i tromboksanów). Kwasy tłuszczowe zawierające grupy hydroksylowe, rozgałęzienia łańcucha lub fragmenty pierścieniowe spotyka się rzadko. Wzory najważniejszych kwasów tłuszczowych zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wzory ważniejszych kwasów tłuszczowych

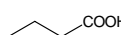
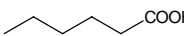
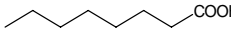
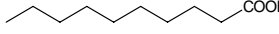

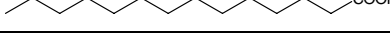
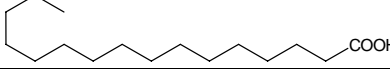
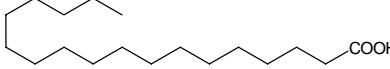
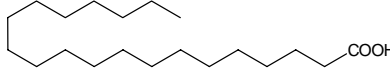
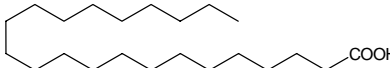
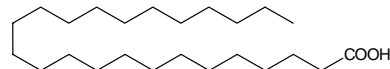
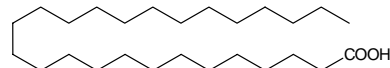
	Nazwa	C _n	Wzór	Główne miejsca występowania
Kwasy nasycone	Kwas 1-butanowy (kwas masłowy)	4		masło
	Kwas 1-heksanowy (kwas kapronowy)	6		masło olej kokosowy
	Kwas 1-oktanowy (kwas kaprylowy)	8		masło olej kokosowy
	Kwas 1-dekanowy (kwas kaprynowy)	10		masło olej kokosowy
	Kwas 1-dodekanowy (kwas laurynowy)	12		olej laurowy olej kokosowy
	Kwas 1-tetradekanowy (kwas mirystynowy)	14		masło kokosowe
	Kwas 1-heksadekanowy (kwas palmitynowy)	16		tłuszcze zwierzęce i roślinne
	Kwas 1-oktadekanowy (kwas stearynowy)	18		tłuszcze zwierzęce i roślinne
	Kwas 1-eikozanowy (kwas arachinowy)	20		olej z orzechów ziemnych
	Kwas 1-dokozanowy (kwas behenowy)	22		olej z orzechów ziemnych
	Kwas 1-tetrakozanowy (kwas lignocerynowy)	24		olej z orzechów ziemnych
	Kwas 1-heksakozanowy (kwas cerotynowy)	26		lanolina

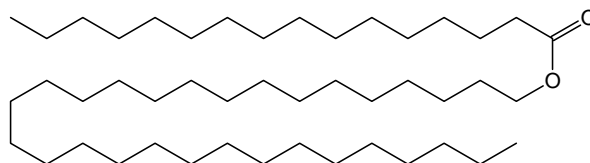
Tabela 9. Wzory ważniejszych kwasów tłuszczowych (c.d.)

Kwasy jednonienasycone	Kwas <i>trans</i> -2-buten-1-owy (kwas krotonowy)	4		olej krotonowy
	Kwas <i>cis</i> -9-heksadecen-1-owy (kwas palmitooleinowy)	16		tłuszcze roślinne i zwierzęce
	Kwas <i>cis</i> -9-oktadecen-1-owy (kwas oleinowy)	18		tłuszcze roślinne i zwierzęce
	Kwas <i>trans</i> -9-oktadecen-1-owy (kwas elaidynowy)	18		tłuszcze przeżuwaczy
	Kwas <i>cis</i> -13-dokozenowy-1-owy (kwas erukowy)	22		olej rzepakowy tran
	Kwas <i>cis</i> -11-dokozen-1-owy (kwas cetolowy)	22		tran, tłuszcz wieloryba
	Kwas <i>cis</i> -15-tetrakozen-1-owy (kwas nerwonowy)	24		tran, tkanka nerwowa
Kwasy wielonienasycone	Kwas <i>cis,cis</i> -9,12-oktedecadien-1-owy (kwas linolowy)	18		oleje roślinne
	Kwas <i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-oktedecatrien-1-owy (kwas α-linolenowy)	18		olej lniany i inne tłuszcze roślinne
	Kwas <i>cis,cis,cis</i> -6, 9,12-oktedecatrien-1-owy (kwas γ-linolenowy)	18		tłuszcze i tkanki zwierzęce
	Kwas <i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eikozatetraen -1-owy (kwas arachidonowy)	20		tłuszcze i tkanki zwierzęce
	Kwas <i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17-eikozapentaen-1-owy	20		tłuszcze i tkanki zwierzęce

12.1.2 Tłuszcze proste

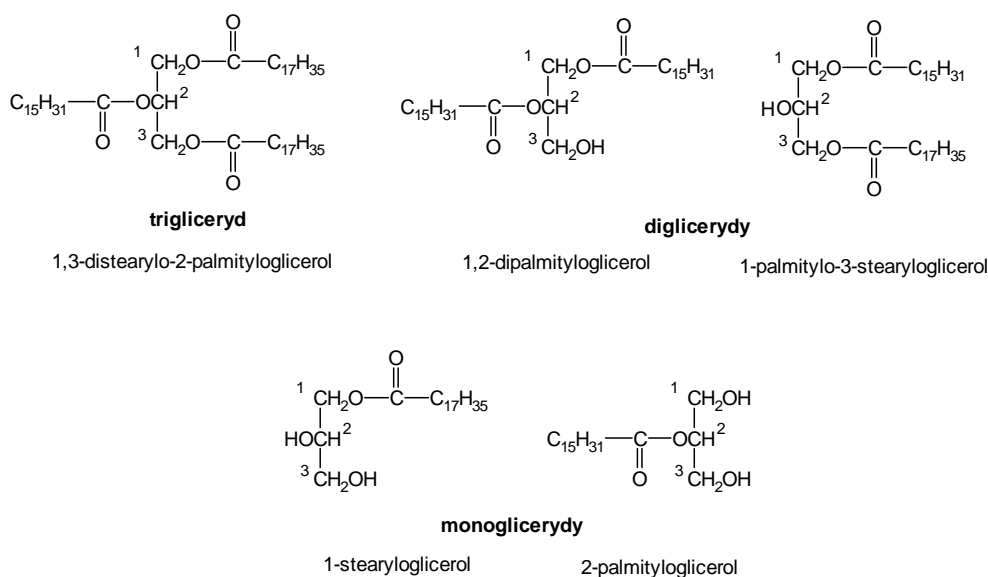
Jak już wspomniano do tej grupy zalicza się lipidy zawierające w swoich cząsteczkach wyłącznie fragment kwasu tłuszczowego oraz alkohol. Związki z tej grupy dzielimy na dwie klasy:

- **woski** – są substancjami popularnymi zarówno w świecie roślin jak i zwierząt. Z chemicznego punktu widzenia woski są estrami wyższych kwasów tłuszczowych i długołańcuchowych alkoholi jednowodorotlenowych (powstających z kwasów tłuszczowych w wyniku redukcji grupy –COOH do CH₂OH), zazwyczaj zbudowanych z parzystej liczby atomów węgla. Z alkoholi wchodzących w skład tych estrów wymienić należy alkohol cetylowy (C₁₆H₃₃OH), stearylowy (C₁₈H₃₇OH), cerylowy (C₂₆H₅₃OH), mirycylowy (C₃₀H₆₁OH), melisylowy (C₃₁H₆₃OH) oraz jednonienasycony alkohol oleilowy (C₁₈H₃₅OH). Wśród kwasów wchodzących w skład wosków znajdujemy związki o łańcuchach złożonych z 16 do 36 atomów węgla. Jest rzeczą znaną, że estry tworzące woski zbudowane są często z alkoholi i kwasów o tej samej liczbie atomów tworzących łańcuch. Dodatkowo w skład naturalnych wosków wchodzi wolne kwasy tłuszczowe oraz węglowodory parafinowe. Znany woski płynne (np.: tzw. olej olbrotowy z czaszki wieloryba) oraz stałe (wszystkie woski roślinne, wosk pszczeli, wosk wełny owczej). Pełnią rolę substancji ochronnych oraz funkcje semiochemiczne.



mirysyna (składnik wosku pszczelego)

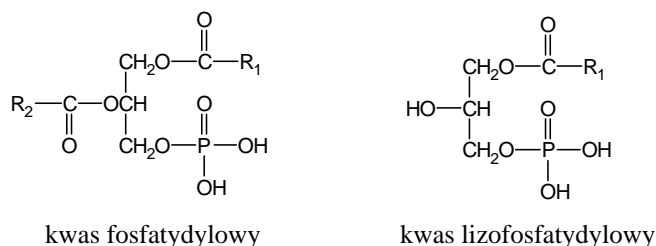
- tłuszcze właściwe** – tłuszcze właściwe (glicerydy), są estrami kwasów tłuszczowych i alkoholu trójwodorotlenowego - gliceryny (1,2,3-propanotriolu). Pamiętać należy, że rodniki acylowe przyłączone do cząsteczki gliceryny są bardzo często różne (pochodzą od różnych kwasów tłuszczowych), ponadto często zdarza się, że zestryfikowane są nie trzy (jak to ma miejsce w **trójglicerydach**), a dwie (w **dwuglicerydach**) lub jedna (**monoglicerydy**) grupa hydroksylowa. Należy zdawać sobie sprawę z faktu, że wszystkie trzy pozycje w cząsteczce gliceryny są nierównocenne, zatem ilość możliwych kombinacji jeszcze bardziej wzrasta. Położenie podstawników acylowych nie jest przypadkowe, i zależy od typu glicerydu. I tak na przykład w lipidach mleka długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe zajmują pozycję przy węglu C-1, a krótkołańcuchowe przy C-3. W tłuszczach tkanek zwierzęcych z kolei w pozycjach zewnętrznych (1 i 3) przyłączone są długołańcuchowe kwasy nasycone, zaś w pozycji 2 (wewnętrznej) reszta kwasu nienasyconego. Wyjątek stanowi tłuszcz wieprzowy, w którego cząsteczkach w pozycjach C-1 i C-3 najczęściej znajdujemy kwasy nienasycone.



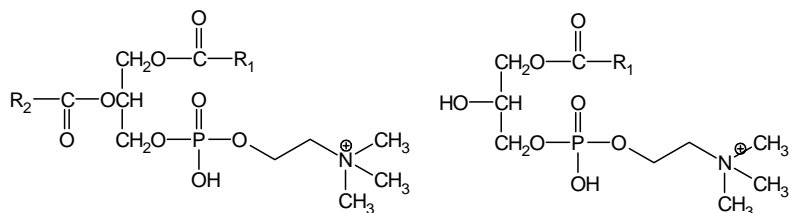
12.1.3 Tłuszcze złożone

Tłuszczowce złożone, w zależności od charakteru nielipidowej części cząsteczki dzielimy na trzy duże grupy:

- fosfolipidy** – lipidy, w skład których cząsteczki wchodzi reszta kwasu fosforowego. Jest ona przyłączona do organicznej części cząsteczki poprzez wiązanie estrowe (jest związana poprzez grupę -OH alkoholu). Znamy wiele różnych fosfolipidów o różnej budowie cząsteczek i różnych dodatkowych podstawnikach, pełniących różne funkcje biologiczne. Związki z tej grupy wchodzi w skład wszystkich błon półprzepuszczalnych ustroju. Oprócz funkcji strukturalnych uczestniczą w aktywnym transporcie jonów, wchodzi w skład lipoprotein odpowiedzialnych z transport tłuszczowców w ustroju, są odpowiedzialne za transport elektronów w mitochondriach. Do najważniejszych fosfolipidów należą:
 - kwasy fosfatydylowe** – są pochodnymi mono- lub diglicerydów których cząsteczka zawiera fosforylowaną grupę hydroksylową. Reszta fosforanowa przyłączona jest do grupy alkoholowej przy węglu C-3. Pochodne monoacylowe nazywamy **kwasami lizofosfatydyłowymi**. Występują one często w stanie wolnym, prawdopodobnie pełnią funkcje infochemiczne, stymulują produkcję DNA i wzrost komórek, wpływają na gospodarkę jonami wapnia oraz na cytoszkielet i apoptozę, są ponadto prekursorami wielu innych fosfolipidów.



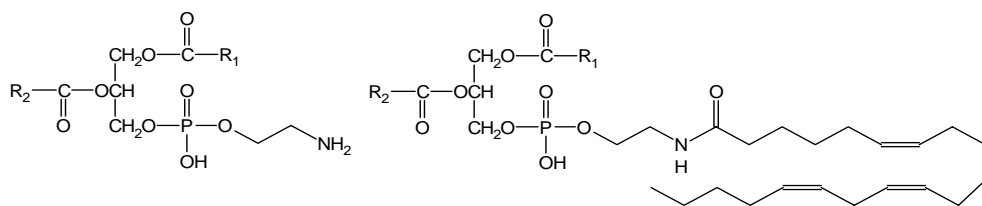
- fosfatydylocholina** – jest pochodną kwasu fosfatydylowego zawierającą zamiast grupy –OH resztę aminy biogennej – choliny, przyłączoną wiązaniem estrowym do atomu fosforu. Analogicznym produktem estryfikacji kwasu lizofosfatydylowego jest **lizofosfatydylocholina**. Związki te znane są również pod nazwami **lecytyna** i **lizolecytyna**. Lecytyna stanowi ponad połowę fosfolipidowej frakcji tłuszczów komórkowych zwierząt, wchodzi w skład błon biologicznych. Fosfatydylocholina zawierająca dwie reszty kwasu palmitynowego jest doskonałym związkiem powierzchniowo czynnym (surfaktantem) obniżającym napięcie powierzchniowe na granicy faz pomiędzy tkanką płucną a gazami oddechowymi i zapobiegającą sklejanemu się pęcherzyków płucnych, lizolecytyny pełni funkcje semiochemiczne (są odpowiedzialne za agregacje leukocytów).



fosfatydylocholina

lizofosfatydylocholina

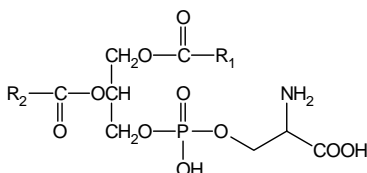
- fosfatydyloetanoloamina** – tak zwana **kefalina**, jest związkiem o strukturze analogicznej do lecytyny, zawierającym zamiast choliny cząsteczkę etanoloaminy. Jest głównym fosfolipidem bakteryjnym. W komórkach roślinnych i zwierzęcych występuje również, ale w mniejszych ilościach niż lecytyna. Z wielu organizmów wyizolowano także pochodne N-acylowe, powstałe w wyniku wytworzenia wiązania amidowego pomiędzy grupą aminową fosfatydyloetanoloaminy a cząsteczką kwasu karboksylowego. Z reguły są to długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (stearynowy, palmitynowy).



fosfatydyloetanoloamina

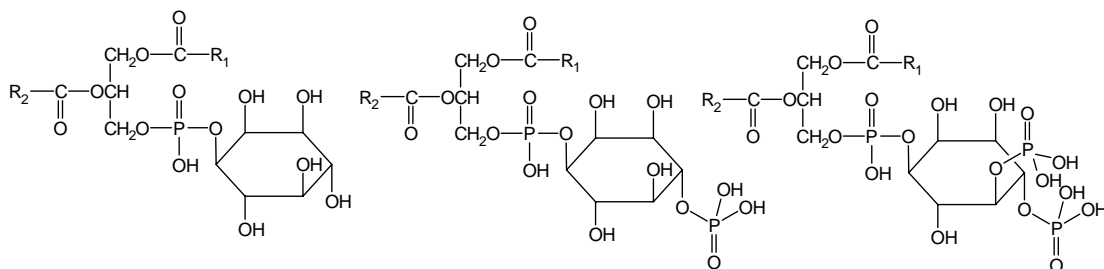
N-arachidonylofosfatydyloetanoloamina

- fosfatydyloseryna** – jest analogiem lecytyny, zawierającym w miejsce reszty choliny cząsteczkę seryny. Jest to jedyny fosfolipid zawierający aminokwas, izolowany z tkanek zwierzęcych. Stanowi on około 10% puli fosfolipidowej u zwierząt. Jest kluczowym związkiem odpowiedzialnym za aktywację kinazy proteinowej C, uczestniczy ponadto w koagulacji komórek krwi.



fosfatydyloseryna

- fosfatydyloinozytol** – jest fosfolipidem zawierającym w swojej budowie cząsteczkę *mezo*-inozytolu przyłączoną do grupy fosforanowej poprzez hydroksyl związany z węglem C-1 cyklicznie. Ponadto wyodrębniono fosforylowane pochodne fosfatydyloinozytolu, w których cząsteczkach znajdują się dodatkowe grupy fosforanowe w pozycji 4 lub 4 i 5 inozytolu. W organizmach pełnią funkcje infochemiczne.

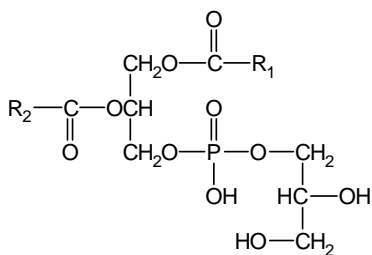


fosfatydyloinozytol

fosfatydylo-4-fosfoinozytol

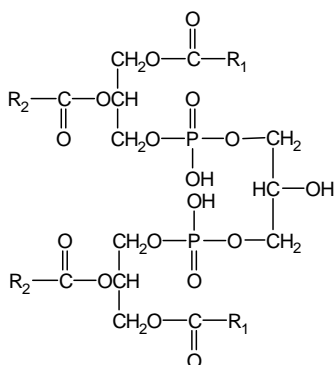
fosfatydylo-4,5-difosfoinozytol

- **fosfatydyloglicerol** – jest fosfolipidem zawierającym dwie reszty glicerolu przyłączone do jednej grupy fosforanowej, przy czym jedna z nich jest acylowana. W tkankach zwierząt występują w niewielkich ilościach, w tkankach roślinnych stanowią 20% frakcji fosfolipidowej (występują głównie w chloroplastach), są również bardzo rozpowszechnione u bakterii.

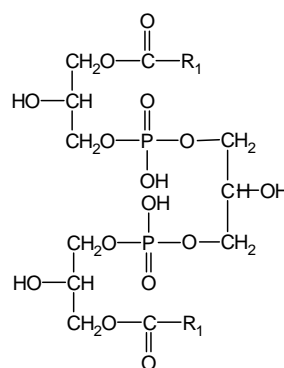


fosfatydyloglicerol

- **difosfatydyloglicerol** – związki z tej grupy nazywane są **kardiolipinami** i powstają na skutek przyłączenia dwóch fragmentów kwasu fosfatydylowego do molekuly glicerolu. Stanowią istotny składnik błon mitochondrialnych oraz błon komórkowych bakterii. Na skutek hydrolizy enzymatycznej z cząsteczki kardiolipiny oderwane mogą być dwie reszty acylowe, co prowadzi do powstania cząsteczki **lizodifosfatydyloglicerolu**.

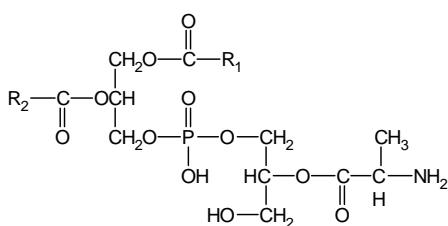


difosfatydyloglicerol

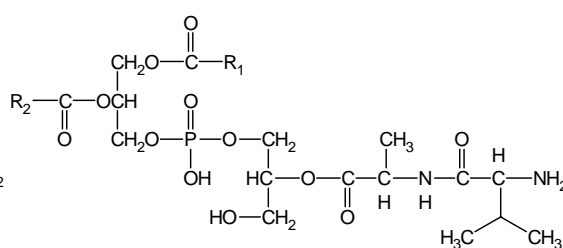


lizodifosfatydyloglicerol

- **lipioaminokwasy** – są to związki zawierające resztę aminokwasową przyłączoną poprzez wiązanie estrowe do wolnych grup -OH w pozycji 2 lub 3 w difosfatydyloglicerolu. Wspomniane reszty aminokwasowe mogą być uwikłane w strukturę peptydową (najdłuższy wyizolowany lipopeptyd zawierał 10 reszt amniokwasowych).

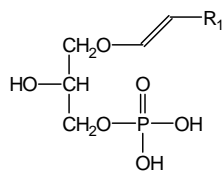


lipioaminokwas

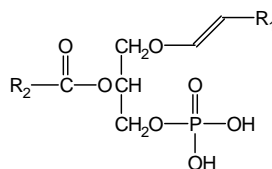


lipopeptyd

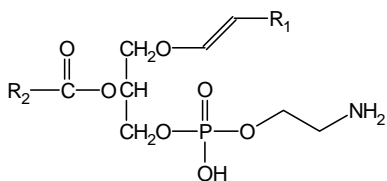
- **plazmalogeny** – znane są przypadki uwikłania grupy hydroksylowej przy węglu C-1 gliceryny w wiązanie eterowe z enolową formą cząsteczką aldehydu, utworzonego z któregoś z długołańcuchowych kwasów karboksylowych. Powstały alkohol diwodortlenowy, zawierający w cząsteczce ugrupowanie eterowe, ulega fosforylacji w pozycji 3, tworząc kwas lizoplazmelinowy, który acylowany kwasem tłuszczowym w pozycji 2 daje w efekcie kwas plazmelinowy. Kwas plazmelinowy, podobnie jak kwas fosfatydylowy, tworzy estry z alkoholami takimi jak cholina czy etanoloamina. Pochodne te nazywamy odpowiednio plazmalogenem cholinowym i plazmalogenem etanoloaminowym. Związki te stanowią co najmniej 10% fosfolipidów mózgu i mięśni. Znaczenie biologiczne tych związków nie jest do końca poznane.



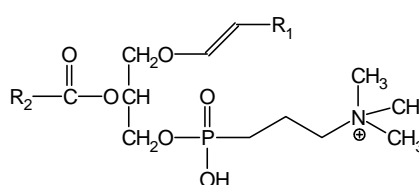
kwas lizoplazmelinowy



kwas plazmelinowy



plazmalogen etanoloaminowy



plazmalogen cholinowy

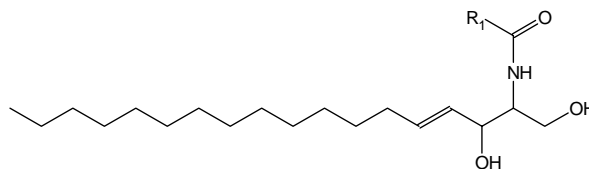
- **sfigomieliny** – są to pochodne 2-amino-1,3-dialkoholi, zwanych sfigozynami. Częściki sfigozyny zbudowane są z wielowęglowych łańcuchów alifatycznych (C16-C20) mogących zawierać do kilku wiązań podwójnych i, sporadycznie, dodatkową grupę hydroksylową w pozycji 4. Najczęściej w tkankach zwierzęcych występuje sfigozyna d18:1 i dihydrosfigozyna d18:0, natomiast w tkankach roślinnych dominuje fitosfigozyna t18:0. Wzory ważniejszych sfigozyn zestawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Wzory ważniejszych sfigozyn

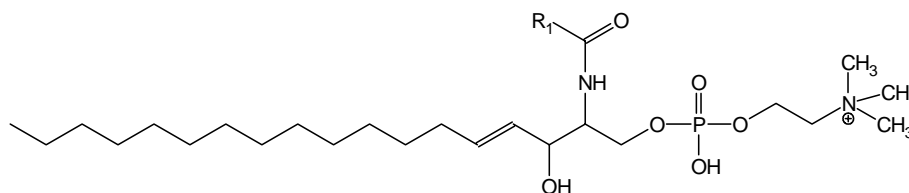
Nazwa zwyczajowa i chemiczna	Wzór strukturalny
sfigozyna d18:1 <i>trans</i> -2-D-aminooktadec-4-en-1,3-diol	
dihydrosfigozyna d18:0 2-D-aminooktadekan-1,3-diol	
C20-dihydrosfigozyna d20:0 2-D-amineikozan-1,3-diol	
fitosfigozyna t18:0 2-D-aminooktadekan-1,3,4-triol	
C20-fitosfigozyna t20:0 2-D-amineikoza-1,3,4-triol	
dehydrofitosfigozyna t18:1 <i>trans</i> -2-D-aminooktadec-8-en-1,3,4-triol	
sfigadienina d18:2 <i>trans,trans</i> -2-D-aminooktadeka-4,8-dien-1,3-diol	

Sfigozyny reagują z kwasami tłuszczowymi, tworząc amidy nazywane **ceramidami**. Obecność wolnych grup hydroksylowych umożliwia z kolei fosforylację tych związków poprzez wytworzenie wiązań estrowych z resztą kwasu fosforowego, przy czym ze źródeł naturalnych wyizolowano wyłącznie produkt reakcji fosforylacji grupy –OH znajdującej się w pozycji C-1 (terminalnej) łańcucha ceramidu. Tak wytworzone estry fosforanowe łączą się z kolei z cząsteczką choliny z wytworzeniem ważnych biologicznie

pochodnych – **sfigomielin**. Związki te występują głównie w tkance nerwowej i wątrobie, przy czym frakcje sfigomielin z obu tych źródeł różnią się charakterem podstawników acylowych (głównym acylowym składnikiem sfigomielin wątroby jest kwas palmitynowy, mózgu – stearynowy i lignocerynowy). Są głównym składnikiem otoczki mielinowej, uczestniczą w przekazywaniu sygnałów przez błony komórkowe. W organizmach owadów wykazano obecność analogów sfigomielin zawierających, w miejsce choliny, cząsteczkę etanoloaminy.

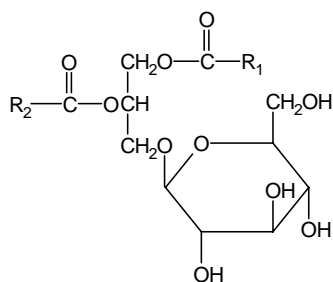


ceramid

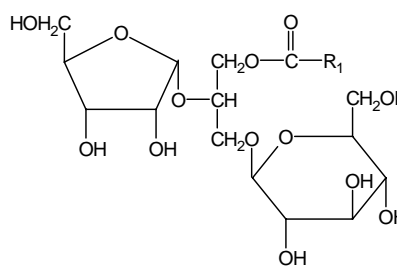


sfigomielina

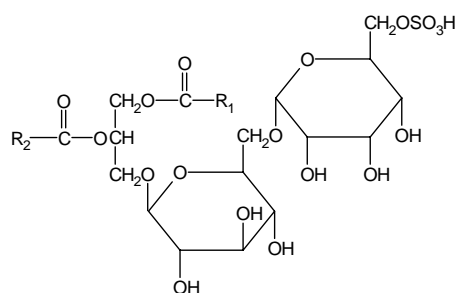
- **glikolipidy** – są to związki zawierające wiązanie eterowe pomiędzy cząsteczką cukru a cząsteczką glicerolu bądź sfigozyny. W pierwszym przypadku mówimy o glikoglicerolipidach, w drugim o glikosfingozydach.
 - **glikoglicerolipidy** – w wytworzenie wiązania eterowego zaangażowana jest grupa –OH przy anomerycznym atomie węgla sacharydu oraz grupa –OH w położeniu 3 glicerolu. Znane są nieliczne przypadki przyłączenie dwu reszt cukrowych do cząsteczki gliceryny, wówczas drugie wiązanie glikozydowe tworzy się poprzez grupę hydroksylową przy drugim atomie węgla 1,2,3-propanotriolu (tzw. diglikoglicerolipidy). Fragmenty cukrowe mogą być zarówno mono- jak i oligosacharydami. Grupy cukrowe mogą być sulfonowane, mogą mieć też charakter aminocukru. W części lipidowej cząsteczki zazwyczaj acylowane są wszystkie wolne grupy –OH. Do klasy glikoglicerolipidów zalicza się także pochodne w których połączenie cukier – lipid odbywa się poprzez wiązanie fosfodiesterowe (tzw. fosfatydylosacharydy), jak też związki w których, zamiast cząsteczki diacyloglicerolu (ew. monoacyloglicerolu) występuje molekula fosfatydyloglicerolu. Przykłady struktur różnych klas glikoglicerolipidów podano poniżej. Występują one głównie u organizmów fotosyntetyzujących (roślin wyższych, glonów, bakterii), gdzie wchodzi w skład błon chloroplastów.



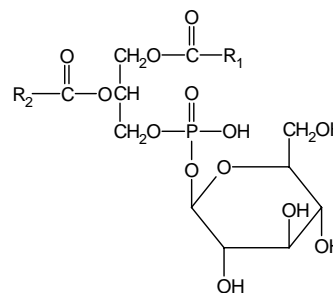
glikoglicerolipid



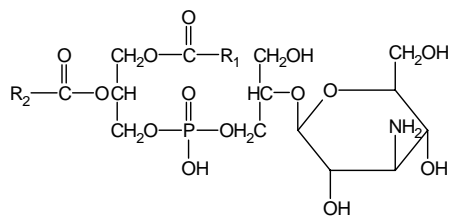
diglikoglicerolipid



sulfonowany glikoglicerolipid

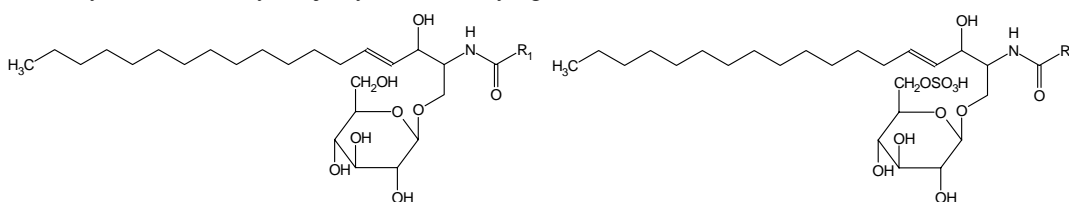


fosfatydylosacharyd



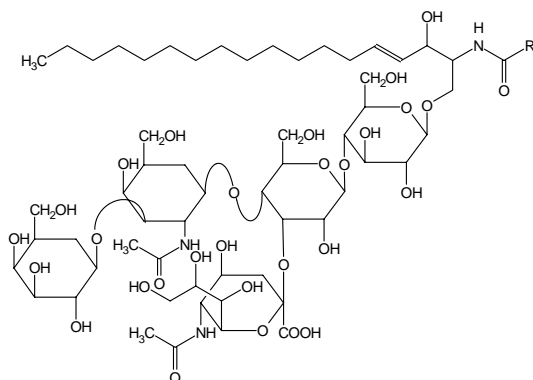
glikofosfatydyloglicerol (pochodna aminocukru)

- glikosfingozydy** – są szeroko rozpowszechnione w tkankach żywych organizmów, zwłaszcza w tkance nerwowej. Wśród nich wyróżniamy cerebrozydy (zawierające jedną resztę cukrową, przyłączoną do grupy hydroksylowej przy C-1 sfingozy) oraz gangliozydy, zawierające w tej pozycji łańcuch oligosacharydowy. W cerebrozydach sacharydem jest zazwyczaj glukoza lub galaktoza, różnią się one ponadto strukturą fragmentu acylowego, przyłączonego do grupy aminowej sfingozy. Reszta cukrowa może być dodatkowo zestyfikowana resztą kwasu siarkowego, efektem czego są sulfoglikosfingolipidy nazywane również sulfatydami. W skład fragmentów oligosacharydowych gangliozydów wchodzi głównie glukoza, galaktoza, kwas acetylnuraminowy (slajowy) lub N-acetylogalaktozaminę.



cerebrozyd

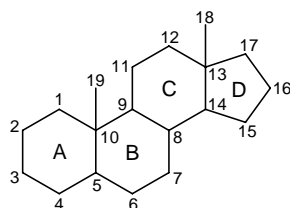
sulfatyd



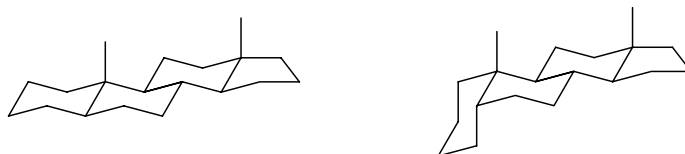
gangliozyd

12.1.4 Sterole

Do lipidów, obok wosków, tłuszczów właściwych oraz tłuszczów złożonych, zalicza się również związki zwane sterolami. W skład wszystkich steroli wchodzi układ czteropierścieniowy, zwany układem steroidowym.

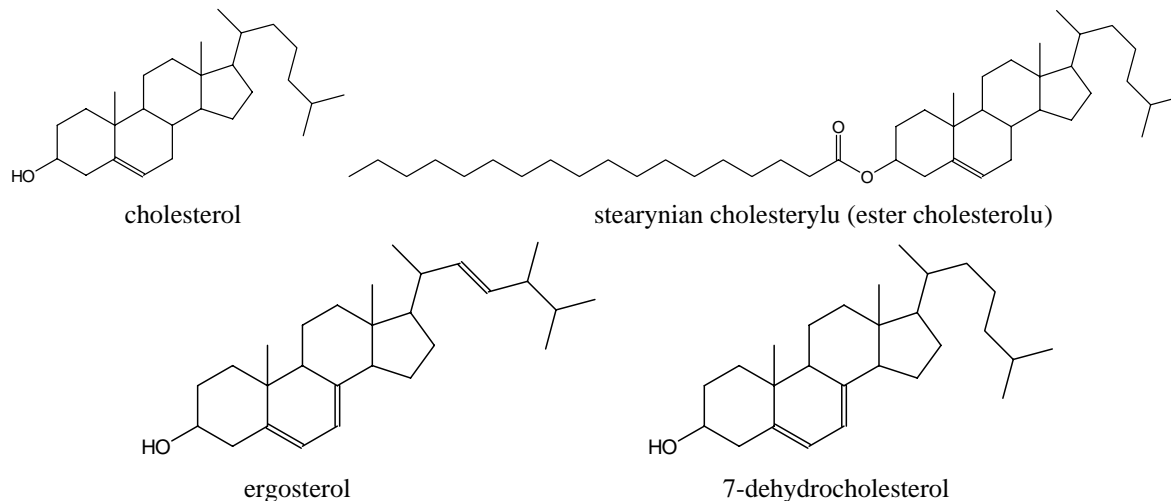


układ steroidowy – numeracja węgli i oznaczenie pierścieni



najczęściej występujące struktury przestrzenne układu steroidowego

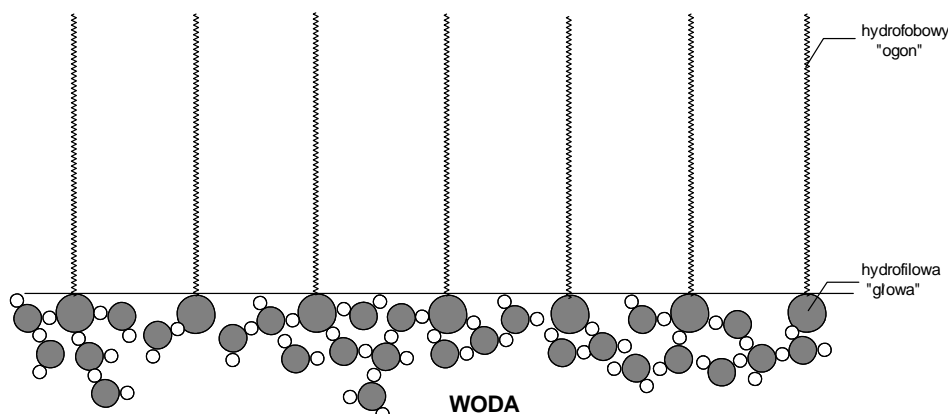
Do najważniejszych steroli zwierzęcych należy cholesterol, będący istotnym składnikiem lipoprotein, błon komórkowych oraz prekursorem większości związków sterydowych występujących w organizmie, takich jak kwasy żółciowe i hormony sterydowe: androgeny, estrogeny, progesterony czy kortykoidy. Pewna część cholesterolu wchodzącego w skład błon biologicznych występuje w formie estrów z kwasami tłuszczowymi. Kolejnym ważnym biologicznie steroidem jest ergosterol, będący prekursorem witaminy D₂ oraz 7-dehydrocholesterol – prekursor witaminy D₃.



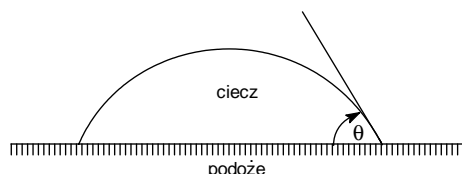
12.1.5 Napięcie powierzchniowe, związki powierzchniowo czynne, micelle

Pod pojęciem napięcia powierzchniowego rozumiemy skłonność powierzchni cieczy do kurczenia się (zmniejszania swojej powierzchni), spowodowaną siłami wciągającymi cząsteczki znajdujące się w fazie powierzchniowej do wnętrza cieczy. Przeniesienie cząsteczki z wnętrza cieczy na granicę faz wiąże się z wkładem energetycznym (zwanym energią powierzchniową), zatem występowanie maksymalnie rozwiniętej powierzchni pomiędzy fazami jest, z punktu widzenia termodynamiki, niekorzystne, czego efektem są wspomniane wyżej siły. Siły napięcia powierzchniowego działają stycznie do powierzchni, przeciwdziałając jej zwiększaniu. Ilościowo siły napięcia powierzchniowego definiuje się jako równą pracy potrzebnej na powiększenie powierzchni na granicy faz o jednostkę bądź równie sile działającej stycznie do powierzchni na jednostkowej długości.

Doświadczenie wykazuje że roztwory wielu substancji organicznych w wodzie wykazują znacznie niższe napięcie powierzchniowe niż czysty rozpuszczalnik. Ponieważ efekt ten musi być wywołany obecnością cząsteczek tych substancji w fazie powierzchniowej (inaczej nie można by zrozumieć ich wpływu na energię swobodną tej fazy), a jednocześnie proces obniżania napięcia powierzchniowego jest termodynamicznie korzystny, możemy oczekiwać, że cząsteczki te wykazywać będą tendencję do gromadzenia się na powierzchni cieczy. Innymi słowy, molekuly tych substancji (zwanych powierzchniowo czynnymi lub kapilarnie aktywnymi) będą adsorbować się na powierzchni cieczy. Większość związków powierzchniowo czynnych wykazuje podobieństwo w budowie, tj. zawiera polarną grupę funkcyjną (aminową, hydroksylową, estrową, tiolową, karboksylową) wykazującą powinowactwo do wody (tzw. grupę **hydrofilową**) oraz długi łańcuch węglowodorowy, który, nie posiadając możliwości tworzenia wiązań wodorowych i jonowych, „ucieka” od powierzchni wody (jest **hydrofobowy**).

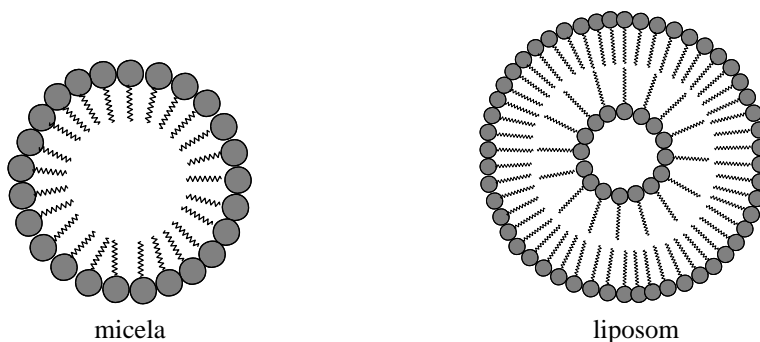


Napięcie powierzchniowe powoduje że ciecz dąży do przyjęcia kształtu kuli (stosunek objętości do powierzchni jest w tym przypadku największy), jednakże krople cieczy na powierzchni ciała stałego, na skutek oddziaływań pomiędzy molekułami podłoża a cząsteczkami cieczy, które są tym większe, im większa jest powierzchnia kontaktu pomiędzy fazami, przyjmują kształt mniej lub bardziej spłaszczony. Jeśli oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami cieczy a powierzchnią (adhezja) są przynajmniej równe sile wzajemnego oddziaływania pomiędzy cząsteczkami cieczy (kohezji), mamy do czynienia z całkowitym zwilżaniem (np.: czystego szkła przez wodę). Jeśli jednak siły adhezji są mniejsze niż siły kohezji, dochodzi do formowania kropli, tym bardziej sferycznych, im większa jest dysproporcja pomiędzy tymi efektami. W celu opisanego stopnia zwilżania podłoża przez ciecz wprowadzono pojęcie kąta zwilżania θ , zdefiniowanego jako kąt pomiędzy stycznymi do obu faz w punkcie styku. Jego wartość jest zależna od relacji pomiędzy napięciem powierzchniowym na granicy faz ciecz-ciało stałe oraz ciecz-powietrze.



Wraz ze wzrostem wartości napięcia powierzchniowego na granicy faz ciecz-powietrze, wzrasta wymagana wartość adhezji, niezbędna do dobrego zwilżenia. Środki powierzchniowo czynne, zmniejszając wartość napięcia powierzchniowego (kohezji) pozwalają na dobre przyleganie wody nawet do substancji których zwilżanie, w zwykłych warunkach, jest bardzo słabe (np.: podłoża brudnego lub pokrytego substancjami tłustymi). Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym zwilżaniu jest adsorpcja substancji powierzchniowo czynnych na powierzchniach hydrofobowych na skutek oddziaływań Van der Waalsa z hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi substancji kapilarnie aktywnych. Tym samym w stronę cieczy skierowane są hydrofilowe "główki", co powoduje wzrost adhezji.

Substancje powierzchniowo czynne, na skutek oddziaływań typu Van der Waalsa, tworzą agregaty, zwane micelami. W micelach zbudowanych z cząsteczek tego typu łańcuchy węglowodorowe skierowane są do środka agregatu, gdzie dochodzi do niekwalencyjnych wiążących oddziaływań pomiędzy nimi, reszty hydrofilowe skierowane są na zewnątrz miceli, gdzie oddziałują z cząsteczkami wody. We wnętrzu takiej miceli zamknięte (enkapsulowane) mogą być substancje o charakterze hydrofobowym. Możliwe jest utworzenie warstwy podwójnej, wówczas wewnątrz miceli wypełnia, z racji jego hydrofilowego charakteru, roztwór wodny. Taki agregat zbudowany z podwójnej (lub wielokrotnej) warstwy cząsteczek związku powierzchniowo czynnego nazywamy liposomem.



12.1.6 Koloidy

Układem koloidalnym (układem mikrojednorodnym) nazywamy układ dwu- lub wielofazowy, w którym jedna faza jest fazą zwartą stanowiącą ośrodek dyspersyjny dla pozostałych, będących fazami rozproszonymi, których wymiary cząsteczek leżą w granicach od kilku do kilkuset nanometrów. Zajmują one, z punktu widzenia stopnia zdyspersjowania fazy rozproszonej, miejsce pośrednie pomiędzy zawiesinami (cząstki są dostrzegalne pod mikroskopem optycznym) a roztworami właściwymi (dyspersja na poziomie molekularnym, cząstki rzędu 1 nm). Podział koloidów w zależności od stanu skupienia ośrodka dyspersyjnego i fazy rozproszonej prezentuje Tabela 11.

Tabela 11. Typy koloidów

Ośrodek dyspersyjny	Faza rozproszona	Nazwa	Przykłady
Gaz	Gaz	-	brak
	Ciecz	mgły	mgła, chmura
	Ciało stałe	gazozole	kurz, dym
Ciecz	Gaz	piany, azozole	piana
	Ciecz	emulsje	mleko, emulsje tłuszczu
	Ciało stałe	lizozole, suspensoidy	zole metali, tlenków, siarczków
Ciało stałe	Gaz	piany stałe	pumeks, okluzje gazowe
	Ciecz	emulsje stałe	kwarc dymny, okluzje ciekłe
	Ciało stałe	zole stałe	szkło rubinowe, perły fosforanowe

Wyróżniamy następujące grupy układów koloidalnych:

- **koloidy dyspersyjne** – otrzymywane przez rozdrobnienie fazy zwartej lub poprzez wytrącenie na drodze chemicznej z roztworu właściwego. Cząstki rozproszone zawierają $10^3 - 10^9$ atomów lub cząsteczek.
- **koloidy asocjacyjne** – powstają na skutek samorzutnego skupiania większej ($10^3 - 10^4$) liczby cząsteczek w agregaty (micele). Ten typ koloidów tworzą związki powierzchniowo czynne.
- **koloidy cząsteczkowe** – tzw. **eukoidy**, w których fazę rozproszoną stanowią pojedyncze, solwatowane molekuly związków wielkocząsteczkowych, takich jak białka, polisacharydy, kwasy nukleinowe, polimery syntetyczne.

Według innej klasyfikacji koloidy dzielimy na **liofobowe**, których cząsteczki nie ulegają solwatacji, zawdzięczające trwałość ładunkowi elektrycznemu pochodzącemu od zaadsorbowanych na ich powierzchni jonów, oraz **liofilowe**, o cząstkach silnie solwatowanych. Jeśli wielkość cząsteczek zdyspergowanych jest różna, mówimy o koloidach **polidyspersyjnych**, jeśli zaś taka sama, o **monodyspersyjnych**. Cząsteczki koloidu nie ulegają sedymentacji (wytrącaniu) w normalnych warunkach (w ziemskim polu grawitacyjnym), gdyż ich rozmiary są tak małe, że chaotyczny ruch cieplny (tzw. **ruchy Browna**) mają przewagę nad siłami ciężkości.

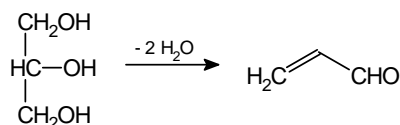
Każda cząstka koloidu składa się z „jądra”, utworzonego z cząsteczek (jonów) fazy rozproszonej, oraz warstwy elektrycznej, złożonej z jonów oraz dipoli fazy dyspersyjnej trwale związanej z „jądrem” koloidu (tzw. warstwa Helmholtza – Sterna). Warstwa ta jest warstwą podwójną, z jednej strony tworzą ją jony zaadsorbowane na powierzchni drobiny koloidu lub zjonizowane, hydrofilowe grupy funkcyjne cząsteczek tworzących micelę, z drugiej, związane siłami elektrostatycznymi przeciwjony obecne w roztworze.

Cechą układów koloidalnych jest zdolność do koagulacji, tj. tworzenia przez cząsteczki koloidu coraz to większych agregatów, co prowadzi w końcu do wytworzenia drobin na tyle dużych, że siły ciężkości przeważają nad siłami Browna, czego następstwem jest wytrącenie się koloidu. Stabilność koloidu liofobowego zapewnia obecność warstwy podwójnej, związane elektrostatycznie jony odpychają się, co uniemożliwia zbliżenie się zdyspergowanych cząstek i ich agregację. Dodanie do układu silnego elektrolitu powoduje odebranie drobinom koloidu części jonów tworzących warstwę Helmholtza (zostają one zaangażowane w tworzenie par i trójek jonowych ze składnikami dodanego elektrolitu), a w następstwie koagulacji. W przypadku koloidów liofilowych proces koagulacji opiera się na niszczeniu przez elektrolit otoczek solwatacyjnych, stabilizujących cząstki zdyspergowane.

12.1.7 Reakcje lipidów

12.1.7.1 Wykrywanie gliceryny

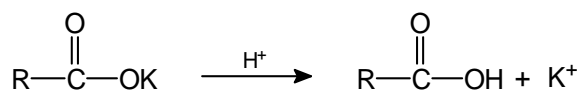
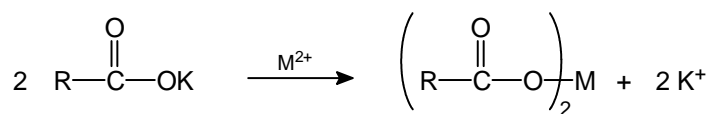
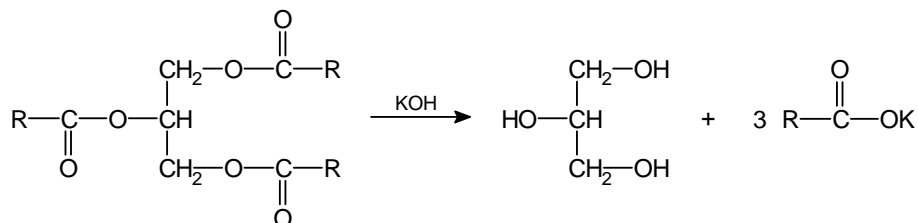
W środowisku słabo kwaśnym, podczas ogrzewania, glicerydy ulegają rozpadowi z wytworzeniem lotnego aldehydu – akroleiny, o charakterystycznym zapachu.



12.1.7.2 Zmydlanie tłuszczów

Na skutek zasadowej hydrolizy lipidów powstaje gliceryna i sole wyższych kwasów tłuszczowych – mydła. Mydła będące solami litowców są rozpuszczalne w wodzie ale w reakcji z solami metali dwu i

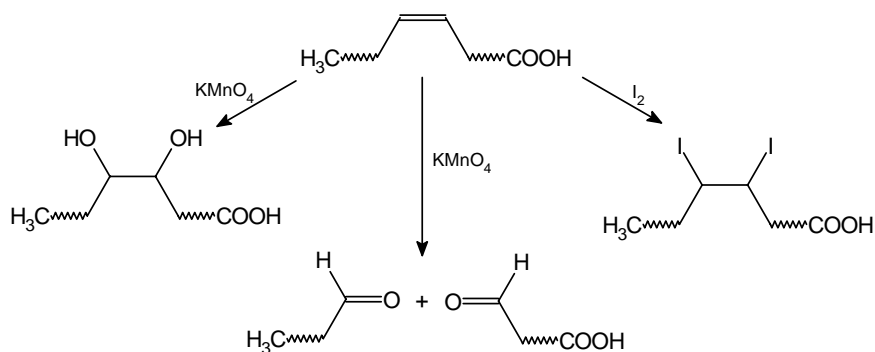
trójwartościowych tworzą, na skutek wymiany, sole nierozpuszczalne. W reakcji roztworów mydeł z kwasami mineralnymi powstają wolne kwasy tłuszczowe. Mydła, podobnie jak lipidy, tworzą układy koloidalne i micelle (gwarantuje to obecność reszty polarnej - jonu karboksylanowego, oraz części niepolarniej - łańcucha alifatycznego). Mydła należą do związków powierzchniowo czynnych, tzn. posiadają zdolność zmniejszania napięcia powierzchniowego cieczy, przez co mogą stabilizować układy koloidalne (np.: lipidów lub białek). Na reakcji tworzenia mydeł opiera się wyznaczanie tzw. liczby zmydlenia, tj. liczby miligramów wodorotlenku potasu zobojętniającej kwasy tłuszczowe zawarte w 1g badanego tłuszczu.



12.1.7.3 Wykrywanie wiązań podwójnych w lipidach

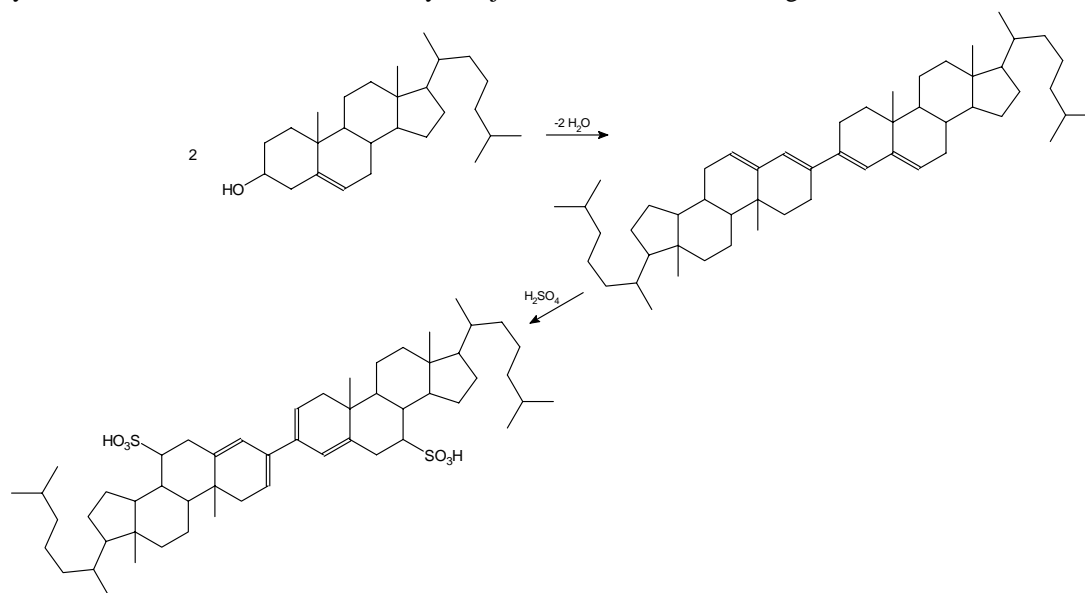
Obecność wiązań wielokrotnych C=C w kwasach tłuszczowych powoduje że lipidy dają odczyny charakterystyczne dla związków nienasyconych. Najbardziej znanymi są:

- reakcja z zasadowym roztworem nadmanganianu potasu – w wyniku reakcji jonów MnO_4^- z alkenami dochodzi do utlenienia wiązania podwójnego, prowadzące do postania dialkoholu lub rozerwania cząsteczki z wytworzeniem dwóch molekuł aldehydu, oraz redukcji jonu manganianowego(VII) z wytworzeniem tlenku manganu(IV), co powoduje odbarwienie roztworu.
- reakcja z jodem (odczyn Hübla) – w reakcji z jodem dochodzi do addycji cząsteczki I_2 do wiązania podwójnego, co prowadzi do powstania diiodopochodnej oraz powoduje odbarwienie roztworu jodu. Katalizatorem tej reakcji jest chlorek rtęci(II). Na reakcji z jodem opiera się wyznaczanie tzw. liczby jodowej, tj. liczby gramów jodu przyłączanego przez kwasy nienasycone zawarte w 100 g badanego tłuszczu. Jest to wartość charakterystyczna dla tłuszczu z danego źródła, pozwalająca wykryć ewentualne zafałszowania.



12.1.7.4 Reakcja cholesterolu

Pod wpływem stężonego kwasu siarkowego tworzą się produkty kondensacji, dehydratacji i sulfonowania cholesterolu (odczyny Salkowskiego oraz Liebermanna-Burcharda). Powstałe produkty są intensywnie zabarwione, co umożliwia identyfikację i oznaczanie ilościowe tego sterolu.



12.2 Lipidy – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z podstawowymi reakcjami i właściwościami lipidów oraz steroli.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Lipidy proste i złożone, woski, kwasy tłuszczowe, wzory ważniejszych kwasów tłuszczowych, reakcje lipidów, zmydlanie, micelle, czynność powierzchniowa, koloidy, sterole, sterydy.

ODCZYNNIKI

1 M NaOH	2 M HNO ₃	CCl ₄
30% NaOH	1 M molibdenian amonu	etanol
1 M CaCl ₂	10% KOH w etanolu	eter dietylowy
1 M BaCl ₂	KNO ₃ + Na ₂ CO ₃ 1:1	aceton
1 M Pb(CH ₃ COO) ₂	kwask oleinowy	chloroform
1 M H ₂ SO ₄	detergent (np. Ludwik)	bezwodnik kwasu octowego
1% I ₂ w etanolu	KHSO ₄	roztwór mydła
2 M NaOH	NaCl	gliceryna
80% CH ₃ COOH	H ₂ SO ₄ stęż.	I ₂ roztwór nasycony w KI

UWAGA: Wodorotlenki sodu i potasu, kwas siarkowy, octowy oraz azotowy są silnie żrące. Sole rtęci, baru i ołowiu są toksyczne. Pracując z nim obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Roztwory jodu są silnie płamiące. Rozpuszczalniki organiczne są łatwopalne. Pracuj z nimi z dala od otwartych źródeł ognia. Ogrzewaj wyłącznie przy użyciu elektrycznych źródeł ciepła, najlepiej pod dygestorium.

OPIS ĆWICZENIA

a. Emulgowanie tłuszczów

Do 7 probówek wlej po 3 ml wody i dodaj po 4 krople oliwy. Następnie dodaj:

I - probówka pierwsza stanowi układ kontrolny, tak że nie dodajemy nic, II - 4 krople 30% roztworu NaOH, III - 4 krople 30% NaOH i 1 kroplę kwasu oleinowego, IV - 1 kroplę kwasu oleinowego, V - kroplę roztworu mydła, VI - kroplę detergentu, VII - 1 kroplę roztworu soli kwasu żółciowego. Probówki zakorkuj i każdą z nich wytrząsaj dokładnie przez około 30s. Odczekaj kilka minut i zaobserwuj która z emulsji jest trwała a która ulega rozdzieleniu na tłuszcz i wodę.

b. Wykrywanie gliceryny

Przygotuj 2 probówki. Do pierwszej z nich wlej 2 krople glicerolu, do drugiej 2 krople oleju. Do obu probówek dodaj szczyptę wodorosiarczany potasu. Probówki ogrzej w płomieniu palnika. Wydzielająca się akroleina ma charakterystyczny zapach. Jej obecność można też wykryć umieszczonym u wylotu probówki papierkiem nasączonym amoniakalnym roztworem azotanu srebra. Akroleina redukuje jony srebra do czarnego srebra metalicznego.

c. Tworzenie mydeł i ich właściwości

1 ml oleju ogrzewaj przez 5 minut w probówce z 4 ml 30% roztworu NaOH i 1 ml etanolu. Następnie mieszaninę wlej do zlewki zawierającej 40 ml gorącej wody i ogrzewaj do całkowitego rozpuszczenia wytworzonego mydła. Otrzymany roztwór przelej do 5 probówek w celu zbadanie jego własności.

- Wysalanie koloidu:

Do probówki zawierającej roztwór mydła dodaj szczyptę chlorku sodu i dobrze wymieszaj. Wytrącony osad mydła oddziel przez dekantację i zbadaj jego rozpuszczalność w wodzie destylowanej.

- Strącanie mydeł nierozpuszczalnych

Do trzech probówek zawierających roztwór mydła dodaj kolejno po kilka kropli roztworu chlorku wapnia, chlorku baru i octanu ołowiu. Po oddzieleniu osadów przez dekantację zbadaj ich rozpuszczalność w wodzie.

- Wytrącanie kwasów tłuszczowych

Do probówki z roztworem mydła dodaj 1 M kwas siarkowy aż do odczynu kwaśnego. Zbadaj rozpuszczalność wytrąconego kwasu tłuszczowego, po oddzieleniu go przez dekantację, w CCl_4 .

d. Wykrywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych

Do 3 probówek dodaj niewielką ilość oliwy, masła i margaryny. Następnie wlej kilka kropli roztworu jodu w alkoholu i kilka kropli roztworu chlorku rtęci (**UWAGA: sole rtęci są toksyczne**). W probówkach zawierających tłuszcze zbudowane z nienasyconych kwasów tłuszczowych obserwuje się odbarwienie roztworu.

e. Wykrywanie choliny i fosforanów w lecytynie

I.

Grudkę lecytyny zalej w parownicze 4 ml 2M roztworu NaOH i ogrzewaj łagodnie, stale mieszając, przez 5 minut. Uzupełnij ubytek odparowanej wody wodą destylowaną. Do roztworu dodaj 80% kwas octowy do wystąpienia odczynu kwaśnego wobec papierka wskaźnikowego. Wytrącone kwasy tłuszczowe odsącz przez zwitek waty a do kropli przesącza dodaj kroplę nasyconego roztworu jodu. Zaobserwuj powstawanie kryształów jodku choliny.

II.

W małym tyglu rozetrzyj bagietką grudkę lecytyny z niewielką ilością mieszaniny azotanu potasu i węglanu sodu. Tygiel praż w płomieniu palnika do szarego zabarwienia mieszaniny (czynność wykonuj pod dygestorium). Po ostygnięciu tygla dodaj do niego 1 ml 2 M HNO_3 i kilka kropli molibdenianu amonu. Żółte zabarwienie świadczy o obecności fosforanów.

f. Izolacja cholesterolu

Żółtko jaja zalej w kolbie 80 cm^3 mieszaniny ekstrahującej, złożonej z etanolu i eteru zmieszanych w stosunku 3:1. Mieszaj przez 10 minut, a następnie przesącz. Osad na sączku przepłucz kolejnymi 20 cm^3 mieszaniny ekstrahującej. Przesącz odparuj na wyparce. Pozostałość rozpuść w 3 cm^3 eteru a następnie dodaj 10 cm^3 acetonu. Osad lecytyn odwiruj. Supernatant odparuj pod próżnią do ¼ objętości, dodaj 5 cm^3 alkoholowego roztworu KOH a następnie ogrzewaj we wrzącej łaźni wodnej przez 30 min. Po oziębieniu dodaj 10 cm^3 eteru. Odwiruj osad wytrąconych mydeł. Przesącz odparuj do sucha na wyparce rotacyjnej, dodaj 2 cm^3 gorącego etanolu, przenieś do probówki wirówkowej i dodawaj kroplami wodę. Wypadający osad cholesterolu odwiruj.

Reakcje cholesterolu:

- Odczyn Salakowskiego

Do suchej probówki wlać 0,5 ml chloroformowego roztworu cholesterolu, a następnie 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego. Czerwona barwa świadczy o obecności cholesterolu.

- Odczyn Liebermanna-Burcharda

Do suchej probówki wlać około 0,5 ml roztworu cholesterolu w CHCl_3 , a następnie 0,5 ml bezwodnika kwasu octowego i kilka kropli stężonego kwasu siarkowego. Powstaje barwa zielona.

13. Ćwiczenie 9

13.1 Otrzymywanie i chromatografia lipidów złożonych

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z metodą chromatografii cienkowarstwowej i analiza składu frakcji lipidów organizmów żywych.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Chromatografia: podział, podstawy teoretyczne, współczynnik R_f , eluenty, polarność, lipidy proste i złożone i ich rola w organizmach żywych.

ODCZYNNIKI

eter dietylowy	molibdenian amonu (1 g w 8 ml wody + 3 ml HCl i 3 ml 12 M HClO ₄ w 86 ml acetonu)	L- α -lizofosfatydylocholina
etanol		sfigomielina
aceton	50% kwas siarkowy	galaktocerebrozyd
chloroform	CdCl ₂ w etanolu	sulfatyd
metanol	gangliozyd	kardiolipina
chlorek metylenu	L- α -fosfatydylocholina	1-monooleilo- <i>rac</i> -glicerol
heksan	L- α -fosfatydyloetanamina	1,3-dioleina
kwas octowy	L- α -fosfatydyloinozytol	trioleina
dipikryloamina 0,2% w acetonie	L- α -fosfatydyolseryna	oleinian cholesterylu
		cholesterol

UWAGA: Kwasy: siarkowy, solny i nadechlorowy są żrące. Sole kadmu są toksyczne. Obowiązuje praca w rękawicach i okularach ochronnych. Rozpuszczalniki organiczne są palne, ogrzewanie prowadź z dala od źródeł ognia, przy pomocy elektrycznych źródeł ciepła.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

100 cm³ 30% etanolu

OPIS ĆWICZENIA

a. Izolacja lecytyn

Żółtko jaja oddziel od białka, zważ i zalej w kolbie stożkowej 75 ml mieszaniny eter-etanol (1:2) a następnie mieszaj intensywnie przez 10 minut, później osad odwiruj. Zlej klarowny supernatant, odparuj rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej a następnie rozpuść pozostałość w eterze dietylowym (10 ml). Mieszając roztwór wkraplaj do niego aceton (50 ml). Osad fosfolipidów odwiruj, przemyj acetonem (15 ml). Pobierz z osadu niewielką ilość (ok. 10 mg) i pozostaw do analizy TLC. Resztę frakcji fosfolipidowej rozpuść w 5 ml etanolu i dodaj 5 ml roztworu chlorku kadmu w C₂H₅OH. Po 10 minutach osad odwiruj a przesącz odrzuć. Pozostałość rozpuść w chloroformie (15 ml). Dodaj 25 ml 30% etanolu, wytrząśnij energicznie a następnie odwiruj w celu dokładnego rozdzielenia warstw. Warstwę etanolowo - wodną (górną) odrzuć. Proces ekstrakcji CdCl₂ powtórz czterokrotnie. Roztwór chloroformowy, po ostatniej ekstrakcji, odparuj na wyparce, pozostałość rozpuść w eterze dietylowym (5 ml), i dodaj do niego acetonu (45 ml). Odwiruj osad lecytyn, przemyj go acetonem (3*10 ml), wysusz i zważ.

b. Izolacja lipidów mózgu lub wątroby

Okolo 25 g mózgu cielęcego lub wątroby zmiksuj, przenieś do kolby stożkowej i zalej 250 ml acetonu. Mieszaninę dokładnie wytrząśnij. Po przesączaniu pod próżnią osad pozostaw rozłożony na bibule celem wysuszenia.

5 g sproszkowanego w mózdzierzu suchego mózgu (lub wątroby) umieść w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zalej 25 ml mieszaniny chloroform-metanol (2:1). Ogrzewaj do wrzenia przez 15 minut, mieszając okresowo zawartość kolby. Po ochłodzeniu osad odsącz przez sączonek karbowany do wytarowanej kolby, rozpuszczalnik odparuj do sucha na wyparce rotacyjnej, zważ a następnie rozpuść pozostałość w 5 ml chlorku metylenu.

c. Ekstrakcja lipidów z osocza

0,5 ml surowicy krwi wkraplaj powoli do 9,5 ml mieszaniny eteru etylowego z etanolem (3:1), wymieszaj i podgrzej umieszczając probówkę w gorącej wodzie na 2-3 minuty, mieszając ciągle zawartość. Osad odwirowuj a warstwę organiczną odparowuj na wyparce rotacyjnej. Suchą pozostałość przemij trzykrotnie 1 ml porcjami heksanu. Wyciągi heksanowe zageść do objętości 0,5 ml.

d. Chromatografia cienkowarstwowa lipidów

Przygotuj dwie komory chromatograficzne, na dno pierwszej nalej mieszaninę chloroform-metanol-woda (65:25:4) - faza 1, do drugiej heksan-eter dietylowy-kwas octowy (80:20:1) - faza 2. Komory pozostaw na 1 h w celu nasycenia parami rozpuszczalników. Przygotuj 4 płytki chromatograficzne, pokrytych żelem krzemionkowym, 2 o wymiarach 10x10 cm i 2 o wymiarach 5x10 cm. Na punkty startowe nanieś:

a. na płytkę do rozdzielania lipidów polarnych (faza 1, większe płytki):

- ekstrakt lipidów z tkanki zwierzęcej
- ekstrakt lipidów z surowicy
- surową lecytynę (roztwór w chlorku metylenu)
- wzorce: gangliozyd, L- α -fosfatydylocholinę, L- α -fosfatydyloetanolaminę, L- α -fosfatydylinozitol, L- α -fosfatydyloserynę, L- α -lizofosfatydylocholinę, sfingomielinę, galaktocerebrozyd, sulfatyd, kardiolipinę

b. na płytkę do rozdzielania lipidów niepolarnych (faza 2, mniejsze płytki)

- ekstrakt lipidów z tkanki zwierzęcej
- ekstrakt lipidów z surowicy
- wzorce: 1-monooleilo-*rac*-glicerol, 1,3-dioleilo-*rac*-glicerol, trioleilo-*rac*-glicerol, cholesterol, oleinian cholesterolu

Po rozwinięciu płytki wyjmij z komór, wysusz a następnie:

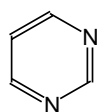
- a. obejrzyj pod lampą UV (obie płytki)
- b. wywołaj w parach jodu (tą samą którą oglądano pod ultrafioletem, obie płytki)
- c. spryskaj 50% kwasem siarkowym i ogrzej w suszarce do 150⁰C (obie płytki)

14 Ćwiczenie 10

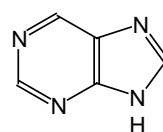
14.1 Kwasy nukleinowe – wstęp teoretyczny

14.1.1 Zasady azotowe, nukleozydy, nukleotydy

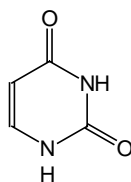
Nukleotydy są estrami fosforanowymi N-glikozydowych pochodnych heterocyklicznych zasad azotowych. Zasady azotowe są związkami o szkieletach puryny (tzw. zasady purynowe) bądź pirymidyny (tzw. zasady pirymidowe). Pierścienie heterocykliczne (purynowy i pirymidynowy) mają strukturę płaską, co nie pozostaje bez znaczenia dla struktury kwasu nukleinowego. Głównymi zasadami pirymidynowymi są tymina, cytozyna i uracyl. Do najważniejszych związków z drugiej grupy należy adenina i guanina. Ponadto z naturalnych kwasów nukleinowych izolowano niewielkie ilości innych związków, których funkcje nie są do końca poznane.



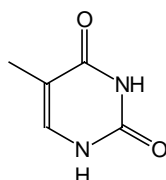
pirymidyna



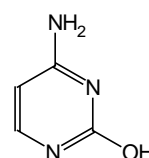
puryna



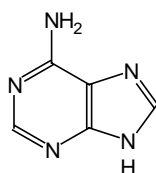
uracyl



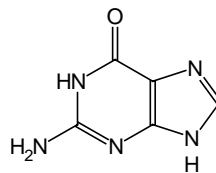
tymina



cytozyna

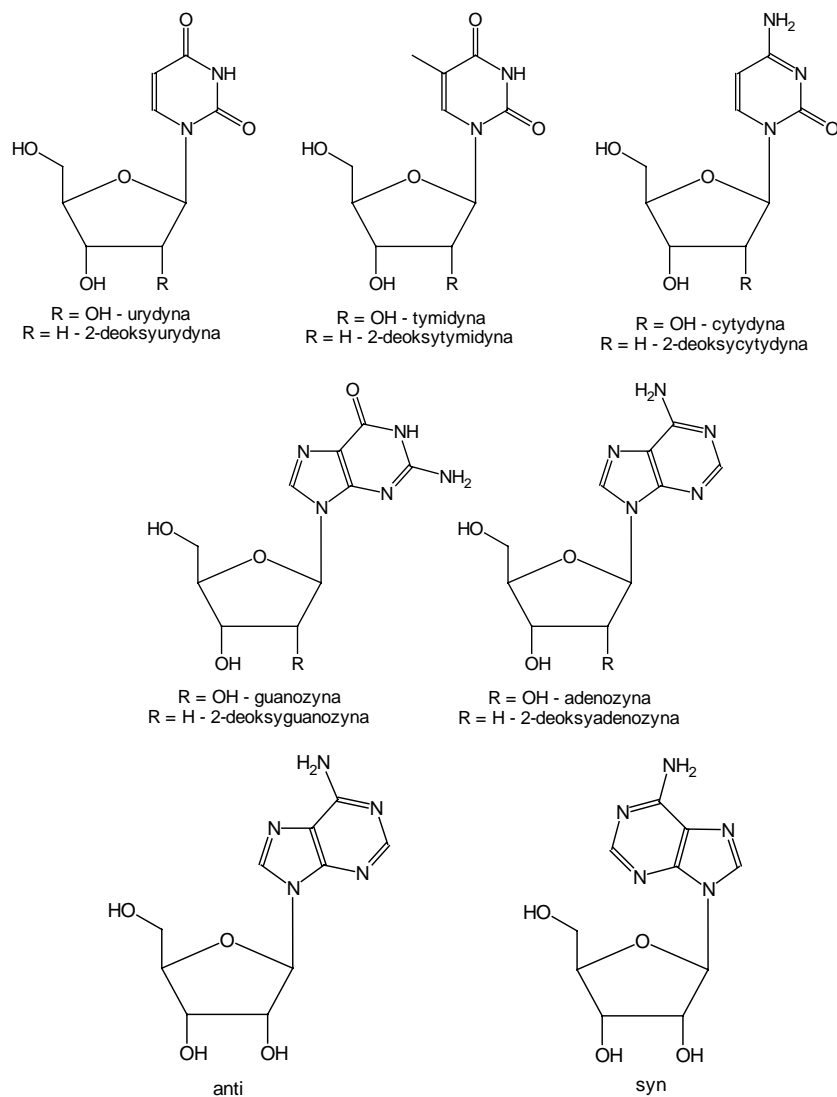


adenina

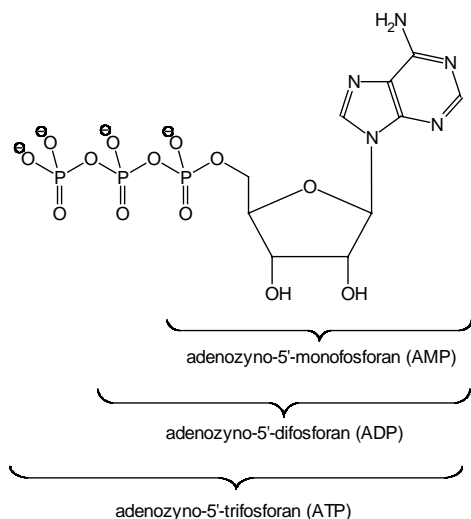


guanina

Zasady azotowe wykazują tautomerię keto-enolową, odgrywającą dużą rolę w mutageniezie i parowaniu zasad. N-glikozydowe pochodne zasad azotowych nazywamy nukleozydami. Komponentem cukrowym tych połączeń jest D-ryboza (w przypadku RNA) lub D-2-deoksyryboza (w przypadku DNA). Wiązanie glikozydowe łączy pozycje C-1' cukru z pozycją N-1 pirymidyny lub N-9 puryny i ma ono konfigurację β . Nukleozydy zawierające rybozę (rybozydy) nazywają się odpowiednio: adenozylna (A), guanozylna (U), cytydyna (C), urydyna (U) i tymidyna (T). Nazwy pochodnych deoksyrybozy tworzymy dodając do nazw rybozydów przedrostek deoksy- i oznaczamy dodając do skrótów jednoliterowych d (np.: dA, dT). Ze względu na zawadę steryczną w przewodzie występują nukleozydy o konfiguracji anty. Numerację pierścienia cukrowego oznaczamy „primami” np. C-1' w odróżnieniu od numeracji zasady heterocyklicznej.

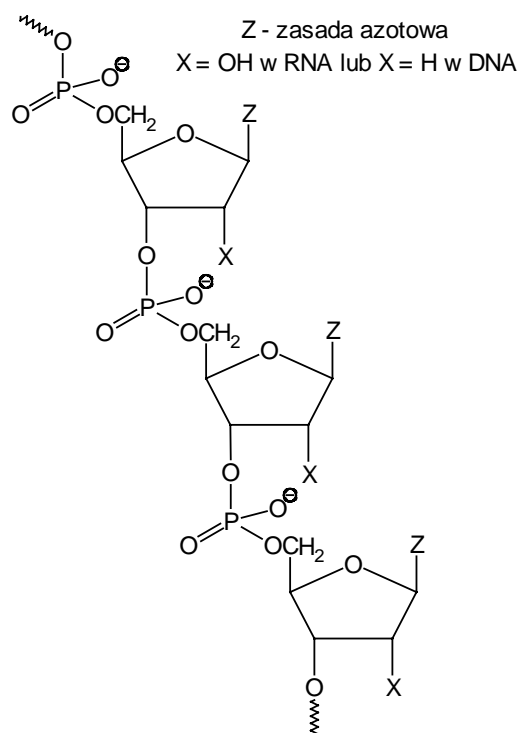


Nukleotydami nazywamy nukleozydy zestryfikowane resztami kwasu fosforowego(V). Reszta fosforanowa(V) przyłączona jest zazwyczaj do węgla C-5' pierścienia cukrowego. Monofosforany nukleozydów oznaczamy dodając do skrótów przypisanych nukleozydom końcówkę MP (np.: AMP, dCMP). Zamiast reszty kwasu fosforowego(V) w cząsteczce nukleotydu może znajdować się reszta pochodząca od kwasu difosforowego(V) lub trifosforowego (V) (kwasu pirofosforowego). Związki te, nazywane di- lub trifosforanami nukleozydów i zapisujemy dodając do skrótu litery DP (dla difosforanu) lub TP (w przypadku trifosforanu) np.: ADM, dTDP, ATP, dCTP.

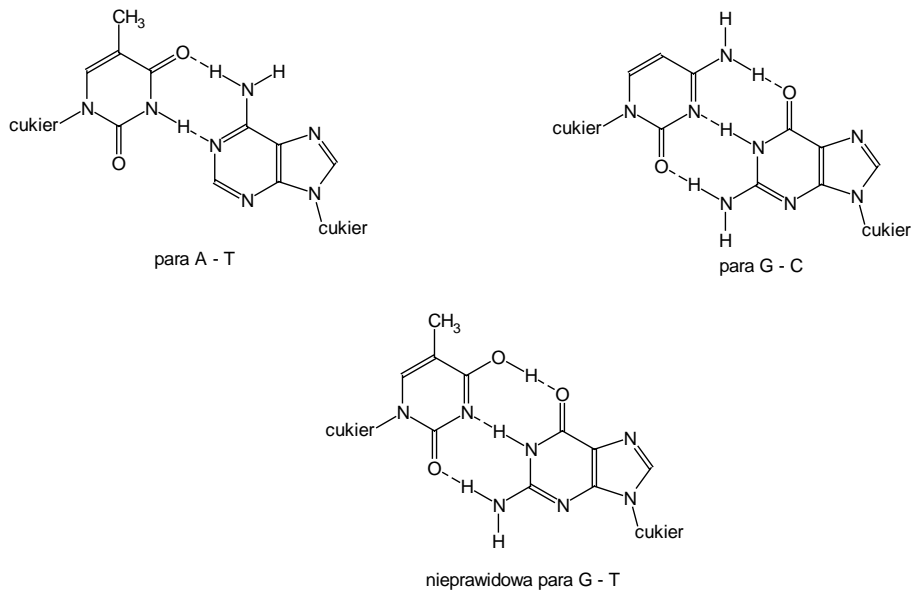


14.1.2 Kwasy nukleinowe

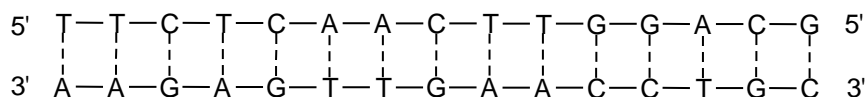
Produktami polikondensacji nukleotydów są kwasy nukleinowe. W organizmach żywych występują dwa ich typy, różniące się ze względu na charakter pierścienia cukrowego i skład nukleotydowy, różniące się zasadniczo właściwościami i funkcjami. Pierwszym z nich jest kwas deoksyrybonukleinowy – DNA, zawierający reszty 2-deoksyrybozy oraz adeninę, guaninę, cytozynę i tyminę. W skład kwasu rybonukleinowego (RNA) wchodzi cząsteczki rybozy oraz adenina, guanina, cytozyna i uracyl. Obok wymienionych zasad azotowych w skład obu kwasów wchodzi niewielkie ilości zasad modyfikowanych o odmiennej strukturze. Proces polikondensacji „cegiełek” nukleotydowych polega na wytworzeniu wiązania estrowego pomiędzy resztą fosforanową w pozycji C-5’ jednej cząsteczki monofosforanu a grupą hydroksylową w pozycji C-3’ kolejnej molekuly. Cząsteczki tych polimerów są polarne, na jednym z końców występuje wolna grupa 3’ hydroksylowa, na drugim 5’ hydroksylowa. Wykazują one charakter polianionów, zdolnych do wiązania zasadowych białek oraz jonów metali wielowartościowych, co nie pozostaje bez znaczenia dla ich struktury i właściwości.



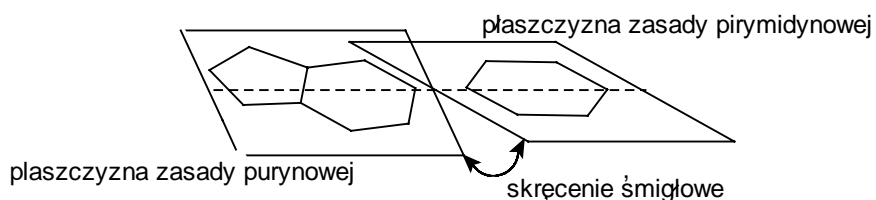
Badania wykazały, że skład procentowy frakcji zasad azotowych izolowanych z RNA jest zmienny i nie obserwuje się większych zależności pomiędzy ich wzajemnymi proporcjami. W przypadku DNA sytuacja przedstawia się odmiennie. W hydrolizacie wykazano obecność równych ilości adeniny i tyminy oraz guaniny i cytozyny, przy czym proporcje pomiędzy obiema parami są różne, w zależności od źródła materiału. Wywnioskowano na tej podstawie, że DNA występuje w formie dimerycznej, przy czym powstawanie dimeru odbywa się na zasadzie tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy resztami A i T oraz G i C (mówimy że zasady te są komplementarne). Procesy tworzenia tych wiązań nazywamy parowaniem zasad. Tak duża selektywność oddziaływań wynika z geometrii centrów protonodonorowych i protonoakceptorowych w cząsteczkach zasad azotowych, stabilności forma tautomerycznych w których występują (np. o ile najbardziej stabilny tautomer tymidyny ulega parowaniu z resztą adenozynty, to w przypadku enolowej formy tymidyny dochodzi do oddziaływania z cząsteczką guanozyny) oraz geometrii wiązania N-glikozydowego.



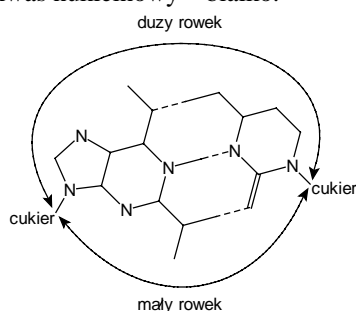
Tak więc sekwencja nukleotydów w jednej nici DNA determinuje kolejność nukleotydów w drugiej nici dimeru, zgodnie z zasadami komplementarności. Oba łańcuchy DNA cechuje przeciwna polaryzacja, tj. koniec 3' jednej nici sąsiaduje z końcem 5' drugiej.



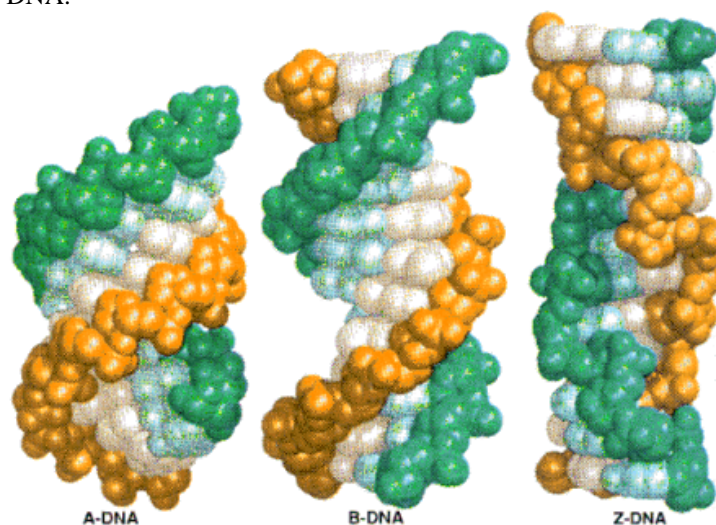
Dwa łańcuchy polinukleotydowe, tworzące cząsteczkę DNA, biegnące w przeciwnych kierunkach, okręcają się wokół wspólnej osi śrubowej tworząc prawoskrętną, dwuniciową helisę. Do wnętrza helisy skierowane są reszty purynowe i pirymidynowe natomiast jej powierzchnia zewnętrzna utworzone jest przez fragmenty fosfosacharydowe. Istnienie struktury helikalnej determinowane jest przez oddziaływania pomiędzy cząsteczkami zasad azotowych wchodzących w skład jednej nici, o tworzeniu struktury dwuniciowej (dimerycznej) decydują wzajemne oddziaływania pomiędzy zasadami dwu łańcuchów. Pierścienie purynowe i pirymidynowe jednej pary komplementarnych zasad nie leżą dokładnie w jednej płaszczyźnie lecz są skręcone względem siebie jak łopaty śmigła.



Struktura przestrzenna DNA jest układem dynamicznym. Stopień skręcenia łańcuchów jest różny i zależy od lokalnej sekwencji nukleotydów oraz czynników zewnętrznych takich jak siła jonowa czy pH środowiska. Ponadto helisa może wyginać się w łuki lub przyjmować formy superhelikalne bez większych lokalnych zmian strukturalnych. Na powierzchni heliksu wyróżnić można dwa zagłębienia, zwane większym i mniejszym rowkiem (bruzdą). Powstają one dlatego, że wiązania N-glikozydowe komplementarnych par zasad nie leżą dokładnie naprzeciwko siebie. Rowki są wyścielane atomami lub grupami funkcyjnymi, będącymi donorami bądź akceptorami protonu (tj. mogącymi uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych), przez co są odpowiedzialne za tworzenie kompleksów kwas nukleinowy – białko.



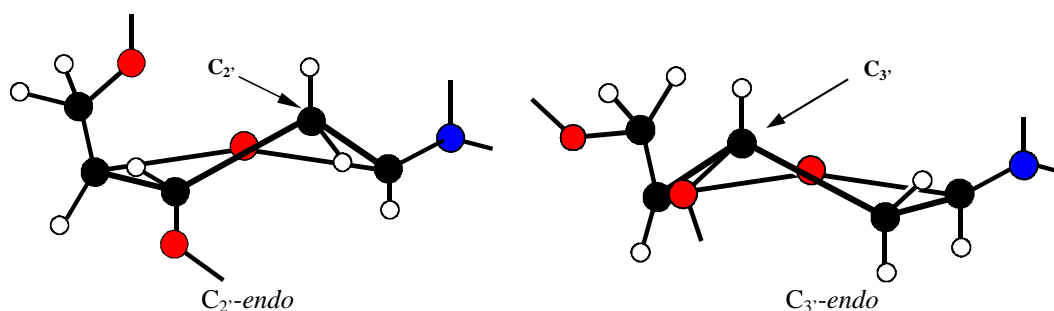
Podczas badań rentgenograficznych wykazano istnienie trzech zasadniczych typów (form), jakie może przyjmować molekula DNA.



Zasadnicze różnice pomiędzy nimi zestawiono w Tabeli 12.

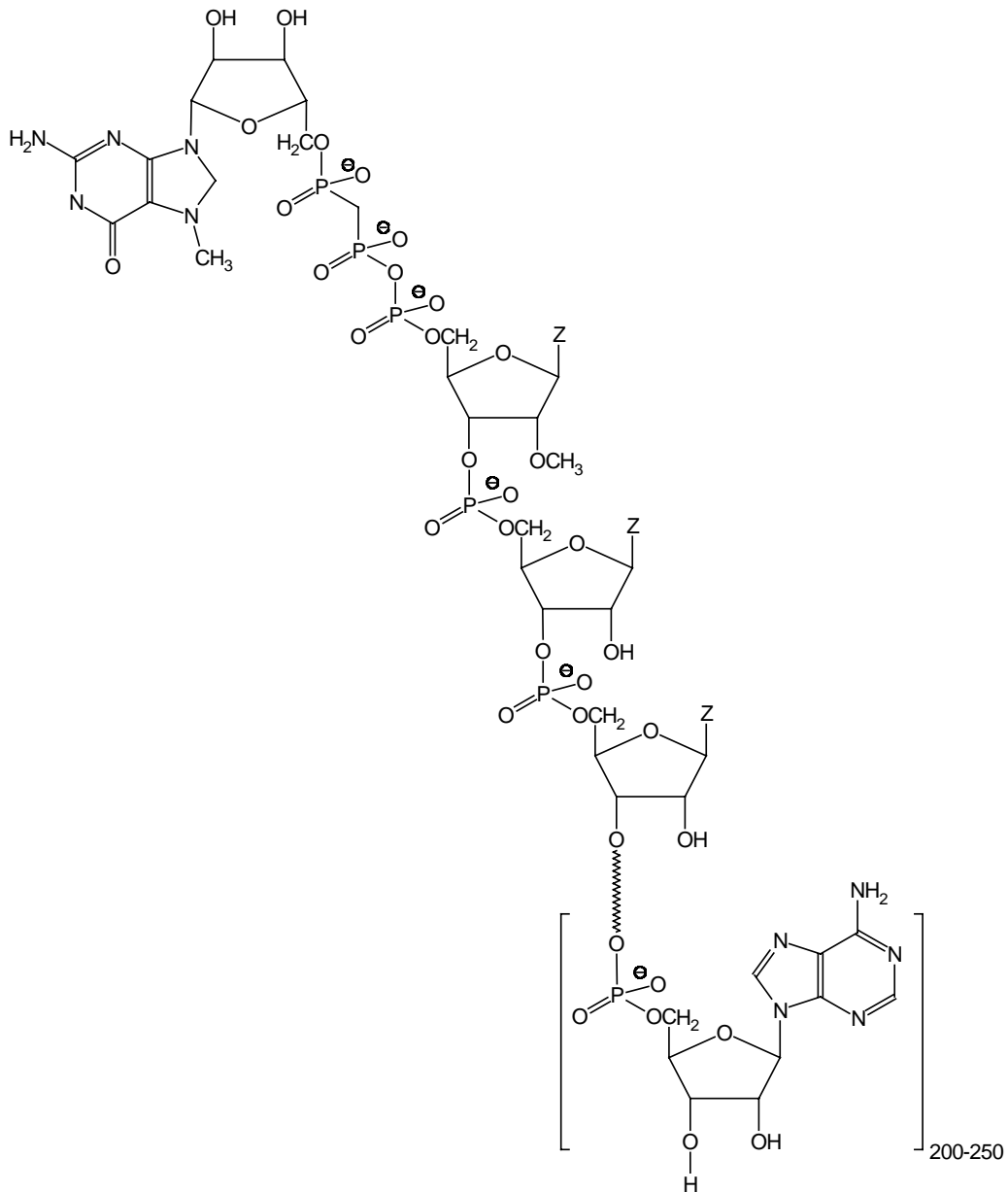
Tabela 12. Porównanie A, B i Z DNA

Parametr	Typ helisy		
	A	B	Z
Kształt	najszerza	pośrednia	najwęższa
Przyrost długości helisy na parę zasad	0,23 nm	0,34 nm	0,38 nm
Średnica helisy	2,55 nm	2,37 nm	1,84 nm
Kierunek skręcenia	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna
Wiązanie glikozydowe	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> dla C i T <i>syn</i> dla G
Konformacja pierścienia cukrowego	C_3' - <i>endo</i>	C_2' - <i>endo</i>	C_3' - <i>endo</i>
Liczba par zasad na skręt helisy	11	10,4	12
Skok helisy	2,53 nm	3,54 nm	4,56 nm
Odchylenie pary zasad od położenia prostopadłego do osi helisy	19°	1°	9°
Duży rowek	wąski i bardzo głęboki	szeroki i dość głęboki	płaski
Mały rowek	bardzo szeroki i płytki	wąski i dość głęboki	bardzo wąski i głęboki



Kwas rybonukleinowy (RNA) występuje w formie monomeru, tj. nie tworzy się kompleks zbudowany z dwóch nici, związanych wiązaniami wodorowymi. W związku z tym, wzajemny stosunek zasad komplementarnych nie musi być równy. Jednakże często dochodzi do parowania się odcinków komplementarnych znajdujących się w obrębie jednej nici. Struktura przestrzenna RNA jest różna i zależna od funkcji danej jego formy. We wszystkich organizmach prokariotycznych i eukariotycznych występują 3 główne typy kwasu rybonukleinowego.

- informacyjny RNA (mRNA) – klasa najbardziej heterogenna pod względem wielkości cząsteczek, ich struktury pierwszorzędowej (kolejności zasad) oraz stabilności. Służą jako przenośniki informacji z DNA do miejsc syntezy białek, gdzie pełnią funkcję matryc na których zachodzi polikondensacja aminokwasów według określonej sekwencji, której następstwem jest wytworzenie łańcucha polipeptydowego. Cząsteczka mRNA wykazuje kilka specyficznych cech strukturalnych. Koniec 5' łańcucha polinukleotydu zbudowany jest z 2'-O-metylowanej reszty nukleotydu, połączonej poprzez resztę 5'-OH z trifosforanem 7-metyloguanozyny. Kolejną cechą informacyjnego kwasu rybonukleinowego jest obecność, w 3' końcowym odcinku łańcucha, fragmentu poliA zawierającego 200-250 reszt adenylanowych. Modyfikacje te chronią cząsteczkę mRNA przed atakiem 3'- oraz 5'-egzonukleaz.

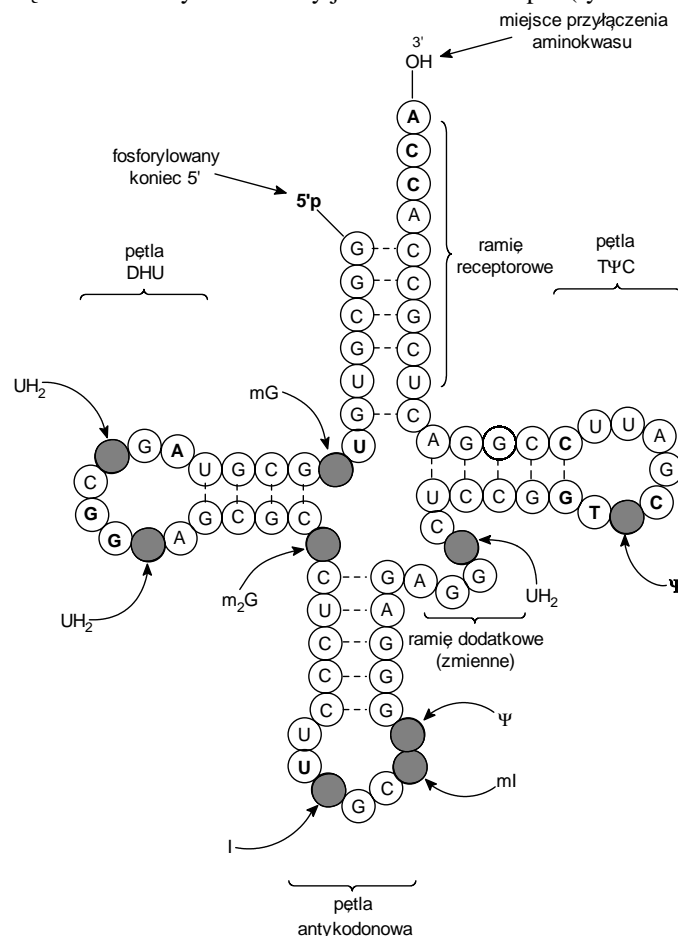


- transferowy RNA (tRNA) – cząsteczki tRNA składają się z ok. 73-93 rybonukleotydów (masa ok. 25 kDa). Służą one jako łączniki w procesie translacji informacji zapisanej w sekwencji nukleotydów matrycowego RNA na swoiste aminokwasy. Każdemu aminokwasowi (z wyjątkiem aminokwasów powstających na drodze modyfikacji posttranslacyjnej) przyporządkowany jest przynajmniej jeden rodzaj transferowego RNA. Każda swoista molekula tRNA różni się od innych sekwencją nukleotydową, jednakże w ich strukturze znaleźć można wiele wspólnych cech. Struktura pierwszorzędowa wszystkich cząsteczek transferowego kwasu rybonukleinowego pozwala na jego sfałdowanie, a wewnątrzcząsteczkowa komplementarność niektórych odcinków umożliwia wytworzenie struktury drugorzędowej, podobnej do liścia koniczyny. W cząsteczkach tRNA występuje wiele nietypowych zasad azotowych, zazwyczaj 7-15 na

cząsteczkę. Modyfikacje takie zapobiegają parowaniu pewnych odcinków łańcucha rybonukleotydu, co jest ważne dla zachowania i stabilizacji geometrii cząsteczki. Ponadto wpływają one na hydrofobowość molekuly, własność istotną dla prawidłowego wiązania z białkami rybosomalnymi oraz wpływającą na strukturę trzyczłonową cząsteczki. Najważniejsze cechy cząsteczki przedstawiono na przykładzie alaninowego transferowego RNA izolowanego z drożdży. Zasady oznaczone czcionką pogrubioną są wspólne dla wszystkich molekuly tRNA. Zaciemnionymi kółkami oznaczono zasady nietypowe (UH₂ – dihydrourydina; mI – metyloinozyna; T – rybotymidyna; I – inozyna; mG – metyloguanozyna; m₂G – dimetyloguanozyna; Ψ – pseudourydyna). W molekule wyróżnić możemy następujące fragmenty:

- ramię akceptorowe – składa się z szypuły, utworzonej ze sparowanych zasad. W jego skład wchodzi oba końce (tj. 3' i 5') łańcucha rybonukleotydu. Koniec 5' jest fosforylowany (nukleotidem 5' końcowym jest zwykle guanozyna). Cztery ostatnie nukleotydy końca 3' są wolne, przy czym ostatnie trzy tworzą sekwencję CCA. Do reszty 3'-OH terminalnej adenozyiny przyłączany jest, poprzez wiązanie estrowe, aminokwas.
- pętla T Ψ C – nazwa pochodzi od wspólnej dla wszystkich tRNA sekwencji rybotymidyna – pseudourydyna – cytydyna występującej w tej pętli.
- pętla DHU – nazwa pochodzi od obecnego w ramieniu, we wszystkich typach tRNA, dihydrouacylu. Liczba reszt tej modyfikowanej zasady jest zmienna.
- pętla antykodonowa – zawiera miejsce wiązania cząsteczki tRNA z odpowiednią sekwencją mRNA (tzw. antykonon). Zawiera siedem zasad o następującej sekwencji: pirymidyna – uracyl – antykonon (3 zasady) – zmodyfikowana puryna – zmienna zasada.
- ramię dodatkowe – najbardziej zmienny fragment cząsteczki tRNA. Stanowi podstawę do klasyfikacji cząsteczek transferowego kwasu rybonukleinowego. Klasa 1 tRNA ma dodatkowe ramię długości 3 – 5 par zasad (75% wszystkich tRNA), klasa 2 tRNA 13 – 21 par zasad (często o strukturze szypuła – pętla).

Cząsteczka tRNA ma kształt litery L (w zgięciu znajdują się pętle T Ψ C oraz DHU). Na końcach ramion litery L znajdują się pętla antykodonowa oraz ramię akceptorowe. W cząsteczce znajdują się dwa dwuniciowe fragmenty helikalne, każdy o długości ok. 10 par zasad. Większość zasad znajdujących się w odcinkach jednoniciowych jest uwikłana w nietypowe dla kwasów nukleinowych wiązania wodorowe (GG; AA; AC). W wiele wiązań wodorowych uwikłany jest także szkielet poli(rybozofosforanowy).



- rybosomalny RNA (rRNA) – rybosom jest strukturą nukleoproteinową w której 2/3 masy stanowią kwasy rybonukleinowe. Rybosom ssaków składa się z dwóch podjednostek różniących się masą, oznaczanych jako 40S ($1,4 \cdot 10^6$ Da) oraz 60S ($2,8 \cdot 10^6$ Da). W skład podjednostki 40S wchodzi pojedyncza cząsteczka RNA (oznaczana jako 18S) zawierająca 1900 zasad (ok. $7 \cdot 10^5$ Da). Większa podjednostka 60S zawiera 3 łańcuchy rybonukleotydowe: 5S; 5,8S oraz 28S o masach odpowiednio 35kDa; 45 kDa oraz $1,6 \cdot 10^6$ Da (co odpowiada ok. 120; 160 i 4700 zasadom). Rybosomalne RNA tworzą w przestrzeni ściśle określone struktury z wieloma odcinkami helikalnymi, powstającymi na drodze wewnątrzcząsteczkowego parowania odcinków komplementarnych.

14.2 Kwasy nukleinowe – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Otrzymanie preparatu DNA i zbadanie jego składu.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Nukleozydy, nukleotydy, zasady azotowe, DNA, RNA, chromatografia-podstawy teoretyczne i techniki.

ODCZYNNIKI

NaCl	HClO ₄ 72%	uracyl
NaHCO ₃	etanol	cytozyna
sulfododecylan sodu	HCl stęż.	adenina
izopropanol	tymina	guanina

UWAGA: Kwasy: solny i nadchlorowy są silnie żrące. Rozpuszczalniki są łatwopalne, operacje z nimi prowadź z dala od źródeł ognia. Ze względu na niebezpieczeństwo wybuchu ogrzewanie z kwasem nadchlorowym prowadź pod dygestorium, dbając o to, by w łaźni wodnej znajdowała się woda. Pracuj w okularach ochronnych!

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotować:

10 cm³ 80% etanolu

OPIS ĆWICZENIA

a. Izolacja DNA

Rozpuścić w 120 ml wody destylowanej 1,5 g chlorku sodu, 5 g wodorowęglanu sodu i 0,6 g detergentu (sulfododecylan sodu). Przygotowany bufor ozięb w łaźni lodowej do 2-4⁰C (w celu obniżenia temperatury łaźni lodowej do pokruszonego lodu dodaj chlorku sodu lub chlorku wapnia). W homogenizatorze umieść cebulę (bądź banan), dodaj około 20 ml wody i starannie zmiksuj. 50 ml uzyskanej papki zmieszaj z przygotowanym buforem, a następnie mieszaj energicznie przez 5 minut. Osad tkanek roślinnych odwiruj przy 2000 obrotów a klarowny supernatant, po ochłodzeniu w łaźni lodowej, przelej do czystego cylindra miarowego o pojemności 250 cm³. Następnie, z pomocą pipety, nawarstw na warstwę wodną schłodzoną do ok. -20⁰C izopropanol (ok. 100 cm³). Przez warstwę alkoholu przeprowadź bagietkę (uważając by nie pomieszać warstw), tak by jej końcówka znajdowała się tuż poniżej granicy warstw, a następnie obracaj bagietką i poruszaj nią delikatnie w górę i w dół, tak aby gromadzący się na granicy DNA przyczepił się do bagietki. Bagietkę wyjmij, a uzyskany surowy dna przenieś do probówki wirówkowej, dodaj 10 ml 80% etanolu, schłodzonego do -20⁰C i odwiruj. Osad kwasu dezoksyrybonukleinowego użyj do dalszych reakcji.

b. Hydroliza DNA

Okolo 5 mg DNA umieść w probówce, dodaj 0,2 ml 72% kwasu nadchlorowego i umieść w wrzącej łaźni wodnej na ok. 1h, co jakiś czas uzupełniając ubytek kwasu wodą destylowaną. Po oziębieniu dodaj 0,6 ml wody, zamieszać i odwiruj przy 3000 obr./min.

c. Chromatografia cienkowarstwowa

Na płytkę chromatograficzną o wymiarach 6x10 cm pokrytą żelem krzemionkowym, nanieś roztwory wzorcowe tyminy, uracylu, guaniny, cytozyny i adeniny oraz próbkę hydrolizatu. Chromatogram rozwiń w układzie chloroform - metanol (0,75:0,25). Płytki wysusz w strumieniu powietrza. Plamy zasad zlokalizuj za pomocą UV.

15. Ćwiczenie 11

15.1 Barwniki naturalne – wstęp teoretyczny

15.1.1 Teoria barwy

Oko ludzkie jest odpowiedzialne za odbieranie promieniowania elektromagnetycznego z przedziału 400-800 nm. Barwą nazywamy efekt neurofizjologiczny (wrażenie wzrokowe) wywołane przez promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu widzialnego o określonej długości fali. Jeśli do oka dociera światło o pewnej określonej częstotliwości z powyższego zakresu (monochromatyczne), wówczas odbieramy wrażenie barwne, odpowiadające czystej barwie widmowej, zwanej również barwą prostą (w widmie światła białego wyróżniamy 7 barw prostych: czerwoną, pomarańczową, żółtą, zieloną, niebieską, błękitną i fioletową oraz kilka barw pośrednich). Jeśli do oka dochodzi promieniowanie elektromagnetyczne będące mieszaniną fal o różnych długościach i różnym natężeniu, oko odbiera je jako pewien wypadkowy bodziec, zwany barwą złożoną (mieszaną). Barwy mieszane ulegają rozszczepieniu w pryzmacie na wiązki promieniowania monochromatycznego. Większość barw złożonych wywołuje takie samo wrażenie wzrokowe, jak pewne „czyste” częstotliwości z widma światła białego, wyjątek stanowią barwy purpurowe, które nie odpowiadają żadnym pojedynczym długościom fali. W przypadku powstawania barw złożonych jako efektu nałożenia się promieniowania o kilku długościach, mówimy o addytywnym mieszaniu (powstawaniu) barw. Wykazano, iż przez zmieszanie addytywne trzech długości fali: czerwonej (700 nm), zielonej (546,1 nm) i fioletowej (435,8 nm), tzw. barw podstawowych, w różnych proporcjach (tj. o różnym natężeniu) można uzyskać dowolną barwę chromatyczną (kolorową) jak i achromatyczną (niekolorową). Promieniowania złożone o takim składzie i takich stosunkach natężeń, jakie występują w świetle słonecznym wywołuje wrażenia światła białego. Wystarczy jednak usunąć z widma którąkolwiek z częstotliwości lub zmienić stosunek natężeń, by zamiast światła białego otrzymać wrażenia barwne. Sposób wywoływania barw poprzez usuwanie pewnych składników padającego promieniowania nazywamy subtraktywnym. Na przykład usunięcie z widma promieniowania białego fal o częstotliwościach odpowiadających barwie żółtej wywoła wystąpienie barwy niebieskiej. Takie pary barw, które w sumie dają wrażenia światła białego nazywamy barwami dopełniającymi (często jedną z pary nazywa się barwą zasadniczą, drugą – dopełniającą). W Tabeli 13 zebrano kilka zestawów barw dopełniających.

Tabela 13. Barwy zasadnicze dopełniające

Barwa zasadnicza	Długość fali	Barwa dopełniająca	Długość fali
Fioletowa	400-440 nm	Żółta	570-572 nm
Indygo	440-470 nm	Żółta	572-575 nm
Błękitna	470-480 nm	Żółtopomarańczowa	575-580 nm
Niebieska	480-490 nm	Żółtopomarańczowa i pomarańczowa	580-600 nm
Niebieskozielona	490-495 nm	Pomarańczowoczerwona i czerwona	600-700 nm
Zielona	495-560 nm	Czerwonopurpurowa	-
Zielonożółta	560-570 nm	Purpurowofioletowa	-
Żółta	570-575 nm	Fioletowa i indygo	400-470 nm
Żółtopomarańczowa	575-590 nm	Błękitna i niebieska	470-486 nm
Pomarańczowa	590-600 nm	Niebieska	486-490 nm
Pomarańczowoczerwona	600-620 nm	Niebieskozielona	490-493 nm
Czerwona	620-700 nm	Niebieskozielona	493-495 nm

Efekt koloru dowolnego ciała lub ośrodka nie świecącego polega na wywoływaniu wrażenia barwy pod wpływem promieniowania oświetlającego. Zabarwienie ciał jest wynikiem różnorodnych procesów fizycznych z których najważniejszymi są:

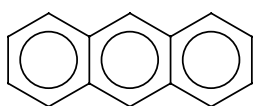
- selektywne pochłanianie – w najprostszym przypadku zjawisko to obserwuje się przy przechodzeniu światła przez ośrodek pochłaniający promieniowanie o pewnych długościach fali, odpowiadających określonym obszarom widma. Barwa takiego ciała jest wrażeniem będącym efektem złożenia tych wszystkich części widma widzialnego, które nie uległy pochłonięciu przez ośrodek. Taki typ zabarwienia wykazuje np.: kolorowe szkło, roztwory itd. Pochłanianie selektywne jest również przyczyną zabarwienia ciał rozpraszających. W tym przypadku światło padające na obiekt wnika w niego na pewną głębokość, ulegając pochłanianiu w pewnym obszarze widma, i następnie wychodzi z powrotem jako światło rozproszone o

zmienionym składzie widmowym. Efekt taki obserwuje się np.: w przypadku liści czy też powierzchni pokrytych farbą.

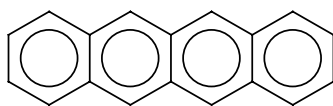
- selektywne odbicie – efekt ten występuje wtedy gdy selektywne pochłanianie staje się bardzo silnie. Zdolność odbijająca jest wówczas największa dla promieniowania o tej długości fali, która ulega najsilniejszemu pochłanianiu. Należy zwrócić uwagę, iż w tym przypadku barwa w świetle przechodzącym jest inna niż w odbitym i mają się one do siebie na ogół jak barwy dopełniające. Zabarwienie na skutek selektywnego odbicia wykazują przede wszystkim metale jak też niektóre roztwory, np.: czerwony atrament w świetle przechodzącym jest czerwony, zaś roztwór chlorofilu zielony, w świetle odbitym ciecze te przyjmują odpowiednio zabarwienie zielone i czerwone.
- rozproszenie światła na skutek niejednorodności ośrodka – niejednorodność ośrodka przez który przechodzi światło powoduje, iż w przypadku gdy rozmiary „niejednorodności” są porównywalne z długością fali, obserwuje się zabarwienie wynikające z różnic w rozpraszaniu promieniowania. Najsilniej rozpraszane są fale najkrótsze (tj. niebieskie i fioletowe), natomiast najslabiej najdłuższe (czerwone). Zdolność rozpraszająca dla niejednorodności o określonej wielkości jest odwrotnie proporcjonalna do λ^4 . Rozpraszanie jest efektem np.: błękitnego zabarwienia nieba czy też purpurowego zabarwienia złota koloidalnego.
- zabarwienie na skutek interferencji – zjawisko to obserwowane jest głównie przy odbiciu wiązki światła od dwóch powierzchni ograniczających cienką, przezroczystą warstwę przy czym dla danego kąta padania i danej grubości warstwy w świetle odbitym wygaszone zostają te barwy, dla których różnice dróg optycznych wynoszą nieparzystą wielokrotność połowy długości fali. W świetle przechodzącym ciała takie wykazują zabarwienie będące barwą dopełniającą światła odbitego.

15.1.2 Podstawy fotokolorymetrii

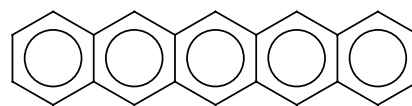
Absorpcja światła widzialnego przez różne materiały jest uwarunkowana pochłanianiem kwantów promieniowania przez cząsteczki. Energia fotonów światła widzialnego i ultrafioletowego zużywana jest do wzbudzenia stanów elektronowych molekuł. Energia potrzebna na wzbudzenie elektronów należących do różnych typów atomów lub wiązań w cząsteczce jest różna, zatem przez różne związki absorbowane są różne długości fali. Najwyższa energia potrzebna jest do wzbudzenia elektronów walencyjnych tworzących wiązanie pojedyncze (wiązanie typu σ) i odpowiada promieniowaniu z zakresu dalekiego ultrafioletu, mniejsza - na wzbudzenie elektronów wiązań podwójnych oraz elektronów orbitali d jonów metali (te przejścia energetyczne leżą w zakresie bliskiego ultrafioletu i światła widzialnego). Atomy i grupy funkcyjne odpowiedzialne za absorpcję światła, a tym samym nadawanie materii barwy nazywamy chromoforami. Są to najczęściej wiązania podwójne: C=C, C=N, C=O, C=S, grupy nitrowe i układy aromatyczne. Silną absorpcję światła widzialnego wykazują także niektóre jony metali bloku d i f , między innymi: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} . Jeśli dwa (lub więcej) układów chromoforowych występuje w bezpośrednim sąsiedztwie, dochodzi pomiędzy nimi do tzw. sprzężenia efektem czego jest przesunięcie pasma absorpcji w stronę fal dłuższych. Przykładem sprzężeń pomiędzy chromoforami może być seria węglowodorów aromatycznych:



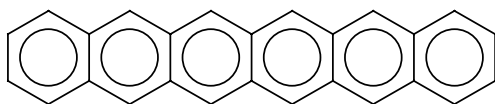
antracen
bezbardwy



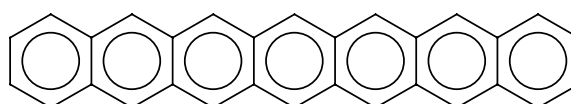
tetracen
pomarańczowy



pentacen
niebieski



heksacen
zielony



heptacen
ciemnozielony

Wiele grup funkcyjnych przyłączonych do chromoforu lub sprzężonego układu chromoforów powoduje zmianę długości fali absorbowanej przez związek oraz intensywności tej absorpcji. Podstawniki takie nazywamy auksochromami (najważniejszymi są halogeny, grupy hydroksylowe i aminowe). Efekt ten polega na oddziaływaniu podstawnika z elektronami chromoforu, skutkiem czego są zmiany energii potrzebnych na ich wzbudzenie. Zmiany podobne jak na skutek działania auksochromów obserwuje się często pod wpływem

rozpuszczalnika. W przypadku gdy zmiana położenia pasma absorpcji następuje w stronę większych długości fali (mniejszych częstotliwości) mówimy o przesunięciu batochromowym (przesunięcie ku czerwieni), jeśli w stronę przeciwną – o przesunięciu hipsokromowym (przesunięcie w stronę fioletu). Zwiększenie intensywności pasma absorpcji pod wpływem podstawnika lub rozpuszczalnika nazywamy efektem hiperchromowym, zaś zmniejszenie – efektem hipochromowym.

Podstawą fotokolorymetrii jest prawo Berra, obowiązujące dla roztworów gazowych, ciekłych i stałych o niezbyt dużym stężeniu. Stwierdza ono, że natężenie I światła monochromatycznego, przechodzącego przez warstwę pochłaniającą o grubości l i o stężeniu substancji pochłaniającej promieniowania wynoszącym c , maleje wykładniczo.

$$I = I_0 e^{-\epsilon lc}$$

gdzie I_0 oznacza początkowe natężenie promieniowania, ϵ - współczynnik charakterystyczny dla każdej substancji pochłaniającej, zwany współczynnikiem ekstynkcji. Wartość współczynnika ekstynkcji dla każdego materiału jest zależna od długości fali. Logarytm naturalny ze stosunku natężeń wiązki padającej do przechodzącej przez ośrodek nazywamy absorbancją.

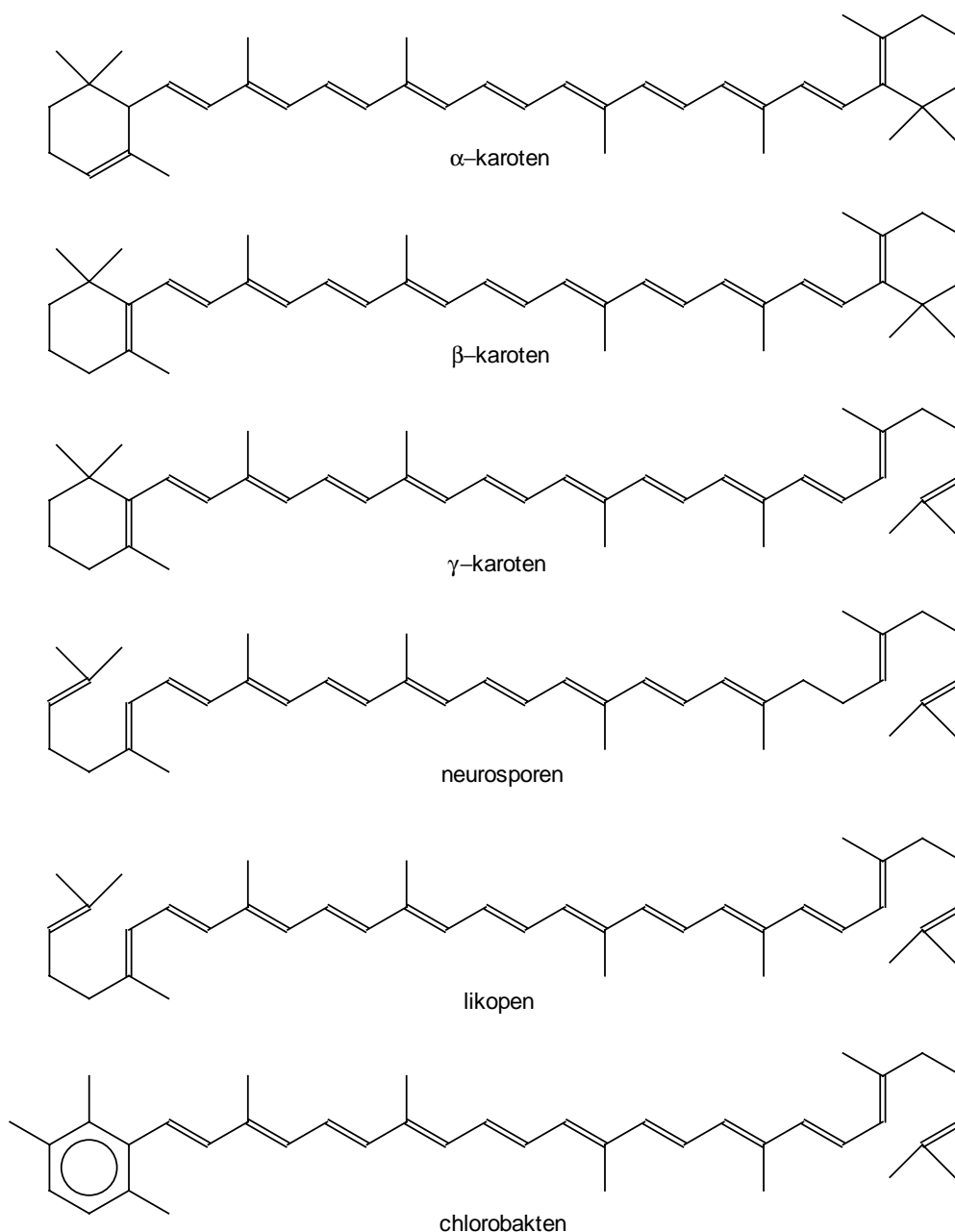
$$A = \ln \frac{I_0}{I} = \epsilon lc$$

15.1.3 Ważniejsze klasy barwników naturalnych

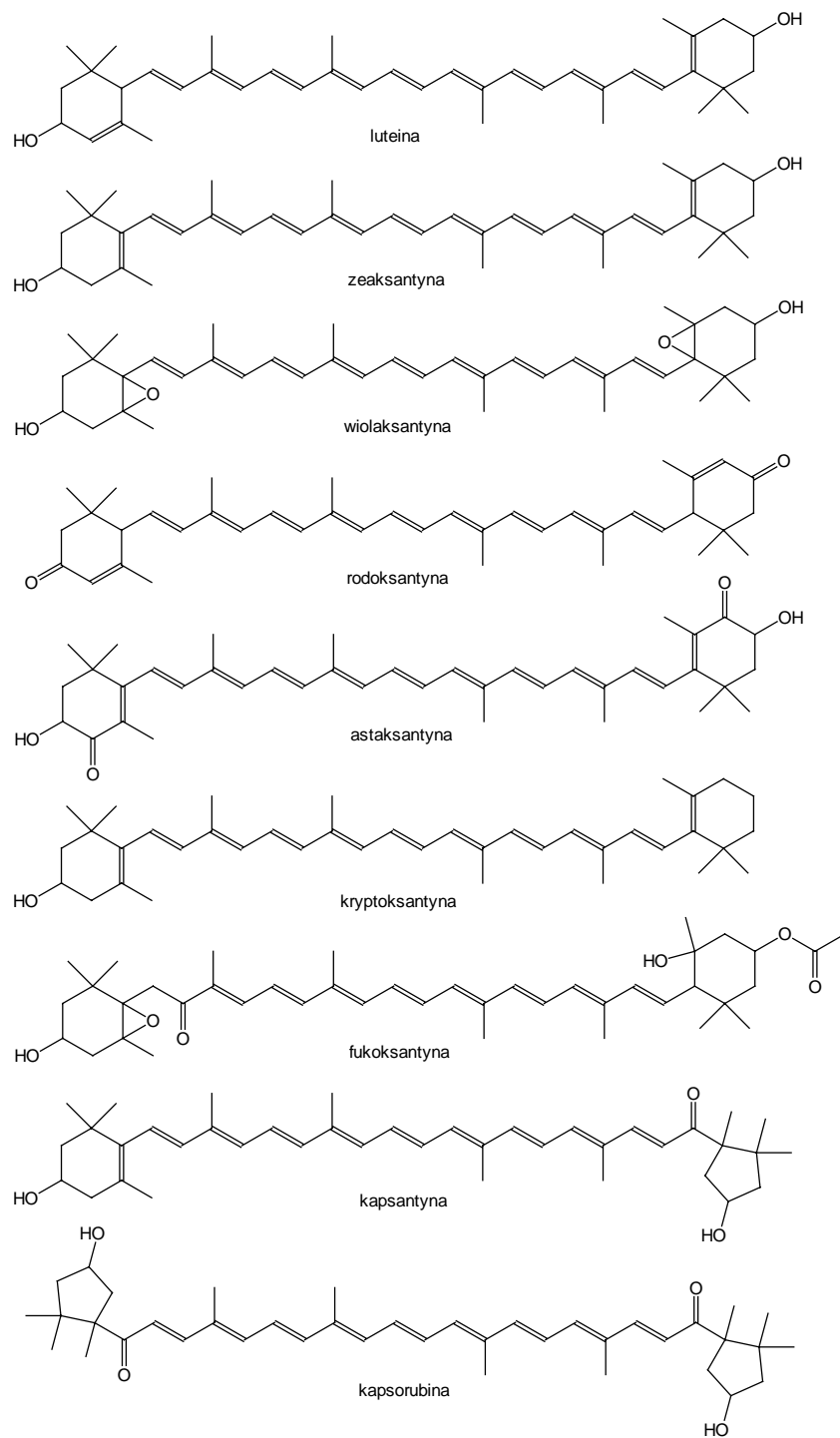
15.1.3.1 Karotenoidy

Związki z tej grupy są pochodnymi rozgałęzionych węglowodorów zawierających 40 atomów węgla, zwanych tetraterpenami. Obecność w ich cząsteczkach wielu sprzężonych ze sobą wiązań podwójnych jest przyczyną intensywnej barwy tych układów. Wiązania podwójne występują prawie wyłącznie w konfiguracji *trans*. Barwniki z tej grupy są bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym (dotychczas wyizolowano ponad 600 substancji tego typu). Dzieli się je na węglowodory zwane karotenami oraz ich pochodne tlenowe (alkohole, ketony, aldehydy, kwasy, epoksydy) – tzw. ksantofile. Różnorodność wzrasta dodatkowo na skutek możliwości tworzenia przez karotenoidy zawierająca grupy hydroksylowe lub karboksylowe, estrów z naturalnymi kwasami (np. tłuszczowymi) i alkoholami. Dodatkowo istnieje możliwość tworzenia się, na skutek różnorodnych procesów metabolicznych, karotenowców o krótszych łańcuchach jak również elongacja cząsteczki (do 50 atomów węgla). Karotenowce występują zarówno u roślin wyższych, glonów, sinic i bakterii jak również w tkankach niektórych, niezdolnych do fotosyntezy, grzybów. W komórkach roślinnych zlokalizowane są głównie w chloroplastach i chromoplastach. W procesie fotosyntezy odpowiedzialne są za pochłanianie energii świetlnej niesionej przez kwanty promieniowania widzialnego odpowiadające długościom fal nie absorbowanych przez chlorofile. Pełnią ponadto funkcje ochronne, selektywnie pochłaniając niepożądane częstotliwości fal świetlnych. Są prekursorami hormonów roślinnych i naturalnych substancji zapachowych. Ksantofile są prawdopodobnie odpowiedzialne za zachowanie równowagi pomiędzy stężeniem ATP a NADPH w tylakoidach. Występują również powszechnie, często w dużych ilościach, w świecie zwierząt lecz nie mogą być przez nie syntezowane i pochodzą jedynie z treści pokarmowej (są jednak czasami w organizmach zwierzęcych modyfikowane). Są związkami macierzystymi z których powstaje witamina A. Wchodzi również w skład błon komórkowych gdzie pełnią funkcje antyoksydantów. Mają barwy od czerwonej do żółtej czasami o odcieniu brązowozielonym. Barwniki z tej grupy nadają kolor wielu owocom (cytrusy, truskawki, papryka, pomidory itd.), liściom (ich kolor jest zazwyczaj maskowany przez chlorofile, uwidacznia się jednak często, np. jesienią, kiedy to barwnik zielony ulega rozkładowi), kwiatom (narcyzy) oraz niektórym zwierzętom (pióra kanarka, wiele owadów, tkanki łososia).

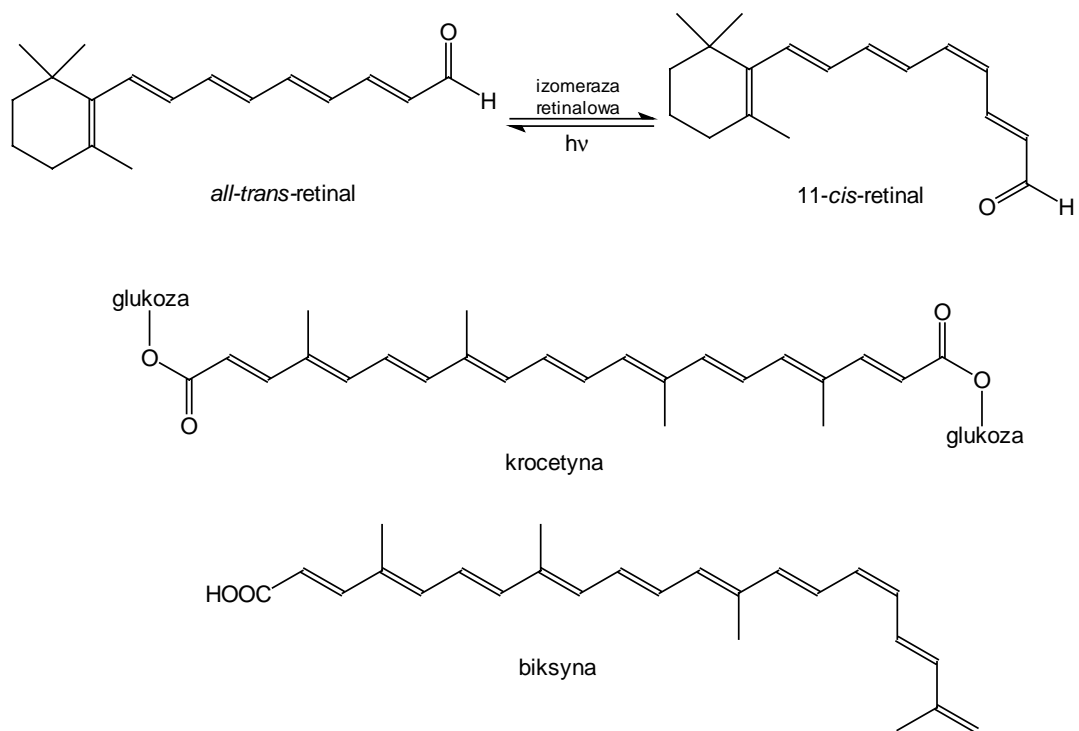
- **karoteny** – głównymi przedstawicielami są β -, α - i γ -karoten, przy czym izomer β - stanowi 75-80% ogółu karotenów roślinnych i jest zarazem głównym prekursorem witaminy A. Cząsteczki wyżej wymienionych związków zawierają fragmenty cykliczne. Znane są także karoteny otwartołańcuchowe. Przykładem może być neurosporen izolowany z grzybów i likopen występujący w pomidorach i papryce. Cząsteczki zawierające tylko jeden pierścień bądź nie zawierające go wcale są na ogół produktami pośrednimi na drodze syntezy związków o dwóch pierścieniach w molekuale. Z organizmów morskich (gąbek) oraz bakterii fotosyntezujących otrzymano karoteny zawierające pierścienie aromatyczne (np.: chlorobakten)



- ksantofile** – są to pochodne karotenów zawierające, zazwyczaj umieszczone symetrycznie, grupy alkoholowe, karboksylowe, aldehydowe, ketonowe i epoksydowe. Występują, obok karotenowców, w tkankach roślinnych (stanowią 60-70% związków karotenoidowych) i zwierzęcych. Najczęściej spotykane są pochodne o charakterze alkoholi i epoksydów. Najprostszym związkiem z tej klasy jest luteina (ksantofil), będąca 3,3'-dihydroksypochodną α -karotenu. Występuje praktycznie w tkankach wszystkich roślin zielonych. Jej izomer – zeaksantynę, wyizolowano z nasion kukurydzy. Bardzo rozpowszechniony jest epoksyd zeaksantyny – wiolaksantyna. Rzadziej spotykane w świecie roślinnym są pochodne ketonowe (np. rodoksantyna z igieł cisa pospolitego), jednakże stanowią one jedne z ważniejszych ksantofili zwierzęcych (np.: astaksantyna – barwnik pancerzy skorupiaków, jeźowców, piór i nóg ptasich; występuje w formie wolnej jak również w postaci estrów z kwasami tłuszczowymi). Z form niesymetrycznie podstawionych wymienić należy kryptoksantynę (pomarańczowy barwnik owoców papryki i pomarańczy) oraz fukoksantynę – barwnik brunatnic uczestniczący w fotosyntezie. Do ksantofili należą również, pomimo niewielkich różnic strukturalnych, główne barwniki papryki: kapsorubina i kapsantyna.

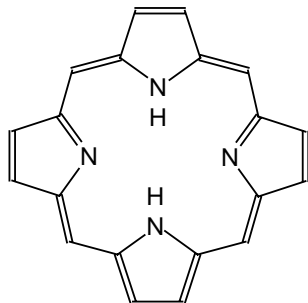


- produkty degradacji karotenoidów** – na drodze degradacji karotenoidów powstaje kilka ważnych barwników naturalnych. Najważniejszym jest witamina A (retinal), będąca niebiałkowym składnikiem rodopsyny – chromoproteidu odpowiedzialnego za odbieranie bodźców świetlnych przez liczne zwierzęta i niektóre organizmy roślinne (bakterie i glony jednokomórkowe). Mechanizm widzenia opiera się na procesie izomeryzacji jednego z wiązań podwójnych w cząsteczce retinalu. Innymi barwnikami wywodzącymi się z karotenoidów są krocetyna (intensywnie żółty barwnik o charakterze glikozydowym izolowany z szafranu) oraz biksyna (pomarańczowy pigment arnoty właściwej).



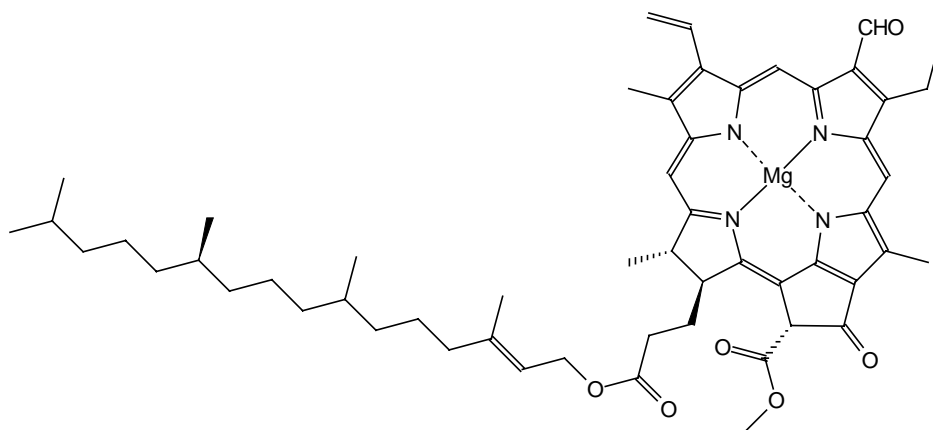
15.1.3.2 Barwniki porfiryne i pirolowe

Porfirydami nazywamy związki heterocykliczne zawierające cztery pierścienia pirolowe połączone mostkami jednowęglowymi, tworzące duży układ cykliczny. Charakterystyczną cechą porfiryń jest zdolność do tworzenia trwałych połączeń z jonami metali, koordynowanymi atomami azotu.

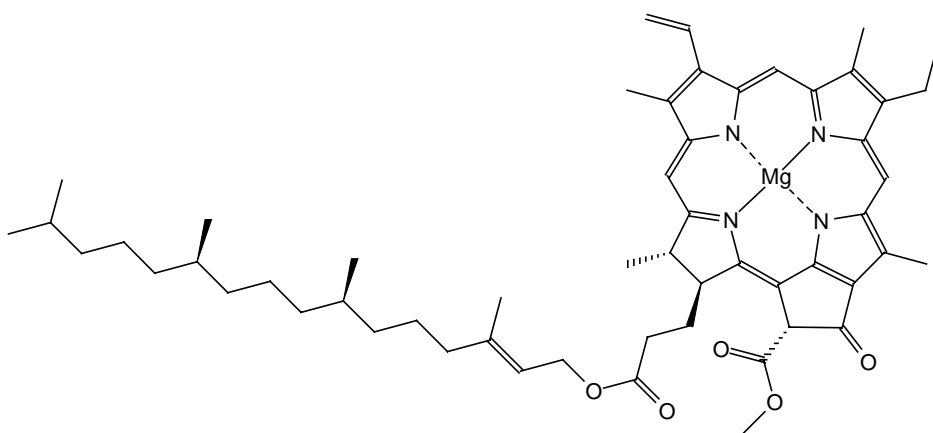


Barwniki porfiryne stanowią grupę związków pełniących najistotniejsze funkcje fizjologiczne. Występują u wszystkich grup systematycznych. Do najważniejszych pigmentów z tej grupy należą chlorofile, występujące u roślin i bakterii fotosyntetyzujących oraz pochodne hemowe, wchodzące w skład hemoglobiny oraz cytochromów.

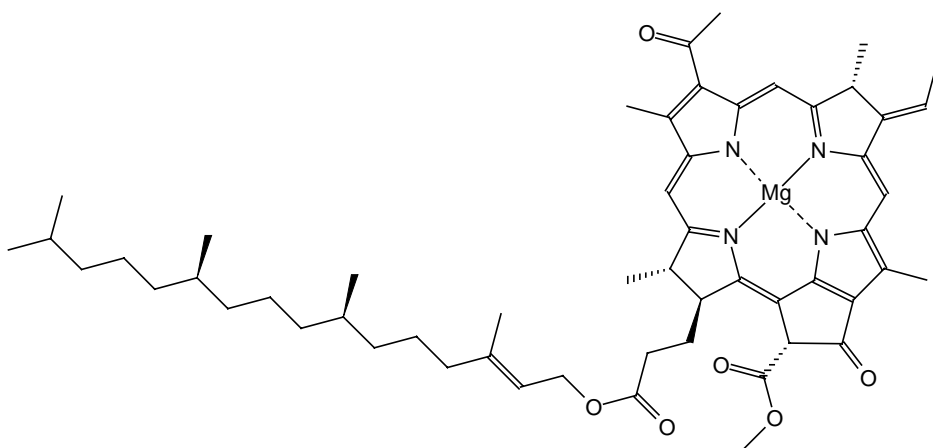
- **chlorofile** – są zielonymi barwnikami porfirynowymi zawierającymi skoordynowany atom magnezu. Mają fundamentalne znaczenie w procesie fotosyntezy. W chloroplastach występują w formie związanej z białkami. W chlorofilu do pierścienia porfiryneowego przyłączone są liczne podstawniki, determinujące właściwości fotochemiczne cząsteczki. U roślin wyższych głównymi barwnikami z tej grupy są chlorofile *a* i *b*, u bakterii i sinic tzw. bakteriochlorofile (oznaczane literami od *a* do *g*). Cząsteczki chlorofili zawierają dwie grupy karboksylowe, z których jedna jest zawsze zestryfikowana długołańcuchowym niepolarnym alkoholem (najczęściej tzw. fitolem). Zawartość chlorofili w zielonych tkankach roślin wynosi około 10% ich suchej masy.



chlorofil a

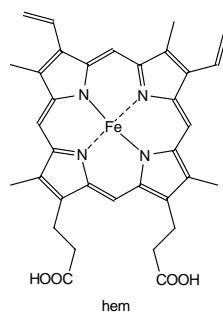


chlorofil b

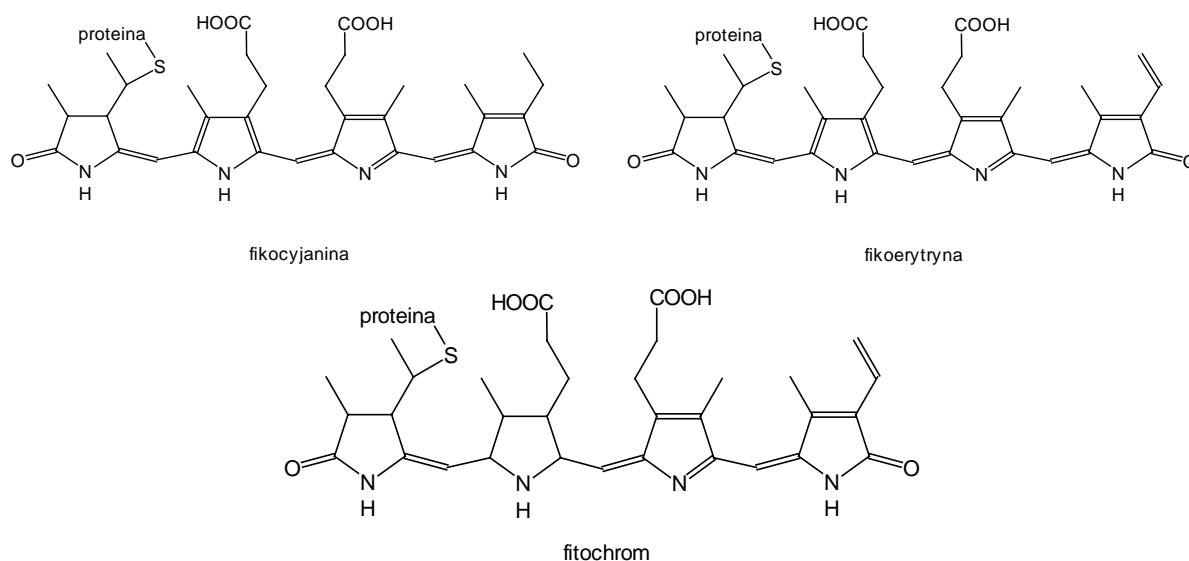


bakteriochlorofil b

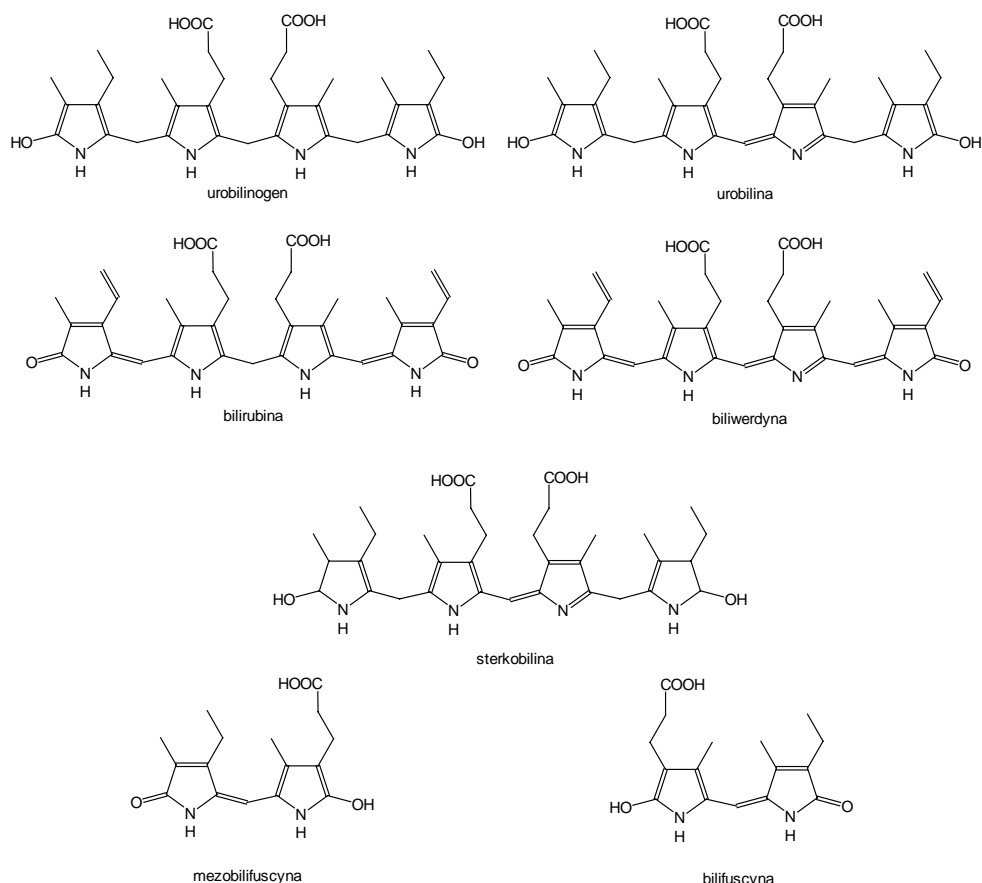
- Barwniki hemowe** – związki z tej grupy są kompleksami protoporfiryny IX z jonami żelaza(II) (tzw. ferrohem) lub żelaza(III) (tzw. ferrihem). Barwniki te wchodzą w skład licznych chemoprotein, odpowiedzialnych z transport tlenu (hemoglobina), jego magazynowanie w tkankach (mioglobina), transport elektronów (cytochromy) oraz pełniących funkcje enzymatyczne (katalazy, peroksydazy). Mają zabarwienie czerwone lub brunatnoczerwone. Fragment porfirynowy jest związany z białkiem bądź poprzez wiązania koordynacyjne, bądź kowalencyjne (poprzez podstawniki winylowe). Bliższe właściwości chemiczne tych związków zostaną przedstawione w rozdziale poświęconym reakcjom utleniania-redukcji w układach biologicznych.



- barwniki pirolowe** – występują w organizmach roślinnych (fikobiliny) i zwierzęcych (bilany). Związki z tej grupy zawierają, podobnie jak porfiryny, cztery pierścienie pirolowe, z tym że w tym wypadku nie tworzą one struktury cyklicznej. Mają zabarwienie od żółtobrunatnego poprzez pomarańczowe do czerwono-fioletowego i niebieskiego. Fikobiliny pełnią funkcje barwników asymilacyjnych, absorbując światło w zakresie długości fali nie pochłanianych przez chlorofile (tzw. barwniki wspomagające). U roślin niższych (sinice i krasnorosty) występują jako tzw. biliproteiny w formie kowalencyjnych połączeń z białkami. W zależności od barwy kompleksu białkowo-fikobilinowego rozróżnia się fikocyjaniny (niebieskofioletowe) i fikoerytryny (czerwone). Fikobiliny roślin wyższych to tzw. fitochromy. Są one, podobnie jak u roślin niższych, połączone z fragmentem białkowym. Kompleksy te uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych regulowanych przez światło, regulują ekspresję genów, syntezę i aktywność enzymów oraz szybkość metabolizmu. Chromofor fitochromów występuje w dwóch formach, różniących się widmem absorpcyjnym i ulegających wzajemnym przemianom pod wpływem światła oraz specyficznych układów enzymatycznych.



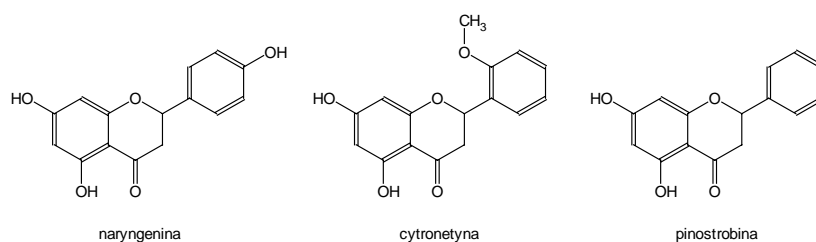
Bilany zwierzęce są produktami katabolizmu porfiryń (głównie hemu). Nadają one zabarwienie żółci, kału i moczu oraz, w stanach patologicznych (żółtaczką), skóry, błon śluzowych i oczu. Mają zabarwienie żółtopomarańczowe do brunatnego; wiele z nich w stanie wolnym jest bezbarwna lub bardzo słabo zabarwiona i ciemnieje na skutek oddziaływania z tlenem. Najważniejszymi związkami z tej grupy są: urobilinogen (bezbarwny prekursor urobiliny, występuje w świeżym moczu); urobilina (brunatny barwnik moczu, powstaje z urobilinogenu na skutek utleniania tlenem atmosferycznym oraz z bilirubiny pod wpływem bakteryjnej flory jelitowej); bilirubina (żółtopomarańczowy barwnik żółci, występuje w formie rozpuszczalnych soli, w formie nierozpuszczalnych soli wapniowych tworzy kamienie żółciowe); biliwerdyna (żółtozielony barwnik żółci, jest prekursorem bilirubiny, pod wpływem enzymów bakteryjnych lub tlenu możliwa jest reakcja odwrotna); sterkobilina (żółtobrazowy barwnik kału, powstaje w wyniku utleniania produktów enzymatycznych przekształceń bilirubiny i biliwerdyny przez bakterie jelitowe, rozpada się do żółtych barwników dwupirolowych – mezobilifuscyny i bilifuscyny).



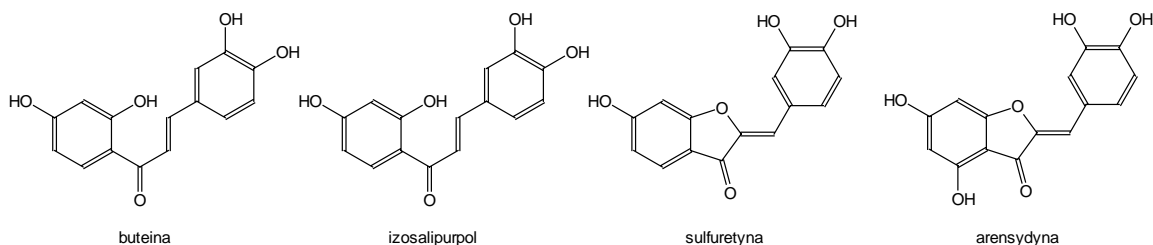
15.1.3.3 Flawonoidy

Flawonoidy stanowią ogromną grupę barwników roślinnych o strukturze określanej jako $C_6-C_3-C_6$, w skład której wchodzi dwa pierścienie fenylowe połączone trójęglowym mostkiem – w większości przypadków tworzącym pierścień zawierający heteroatom tlenu. Literatura podaje struktury ponad 2500 tysięcy flawonoidów (liczba ta wynika z faktu, iż wiele związków z tej grupy występuje w formie glikozydów). Związki z tej grupy są nadzwyczaj szeroko rozpowszechnione wśród roślin, szczególnie wśród roślin kwiatowych. Stosunkowo rzadko spotyka się je w tkankach roślin zarodnikowych i bakterii. Związki flawonoidowe są głównymi barwnikami kwiatów i owoców (czasami również innych części rośliny). Mają zabarwienie od kremowożółtego do niebieskiego, niektóre zaś są bezbarwne i pełnią inne funkcje fizjologiczne. Dzieli się je na 11 zasadniczych klas, w zależności od charakteru mostka trójęglowego. Zmienność w obrębie każdej z klas wynika z ilości i lokalizacji w cząsteczce grup hydroksylowych, możliwości tworzenia przez nie połączeń eterowych (najczęściej z alkoholem metylowym), estrowych oraz miejsca przyłączenia i charakteru grup glikozydowych. Flawonoidy mogą być zarówno mono- jak i poliglikozydami, zawierającymi reszty jedno- jak i oligosacharydowe (największe bogactwo pochodnych cukrowych wykazuje kwercetyna – ponad 80 związków).

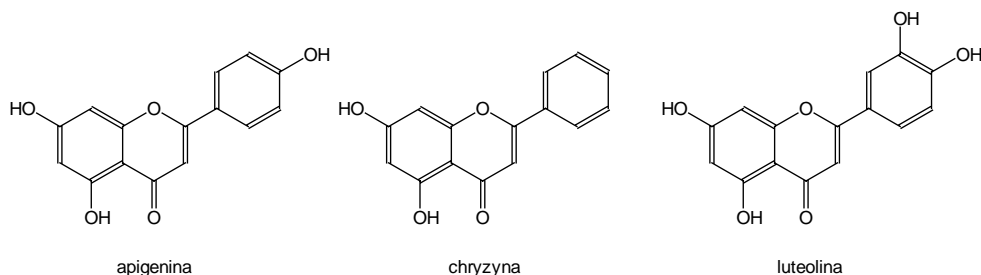
- **flawanony** – związki z tej grupy są w większości bezbarwnymi prekursorami barwników flawonowych. Występują w tkankach roślin w niewielkich ilościach, wyjątek stanowią naryngenina i cytronetyna (występują w formie glikozydu w skórce pomarańczy) oraz pinostrobin (wyizolowana z sosny wejmutki). Niektóre związki z tej grupy mają intensywnie gorzki, piekący smak, pełnią zatem funkcje repelentów pokarmowych. Występują często w pąkach, gdzie obok roli związków odstrasających zwierzęta, znoszą działanie giberelin.



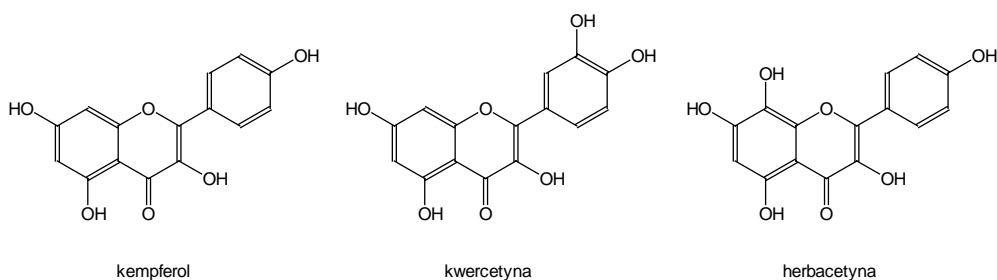
- **chalkony i aurony** – są pigmentami o barwach żółtych i złotych, występującymi w dużych stężeniach w kwiatach wielu roślin, głównie z rodziny złożonych (*Compositae*). Związki te wykazują zdolność zmiany barwy na ciemnopomarańczową wraz z silnym zalkalizowaniem środowiska, co odróżnia je od barwników karotenoidowych. Do najważniejszych barwników z grupy chalkonów należy izosalipurpol, izolowany z kory wierzby purpurowej oraz buteina, szeroko rozpowszechniona wśród różnych gatunków roślin. Z grupy auronów wymienić należy sulfuretynę, barwnik kwiatów z rodzaju kosmos, oraz arensydynę, obecną w kwiatostanach szczawiu oraz wyżlina wielkiego. Wszystkie substancje z tych grup występują w tkankach roślinnych głównie w formie glikozydów.



- **flawony** – mają zabarwienie od jasno- do ciemnożółtego i są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. Do najczęściej spotykanych, zarówno w stanie wolnym jak i w formie glikozydów, flawonów, należą: apigenina (w stanie wolnym występuje w kwiatach georginii, w formie związanej w koszykach rumianu i częściach zielonych wyki drobnokwiatowej i pietruszki), chryzyna (pączki topoli), luteolina (w formie glikozydów i stanie wolnym w kwiatach janowca bawierskiego, naparstnicy, rezedzie i innych roślin).

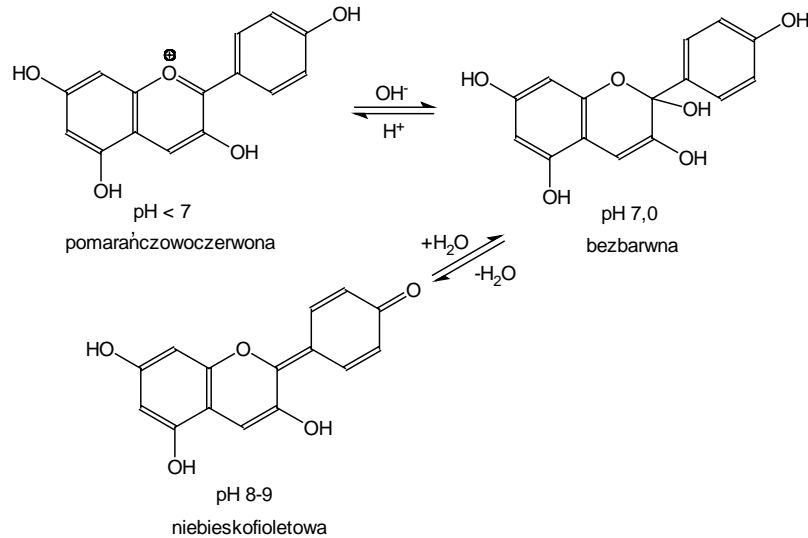


- **flawonole** – są pigmentami o intensywnie żółtej barwie, wykazującymi zielonkawą fluorescencję. Występują zarówno w stanie wolnym jak i w postaci połączeń z sacharydami. Do najważniejszych flawonoli, najszerszej rozpowszechnionych w świecie roślin, zaliczyć należy: kempferol (izolowany, w formie glikozydów, m.in. z kwiatów traganka chińskiego, koniczyny czerwonej, kasztanowca z liści herbaty), herbacetyna (w formie glikozydów w kwiatach i liściach bawełny i herbaty), kwercetyna (jeden z najszerszej rozpowszechnionych barwników z tej grupy, stanowi barwnik łusek cebuli, kory dębu, kwiatów fiołka wonnego, tytoniu, roślin psiankowatych i gryki).

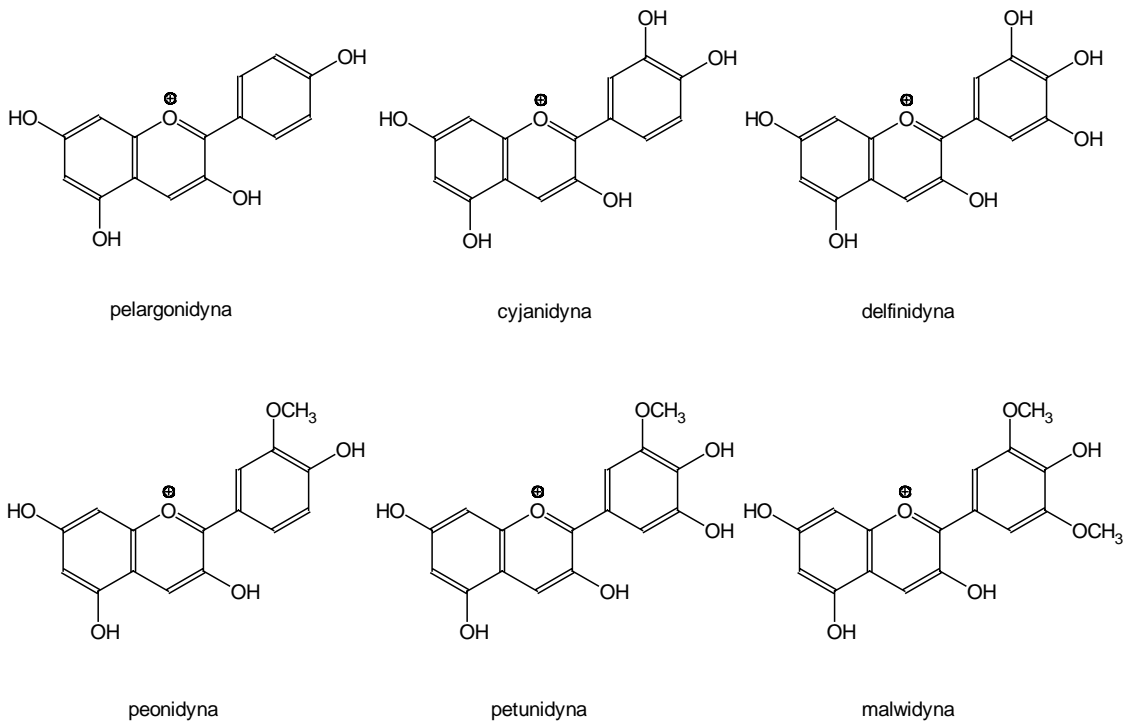


- **antocyjanidyny** – do tej grupy zalicza się wiele najważniejszych i najbardziej rozpowszechnionych barwników roślinnych. Występują głównie w kwiatach i dojrzałych owocach, którym nadają barwy od jasnoczerwonej poprzez ciemnoniebieską do prawie czarnej. Występują prawie wyłącznie w formie glikozydów – antocyjanin. Barwa nadawana kwiatom przez antocyjanidyny zależy od kilku czynników:
 - **budowa barwnika** – główny efekt związany jest z miejscem przyłączenia grup hydroksylowych
 - **stężenie barwnika**
 - **obecność kopigmentów flawonoidowych** – na skutek tworzenia słabych kompleksów pomiędzy antocyjaninami a innymi flawonoidami następuje zmiana barwy, tj. wzrost intensywności barwy niebieskiej
 - **obecność metali trójwartościowych** – powoduje wzrost intensywności barwy niebieskiej
 - **obecność podstawników aromatycznych** – powoduje wzrost intensywności barwy niebieskiej

- **podstawniki hydroksylowe w pierścieniu heterocyklicznym** – wzrost intensywności barwy czerwonej
- **metylowania barwnika** - wzrost intensywności barwy czerwonej
- **obecność innych barwników**
- **pH środowiska tkankowego** – ma duży wpływ na barwę antocyjanin. W środowisku o odczynie kwaśnym czyste antocyjaniny mają zabarwienie czerwonepomarańczowe, w obojętnym – prawie bezbarwne, w zasadowym przyjmują kolor niebieski. Przemiany barwnika wraz ze zmianami pH prezentuje rysunek



Do najważniejszych antocyjanin należą: cyjanidyna (najczęściej występujący związek z tej grupy, występuje w kwiatach chabrów, fiołków, róż, maku polnym, jagodach bzu czarnego i innych roślinach), pelargonidyna (szeroko rozpowszechniona u roślin tropikalnych m.in. w astrze chińskim, pelargonii, daliach, owocach granatu), delfinidyna (często spotykana u roślin alpejskich, w kwiatach malwy czarnej, wyki, szafli i innych), peonidyna (wyzolowana m.in. z piwonii), petunidyna (barwnik petunii ogrodowej) oraz malwidyna (kwiaty pierwiosnków, ślazu dzikiego, owoce borówek).



Kombinacje ważniejszych barwników i odpowiadające im zabarwienie kwiatów zestawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Wpływ składu mieszaniny barwników roślinnych na barwę

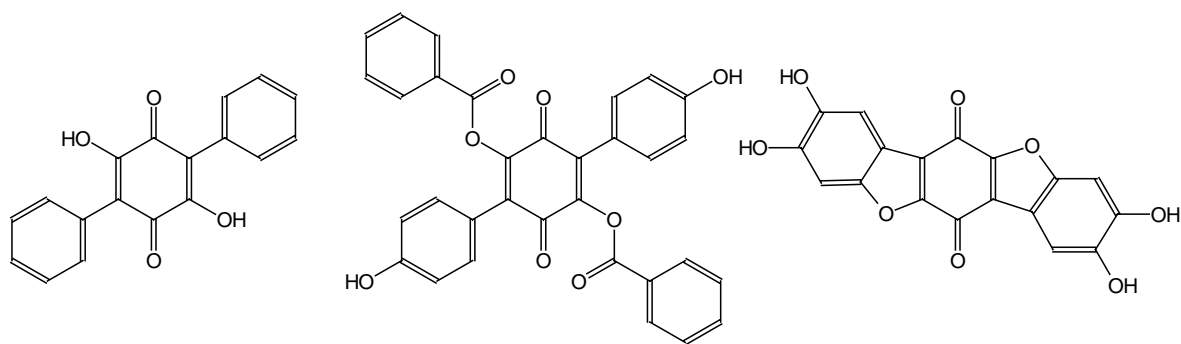
Barwa	Barwniki	Przykłady
Biała, kość słoniowa, kremowa	flawony (np.: luteolina) i/lub flawonole (np. kwercetyna)	większość biało kwitnących gatunków roślin
Żółta	<ul style="list-style-type: none"> tylko karotenoidy tylko żółte flawonole tylko chalkony i aurony karotenoidy + żółte flawonoidy 	<ul style="list-style-type: none"> większość żółto kwitnących gatunków pierwiosnek, bawełna, chryzantemy lnica, szczawik, dalie nachyłek, rudbekia
Pomarańczowa	<ul style="list-style-type: none"> tylko karotenoidy pelargonidyna + aurony 	<ul style="list-style-type: none"> nagietek, lilie wyżlin większy (Iwia paszcza)
Szkarłatna	<ul style="list-style-type: none"> czysta pelargonidyna cyjanidyna + karotenoidy 	<ul style="list-style-type: none"> wiele gatunków, np.: szałwia tulipany
Błękitna	cyjanidyny + karotenoidy	lak pospolity, storczykowate
Purpurowa, karmazynowa	czysta cyjanidyna	większość o czerwonych kwiatach np.: róża
Różowa	czysta peonidyna	piwonia, róża pomarszczona
Fioletowa	czysta delfinidyna	wiele gatunków, np.: werbena
Niebieska	<ul style="list-style-type: none"> cyjanidyna + flawonoid lub jon metalu delfinidyna + flawonoid lub jon metalu 	<ul style="list-style-type: none"> chabry większość niebiesko kwitnących, np. goryczki
Czarna, purpurowoczerwona	delfinidyna w bardzo dużym stężeniu	czarne tulipany, bratki
Zielona	chlorofile	ciemniernik

15.1.3.4 Inne barwniki roślinne

W świecie roślinnym występuje, obok powyżej opisanych, wiele innych klas barwników o ciekawych właściwościach i funkcjach biologicznych.

- barwniki chinonowe** – różnorodna pod względem struktury, biosyntezy i funkcji grupa pigmentów zawierających w cząsteczkach fragment benzo-, nafto-, antro- lub fenantrochinonu. Większość z nich występuje w formie glikozydów. Charakteryzują się żółtym, pomarańczowym bądź czerwonym zabarwieniem. Wiele ze związków chinonowych występuje w świecie roślinnym (a także zwierzęcym) asystematycznie (np.: ubichinony, witamina K, plastochinony), pełniąc różnorakie funkcje fizjologiczne nie związane bezpośrednio z ich zabarwieniem. Obok nich izoluje się z roślin wiele innych substancji o nie do końca wyjaśnionej roli biologicznej. Niektóre z nich są barwnikami kwiatów (nodozyna w płatkach strączyńca, hiperycyna w kwiatach dziurawca), drewna (lapachol w zdrewniałych tkankach *Tecoma stans*), liści (lawson występujący w częściach zielonych lawsonii, ekstrakt z tej rośliny stosowany jest do farbowania włosów jako tzw. henna), korzeni (droseron w częściach podziemnych rosiczek, alkanina w alkanii bawierskiej), antybiotykami (adriamycyna), inne pełnią dużą rolę w alopatii (juglon wydzielany przez korzenie orzecha czarnego) lub jako toksyny produkowane przez rośliny wyższe i będące substancjami obronnymi przed szkodnikami oraz patogennymi mikroorganizmami (tekochinon z drzewa tekowego), kolejne powstają w mikroorganizmach i służą jako toksyny skierowane przeciwko roślinom i zwierzętom (np.: skyrina wytwarzana przez workowca *Endothia parasitica* atakującego drzewa kasztana jadalnego). Wiele substancji chinonowych jest odpowiedzialnych za barwę grzybów wyższych (np.: brązowofioletowy kwas poliporowy występujący w owocnikach grzyba nadrzewnego - żagwi zimowej; kwas teleforowy, pigment o barwie fioletowej, obecny w tkankach grzybów z rodzaju kolczak oraz sarniak; aurancyjanina – pomarańczowa substancja odpowiedzialna za kolor kolczakówki).

BENZOCHINONY

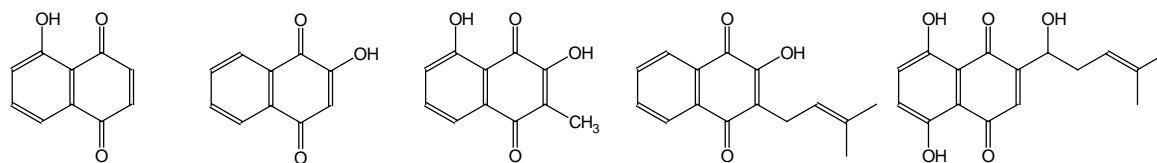


kwas poliporowy

kwas teleferowy

aurancjanina

NAFTOCHINONY



juglon

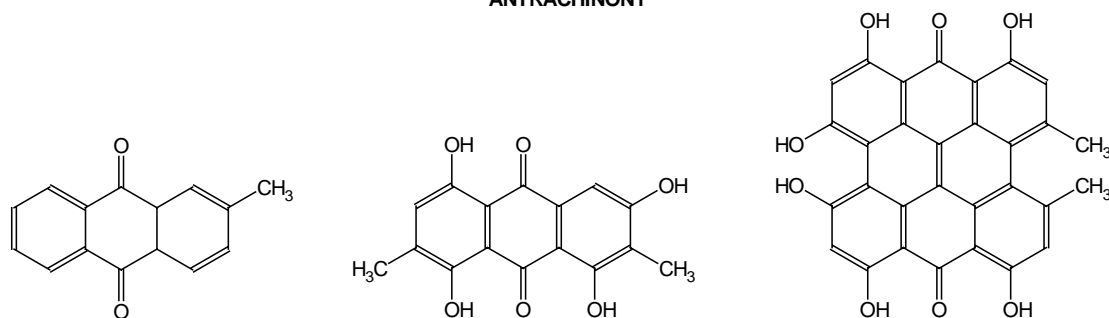
lawson

droseron

lapachol

alkanin

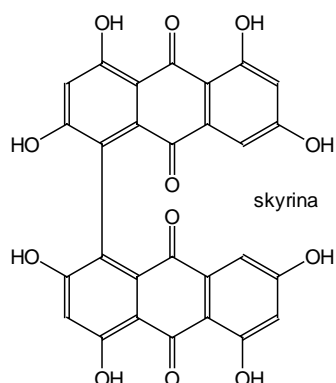
ANTRACHINONY



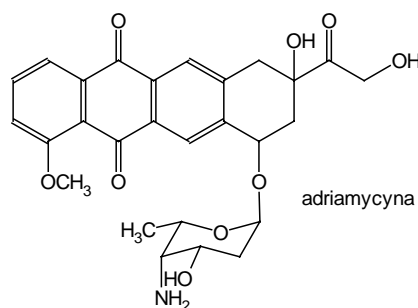
tekochinon

nodozyna

hiperycyna



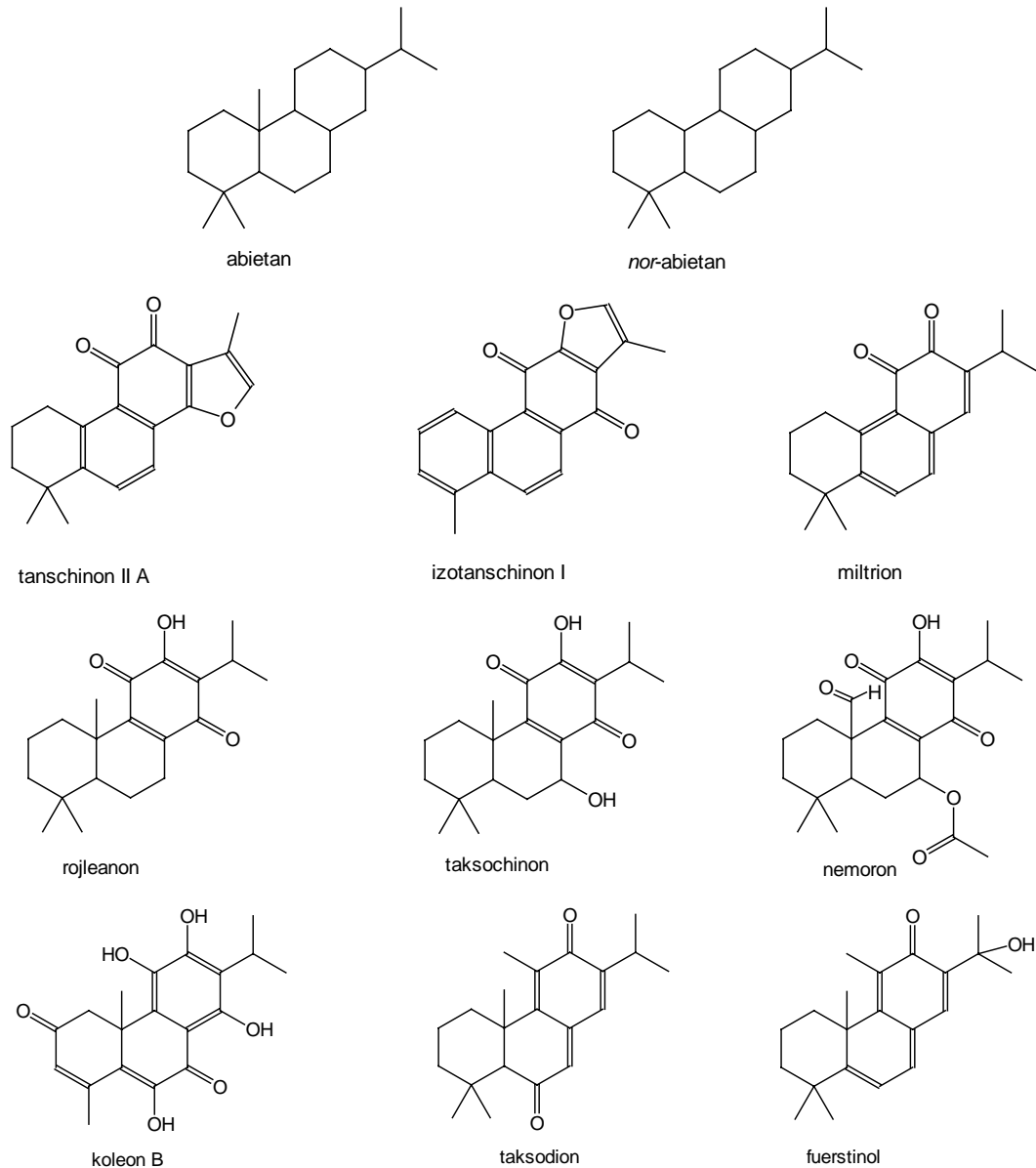
skyrina



adriamycyna

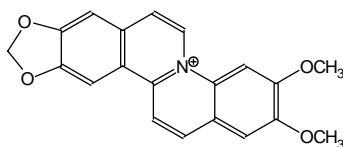
- **barwniki diterpenowe** – obok karotenoidów, stanowiących najliczniejszą grupę barwników o charakterze terpenowym znanych jest kilka innych barwników izoprenoidowych, zawierających trzy lub cztery pierścienie zbudowane z ok. 20 atomów węgla. Pigmenty te odznaczają się barwą pomarańczową do ciemnoczerwonej. Większość z nich zawiera w swoich molekułach ugrupowanie chinonowe, jednakże ze względu na drogę biosyntezy zaklasyfikowano je jako odrębną grupę. Substancje te dzieli się na 3 klasy: tanschinony, rojleanony oraz koleony. Do pierwszej zalicz się 10 substancji, pochodnych *nor*-abietanu. Wykryto je w korzeniach pewnych gatunków szałwi oraz rozmarynu. Do najważniejszych przedstawicieli tej klasy należą: tanschinon, izotanschinon oraz miltrion. Rojleanony wykazują mniej intensywne

zabarwienie (najczęściej żółtopomarańczowe). Ich występowanie, o odróżnieniu od substancji z poprzedniej klasy, nie ogranicza się do tkanek korzeni, jednakże tam występują w największych stężeniach. Ich szkielet węglowy wykazuje strukturę abietanu. Do najbardziej rozpowszechnionych należą: rojleanon (wyizolowany z szałwi), taksochinon (obecny w tkankach cyprysika błotnego) oraz nemoron (podobnie jak rojleanon występuje w tkankach pewnych gatunków szałwi). Do trzeciej klasy zalicza się substancje barwne zgromadzone w wyspecjalizowanych gruczołach występujących na spodniej stronie liści niektórych gatunków roślin. Do najbardziej reprezentatywnych przedstawicieli tej klasy zaliczyć można: koleon B (jasnożółty pigment izolowany z liści szałwi ognistej), złotożółty taksodion (nasiona i igły cyprysika błotnego) oraz silnie czerwony fuerstion występujący w roślinie *Fuerstia africana*.

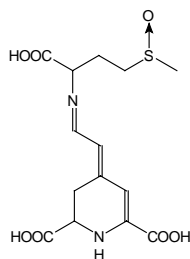


- **barwniki alkaloidowe** – alkaloidy stanowią ważną grupę metabolitów roślinnych o różnorodnej budowie i funkcjach fizjologicznych. Niektóre z nich pełnią rolę barwników. Najważniejszymi przykładami są berberyna (izochinolinowy alkaloid izolowany z tkanek berberysu i odpowiedzialny za ich kolor) oraz betaksantyny i betacyjaniny. Betaksantyny stanowią grupę żółtych barwników, których występowanie jest ograniczone do roślin rzędu śródłożonych (*Centrospermae*). Są pochodnymi aminokwasów alifatycznych, wykazującymi charakter zasad Schiffa. Do najważniejszych przedstawicieli należy indykasantyna i wulgaksantyna – barwniki bulwy buraka pastewnego oraz miraksantyna znaleziona w kwiatach dziwaczka polnego. Do betacyjanin zalicza się intensywnie czerwone oraz czerwopurpurowe barwniki występujące, zarówno w formie wolnej jak i związanej, w korzeniu i innych tkankach buraka czerwonego i liściach oraz kwiatach szarłat (np.: betanidyna) oraz owocnikach muchomora czerwonego (pomarańczowa muskaflawina). Wykazują, podobnie jak antocyjaniny, zależność barwy od pH roztworu. Warto zaznaczyć,

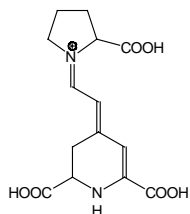
że obecność w roślinie związków z grupy betaksantyn oraz betacyjanin wyklucza obecność antocyjanin w tkankach.



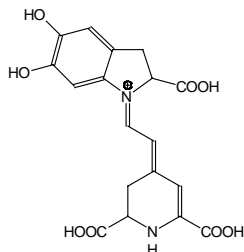
berberyna



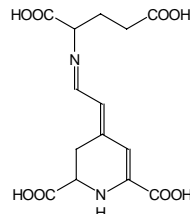
miraksantyna



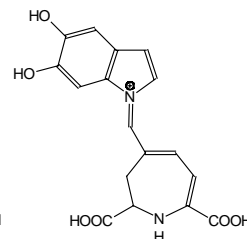
indygaksantyna



betanidyna

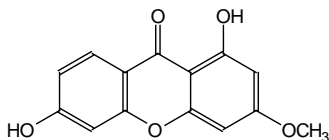


wulgaksantyna I



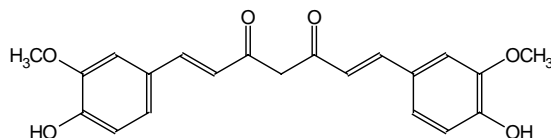
muskaflawina

- **barwniki ksantonowe** – są stosunkowo mało rozpowszechnioną klasą związków o barwie żółtej lub pomarańczowej. Są charakterystyczne dla rodziny goryczkowatych i dziurawcowatych oraz niektórych paproci. Mogą tworzyć glikozydy. Przykładem może być gentyzyna (izolowana z goryczki żółtej).

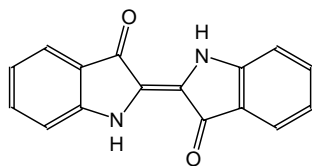


gentyzyna

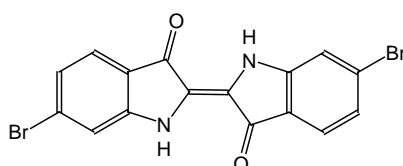
- **kurkumina** – intensywnie żółtopomarańczowy barwnik z korzeni *Curcuma longa*.



- **indygo** – jeden z najbardziej znanych barwników roślinnych. Wyizolowany z indygowca bawierskiego oraz urzetu bawierskiego. Cechuje się intensywnie niebieską barwą. W tkankach występuje w formie bezbarwnego glikozydu – indykanu, z którego powstaje podczas ekstrakcji. Dibromopochodna indyga (tzw. purpura tyryjska) jest barwnikiem zwierzęcym, otrzymywanym z tkanek ślimaka *Purpura lapilus*, w starożytności stosowanym do farbowania szat.

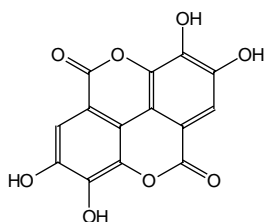


indygo



purpura Tyryjska

- **barwniki fenolowe** – wiele związków fenolowych wykazuje słabe żółte lub brązowożółte zabarwienie, przez co są odpowiedzialne za barwy tkanek pewnych gatunków roślin. Do najważniejszych należą kwas elagowy, otrzymany z kory dębu, świerka, korzeni granatu i wilczomleczka formozańskiego.

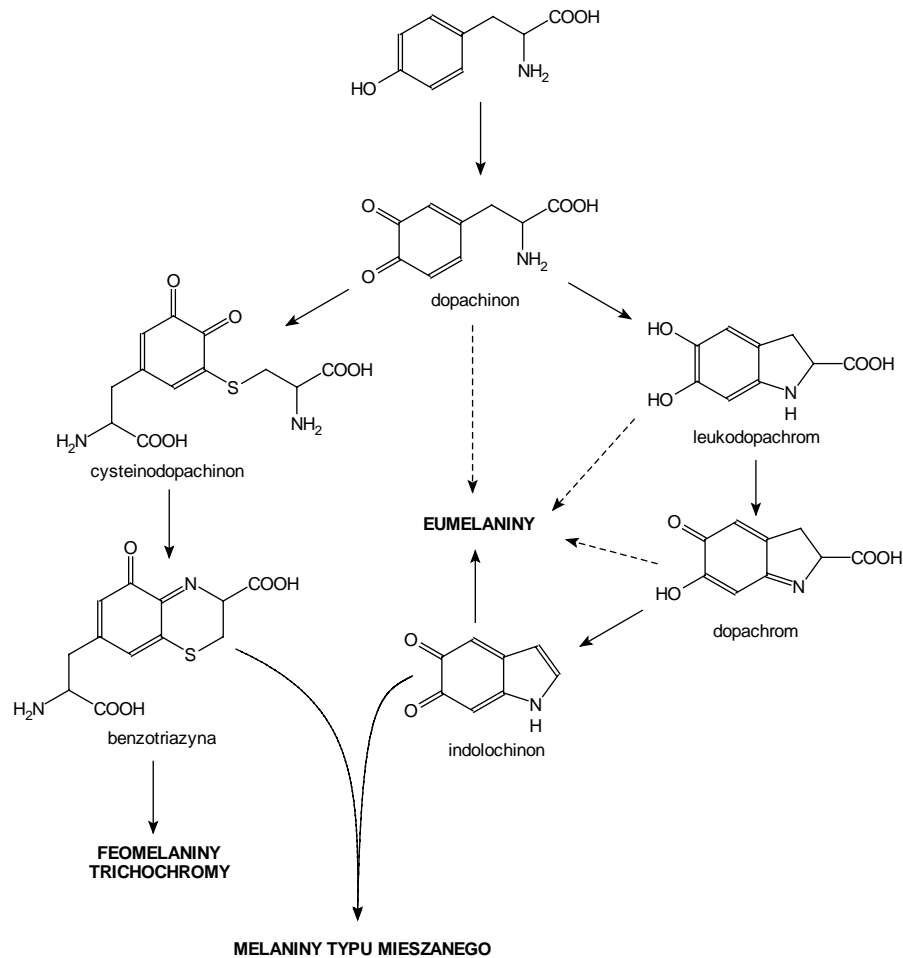


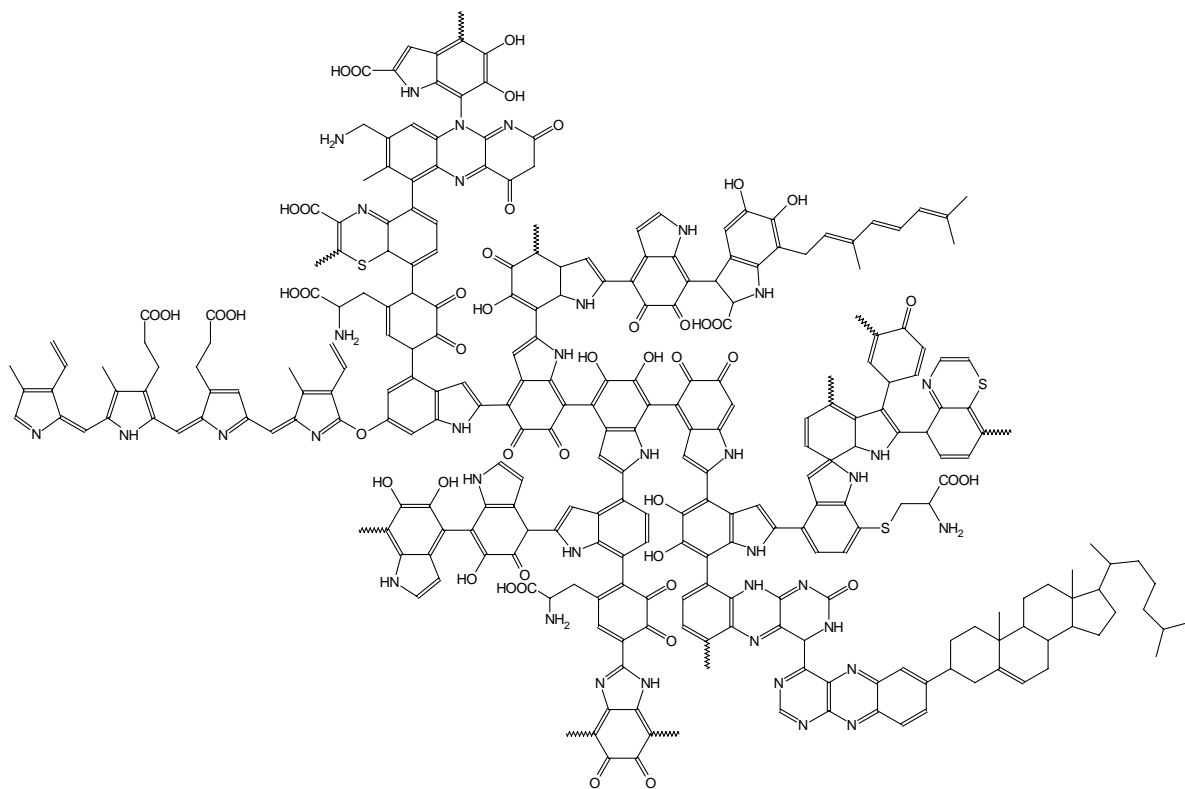
15.1.3.5 Inne barwniki zwierzęce

Obok opisanych powyżej barwników wchodzących w skład tkanek zwierzęcych wymienić należy jeszcze kilka, należących do mniej licznych, ale zarazem bardzo istotnych grup.

- **melaniny** – barwniki z tej grupy należą do heteropolimerów o złożonej i zróżnicowanej budowie. Nadają kolor włosom, skórze oraz tęczówce. Wywodzą się z tyrozyny. Często zawierają dodatkowe podstawniki, pochodzące z układów terpenoidowych lub pirolowych. W zależności od składu dzielimy je na:
 - **feomelaniny** – wielkocząsteczkowe produkty polimeryzacji benzotiazyn, kolor czarny i ciemnobrązowy
 - **trichochromy** – związki podobne do feomelanin lecz charakteryzujące się mniejszą masą cząsteczkową
 - **eumelaniny** – produkty kondensacji dopachinonu i dopachromu, kolor żółty do jasnobrażowego
 - **melaniny typu mieszanego**

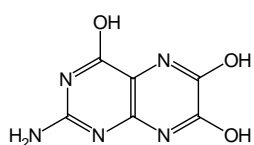
Skrócony schemat biosyntezy melanin oraz przykładową strukturę melaniny typu mieszanego poniżej.



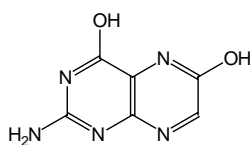


melanina

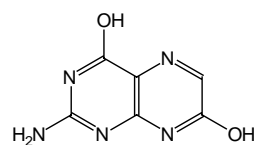
- pteryny** – stosunkowo nieliczna grupa barwników heterocyklicznych odpowiedzialnych z kolor oczu i skrzydeł wielu owadów oraz skóry ryb i płazów. Ponadto wyizolowano je z niektórych sinic. Do tej klasy zalicza się również kwas foliowy. Do najważniejszych związków z tej grupy należą: leukopteryna (bezbarwny pigment skrzydeł bielinka kapustnika); ksantopteryna (żółtozielony pigment skrzydeł listkowca cytrynka) oraz biopteryna (niebieska), drosopteryna (pomarańczowa), sapiopteryna (żółta), izoksantopteryna (fioletowa) będące barwnikami oczu owadów.



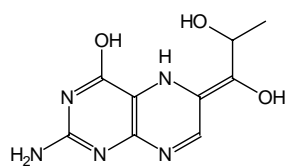
leukopteryna



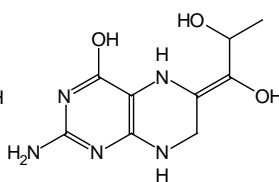
ksantopteryna



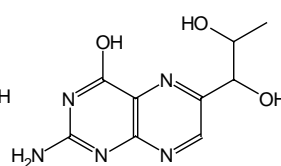
izoksantopteryna



drosopteryna



sepiapteryna



biopteryna

15.2 Barwniki naturalne – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz analiza składu barwników roślinnych.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Chromatografia: podział, podstawy teoretyczne, współczynnik R_f , elenty, polarność, barwniki roślinne: karoteny, likopeny, ksantofile, chlorofile, antocyjaniny, flawonoidy - budowa i rola.

ODCZYNNIKI

aceton	metanol	chlerek metylenu
krzemionka	chloroform	MgSO ₄ bezw.
eter dietylowy	benzen	2M HCl
heksan	tetrachlorek węgla	2M NaOH

UWAGA: Kwas solny jest żrący, podobnie jak wodorotlenek sodu. Obowiązuje praca w rękawicach i okularach ochronnych. Rozpuszczalniki organiczne są palne, ogrzewanie prowadź z dala od źródeł ognia, przy pomocy elektrycznych źródeł ciepła.

OPIS ĆWICZENIA

a. Chromatografia cienkowarstwowa barwników terpenowych i pirolowych

W moździerzu umieść się ok. 2 g posiekanej natki pietruszki i rozetrzyj ją z niewielką ilością krzemionki i szczyptą Na₂CO₃. Następnie dodaj 10 ml acetonu i rozetrzyj powtórnie. Drugą porcję liści rozetrzyj w analogiczny sposób z eterem naftowym (5 ml), po roztarciu przenieś mieszaninę do kolbki, dodaj 22 ml eteru etylowego i 2 ml etanolu i po zatkaniu korkiem mieszaninę wytrząśnij energicznie przez około 5 minut. Roztwór acetonowy i eterowy należy przesączyć przez watę do dwóch oddzielnych kolbek i suszyć bezwodnym siarczanem magnezu przez ok. 5 minut. Następnie pobierz po 1 ml każdego z roztworów, przelej do małych zlewek i ogrzewaj suszarką w celu odparowania rozpuszczalnika do 1/10 objętości.

Około 2 g pasty pomidorowej wymieszaj w probówce z 3 ml metanolu, zawieszinę przesącz przez zwitek waty. Watę wraz z osadem przenieś do próbówki. Do osadu dodaj 4 ml mieszaniny metanol-chloroform (1:1), próbówkę zatkać korkiem i mocno wytrząśnij. Po odsączeniu osadu, przesącz rozdziela się samoistnie na dwie warstwy. Warstwę dolną, chloroformową, zbierz za pomocą pipety Pasteura i wytrząśnij ją w probówce z 2 ml wody. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej osusz ją pomocą bezwodnego siarczanu magnezu, pobierz z niej około 0,5 ml i odparuj rozpuszczalnik w strumieniu ciepłego powietrza.

W tym czasie przygotuj trzy komory chromatograficzne, na ich dno nalej po około 0,5 cm eluentów: do pierwszej mieszaninę benzen/aceton (7:3), do drugiej heksan/aceton/tetrachlorek węgla (3:1:1), do ostatniej czysty heksan. Komory pozostaw do nasycenia parami rozpuszczalników co trwa około 10 minut. Na trzech płytkach chromatograficznych narysuj miękkim ołówkiem linię w odległości ok. 1 cm od jednego z krótszych boków płytki. Na linii zaznacz, w równych odstępach od siebie i boków płytki, trzy punkty startowe. Za pomocą kapilary nanieś po kilka mikrolitrów badanych roztworów do uzyskania plamek o średnicy < 0,5 cm. Po wysuszeniu w strumieniu ciepłego powietrza powtórz czynność nanoszenia próbek. Płytki umieść w komorach chromatograficznych i odczekaj aż czoło rozpuszczalnika osiągnie wysokość około 10 cm. Następnie wyjmij płytki z komór, wysusz je w strumieniu ciepłego powietrza i obejrzyj plamy pochodzące od rozdzielonych związków, w świetle widzialnym, UV-254 nm oraz UV-366 nm a następnie wywołaj chromatogramy parami jodu.

b. Izolacja i chromatografia pigmentów papryki

Około 50 mg sproszkowanej ostrej papryki umieść w probówce, dodaj 0,5 ml chlorku metylenu, wstrząśnij kilka minut a następnie odwiruj. Analogiczną procedurę przeprowadź dla papryki słodkiej. Nanieś po kropli ekstraktu na płytki do TLC (3x10 cm) i rozwiń chromatogramy w CH₂Cl₂ oraz w eterze dietylowym.

c. Właściwości antocyjanin i betacyjanidyn

Rozdrobnij po 10 g czerwonej kapusty i buraka a następnie umieść je w oddzielnych w zlewkach, zalać 50 ml wody i zagotowuj. Do 4 probówek wlej po 2 ml ekstraktów. Do dwóch probówek dodać po 2-3 krople 2M HCl, do dwu kolejnych 2M NaOH. Ponadto wyciągami z kapusty i buraków nasycić paski bibuły, wysusz je a następnie trzymaj kilka minut w oparach amoniaku.

16. Ćwiczenie 12

16.1 Reakcje enzymatyczne – wstęp teoretyczny

16.1.1 Enzymy

Pod pojęciem enzymów rozumiemy grupę naturalnych biokatalizatorów makromolekularnych. Prawie wszystkie enzymy są białkami, za wyjątkiem kilku znanych przypadków kwasów rybonukleinowych o właściwościach katalitycznych. W przeciwieństwie do wielu katalizatorów niebiałkowych enzymy cechuje wielka specyficzność katalizowanych reakcji oraz duża stereo-, regio- oraz enancjoselektywność reakcji. Wykazują również często dużą swoistość w stosunku do substratu (w przypadku substratów optycznie czynnych wiele z nich jest aktywna wyłącznie w stosunku do jednego z enancjomerów).

Cząsteczki enzymów mogą mieć charakter czysto białkowy (ureaza, pepsyna, trypsina itd.) mogą także zawierać części apeptydowe. Zgodnie z przyjętą nomenklaturą enzym jako całość nazywamy holoenzymem, jego część białkową – apoenzymem zaś reszty apeptydowe – grupami prostetycznymi lub koenzymami. Do najważniejszych koenzymów należą grupy hemowe, wolne oraz fosforylowane witaminy i ich pochodne (NADP, FAD, CoA), flawonoidy, fosforany nukleozydów, chinony. Aktywność wielu enzymów jest zależna od obecności jonów metali jak też niektórych anionów nieorganicznych.

W bezpośredni kontakt z substratem wchodzi nie całe białko lecz tylko pewne jego ugrupowanie aminokwasowe. Ugrupowania te nazywamy centrami katalitycznymi lub centrami aktywnymi enzymu. Każdy enzym ma przynajmniej jedno centrum aktywne, znamy jednak wiele posiadających po kilka miejsc wiązania substratu. W centrum aktywnym, obok skierowanych do jego wnętrza reszt aminokwasowych, znajdują się związane kowalencyjnie lub koordynacyjnie grupy prostetyczne oraz ewentualne jony potrzebne do wystąpienia prawidłowej aktywności enzymatycznej. Aminokwasy tworzące centrum aktywne (zwane czasami aminokwasami kontaktowymi) mają zazwyczaj charakter polarny i aktywne chemicznie grupy funkcyjne, przez co są zdolne do oddziaływań kowalencyjnych, koordynacyjnych, jonowych i wodorowych zarówno z substratem jak i koenzymem. Siła wiązania jest niewielka, rzędu $10\text{-}50\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Centra katalityczne umiejscowione są na ogół w zagłębieniu cząsteczki, izolowanym od środowiska zewnętrznego. Specyficzność wiązania zależy od precyzyjnie określonego ułożenia atomów w miejscu aktywnym. Substrat musi mieć odpowiedni kształt aby dopasować się do miejsca aktywnego. Obok czynnika geometrycznego istotny jest aspekt stereoelektronowy. Wiązana molekula musi charakteryzować się, obok właściwego kształtu, właściwym rozkładem gęstości elektronowej, umożliwiającym wiązania z polarnymi grupami funkcyjnymi znajdującymi się w miejscu wiązania. Miejsca aktywne wielu enzymów nie są strukturami sztywnymi, a ich kształt ulega często zmianie po skompleksowaniu cząsteczki substratu. Wynika z tego iż komplementarny względem substratu kształt miejsca katalitycznego pojawić się może w tym przypadku dopiero do związaniu substratu. Enzymy wykazujące takie właściwości cechuje często mniejsza specyficzność i większa różnorodność katalizowanych reakcji.

Wiele reakcji w organizmach żywych katalizowanych jest przez enzymy o podobnym działaniu lecz odmiennej strukturze. Mówimy wówczas o izoenzymach. Różnice takie są dostrzegalne przede wszystkim w materiale pochodzącym z tkanek różnych gatunków, jednakże często preparat enzymatyczny uzyskany z jednego organizmu jest niehomogeniczny i można go rozdzielić na białka o takiej samej aktywności biologicznej lecz odmiennej strukturze. Izoenzymy są szczególnie często spotykane w przypadku enzymów wykazujący strukturę oligomeryczną (są zbudowane z kilku podjednostek – protomerów). Często jedna tkanka wytwarza głównie jeden protomer a inna – drugi protomer. Protomery pochodzące z różnych źródeł mogą łączyć się w różnych kombinacjach, tworząc różne izoenzymy.

16.1.2 Klasyfikacja enzymów

Rosnąca ilość poznanych enzymów spowodowała konieczność wprowadzenia ich ujednocionej nomenklatury. Nazwy systematyczne składają się z dwóch części. Część pierwsza nazwy, o końcówce –aza, mówi o typie katalizowanej reakcji. Druga część nazwy enzymu wskazuje na substrat (substraty) na który działa enzym. W przypadku transferaz i oksydoreduktaz w nazwach uwzględnia się donor i akceptor. Przy transferazach jako przedrostek podaje się grupę przenoszoną. W grupie ligaz podaje się (w nawiasie) produkt powstały z rozpadu nukleotydu wysokoenergetycznego, wykorzystanego w reakcji. Nazwę substratu podaje się w dopełniaczu liczby pojedynczej (np.: oligonukleotydaza dezoksyrybonukleinianu), w przypadku gdy w reakcji biorą udział dwa substraty ich nazwy podaje się w mianowniku liczby pojedynczej, rozdzielone dwukropkiem (np.: N-metylotransferaza S-adenozylometionina : guanidynoocetan). Jeżeli dany enzym katalizuje dwa, następujące po sobie przekształcenia, nazwa drugiego powinna być ujęta w nawias i znajdować się jako trzeci człon nazwy (np.: oksyreduktaza L-aminokwas : NAD (dezaminująca)). Dodatkowo utworzono kod liczbowy

służący do klasyfikacji enzymów. Każdemu enzymowi przyporządkowany jest czteroliterowy ciąg. Pierwsza liczba określa przynależność enzymu do jednej z sześciu zasadniczych grup:

1. oksydoreduktazy
2. transferazy
3. hydrolazy
4. liazy
5. izomerazy
6. ligazy (syntetazy)

Kolejna liczba określa podklasę w danej grupie enzymów. Liczba trzecia oznacza przynależność danego enzymu do podpodklasy. Czwarta, ostatnia, określa konkretny enzym. I tak w poszczególnych klasach liczby oznaczają (w nawiasach podano przykłady):

Tabela 15. Oznaczenie liczbowe enzymów

klasa	druga liczba	trzecia liczba
1. oksydoreduktazy	- utleniana grupa w donorze (CHOH, CHNH ₂ itd.)	akceptor (NAD, NADP, cytochromy itd.)
2. transferazy	- przenoszona grupa (jednowęglowa; acyl, glikozyl, reszta kwasu fosforowego)	- dla fosfotransferaz: akceptor reszty kwasu fosforowego (alkohol, kwas karboksylowy, amina itd.) - dla pozostałych transferaz: bliższa informacja o przenoszonej grupie (formyl, metyl itd.)
3. hydrolazy	- hydrolizowane wiązanie (peptydowe, estrowe itd.)	- bliższe informacje o hydrolizowanym wiązaniu (estrowe w estrach kwasów karboksylowych, w estrach fosforanowych itd.)
4. liazy	- rozszczepiane wiązanie (C-C, C-O, C-N itd.)	- odszczepiana od substratu grupa (CO ₂ , H ₂ S, H ₂ O itd.)
5. izomerazy	- typ izomeryzacji (oksydoredukcja wewnątrzcząsteczkowa, izomeryzacja <i>cis-trans</i> itd.)	- forma przekształcenia lub atakowany substrat lub grupa (zmiana konfiguracji, aminokwas, aldozy, grupa enolowa itd.)
6. ligazy	- powstające wiązanie (C-O, C-C itd.)	- substraty syntezy (kwas : tiol, kwas : amoniak itd.)

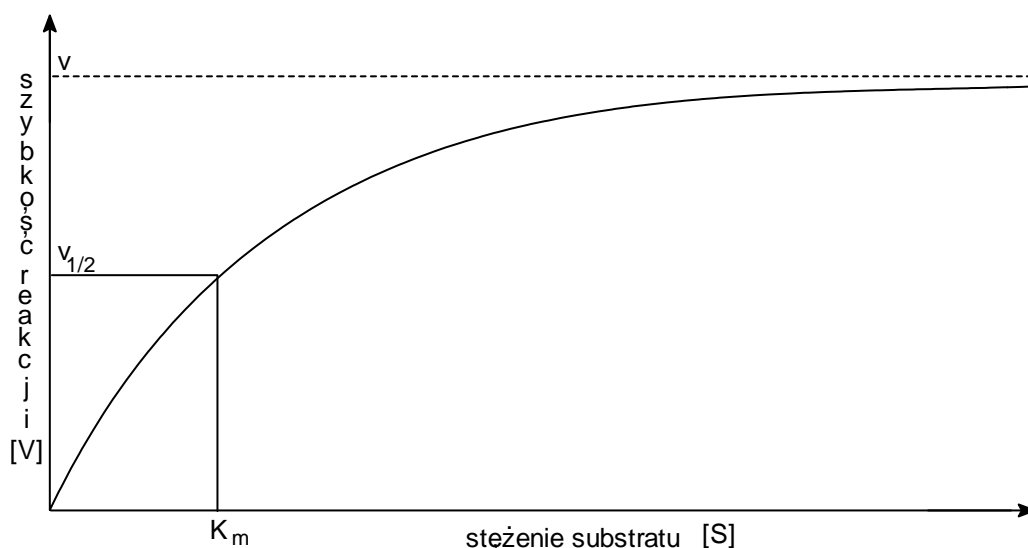
16.1.3 Charakterystyka poszczególnych klas enzymów

- **oksydoreduktazy** - katalizują reakcje utleniania-redukcji, polegające na przenoszeniu elektronów i atomów wodoru lub przyłączaniu atomów tlenu do substratu. Gdy nazwa enzymu pochodzi od donora atomów wodoru mówimy o dehydrogenazach (np.: oksydoreduktaza alkohol : NAD zwana dehydrogenazą alkoholową; katalizuje redukcję alkoholu do aldehydu z NAD jako akceptorem protonów). Jeśli nazwa enzymu pochodzi od akceptora atomów wodoru a donorem jest NADH₂ mówimy o reduktazach (np.: oksydoreduktaza zredukowany NAD : L-cystyna zwana reduktazą cystynową; katalizuje redukcję cystyny do cysteiny przy udziale NADH₂ jako donora protonów). Gdy jony wodorkowe przenoszone są z jednego układu nikotynoamidowego na drugi enzymy takie nazywamy transhydrogenazami (np.: oksydoreduktaza zredukowany NADP : NAD, nazywana transhydrogenazą NADP; katalizuje przemianę NADPH₂ w NADP przy jednoczesnej redukcji NAD do NADH₂). Jeśli akceptorem wodoru podczas utleniania substratu jest tlen enzymy katalizujące tą reakcję nazywamy oksydazami, jeśli jest nim nadtlenek wodoru – peroksydazami (np.: oksydoreduktaza L-askorbinian : tlen, inaczej oksydaza askorbinianowa, katalizuje dehydrogenację witaminy C przy udziale tlenu i z wytworzeniem wody). Przyłączanie tlenu do substratu umożliwiają oksygenazy (np.: oksydoreduktaza tlen : tryptofan, nazywana oksygenazą tryptofanową, umożliwia utlenienie tryptofanu tlenem cząsteczkowym). Jednoczesne przyłączenie tlenu do dwóch substratów (dokładniej przyłączenie do jednego z substratów grupy hydroksylowej z jednoczesną dehydrogenacją drugiego substratu i wytworzeniem cząsteczki wody) umożliwiają hydroksylazy (np.: oksydoreduktaza 3,4-dwuhydroksyfenyloetyloamina, askorbinian : tlen (hydroksylująca), inaczej hydroksylaza DOPA-aminy, utlenia DOPA-aminę do noradrenaliny za pomocą tlenu cząsteczkowego z jednoczesną dehydrogenacją cząsteczki witaminy C). Grupami prostetycznymi są najczęściej mono- lub dinukleotydy flawinowe – FAD, FMN (pochodne witaminy B₂); dinukleotydy nikotynoamidoadeninowe – NAD, NADP (pochodne witaminy PP); witamina B₂; hem; jony miedzi żelaza i cynku.

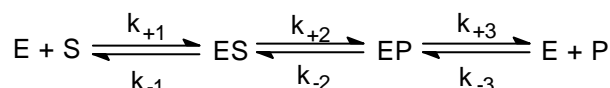
- **transferazy** – są to enzymy umożliwiające przenoszenie rodnika lub grupy z jednego związku na drugi albo wymianę rodnika lub grupy z atomem wodoru lub tlenu innego związku. Z ważniejszych enzymów z tej grupy wymienić należy: metylotransferazy, hydroksymetylotransferazy, formyltransferazy, karboksylotransferazy, transketolazy, aransaldolazy, acylotransferazy (np.: acetylotransferazy), aminoacylotransferazy (np.: alaninylotransferazy), glikozylotransferazy (np.: galaktozylotransferazy), kinazy (fosforylotransferazy), nukleotydotransferazy i inne. Koenzymami są: witamina B₁ i jej fosforan; fosforan witaminy B₆; kwas liponowy; kwas pangamowy; koenzym A; kwas foliowy i inne.
- **hydrolazy** – katalizują rozbitcie wiązań przy udziale wody. W zależności od charakteru hydrolizowanych wiązań rozróżniamy hydrolazy: działająca na wiązania estrowe (estrazy, lipazy, hydrolazy tioestrów), wiązania monoestrów fosforanowych (fosfatazy, nukleotydyazy), działające na związki glikozydowe, peptydy (aminopeptydazy, karboksypeptydazy, dipeptydazy), działające na di- i trifosforany (ATPaza, pirofosfataza nieorganiczna) i inne
- **liazy** – są enzymami które katalizują rozbitcie różnych wiązań nie na drodze hydrolitycznej, przy czym z substratu na który działa enzym uwalniane są związki małocząsteczkowe. Ze względu na rodzaj odszczepianych grup wyróżniamy między innymi: dekarboksylazy (uwalniają CO₂), aldolazy (uwalniają małocząsteczkowe aldehydy), dehydratazy (uwalniają wodę), amoniakolazy (uwalniają amoniak).
- **izomerazy** – umożliwiają wewnątrzcząsteczkową izomeryzację substratu. Proces może obejmować zmianę konfiguracji przy węglu asymetrycznym (racemazy i epimerazy), przeniesienie atomu wodoru (izomerazy) lub grupy funkcyjnej (mutazy).
- **ligazy** – są odpowiedzialne za syntezę (powstawanie nowych wiązań), związaną z pobraniem energii z fosforanów wysokoenergetycznych.

16.1.4 Kinetyka reakcji enzymatycznych.

W odróżnieniu od reakcji niekatalizowanych, szybkość reakcji enzymatycznej nie jest prostoliniową funkcją stężenia substratu, lecz graficznie przedstawia krzywą przypominającą hiperbole.



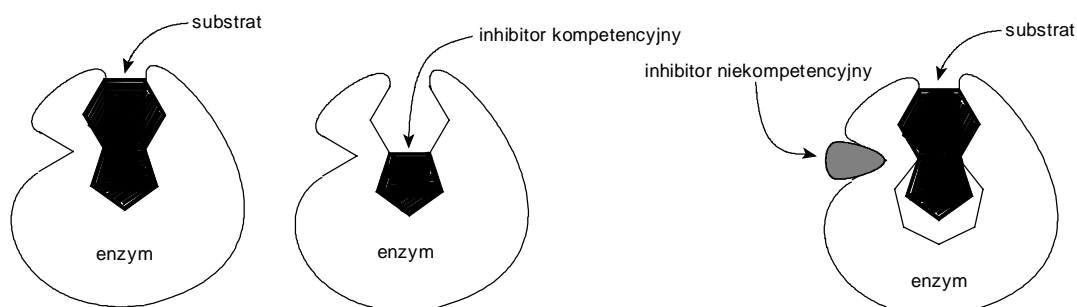
Reakcje enzymatyczne przebiegają etapowo, z wytworzeniem kompleksów enzym-substrat (ES) a następnie enzym-produkt (EP).



Maksymalną szybkość reakcji, v_{\max} osiągamy w przypadku całkowitego wysycenia miejsc aktywnych enzymu substratem. Dla scharakteryzowania własności katalitycznych enzymów wprowadzono pojęcie stałej Michaelisa-Menten, zdefiniowanej jako stężenie substratu (wyrażone w mol*dm⁻³) przy którym szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej.

16.1.5 Wpływ inhibitorów i aktywatorów na szybkość reakcji enzymatycznych. Enzymy allosteryczne.

Inhibicja enzymów przez małe cząsteczki organiczne oraz jony ma zasadnicze znaczenia dla regulacji i kontroli procesów enzymatycznych w żywym organizmie. Inhibicja może być procesem odwracalnym bądź nieodwracalnym. W inhibicji nieodwracalnej inhibitor łączy się kowalencyjnie z enzymem lub wiąże się z nim w sposób na tyle silny, że rozdysocjowanie kompleksu jest praktycznie niemożliwe. W przeciwieństwie do inhibicji nieodwracalnej, inhibicję odwracalną cechuje szybki rozpad kompleksu enzym – inhibitor. Najprostszym typem odwracalnego hamowania funkcji enzymu jest inhibicja kompetencyjna. W tym przypadku cząsteczka inhibitora wiąże się z enzymem w miejscu wiązania substratu, zmniejszając w ten sposób liczbę molekuł enzymu zdolnych do katalizowania reakcji, zmniejszając zatem szybkość katalizy. Inhibitory kompetencyjne są geometrycznie i stereoelektronowo podobne do substratu. Inhibitory niekompetencyjne wiążą się z enzymem jednocześnie z wiązaniem substratu. Spowodowani tego typu zmieniają właściwości enzymu, uniemożliwiając tym samym katalizowanie przez niego reakcji.



Grupą enzymów charakteryzującą się odmiennymi właściwościami kinetycznymi oraz cechami procesów inhibicji i aktywacji są enzymy allosteryczne. W przypadku biokatalizatorów z tej grupy w każdej molekułce występuje kilka (przynajmniej dwa) miejsca wiązania substratu, przy czym związanie substratu w jednym z tych miejsc zmienia powinowactwo (zmniejsza lub zwiększa) pozostałych centrów aktywnych do kolejnych cząsteczek substratu. Takie wiązanie substratu nazywamy wiązaniem kooperatywnym. Aktywność enzymu allosterycznego zależy ponadto od obecności cząsteczek regulujących, wiążących się podobnie jak inhibitory niekompetencyjne, poza centrum katalitycznym lecz zmieniających właściwości katalityczne cząsteczki enzymu. Mogą one mieć zarówno wpływ aktywujący jak i dezaktywujący na biokatalizator.

16.1.6 Wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów.

Dla każdego enzymu istnieje optymalne pH, w którym wykazuje on maksymalną aktywność. Ponieważ pH wpływa na ładunek cząsteczki enzymu jak i cząsteczki substratu, największą szybkość reakcji zaobserwujemy przy stężeniu jonów wodorowych gwarantującym największą różnicę pomiędzy ładunkiem substratu i enzymu (w szczególności zaś miejsca katalitycznego). Dodatkowo zmiany pH wpływają, na skutek jonizacji pewnych grup funkcyjnych białka, na zmianę struktury trzeciorzędowej a zatem i geometrii, cząsteczki enzymu, co pociąga za sobą zmiany aktywności katalitycznej. Poszczególne enzymy różnią się pH optymalnym. Pepsyna, karboksylaza drożdżowa czy też amylaza słodowa wykazują maksimum własności katalitycznych w środowisku o odczynie kwaśnym (odpowiednio 1,7; 4,8 i 4,5 jednostki pH). Z kolei większość enzymów trawiennych (lipaza trzustkowa, trypsyna, arginaza wątrobowa) najefektywniej działa w warunkach zasadowych (odpowiednio 7,8; 9 i 9,8 jednostki pH).

Podwyższenie reakcji o 10°C powoduje wzrost szybkości reakcji 2-3 krotnie. W przypadku żywych organizmów prawo to dotyczy niewielkiego zakresu temperatur, w którym nie zachodzą zmiany strukturalne w białkach. Na ogół powyżej 45°C zaczynają zachodzić zmiany w geometrii białek, prowadzące w ok. 70°C do całkowitej inaktywacji enzymów. Wyjątek stanowią biokatalizatory izolowane z bakterii żyjących w pobliżu gorących źródeł, przystosowanych do życia w temperaturach bliskich punktowi wrzenia wody.

16.2 Reakcje enzymatyczne – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie z podstawowymi cechami reakcji enzymatycznych.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Enzymy, enzymy allosteryczne, kinetyka reakcji enzymatycznych, stała Michaelisa, inhibitory, wpływ czynników środowiska na aktywność enzymów, hydroliza enzymatyczna skrobi, bufor, pH.

ODCZYNNIKI

2M NaHCO ₃	0,02 M I ₂ w 0,1 M KI	skrobia
1% NaCl	kwasy cytrynowy	
0,1M HCl	Na ₂ HPO ₄	

UWAGA: Roztwory jodu są silnie płamiące.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotuj:

100 cm³ 0,1M roztworu kwasu cytrynowego

100 cm³ 0,2M roztworu wodorofosforanu sodu

100 cm³ 1% roztworu skrobi (odważoną ilość skrobi rozpuścić w 10 cm³ wrzącej wody i rozcieńczyć do 100 cm³)

10 cm³ 0,1 M roztworu HCl

OPIS ĆWICZENIA

a. Wstępne oznaczanie stężenia amylazy

Przepłukać usta wodą destylowaną, zebrać ślinę, rozcieńczyć 4-krotnie wodą i przesączyć przez watę. Przygotować cztery próbki, do których odmierzyć kolejno 2, 1, 0,5 i 0,2 ml roztworu śliny. Rozcieńczyć zawartość probówek wodą destylowaną do objętości 2 ml (odpowiednio 0, 1, 1,5 i 1,8 ml). Dodać po 2 ml buforu cytrynianowego o pH=6,6. Probówki umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 37°C i po 5 minutach do każdej wlać po 2 ml 1% roztworu skrobi ogrzanego do tej samej temperatury (roztwór skrobi przygotować bezpośrednio przed ćwiczeniem). Inkubować mieszaninę w podanej temperaturze przez 5 minut, a następnie dodać po 2 ml 0,02 M roztworu jodu w jodku potasu. Do dalszych eksperymentów należy wybrać tę najmniejszą objętość śliny, która w podanym czasie powoduje całkowitą hydrolizę skrobi. Jeżeli barwa nie wystąpi w żadnej próbce, to roztwór śliny należy jeszcze bardziej rozcieńczyć.

b. Wpływ temperatury na aktywność enzymu

Przygotować 40 probówek zawierających po 1 ml roztworu I₂ w KI. Oddzielnie zmieszać w próbce 2 ml roztworu skrobi z 2 ml buforu cytrynianowego (pH=6,6) i ogrzewać na łaźni wodnej w 20°C. Dodać objętość roztworu śliny wyznaczoną w poprzednim etapie. Zanotować czas zero. Dokładnie co 1 minutę pobierać po 0,2 ml mieszaniny i dodawać do kolejnych probówek z jodem. Inkubację przerwać w momencie całkowitej hydrolizy skrobi do achrodekstryn (nie pojawia się barwa z jodem). Zanotować czas jaki był na to potrzebny. Wykonać analogiczny pomiar w 40, 60 i 80°C. Wykazać temperaturę optymalną dla amylazy.

c. Wpływ pH na aktywność amylazy

Przygotować szereg probówek zawierających po 1ml roztworu jodu w KI. W łaźni wodnej o temperaturze 37°C ogrzać mieszaninę 2 ml buforu o badanym pH z 2 ml roztworu skrobi. Po 5 minutach dodać wyznaczoną wcześniej objętość śliny. Przenosić po 0,2 ml mieszaniny po kolejnych probówek z jodem. Wyznaczyć czas potrzebny na zhydrolizowanie skrobi do achrodekstryn. Pomiar wykonać dla pH=5,0; 6,0; 6,6; 7,5; 8,0.

Tabela 16. Skład buforu cytrynianowego o zadanym pH

pH	5,0	6,0	6,6	7,5	8,0
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	10,3	12,63	14,55	17,39	19,45
0,1 M kwas cytrynowy (ml)	9,7	7,37	5,46	2,61	0,55

d. Wpływ aktywatorów i inhibitorów

Przygotować 4 szeregi po 10 probówek zawierających roztwór jodu w KI. W łaźni wodnej o temperaturze 37⁰C umieścić 4 probówki zawierające po 2 ml roztworu skrobi i 2 ml buforu o pH=6,6. Do pierwszej probówki dodać 2 ml wody, do drugiej 2 ml 1% NaCl, do trzeciej 2 ml 0,1 M HCl, a do czwartej 2 ml 2M NaHCO₃. Następnie do każdej dodać wyznaczoną wcześniej objętość śliny. Co 1 minutę pobierać 0,2 ml cieczy z każdej probówki i wprowadzać do płynu Lugola. Wyznaczyć czas potrzebny na hydrolizę do achrodekstryn.

17 Ćwiczenie 13

17.1 Procesy utleniania-redukcji w organizmach żywych – wstęp teoretyczny

Olbrymia część procesów zachodzących w organizmach żywych polega na procesach utleniania – redukcji. W związku z tym w tkankach istnieje szereg wyspecjalizowanych enzymów katalizujących te reakcje jak i liczna grupa związków będących donorami lub akceptorami elektronów, atomów wodoru lub tlenu pobieranych bądź uwalnianych w tych procesach oraz służących do ich transportu, zarówno w obrębie komórki jak i w całym organizmie. Zagadnienia te są na tyle szerokie, że omówione zostaną jedynie problemy związane z procesami badanymi podczas ćwiczeń.

17.1.1 Biologiczne układy utleniania-redukcji

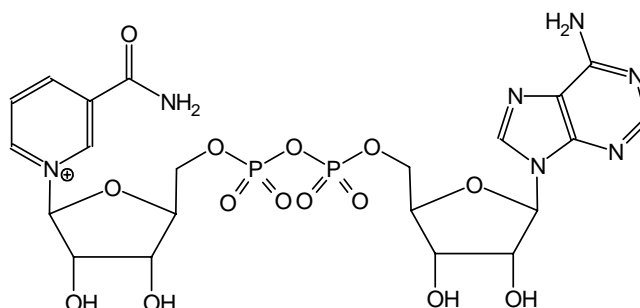
Jak wspomniano w części poświęconej reakcjom utleniania – redukcji, własności układu utleniacz-reduktor scharakteryzować można poprzez podanie potencjału normalnego. Dla układów biologicznych, ze względu na ich specyfikę, wprowadzono pojęcie pozornego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, mierzonego w warunkach o pH=7,0. W Tabeli 17 zestawiono potencjały pozorne E_0' dla najważniejszych biologicznie układów utleniacz-reduktor.

Tabela 17. Najważniejsze biologiczne układy utleniania-redukcji

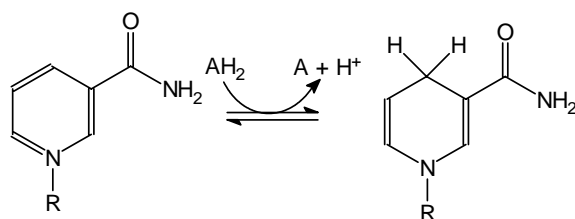
Układ	Pozorny potencjał utleniania-redukcji [V]
$H_2/2H^+ + 2e^-$	-0,420
Cysteina/cystyna	-0,340
NAD/NADH ₂	-0,320
Liponian/dihydroliponian	-0,290
Glutation zredukowany/glutation utleniony	-0,220
Kwas mlekowy/kwas pirogronowy	-0,180
Flawoproteina zredukowana/flawoproteina utleniona	-0,120
Etanol/aldehyd octowy	-0,090
Kwas bursztynowy/kwas fumarowy	0,030
Kwas askorbinowy/kwas dehydroaskorbinowy	0,060
Cytochrom b Fe^{3+} /cytochrom b Fe^{2+}	0,080
Ubichinon/ubichinol	0,100
Cytochrom c Fe^{3+} /cytochrom c Fe^{2+}	0,220
Cytochrom a Fe^{3+} /cytochrom a Fe^{2+}	0,290
O^{2-}/O_2	0,820

Do najważniejszych związków biorących udział w reakcjach utleniania redukcji należą:

- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD)



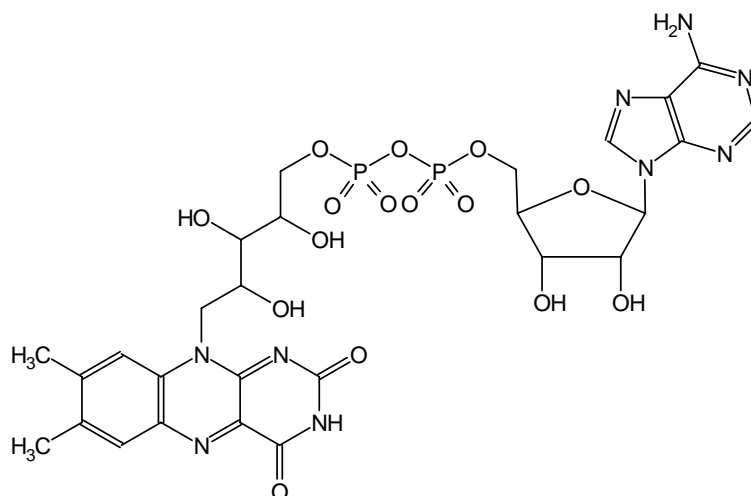
Proces redukcji NAD polega na oderwaniu od cząsteczki substratu dwóch atomów wodoru, z których jeden, jako anion wodorowy (H^-) ulega przyłączeniu w pozycji 4 nikotynamidu (witamina PP), drugi przechodzi do roztworu jako kation wodorowy (H^+).



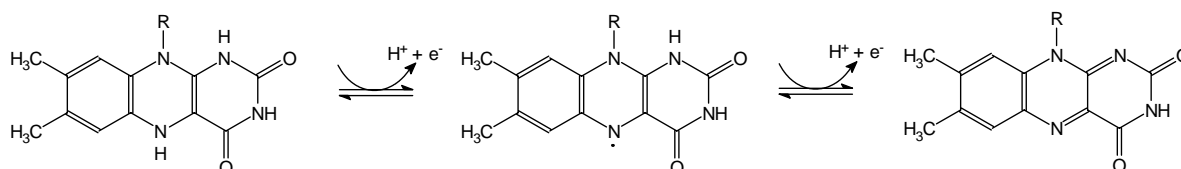
Zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NADH + H⁺) może być z kolei donorem atomów wodoru w procesach redukcji innych związków.

NADP (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowy) jest pochodną NAD, zawierającą resztę kwasu fosforowego przyłączoną poprzez wiązanie estrowe w pozycji 2' pierścienia cukrowego adenozyiny. Warto pamiętać, iż dehydrogenazy współpracujące z NAD są na ogół swoiste i nie reagują (bądź reagują wolno) w obecności NADP, i odwrotnie NADP-zależne dehydrogenazy nie współpracują z NAD.

- dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD)



Proces utleniania-redukcji FAD związany jest z odrywaniem (przyłączaniem) jonów H⁺ i elektronów do pierścienia heterocyklicznego witaminy B₂ wchodzącej w skład dinukleotydu.

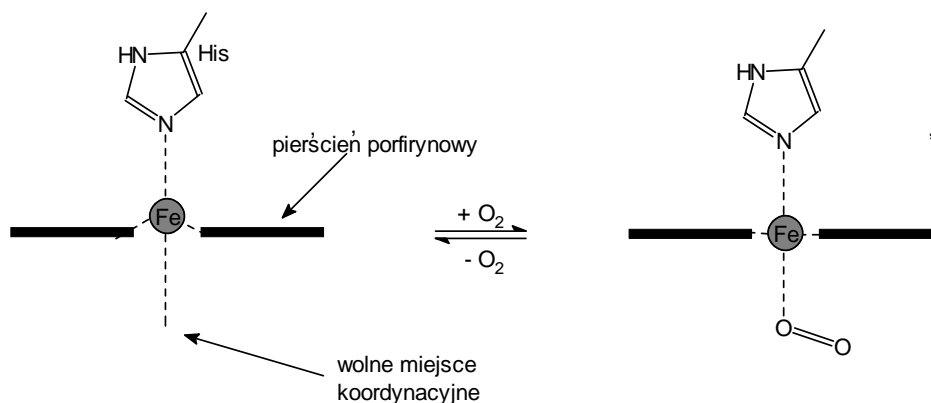


Nukleotydy flawinowe wchodzi w skład oksydaz, enzymów zdolnych do przenoszenia wodoru bezpośrednio na tlen cząsteczkowy.

17.1.2 Barwniki hemowe

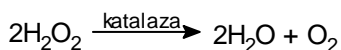
W procesach utleniania wewnątrzkomórkowego udział biorą liczne chromoproteiny zawierające, jako grupy protetyczne, cząsteczki hemu. Pełnią one funkcje enzymów, przenośników elektronów oraz przenośników i magazynów tlenu. Tak szerokie rozpowszechnienie i różnorodność funkcji wynikają z właściwości utleniająco-redukujących oraz własności koordynacyjnych hemu. Do najbardziej znanych białek hemowych należą hemoglobina i mioglobina. Pierwsza z nich pełni funkcje transportera i dostarczyciela tlenu do tkanek w organizmach zwierzęcych, druga służy magazynowaniu tlenu w tkankach. Hemoglobina jest białkiem wykazującym strukturę czwartorzędową. Składa się z czterech niezależnych łańcuchów białkowych (po dwa łańcuchy dwóch różnych typów) i zawiera cztery reszty hemowe. Każdy z łańcuchów ma długość ok. 145 reszt aminokwasowych. Mioglobina nie ma struktury oligomerycznej. Zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego, złożonego z ok. 150 aminokwasów, i zawiera jeden element porfirynowy. Jej cząsteczka jest pofałdowana i ma kształt dysku. Mioglobiny pochodzące od różnych gatunków wykazują pewne, niewielkie różnice strukturalne. Mioglobiny nie są białkami jednorodnymi; część białkowa mioglobiny człowieka składa się z co najmniej pięciu, różnych elektroforetycznie, frakcji. Żelazo w czynnych hemoglobinach i mioglobinach znajduje się zawsze na drugim stopniu utlenienia. Hem zawierający Fe²⁺ nazywamy ferrohmemem. W obu

białkach hem jest związany niekowalencyjnie, poprzez wiązania koordynacyjne pomiędzy jonem żelaza a resztą histydyny. W obu przypadkach atom żelaza nie leży dokładnie w płaszczyźnie pierścienia tetrapirołowego porfiryny lecz jest wysunięty nieznacznie w kierunku kompleksującej jon Fe^{2+} histydyny (o ok. 0,03 nm). Żelazo dwuwartościowe cechuje obecność sześciu miejsc koordynacyjnych. W nieutlenowanej hemoglobinie bądź mioglobinie cztery miejsca wykorzystane są przez porfiryne atomy azotu, piąte bierze udział w wiązaniu z resztą His natomiast ostatnie, szóste, jest wolne. Proces wiązania cząsteczki tlenu nie wiąże się ze zmianą stopnia utleniania atomu Fe. Molekuła O_2 ulega dokoordynowaniu do atomu żelaza wykorzystując ostatnie wolne miejsce koordynacyjne. Procesowi temu towarzyszy zmiana położenia jonu Fe^{2+} , który przesuwa się o około 0,02 nm w stronę cząsteczki tlenu. Pociąga to za sobą zmianę kształtu całej molekuly białka.

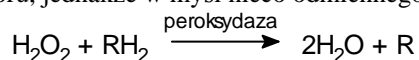


Wolne miejsce może być również zajęta przez inne cząsteczki, na przykład tlenek węgla (czad), wiążący się ponad 200 razy silniej niż tlen, siarkowodór i inne. W przypadku zmiany stopnia utlenienia żelaza w hemie z II na III dochodzi do dezaktywacji hemoglobiny (lub mioglobiny) i utraty przez nie funkcji biologicznych. Produktu utlenienia hemoglobiny nazywamy methemoglobinami i zaliczmy je do barwników ferrihemowych (zawierających hem z jonami Fe^{3+} , tzw. ferrihem). W ferrihemoglobinie wolne miejsce koordynacyjne zajmuje cząsteczka wody.

Białkami zawierającymi hem z żelazem na trzecim stopniu utlenienia są katalazy i peroksydazy. Katalaza jest białkiem o masie około 240 kDa, zawierającym 4 reszty ferrihemowe. Występuje głównie w świecie zwierzęcym i jest odpowiedzialna za rozkład nadtlenu wodoru w myśl reakcji:



Aktywność katalazy jest imponująca. Jedna jaja cząsteczka rozkłada w ciągu minuty 5 mln cząsteczek H_2O_2 (w 0°C). Peroksydazy są szerzej rozpowszechnione w organizmach roślinnych. Obok hemu w jej centrum katalitycznym znajduje się selen (związany w selenocysteinie). Jej funkcja, podobnie jak funkcja katalazy, polega na rozkładzie nadtlenu wodoru, jednakże w myśl nieco odmiennego mechanizmu:



Donorem atomów wodoru jest najczęściej zredukowany cytochrom c, chinony lub kwas askorbinowy.

Proteinami zawierającymi żelazo na zmiennym stopniu utlenienia są cytochromy. Najważniejszymi są proteiny oznaczane literami *a*, *b*, *c* i *d*. Cytochrom *a* zawiera dwie cząsteczki zmodyfikowanego hemu (zawierającego grupę aldehydową zamiast jednej z reszt metylowych i łańcuch politerpenowy w miejsce podstawnika winylowego), związanego kowalencyjnie z białkiem poprzez wiązanie tioeterowe. Zawiera ponadto dwa jony miedzi. W skład cząsteczki cytochromu *b* wchodzi dwie molekuly niezmodyfikowanego hemu, nie połączonego z łańcuchem polipeptydowym w sposób kowalencyjny. Cytochrom *c* zawiera dwie molekuly hemu związane, podobnie jak w cytochromie *a*, kowalencyjnie. W cytochromie *d* grupą prostetyczną jest żelazodihydroporfiryna.

Cytochromy są białkami łańcucha oddechowego, wbudowanymi w błonę mitochondrialną, odpowiedzialnymi za transport elektronów

17.2 Procesy utleniania-redukcji w organizmach żywych – część eksperymentalna

CEL ĆWICZENIA

Zapoznanie ze zagadnieniem reakcji utleniania-redukcji zachodzących w żywym organizmie.

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU

Pojęcie utleniania i redukcji, utleniacz, reduktor, stopień utlenienia, stała równowagi reakcji utleniania-redukcji, barwniki pirolowe w organizmach żywych, chromoproteiny, transport tlenu w organizmie zwierzęcym, widma elektronowe.

ODCZYNNIKI

kwas askorbinowy (wit. C)	2M NaOH	1% NaCl
$K_3[Fe(CN)_6]$	1% fenol	roztwór Stokesa
0,01 M HCl	1% pirogallol	NH_4OH
0,01 M NaOH	1% gwajakol	papierki wskaźnikowe
Na_2S	3% H_2O_2	hemoglobina
2 M H_2SO_4	4% benzydyny w CH_3COOH	cytochrom c
$NaHSO_3$	1% KCN	CO

UWAGA: Wodorotlenek sodu oraz kwasy: solny, siarkowy i octowy, są silnie żrące. Cyjanek potasu jest silną trucizną, podobnie jak siarkowodór i tlenek węgla. Pracując z nimi obowiązuje stosowanie rękawic ochronnych i okularów. Roztwory wskaźników są silnie plamiące.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotować:

10 cm³ 1% roztworu $K_3[Fe(CN)_6]$
100 cm³ 8 mM roztworu kwasu askorbinowego

OPIS ĆWICZENIA

a. Cytochromy - Redukcja i utlenianie cytochromu c

Przygotować roztwór 5 mg cytochromu c w 5 ml 1% roztworu chlorku sodu. Do 3 probówek odmierzyć po 1 ml roztworu cytochromu c i 1 cm³ wody. Do 2 i 3 probówki dodać po ok. 50μl (1 kropla) 8 mM roztworu kwasu askorbinowego (wit. C). Wreszcie do probówki 3 dodać 1 kroplę sześciocyjanożelazianu(III) potasu. Zmierzyć widma UV-VIS uzyskanych roztworów.

b. Reakcje utleniania-redukcji i wymiany ligandów w cząsteczce hemoglobiny

Rozpuść 10 mg hemoglobiny w 10 ml 1% NaCl. Nalać po 1 cm³ roztworu do 9 probówek a następnie

1. nasycić tlenem
2. nasycić tlenem, a następnie tlenkiem węgla
3. nasycić tlenkiem węgla
4. dodać roztworu Stokesa
5. dodać roztworu Stokesa i nasycić tlenkiem węgla
6. dodać kroplę 1% roztworu sześciocyjanożelazianu(III) potasu ($K_3[Fe(CN)_6]$), doprowadzić pH do 6 za pomocą 0,01 M HCl lub NaOH
7. dodać kroplę 1% roztworu sześciocyjanożelazianu(III) potasu ($K_3[Fe(CN)_6]$), doprowadzić pH do 10 za pomocą 0,01 M HCl lub NaOH

8. nasycić tlenem a następnie siarkowodorem¹
9. dodać szczyptę wodorosiarczynu(IV) sodu, zalkalizować 2M NaOH (pH powyżej 12), ogrzać do powstania czerwonego zabarwienia

Roztwór Stokesa: 20g siarczynu żelaza(II) rozpuścić w 0,5 dm³ i dodać roztwór 30 g kwasu winowego w 0,5 dm³ wody. Przed użyciem do potrzebnej objętości roztworu dodawać kroplami, intensywnie mieszając, stężony amoniak do momentu rozpuszczenia osadu wytrącającego się w początkowym etapie. Zmierz widma UV-Vis otrzymanych roztworów.

UWAGA: Z powodu toksycznego działania H₂S i CO nasycanie gazami prowadź pod dygestorium

c. Oksydazy i peroksydazy

- Przygotowanie preparatu oksydaz

Utrzeć na tarce ziemniak, miazgę włożyć do płóciennego woreczka, zanurzyć w zlewce z 200 ml wody destylowanej i przepłukać miazgę. Zdekantować otrzymany roztwór znad wyptukanej skrobi.

- Badanie oksydaz

Do 4 probówek wlać po 5 ml wyciągu z ziemniaka i dodać do kolejnych probówek po 10 kropli 1% roztworu fenolu, 1% roztworu pirogallolu i 1% roztworu gwajakolu. Zawartość wymieszać i wstawić do łaźni o temperaturze 40°C. Po godzinie obserwuje się zmiany barwy roztworów.

- Reakcje peroksydaz

Do probówki wlać kilka mililitrów wyciągu ziemniaczanego i dodać kroplę 4% roztworu benzydyny w CH₃COOH oraz kilka kropel 3% wody utlenionej. Równolegle wykonać próbę utleniania benzydyny:

- bez wyciągu ziemniaczanego
- po uprzednim zagotowaniu i ostudzeniu wyciągu
- po dodaniu do wyciągu kropli 1% roztworu cyjanku sodu
- z wodą destylowaną zamiast utlenionej

- Reakcje katalaz

Do dwu probówek wlać po 2 ml soku ziemniaka, a do kolejnych dwóch po 2 ml świeżego mleka. Jedną probówkę z sokiem ziemniaczanym i jedną z mlekiem ogrzać do wrzenia i ostudzić, a następnie do wszystkich dodać po 2 ml 3% roztworu nadtlenu wodoru. Zaobserwować zmiany w poszczególnych probówkach.

¹ siarkowódor otrzymuje się w zestawie do wytwarzania gazów w wyniku reakcji Na₂S z 2M kwasem siarkowym

18. Tablice i wiadomości uzupełniające

18.1 Sposoby wyrażania zawartości składników w mieszaninach i roztworach

Mol jest to taka ilość materii, która zawiera liczbę cząstek równą liczbie atomów zawartych w 0,012 kg ^{12}C (węgla 12). Przy stosowaniu pojęcia mola należy określić rodzaj cząstek. Mogą nimi być: atomy, drobiny (cząsteczki), jony, elektrony, inne cząstki albo określone zespoły takich cząstek.

Poniżej podano definicje sposobów wyrażania zawartości składnika w roztworze lub mieszaninie.

Stężenie molowe - stosunek liczby moli składnika do objętości układu zawierającego ten składnik.

$c_B = n_B / V$, gdzie n_B - liczba moli składnika **B**,

V - objętość roztworu;

wymiar: **mol/l, mol/dm³, M**.

Stężenie masowe - stosunek masy określonego składnika do objętości układu zawierającego tę masę.

$p_B = m_B / V$, gdzie m - masa składnika **B**,

V - objętość układu

Ułamek masowy - stosunek masy określonego składnika do masy całego układu (ułamek masowy wyrażony w % nazywany jest stężeniem procentowym).

$w_B = m_B / m_G$, gdzie m_B - masa składnika **B**,

m_G - masa całego układu **G**

wymiar: **kg/kg, ppm - 10⁻⁶, ppb - 10⁻⁹**

Ułamek objętościowy - stosunek objętości określonego składnika do objętości całego układu.

$V_B = V_B / V_G$,

gdzie V_B - objętość składnika **B**,

V_G - objętość całego układu **G**

wymiar: **m / m , ppm (v/v), ppb(v/v)**

Ułamek molowy - stosunek ilości moli określonego składnika do sumy ilości materii wszystkich składników układu.

$x_B = n_B / \sum n_i$,

gdzie n_B - ilość moli składnika **B**,

$\sum n_i$ - suma liczby moli wszystkich składników układu

Molarność - stosunek ilości moli określonego składnika do masy rozpuszczalnika.

$m_B = n_B / m$, gdzie n_B - ilość moli składnika **B**, m - masa rozpuszczalnika

wymiar: mol/kg

18.2 Roztwory kwasów i zasad

Kwas solny HCl

stężony: 38% (12 M) roztwór chlorowodoru w wodzie; $d=1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Kwas siarkowy(VI) H₂SO₄

stężony: 96% (18 M) roztwór w wodzie; $d=1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, t.w. 330°C

Kwas azotowy HNO₃

stężony: 68% (15 M) roztwór w wodzie; $d=1,40 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, t.w. azeotropu 120°C

Kwas chlorowy(VI) HClO₄

stężony: 70% (11 M) roztwór w wodzie; $d=1,60 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Kwas fluorowodorowy HF

stężony: 40% (22 M) roztwór fluorowodoru w wodzie; $d=1,12 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Kwas octowy CH₃COOHstężony (zwany lodowatym): 100% (17,5 M); d=1,05 g*cm⁻³**Woda amoniakalna (NH₃*H₂O)**stężony: 25% (13 M) roztwór amoniaku w wodzie; d=0,91 g*cm⁻³**18.3 Wartości stałych dysocjacji ważniejszych kwasów i zasad****Tabela 18.** Wartości pK_a wybranych kwasów nieorganicznych

Kwas/zasada sprzężona	pK _a	Kwas/zasada sprzężona	pK _a
H ₃ O ⁺ /H ₂ O	-1,74	H ₂ Te/HTe ⁻	2,64
H ₂ O/OH ⁻	15,97	HTe ⁻ /Te ²⁻	5,00
OH ⁻ /O ²⁻	>36	H ₂ Se/HSe ⁻	3,77
H ₂ O ₂ /HO ₂ ⁻	11,62	HSe ⁻ /Se ²⁻	10,0
HClO ₄ /ClO ₄ ⁻	<-8	H ₂ S/HS ⁻	7,04
HClO ₃ /ClO ₃ ⁻	0,92	HS ⁻ /S ²⁻	14,92
HClO ₂ /ClO ₂ ⁻	2,00	HIO/JO ⁻	11,00
HClO/ClO ⁻	7,43	HIO ₃ /IO ₃ ⁻	0,72
HNO ₃ /NO ₃ ⁻	<0	H ₃ IO ₆ /H ₄ IO ₆ ⁻	1,64
HNO ₂ /NO ₂ ⁻	3,35	H ₄ IO ₆ ⁻ /H ₃ IO ₆ ²⁻	8,40
H ₂ N ₂ O ₂ /HN ₂ O ₂ ⁻	7,05	H ₃ IO ₆ ²⁻ /H ₂ IO ₆ ³⁻	15,00
HN ₂ O ₂ ⁻ /N ₂ O ₂ ²⁻	11,00	HBrO/BrO ⁻	8,70
H ₂ SO ₄ /HSO ₄ ⁻	<-3	HBrO ₃ /BrO ₃ ⁻	0,70
HSO ₄ ⁻ /SO ₄ ²⁻	1,70	H ₃ SbO ₄ /H ₂ SbO ₄ ⁻	4,40
H ₂ SO ₃ /HSO ₃ ⁻	1,77	H ₂ AsO ₄ /HAsO ₄ ⁻	2,32
HSO ₃ ⁻ /SO ₃ ²⁻	7,20	HAsO ₂ /AsO ₂ ⁻	9,22
H ₄ P ₂ O ₇ /H ₃ P ₂ O ₇ ⁻	0,85	H ₃ AsO ₃ /H ₂ AsO ₃ ⁻	9,20
H ₃ P ₂ O ₇ ⁻ /H ₂ P ₂ O ₇ ²⁻	1,96	H ₂ AsO ₃ ⁻ /HAsO ₃ ²⁻	13,77
H ₂ P ₂ O ₇ ²⁻ /HP ₂ O ₇ ³⁻	6,54	H ₃ AsO ₄ /H ₂ AsO ₄ ⁻	2,22
HP ₂ O ₇ ³⁻ /P ₂ O ₇ ⁴⁻	8,44	H ₂ AsO ₄ ⁻ /HAsO ₄ ²⁻	6,98
H ₄ P ₂ O ₆ /H ₃ P ₂ O ₆ ⁻	2,39	HAsO ₄ ²⁻ /AsO ₄ ³⁻	11,41
H ₃ P ₂ O ₆ ⁻ /H ₂ P ₂ O ₆ ²⁻	2,81	H ₂ CO ₃ /HCO ₃ ⁻	6,46
H ₂ P ₂ O ₆ ²⁻ /HP ₂ O ₆ ³⁻	7,27	HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ²⁻	10,22
HP ₂ O ₆ ³⁻ /P ₂ O ₆ ⁴⁻	10,03	H ₃ BO ₃ /H ₂ BO ₃ ⁻	9,24
H ₃ PO ₃ /H ₂ PO ₃ ⁻	1,30	H ₂ BO ₃ ⁻ /HBO ₃ ²⁻	12,74
H ₂ PO ₃ ⁻ /HPO ₃ ²⁻	4,70	HBO ₃ ²⁻ /BO ₃ ³⁻	13,80
H ₃ PO ₂ /H ₂ PO ₂ ⁻	2,00	HBO ₂ /BO ₂ ⁻	9,12
H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻	2,12	H ₂ B ₄ O ₇ /HB ₄ O ₇ ⁻	4,00
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	7,23	HB ₄ O ₇ ⁻ /B ₄ O ₇ ²⁻	9,00
HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	12,44	H ₂ CrO ₄ /HCrO ₄ ⁻	0,74
HF/F ⁻	3,14	HCrO ₄ ⁻ /CrO ₄ ²⁻	6,49
HCl/Cl ⁻	<-7	H ₃ AlO ₃ /H ₂ AlO ₃ ⁻	12,20
HBr/Br ⁻	<-9	H ₃ GaO ₃ /H ₂ GaO ₃ ⁻	10,30
HI/I ⁻	<-10	H ₂ GaO ₃ ⁻ /HGaO ₃ ²⁻	11,70
HCNS/CNS ⁻	4,00	H ₂ GeO ₃ /HGeO ₃ ⁻	8,77
HSCN/SCN ⁻	0,5	HGeO ₃ ⁻ /GeO ₃ ²⁻	12,72
HOCN/OCN ⁻	3,92	H ₂ S ₂ O ₃ /HS ₂ O ₃ ⁻	0,66
HCN/CN ⁻	9,14	HS ₂ O ₃ ⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻	1,56
HN ₃ /N ₃ ⁻	4,72	H ₂ SeO ₃ /HSeO ₃ ⁻	2,52
H ₂ SiO ₃ /HSiO ₃ ⁻	9,66	HSeO ₃ ⁻ /SeO ₃ ²⁻	7,30
HSiO ₃ ⁻ /SiO ₃ ²⁻	11,80	H ₂ TeO ₃ /HTeO ₃ ⁻	2,50
H ₄ SiO ₄ /H ₃ SiO ₄ ⁻	9,70	HTeO ₃ ⁻ /TeO ₃ ²⁻	7,70
H ₃ SiO ₄ ⁻ /H ₂ SiO ₄ ²⁻	11,70	H ₂ TeO ₄ /HTeO ₄ ⁻	7,64
H ₂ SiO ₄ ²⁻ /HSiO ₄ ³⁻	12,00	HTeO ₄ ⁻ /TeO ₄ ²⁻	11,19
HSiO ₄ ³⁻ /SiO ₄ ⁴⁻	12,00	H ₃ Fe(CN) ₆ /H ₂ Fe(CN) ₆ ⁻	<1
Cd(H ₂ O) _x ²⁺ /Cd(H ₂ O) _{x-1} OH ⁺	11,70	H ₄ Fe(CN) ₆ /H ₃ Fe(CN) ₆ ⁻	<1
Co(H ₂ O) _x ²⁺ /Co(H ₂ O) _{x-1} OH ⁺	9,60	H ₃ Fe(CN) ₆ ⁻ /H ₂ Fe(CN) ₆ ²⁻	<1

Tabela 18. Wartości pK_a wybranych kwasów nieorganicznych (c.d.)

$\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_x^{3+}/\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^{2+}$	3,20	$\text{H}_2\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}/\text{HFe}(\text{CN})_6^{3-}$	2,20
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}/\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^+$	12,63	$\text{HFe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	4,20
$\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}/\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^+$	11,40	$\text{H}_2\text{MoO}_4/\text{HMoO}_4^-$	1,80
$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_x^{3+}/\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^{2+}$	4,89	$\text{HMoO}_4^-/\text{MoO}_4^{2-}$	4,10
$\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_x^{3+}/\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^{2+}$	4,00	$\text{N}_2\text{H}_6^{2+}/\text{N}_2\text{H}_5^+$	-0,60
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_x^{3+}/\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^{2+}$	2,13	$\text{N}_2\text{H}_5^+/\text{N}_2\text{H}_4$	8,1
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^{2+}/\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{x-2}\text{OH}^+$	3,26	$\text{HONH}_3^+/\text{HONH}_2$	6,10
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}/\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^+$	10,14	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$	9,48
$\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}/\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^+$	9,60	$\text{H}_2\text{SnO}_2/\text{HSnO}_2^-$	12,2
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}/\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}\text{OH}^+$	10,14	$\text{H}_2\text{SnO}_3/\text{HSnO}_3^-$	9,40

Tabela 19. Wartości pK_a wybranych kwasów organicznych

Kwas/zasada sprzężona	pK _a	Kwas/zasada sprzężona	pK _a
Kwas mrówkowy/ mrówczan	3,74	Kwas szczawiowy/ szczawian	1,27
			4,27
Kwas octowy/ octan	4,72	Kwas benzoesowy/ benzoesan	4,18
Kwas trifluorooctowy/ trifluorooctan	0,23	Kwas pikrynowy/ pikrynian	0,71
Kwas chlorooctowy/ chlorooctan	2,83	Kwas askorbinowy/ askorbinian	4,10
			11,79
Kwas dichlorooctowy/ dichlorooctan	1,3	Fenol/ fenolan	10,0
Kwas trichlorooctowy/ trichlorooctan	0,7	Jon pirydyniowy/ pirydyna	5,3
Kwas winowy/ winian	2,98	Jon trimetyloamoniowy/ trimetyloamina	9,9
	4,34		
Kwas wersenowy/ wersenian	2,1	Kwas cytrynowy/ cytrynian	3,1
	2,8		4,8
	6,2		6,4
	10,3		>16