

SLOVENSKÁ KOMISIA CHEMICKEJ OLYMPIÁDY

CHEMICKÁ OLYMPIÁDA

61. ročník, školský rok 2024/2025

Kategória EF

Domáce kolo

ÚLOHY Z PRAXE

ÚLOHY Z ANALYTICKEJ PRAXE

Chemická olympiáda – kategória EF – 61. ročník – šk. rok 2024/2025

Študijné kolo

Matúš Tomášik

Maximálne 100 pomocných bodov = 50 bodov

Doba riešenia: bez časového obmedzenia

Sacharidy sú najrozšírenejšou zložkou potravy. V závislosti od druhu potravinárskych produktov je ich obsah rôzny. V potravinách sa vyskytuje široká škála sacharidov, od monosacharidov až po polysacharidy. Zo štruktúrneho hľadiska sacharidy môžeme definovať ako polyhydroxyaldehydy, resp. polyhydroxyketóny. Prakticky všetky monosacharidy a niektoré disacharidy alebo oligosacharidy sú redukujúcimi sacharidmi, čo znamená, že vo svojej štruktúre obsahujú voľnú karbonylovú skupinu, čo umožňuje ich správanie sa ako redukčných činidiel. Túto vlastnosť sacharidov využívajú gravimetrické a titračné metódy, založené na nestechiometrických redukciách oxidačných činidiel. Najvhodnejším oxidačným činidlom sú alkalické roztoky meďnatých iónov, ktoré sa pri zvýšenej teplote pôsobením redukujúcich sacharidov redukujú na oxid meďný. Jednotlivé titračné metódy sa líšia okrem presne definovaných podmienok redukcie aj spôsobom stanovenia vyredukovaného oxidu meďného. V 61. ročníku chemickej olympiády sa budeme zaoberať tromi konkrétnymi titračnými metódami:

- Metódou podľa Luffa–Schoorla, ktorá je založená na jodometrickom stanovení nezreagovaného nadbytku meďnatej soli,
- Metódou podľa Potterata–Eschmanna, založenou na komplexometrickom stanovení vyredukovaného oxidu meďného,
- Metódou podľa Bertranda, ktorá je založená na manganometrickom stanovení vylúčeného oxidu meďného.

Sacharidy sa okrem redukčných vlastností vyznačujú aj optickou aktivitou, čo využívajú inštrumentálne metódy ako polarimetria a refraktometria. Týmito metódami sa v rámci jednotlivých kôl budeme zaoberať v doplnkových úlohách, ako aj v úlohách z praxe. Z inštrumentálnych metód sa na stanovenie sacharidov využíva aj spektrofotometria, ktorá sa vyznačuje pomerne veľkou citlivosťou. Medzi spektrofotometrické metódy môžeme zaradiť metódy založené na redukčných účinkoch cukrov alebo metódy založené na farebných reakciách derivátov furánu. V súčasnej analytickej praxi sú významnými aj tzv. enzýmové metódy stanovenia cukrov, ktoré využívajú vhodné enzýmy ako analytické činidlá.

Cieľom jednotlivých kôl 61. ročníka chemickej olympiády bude stanoviť celkový obsah cukrov a obsah sacharózy v potravinovej vzorke. Nakoľko sacharóza nie je redukujúcim sacharidom, pred titračným alebo gravimetrickým stanovením je potrebné ju rozštiepiť na monosacharidy glukózu a fruktózu. Hydrolytické štiepenie alebo inverziu možno previesť dvomi spôsobmi, a to kyslou alebo enzymatickou hydrolyzou. V rámci enzymovej hydrolyzy bude úlohou stanoviť aktivitu použitého enzymového preparátu a vykonať vlastné stanovenie sacharózy po inverzii. V doplnkových úlohách sa budeme venovať výpočtom enzymovej aktivity na základe kinetických parametrov Michaelis–Mentenovej kinetického modelu.

Riešenie úloh študijného kola ponúka množstvo príležitostí na osvojenie si zručností laboratórnej techniky a vedomostí potrebných pre úspešné absolvovanie vyšších súťažných kôl. Dôležitou zručnosťou je aj tzv. time management, teda vhodná voľba poradia riešenia jednotlivých úloh a efektívne zhodnotenie dostupného časového fondu na riešenie daných problémov.

Pri riešení jednotlivých úloh, ako aj pri príprave na vyššie súťažné kolá dôrazne odporúčam pracovať s uvedenými literárnymi zdrojmi, ako aj s autorským riešením.

Náplňou úloh študijného kola je:

- *stanoviť celkový obsah sacharidov a obsah sacharózy vo vzorke sušených datlí metódou podľa Luffa–Schoorla,*
- *stanoviť celkový obsah sacharidov a obsah sacharózy vo vzorke sušených datlí gravimetrickou metódou,*
- *stanoviť aktivitu zriedeného enzymového preparátu INVERTOFIX® a enzymový preparát aplikovať pri inverzii sacharózy prítomnej vo vzorke.*

Odporúčaná literatúra:

Príbela A., *Analýza prírodných látok v požívatinách*, Bratislava: Alfa, 1978. ISBN 63-008-77

Davídek J. a kol., *Laboratorní příručka analýzy potravin*, Praha: SNTL, 1977. ISBN 04-830-77

Šandera K., Sázaravský V., *Analytika cukrů: metodické základy a laboratorní příručka*, Praha: SNTL, 1959. Řada potravinářské literatury.

Čermáková L. a kol., *Analytická chemia 1 pre 3. ročník SPŠCH študijného odboru analytická chemia*, Bratislava: Alfa, 1986. ISBN 63-435-86.

Brandšteterová A., Loffayová S., *Analytická chemia pre 1. ročník študijného programu potravinárska výroba*, Bratislava: EXPOL pedagogika, 2004.

Koplić R., *Prednášky z predmetu: Základy analýzy potravin*, prednáška 9., On-line dostupné na https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stB3_1.pdf.

K dispozícii sú nasledovné chemické látky a roztoky:

- tuhý jodid draselný, p.a.,
- tuhý pentahydrát tiosíranu sodného, p.a.,
- tuhý jodičnan draselný, p.a.,
- roztok kyseliny sírovej ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$),
- rozpustný škrob, p.a.,
- vodný roztok etanolu ($w = 0,80$),
- Carrezov roztok I (vodný roztok hexakynožeľeznatanu draselného),
- Carrezov roztok II (vodný roztok síranu zinočnatého),
- roztok kyseliny octovej (4 : 1),
- zásobný roztok sacharózy ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$),
- acetátový tlmivý roztok $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (pH 4,8; $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$),
- D-fruktóza, p.a.,
- D-glukóza, p.a.,
- zriedený enzýmový preparát INVERTOFIX® (1 : 9),
- reagentia s kyselinou 3,5-dinitrosalicylou (roztok DNS v hydroxide sodnom s prídavkom tetrahydrátu vínanu draselného-sodného),
- Luffov–Schoorlov roztok (roztok síranu meďnatého, bezvodého uhličitanu sodného a kyseliny citrónovej),
- koncentrovaná kyselina chlorovodíková, p.a.,
- roztok hydroxidu sodného ($c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$),
- Fehlingov roztok I (vodný roztok pentahydrátu síranu meďnatého),
- Fehlingov roztok II (vodný roztok vínanu draselného-sodného a hydroxidu sodného),
- etanol, p.a.,
- dietyléter, p.a.

Tab. 1 Identifikácia nebezpečnosti použitých látok a zmesí podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (CLP).

Názov chemikálie	H vety	P vety
Jodid draselný	H372	P270
Tiosíran sodný, pentahydrát	Látka nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Jodičnan draselný	H272, H302, H319	P210, P220, P280, P301+P312, P305+P351+P338
Kyselina sírová, roztok	H290, H314	P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P308+P311
Škrob, rozpustný	Látka nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Etanol, roztok ($w = 0,80$)	H225, H319	P210, P233, P305+P351+P338
Etanol ($w = 0,96$)	H225, H319	P210, P233, P305+P351+P338
Carrezov roztok I	H318, H412	P273, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Carrezov roztok II	Zmes nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Kyselina octová, roztok	Zmes nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Sacharóza, roztok	Látka nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
D-glukóza	Látka nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
D-fruktóza	Látka nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Acetátový tlmivý roztok ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$)	Zmes nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Enzýmový preparát INVERTOFIX®	Zmes nespĺňa kritériá pre	klasifikáciu v súlade s nariadením č. 1272/2008/ES.
Kyselina 3,5-dinitrosalicylá	H302, H318	P280, P301+P312, P305+P351+P338
Luffov–Schoorlov roztok	H319, H411	P273, P280, P305+P351+P338, P337+P313, P501
Kyselina chlorovodíková ($w = 0,37$)	H290, H314, H335	P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310
Hydroxid sodný, roztok	H290, H314	P260, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310
Fehlingov roztok I	H318, H410	P273, P280, P305+P351+P338, P310, P391
Fehlingov roztok II	H290, H314	P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310
Dietyléter	H224, H302, H336	P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P312, P403+P235

Úloha A: Príprava roztokov a stanovenie ich presnej koncentrácie

Úloha A1: Príprava roztokov

- A1.1. Vypočítajte množstvo pentahydrátu tiosíranu sodného potrebné na prípravu 250 cm³ odmerného roztoku o približnej koncentrácii $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Odmerný roztok následne pripravte navážením a rozpustením vypočítaného množstva $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ v deionizovanej vode a doplnením odmernej banky po značku.
- A1.2. Navážením presne asi 0,143 g jodičnanu draselného pripravte 200 cm³ štandardného roztoku KIO_3 . Vypočítajte presnú koncentráciu jódu v tomto roztoku, ktorý sa vylúči v nadbytku KI v kyslom prostredí. Zapíšte stechiometrickú rovnicu tohto deja v iónovom tvare.
- A1.3. Pripravte škrobový maz rozpustením 0,5 g škrobu v 100 cm³ studenej deionizovanej vody. Roztok povarte asi 2 minúty. Po vychladnutí roztok škrobu prelejte do nádoby z tmavého skla. Pripravený roztok uchovávajte v chladničke.

Úloha A2: Stanovenie presnej koncentrácie odmerného roztoku tiosíranu sodného

- A2.1. Do jódovej banky pipetujte 50,0 cm³ štandardného roztoku KIO_3 , ktorý ste pripravili v úlohe A1.2. K roztoku v banke pridajte asi 0,5 g tuhého jodidu draselného. Po úplnom rozpustení KI pridajte odmerným valcom 5 cm³ roztoku kyseliny sírovej ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$). Vylúčený jód ihneď titrujte odmerným roztokom tiosíranu sodného do žltého sfarbenia. Potom ku zmesi pridajte 1 cm³ škrobového mazu a ďalej titrujte do vymiznutia modrého sfarbenia. Vykonajte potrebný počet paralelných stanovení.
- A2.2. Na základe nameraných hodnôt vypočítajte presnú koncentráciu odmerného roztoku tiosíranu sodného. Do odpovedového hárka zapíšte rovnicu deja prebiehajúceho pri štandardizácii.

Úloha B: Príprava vzorky sušených datlí na stanovenie cukrov

Pred samotným stanovením je potrebné cukry obsiahnuté v analyzovanom materiáli kvantitatívne previesť do roztoku. Na izoláciu sacharidov sa najčastejšie používa extrakcia kvapalným rozpúšťadlom. Najčastejšie používanými extrakčnými činidlami sú deionizovaná voda a 80 %ný vodný roztok etanolu.

Okrem cukrov však do roztoku prechádzajú aj ďalšie indiferentné látky, ktoré by potenciálne mohli ovplyvniť stanovenie. Tieto sa najčastejšie odstraňujú tzv. čírením. Podľa povahy odstraňovaných látok, ako aj metódy stanovenia sacharidov sa používa niekoľko spôsobov čírenia vzorky. Medzi najpoužívanejšie patrí čírenie soľami ťažkých kovov, ako napríklad čírenie neutrálnym alebo zásaditým octanom olovnatým alebo čírenie podľa Carreza. Častokrát sa na čírenie cukorných roztokov používajú aj vhodné adsorbenty, ako napríklad aktívne uhlie, či vhodné zmesi ionexov.

Úloha B1: Extrakcia sacharidov do kvapalnej fázy

- B1.1. Na homogenizáciu odoberte z balenia niekoľko kusov sušených datlí a zbavte ich kôstok. Odkôstkované datle následne dôkladne zhomogenizujte v mixéri alebo v trecej miske.
- B1.2. Z takto pripravenej reprezentatívnej vzorky odvážte do 150 cm³ kadičky približne 5 g s presnosťou na dve desatinné miesta. Presnú hmotnosť vzorky zapíšte do odpovedového hárka.
- B1.3. K návažku pridajte pomocou odmerného valca 100 cm³ 80 %ného etanolu a kadičku prikryte hodinovým sklíčkom. Za občasného miešania vzorku extrahujte pri laboratórnej teplote 1 hodinu.
- B1.4. Po uplynutí predpísaného času zostavte aparatúru na jednoduchú filtráciu a kvapalný podiel dekantujte cez hladký filter do 250 cm³ odmernej banky označenej nápisom „extrakt“.
- B1.5. Tuhý podiel v kadičke, ako aj tuhý podiel zachytený na filtri kvantitatívne preneste do 250 cm³ varnej banky s guľatým dnom pomocou ďalších 100 cm³ 80 %ného etanolu. Na hrdlo banky nasadíte spätný chladič a banku zahrievajte na vriacom vodnom kúpeli, resp. v ohrevnom hniezde po dobu 1 hodiny.
- B1.6. Po ukončení extrakcie nechajte obsah banky vychladnúť na laboratórnu teplotu. Zmes v banke následne prefiltrujte cez hladký filter, pričom filtrát (etanolový extrakt) zachytávajúce do 250 cm³ odmernej banky označenej nápisom „extrakt“.
- B1.7. Spojené etanolové extrakty z bodov B1.4 a B1.6 v odmernej banke doplňte po značku 80 %ným etanolom.

Úloha B2: Príprava a čírenie roztoku vzorky

- B2.1. Z etanolového extraktu, ktorý ste pripravili v úlohe B1 odpipetujte 20,0 cm³ do porcelánovej odparovacej misky. Porcelánovú misku zahrievajte na vodnom kúpeli do odparenia etanolu. Zahustený extrakt nechajte na porcelánovej miske vychladnúť na laboratórnu teplotu.
- B2.2. Vychladnutý odparok kvantitatívne preneste pomocou 100 cm³ deionizovanej vody do 250 cm³ kadičky. Obsah kadičky následne zahrejte na teplotu 80 °C. Teplotu kontrolujte teplomerom. Po dosiahnutí predpísanej teploty zahrievanie ukončíte a obsah kadičky nechajte vychladnúť. (*Pozn.: Týmto krokom sa dosiahne vyvrážanie rozpustených balastných látok prítomných vo vzorke*).
- B2.3. Po vychladnutí roztoku v kadičke skontrolujte jeho pH pomocou univerzálneho indikátorového papierika. V prípade, ak je pH neutrálne alebo zásadité, upravte ho pár kvapkami (4 – 5 kvapiek) kyseliny octovej zriedenej v pomere 4 : 1 na mierne kyslé.

- B2.4. Po úprave pH k roztoku v kadičke pridajte po kvapkách za stáleho miešania najskôr 5 cm³ Carrezovho roztoku I a následne 5 cm³ Carrezovho roztoku II.
- B2.5. Zostavte aparatúru na jednoduchú filtráciu pri atmosférickom tlaku a zrazeninu prefiltrujte cez hladký filter. Zrazeninu na filtri niekoľkokrát premyte deionizovanou vodou, pričom **všetky podiely filtrátu zachytávajúte do odmernej banky o objeme 200 cm³**. Po ukončení filtrácie obsah banky doplňte po značku deionizovanou vodou a starostlivo zhomogenizujte.

Úloha C: Určenie aktivity enzýmového prípravku INVERTOFIX®

Enzýmy sú makromolekulové látky bielkovinovej povahy, schopné katalyzovať chemické reakcie. Na rozdiel od chemických katalyzátorov sa enzýmy vyznačujú vysokou špecificitou (reakčnou i substrátovou) a vysokou katalytickou silou (aktivitou). Enzýmová aktivita je mierou urýchlenia reakcie katalytickým pôsobením enzýmu. Je to teda rýchlosť enzýmovej reakcie, ktorá sa pri štandardných podmienkach, t. j. optimálnom pH, optimálnej teplote a pri plnom nasýtení enzýmu substrátom ($c_S \gg K_M$), rovná maximálnej rýchlosti enzýmovej reakcie v_{max} . Špecifická enzýmová aktivita predstavuje aktivitu vzťahnutú na jednotkové množstvo enzýmového preparátu (1 kg suchého enzýmového preparátu alebo 1 l kvapalného enzýmového preparátu).

Invertáza (syst. β -fruktofuranozidáza, EC 3.2.1.26) je enzým patriaci do triedy hydroláz, ktorý katalyzuje hydrolytické štiepenie sacharózy za vzniku ekvimolárneho množstva glukózy a fruktózy. Výsledný produkt, teda zmes glukózy a fruktózy v pomere 1 : 1, sa častokrát nazýva aj invertný cukor. Hydrolýza sacharózy sa označuje tiež ako inverzia. Prvýkrát na možnosť použitia invertázy pri stanovení cukrov poukázal už v roku 1881 dánsky chemik J. Kjeldahl. Neskôr sa zistilo, že s invertázou možno pracovať kvantitatívne, čo pri analýze melás a ďalších cukrovarníckych produktov využili Ling a Baker.

Úloha C1: Sledovanie priebehu enzýmovej reakcie pri rôznych začiatočných koncentráciách substrátu

- C1.1. Do troch Eppendorfových skúmaviek (2 ml) označených číslami 1 až 3 pipetujte po 200 μ l acetátového tlmivého roztoku (CH₃COOH/CH₃COONa; pH 4,8; $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) a 10 μ l enzýmového preparátu INVERTOFIX® zriedeného v pomere 1 : 9 deionizovanou vodou. Pridajte predpísaný objem deionizovanej vody podľa tabuľky Tab. 2.
- C1.2. Enzýmovú reakciu spustíte prídavkom predpísaného množstva zásobného roztoku substrátu (roztok sacharózy s približnou koncentráciou $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$), skúmavku uzavrite a reakčnú zmes dôkladne pretrepte. Po prídavku substrátu ihneď začnite merať reakčný čas stopkami ($t_{R,start}$)!

Tab. 2 Príprava reakčných zmesí pre stanovenie enzýmovej aktivity.

Objem [μl]	1	2	3
Acetátový tlmivý roztok (pH 4,8; $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$)	200	200	200
Enzýmový preparát (1:9)	10	10	10
Deionizovaná voda	170	150	30
Substrát ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$)	580	600	720

- C1.3. Po uplynutí približne 30 minút reakciu zastavte povarením reakčných zmesí pri teplote $100 \text{ }^\circ\text{C}$ asi 5 minút. Meranie reakčného času sa preruší v momente vloženia skúmavky do vriaceho vodného kúpeľa ($t_{R,stop}$). Vypočítajte presnú dĺžku reakčného času t_R odčítaním hodnoty $t_{R,štart}$ od hodnoty $t_{R,stop}$ pre každú enzýmovú reakciu.
- C1.4. Enzýmovú reakciu pre každú počiatočnú koncentráciu substrátu uskutočnite aspoň trikrát. Vypočítané hodnoty reakčných časov zapíšte do odpovedového hárka a vypočítajte presné počiatočné koncentrácie sacharózy v jednotlivých reakčných zmesiach. Zapíšte stechiometrickú rovnicu hydrolýzy sacharózy účinkom invertázy.
- Aby sa zabránilo vplyvu nečistôt a sacharidov prítomných v enzýmovom preparáte na presnosť stanovenia, je potrebné vykonať kontrolné stanovenie ku každej enzýmovej reakcii uskutočnenej pri určitej počiatočnej koncentrácii substrátu. Jednotlivé kontrolné stanovenia vykonajte podľa postupu uvedeného v nasledujúcich bodoch.
- C1.5. Do troch 2 ml Eppendorfových skúmaviek pipetujte po 200 μl acetátového tlmivého roztoku a objemy deionizovanej vody a zásobného roztoku substrátu predpísané v tabuľke Tab. 2. Zmes v každej skúmavke dôkladne premiešajte a nechajte inkubovať približne 30 minút pri laboratórnej teplote.
- C1.6. Po 30 minútach zmesi 5 minút povarte na vriacom vodnom kúpeli pri teplote $100 \text{ }^\circ\text{C}$.
- C1.7. Inaktivujte potrebný objem zriedeného enzýmového preparátu povarením na vriacom vodnom kúpeli po dobu 5 minút pri teplote $100 \text{ }^\circ\text{C}$.
- C1.8. K vychladeným reakčným zmesiam pipetujte po 10 μl zriedeného inaktivovaného enzýmového preparátu.

Úloha C2: Stanovenie koncentrácie produktov enzýmovej reakcie metódou podľa Millera

- C2.1. Pripravte 100 cm^3 štandardného roztoku redukujúcich sacharidov s koncentráciou $c = 9 \text{ mg cm}^{-3}$ rozpustením 450 mg D-fruktózy a 450 mg D-glukózy v cca 50 cm^3 deionizovanej vody a doplnením objemu roztoku v odmernej banke po značku.
- C2.2. Pripravte sadu kalibračných roztokov pipetovaním objemov uvedených v tabuľke Tab. 3 do 2 ml Eppendorfových skúmaviek. Ku každému roztoku pridajte po 160 μl

reagencie s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (DNS). Roztoky dôkladne premiešajte a inkubujte na vriacom vodnom kúpeli 5 minút pri teplote 100 °C.

Tab. 3 Príprava kalibračných roztokov na stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Millera.

Objem [μl]	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Štandardný roztok RS (9 mg cm ⁻³)	0	1	2	4	8	12	16	20	24	28
Deionizovaná voda	0	39	38	36	32	28	24	20	16	12
DNS	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160

- C2.3. Po ochladení k jednotlivým roztokom pridajte po 1,6 cm³ deionizovanej vody a zmesi dôkladne premiešajte. Zmerajte absorbanciu jednotlivých kalibračných roztokov pri vlnovej dĺžke 540 nm oproti zmesi deionizovanej vody a DNS (blanku). Každé meranie opakujte trikrát, pričom do odpovedového hárka zapíšte priemernú hodnotu týchto meraní. Vypočítajte presné koncentrácie kalibračných roztokov vzhľadom k celkovému objemu reakčnej zmesi 1,8 cm³.
- C2.4. Z nameraných údajov zostrojte kalibračnú závislosť (v aplikácii MS Excel alebo na milimetrový papier), ako závislosť absorbancie na koncentrácii redukujúcich sacharidov.
- C2.5. Z vychladnutých reakčných zmesí pripravených v úlohe C1 pipetujte do 2 ml Eppendorfových skúmaviek po 2 μl. Upravte objem na 40 μl prídavkom deionizovanej vody a pridajte po 160 μl reagencie s DNS. Roztoky inkubujte na vriacom vodnom kúpeli 5 minút pri teplote 100 °C. Po ochladení pridajte po 1,6 cm³ deionizovanej vody a zmerajte absorbanciu pri 540 nm oproti blanku. Každé meranie opakujte trikrát a do odpovedového hárka zapíšte priemernú hodnotu týchto meraní.
- C2.6. V prípade kontrolných reakčných zmesí sa absorbancia zmeria rovnakým spôsobom, aký je opísaný v predošlom bode.
- C2.7. Z kalibračnej krivky odčítajte koncentrácie redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele reakčnej zmesi odobratom na stanovenie. Vypočítajte presnú koncentráciu produktu inverzie v pôvodnom objeme reakčnej zmesi v mol dm⁻³, pričom od výsledku odčítajte výsledok kontrolného stanovenia.

Úloha C3: Výpočet špecifickej enzýmovej aktivity enzýmového preparátu INVERTOFIX®

- C3.1. Pre každú enzýmovú reakciu vypočítajte množstvo zreagovaného substrátu (sacharózy) vzhľadom na objem reakčnej zmesi, ekvivalentné stanovenej koncentrácii produktu. Vychádzajte zo stechiometrie prebiehajúceho deja.
- C3.2. Pre každú enzýmovú reakciu vypočítajte špecifickú aktivitu enzýmového preparátu podľa vzťahu

$$EA_s = \frac{c_{S,r} \cdot V_{RZ}}{t_R \cdot V_{EP}} \cdot 10$$

- kde EA_s je špecifická aktivita enzýmového preparátu v $\text{mol min}^{-1} \text{dm}^{-3}$,
 $c_{S,r}$ je koncentrácia zreagovaného množstva substrátu v mol dm^{-3} ,
 t_R je reakčný čas v min,
 V_{RZ} je objem reakčnej zmesi v dm^3 ,
 V_{EP} je objem pridaného enzýmového preparátu v dm^3 .

Násobenie desiatimi zohľadňuje 10-násobné riedenie pôvodného enzýmového preparátu. Výsledná špecifická aktivita enzýmového preparátu INVERTOFIX® sa určí ako aritmetický priemer vypočítaných hodnôt pre jednotlivé stanovenia.

Úloha D: Stanovenie obsahu sacharidov vo vzorke sušených datlí

Úloha D1: Stanovenie množstva redukujúcich sacharidov pred inverziou metódou Luffovou–Schoorlovou

- D1.1. Do Erlenmayerovej banky s objemom 250 cm^3 pipetujte $25,0 \text{ cm}^3$ Luffovo–Schoorlovho roztoku a $25,0 \text{ cm}^3$ vyčíreného roztoku vzorky pripraveného v úlohe B2.
- D1.2. Ku zmesi v kuželovej banke pridajte niekoľko varných kamienkov a roztok počas 2 – 3 minút privedte k varu. Mierny var udržiajte presne 10 minút (čas merajte stopkami). Aby sa zabránilo odparovaniu reakčnej zmesi, do hrdla banky vložte malý sklenený lievik.
- D1.3. Po uplynutí 10 minút var okamžite prerušte ochladením reakčnej zmesi pod prúdom studenej vody. Reakčnú zmes ďalej chladte vo vodnom kúpeli na laboratórnu teplotu.
- D1.4. K ochladenej reakčnej zmesi pridajte približne 3 g tuhého jodidu draselného a 20 cm^3 roztoku kyseliny sírovej ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$). *Pozn.: Vzhľadom k búrlivému vývoju oxidu uhličitého je roztok kyseliny potrebné pridávať postupne po malých množstvách!*
- D1.5. Po vylúčení jódu reakčnú zmes ihneď titrujte odmerným roztokom tiosíranu sodného do žltého sfarbenia. Pridajte 3 cm^3 škrobového mazu a zmes dotitrujte do vymiznutia sivého sfarbenia. Vykonajte potrebný počet paralelných stanovení a namerané hodnoty zapíšte do odpovedového hárka.
- D1.6. Pre vyhodnotenie nameraných údajov je potrebné vykonať slepý pokus. Pri slepom pokuse postupujte opäť podľa postupu opísaného v bodoch D1.1. až D1.5. s použitím $25,0 \text{ cm}^3$ deionizovanej vody namiesto roztoku vzorky. Nameraný údaj zapíšte do odpovedového hárka.
- D1.7. Z experimentálne získaných hodnôt vypočítajte pre každé stanovenie ekvivalentný objem odmerného roztoku tiosíranu sodného o presnej koncentrácii, zodpovedajúci obsahu redukujúcich sacharidov, podľa vzťahu

$$V_{ekv} = \frac{(V_{SP} - V_{ST}) \cdot c_{OR}}{0,1}$$

kde V_{SP} je objem odmerného roztoku spotrebovaný na slepý pokus,
 V_{ST} je objem odmerného roztoku spotrebovaný na vlastné stanovenie vzorky,
 c_{OR} je presná koncentrácia odmerného roztoku.

D1.8. Na základe vypočítaného ekvivalentného objemu odmerného roztoku odčítajte z empirickej tabuľky pre každé meranie hmotnosť redukujúcich sacharidov m_{RS} (glukózy a fruktózy) v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie. Vypočítajte priemernú hmotnosť redukujúcich sacharidov na 100 g sušených datlí vzhľadom k presnej hodnote návažku vzorky použitého pri príprave extraktu.

Tab.4 Empirická tabuľka pre stanovenie redukujúcich cukrov metódou podľa Luffa–Schoorla.

V_{ekv} [cm ³]	m_{RS} [mg]	V_{ekv} [cm ³]	m_{RS} [mg]
1	2,4	12	30,3
2	4,8	13	33,0
3	7,2	14	35,7
4	9,7	15	38,5
5	12,2	16	41,3
6	14,7	17	44,2
7	17,2	18	47,1
8	19,8	19	50,0
9	22,4	20	53,0
10	25,0	21	56,0
11	27,6	22	59,1

Úloha D2: Stanovenie množstva redukujúcich sacharidov po inverzii metódou Luffovou–Schoorlovou s využitím kyslej hydrolyzy sacharózy

- D2.1. Na kyslú hydrolyzu sacharózy obsiahnutej vo vzorke pipetujte do 100 cm³ odmernej banky 50,0 cm³ vyčíreného roztoku vzorky. Pridajte 5,0 cm³ koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a reakčnú zmes za častého premiešavania zahrievajte 8 minút na vodnom kúpeli pri teplote 68 až 70 °C.
- D2.2. Po ochladení reakčnú zmes neutralizujte roztokom hydroxidu sodného ($c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$) na univerzálny indikátorový papierik. Neutrálny roztok doplňte po značku deionizovanou vodou.
- D2.3. Na stanovenie redukujúcich sacharidov po inverzii pipetujte do 250 cm³ Erlenmayerovej banky 25,0 cm³ Luffovho–Schoorlovho roztoku a 25,0 cm³ roztoku vzorky po inverzii. Stanovenie vykonajte podľa postupu uvedeného v úlohe D1. Vykonajte potrebný počet paralelných stanovení.
- D2.4. Z experimentálne získaných hodnôt určte obsah redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie po inverzii. Z rozdielu obsahu redukujúcich

sacharidov pred inverziou a po inverzii vypočítajte obsah sacharózy v 100 g sušených datlí vzhľadom k presnej hodnote návažku vzorky použitého pri príprave extraktu.

D2.5. Vypočítajte celkový obsah cukrov v gramoch na 100 g sušených datlí. Výsledok udajte s presnosťou na 2 desatinné miesta.

Úloha D3: Stanovenie množstva redukujúcich sacharidov po inverzii metódou Luffovou–Schoorlovou s využitím enzýmovej inverzie sacharózy

D3.1. Na základe stanovenej aktivity enzýmového preparátu INVERTOFIX® a obsahu sacharózy vo vzorke, stanoveného v úlohe D2, vypočítajte objem 10-násobne zriedeného enzýmového prípravku potrebný na inverziu množstva sacharózy obsiahnutého v 50 cm³ vyčíreného roztoku vzorky, ak reakčný čas bude 30 minút.

D3.2. Na inverziu sacharózy obsiahnutej vo vzorke pipetujte do 100 cm³ odmernej banky 50,0 cm³ vyčíreného roztoku vzorky. Prídavkom 15,0 cm³ acetátového tlmivého roztoku (CH₃COOH/CH₃COONa; pH 4,8; c = 1 mol dm⁻³) upravte pH na 4,8. Pridajte dvojnásobok vypočítaného množstva enzýmového prípravku INVERTOFIX® zriedeného deionizovanou vodou v pomere 1 : 9, reakčnú zmes dôkladne zhomogenizujte a nechajte inkubovať cca 30 minút pri laboratórnej teplote.

D3.3. Po približne 30 minútach doplňte objem reakčnej zmesi po značku deionizovanou vodou a zhomogenizujte. Na stanovenie redukujúcich sacharidov po inverzii pipetujte do 250 cm³ Erlenmayerovej banky 25,0 cm³ Luffovho–Schoorlovho roztoku a 25,0 cm³ roztoku vzorky po inverzii. Stanovenie vykonajte podľa postupu uvedeného v úlohe D1. Vykonajte potrebný počet paralelných stanovení.

D3.4. Z experimentálne získaných hodnôt určte obsah redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie po inverzii. Z rozdielu obsahu redukujúcich sacharidov pred inverziou a po inverzii vypočítajte obsah sacharózy v 100 g sušených datlí vzhľadom k presnej hodnote návažku vzorky použitého pri príprave extraktu.

D3.5. Vypočítajte celkový obsah cukrov v gramoch na 100 g sušených datlí. Výsledok udajte s presnosťou na 2 desatinné miesta. Porovnajete výsledky získané kyslou hydrolyzou a enzýmovou katalýzou.

Úloha D4: Stanovenie obsahu sacharidov vo vzorke sušených datlí gravimetrickou metódou

D4.1. Do Erlenmayerovej banky o objeme 250 cm³ pipetujte po 25,0 cm³ Fehlingovho roztoku I a Fehlingovho roztoku II a zmes mierne zahrejte na varíči.

D4.2. Ku zahriatej zmesi Fehlingových roztokov pipetujte 25,0 cm³ vyčíreného roztoku vzorky pripraveného v úlohe B2. Reakčnú zmes následne uveďte do varu. Mierny var udržujte presne 2 min (čas merajte stopkami).

- D4.3. Po uplynutí predpísaného času var prerušte prídavkom 100 cm³ deionizovanej vody a reakčnú zmes ochladte vo vodnom kúpeli na laboratórnu teplotu.
- D4.4. Zostavte aparatúru na filtráciu za zníženého tlaku a vylúčený oxid meďný kvantitatívne zachyťte na filtračnom tégliku S 4. Pred filtráciou téglik odvážte s presnosťou na 4 desatinné miesta. Zrazeninu niekoľkokrát premyte horúcou deionizovanou vodou. *Pozn.: Majte na zreteli, aby zachytávaný oxid meďný nebol vystavený oxidačnému pôsobeniu vzdušného kyslíka (zrazeninu stále udržiajte pod vrstvou deionizovanej vody).*
- D4.5. Zachytený oxid meďný premyte ešte trikrát 20 cm³ etanolu a jedenkrát 20 cm³ dietyléteru. Zrazeninu nechajte pri zapnutej výveve presušiť asi 2 minúty a následne téglik so zrazeninou vložte na 45 minút do sušiarne vyhriatej na 105 °C.
- D4.6. Po vychladnutí odvážte fritu so zrazeninou. Vypočítajte hmotnosť vylúčeného oxidu meďného. Vypočítajte hmotnosť vyredukovanej medi v mg, ekvivalentnú ku hmotnosti vylúčeného oxidu meďného.
- D4.7. Z priloženej empirickej tabuľky metódou lineárnej interpolácie odčítajte hmotnosť redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie, prislúchajúcu vypočítanému množstvu vyredukovanej medi.

Tab.5 Empirická tabuľka pre gravimetrické stanovenie redukujúcich cukrov.

m_{Cu} [mg]	m_{RS} [mg]	m_{Cu} [mg]	m_{RS} [mg]	m_{Cu} [mg]	m_{RS} [mg]	m_{Cu} [mg]	m_{RS} [mg]
27,5	14,2	40,0	20,7	52,4	27,2	64,8	33,6
28,4	14,7	40,8	21,1	53,3	27,6	65,7	34,1
29,3	15,1	41,7	21,6	54,2	28,1	66,6	34,5
30,2	15,6	42,6	22,1	55,1	28,6	67,5	35,0
31,1	16,1	43,5	22,5	55,9	29,0	68,4	35,5
32,0	16,5	44,4	23,0	56,8	29,5	69,3	35,9
32,9	17,2	45,3	23,5	57,7	30,0	70,2	36,4
33,7	17,4	46,2	23,9	58,6	30,4	71,0	36,8
34,6	17,9	47,1	24,4	59,5	30,9	71,9	37,3
35,5	18,4	48,0	24,9	60,4	31,4	72,8	37,8
36,4	18,8	48,8	25,3	61,3	31,8	73,7	38,2
37,3	19,3	49,7	25,8	62,2	32,3	74,6	38,7
38,2	19,8	50,6	26,2	63,0	32,7	75,5	39,2
39,1	20,2	51,5	26,7	63,9	33,1	76,4	39,7

- D4.8. Vykonajte gravimetrické stanovenie sacharidov po inverzii. Z roztoku pripraveného v úlohe D2 pipetujte na stanovenie 25,0 cm³ do zahriatej zmesi Fehlingových činidiel. Ďalej postupujte podľa postupu uvedeného v bodoch D4.3. až D4.6.
- D4.9. Odčítajte množstvo redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie po inverzii. Z rozdielu obsahu redukujúcich sacharidov pred a po inverzii vypočítajte obsah sacharózy v 100 g sušených datlí.

D4.10. Vypočítajte celkový obsah sacharidov v gramoch na 100 g sušených datlí. Výsledok udajte s presnosťou na 2 desatinné miesta. Porovnajete výsledky získané gravimetrickou a odmernou metódou.

ODPOVEĎOVÝ HÁROK Z ANALYTICKEJ PRAXE

Chemická olympiáda – kategória EF – 61. ročník – šk. rok 2024/2025

Študijné kolo

Škola:			
Meno súťažiaceho:			
Počet pridelených bodov:		Podpis hodnotiteľa:	
Úloha A			
A1.1.	Výpočet hmotnosti pentahydrátu tiosíranu sodného ($M_r(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}) = 248,17$):		
A1.2.	Navážená hmotnosť KIO_3	$m(\text{KIO}_3) =$	
	Zápis stechiometrickej rovnice prebiehajúceho deja v iónovom tvare:		
	Výpočet presnej koncentrácie I_2 v štandardnom roztoku ($M_r(\text{KIO}_3) = 214,001$):		
A2.1.	Spotreba odmerného roztoku tiosíranu sodného:		
Akceptovaná hodnota $V_{\text{OR}}(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}) =$			
A2.2.	Zápis stechiometrickej rovnice deja prebiehajúceho pri štandardizácii:		
	Výpočet presnej koncentrácie odmerného roztoku tiosíranu sodného:		

Úloha B				
B1.2.	Navážená hmotnosť vzorky datlí	$m(\text{vzorka}) =$		
Úloha C				
C1.4.	Zápis stechiometrickej rovnice inverzie sacharózy:			
	Vzorový výpočet reakčného času t_R pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu:			
	Vzorový výpočet počiatočnej koncentrácie substrátu v objeme reakčnej zmesi:			
	Celkový objem reakčnej zmesi		$V_{RZ} =$	
		1	2	3
	$V(\text{pufor}) / \mu\text{l}$	200	200	200
	$V(\text{substrát}) / \mu\text{l}$	580	600	720
	$V(\text{dH}_2\text{O}) / \mu\text{l}$	170	150	30
	$V(\text{enzým}) / \mu\text{l}$	10	10	10
	$c_{S0} / \text{mol dm}^{-3}$			
	$t_{R,\text{start}} / \text{min}$	1.	1.	1.
		2.	2.	2.
		3.	3.	3.
	$t_{R,\text{stop}} / \text{min}$	1.	1.	1.
2.		2.	2.	
3.		3.	3.	
t_R / min	1.	1.	1.	
	2.	2.	2.	
	3.	3.	3.	
C2.3.	Vzorový výpočet presnej koncentrácie ľubovoľného kalibračného roztoku:			

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	$V_{\text{ŠT}} / \mu\text{l}$	0	1	2	4	8	12	16	20	24	28
	$V_{\text{(dH}_2\text{O)}} / \mu\text{l}$	40	39	38	36	32	28	24	20	16	12
	$V_{\text{DNS}} / \mu\text{l}$	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
inkubovať 5 minút pri teplote 100 °C											
	$V_{\text{(dH}_2\text{O)}} / \text{cm}^3$	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	$c_{\text{RS}} / \text{g dm}^{-3}$										
	$A_{540\text{nm}}$										
C2.4.	Priložená kalibračná závislosť pre stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Millera:										
C2.5.		$c_{\text{S0,1}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 1		$c_{\text{S0,2}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 2		$c_{\text{S0,3}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 3		
a	$A_{540\text{nm}} / -$	1.			1.			1.			
C2.6.		2.			2.			2.			
		3.			3.			3.			
C2.7.	Vzorový výpočet koncentrácie produktu (invertu) v pôvodnom objeme reakčnej zmesi pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu ($M_r(\text{glukóza/fruktóza}) = 180,16$):										
		$c_{\text{S0,1}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 1		$c_{\text{S0,2}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 2		$c_{\text{S0,3}} = \dots\dots$ mol dm^{-3}	kontrola 3		
	$c_{\text{RS}} / \text{g dm}^{-3}$	1.			1.			1.			
		2.			2.			2.			
		3.			3.			3.			
	$c_{\text{PI/RZ}} / \text{mol dm}^{-3}$	1.			1.			1.			
		2.			2.			2.			
		3.			3.			3.			

C3.1. a C3.2.	Vzorový výpočet koncentrácie zreagovaného množstva sacharózy pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu:			
	Vzorový výpočet špecifickej enzýmovej aktivity pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu:			
		$c_{S0,1} = \dots \text{ mol dm}^{-3}$	$c_{S0,2} = \dots \text{ mol dm}^{-3}$	$c_{S0,3} = \dots \text{ mol dm}^{-3}$
	$c_{S,t} / \text{mol dm}^{-3}$	1.	1.	1.
		2.	2.	2.
		3.	3.	3.
	$EA_s / \text{mol min}^{-1} \text{ dm}^{-3}$	1.	1.	1.
		2.	2.	2.
		3.	3.	3.
	Priemerná špecifická enzýmová aktivita		$EA_s(\text{avg}) =$	
Úloha D				
D1.5.	Spotreba odmerného roztoku tiosíranu sodného:			
D1.6.	Spotreba OR na slepý pokus:		$V_{SP} =$	
D1.7.	Vzorový výpočet ekvivalentného objemu V_{ekv} pre ľubovoľné stanovenie:			
	Ekvivalentný objem odmerného roztoku tiosíranu sodného:			

D1.8.	Odčítaná hmotnosť redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky:		
	Výpočet priemernej hmotnosti redukujúcich sacharidov pred inverziou v 100 g vzorky sušených datlí:		
	Priemerná hmotnosť RS v 100 g vzorky:	$m_{RS}(avg) =$	
D2.3.	Spotreba odmerného roztoku tiosíranu sodného:		
D2.4.	Ekvivalentný objem odmerného roztoku tiosíranu sodného:		
	Odčítaná hmotnosť redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky:		
	Výpočet priemernej hmotnosti redukujúcich sacharidov po inverzii v 100 g vzorky sušených datlí:		
	Priemerná hmotnosť RS v 100 g vzorky:	$m_{RS,i}(avg) =$	
	Výpočet obsahu sacharózy v 100 g vzorky sušených datlí ($M_r(\text{glukóza/fruktóza}) = 180,16$; $M_r(\text{sacharóza}) = 342,3$):		
Hmotnosť sacharózy v 100 g vzorky:	$m_{\text{sacharóza}} =$		

D2.5.	Výpočet celkového obsahu cukrov na 100 g sušených datlí:		
	Obsah cukrov v 100 g sušených datlí:	$m_{\text{cukry}} =$	
D3.1.	Výpočet potrebného objemu 10-násobne zriedeného enzýmového preparátu:		
	Objem enzýmu použitý na inverziu:	$V_E =$	
D3.3.	Spotreba odmerného roztoku tiosíranu sodného:		
D3.4.	Ekvivalentný objem odmerného roztoku tiosíranu sodného:		
	Odčítaná hmotnosť redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele vzorky:		
	Výpočet priemernej hmotnosti redukujúcich sacharidov po inverzii v 100 g vzorky sušených datlí:		
	Priemerná hmotnosť RS v 100 g vzorky:	$m_{\text{RS},i}(\text{avg}) =$	

	Výpočet obsahu sacharózy v 100 g vzorky sušených datlí ($M_r(\text{glukóza/fruktóza}) = 180,16$; $M_r(\text{sacharóza}) = 342,3$):	
	Hmotnosť sacharózy v 100 g vzorky:	$m_{\text{sacharóza}} =$
D3.5.	Výpočet celkového obsahu cukrov na 100 g sušených datlí:	
	Obsah cukrov v 100 g sušených datlí:	$m_{\text{cukry}} =$
	Porovnanie výsledkov:	
D4.4.	Hmotnosť téglíka:	$m_{\text{frita}} =$
D4.6.	Hmotnosť téglíka so zachyteným Cu_2O :	$m_{\text{frita+zrazenina}} =$
	Hmotnosť Cu_2O :	$m_{\text{oxid meďný}} =$
	Výpočet ekvivalentného množstva Cu ($M_r(\text{Cu}) = 63,546$; $M_r(\text{Cu}_2\text{O}) = 143,091$):	

D4.7.	Odčítaná hmotnosť RS pred inverziou:	$m_{RS} =$
D4.8.	Hmotnosť téglíka:	$m_{frita} =$
D4.9.	Hmotnosť téglíka so zachyteným Cu_2O :	$m_{frita+zrazenina} =$
	Hmotnosť Cu_2O :	$m_{oxid\ medný} =$
	Výpočet ekvivalentného množstva Cu ($M_r(Cu) = 63,546$; $M_r(Cu_2O) = 143,091$):	
	Odčítaná hmotnosť RS po inverzii:	$m_{RS,i} =$
	Výpočet obsahu sacharózy v 100 g vzorky sušených datlí ($M_r(\text{glukóza/fruktóza}) = 180,16$; $M_r(\text{sacharóza}) = 342,3$):	
	Hmotnosť sacharózy v 100 g vzorky:	$m_{sacharóza} =$
D4.10.	Výpočet celkového obsahu cukrov na 100 g sušených datlí:	
	Obsah cukrov v 100 g sušených datlí:	$m_{cukry} =$
	Porovnanie výsledkov:	

DOPLNKOVÉ ÚLOHY Z PRAXE

Chemická olympiáda – kategória EF – 61. ročník – šk. rok 2024/2025

Študijné kolo

Matúš Tomášik

Maximálne 40 pomocných bodov = 10 bodov

Doba riešenia: bez časového obmedzenia

Úloha 1: Stanovenie obsahu cukrov v jahodovom džeme metódou podľa Potterata–Eschmanna

Návažok jahodového džemu s hmotnosťou 2,37 g sa pri laboratórnej teplote digeroval 100 cm³ deionizovanej vody 30 minút. Cukorný extrakt sa vyčíril pomocou Carrezových roztokov, prefiltraval sa, pričom filtrát sa zachytával do odmernej banky s objemom 1000 cm³. Doplnením odmernej banky deionizovanou vodou po značku sa pripravil zásobný roztok vzorky. Na stanovenie obsahu redukujúcich sacharidov pred inverziou sa z roztoku vzorky pipetovalo do 250 cm³ Erlenmayerovej banky 10,0 cm³. Pridalo sa 10,0 cm³ alkalického roztoku síranu meďnatého, niekoľko varných kamienkov a zmes sa uviedla do varu. Po 10 minútach sa var prerušil prídavkom asi 25 cm³ studenej deionizovanej vody a reakčná zmes sa ochladila na laboratórnu teplotu. Vyredukovaný oxid meďný sa od nezreagovaného kvapalného podielu oddelil filtráciou za zníženého tlaku. Premytá zrazenina Cu₂O sa rozpustila v titračnej banke 4 – 5 kvapkami koncentrovanej kyseliny dusičnej. Potom sa pridalo ešte 5 cm³ zriedenej kyseliny dusičnej a zmes sa krátko povarila. Po ochladení sa vzniknutý roztok meďnatej soli zneutralizoval prídavkom 5 cm³ roztoku amoniaku ($c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$). Vyjasnený roztok sa zriedil prídavkom cca 250 cm³ deionizovanej vody, pridal sa tuhý indikátor murexid a zmes sa titrovala odmerným roztokom chelatónu 3 o približnej koncentrácii $c = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ zo zeleného do modrofialového sfarbenia.

Na inverziu sacharózy prítomnej vo vzorke sa do 100 cm³ odmernej banky pipetovalo 50 cm³ zásobného roztoku vzorky. Pridalo sa 5,0 cm³ koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a zmes sa na vodnom kúpeli zahrievala 8 minút pri teplote 60 – 70 °C. Po ochladení sa roztok v banke doplnil po značku deionizovanou vodou a dôkladne zhomogenizoval. Na stanovenie obsahu redukujúcich sacharidov po inverzii sa z takto pripraveného roztoku pipetovalo do 250 cm³ Erlenmayerovej banky 10,0 cm³ a pridalo sa 10,0 cm³ alkalického roztoku síranu meďnatého. Vlastné stanovenie sa vykonalo rovnako, ako v prípade stanovenia obsahu redukujúcich sacharidov pred inverziou.

- 1.1. Vypočítajte presnú koncentráciu odmerného roztoku chelatónu 3, ktorý bol štandardizovaný na dusičnan olovnatý. 50 cm³ štandardného roztoku Pb(NO₃)₂

sa pripravilo rozpustením presne 0,3279 g základnej látky v deionizovanej vode a doplnením objemu po značku. Na štandardizáciu sa pipetovalo 10,0 cm³ štandardného roztoku, pH sa upravilo prídavkom tuhého hexametyléntetraamínu (urotropínu) a po prídavku malého množstva indikátora xylenolová oranž sa roztok v banke titroval odmerným roztokom chelatónu 3 z fialového do žltého sfarbenia. Priemerná spotreba odmerného roztoku chelatónu 3 bola 10,1 cm³. Zapište stechiometrickú rovnicu štandardizácie.

- 1.2. Zapište stechiometrické rovnice dejov prebiehajúcich pri rozpúšťaní oxidu meďného v kyseline dusičnej a chelátometrickom stanovení vzniknutých meďnatých iónov.
- 1.3. Určte obsah redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele roztoku vzorky použitom na stanovenie pred inverziou v miligramoch, ak spotreba odmerného roztoku chelatónu 3 na slepý pokus bola $V_{SP} = 0,1 \text{ cm}^3$ a priemerná spotreba odmerného roztoku na vlastné stanovenie bola $V_{ST} = 15,0 \text{ cm}^3$. Množstvo redukujúcich sacharidov odčítajte metódou lineárnej interpolácie z priloženej empirickej tabuľky na základe vypočítaného ekvivalentného objemu odmerného roztoku chelatónu 3 podľa vzťahu

$$V_{ekv} = \frac{(V_{ST} - V_{SP}) \cdot c_{OR}}{0,02}$$

kde V_{SP} je objem odmerného roztoku spotrebovaný na slepý pokus,
 V_{ST} je objem odmerného roztoku spotrebovaný na vlastné stanovenie vzorky,
 c_{OR} je presná koncentrácia odmerného roztoku.

Tab.6 Empirická tabuľka pre stanovenie redukujúcich cukrov metódou podľa Potterata–Eschmanna.

V_{ekv} [cm ³]	m_{RS} [mg]	V_{ekv} [cm ³]	m_{RS} [mg]	V_{ekv} [cm ³]	m_{RS} [mg]
9,0	7,05	12,4	9,67	15,8	12,34
9,2	7,20	12,6	9,83	16,0	12,50
9,4	7,35	12,8	9,98	16,2	12,66
9,6	7,50	13,0	10,14	16,4	12,82
9,8	7,65	13,2	10,30	16,6	12,98
10,0	7,80	13,4	10,45	16,8	13,14
10,2	7,96	13,6	10,61	17,0	13,30
10,4	8,11	13,8	10,76	17,2	13,46
10,6	8,27	14,0	10,92	17,4	13,62
10,8	8,42	14,2	11,08	17,6	13,78
11,0	8,58	14,4	11,23	17,8	13,94
11,2	8,74	14,6	11,39	18,0	14,10
11,4	8,89	14,8	11,54	18,2	14,26
11,6	9,05	15,0	11,70	18,4	14,42
11,8	9,20	15,2	11,86	18,6	14,58
12,0	9,36	15,4	12,02	18,8	14,74
12,2	9,52	15,6	12,18	19,0	14,90

- 1.4. Určte obsah redukujúcich sacharidov v alikvotnom podiele roztoku vzorky použitom na stanovenie po inverzii v miligramoch, ak spotreba odmerného roztoku chelatónu 3

na slepý pokus bola $V_{SP} = 0,1 \text{ cm}^3$ a priemerná spotreba odmerného roztoku na vlastné stanovenie bola $V_{ST} = 9,8 \text{ cm}^3$. Množstvo redukujúcich sacharidov odčítajte metódou lineárnej interpolácie z empirickej tabuľky Tab.6. Z rozdielu obsahu redukujúcich sacharidov pred a po inverzii vypočítajte obsah sacharózy na 100 g jahodového džemu.

- 1.5. Vypočítajte celkový obsah cukrov v gramoch na 100 g džemu. Výsledok uďte s presnosťou na 2 desatinné miesta.
- 1.6. Džem sa pripravuje varením ovocia spolu s cukrom. Ako regulátor kyslosti a konzervačná látka sa pridáva kyselina citrónová. Kyselina citrónová, ako aj ostatné kyseliny prítomné v ovocnom podiele spolu vytvárajú kyslé prostredie, čo má za následok, že značný podiel prítomnej sacharózy podlieha kyslej hydrolyze. Vypočítajte, približne koľko g cukru (sacharózy) sa použilo na prípravu 100 g jahodového džemu, ak uvažujeme, že obsah monosacharidov (najmä fruktózy a glukózy) v jahodách je približne 4,9 g na 100 g ovocia, pričom ovocný podiel tvorí 50 % celkovej hmotnosti džemu. Pri výpočte použite údaje získané v úlohách 1.3. a 1.4. Koľko % z pôvodného množstva sacharózy zhydrolyzovalo pri varení džemu?

$M_r(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2) = 331,2$; $M_r(\text{sacharóza}) = 342,3$; $M_r(\text{glukóza/fruktóza}) = 180,16$

Úloha 2: Stanovenie obsahu cukrov v sladkom víne metódou dvojnej polarizácie

Zo vzorky sladkého vína sa na prípravu cukorného extraktu pipetovalo $25,0 \text{ cm}^3$ do 200 cm^3 odmernej banky. Pridali sa 4 cm^3 zásaditého octanu olovnateho, roztok sa doplnil po značku deionizovanou vodou a vzniknutá zrazenina sa oddelila filtráciou za atmosférického tlaku. Z filtrátu sa na stanovenie pipetovalo $50,0 \text{ cm}^3$ do 100 cm^3 odmernej banky. Roztok sa doplnil po značku deionizovanou vodou a zhomogenizoval sa (roztok A). Takto pripravený roztok sa polarizoval v trubici dlhej 200 mm pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a vlnovej dĺžke žltých čiar sodíkového spektra $D = 589,3 \text{ nm}$. Pri týchto podmienkach mal roztok A otáčavosť $+1,13 \text{ }^\circ$. Na inverziu prítomnej sacharózy sa do 100 cm^3 odmernej banky pipetovalo $50,0 \text{ cm}^3$ vyčíreného filtrátu, pridalo sa $25,0 \text{ cm}^3$ deionizovanej vody a $10,0 \text{ cm}^3$ koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Banka sa za občasného miešania zahrievala pri teplote $68 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$ presne 5 minút. Po ochladení sa obsah banky doplnil deionizovanou vodou po značku a zhomogenizoval sa (roztok B). Roztok B sa polarizoval za rovnakých podmienok, ako roztok A. Pri týchto podmienkach mal roztok B otáčavosť $-0,16 \text{ }^\circ$.

- 2.1. Zapište stechiometrickú rovnicu kyslej hydrolyzy (inverzie) sacharózy prítomnej vo vzorke pri príprave roztoku B.
- 2.2. Vypočítajte obsah sacharózy a glukózy v 100 cm^3 roztoku vzorky (v gramoch), ak špecifická otáčavosť sacharózy je $[\alpha]_D^{20} = +66,5 \text{ }^\circ$, glukózy $[\alpha]_D^{20} = +52,8 \text{ }^\circ$

a invertného cukru $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$. Pri výpočte uvažujte, že roztok A obsahuje sacharózu, glukózu a opticky neaktívne látky. Po inverzii uvažujte prítomnosť glukózy, opticky neaktívnych látok a produktov inverzie. Produkty inverzie pre jednoduchosť výpočtu považujte za jednu zložku (invertný cukor).

2.3. Vypočítajte obsah sacharózy a glukózy v hmotnostných percentách v alikvotnom podiele vzorky použitom na stanovenie, ak uvažujeme približnú hustotu vína $\rho = 1020 \text{ kg m}^{-3}$.

2.4. Vypočítajte hmotnostnú koncentráciu cukrov vo víne, vzťahnutú na 1 liter sladkého vína.

$$M_r(\text{sacharóza}) = 342,3; M_r(\text{invert}) = 360,32$$

Pre čo najrýchlejšie a najjednoduchšie stanovenie sacharózy sa v analytickej praxi najčastejšie využívajú tzv. sacharimetre. Na rozdiel od klasických polarimetrov sa stupne sacharimetrickej stupnice priamo viažu na množstvo sacharózy v tzv. jednonormálnom množstve vzorky. Najčastejšími stupnicami sacharimetrov sú stupnice Ventzkeho $[\text{°V}]$ a Medzinárodná sacharimetrická stupnica $[\text{°S}]$. Stanovenie podľa Clergeta využíva princíp dvojnej polarizácie a používa sa na stanovenie sacharózy v prítomnosti iných opticky aktívnych látok, ktoré počas inverzie sacharózy nemenia svoju polarizáciu. Na stanovenie obsahu sacharózy v sladkom víne sa navážilo presne 52,00 g vzorky vína do 200 cm³ odmernej banky. Pri úprave roztoku vzorky, ako aj pri príprave roztokov na stanovenie pred inverziou (roztok A) a po inverzii (roztok B) sacharózy sa postupovalo rovnako, ako pri predošlom stanovení. Pri týchto podmienkach mal roztok A otáčavosť $+2,33^\circ$ a roztok B $-0,33^\circ$.

2.5. Vypočítajte obsah sacharózy v hmotnostných percentách v pôvodnej vzorke dosadením údajov do Clergetovho empirického vzťahu. Namerané hodnoty polarizácie je potrebné dosadiť v $^\circ\text{S}$ (pri prepočte uvažujte, že $1^\circ = 2,8885^\circ\text{S}$) a vynásobiť dvomi, nakoľko tieto hodnoty zodpovedajú tzv. polnormálnemu roztoku vzorky. Clergetov vzťah má tvar

$$w_{\%} = \frac{100 \cdot (\alpha_A - \alpha_B)}{133,5}$$

kde $w_{\%}$ je obsah sacharózy v hmotnostných percentách,
 α_A je otáčavosť roztoku A pred inverziou v $^\circ\text{S}$ vynásobená dvomi,
 α_B je otáčavosť roztoku B po inverzii v $^\circ\text{S}$ vynásobená dvomi,
133,5 je Clergetova konštanta závislá na teplote.

Úloha 3: Určenie enzýmovej aktivity z parametrov Michaelis–Mentenovej kinetického modelu

Metódou počiatkových rýchlostí boli stanovené kinetické parametre Michaelis–Mentenovej kinetického modelu pre systém invertáza–sacharóza. Na enzýmovú reakciu sa do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek pipetovalo po 100 μl acetátového tlmivého roztoku ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,8) a 80 μl enzýmového preparátu s koncentráciou 10 g dm^{-3} . Pridal sa predpísaný objem deionizovanej vody a reakcia sa spustila prídavkom predpísaného množstva zásobného roztoku substrátu (sacharózy) s koncentráciou $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Po približne 30 minútach sa reakcia zastavila povarením reakčných zmesí vo vriacom vodnom kúpeli pri teplote $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí sa stanovila koncentrácia produktu (glukózy) vo výslednom objeme reakčnej zmesi. Súhrn experimentálne získaných údajov je uvedený v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 7 Experimentálne hodnoty pre stanovenie Michaelis–Mentenovej kinetických parametrov.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$V(\text{substrát}) / \mu\text{l}$	0	45	90	225	270	315	450	585	675	720
$V(\text{dH}_2\text{O}) / \mu\text{l}$	720	675	630	495	450	405	270	135	45	0
t_R / min	30,053	29,832	30,205	28,366	29,021	30,080	30,010	30,011	30,260	29,630
$c_{\text{produkt}} / \text{mol dm}^{-3}$	0	0,0248	0,0456	0,0515	0,0539	0,0568	0,0585	0,0595	0,0604	0,0593

- 3.1. Vypočítajte počiatkové koncentrácie sacharózy c_{S0} v jednotlivých reakčných zmesiach.
- 3.2. Pre jednotlivé reakčné systémy vypočítajte reakčné rýchlosti r_P , ako podiel prírastku koncentrácie produktu (glukózy) a reakčného času t_R .
- 3.3. Na priložený milimetrový papier (alebo v aplikácii MS Excel) zostrojte závislosť vypočítanej reakčnej rýchlosti na počiatkovej koncentrácii substrátu a zo závislosti odčítajte kinetické parametre K_M a v_{max} .
- 3.4. Na základe odčítanej hodnoty maximálnej rýchlosti enzýmovej reakcie v_{max} vypočítajte špecifickú aktivitu vzťahnutú na 1 liter enzýmového preparátu invertázy s koncentráciou 10 g dm^{-3} vzhľadom na celkový objem reakčnej zmesi.
- 3.5. Vypočítajte, koľko gramov čistého enzýmu je potrebné navážiť, ak úlohou je za 2 hodiny zinvertovať sacharózu, obsiahnutú v 10 litroch roztoku ($c = 500 \text{ g dm}^{-3}$).

$$M_r(\text{sacharóza}) = 342,3$$

ODPOVEĎOVÝ HÁROK K DOPLNKOVÝM ÚLOHÁM Z PRAXE

Chemická olympiáda – kategória EF – 61. ročník – šk. rok 2024/2025

Študijné kolo

Škola:	
Meno súťažiaceho:	
Počet pridelených bodov:	Podpis hodnotiteľa:
Úloha 1	
1.1.	Zápis stechiometrickej rovnice deja prebiehajúceho pri štandardizácii:
	Výpočet presnej koncentrácie odmerného roztoku chelatónu 3:
1.2.	Zápis stechiometrických rovníc prebiehajúcich dejov:
1.3.	Výpočet ekvivalentného objemu odmerného roztoku chelatónu 3:
	Odčítaná hmotnosť RS pred inverziou: $m_{RS} =$
1.4.	Výpočet ekvivalentného objemu odmerného roztoku chelatónu 3:
	Odčítaná hmotnosť RS po inverzii: $m_{RS,i} =$

	Výpočet obsahu sacharózy v 100 g vzorky jahodového džemu:	
	Hmotnosť sacharózy v 100 g vzorky:	$m_{\text{sacharóza}} =$
1.5.	Výpočet celkového obsahu cukrov na 100 g jahodového džemu:	
	Obsah cukrov v 100 g džemu:	$m_{\text{cukry}} =$
1.6.	Výpočet použitého množstva sacharózy:	
	% zhydrolyzovanej sacharózy:	% =
Úloha 2		
2.1.	Zápis stechiometrickej rovnice inverzie sacharózy:	
2.2.	Výpočet obsahu sacharózy a glukózy v 100 cm ³ roztoku vzorky:	

2.3.	Výpočet hmot. % sacharózy a glukózy v alikvotnom podiele vzorky:	
	Hmotnostné percento sacharózy:	% _{sacharóza} =
	Hmotnostné percento glukózy:	% _{glukóza} =
2.4.	Výpočet hmotnostnej koncentrácie cukrov v 1 litri sladkého vína:	
2.5.	Výpočet hmot. % sacharózy podľa Clergeta:	
	Hmotnostné percento sacharózy:	% _{sacharóza} =

Úloha 3

Vzorový výpočet počiatočnej koncentrácie substrátu v reakčnej zmesi pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu:

Vzorový výpočet reakčnej rýchlosti pre ľubovoľnú enzýmovú reakciu:

3.1.
a
3.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$V_S / \mu\text{l}$	0	45	90	225	270	315	450	585	675	720
$V_{\text{dH}_2\text{O}} / \mu\text{l}$	720	675	630	495	450	405	270	135	45	0
$c_{S0} / \text{mol dm}^{-3}$										
t_R / min	30,053	29,832	30,205	28,366	29,021	30,080	30,010	30,011	30,260	29,630
$c_P / \text{mol dm}^{-3}$	0	0,0248	0,0456	0,0515	0,0539	0,0568	0,0585	0,0595	0,0604	0,0593
$r_P / \text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$										

3.3.

Priložená závislosť rýchlosti enzýmovej reakcie na počiatočnej koncentrácii substrátu:

Odčítaná hodnota v_{max} :

$v_{\text{max}} =$

Odčítaná hodnota K_M :

$K_M =$

3.4.

Výpočet špecifickej enzýmovej aktivity:

3.5.

Výpočet hmotnosti suchého enzymu:

Autor: Matúš Tomášik

Recenzenti: Ing. Martina Gánovská, Ing. Elena Kulichová

Redakčná úprava: Ing. Anna Ďuricová, PhD.(vedúca autorského kolektívu)

Slovenská komisia Chemickej olympiády

Vydal: NIVAM, Bratislava 2025