

OSNOVNO O RADU U HEMIJSKOJ LABORATORIJI

Vežbe iz hemije se izvode u studentskim hemijskim laboratorijama čija se oprema razlikuje od istraživačkih laboratorija, utoliko što je znatno jednostavnija. U studentskoj laboratoriji student dobija radno mesto za laboratorijskim stolom, opremljeno potrebnim reagensima i hemijskim posuđem (Slika 1).



Slika 1. Studentska laboratorija na Institutu za hemiju, Medicinskog fakulteta.

Rad u studentskoj hemijskoj i biohemijskoj laboratoriji, budući da podrazumeva kontakt sa različitim hemikalijama i opremom, iako ne nosi opasnost i rizik, zahteva red, disciplinu i poštovanje osnovnih pravila:

- u laboratoriji se ne jede i ne pije
- nikada se ne pipetira ustima; koristi se propipeta
- uvek pažljivo pročitati tekst na etiketama na reagens boci
- posebno obazrivo rukovati sa supstancama na kojima stoje oznake:



eksplozivno



toksično



zapaljivo



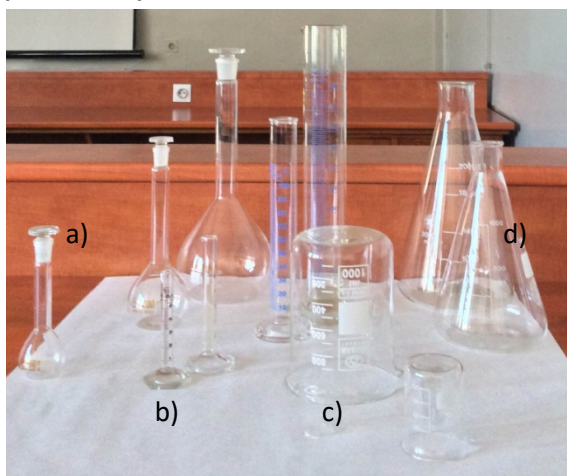
korozivno

Pre početka eksperimentalnog rada treba naučiti odgovarajuće poglavlje iz udžbenika ili iz beležaka sa predavanja i pažljivo proučiti uputstvo za praktični rad. Pri radu se treba pridržavati uputstava i pažljivo beležiti lična zapažanja. Pored praktikuma i knjiga, kao dobar izvor informacija služi i Internet. Mnogi izdavači, univerziteti i istraživačke laboratorije imaju svoje stranice na Internetu na kojima se može naći obilje korisnih informacija. Internet, pored toga, nudi otvoren pristup bazama podataka koje obiluju najrazličitijim

informacijama iz oblasti hemije i biohemije. Tako, na primer, osnovne hemijske tehnike možete naći na adresi: <http://www.dartmouth.edu/~chemlab/techniques>

OSNOVNO LABORATORIJSKO POSUĐE

U hemijskoj laboratoriji se upotrebljava, pre svega stakleno, ali u određenoj meri i plastično posuđe. Staklo mora biti dobrog kvaliteta, što znači otporno na nagle promene temperature, mehaničke udare i delovanje korozivnih hemikalija. Alkalni rastvori nagrizaју staklo, dok su kiseline (izuzev HF) inertne prema staklu. U hemijskoj laboratoriji najčešće se upotrebljavaju: epruvete, čaše, erlenmajeri, normalni sudovi, menzure, pipete, birete, okrugli baloni, eksikator. Laboratorije specijalizovane za određene oblasti hemije/biohemije pored osnovnog poseduju i raznovrsno posuđe pogodno za izvođenje specifičnih reakcija. Na slici 2. je prikazano stakleno laboratorijsko posuđe, koje se sreće u svakoj hemijskoj i biohemijskoj laboratoriji.



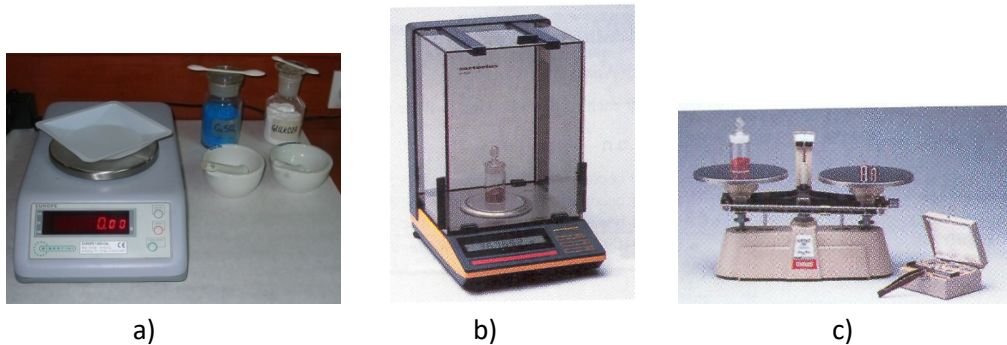
Slika 2. Stakleno laboratorijsko posuđe različitih zapremina: a) normalni sudovi, b) menzure, c) čaše i d) erlenmajeri

Za pravilan tok i uspešan ishod eksperimenta važno je da laboratorijsko posuđe bude hemijski čisto. To se postiže pranjem u detergentu, a zatim ispiranjem česmenskom i destilovanom vodom. Po završetku eksperimenta ostatke (toksične, korozivne...), jednom rečju opasne materije, treba odlagati u, za to namenjene, specijalne kontejnere.

MERENJE

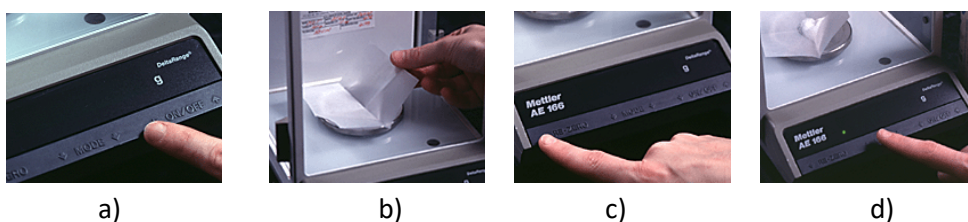
Masa

Hemija kao egzaktna nauka počiva na merenju. U hemijskoj - biohemijskoj laboratoriji merenje mase se vrši na vagama: tehničkim ili decimalnim čija je tačnost 0,01 g i maksimalna masa 1 kg i analitičkim čija je tačnost 0,0001-0,0002 g i koje služe za precizna merenja manjih masa supstance. Tehničke i analitičke vage mogu biti mehaničke i digitalne. Na slici 2. su prikazane digitalna i mehaničke vage: na prvoj se masa očitava na elektronskom displeju, a kod drugih na mehaničkoj skali (slika 3.).



Slika 3. Laboratorijske vage: a) digitalna, b) mehanička sa elektronskim displejem i c) mehanička vaga.

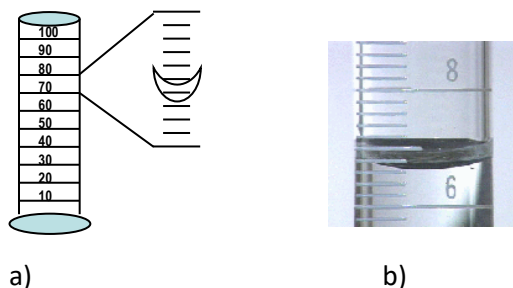
Digitalne vage su sasvim potisnule iz upotrebe mehaničke vage.¹ Postupak merenja na digitalnoj vagi je prikazan na slici 4.



Slika 4. Postupak merenja na digitalnoj vagi: a) vaga se uključuje pritiskom tastera za uključivanje, na displeju se očitava 0.000, b) papir ili posuda za odmeravanje se stavlja na tas, c) tarira se masa pritiskom na taster za tariranje, na displeju se ponovo očitava 0.000, d) a zatim se pažljivo dodaje supstanca do željene mase.

Zapremina

SI jedinica za zapreminu je m^3 . Ova jedinica zapremine je u praktične svrhe zamenjena litrom. Za odmeravanje zapremine tečnosti u hemijskoj/ biohemijskoj laboratoriji upotrebljavaju se menzure, birete, pipete, automatske pipete, mikrobirete i mikrošpricevi. Na slici 5. je prikazano očitavanje zapremine tečnosti u menzuri i bireti.

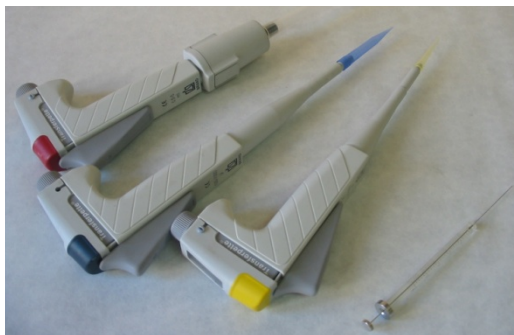


Slika 5. Očitavanje zapremine tečnosti u: a) menzuri i b) bireti.

¹Mehanička vaga predstavlja ravnokraku polugu na čijim krajevima su obešeni tasovi. Postupak merenja na mehaničkoj vagi je sledeći: pre svakog merenja odredi se nulti (ravnotežni) položaj vage i tarira posuda u kojoj se meri. Za merenja se upotrebljavaju tegovi poznate mase. Supstanca koja se meri obično se stavlja na levi tas zakočene vage, a tegovi na desni, vaga se otkoči i odmerava supstanca dok se ne postigne ravnoteža sa odabranim tegom.

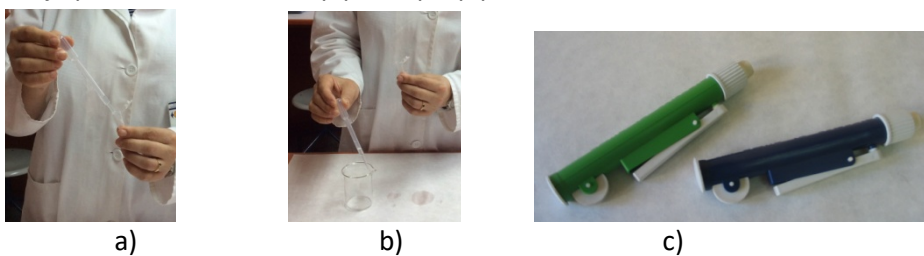
Birete su graduisane staklene cevi koje se na donjem delu završavaju slavinom koja služi za regulisanje isticanja tečnosti u kapima. Mogu biti makro (zapremine 25 ili 50 mL) i mikrobirete (sa izbaždarenim stotim delovima mL).

Pipete služe za dodavanje u kapima (Pasterove i serološke – graduisane odozgo na dole ili bez kalibracije), ili precizno odmeravanje makro (preko 1 mL) ili mikro (manje od 1 mL) zapremine tečnosti. Na slici 6. su prikazane automatske mikropipete i stakleni mikrošpric.



Slika 6. Automatske mikropipete sa promenljivom i fiksnom zapreminom i stakleni mikrošpric.

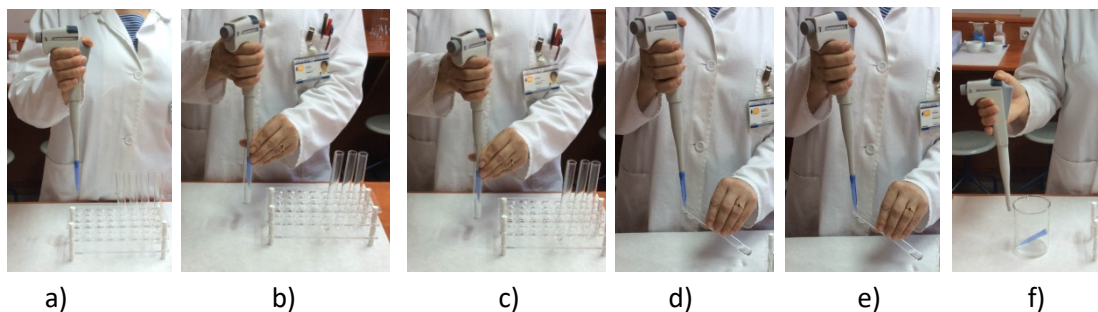
Na slici 7. je prikazana Pasterova pipeta i propipete.



Slika 7. Prenosenje tečnosti Pasterovom pipetom: a) pipetiranje tečnosti iz mikro kivete i b) prenošenje u čašu; c) propipete.

Automatske pipete mogu biti sa fiksnom (npr. 5, 10, 25, 50, 100, 1000 μL) ili promenljivom (npr. 10–50, 200–1000 μL) zapreminom. U radu sa automatskim pipetama koriste se plastični nastavci za jednokratnu upotrebu. Automatske pipete se ne koriste za rad sa isparljivim ili korozivnim tečnostima (kakva je npr. HCl).

Postupak rada sa automatskom pipetom je prikazan na slici 8.

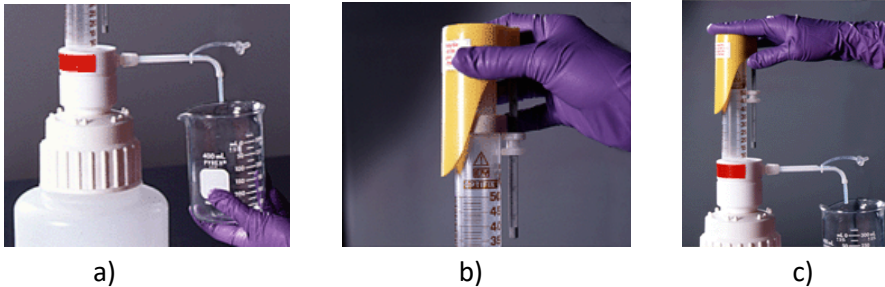


Slika 8. Odmeravanje tečnosti automatskom pipetom: a) klip je potisnut do kraja prvog hoda, b) automatska pipeta se nastavkom uranja u tečnost, c) lagano se otpušta klip i tečnost se usisava, d)

tečnost se izbacuje pritiskanjem klipa do kraja prvog hoda, e) do kraja drugog hoda, i f) izbacuje se nastavak.

U biohemijskim i mikrobiološkim laboratorijama se koriste serološke pipete koje su graduisane odozgo na dole i kojima se odmerava zapremina u celim mL. Mikrošpricevi se koriste za merenje malih zapremina npr. 5–10 μL , (slika 6). Takođe, u kliničkim biohemijskim laboratorijama, gde je potrebno odmeriti veliki broj uzoraka iste zapremine, upotrebljavaju se pipetori, slika 9.

Na slici 9. je prikazan postupak rada sa pipetorom.



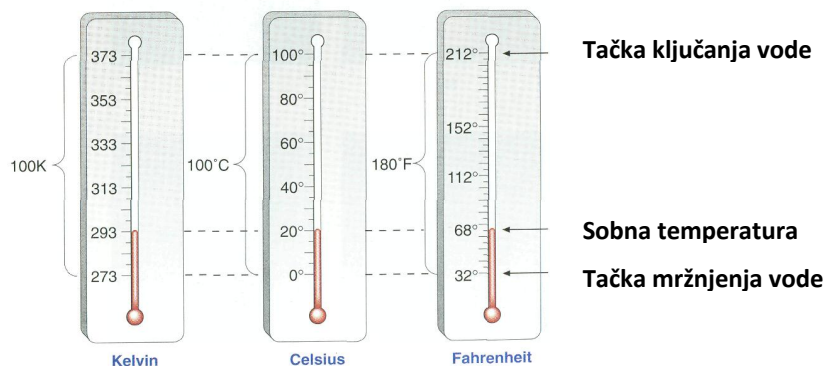
Slika 9. Postupak rada sa pipetorom: a) na baždarnoj skali se podesi zapremina, b) klip pipetora se povuče na gore do svog krajnjeg položaja i c) usisana tečnost se ispušta pritiskom klipa pipetora na dole.

Temperatura

Za merenje temperature su razvijeni različiti instrumenti, ali su u upotrebi najčešće živin i alkoholni termometar. Temperatura se izražava pomoću tri temperaturne skale: Farenhajtove ($^{\circ}\text{F}$), Celzijusove ($^{\circ}\text{C}$) i Kelvinove (K). Za njihovu međusobnu konverziju koriste se jednačine:

$$^{\circ}\text{C} = 5/9 (^{\circ}\text{F} - 32); \quad ^{\circ}\text{F} = 1,8 \times ^{\circ}\text{C} + 32; \quad \text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273,15.$$

Na slici 10. je dat uporedni prikaz Kelvinove, Celzijusove i Farenhajtove temperaturne skale.



Slika 10. Uporedni prikaz mernog opsega Kelvinove, Celzijusove i Farenhajtove temperaturne skale.

PRAVLJENJE RASTVORA

Unutrašnjost ćelije je ispunjena rastvorom različitih biopolimera, kao što su: proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi, kao i malih organskih molekula i elektrolita. Kompleksni biohemijski procesi razgradnje i sinteze biomolekula se najvećim delom odvijaju u vodenoj sredini. Voda kao univerzalni rastvarač, svojom specifičnom strukturom umnogome određuje strukturu, a samim tim i funkciju biomolekula. Voda i vodeni rastvori dakle, predstavljaju osnov za funkcionisanje živih sistema.

Vodeni rastvori imaju široku primenu u svakodnevnoj medicinskoj praksi. Tako npr. postoji čitav niz različitih rastvora za infuziju, kao što su: rastvori ugljenih hidrata i elektrolita, rastvori aminokiselina, osmotski diuretici, plazma ekspanderi itd. Infuzioni rastvori mogu biti različitog sastava, kao npr: fiziološki rastvor (9 g/L NaCl), fiziološki rastvor sa glukozom, rastvori ugljenih hidrata i elektrolita koji služe za unos tečnosti i energije, Hartmanov rastvor (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, laktat) i Ringerov rastvor (Na⁺, K⁺, Ca²⁺iCl⁻).

Rastvori su homogeni, energetski stabilni disperzni sistemi, koji se sastoje od rastvarača i rastvorene supstance.

Po dimenzijama rastvorenih čestica rastvori mogu biti: **pravi**, čije su čestice rastvorene do veličine jona ili molekula, (dimenzije rastvorenih čestica < 1 nm) i **koloidni**, čije čestice mogu biti agregati manjih molekula ili makromolekula dimenzija 1-100 nm. Emulzije i suspenzije predstavljaju **grubo-disperzne sisteme**, u kojima su dimenzije čestica > 100 nm.

Sadržaj rastvorene supstance u rastvoru se može izraziti kao:

1. **Molarnost; količinska koncentracija**– Predstavlja količinu rastvorene supstance u jedinici

$$\text{zapremine rastvora, } c = \frac{n}{V} \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}, \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right)^2$$

2. **Molalnost**– Predstavlja količinu rastvorene supstance u jedinici mase rastvarača,

$$b = \frac{n(\text{rastvorene supstance})}{m(\text{rastvarača})} \left(\frac{\text{mol}}{\text{kg}} \right)$$

3. **Masena koncentracija** – Predstavlja masu rastvorene supstance u jedinici zapremine

$$\text{rastvora, } \gamma = \frac{m}{V} \left(\frac{\text{kg}}{\text{L}}, \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)$$

4. **Masena frakcija, maseni udeo** – Predstavlja odnos mase rastvorene supstance i ukupne

$$\text{mase rastvora, } w_A = \frac{m_A}{\sum m_i}$$

²U medicini se koristi mol/L

5. **Molska frakcija, količinska frakcija**, - Predstavlja odnos količine rastvorene supstance ili rastvarača i količine svih supstanci u rastvoru, $\chi = \frac{n_A}{\sum n_A}$

6. **Osmolarnost** predstavlja broj molova osmotski aktivnih čestica (osmola) u jedinici zapremine, odnosno koncentraciju osmotski aktivnih čestica i izražava se u osmol/L. Broj osmola izračunava se kao: $n \times i$, gde je i Van't Hoffov korekcionni faktor, koji se definiše kao: $i = \frac{\text{aktuelni broj čestica u rastvoru nakon disocijacije}}{\text{ukupno unet broj čestica}}$. i zavisi od koncentracije elektrolita i uvek je veće od 1, a za rastvore neelektrolita $i=1$.

Tako se u rastvoru neelektrolita (npr. glukoze) koncentracije 0,1 mol/L nalazi 0,1 osmol/L, dok se u rastvoru elektrolita NaCl iste koncentracije, za koji je $i=1,85$ nalazi 0,185 osmol/L ($c = 0,1 \times 1,85 = 0,185$ osmol/L).

PRAVLJENJE RASTVORA ODREĐENE KONCENTRACIJE

Rastvorisemogupripremitidirektnimodmeravanjem čvrstih supstanci i rastvaranjem u potrebnoj zapremini odgovarajućeg rastvarača. Međutim, u hemijskim i biohemijskim laboratorijama rastvori se mnogo češće prave polazeći od već pripremljenog, koncentrovanog rastvora (stock) jednostavnim razblaživanjem. U biohemiji se obično koriste supstance visoke čistoće i voda visokog kvaliteta (destilovana, dejonizovana, bidestilovana). Za izvođenje biohemijskih eksperimenata i tragovi nečistoća u supstancama, od kojih se priprema rastvor, mogu biti kritični.

1) Pravljenje rastvora odmeravanjem čvrste supstance

Primer

Koliko je grama glukoze potrebno za pripremanje 250 mL rastvora koncentracije 0,05 mol/L (M_r glukoze - 180)? Izračunati masenu koncentraciju rastvora.

Iz količinske koncentracije 0,05 mol/L izračunava se broj molova glukoze u 250 mL rastvora:

1000 mL rastvora sadrži 0,05 mola

250 mL rastvora sadrži 0,0125 mola

Masa 0,0125 mola glukoze izračunava se iz mase 1 mola glukoze (180 g):

1 mol glukoze je 180 g

0,0125 mola glukoze je 2,25 g $m = 2,25$ g glukoze

Potrebno je izmeriti 2,25 g glukoze, rastvoriti u vodi i preneti u normalni sud od 250 mL

Masena koncentracija datog rastvora se izračunava iz sledeće formule:

$$\gamma = c \times M = 0,05 \times 180 = 9 \text{ g/L}$$

Supstance za pravljenje rastvora:

Glukoza (M_r -180)

KMnO₄ (M_r -158)

NaCl (M_r -58,5)

Postupak

Kada se pravi rastvor odmeravanjem čvrste supstance potrebno je čvrstu supstancu prethodno usitniti u porcelanskom avanu (da bi se njeno rastvaranje ubrzalo), a zatim se izračunata masa supstance odmeri u čaši. Za odmeravanje supstance koristi se tehnička ili analitička vaga. Odmerena supstanca se rastvori u malo vode i pažljivo prenese (niz štapić kroz levak) u normalni sud. Čaša se ispira više puta sa dest. vodom, pažljivo prenosi u normalni sud, niz štapić (kvantitativno prenošenje) i normalni sud pažljivo dopuni dest. vodom do obeležene crte. Normalni sud se zatvori i promućka, da bi rastvor bio homogen.

2) Pravljenje rastvora razblaživanjem postojećeg rastvora poznate koncentracije

Polazni rastvori:

Glukoza - 0,5 mol/L i 1 mol/L

NaCl - 1,5 mol/L

Primer1.

Napraviti 50 mL rastvora glukoze koncentracije 5 mmol/L polazeći od rastvora koncentracije 0,5 mol/L.

Za 50 mL rastvora glukoze koncentracije 5 mmol/L je potrebno $0,05 \text{ L} \times 5 \text{ mmol/L} = 0,25 \text{ mmol}$

Polazni rastvor je koncentracije 0,5 mol/L = 500 mmol/L. Izračunatih 0,25 mmol glukoze, koliko je potrebno za pravljenje rastvora koncentracije 5 mmol/L se nalazi u:

$$1000 : 500 = x : 0,25$$

$$x = 0,5 \text{ mL} = 500 \text{ } \mu\text{L} \text{ polaznog rastvora koncentracije } 0,5 \text{ mol/L.}$$

Potrebna zapremina se može izračunati i korišćenjem obrasca: $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$, gde oznaka 1 u indeksu odgovara rastvoru koji treba napraviti (u datom primeru $c_1 = 5 \text{ mmol/L}$ i $V_1 = 50 \text{ mL}$) a oznaka 2 u indeksu, polaznom rastvoru ($c_2 = 0,5 \text{ mol/L}$ tj. 500 mmol/L, V_2 - nepoznato). Nepoznata (potrebna) zapremina je $V_2 = (c_1 \times V_1) : c_2$, i u datom primeru je $V_2 = (5 \text{ mmol/L} \times 50 \text{ mL}) : 500$ i iznosi 0,5 mL tj. 500 μL .

Postupak

Automatskom pipetom se odmeri 500 μL polaznog rastvora direktno u pripremljeni normalni sud i dopuni dest. vodom do crte. Zatim se normalni sud zatvori i promućka, da bi se dobio homogen rastvor.

Polazni rastvori:

Glukoza - 0,05 mol/L i 5 g/L

KMnO₄ - 0,3 mol/L i 5 g/L

NaCl - 1,5 mol/L i 9 g/L

Primer 2.

Koliko je potrebno mililitara rastvora NaCl koncentracije $\gamma = 11,7 \text{ g/L}$ da se napravi 250 mL rastvora koncentracije $c = 0,01 \text{ mol/L}$? (Na-23; Cl-35,5)

Izračunava se količina supstance (broj molova) koja se nalazi u zapremini od 250 mL rastvora koncentracije $c = 0,01 \text{ mol/L}$:

1000 mL rastvora sadrži 0,01 mol

250 mL rastvora sadrži 0,0025 mol

Zatim se izračunava masa potrebnih 0,0025 mol:

1 mol NaCl ima 58,5 g

0,0025 mola NaCl je 0,15 g

Da bi se pripremilo 250 mL rastvora $c = 0,01 \text{ mol/L}$ polazeći od rastvora $\gamma = 11,7 \text{ g/L}$ treba odmeriti zapreminu u kojoj se nalazi 0,15 g NaCl:

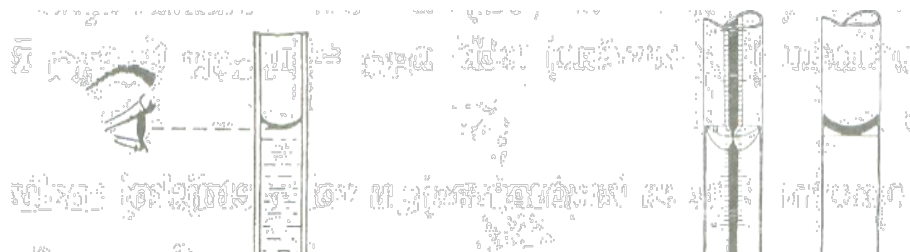
1000 mL rastvora sadrži 11,7 g

x mL rastvora sadrži 0,15 g

$$x = 12,5 \text{ mL NaCl}$$

Postupak

U biretu pomoću levka sipati "stock" rastvor, skloniti levak i podesiti nivo rastvora u bireti, najbolje do nekog celog podeoka (slika 3). Biretom se odmeri određena zapremina rastvora direktno u pripremljeni normalni sud i dopuni dest. vodom do crte. Zatim se normalni sud zatvori i promućka, da bi se dobio homogen rastvor.



Slika 3: Očitavanje birete: Schelbach-ova (uočiti položaj tačke nastale kao presek plave trake u odnosu na podeoke na bireti) i Mohr-ova bireta (položaj donjeg nivoa rastvora u odnosu na podeoke na bireti).

Za sva potrebna izračunavanja pri pripremanju rastvora, danas mogu da se koriste gotovi softverski paketi, čije su adrese dostupne na internetu, npr:

<http://www.topshareware.com/Chemical-Reagent-Calculator-download-17295.htm>

Literatura:

- Bloomfield M.M., Stephens L.J., **Chemistry and the Living Organism** (sixth edition) John Wiley and Sons, New York, 1996
- Dražić A., Dimitrijević N., Vujović Z., Karadžić I., Šljivar-Bročić S, **Priručnik za vežbe iz hemije**, Conit, Beograd, 2001