

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra učitelství a didaktiky chemie

Studijní program: Vzdělávání v chemii



**Výukové aplikace modelů složitých biochemických procesů**

**Educational applications of the complicated biochemical  
processes models**

*Disertační práce*

**Mgr. Jindřich Zdražil**

Školitel disertační práce: Prof. Ing. Karel Kolář, CSc.

Praha, 2013



Autor: **Mgr. Jindřich Zdražil**  
Školitel: **Prof. Ing. Karel Kolář, CSc.**  
Oponenti: **Doc. RNDr. Helena Klímová, CSc.**  
**Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím se zapůjčením své disertační práce ke studijním účelům.

V Pírně, 23. 4. 2013

Mgr. Jindřich Zdražil

## **Bibliografický záznam**

ZDRAŽIL, Jindřich. *Výukové aplikace modelů složitých biochemických procesů*. Praha: Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra učitelství a didaktiky chemie, 2013. 108 s. Školitel: Prof. Ing. Karel Kolář, CSc.

## **Abstrakt**

Doktorská práce „Výukové aplikace modelů složitých biochemických procesů“ pojednává o možnosti začlenění jednoduchých bioorganických výukových experimentů, modelujících složité biochemické procesy v živých systémech, do učiva na středních a vysokých školách, v některých případech i na školách základních. Úkolem těchto experimentů je zjednodušené, ale názorné odpovídající přiblížení složité problematiky biochemických procesů formou transparentního pokusu, probíhajícího za podmínek srovnatelných reálného děje s podmínkami v živém systému. Teoretická část je rozdělena do čtyř tematických okruhů: bioorganické modely; modely reakcí v biochemii; modely působení toxických a antidotních látek a aplikace bioorganických modelů ve výuce chemie. Praktická část obsahuje vlastní výukové experimenty z výše uvedených tematických okruhů a výzkum vlivu zařazení konkrétního experimentu do výuky chemie.

## **Abstract**

PhD thesis "Educational applications of models of complicated biochemical processes" discusses possibility of involving simple bioorganic educational experiments that simulate complex biochemical processes in living systems, into curriculum at high schools and universities; in some cases also at basic schools. The aim of these experiments is simplified but demonstrative introduction of complex biochemical processes via transparent experiment that is taking place under conditions that are comparable with real state in living system. The theoretic part is divided into four thematic parts: bioorganic models; models of reactions in biochemistry; models of effects of toxic substances and antidotes; and application of bioorganic models in teaching chemistry. The practical part contains actual educational experiments from above-mentioned thematic parts and research of effect of involvement of actual experiment into classes of chemistry.

## **Klíčová slova**

Bioorganická chemie, didaktika chemie, výukové experimenty, bioorganické modely, antidotní přípravky, modelování reakcí, biochemie, toxicita, kancerogenní látky, antioxidanty.

## **Keywords**

Bioorganic chemistry, didactics of chemistry, teaching experiments, bioorganics models, antidots, modeling of reactions, biochemistry, toxicity, carcinogenic substances, antioxidants.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi byli nápomocni radou i milým slovem, zejména však panu prof. Ing. Karlu Kolářovi, CSc. za odborné vedení a pomoc, paní Mgr. Janě Neuper za konzultace při překladech z ruského jazyka, paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za pomoc v rámci pedagogického výzkumu. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své ženě Heleně Zdražilové a celé své rodině za morální podporu.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
2.1 <i>Biochemie a bioorganická chemie</i> .....	11
2.2 <i>Bioorganické modely a jejich charakteristika</i> .....	14
2.2.1 <i>Modely enzymů a jejich katalytického působení</i> .....	14
2.2.2 <i>Modelování biochemických reakcí</i> .....	24
2.2.3 <i>Modely působení toxických a antidotních látek</i> .....	28
2.2.4 <i>Modely působení látek s antioxidačním účinkem</i> .....	31
2.2.5 <i>Modely působení kancerogenů</i> .....	33
2.3 <i>Vybrané konkrétní aplikace bioorganických modelů ve výuce chemie</i> ....	38
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>44</b>
4.1 <i>Pomůcky a chemikálie</i> .....	44
4.2 <i>Návrhy výukových experimentů</i> .....	46
4.2.1 <i>Modelování biuretové reakce</i> .....	46
4.2.2 <i>Methylenová modř jako model koenzymu</i> .....	49
4.2.3 <i>Modelování vlivu reakčních podmínek-štěpení škrobu amylasou</i> .....	51
4.2.4 <i>Modely působení toxických látek a antidotních přípravků</i> .....	53
4.2.5 <i>Model působení mutagenů</i> .....	56
4.2.6 <i>Modely působení antioxidantů</i> .....	58
4.3 <i>Metodika pedagogického výzkumu</i> .....	59
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>64</b>
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>71</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>74</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>75</b>
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>80</b>
<b>10. PŘÍLOHY</b> .....	<b>81</b>

# 1. ÚVOD

Již od samého počátku ustavení oboru didaktika chemie a vlastní edukace přírodních věd jako takových hraje experiment jednu z nejdůležitějších rolí v procesu výuky. Ať už se jedná o demonstrační experiment prováděný učitelem nebo žákovské pokusy, vždy patří pro svou motivační hodnotu, názornost a zajímavost, kdy žáci objevují podstatu teoretických zákonitostí v reálných situacích, mezi ty nejoblíbenější. Na druhou stranu přináší realizace této části výuky vyšší nároky na přípravu učitele, nejen pokud jde o vlastní technickou přípravu experimentu, ale i vzhledem k náročnosti po stránce teoretické, počínaje vhodným zařazením příslušného experimentu do výuky chemie, jeho realizací a řešením neobvyklých situací, které mohou nastat, až po vlastní interpretaci výsledků a splnění výchovných cílů, které vyplývají z vlastní podstaty zařazení experimentu. Učitel musí při svém rozhodování o zařazení pokusu řešit také otázky bezpečnosti daného experimentu a tím zodpovědnost za zdraví svých studentů a samozřejmě i otázku chemikálií a dalšího materiálu, finančních nákladů a technických možností výukové laboratoře.

Po stránce obsahu je chemie rozsáhlým vědním oborem, který kooperuje s dalšími přírodovědnými obory, především fyzikou a biologií. Jako jiné vědní obory je i chemie rozdělena do řady dílčích oborů, např. anorganická a organická chemie, biochemie, chemie polymerů a jiné. Každý z těchto oborů svým charakterem přináší rozdílné nároky na experimentální stránku výuky. Jistě nebude pro učitele zásadní problém připravit experiment na téma dělení složek směsí pomocí filtrace, reakce zinku s roztokem síranu měďnatého v kapitole o redoxních reakcích nebo esterifikace pro rozpravu o chemických vlastnostech karboxylových kyselin. Ale existují i tematické celky, které svým obsahem, zejména jeho složitostí na úrovni základní, střední a někdy i vysoké školy, přinášejí po stránce experimentální značné, někdy téměř neřešitelné problémy. Mezi takové celky patří i biochemické procesy, především pro svou složitost, rozmanitost a obtížnost pochopení podstaty látkových přeměn v živých organizmech. Složitě uspořádané a z hlediska prostoru objemné organické molekuly spolu reagují za podmínek, které panují v živých systémech, a tyto reakce katalyzují ještě složitější a prostorově objemnější katalyzátory – enzymy.

Biochemie a bioorganická chemie jsou vědní obory, které tvoří jakousi křížovátku mezi chemií, biologií, molekulární biologií, farmakologií a dalšími obory, výrazně tak

zasahují do zcela zásadního vědního oboru pro lidstvo – lékařství. Hrají tak stále důležitější roli nejen na poli vědy, ale i ve výuce chemie a biologie na všech typech škol.

Tato práce hledá cesty, jak v rámci možností jednoduchou formou modelovat složité procesy probíhající v živých systémech a tím je přiblížit studentům, především středních škol a zároveň být nástrojem pro osvojení si znalostí, vyplývajících z teoretické části výuky, obzvláště biochemie. Měla by též být jakýmsi výchozím bodem pro hledání dalších podobných modelů a tím i přispívat k rozšíření a zpřesnění obsahové stránky daného tematického celku. Práce by měla být také návodem a pomůckou pro uživatele – učitele chemie při jejich náročné práci s žáky a studenty v chemické laboratoři.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Biochemie a bioorganická chemie

Živý organizmus je z chemického hlediska nesmírně složitý systém. Fascinuje nás svou dokonalostí, univerzálností a přesto neuvěřitelnou rozmanitostí forem. Poznávání zákonitostí jeho stavby, látkové a energetické přeměny v něm probíhající je předmětem celé řady vědních oborů. První poznatky, které byly kdysi získávány pozorováním, patřily základní vědě o životě, tj. biologii, která se následně rozdělila na další podobory, zkoumající morfologickou stránku jako například cytologie, anatomie, histologie a další vědy, studující funkčnost jednotlivých jeho částí, z nich nejdůležitější je fyziologie. S postupným rozvojem rozličných výzkumných technik se živý organizmus stával objektem zájmu i jiných oborů, především těch, které se začaly orientovat na molekulární úroveň procesů, a ta je vlastní chemii. Po určité době se organická chemie začala více orientovat na přírodní látky a pomocí metod organické chemie byly postupně získávány informace o molekulární stavbě organizmů, včetně makromolekulárních látek typu bílkovin a nukleových kyselin. Termín biochemie poprvé použil F. Hoppe-Seyler<sup>1</sup> v roce 1903, vlastní věda se osamostatnila později, v třicátých letech minulého století. Biochemie patří mezi chemické disciplíny. Chemii můžeme chápat jako nauku o přeměnách na úrovni elektronového obalu atomů v molekulách, biochemii v této souvislosti pak jako vědu, studující tyto přeměny v organizmech (dynamická biochemie). Jde o studium látkové přeměny tedy metabolismu. Biochemie dále pojednává o stavbě živých organizmů, o látkovém složení živých systémů. Toto odvětví biochemie je nazýváno statickou biochemií. Souvislost chemických procesů v organismu s jeho fyziologickými procesy zkoumá funkční biochemie a konečně způsob uspořádání jednotlivých složek a biochemických přeměn v živém jedinci tzv. biochemie organizační. Vzhledem ke složitosti stavby živých soustav a procesů v nich probíhajících vzniká celá řada nových, specializovaných oborů, studujících na různých úrovních a z různých pohledů tyto systémy, více či méně využívajících k tomuto studiu chemických metod - např. molekulární biologie a bioorganická chemie. Právě bioorganická chemie je moderní mezioborová vědní disciplína, jejíž předmět nelze zcela přesně vymezit, ale je zřejmé, že se jedná o hraniční disciplínu mezi organickou chemií, biochemií a také biologií. Její vznik byl reakcí na potřebu

objasnit průběh procesů v živých organizmech na molekulární úrovni. Tento obor má za cíl detailně popsat chemickou podstatu reakcí probíhajících v živých systémech a využívá k tomu metod organické chemie. Kombinuje a porovnává molekulární struktury a funkce biomolekul, molekulární principy biologických a biochemických procesů (biochemie z pohledu mechanismů organických reakcí), chemické syntézy a biosyntézy biomolekul a biomakromolekul, využití biochemických či biologických prostředků v organické chemii (biokatalýza), využití chemických prostředků ke studiu a ovlivňování biologických procesů (chemická biologie), konstrukce umělých bioanalogických systémů (syntetická biologie) a v neposlední řadě probírá základní fyzikální a chemické principy nejpoužívanějších metodik a technik biochemie a molekulární biologie. Využití takových poznatků je možné na více úrovních a v různých oborech. Ve skutečnosti je součástí bioorganické chemie také řada podoborů, které byly původně součástí chemie organické (např. chemie přírodních látek) nebo biochemie (např. enzymologie, genové inženýrství). Obsahovou náplň oboru víceméně reprezentuje následující soubor témat:

1. Izolace přírodních látek (sacharidy, lipidy, isoprenoidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny, alkaloidy, nukleové kyseliny aj.) a jejich identifikace.
2. Studium struktury a stereochemie přírodních látek s využitím fyzikálně-chemických metod (UV-VIS, IR, NMR, MS apod.).
3. Syntéza přírodních látek s využitím chemických a biochemických metod.
4. Chemické a biochemické přeměny přírodních látek - modifikace jejich struktury.
5. Studium vlivu struktury přírodních látek na jejich biologickou aktivitu.
6. Vzájemné interakce biomakromolekul, interakce biomakromolekul s nízkomolekulárními látkami, vznik supramolekul.
7. Bioorganické modely, modely katalytické funkce enzymů, modely interakce látka-receptor apod.
8. Studium průběhu biochemických reakcí, enzymové reakce *in vivo* a *in vitro*, mechanismus enzymatických reakcí.
9. Biotechnologické procesy, výzkum a inovace biotechnologických postupů na molekulární úrovni.
10. Studium podstaty působení biologicky aktivních látek (vitamíny, hormony aj.) v živých organizmech.

11. Struktura a vlastnosti biologicky aktivních látek (léčiva, pesticidy, bojové chemické látky apod.).
12. Chemická podstata významných procesů v živých organizmech (fotosyntéza aj.).

V poměrně nedávné době započal bouřlivý vývoj oboru, který je nazýván supramolekulární chemií. Tento obor nahlíží na chemii molekul tak, že začal soustřeďovat pozornost na nekovalentní vazebné interakce a prostorové uspořádání mezi individuálními molekulami vedoucí ke vzniku nadmolekulárních nekovalentních (supramolekulárních) struktur, specifickým příkladem je např. komplex typu receptor-substrát. Předmětem zájmu nejsou jen molekulární struktury, ale především polymolekulární struktury vzniklé na základě molekulárního rozpoznání jednotlivých molekul tvořících supramolekulární komplex. Ten je obecně tvořen dvěma a více molekulárními jednotkami, které vytvářejí celek jednoznačného prostorového uspořádání pomocí nekovalentních vazeb. Zřejmě prvním příkladem publikovaným v této souvislosti byl molekulární komplex thiomocoviny s dibenzo-18-crown-6-etherem, popsáný Pedersenem v roce 1971 <sup>6</sup>. Průkopnické práce v tomto oboru byly uskutečněny Pedersenem, Lehmem a Crammem <sup>6</sup>, jejich výsledky stojící v počátcích supramolekulární chemie byly oceněny v roce 1987 Nobelovou cenou za chemii. Je zřejmé, že speciální povaha chemie biologických, a nyní také umělých supramolekulárních systémů, je dána definovanými nekovalentními interakcemi. Kooperací nevazebných interakcí, jako jsou vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce, van der Waalovy a elektrostatické interakce, je dosaženo nejen požadované supramolekulární struktury, ale také příslušné funkce takto vytvořeného systému. Právě výzkum principů chování nekovalentních systémů a jejich využití pro tvorbu systémů umělých je jedním ze základních předmětů supramolekulární chemie, která je vhodnou oblastí pro vytváření bioorganických modelů <sup>6</sup>.

Z toho, co bylo výše deklarováno, je zřejmé, že bioorganická chemie ve své konzervativní podobě (chemie přírodních látek) a obzvláště pak v podobě soudobé (studium mechanismů biochemických procesů) přináší řadu inspirací pro inovace výuky chemie na vysokých školách, vzdělávajících budoucí učitele gymnázií.

## 2.2 Bioorganické modely a jejich charakteristika

### 2.2.1 Modely enzymů a jejich katalytického působení

Jak již bylo uvedeno, chemické reakce v živém systému probíhají podobným mechanismem jako reakce organické a bioorganičtí chemici se pokoušejí pomocí metod organické chemie co nejvíce přiblížit požadovaným produktům a podmínkám takových reakcí. Vzhledem ke složitosti fungování většiny živých systémů, molekulární struktury látek v nich přeměňovaných a podmínek, za jakých tyto přeměny probíhají, je nutné hledat analogie mezi látkami organickými jednodušší struktury, které se v organizmech často ani nevyskytují. Uplatnění modelů a vlastní modelování biochemických pochodů je účinnou metodou vysvětlení či přiblížení způsobu, jakým tyto složité chemické děje a procesy probíhají. Při vytváření modelů a jejich aplikací je třeba brát na zřetel několik zásad, abychom pochopili mechanismy biochemických reakcí, principy působení molekul s katalytickými vlastnostmi, vliv prostorového uspořádání látek na vznik produktů a rychlost jejich vzniku. Je proto zapotřebí, aby se modely svou chemickou podstatou co nejvíce blížily látkám modelovaným. Nejzřetelnější je splnění této podmínky právě u modelování enzymů. Tato oblast patří k nejdůležitějším oblastem zkoumání, především pro unikátní vlastnosti těchto látek, ale také pro vlastní pochopení podstaty procesů, které tyto složité molekuly katalyzují. Enzymy jako biokatalyzátory se podílí na řízení a koordinaci složitého souboru biochemických reakcí živých systémů, tj. metabolismu. Většinou se jedná o proteiny s katalytickými vlastnostmi. Jinou skupinou látek jsou tzv. faktory, které ovlivňují procesy, při nichž nedochází k chemickým změnám, ale pouze ke změně konformací např. regulační faktory při translaci. Enzymy vykazují druhovou specifitu. Každý biologický druh má své vlastní enzymy, odlišné od jiného druhu, ačkoli tyto mají stejnou nebo podobnou funkci. To má za následek existenci obrovského množství různých typů enzymů. Enzymy se rozdělují do dvou skupin podle toho, jaká je struktura té části, která je zodpovědná za katalytickou funkci. Může se jednat o čistou bílkovinu, nebo častěji o složenou, která obsahuje ještě nebiłkovinnou část neboli kofaktor. Na enzymy jsou vzhledem ke složitosti celého systému kladeny poměrně značné nároky. Jednotlivé procesy na sebe navazují podle genetického kódu, nemohou vznikat vedlejší produkty a reakce musí probíhat s dostatečnou rychlostí. Na druhou stranu musí být tvorba a

aktivita enzymů snadno regulovatelná podle měnících se podmínek a potřeb organismu. To vše dává enzymům vlastnosti, kterými mnohonásobně předčí jejich syntetické analogy, které byly vytvořeny uměle člověkem. Molekuly enzymů jsou, pokud jde o katalytický efekt, až o několik řádů účinnější, reagují výrazně specificky s daným substrátem (substrátová specifita), přičemž jedna molekula enzymu je schopna přeměnit až  $5 \cdot 10^4$  molekul substrátu. Také nelze opomenout podmínky, za kterých enzymy působí, což je zásadní pro vlastní bioorganické modelování. Všechny tyto okolnosti souvisí s velkou strukturální složitostí těchto molekul a také jejich labilitou vůči vnějším vlivům. Je velmi obtížné takové molekuly z hlediska struktury napodobit, ale k pochopení problematiky zcela nezbytné. Abychom si mohli ověřit složitost takového procesu, je nutné přizpůsobit model co nejvíce adekvátním způsobem reálné situaci. Pro modelování takových molekul jsou používány organické sloučeniny, které vykazují charakteristické vlastnosti enzymů, ale jejich molekuly jsou mnohem menší a strukturálně jednodušší. Je možné přitom zkoumat jen určité parametry reakce, které nás zajímají, nebo které jsme schopni sledovat. Hlavní výhodou využití umělých struktur pro modelování enzymových reakcí tedy je, že látky můžeme utvářet a upravovat cíleně pro studium určité vlastnosti. Pomocí syntetických metod organické chemie můžeme vytvořit model enzymu, který sice není bílkovinného charakteru, ale obsahuje stejné nebo podobné charakteristické skupiny, které jsou v souladu s geometrií aktivního centra enzymu. Takový způsob se označuje jako biomimetický chemický přístup. Biomimetiku pak můžeme charakterizovat jako vědní obor, který se zaměřuje na uplatňování poznatků ze studia živých organismů v jiných nejen přírodovědných oborech. Snahou takových postupů je objasnit vztah mezi složitými molekulami a jejich funkcemi. V roce 1894 představil německý chemik E. Fischer teorii<sup>42</sup>, že enzymová reakce probíhá jen v určité malé části enzymu, která se nazývá aktivní centrum, což bylo později pomocí rentgenové strukturální analýzy potvrzeno. Aktivní centrum je prostorově uspořádaná část enzymu, na jehož stavbě se podílí větší počet různých typů charakteristických skupin, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselin v řetězci bílkoviny. Tyto charakteristické skupiny mají různé funkce, mohou tvořit centrum, které se bezprostředně účastní katalytického procesu, jiné slouží ke specifické vazbě na substrát. Pro tvorbu modelů enzymů je však nejdůležitější, aby oblast jejich molekuly, účastníci se katalýzy dané reakce, splňovala podmínky, které odpovídají struktuře aktivního centra enzymu. Je několik faktorů reakcí probíhajících v aktivním centru, jejichž existence má za následek nízké hodnoty aktivačních energií a tím i mnohem vyšší rychlost reakcí. Velice

důležitou schopností enzymu je možnost specificky vázat substrát a zároveň jej i vhodně orientovat k charakteristickým skupinám enzymu než je tomu v případě náhodné srážky v roztoku. Jedná se o tzv. efekt proximity, což je vliv sousední skupiny, a o efekt orientace substrátu. Je velmi obtížné zohlednit při konstrukci modelového systému všechny výše uvedené faktory, proto je často nutné omezit se jen na určitou vlastnost modelu. Můžeme jmenovat ty nejdůležitější jako je struktura aktivního centra nebo enzym-substrátového komplexu <sup>2</sup>. Vzhledem ke složitosti enzymových systémů a jejich počtu bylo prozkoumáno jen několik nejjednodušších a další výzkum pomocí nových zobrazovacích metod je velkou výzvou právě pro oblast bioorganické chemie. Je samozřejmé, že všechny výsledky modelování musí být porovnány s chováním studovaného enzymového systému, aby bylo možné porovnat bioorganické modely se systémy, existujícími v přírodě. Může se stát, že modelová sloučenina bude mít vlastnosti, které náleží více než jednomu enzymu. Je proto nutné, aby vhodný model splňoval několik požadavků <sup>2</sup>:

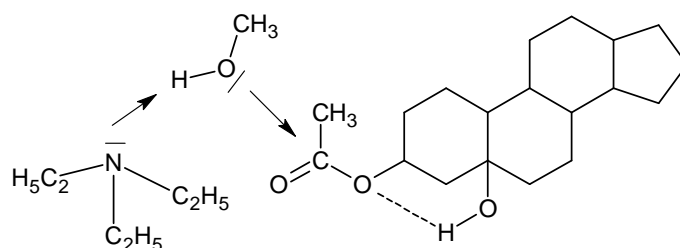
1. Model musí mít vhodné nekovalentní vazebné možnosti tak, aby byly vytvořeny podmínky pro vznik slabých interakcí směrem k substrátu.
2. Charakteristické skupiny musí být uvážlivě zvoleny a rozloženy určitým způsobem v modelu, aby se mohla uplatnit katalýza.
3. Struktura modelu musí být rigidní a musí odpovídat struktuře komplexu substrát-enzym.
4. Modelová sloučenina musí být ve vodě rozpustná a katalyticky aktivní při fyziologických hodnotách pH a teploty.

Tato kritéria jsou závazná pro volbu vhodné matrice, která je schopna přiblížení charakteristických skupin podílejících se na katalytickém procesu a jejich správné orientace, takto je možné zkonstruovat vhodný katalyzátor.

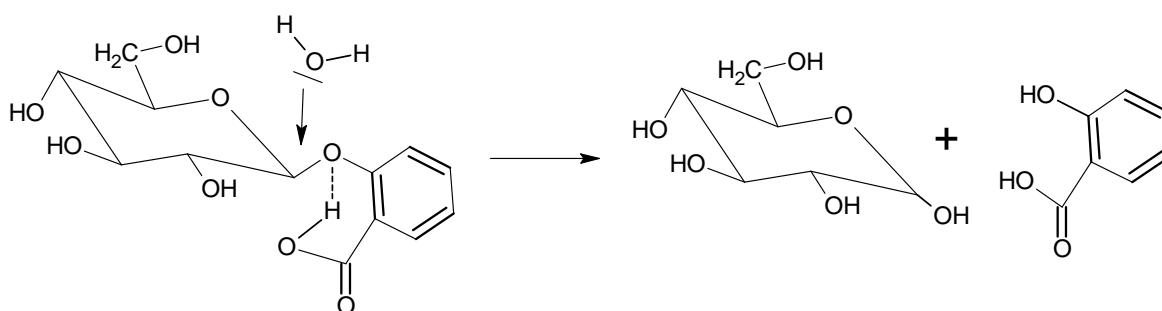
Bioorganická chemie je relativně mladý vědní obor, který dnes vstupuje do velice širokého okruhu oborů, např. modelování přenosu genetické informace na molekulární úrovni, replikace a modifikace DNA i translace, až po tvorbu látek využívaných v enzymovém inženýrství.

Je možné uvést tři příklady, vysvětlující zvýšení rychlosti reakce na základě vzájemného ovlivňování charakteristických skupin, jak uvádí ve své publikaci K. Waissler<sup>3</sup>. Jsou to jednoduché modely interakcí, uplatňující se např. v aktivním centru enzymu:

- 1) 3-β-acetoxy-5-β-hydroxysteroidy se štěpí při reesterifikaci methanolem za přítomnosti triethylaminu 300x rychleji než steroidy bez hydroxylové skupiny v 5-β-poloze. Skupina OH vytvoří vodíkovou vazbu s kyslíkem na acetoxy skupině, a tím zvýší elektronový deficit na karbonylovém uhlíku této skupiny, k němuž pak snadno přistupuje svým volným elektronovým párem atom kyslíku alkoholu.

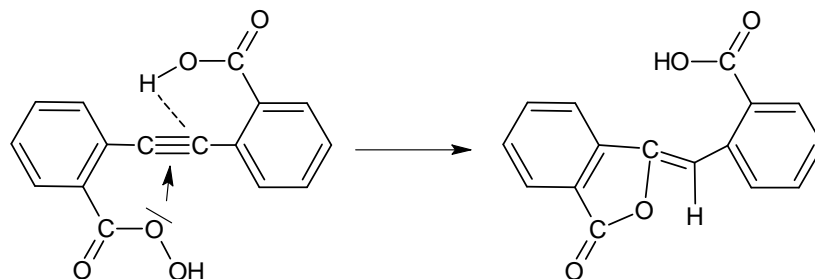


- 2) 2-karboxyfenyl-β-D-glukosidy hydrolyzují 10000x rychleji než odpovídající 4-karboxyfenyl-β-D-glukosidy. Skupina OH karboxylové skupiny vytváří vodíkový můstek s glykosidickým atomem kyslíku. Tím se prohloubí elektronový deficit na atomu uhlíku v poloze 1, ke kterému pak ochotně přistoupí svým volným elektronovým párem atom kyslíku molekuly vody. U 4-hydroxybenzoové kyseliny k tomuto efektu nedochází.

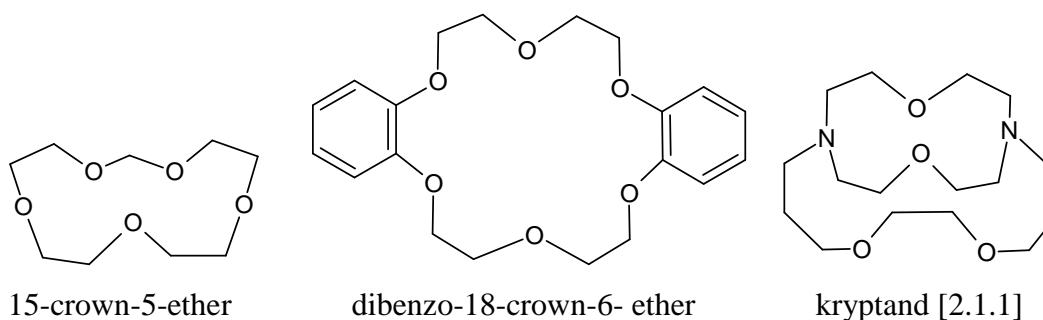


- 3) 2,2'-tolandikarboxylová kyselina v ethanolu přechází 10000x rychleji na (2-karboxybenzyliden)ftalid než 2-tolankarboxylová či 2,4'-tolandikarboxylová kyselina. Efekt je přisuzován interakci vodíku OH skupiny jedné karboxylové skupiny s trojnou vazbou, čímž na jednom atomu uhlíku trojné vazby vznikne elektronový deficit a

k druhému atomu uhlíku trojné vazby pak může snadno přistoupit svým volným elektronovým párem kyslík druhé karboxylové skupiny.

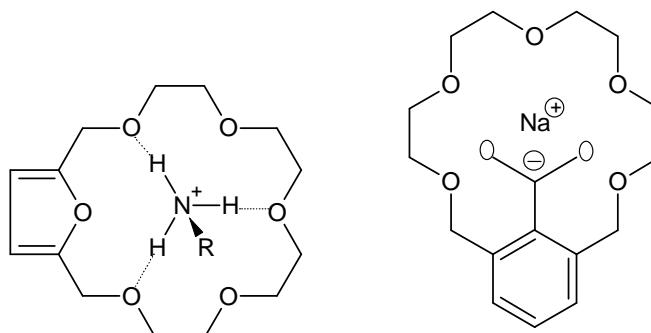


Pro modelování enzymových systémů je velice zajímavou skupina látek, objevených Charlesem Pedersenem v šedesátých létech minulého století, tzv. crownethery. Názvy crownetherů se tvoří podle obecného schématu x-crown-y-ether, kde  $x$  je celkový počet atomů v kruhu a  $y$  je počet atomů kyslíku <sup>4</sup>. Tyto látky se používají jako katalyzátory při fázové katalýze, protože tvoří velmi stabilní komplexy s kationty kovů a kationty organických sloučenin a mají schopnost převádět anorganické soli do organické fáze, tedy umožňují jejich rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Podobnými sloučeninami jsou kryptandy, což jsou makrocyclické aminoethery. Zájem o crownethery se zvýšil v souvislosti s možností jejich využití pro rozdělení enantiomerů aminokyselin <sup>5</sup>.



Je zřejmá analogie s hypotézou „zámku a klíče“, která byla navržena pro popis interakce mezi enzymem a substrátem v komplexu enzym-substrát. Jedná se o komplexy typu hostitel-host, které představují jednoduchou variantu komplexu zámek-klíč (obr. 1).

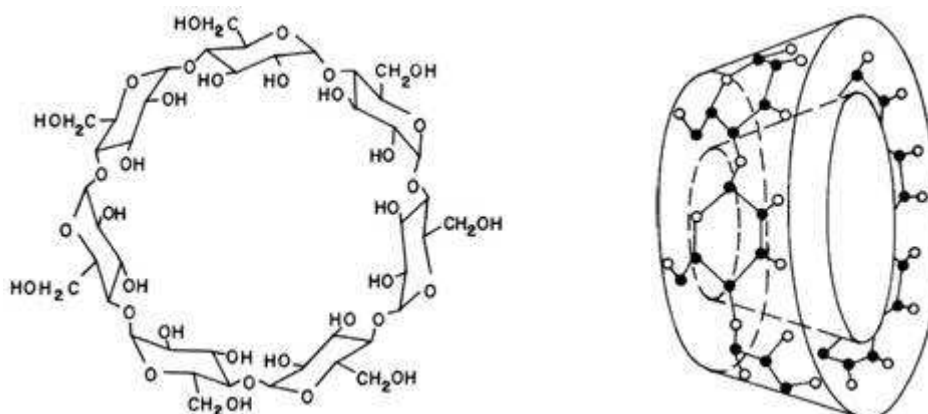
**Obr. 1. - Příklady vybraných komplexů <sup>2</sup>.**



Jako látku typu hostitel pro modelování katalytického centra enzymu lze použít molekulu cyklodextrinu.

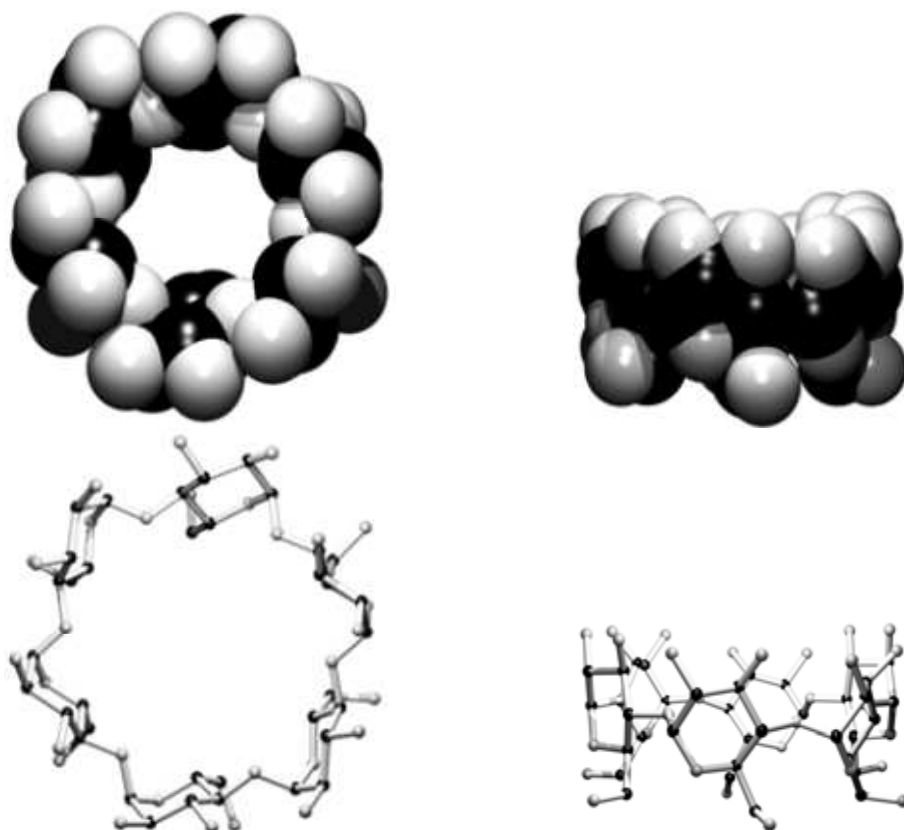
Velkou výhodou je poměrně snadná dosažitelnost  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrinů, které vznikají enzymatickým štěpením amylosy glukosyltransferasami bakteriálního původu (*Bacillus macerans*). Výsledkem takového štěpení je směs cyklických a lineárních oligosacharidů, obsahujících šest až více než sto glukosových jednotek. Nejvíce jsou zastoupeny již výše zmiňované tři skupiny cyklodextrinů. Jedná se o cyklické struktury, tvořené 6, 7 nebo 8 zbytky glukosových jednotek, spojených  $\alpha$ -1,4-glykosidickou vazbou a tyto tři typy se dají pomocí soudobých separačních metod zcela snadno izolovat srážením hexanem, fluorbenzenem nebo anthracenem ze směsi, neboť společně tvoří velmi málo rozpustné komplexy a jako takové se dají získávat v průmyslovém měřítku. Cyklodextriny mají relativně rigidní strukturu ve tvaru komolého kužele, tedy s jednou základnou širší než druhou, s vnitřní dutinou (kavitou), (obr. 2).

**Obr. 2. - Vzorec a model molekuly  $\beta$  - cyklodextrinu <sup>34</sup>.**



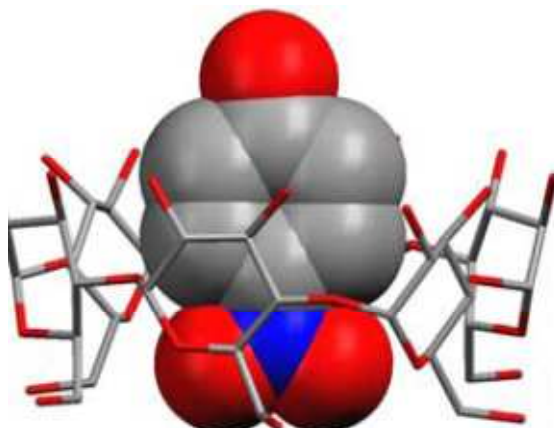
Na širším okraji se v případě  $\alpha$ -cyklodextrinu (obr. 3) nachází 12 sekundárních (připojených v poloze 2 a 3 D-glukosové jednotky), na užším 6 primárních (v poloze 6 D-glukosové jednotky) hydroxylových skupin. Z tohoto důvodu je vnější část cyklu hydrofilní a umožňuje snadnou rozpustnost ve vodě. Oproti tomu je vnitřek dutiny cyklodextrinu lipofilní (vlivem etherických kyslíků O v poloze 4 a některých vazeb C-H). Tím se svou podstatou liší od crown etherů, jejichž dutina je značně hydrofilní. Dále bylo neutronovou difrakcí zjištěno, že kruh zpevňuje pás vodíkových vazeb mezi kyslíky O v poloze 2 a O v poloze 3 hydroxylových skupin sousedních glukosových jednotek <sup>35</sup>. S přibývajícím počtem jednotek v kruhu se délka vodíkových vazeb zkracuje a tím roste pevnost kruhu.

**Obr. 3. - Kalotové a trubičkové znázornění struktury  $\alpha$ -cyklodextrinu <sup>35</sup>.**



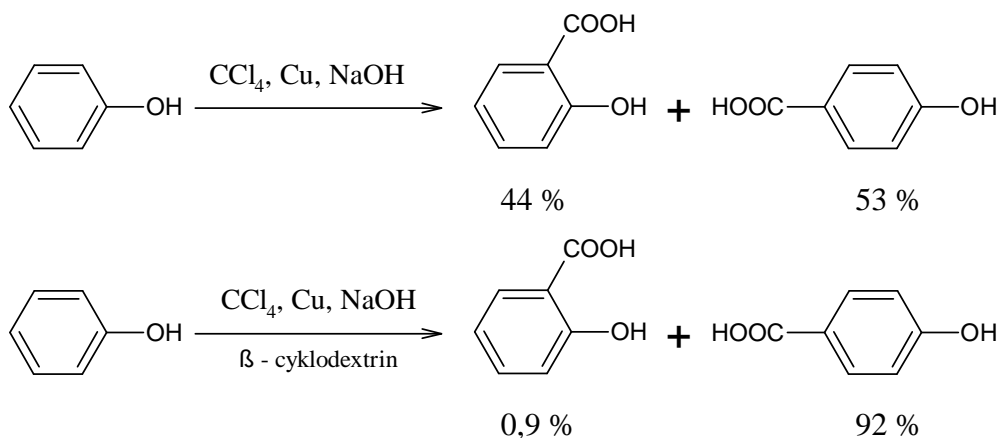
Cyklodextriny mohou tvořit smíšené komplexy s nejrůznějšími molekulami. Molekula je v dutině cyklodextrinu vázána van der Waalsovými, disperzními, případně vodíkovými vazbami. Pro ilustraci benzenový kruh je dostatečně malý, aby se vešel do dutiny  $\alpha$ -cyklodextrinu, anthracen pak pouze do osmičlenného cyklu. Konkrétním příkladem může být komplex 4-nitrofenolu a  $\alpha$ -cyklodextrinu (obr. 4)

Obr. 4. - Znázornění struktury komplexu 4-nitrofenolu a  $\alpha$ -cyklodextrinu <sup>35</sup>.



Cyklodextriny se staly zajímavým objektem supramolekulární chemie, např. pro studium modelování komplexů enzym-substrát. Bylo dokázáno, že cyklodextriny mohou ovlivnit průběh chemické reakce ve smyslu zrychlení či inhibice reakce a také selektivitu reakce.

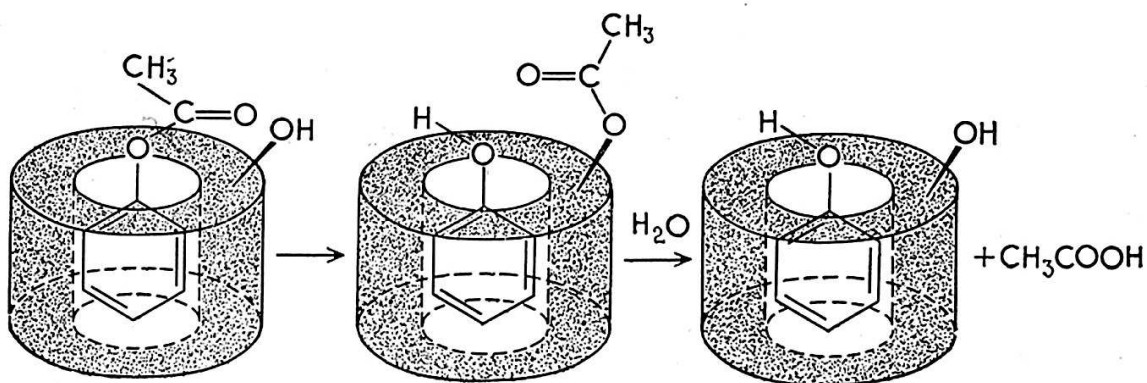
Již v roce 1969 Breslow a Campbell <sup>2</sup> ukázali, že v systému s cyklodextrinem může docházet k selektivní reakci do polohy *para* vlivem sterického bránění poloh *ortho* a *meta*. Reakce byla provedena s vodným roztokem anisolu (0,1 mol/l) a kyselinou chlornou (0,01 mol/l) při pokojové teplotě. V nadbytku cyklodextrinu došlo z 96 % k chloraci do polohy *para* a současně se zvýšila rychlost 6x, což dokazuje, že cyklodextrin nejenom blokuje dané polohy, ale také aktivně katalyzuje substituci v nechráněné poloze. Podobným příkladem může být karboxylace fenolu tetrachlormethanem v bazickém prostředí v přítomnosti mědi, kde podobným způsobem dochází ke sterickému bránění poloh *ortho* a *meta* <sup>35</sup>.



Z uvedených schémat je zřejmé, že  $\beta$ -cyklodextrin významně ovlivňuje selektivitu reakce.

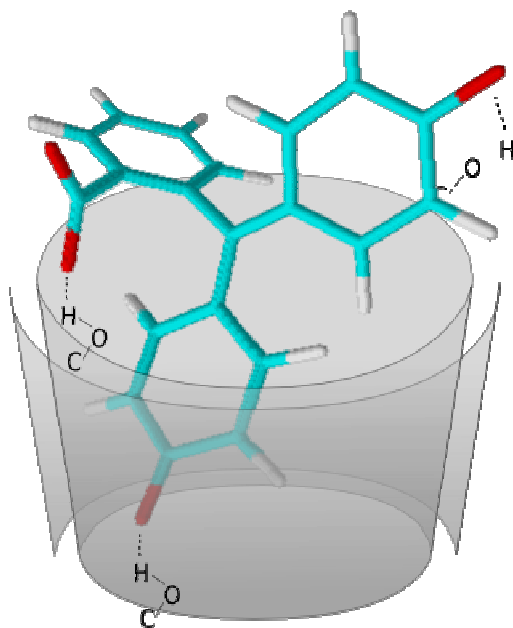
Cyklodextriny lze také použít pro modelování katalytického efektu hydroláz. Za účasti cyklodextrinů se výrazně zvýšila rychlost hydrolýzy aromatických esterů. Tyto látky tvoří s cyklodextrinem komplexy typu hostitel-host. Katalýza se při přenosu acylu účastní OH-skupiny cyklodextrinu (obr. 5).

Obr. 5. - Hydrolýza esteru za účasti cyklodextrinu <sup>2</sup>.



Enzymové modely postupně pronikají do učiva chemie na vysokých školách vzdělávajících učitele, nevylučuje se uplatnění těchto modelů ve speciálních praktikách v rámci gymnaziální chemie. Zajímavý příklad využití cyklodextrinu při utváření modelu aktivního centra enzymu pro potřeby výuky ukázal ve své práci Tausch <sup>44</sup>. Jde o reakci fenolftaleinu s hydroxidem sodným. Za standardních podmínek reaguje fenolftalein s hydroxidem za vzniku barevného produktu. V přítomnosti cyklodextrinu se fenolftalein zabuduje do struktury cyklodextrinu a po přidání hydroxidu sodného se nevytvoří barevný produkt, protože komplex fenolftaleinu s cyklodextrinem neumožňuje vytvoření barevné formy fenolftaleinu (obr. 6, obr. 7).

Obr. 6. - Komplex cyklodextrinu s fenolftaleinem <sup>44</sup>.



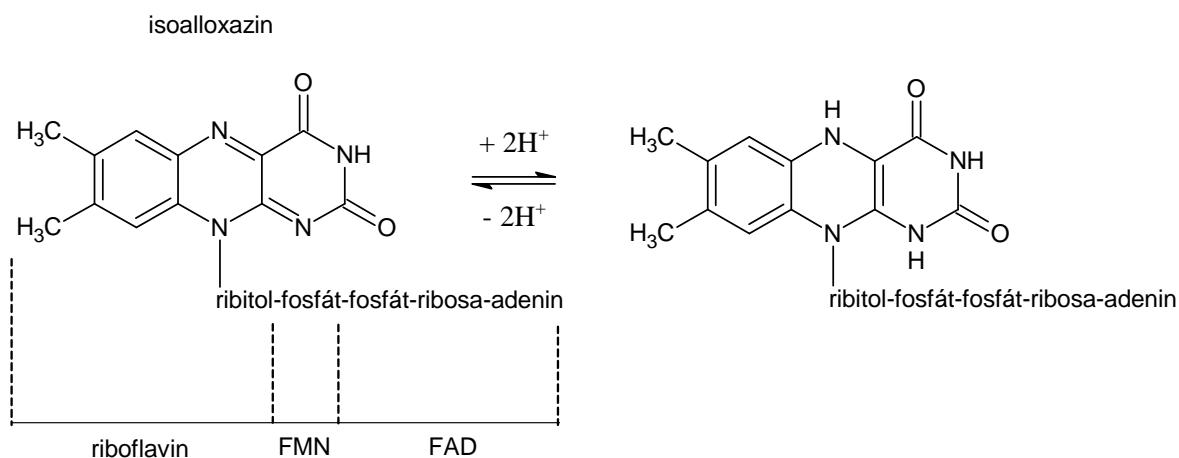
Obr. 7. - Alkalický roztok fenolftaleinu v přítomnosti a bez přítomnosti cyklodextrinu <sup>44</sup>.



## 2.2.2 Modelování biochemických reakcí

Biochemické reakce probíhají téměř bezvýhradně jako reakce katalyzované enzymy. Modelů, které by některou konkrétní reakci či více reakcí látkové přeměny přiblížily s přihlédnutím k potřebám výuky chemie, příliš není. Jednou z možností je použití látek, které se snadno oxidují a redukují pro modelování redoxních procesů spojených a přenosem elektronů. Za účelem modelování takového redoxního systému může být použit riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>). Ten je jako strukturální element součástí prostetické skupiny FAD (flavinadenindinukleotid), která je součástí tzv. flavoproteinů, enzymů třídy oxidoreduktas, účastnících se Krebsova cyklu nebo β-oxidace mastných kyselin. Stejně tak je součástí FMN (flavinmononukleotid), který má podobnou funkci v dýchacím řetězci. Během katalýzy dochází k reverzibilní redukci za vzniku redukovaných forem kofaktorů FADH<sub>2</sub>, nebo FMNH<sub>2</sub>.

**Obr. 8. - Riboflavin - jeho oxidovaná a redukovaná forma.**

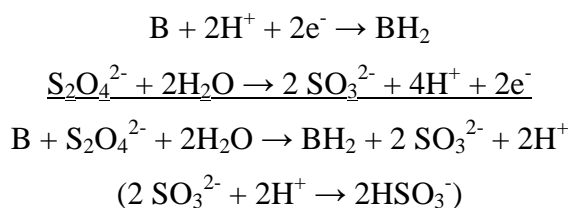


Riboflavin se dříve nazýval laktoflavin vzhledem k jeho výskytu v mléce. Je to žluto-oranžová krystalická látka, tvořená isoalloxazinovým skeletem. Obě formy riboflavinu představují reverzibilní redox systém, oxidovaná forma je barevná, obsahuje chinoidní skelet, který je příčinou barevnosti látky.

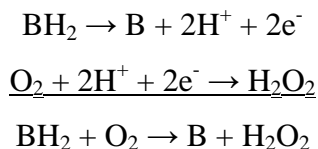
B. Laier a P. Pfeifer ve svém článku „Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>)“<sup>25</sup> modelují pro výukové účely působení FAD a FMN pomocí redukce a reoxidace riboflavinu s detekcí pomocí UV-lampy. Riboflavin se ozáří při 366 nm a emituje charakteristickou fluorescenci.

Po přidání redukčního činidla, dithioničitanu sodného, se riboflavin redukuje na dihydroflavin (bezbarvá leukoforma) a zabarvení mizí, což se projeví i pod UV-lampou. Pokud se zatřepe neuzavřenou baňkou, dochází k reoxidaci vzdušným kyslíkem a roztok opět po ozáření fluoreskuje. Obzvláště působivé je, když se obsah baňky protřepává přímo pod UV-lampou. Reakce může být vícekrát opakována. Tato reakce se dá poměrně jednoduše i bez zvláštních znalostí chemie heterocyklů vysvětlit, použije-li se pro riboflavin např. zkratka B.

1) redukce riboflavinu na dihydroflavin:

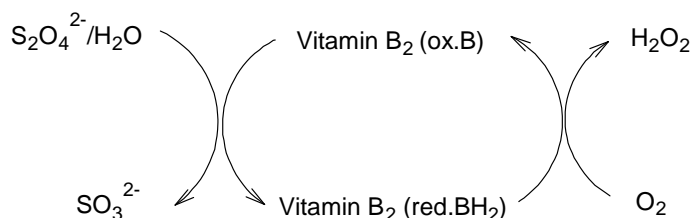


2) reoxidace na riboflavin:



Je možné také použít schéma pro vyjádření cyklického děje podobně jako v případě flavoproteinů při katalýze.

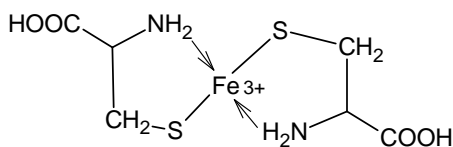
**Obr. 9. - Riboflavin jako součást reverzibilního redoxního systému.**



Vhodným modelem pro znázornění přenosu vodíkových kationtů  $H^+$  (resp. elektronů  $e^-$ ) v dýchacím řetězci může být redoxní systém  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  a cystein, jako donor vodíkových kationtů. V dýchacím řetězci jsou přenášeny elektrony odebrané v případě chemoheterotrofů organickým molekulám (donor) přes soustavu transelektroas (oxidoreduktas) na anorganickou molekulu, u chemoheterotrofů je to kyslík (akceptor). Výsledkem tohoto procesu a s ním spřaženého děje - oxidativní fosforylace, je tvorba ATP. Výukový model některého z komplexů dýchacího řetězce, jako je např. už výše zmíněný FMN popsal ve

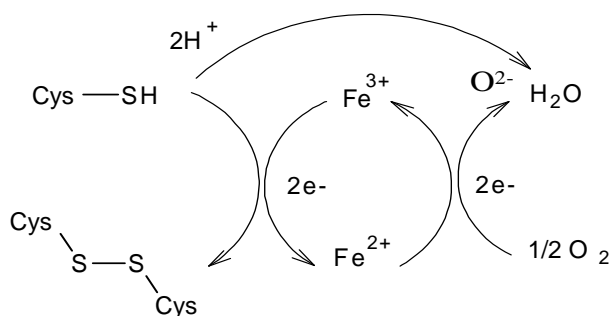
svém článku K. W. Leienbach <sup>29</sup> za použití slabě alkalického roztoku cysteinu a roztoku heptahydrátu síranu železnatého. Kyslík slouží jako akceptor elektronů a protřepáním roztoku vzniká komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -cystein, který způsobuje modré zbarvení roztoku (komplex s  $\text{Fe}^{2+}$  je bezbarvý).

**Obr. 10. - Komplex cysteinu s ionty železa  $\text{Fe}^{3+}$ .**

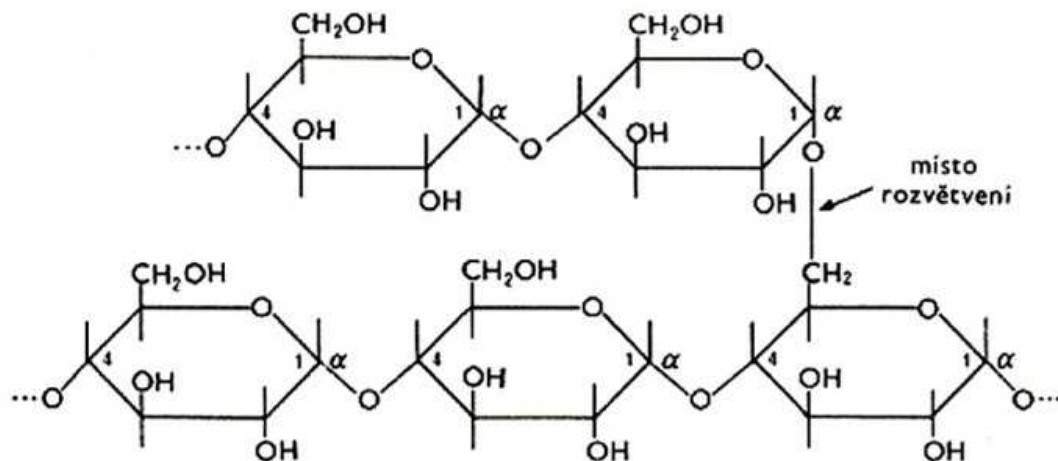


Reakce může být několikrát opakována, dokud není kyslík v láhvi spotřebován. Oxidací cysteinu na cystin dochází ke zpětné redukci železitých iontů na železnaté. Při kontinuálním přísunu kyslíku dojde k trvalému modrému zbarvení roztoku oxidací veškerého cysteinu.

**Obr. 11. - Oxidace cysteinu jako model dýchacího řetězce.**



Jiným způsobem znázornění aktivity enzymu může být pozorování účinku hydrolázy  $\alpha$ -amylasy, která je obsažena ve slinách a její funkcí je štěpení škrobu na maltosu. Jedná se o často ve výuce využívaný a oblíbený experiment, který bývá prezentován jako demonstrační pokus. Škrob je polysacharid tvořený ze dvou různých polysacharidů, amylosy a amylopektinu.



Základní stavební jednotkou jsou monomery glukosy, vázané navzájem  $\alpha$  (1→4) glykosidickou vazbou. Škrob se dá velice snadno dokázat Lugolovým roztokem (roztok jodu ve vodném roztoku jodidu draselného) charakteristickým modrým zbarvením komplexu škrobu s jodem (klathrát). Asi nejznámější a velice často v literatuře uváděný je pokus s Fehlingovým činidlem a amylasou ze slin. Za horka připravený škrobový maz činidlo neredukuje, kdežto po přidání amylasy k roztoku dochází k redukci za vzniku žlutohnědého oxidu měďného, neboť škrob je enzymem štěpen na triosy a maltosu, které mají redukční účinky. Pokus lze snadno provést ve třech zkumavkách naplněných do jedné třetiny škrobovým mazem. Do první se přidá několik kapek Fehlingova činidla (Fehling I+ Fehling II v poměru 1:1), abychom se přesvědčili, že k redukci nedochází. Do druhé a třetí zkumavky se přidá několik kapek Lugolova roztoku, dochází ke zmodrání roztoku (důkaz škrobu). Druhá se ponechá stát jako kontrola, do třetí se přidá roztok slin a poté dochází k odbarvování směsi (důkaz štěpení škrobu účinkem amylasy). Do této zkumavky se pak přidá opět několik kapek Fehlingova činidla, vzniká žlutohnědé zbarvení (důkaz přítomnosti maltosy, redukujícího disacharidu).

Prof. Bukatsch <sup>30</sup> tuto problematiku ještě rozšiřuje o možnosti různých vlivů na aktivitu enzymu. Pokusy jsou prováděny podle předchozího postupu, ale enzym je v roztoku inhibován teplotou (přidáním horké vody před smícháním s amylasou) nebo přítomností solí těžkých kovů (např. přidávkem síranu měďnatého). V návaznosti na teplotu lze zjistit její hodnotu pro optimální působení amylasy, před přidávkem slin je roztok smíchán s temperovanou vodou různé teploty. Teplotní optimum leží přibližně kolem 40 °C. Experimentálně lze také ověřit vliv pH na aktivitu enzymu přidávkem fosfátového pufru o

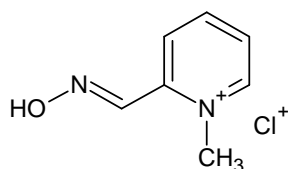
různých hodnotách pH se zjištěním, že enzymová aktivita je neúčinnější při neutrálním pH (ve skutečnosti při pH přibližně 6,9).

Existuje celá řada podobných výukových experimentů s použitím jiných hydrolas, např. proteas (pepsin, trypsin) nebo lipas, tyto experimenty však vyžadují složitější reakční podmínky a méně běžné chemikálie.

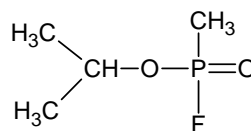
### 2.2.3 Modely působení toxických a antidotních látek

Zcela jinou, ale z praktického hlediska velice důležitou skupinou modelů jsou modely mechanismu působení toxických látek a antidotních přípravků. Vědním oborem, který zkoumá škodlivé působení látek na organismus, je toxikologie. Toxická látka, je látkou vyvolávající škodlivý účinek, přičemž značný vliv má např. její koncentrace, kdy látka je schopna již v malém množství vyvolat závažné změny v organismu. Podle takové definice můžeme jedovaté látky rozdělit od prakticky netoxických až po vysoce toxické, jak je uvedeno v přehledu učebnice toxikologie <sup>18</sup>. Tato problematika je vzhledem k rizikům spojeným s otravou určitou toxickou látkou stále aktuálnější. Ačkoli jsou přístupy k ochraně stále důkladnější a příslušné normy či postupy přísnější, množství látek, které mohou být člověku nebezpečné a se kterými se může dostat v dnešní době do kontaktu, stoupá a jedinec, který s takovými látkami nepracuje, se může i náhodně kontaktovat s některou z toxických látek. V učivu chemie na základní a střední škole jsou v různé míře zařazeny informace o toxických látkách, ale někdy bez jakékoli bližší specifikace jejich působení na lidský organismus či mechanismus působení antidotní látky na toxickou látku. Často chybí informace, jak v takovém případě postupovat nebo jakým způsobem lze takovou látku bezprostředně z těla odstranit a tím i zachránit lidský život. V současné době je této problematice věnována mimořádná pozornost, v učebnicích jsou zařazeny písmenné a obrázkové (ikonické) symboly toxicity chemických látek. Posluchači oboru chemie na vysoké škole mají již v rámci přednášek a cvičení z toxikologie možnost se podrobněji seznámit s problematikou toxických látek a antidotních přípravků. Pro záměry výuky jsou vhodné příklady působení toxických látek na bázi vodorozpustných sloučenin těžkých kovů, které denaturují proteiny případně převádějí ionty biogenních prvků z rozpustné do ve vodě nerozpustné formy (viz. kapitola č. 4.2.4)

Antidotní přípravky nebo také někdy zkráceně antidota (z řec. antidoton – vzhledem k proti, protijed) jsou látky s opačným účinkem proti jiné látce, ve smyslu intoxikace organismu protilátka nebo přesněji protijed. Tyto látky můžeme rozdělit do dvou skupin. Na specifické, které působí přímo na určitou toxickou látku. Vzhledem ke specifičnosti je působení takové látky i účinnější, nicméně takových látek mnoho není. Příkladem může být protamin, respektive protamin sulfát, který se používá jako antidotní přípravek proti heparinu, což je látka, která zabraňuje srážení krve a s protaminem tvoří komplex. Jiným příkladem může být dále zmiňovaný dimerkaprol (viz. str. 53 a 54), který se používá při otravách těžkými kovy, např. rtuť nebo olovem. Při otravách jiným kovem, železem nebo při zvýšeném ukládání železa nebo hliníku v organismu se používá jako chelatační činidlo deferoxamin. Druhou skupinu představují nespecifická antidota, kterých je většina. Do této kategorie je možné zařadit ethanol při otravách methanolem a ethylenglykolem. Pralidoxim je znám jako první antidotum při intoxikaci organofosforovými pesticidy (parathion, chlorpyrifos) nebo nervově paralytickými látkami jako např. sarin. Tyto látky inhibují ireverzibilně enzym acetylcholinesterázu a pralidoxim (2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium-chlorid) se používá ve spojení s atropinem jako reaktivační látka enzymu<sup>26</sup>.



pralidoxim

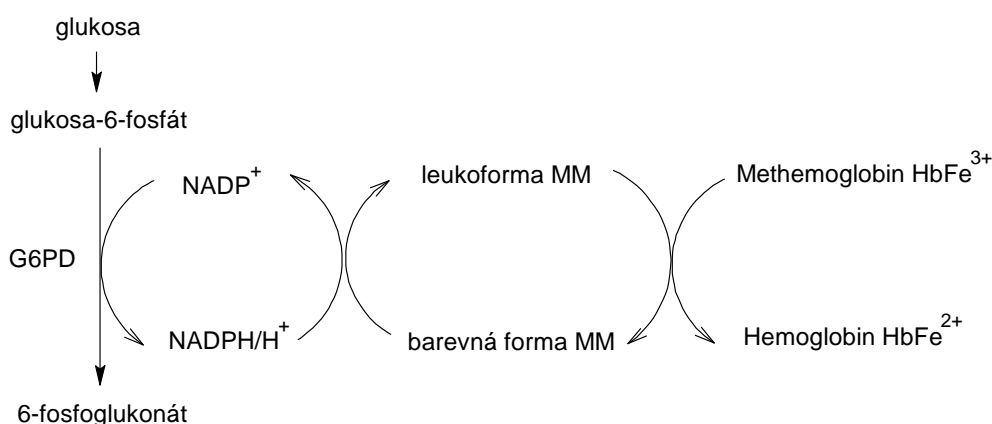


sarin

Velice důležitým antidotním prostředkem této kategorie při tzv. methemoglobinemii je methylenová modř. Methemoglobinemie je charakterizována tvorbou methemoglobinu spojeného s přítomností trojmocného železa, které vzniká oxidací dvojmocného železa v porfyrinovém kruhu hemoglobinu a methemoglobin pak nemá schopnost reverzibilně vázat kyslík a přenášet ho ke tkáním. Methemoglobin se spontánně stále tvoří v malém množství v erythrocytech. Jeho denní produkce představuje asi 0,5-2 %. Zpětná redukce na hemoglobin je zajišťována enzymovými i neenzymovými reakcemi. Enzymovou redukcí zabezpečuje NADH-dependentní methemoglobinreduktasa a neenzymové mechanismy zahrnují působení glutathionu a kyseliny askorbové. Příčiny mohou být různé. Existuje autozomálně recesivní

dědičná forma, která je způsobena vrozeným defektem NADH-dependentní methemoglobinreduktasy nebo přítomností abnormálního hemoglobinu M, kdy vlivem stereochemických změn dochází ke stabilizaci železa v trojmocné formě a methemoglobin je neschopný vázat kyslík <sup>20</sup>. V případě homozygotního jedince je takový stav neslučitelný se životem. Dále pak získaná forma, která může být způsobena celou řadou oxidujících látek, např. oxidy a dalšími sloučeninami dusíku (NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aminy, některé nitrolátky či estery kyseliny dusičné a dusité). Zvláštním příkladem je amylnitrit, ester kyseliny dusité s pentanolem, který se používá jako antidotní látka při otravách kyanidy. Je sám o sobě značně toxický, a také je silným methemoglobinemickým činidlem, ale právě methemoglobin silně váže kyanidový anion a tím chrání cytochrom C oxidasu. Hemoglobin je pak doplněn tvorbou nových červených krvinek <sup>18</sup>. Methemoglobinemii mohou způsobovat některá léčiva (lokální anestetika, fenacetin, sulfonamidy) <sup>19</sup>. Zvýšený obsah methemoglobinu v krvi (zhruba od 40 %) se projeví cyanosou s charakteristickým hnědě-modrým zbarvením, nejdříve očí, rtů, jazyka, uší, později končetin a nakonec celé kůže. Při vysokých koncentracích dochází k hypoxii, únavě, bolestem hlavy a nakonec ke smrti. Jednou z možností při terapii u methemoglobinemie je použití methylenové modři jako oxidačního činidla. Níže je uvedeno možné působení methylenové modře v erythrocytech (MM – methylenová modř, MetHb – methemoglobin, Hb – hemoglobin, G6PD - enzym glukosa-6-fosfát dehydrogenasa):

**Obr. 12. - Redoxní systém methylenová modř - hemoglobin**

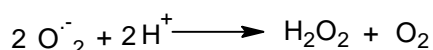
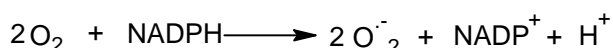


Toto působení lze vysvětlit při určité interpretaci výukovým pokusem známým pod označením Blue-Bottle, který je uveden v kapitole 2.3. Ve smyslu tohoto tématu popisuje Brandl ve svém článku „Menschen mit blauer Hautfarbe - Methämoglobinämie, eine

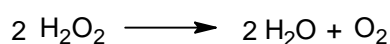
angeborene bzw. erworbene Blutkrankheit“ in vitro experimenty, které ovšem předpokládají manipulaci s hemolyzátem krve, a tudíž jsou pro základní a střední školu nevhodné<sup>21</sup>. Jistou možností takové modelace je provedení oxidace cysteinu prostřednictvím železitých kationtů za vzniku cystinu a redukce Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup>. Tato reakce je vzhledem k reakčnímu mechanismu mnohem vhodnější pro demonstraci modelu dýchacího řetězce a z těchto důvodů je uvedena v předchozí kapitole.

#### 2.2.4 Modely působení antioxidantů

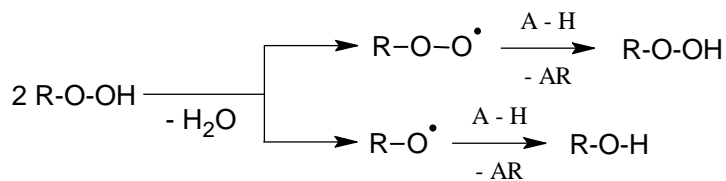
Další důležitou skupinou látek, která nyní stojí v popředí zájmu odborníků a laické veřejnosti, jsou antioxidanty, jak v souvislosti se zdravým životním stylem, tak i s prodloužením trvanlivosti potravin a to především těch, které obsahují větší množství tuků nebo vonných látek povahy terpenů. Antioxidanty jsou látky přírodního i syntetického původu, které reagují s oxidujícími látkami a tím zpomalují oxidační a autooxidační procesy v živých organizmech a potravinách. Látky s oxidačním účinkem, nejčastěji reaktivní formy kyslíku, jejichž představitelem je peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a volné radikály, např. superoxidový anion radikál O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, se mohou do těla dostat prostřednictvím potravy nebo vznikají jako intermediáty metabolismu, např. působením enzymu NADPH – oxidasy se v buňkách tvoří již zmíněný superoxidový anion radikál, který je potom katalyticky přeměněn enzymem superoxidodismutasou na peroxid vodíku.



Působením enzymu katalasy dochází k rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík.



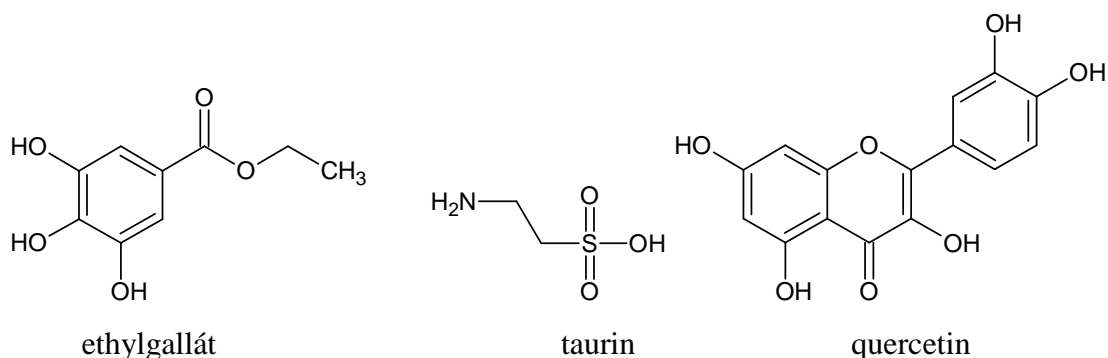
Podstata mechanismu účinku antioxidantů spočívá v tom, že při reakci s volnými radikály poskytují atom vodíku za vzniku peroxidu vodíku, hydroperoxidu nebo jiného neradikálového produktu. Současně přechází antioxidant do formy volného radikálu, který není však tak reaktivní a není schopen iniciovat oxidační proces.



A-H = antioxidant

AR = radikál oxidantu

Volné radikály antioxidantu se mohou deaktivovat buď spojením s dalším radikálem (A·, ROO·, RO·), nebo se disproportionuje na původní antioxidant a odpovídající chinon<sup>43</sup>. Úloha antioxidantu spočívá především ve zkrácení oxidačního řetězce a zrychlení terminačních reakcí. Mezi nejdůležitější antioxidanty v potravě patří fenolové antioxidanty ( tokoferoly, galláty), vitaminy (vitamin A, E, C, B2, kyselina pangamová), karotenoidy a flavonoidy, některé sloučeniny zinku, selenu, manganu a mědi a také antioxidanty na bázi aminokyselin, např. glutathion a taurin.



Obecně jsou tyto látky vnímány pozitivně, zabraňují oxidaci lipidů v potravinách a tím prodlužují jejich trvanlivost, výživovou, sensorickou a toxikologickou hodnotu. Jejich přítomnost v těle má pozitivní vliv na zdraví člověka, eliminací reaktivních sloučenin s oxidačním účinkem dochází k zabránění negativního vlivu těchto látek na cévní systém a vzniku aterosklerózy nebo některých typů rakoviny. V současné době se výzkum zaměřuje také na vliv přemíry antioxidantů na lidský organizmus, především synteticky připravených a podávaných v čisté formě jako potravinový doplněk, které pak mohou působit inhibičně na v těle přirozeně probíhající oxidační procesy a tím působit naopak negativně. Přirozené zdroje antioxidantů, ačkoli jsou konzumovány pravidelně, zvyšují koncentraci antioxidantů v krvi jen nepatrně. Mezi jednoduché výukové pokusy náleží redox reakce kyseliny askorbové

spojené s barevnými změnami, názorně ukazující její antioxidační vlastnosti (např. reakce kyseliny askorbové s ferrikyanidem draselným).

### 2.2.5 Modely působení kancerogenů

Jinou skupinou látek, které jistě tematicky patří do této kapitoly, jsou mutageny neboli látky, působící na strukturu a funkci nukleových kyselin a důsledky tohoto působení se mohou projevit na různých úrovních buněčné organizace. Dnes lze pomocí světelného mikroskopu rozeznat tři typy chromozomálního poškození. Strukturální nebo chromozomální aberace, které postihují strukturu chromozomu, genomové aberace, kdy dochází ke změně počtu některých chromozomů či celého genomu a genové mutace postihující jeden nebo více nukleotidů jednoho genu a neprojeví se proto v morfologii chromozomu. K jejich odhalení slouží techniky molekulární biologie. Do skupiny genových mutací patří tzv. bodové mutace, postihující jediný nukleotid v rámci sekvence DNA – dochází k záměně jediného nukleotidu za jiný. Podle toho, jestli dochází/nedochází k ovlivnění aminokyselinového složení proteinu, jedná se buď o *tichou mutaci* (vzniká triplet, který kóduje stejnou AMK); nebo o mutaci, která mění smysl – *missense mutace* (vzniká triplet, který kóduje jinou AMK) anebo o tzv. stop mutaci – *nonsense mutace*, která vede ke zkrácení proteinu (vzniká triplet, který kóduje STOP kodon) <sup>11, 22</sup>. Většina mutagenů indukuje současně s bodovými mutacemi také chromozomální aberace. Tyto látky jsou někdy nazývány klastogeny a dělí se do tří skupin:

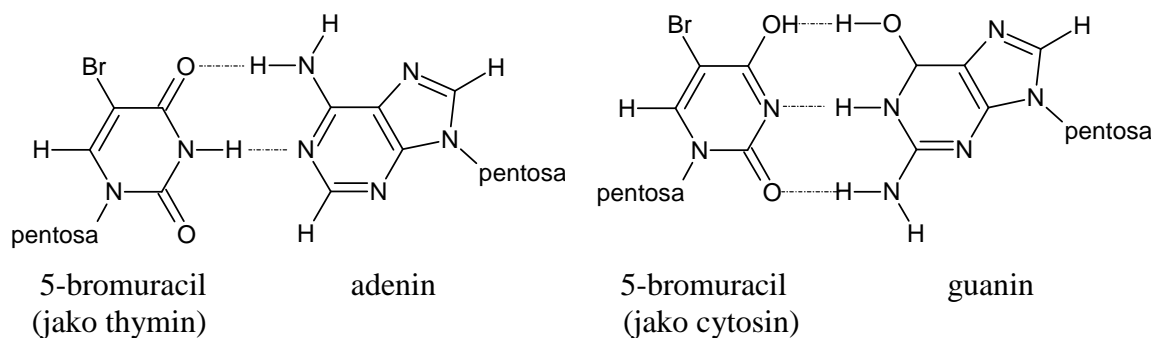
1) Fyzikální klastogeny – např. UV záření, ionizující záření, vysokofrekvenční elektromagnetické záření, ultrazvuk, teplota.

2) Chemické klastogeny – např. alkylační látky, sloučeniny indukující DNA-DNA křížové vazby (mitomycin C), akridiny, radiomimetika (bleomycin), těžké kovy.

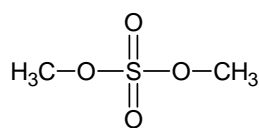
3) Viry

Mutace způsobené nějakým faktorem z výše uvedených skupin se nazývají indukované mutace. Existují ještě mutace vznikající bez známé příčiny a takové se označují jako spontánní.

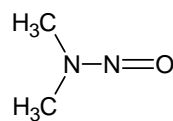
Mutageny patřící do druhé skupiny se také nazývají chemomutageny a jejich počet je velice rozsáhlý, stejně tak jejich účinek, na jehož základě lze chemomutageny rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří analoga bází DNA. Do této kategorie náleží 5-bromuracil, který je analogem thyminu. Tyto látky ovlivňují replikaci DNA.



Druhou skupinou jsou látky, které modifikují strukturu bází DNA. Některé jsou přímými mutageny, reagující s bázemi DNA přímo, jiné tzv. protomutageny, které vyžadují pro toxické působení metabolickou aktivaci. Tyto mutageny působí i za podmínek, kdy se DNA nereplikuje a patří sem celá řada alkylačních činidel, kdy tyto látky intereagují s atomy dusíku či kyslíku purinových a pyrimidinových bází za vzniku odpovídajících alkylderivátů. Příkladem přímého mutagenu jsou alkylsulfáty (např. dimethylsulfát), látkami vyžadujícími metabolickou aktivaci jsou nitrosaminy (např. dimethylnitrosamin), vznikají pak alkylové kationty, jinými látkami tohoto typu jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, které tvoří epoxidy.



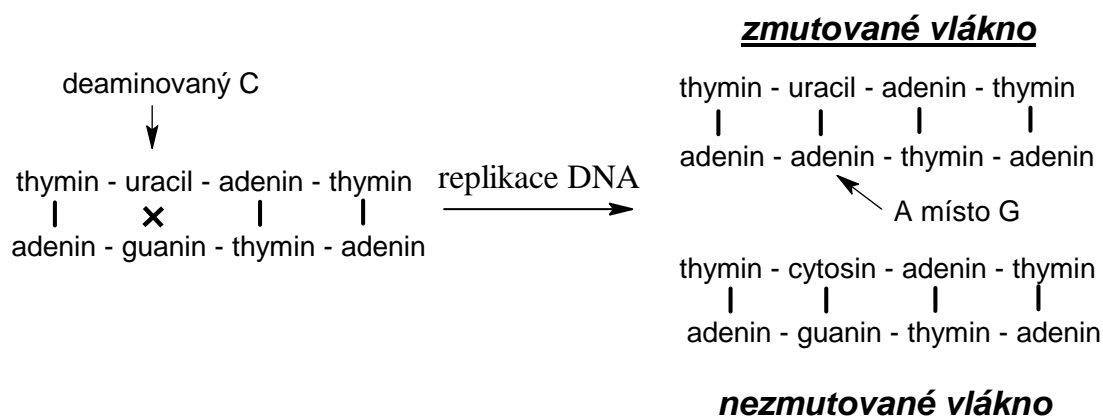
dimethylsulfát



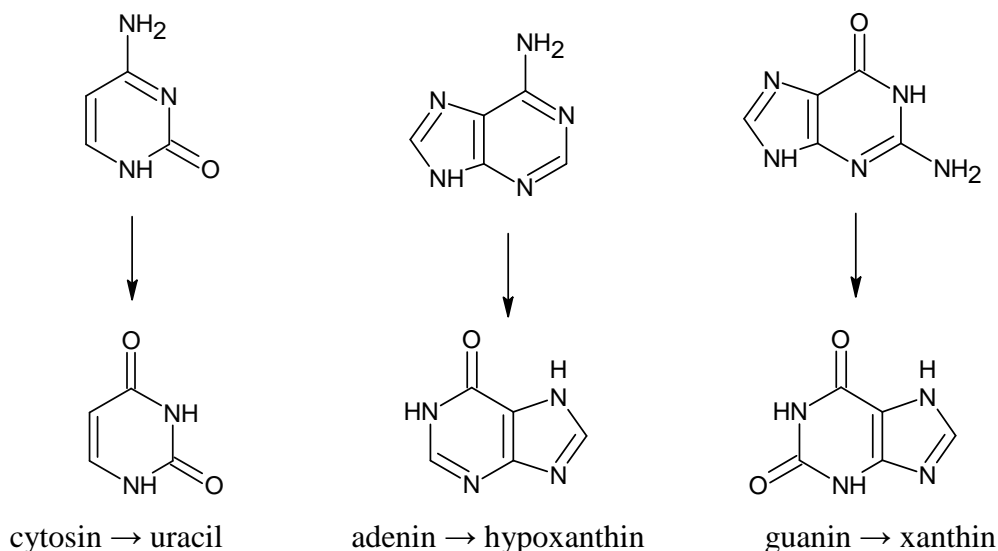
dimethylnitrosamin

Jedním z nejčastějších typů poškození DNA je deaminace (100 bází/buňku/den)<sup>24</sup>. Při této mutaci dochází k přeměně cytosinu na uracil. Podle principu komplementarity se však cytosin ve dvouřetězcové DNA váže s guaninem, ale uracil s thyminem.

**Obr. 13. - Vliv deaminace cytosinu na párování bází při replikaci DNA.**

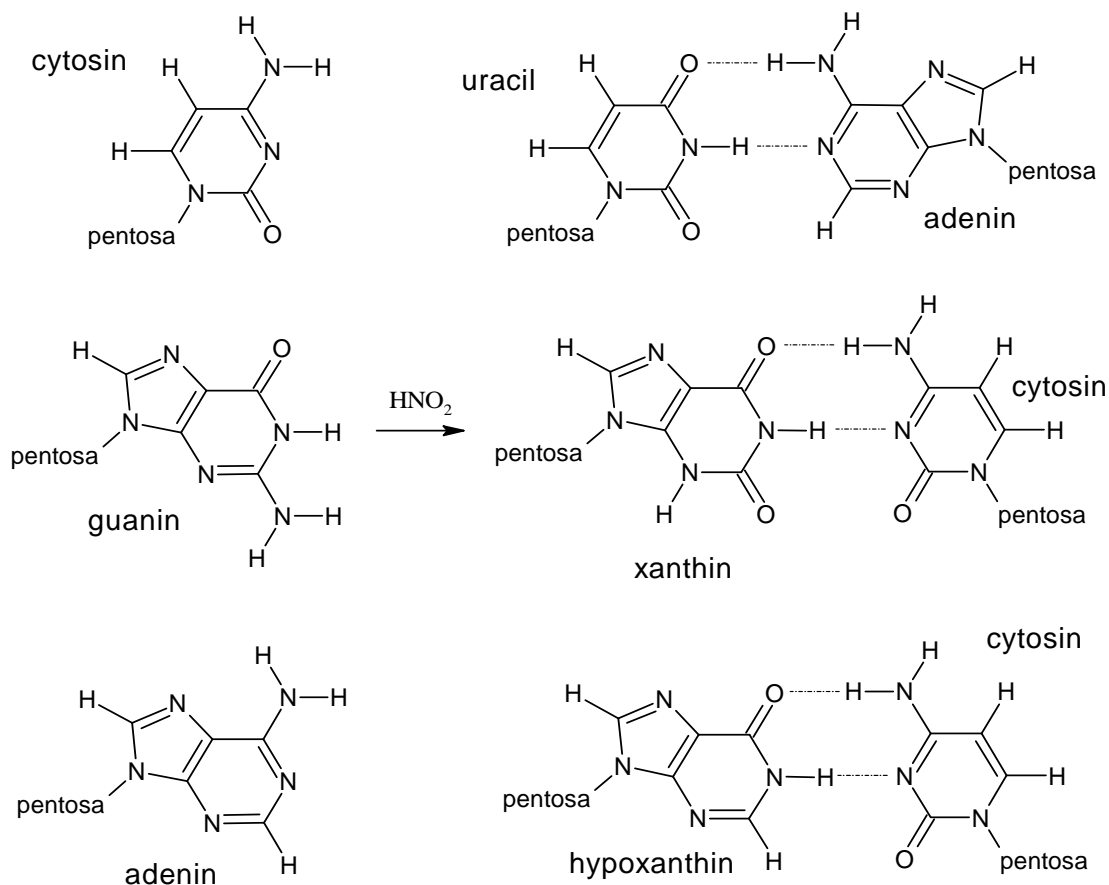


Podobně adenin, který se v normálním případě páruje s thyminem, je přeměněn na hypoxanthin a ten se váže s cytosinem. Může ještě dojít ke změně guaninu na xanthin, ale zde nedochází ke změně vazebního partnera, v obou případech je to cytosin. Mezi látky způsobující deaminaci patří kyselina dusitá. Deaminace bází kyselinou dusitou spočívá v převedení báze, obsahující aminoskupinu na diazoniovou sůl, která se rozloží za uvolnění dusíku na hydroxylovou skupinu, jež okamžitě izomeruje na oxoskupinu (oxo-enol tautomery). Deaminací cytosinu vzniká uracil, adeninu hypoxanthin a guaninu xanthin.

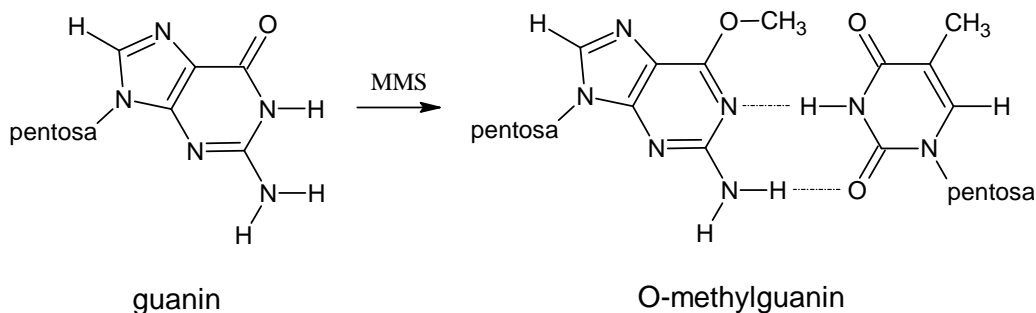


Na následujícím schématu můžeme vidět příslušné párování bází po deaminaci kyselinou dusitou. V prvním případě dochází ke změně komplementárního páru cytosin-guanin na thymin-adenin. U deaminace guaninu nedochází v párování k žádné změně, v obou

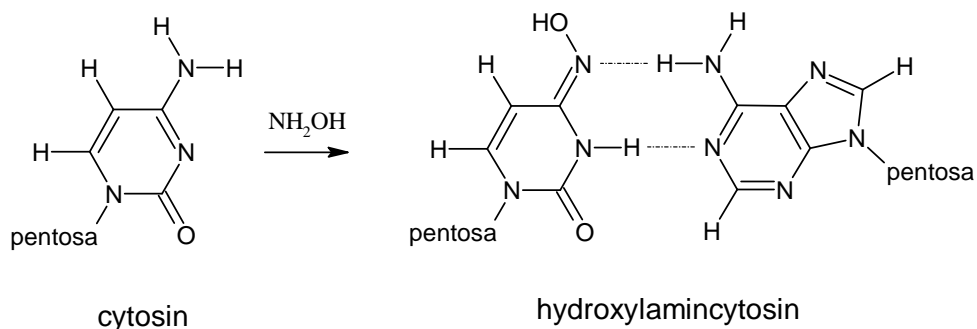
případech je vazebným partnerem cytosin. Deaminací adeninu vzniká hypoxanthin, který se ale páruje s cytosinem, takže původní pár adenin-thymin je změněn na guanin-cytosin.



Méně časté jsou depurinace a depyrimidinace, kdy dochází ke ztrátě nukleotidu. Byla již také zmíněna alkylace, kdy dochází k navázání alkylové skupiny (např.  $\text{CH}_3^-$ ) na bázi. V případě guaninu dochází působením alkylačního činidla methylmethansulfonátu (MMS) k methylaci kyslíku na šestém uhlíku za vzniku O-methylguaninu, který se páruje s thyminem. Původní komplementární pár guanin-cytosin je nahrazen párem adenin-thymin. Některé reakce nemají praktický význam, jiné způsobují mutace chybným párováním během replikace nebo zcela polymeraci zastavují.

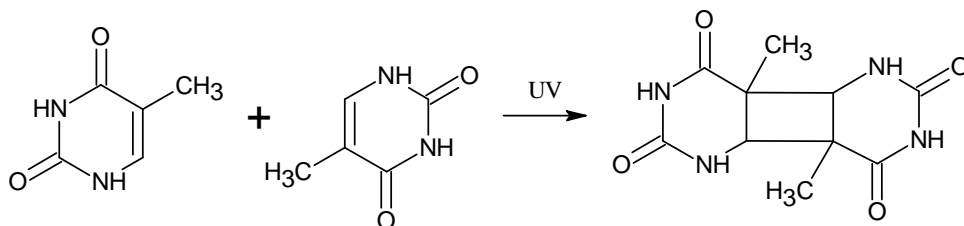


Podobně působí hydroxylační činidla (např. hydroxylamin), kdy z cytosinu vzniká hydroxylamincytosin a ten se místo guaninu váže s adeninem.



Báze nukleových kyselin mohou být využity jako modely biomakromolekul pro demonstraci chemických změn, které mají za následek závažná onkologická onemocnění (např. fotochemická dimerace thyminu) <sup>48</sup>.

**Obr. 14. - Dimerace thyminu.**



Ve výuce chemie se podobné typy experimentů nevyskytují příliš často, jedním z konkrétních příkladů je fotochemická dimerace thyminu <sup>21</sup> aj.

## 2.3 Vybrané konkrétní aplikace bioorganických modelů ve výuce chemie

Stejně jako v každém jiném biologicko-chemickém oboru má modelování biochemických systémů v procesu výuky na základní a obzvláště střední škole zásadní význam pro pochopení či přiblížení dané problematiky žákům. Na nižším gymnáziu a základní škole je v předmětu chemie problematika enzymové katalýzy pouze naznačena, žáci získávají informace o existenci enzymů jako složitých přírodních molekul, které řídí chemické procesy v živých organismech. Z biochemických procesů je i v rámci mezipředmětových vztahů s biologií řešena pouze na základní úrovni fotosyntéza, dále pak získávají žáci informace o existenci přírodních látek, jako jsou bílkoviny, cukry a tuky a o jejich základní stavbě a funkci. Zcela jiná situace je na vyšším gymnáziu, kde žáci absolvovali již organickou chemii a chemii polymerů, podrobněji jsou seznamováni s kapitolami z biochemie. Součástí tohoto učiva je podrobná stavba, funkce a chemické vlastnosti nejdůležitějších skupin přírodních látek, klasifikace a charakteristika enzymů, zjednodušený mechanismus jejich účinku a základy kinetiky enzymové katalýzy a následně i metabolismus jako celek s podrobnější charakteristikou některých jeho částí jako např. glykolýza, Krebsův cyklus a dýchací řetězec,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, močovinový cyklus aj., stejně tak i replikace, transkripce a proteosyntéza. Bylo by samozřejmě velice žádoucí, příslušný výklad doplnit nějakým vhodným modelem těchto složitých molekul či procesů. Takový model má ale ještě další specifika, kterými se výukové modelování liší od modelování bioorganického. Kromě pravidel, která byla zmíněna v kapitole „Bioorganické modely a jejich charakteristika“ musí výukový model ještě splňovat pravidlo jednoduchosti a vhodnosti. To znamená, že kromě vystižení podstaty problému nebo co největšího možného přiblížení způsobu řešení musí být jeho výklad natolik jednoduchý, aby to odpovídalo úrovni středoškolské chemie. Žák při vysvětlení těchto složitých procesů musí pracovat s pojmy, které ovládá a kterým rozumí. Vysvětlení podstaty jevu musí být natolik jednoduché, aby bylo názorným řešením, zároveň musí odpovídat reálnému stavu. Vlastní realizace modelu je prováděna studenty nebo učitelem při vyučování formou experimentu a je tedy nutné, aby používané zařízení bylo pro školu finančně a materiálně dostupné a chemikálie byly netoxické a snadno získatelné. Z těchto důvodů je často velice těžké najít nějaký přijatelný kompromis tak, aby daný model byl co nejjednodušší, odpovídající dané úrovni a zároveň odpovídal reálnému, v přírodě probíhajícímu velice složitému ději. Proto bylo do této doby publikováno jen několik

příkladů, které byly pak většinou nějakým způsobem ještě modifikovány či doplněny. Některé příklady výukových experimentů byly stručně zmíněny již dříve.

### Methylenová modř a Blue bottle

Methylenová modř je významným redoxním indikátorem a její přechod na tzv. bezbarvou leukoformu a naopak ji řadí v organické chemii mezi několik málo reverzibilních redoxních systémů. Tato okolnost v souvislosti s barevnou změnou, ke které dochází při oxidačně redukční reakci, je příčinou toho, že se methylenová modř stala vyhledávanou látkou pro různé typy výukových experimentů. Sloučenina je využívána v pokusech, demonstrujících redoxní reakce organických sloučenin, může být použita v experimentech problémového charakteru, jinou alternativou představuje methylenová modř při modelování složitých biochemických procesů.

Asi neznámější reakcí, modelující reakční mechanismus reverzibilního oxidačně redukčního systému, je reakce „Blue bottle“, která byla poprvé metodicky rozpracována Campbellem v knize „Proč probíhají chemické reakce“<sup>8</sup>. Campbell v první části knihy analyzuje reakci a prostřednictvím série experimentálních pozorování nalézá mechanismus reakce. Tento experiment, jak uvádí Engerer ve své studii<sup>10</sup>, nevysvětluje pouze reakční mechanismus či kinetiku reakce, ale je výborným příkladem tzv. vědecké metody. Blue bottle (modrá láhev) je obecně známá reakce, velmi často využívaná při školních experimentech realizovaných frontálně nebo ji studenti mohou provádět samostatně investigativně-experimentálním způsobem. Používá se jako vizuálně působivá demonstrace a pomůcka pro studium reakčních mechanismů. Je předkládána hypotéza, kterou studenti dokazují v souvislosti s dalšími na sebe navazujícími otázkami a pokusy a výsledkem je potvrzení původní hypotézy o mechanismu reakce. Tento přístup je obzvláště cenný, protože studenti zjišťují, že jejich počáteční hypotézy se nepodařilo vždy experimentálně potvrdit a musí je proto adekvátně korigovat. Studenti průběžně mění hypotézy a podle vývoje experimentu navrhnou další postup, nejde tedy o pouhé shromažďování dat. Tento investigativní způsob je pro studenty velmi motivující. Experiment je poměrně náročný na přípravu učitele, který se musí aktivně zapojovat do diskuze studentů, pozitivně ovlivňovat jejich přístup k řešení problémů a pomoci jim s interpretací výsledků.

V klasické verzi experimentu je D-glukosa přidána k vodnému roztoku hydroxidu sodného současně s malým množstvím methylenové modře. Pokud se roztok protřepává, zmodrá a stáním se opět odbarvuje. Proces se může mnohokrát opakovat. Experiment staví studenty před řadu otázek <sup>9</sup>:

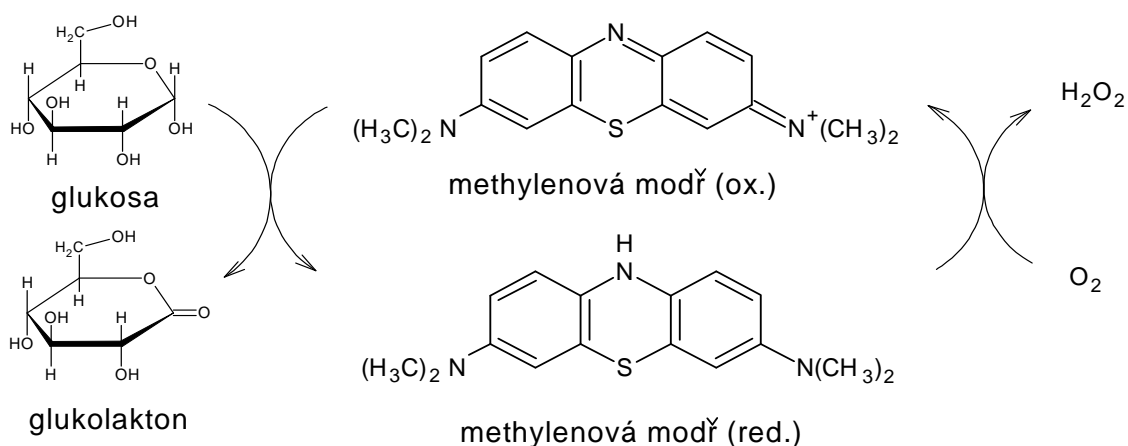
- 1) Mícháním se roztok obohacuje o plynnou složku nad roztokem. V tomto případě lze odvodit, že funkci oxidačního činidla zde má vzdušný kyslík, který se třepáním rozpouští v reakční směsi.
- 2) Kyslík reaguje s některou z látek v roztoku, což přechodně způsobuje vznik modrého meziprojektu.
- 3) Modrý meziprojekt reaguje s některou složkou roztoku za vzniku bezbarvého produktu.
- 4) Změna bezbarvého roztoku na modrý a z modrého na bezbarvý není jeden vratný proces.
- 5) Míchání roztoku delší dobu je příčinou déle trvající reakce, ale ne intenzivnějšího zmodrání. Je to dáno větším množstvím rozpuštěného kyslíku ve směsi.
- 6) Konstantní intenzita modré barvy znamená, že po většinu doby během reakce probíhají oba kroky současně (z modré na bezbarvou a opačně).

Na druhé straně je třeba vyloučit celou řadu nesprávných hypotéz:

- 1) Mícháním roztoku se dodává energie, která iniciuje reakci.
- 2) Cílem míchání je vytvoření homogenního roztoku.
- 3) Změna bezbarvého roztoku na modrý a naopak je jeden vratný proces.

Výsledkem je poznání reakčního mechanismu reakce, kdy se methylenová modř v alkalickém prostředí roztoku glukosy mění na redukovanou bezbarvou formu, tzv. leukoformu. Protřepáváním obsahu baňky dochází k rozpouštění vzdušného kyslíku, jež způsobí oxidaci methylenové modře (redukované bezbarvé formy) na oxidovanou barevnou formu. Stáním se roztok odbarví, protože glukosa reaguje s oxidovanou (barevnou) formou methylenové modři, která se přemění na redukovanou bezbarvou formu (leukoformu) a glukosa se zároveň oxiduje na lakton kyseliny glukonové. V současné době existuje celá řada studií a experimentů, které určitým způsobem tento pokus obohacují nebo modifikují (např. použitím různých substrátů, změnou reakčních podmínek).

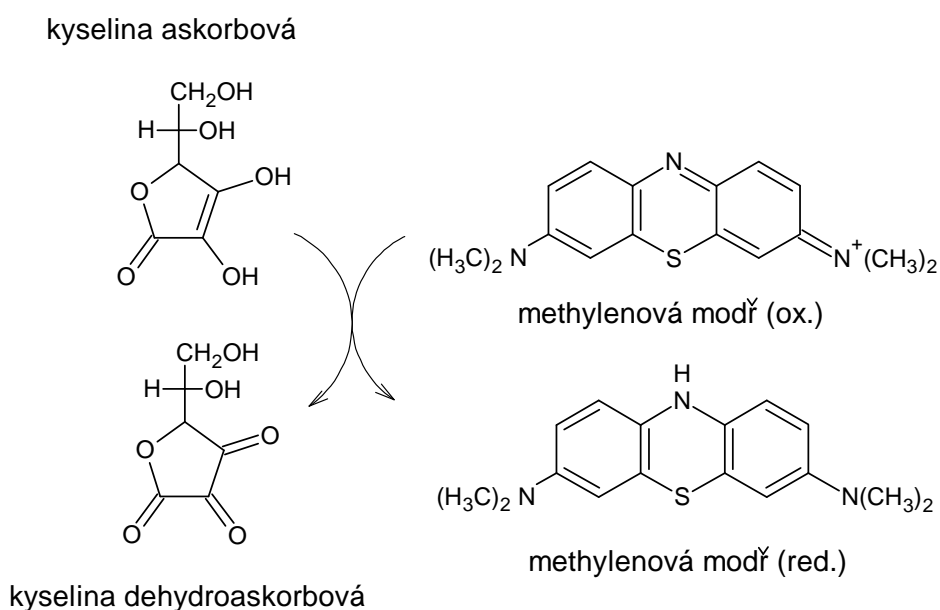
**Obr. 15. - Schéma redoxního systému v případě Blue Bottle**



Určitou alternativu představuje použití jiných sacharidů než glukosy. Mohou se používat jiné redukující sacharidy jako např. D-mannosa a D-galaktosa. Naopak D-sacharosa, která je neredukujícím sacharidem, není pro tento experiment vhodná či může fungovat jako příklad rozdílných chemických vlastností některých sacharidů a důkaz nutnosti redukční skupiny pro zdárný průběh reakce. Pro školní účely je vhodné použít i různé potraviny jako zdroj příslušného sacharidu ve smyslu zlepšení bezpečnosti a snížení nákladů. Nevýhodou je ne zcela kvantitativní odhad příslušných komponent reakce <sup>12</sup>. Může být zajímavým srovnáním rychlost zbarvení směsi na základě přítomnosti určité potraviny a tím i odhad, jaké množství redukujícího sacharidu potravina obsahuje nebo ve srovnání s údaji od výrobce. Určitým srovnáním může být také použití aldehydu s oxoskupinou a alkoholu s hydroxylovou skupinou. Zatímco methanal odbarvuje methylenovou modř a protřepáním může být zbarvení obnoveno, tak reakcí s glycerolem žádné barevné změny nebyly zaznamenány, a proto je pro pozitivní reakci nutná přítomnost oxoskupiny, redukční účinek alkoholu je nedostačující <sup>13</sup>. Existují i jiné varianty tohoto experimentu. Podobný pokus byl popsán Brandlem pod názvem „Red-Bottle“ <sup>21</sup>. V tomto případě se jedná o mechanismus oxidace benzoinu přes stadium barevného radikál-aniontu na benzoát sodný. Barevná změna při této reakci souvisí s přítomností barviva Safranin-T v reakční směsi. Žluto-oranžové zbarvení se mění na červené, odbarvení trvá déle než ve srovnání s Blue bottle. Jako barvivo může být v pokusu „Violett-Blue Bottle“ také použit thioninacetát, bezbarvý roztok se mění na fialový a odbarvení je úplné <sup>14</sup>.

Methylenová modř se často používá ke kinetickým studiím. Zjišťuje se vliv koncentrace jednotlivých složek reakční směsi nebo reakčních podmínek na rychlost reakce. Mowry a Ogren se ve své publikaci „Kinetics of Methylene Blue Reduction by Ascorbic Acid“ zabývají spektrofotometrickým studiem vlivu podmínek na průběh reakce<sup>15</sup>. Cílem těchto studií je kvantitativní zhodnocení závislosti rychlosti reakce na různých faktorech, např. koncentraci methylenové modři a kyseliny askorbové, pH, teplotě nebo vlivu rozpouštědla<sup>16</sup>. Tato problematika svým zaměřením a náročností je vhodná spíše pro vysokoškolské účely. Wellman a Noble ve své již citované studii „Greening the Blue Bottle“ používají methylenovou modř jako barvivo, kyslík jako oxidační činidlo a redukčním činidlem je kyselina askorbová<sup>12</sup>.

**Obr. 16. - Redoxní systém methylenová modř - kyselina askorbová**



Zajímavým využitím methylenové modře je důkaz Schardingerova enzymu v mléce. Při pokusu se používá čerstvé mléko a kupované, pasterizované. Do roztoku se přidá methanal a methylenová modř. Roztok s čerstvým mlékem se odbarví asi po 2 minutách, tepelně zpracované mléko zůstane modře zbarvené i po dlouhé době. Methanal se ve vodném roztoku vyskytuje v rovnovážném stavu s methandiolem. Prostřednictvím Schardingerova enzymu se z diolu odštěpí atomy vodíku, přičemž methylenová modř funguje jako jejich akceptor a přechází na bezbarvou leukoformu. Tento enzym obsahuje pouze čerstvé mléko, při teplotě nad 60 °C dochází k jeho denaturaci<sup>17</sup>.

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce je vypracování podkladů pro výukové experimenty, které s využitím jednoduchých bioorganických modelů přibližují studentům vysokých a žákům středních škol podstatu složitých biochemických procesů. Jde o experimenty prezentující např. metodologii tvorby a využití bioorganických modelů, ale i novou interpretaci známých pokusů. Jedním ze stěžejních úkolů této disertační práce je **ověření přínosu začlenění příslušného experimentu do výuky chemie na gymnáziu za účelem osvojení si daného učiva studenty**. Podstata metody je jednoduchá, určitým skupinám žáků je probírané učivo kromě teoretického výkladu ještě doplněno vhodným tematickým experimentem, který se provádí samostatně nebo v malých skupinách a jiné skupiny žáků jsou seznámeny s danou chemickou problematikou pouze prostřednictvím teoretického výkladu učitele. Obě skupiny jsou poté srovnávány a hodnoceny s využitím dotazníkového šetření a na základě rozdílu úspěšnosti mezi těmito skupinami je možné zjistit vliv experimentu na osvojení si dané chemické problematiky. Pro tento účel byl vybrán tematický okruh z toxikologie – toxické látky a antidotní přípravky, protože modelové reakce jsou jednoduché srážecí nebo komplexotvorné reakce, kdy si žáci mohou odvodit principy působení antidotního přípravku na vodorozpustné toxické látky a tím rozlišit toxickou látku, která je ve vodě rozpustná od jejího nerozpustného derivátu, který má např. konzistenci sraženiny nebo barevného komplexu a je pro organismus prakticky neškodný. Dále jsou reakce velmi nenáročné na laboratorní vybavení a vlastní přípravu experimentu. Pracuje se v mikro nebo semimikroměřítku a s nízkými koncentracemi, proto je nebezpečí otravy spojené s prací s toxickými látkami minimalizováno. Vybrané tematické celky slouží jako podklad pro vypracování návodů experimentálních úloh, které jsou určeny pro vybraná laboratorní cvičení na vysokých školách vzdělávajících učitele chemie i praktika pro zájemce na gymnáziích.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Pomůcky a chemikálie

amoniak, p., Penta, ČR  
dusičnan kademnatý, p.a., Lachema, ČSR  
dusičnan olovnatý, p.a., Lachema, ČSR  
dusitan sodný, p.a., Lachema, ČSR  
fluorid sodný, p.a., Lachema, ČSR  
hexakynoželeznatan sodný, p.a., Lachema, ČSR  
hydroxid sodný, p.a., Labar, ČR  
chlorid barnatý, p.a., Lachema, ČSR  
chlorid vápenatý, p.a., Lachema, ČSR  
komplexon III p.a., Lachema, ČSR  
kyselina chlorovodíková, p.a., Penta, ČSR  
kyselina šťavelová, p.a., Lachema, ČSR  
kyselina trihydrogenfosforečná, p.a., Lach:ner, ČSR  
síran měďnatý, p.a., Pirvos, ČR  
peroxid vodíku, p.a., Lachema, ČSR  
síran sodný, p.a., Lachema, ČSR

aceton, , p.a., Lach:ner, ČR  
albumin, p.a., Sigma, SRN  
anilin, p.a., Lachema, ČSR  
butan-1-ol, p.a., Lachema, ČSR  
cystein, p.a., Aldrich, SRN  
cytosin, p.a., Fluka, Švýcarsko  
difenylamin, p.a., Lachema, ČSR  
ethyl-acetát, p.a., Lach:ner, ČR  
glukosa, p.a., Lachema, ČSR  
glutathion, p.a., Aldrich, SRN

isopropylalkohol, p.a., Lach:ner, ČR  
kyselina octová, p.a., Lachema, ČSR  
methylenová modř, p.a., Lachema, ČSR  
močovina, p.a., Lachema, ČSR  
ninhydrin, p.a., Merck, SRN  
škrob, p.a., Lachema, ČSR  
uracil, p.a., Fluka, Švýcarsko

kádinka (50 cm<sup>3</sup>, 100 cm<sup>3</sup>)  
kuželová baňka se zátkou (1000 cm<sup>3</sup>)  
mikrokapiláry  
odměrný válec (50 cm<sup>3</sup>, 500 cm<sup>3</sup>)  
pipeta (10 cm<sup>3</sup>)  
skleněná tyčinka  
zkumavky

držák na kádinky  
elektrický vaříč  
chromatografická komora s krycím sklem  
kahan  
stojánek na zkumavky  
stopky  
sušárna  
tenká vrstva silikagelu, Kavalier, ČR  
tenká vrstva silikagelu s luminiscenčním indikátorem ( $\lambda=254$  nm), Macherey-Nagel, SRN  
UV lampa na detekci chromatogramů, Camag, Švýcarsko  
váhy

## 4.2 Návrhy výukových experimentů

### 4.2.1 Modelování biuretové reakce<sup>27</sup>

Biuretová reakce je v analytické chemii jedním ze základních způsobů kvantitativního stanovení a kvalitativního důkazu přítomnosti bílkovin. Je založena na reakci měďnaté soli s bílkovinou v alkalickém prostředí, při které vzniká modrofialový produkt. Pro pozitivní výsledek reakce je nutná přítomnost peptidické vazby (-NH-CO-), a proto pozitivní výsledek vykazují i reakce s podstatně jednoduššími látkami obsahujícími peptidickou vazbu než je tomu v případě bílkovin, např. s biuretem. Podobně jako v případě reakce síranu měďnatého s vaječným albuminem reaguje biuret se síranem měďnatým za vzniku modrofialového produktu. Vzhledem k zabarvení produktu můžeme konstatovat, že charakter interakce měďnaté soli s albuminem a biuretem je srovnatelný. Lze provést oba pokusy paralelně s identickým výsledkem a v takovém případě se jedná o klasický příklad bioorganického modelu reakce měďnaté soli s bílkovinou, molekulu biuretu můžeme v této souvislosti považovat za jednoduchý model molekuly albuminu. Výsledek reakce je srovnatelný, i když řetězec bílkoviny se od řetězce biuretu strukturálně liší.

-NH-CH(R)-CO-NH- CH(R)-CO-  
obecné schéma peptidového řetězce

NH<sub>3</sub>  
amoniak

H<sub>2</sub>N-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>  
biuret

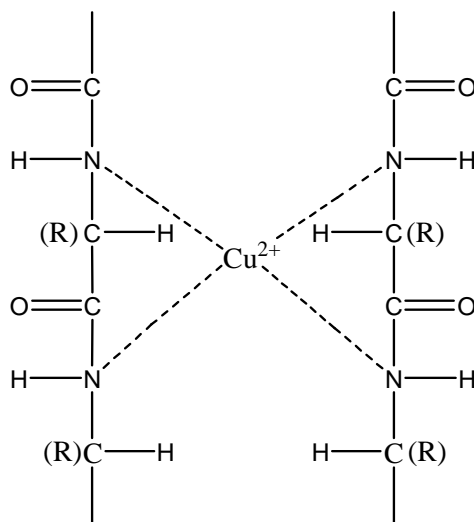
H<sub>2</sub>N-CO-NH<sub>2</sub>  
močovina

V řetězci biuretu se střídají atomy dusíku a uhlíku amidické skupiny. Pro demonstraci lze použít i strukturálně jednodušší látky, strukturálně související s biuretem (amoniak, močovina). V takovém případě je výsledek reakce jiný, síran měďnatý tvoří s amoniakem sytě modrý produkt - síran tetraamminměďnatý, při reakci s močovinou se tvoří světle modrý produkt. Na obrázku č. 27. (viz. příloha) je zřetelně vidět, že vzhled komplexu měďnaté soli s amoniakem a s močovinou je zcela odlišný od komplexu s biuretem či albuminem. Porovnání komplexů měďnaté soli s amoniakem, močovinou, biuretem a albuminem ukazuje, že

komplex měďnaté soli s bílkovinou zřejmě souvisí s přítomností peptidové vazby v molekule. Zbarvení komplexu měďnaté soli s albuminem a biuretem mají podobný odstín, komplex měďnaté soli s amoniakem a močovinou mají jiný vzhled.

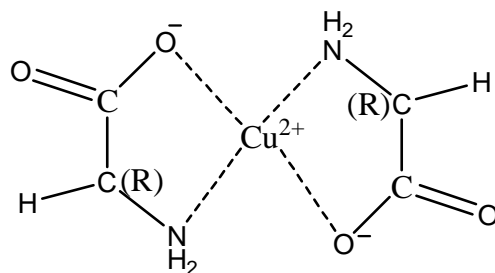
Jistým problémem je struktura takového komplexu, tedy měďnatého kationtu s molekulou biuretu či albuminu. Je zajímavé, že u tak zcela průkazného a jednoduchého modelu neexistuje přesně stanovený model daného komplexu soli. Dostupné navrhované struktury<sup>31, 32</sup> se blíží modelu komplexu měďnaté soli se čtyřmi molekulami biuretu prostřednictvím centrální -NH- skupiny.

**Obr. 17. - Komplex peptidového řetězce s  $\text{Cu}^{2+}$  kationtem**

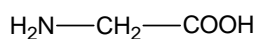


Jinou cestu bioorganických modelů představuje interakce měďnaté soli s aminokyselinami, peptidem a bílkovinou.  $\alpha$ -aminokyseliny tvoří s měďnatými solemi modré cheláty a s kratšími peptidy komplexy, jejichž odstín je dán délkou řetězce peptidu a tím počtem peptidických vazeb<sup>28</sup>. Peptidy se čtyřmi a více aminokyselinovými zbytky dávají při reakci např. červené zbarvení, tripeptidy např. fialové a reakce s dipeptidy jsou neprůkazné.

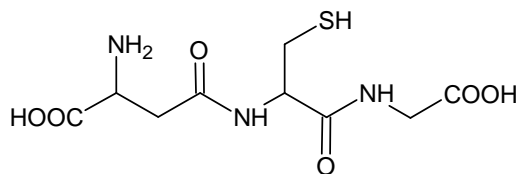
Obr. 18. - Chelát  $\alpha$ -aminokyseliny s  $\text{Cu}^{2+}$  kationtem



Je možné vytvořit modelovou řadu z látek, které jsou si strukturně podobné, ale s odlišnou délkou řetězce <sup>47</sup>. Můžeme takto porovnat například glycin, glutathion a albumin. Glycin je jedním ze strukturně nejjednodušších zástupců aminokyselin a je jednou ze základních složek bílkovin. Jako zástupce  $\alpha$ -aminokyselin neobsahuje peptidickou vazbu. Glutathion je složen ze tří aminokyselin (z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu) a představuje zástupce jednodušších peptidů (konkrétně se jedná o tripeptid). Albumin je bílkovina, obsažená např. v bílku slepičího vejce (vaječný albumin).



glycin

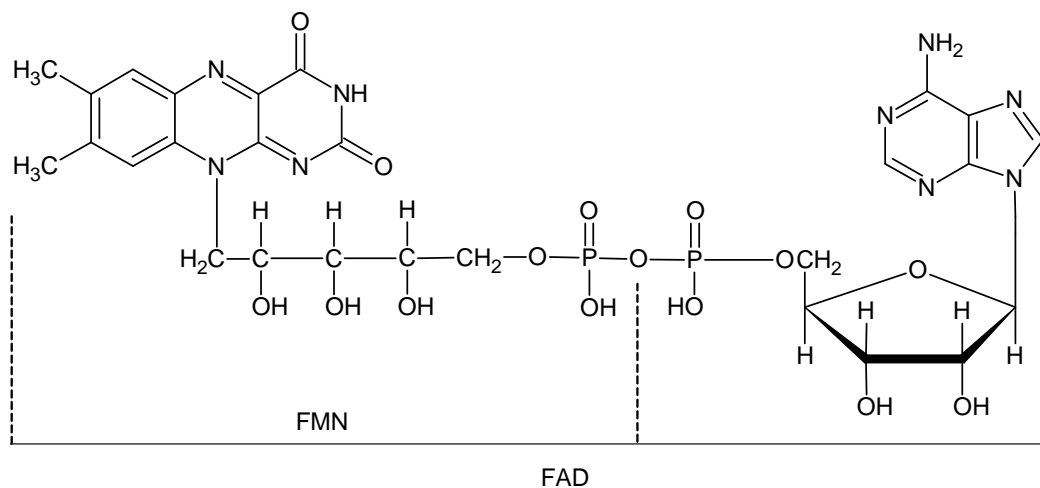


glutathion

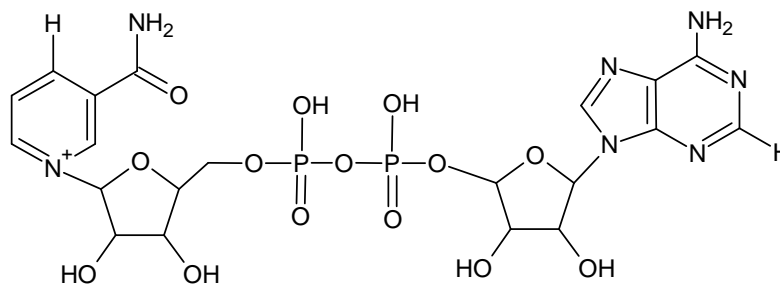
Reakce jednotlivých sloučenin s měďnatou solí vede k barevným produktům, vzájemně se lišícím odstínem modré barvy. Glycin tvoří v alkalickém prostředí s měďnatou solí tmavě modrý chelát (viz. obr. 18). Ani glutathion neposkytuje reakci s měďnatou solí v alkalickém prostředí barevně tradiční komplex, ale vzniká světle modrý produkt. Vaječný albumin za uvedených podmínek vytváří očekávaný modrofialový komplex. Tomuto produktu je přisuzována struktura, znázorněná na obr. 17 a pro pozitivní výsledek biuretové reakce je tedy nutná přítomnost delšího řetězce. Biuretová reakce souvisí s přítomností peptidické vazby v molekule s delším řetězcem.

#### 4.2.2 Methylenová modř jako model koenzymu

Význam methylenové modři jako bioorganického modelu byl popsán v teoretické části o aplikaci bioorganických modelů ve výuce chemie. Campbellův experiment oxidace glukosy "Blue Bottle" lze použít i pro objasnění a pochopení složitého mechanismu přenosu atomu vodíku a elektronů prostřednictvím dehydrogenáz (NAD, FAD nebo FMN) <sup>41</sup>.



flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD)

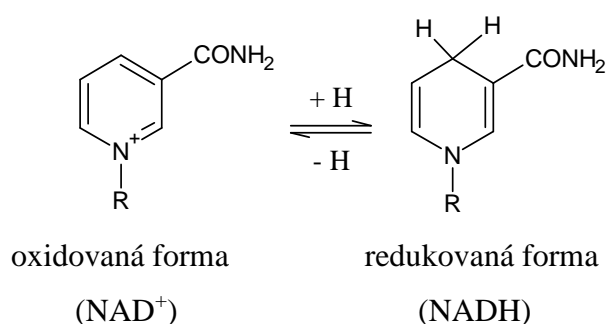


nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>)

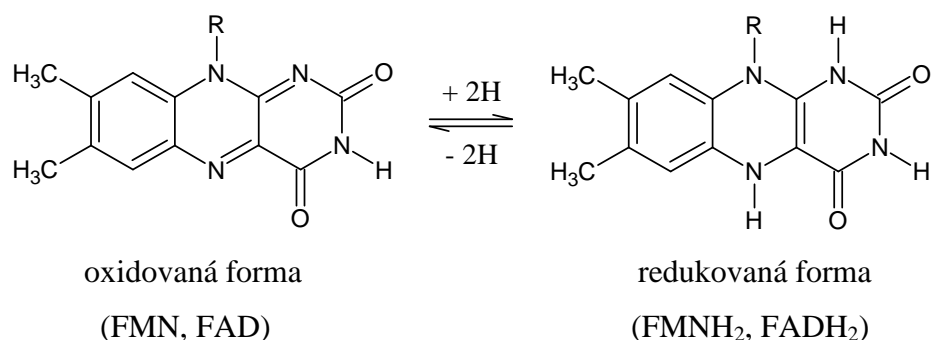
Methylenová modř v tomto případě představuje jako redoxindikátor model katalytického centra uvedených enzymů, protože její struktura je nápadně podobná struktuře heterocyklů ve FAD a FMN, přenos atomu vodíku a elektronů připomíná mechanismus, který se uplatňuje v NAD. Přenos atomu vodíku a elektronů je spojen se změnou struktury indikátoru a tato změna je stejně jako u enzymových reakcí reverzibilní. Substrátem je v tomto případě glukosa, která je oxidována methylenovou modří na glukolakton, methylenová modř přechází na redukovanou formu, která je bezbarvá. Reakce může být opakována

protřepáním, kdy dochází k oxidaci methylenové modři (modré zbarvení) vzdušným kyslíkem (viz. obr. 34 v příloze). S možností příslušného laboratorního vybavení lze průběh reakce sledovat spektrofotometricky nebo potenciometricky.

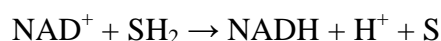
Podle podobného mechanismu odebírá  $\text{NAD}^+$  (kofaktor transhydrogenas) dva vodíky substrátům (především povahy primárních a sekundárních alkoholů a aldehydů). Jeden se váže v poloze 4 na pyridinový kruh nikotinamidu, druhý na apoenzym. Protože tento kruh u redukované formy zaniká, mění se i absorbance v UV oblasti a tím lze tuto změnu detekovat.



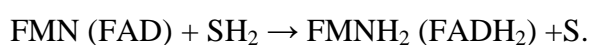
Demonstrace průběhu transferu vodíku je v případě flavinových nukleotidů ještě věrohodnější, právě z důvodu přítomnosti flavinového kruhu. Stejně jako v případě methylenové modři i zde dochází ke změně zbarvení. Oxidovaná forma flavinových enzymů má barvu žlutou, redukována je bezbarvá (leuko-forma).



Pomocí methylenové modři lze vhodně demonstrovat chování systému:



a zároveň modelování systému:



Tradiční Cambellův experiment je proto možné interpretovat v jiných souvislostech.

#### 4.2.3 Modelování vlivu reakčních podmínek - štěpení škrobu amylasou

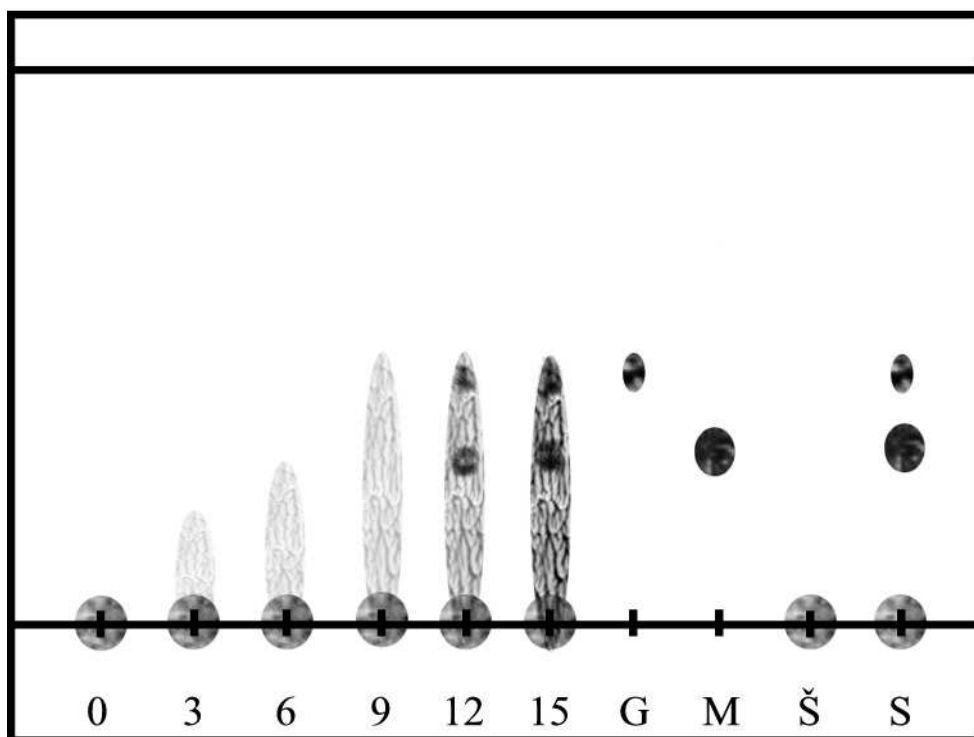
Pro tento typ experimentu je zcela snadné najít zdroj vlastního enzymu, protože v lidských slinách je jeho nevyčerpatelná zásoba. Pro vlastní objasnění experimentu především při detekci produktu reakce je ale nutné znát způsob štěpení škrobu amylasou, resp. i pro svou specifickou různé typy amylas. Existují tři typy amylas.  $\alpha$ -amylasa, která štěpí na kterémkoliv místě 1,4- $\alpha$ -glykosidické vazby polysacharidového řetězce. Podmínkou je přítomnost minimálně tří uvedených vazeb, protože hydrolytické štěpení disacharidů a trisacharidů není tímto enzymem úspěšné. Produktem takového štěpení jsou glukosa, maltosa a oligosacharidy  $\alpha$ -dextriny.  $\beta$ -amylasa štěpí 1,4- $\alpha$ -glykosidické vazby polysacharidového řetězce do jeho větvení, produkty štěpení jsou maltosa a  $\beta$ -dextriny. Existuje ještě  $\gamma$ -amylasa, která hydrolyzuje 1,4- $\alpha$  a 1,6- $\alpha$  glykosidické vazby za vzniku glukosy. Pro nás je nejdůležitější první ze zmiňovaných,  $\alpha$ -amylasa, právě pro její výskyt ve slinách (triviálním názvem se označuje jako ptyalin). Kromě slin se tento typ enzymu nachází ještě v pankreatické šťávě, vylučované do duodena (dvanáctníku) tenkého střeva. Ze způsobu štěpení polysacharidového řetězce  $\alpha$ -amylasou rozlišujeme dvě formy enzymu, tzv. zkapalňující  $\alpha$ -amylasu, která štěpí oligomery o 15 a více glukosových jednotkách a zcukrující  $\alpha$ -amylasu, štěpící tetramery glukosy<sup>33</sup>.

Vedle známých experimentů s Lugolovým a Fehlingovým činidlem lze ještě působení amylasy na škrob demonstrovat s využitím identifikace produktů štěpení na tenké vrstvě silikagelu (Silufol). Výsledkem experimentu je důkaz látek, vzniklých štěpením a vzhledem k zabarvení a velikosti skvrn na tenké vrstvě i poskytnutí většího množství informací kvantitativního charakteru o průběhu enzymatického štěpení než v klasickém podání. Podobně i u této metody může být funkce enzymu ovlivňována různými fyzikálními faktory (např. pH) či inhibitory (např. soli těžkých kovů). Roztok škrobového mazu se před přidáním směsi slin a destilované vody smíchá s malým množstvím dusičnanu stříbrného, v jiném případě s hydroxidem sodným. Po přidání těžkého kovu či hydroxidu se experiment provede zcela identicky jako v předchozím pokusu. V tomto případě nedochází při detekci na tenké vrstvě k tvorbě charakteristických skvrn, aktivita enzymu je inhibována nízkým pH, resp. přítomností soli těžkého kovu (denaturace enzymu).

Vlastní experiment se provádí v kádince o objemu 50 cm<sup>3</sup> při pokojové teplotě (25 °C). Škrobový maz je smíchán se směsí slin a vody v poměru 1:1 a vzorky reakční směsi jsou pak

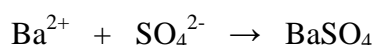
odebírány v přesně stanovených časových intervalech po třech minutách (0, 3, 6, 9, 12 a 15 minut) a nanášeny mikrokapilárou na tenkou vrstvu. Pro eluci nanášených vzorků byla použita směs ethyl-acetát : isopropylalkohol : voda v poměru 3 : 3 : 1, jako detekčního činidla bylo použito směsi difenylaminu, anilinu a kyseliny fosforečné. Zviditelnění chromatogramu se po postřiku detekčním činidlem provádí v sušárně. Kromě vzorků odebraných v jednotlivých časových intervalech jsou na chromatogram ještě nanášeny kontrolní vzorky glukosy, maltosy a škrobu. Z chromatogramu (viz. obr. 19) lze potom odvodit malé množství glukosy ( $R_F= 0,43$ ), dále větší množství maltosy ( $R_F= 0,30$ ) a také těžko identifikovatelných látek, pravděpodobně oligosacharidů typu trimerů a tetramerů ( $R_F= 0,17$  a  $R_F= 0,08$ ). Koncentrace všech těchto látek se s postupujícím časem zvětšuje.

**Obr. 19. - Chromatogram monitoringu průběhu štěpení škrobu  $\alpha$ -amylasou (0-15 je čas v minutách, G - glukosa, M - maltosa, Š - škrob, S - směs)**

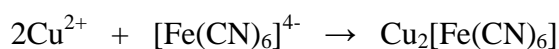


#### 4.2.4 Modely působení toxických látek a antidotních přípravků

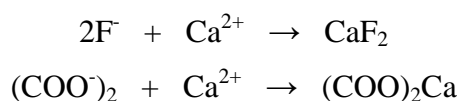
Mechanismus působení toxické látky na organismus nebo antidotní látky lze prokázat nebo modelovat zcela jednoduchou formou prostřednictvím srážecích nebo komplexotvorných reakcí <sup>46</sup>. Antidotní přípravky mohou fungovat různými mechanismy, nejčastěji převedením toxické látky na látku netoxickou nebo změnou struktury látky tělu přirozené, jejíž struktura byla pozměněna toxickou látkou <sup>7</sup>. Mnohem jednodušší a tedy i vhodnější pro výukové modely je první skupina reakcí. Většinou se jedná o přeměnu toxické látky ve vodě rozpustné na látku nerozpustnou nebo rozpustnou, ale netoxickou (různé typy komplexů). Jako antidotní přípravek pro vodorozpustné sloučeniny barya se používá síran sodný. Rozpustné barnaté sloučeniny tvoří se síranem sodným nerozpustný síran barnatý (bílá sraženina). Reakce se provede ve zkumavce s 3 cm<sup>3</sup> 1% roztoku chloridu barnatého a několika kapkami 3% roztoku síranu sodného. Vytvoří se bílá sraženina síranu barnatého, který je netoxický, protože je nerozpustný ve vodě (obr. 28 v příloze).



Podobně rozpustné sloučeniny mědi mohou být stejným způsobem vysráženy z roztoku reakcí s hexakyanoželeznatanem sodným (pro výukové účely lze použít i sůl draselnou) za vzniku hexakyanoželeznatanu měďnatého (hnědá nerozpustná sraženina - obr. 29 v příloze). Pokus se provádí stejným způsobem jako předchozí, přidává se k 3 cm<sup>3</sup> 1% roztoku síranu měďnatého několik kapek 3% roztoku hexakyanoželeznatanu sodného.



Při otravách fluoridy nebo šťavelany se jako antidotní přípravek používá chlorid vápenatý nebo glukonát vápenatý. Při reakci, za zcela analogických podmínek jako u obou předchozích pokusů, vznikají nerozpustné soli - fluorid vápenatý nebo šťavelan vápenatý (bílá sraženina - obr. 30 a 31 v příloze).

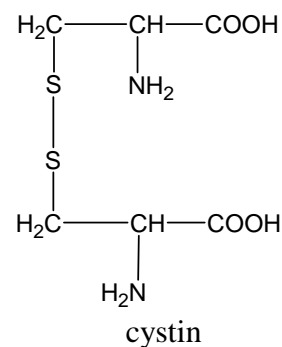
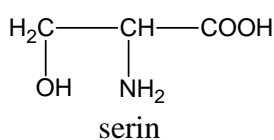
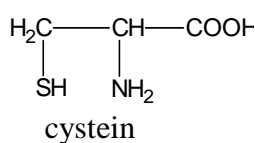




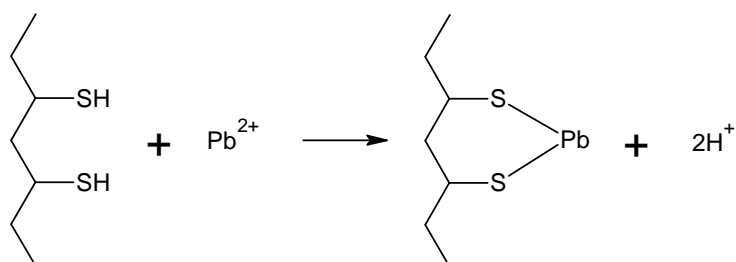
Jak již bylo řečeno, antidotní účinky při odstraňování těžkých kovů vzhledem k přítomnosti SH-skupiny vykazuje cystein a proto i bílkoviny, obsahující tuto aminokyselinu, budou mít stejné vlastnosti. Takové bílkoviny jsou obsaženy například v mléce nebo vaječném bílku. Těžké kovy způsobují denaturaci těchto bílkovin vznikem ve vodě nerozpustných komplexů-sraženin. Reakce se mohou provést odděleně nebo zároveň pro srovnání. Do dvou zkumavek se odměří 3 cm<sup>3</sup> 1% roztoku dusičnanu olovnatého, do první zkumavky se pipetou přidá několik kapek 3% roztoku cysteinu a do druhé zkumavky několik kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu. V obou případech se vyloučí bílá sraženina netoxického komplexu (obr. 32 v příloze).

Bílkovina při reakci s těžkým kovem může obráceně sloužit i jako model toxického působení těžkého kovu. Reakcí vzniká nerozpustný produkt (bílá sraženina), jež simuluje toxické působení solí olova (denaturace bílkovin). Přidáním několika kapek 5% roztoku disodné soli EDTA (Komplexon III) k 3 cm<sup>3</sup> 1% roztoku dusičnanu olovnatého a následně několika kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu se žádný nerozpustný produkt netvoří, neboť ionty olova jsou již vázány do pevného komplexu s disodnou solí EDTA (obr. 33 v příloze).

Jinou alternativou působení iontů těžkých kovů (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) na látky obsahující skupinu -SH je modelování nekompetitivní inhibice enzymu. Na základě interakce iontů kovu s molekulou enzymu mimo jeho aktivní centrum dochází k ireverzibilním (nevratným) změnám ve struktuře enzymu a tím ke ztrátě jeho katalytické aktivity. Modelovými sloučeninami byly zvoleny vaječný albumin a cystein. Bílkovina albumin zde simuluje molekulu enzymu a cystein, který je součástí enzymů, vnáší do enzymu -SH skupinu. Albumin obsahuje cystein v bílkovinném polymerním řetězci. Pro reakci je možno použít i tripeptid glutathion jako model fragmentu enzymu. Pro srovnání byly použity strukturně podobné látky, které ale neobsahují volnou -SH skupinu - cystin a serin. Cystin obsahuje místo -SH skupiny disulfidickou skupinu -S-S- a serin -OH skupinu.



Jako modelové sloučeniny těžkých kovů pro demonstrační experimenty byly vybrány dusičnan olovnatý a dusičnan kademnatý, dusičnan rtuťnatý není z hlediska bezpečnosti práce zcela vhodnou modelovou sloučeninou pro žákovské experimenty. Reakcí 5 % roztoku dusičnanu olovnatého resp. kademnatého s látkami obsahujícími -SH skupinu (albumin, cystein) vznikne bílá sraženina, v případě cystinu a serinu se zákal netvoří. Tuto reakci lze v případě olovnaté soli znázornit následujícím schématem.



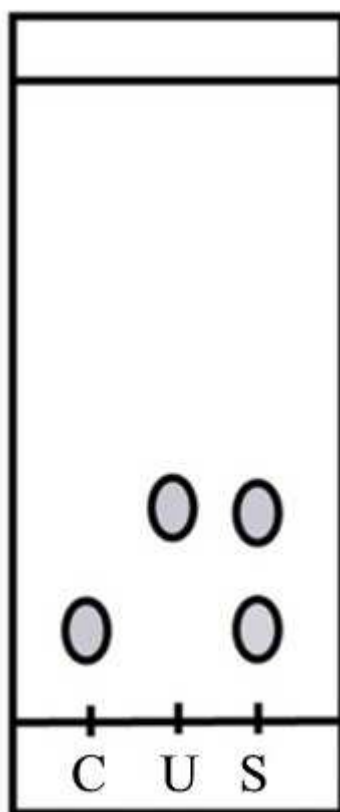
Olovnaté soli vytvářejí komplex, který má vzhled bílé sraženiny. Soli ostatních těžkých kovů ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ) tvoří intenzivní či jen slabý zákal.

#### 4.2.5 Model působení mutagenů

Je zcela zřejmé, že působení mutagenů na DNA je velice složitým procesem. Pro zjednodušení při výukových experimentech lze použít strukturně jednodušší látky. Molekulu DNA můžeme přímo nahradit konkrétní pyrimidinovou nebo purinovou bází, na kterých lze interakce s mutageny snadno demonstrovat. Jak již bylo v kapitole 2.2.4 uvedeno, běžným poškozením DNA je deaminace cytosinu za vzniku uracilu a i jako vhodný příklad modelu působení mutagenu můžeme použít tento typ deaminace působením kyseliny dusité. Vlastní výukový experiment je reakcí cytosinu s dusitanem sodným v přítomnosti kyseliny

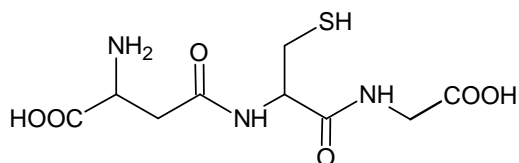
chlorovodíkové a lze ho uskutečnit v semimikro nebo mikroměřítku. Vlastní detekce a průběh experimentu je možné kontrolovat pomocí chromatografie na tenké vrstvě <sup>23</sup>. Reakci provádíme se směsí cytosinu a amoniaku, na kterou působíme za zvýšené teploty (směs zahříváme za stálého míchání na elektrickém vaříči) dusitanem sodným v přítomnosti kyseliny sírové. Jako důkaz uskutečnění reakce nám může sloužit unikající dusík, který lze jednoduše dokázat pomocí hořící třísky. Při reakci dochází taktéž ke změně zbarvení roztoku. Vzorky reakční směsi nanášíme na tenkou vrstvu společně se srovnávacími vzorky cytosinu a uracilu a ponecháme vyvíjet 80% butan-1-olem jako elučním činidlem. Vlastní detekce se provádí pod UV-lampou ( $\lambda=254$  nm). Hodnota retardačního faktoru ( $R_F$ ) pro cytosin je 0,18 a pro uracil 0,40.

**Obr. 20. - Chromatogram průběhu deaminace cytosinu  
(C-cytosin, U-uracil, S-srovnávací vzorek)**



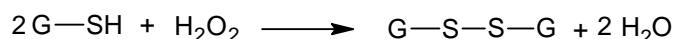
#### 4.2.6 Model působení antioxidantů

Tripeptid glutathion je významnou látkou s antioxidačním účinkem. Skládá se z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu a je to právě cystein se svou volnou -SH skupinou, které tento tripeptid vděčí za své antioxidační účinky.

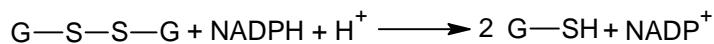


glutathion

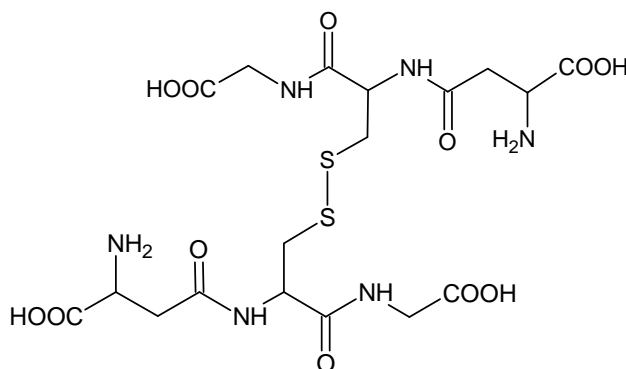
Glutathion (G-SH) se v lidském organismu vyskytuje jako koenzym glutathionoxidas a v přítomnosti peroxidu vodíku, který je tvořen v buňkách, se oxiduje za vzniku produktu s disulfidickou vazbou mezi dvěma molekulami glutathionu (G-S-S-G).



Rozklad peroxidu vodíku vyžaduje dostatek volného glutathionu, který se tvoří působením enzymu glutathionreduktasy z příslušného disulfidu.



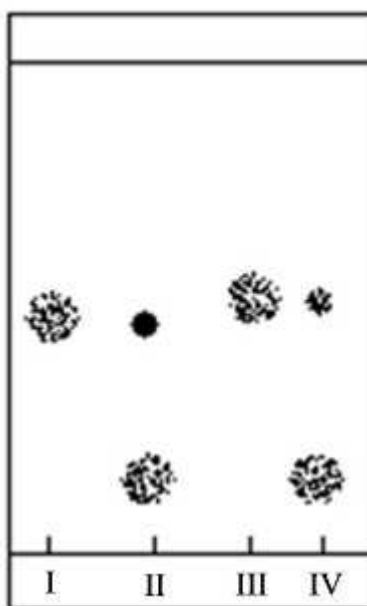
Tento složitý biochemický proces antioxidačního působení glutathionu je možné ve výuce chemie demonstrovat na dvou úrovních <sup>45</sup>. První možností je demonstrace prostřednictvím vzniku cystinu oxidací cysteinu, kdy se tvoří stejným způsobem příslušný disulfid jako v případě oxidace glutathionu.



Druhou možností je provést vlastní oxidaci glutathionu peroxidem vodíku a výsledek reakce potvrdit pomocí tenkovrstvé chromatografie. Produkty oxidace jsou nanášeny

mikrokapilárou na tenkou vrstvu celulosy společně se standardy (cysteinem a glutathionem). Chromatogram se nechá vyvíjet v komoře v elučním činidle butan-1-ol : kyselina octová : voda v poměru 60 : 15 : 25. Detekce se provádí prostřednictvím 1% roztoku ninhydrinu v acetonu a po usušení chromatogramu v sušárně lze pozorovat růžové až fialové skvrny výchozích látek a produktů oxidace (viz. znázornění chromatogramu na obrázku 21). Retardační faktory výchozích látek a produktů jsou: cystein - 0,38; cystin - 0,15; glutathion - 0,39; dimer glutathionu – 0,16. Na chromatogramu je možné detekovat společně s cystinem a dimerem glutathionu i malé množství nezreagovaných výchozích látek a porovnat je se standardy.

**Obr. 21. - Chromatogram průběhu oxidace cysteinu a glutathionu <sup>45</sup>.  
(I - cystein, II - cystin, III - glutathion, IV - dimer glutathionu)**



### 4.3. Metodika pedagogického výzkumu

Slovo metoda pochází z řeckého *methodos* (cesta) a představuje postup nebo způsob pro dosažení určeného cíle či získání příslušných dat a metodologie je obecně věda o principech a metodách vědeckého poznání, v případě metodologie pedagogiky jsou podstatou vědeckého zkoumání pedagogické jevy a procesy, stejně jako získávání dat a jejich

zpracování, které tyto v čase neustále se měnící skutečnosti co nejlépe charakterizují. Je nutné ale dodat, že studium výsledků pedagogického výzkumu je jen jednou z několika možností pro zkoumání procesu výchovy a vzdělávání.

Metody pedagogického výzkumu mohou být kvantitativní nebo kvalitativní a záleží na pedagogickém jevu, který je zkoumán, zda bude převládat kvantitativní nebo kvalitativní přístup. Je nutné, aby zvolená metoda při zkoumání zvoleného jevu zajistila dostatečnou validitu (platnost nebo vhodnost dané metody pro zkoumaný jev) a reliabilitu (spolehlivost nebo přesnost dané metody).

1) Kvantitativní přístup - opírá se především o statistické zpracování výsledků, přesně definuje proměnné, které jsou měřitelné. Mezi kvantitativní metody patří explorativní metody (test, anamnéza, dotazník, anketa, interview), obsahová analýza textu, pozorování, sociometrie a experiment <sup>37</sup>.

**Tab. 1. - Druhy didaktických testů <sup>38</sup>.**

<b>KLASIFIKAČNÍ HLEDISKO</b>	<b>DRUHY TESTŮ</b>		
měrná charakteristika výkonu	testy rychlosti	testy úrovně	
dokonalost přípravy testu a jeho příslušenství	standardizované - profesionálně připravené (existuje standard)	nestandardizované - neformální (obtížnější interpretace)	
povaha činnosti testovaného	kognitivní - úroveň poznání u žáků	psychomotorické - výsledky psychomotor. poznání	
míra specifčnosti učení zjišťovaného testem	výsledků výuky v dané oblasti	studijních předpokladů - obecnější charakteristika	
interpretace výkonu	rozlišující - výkony jsou srovnávány	ověřující - úroveň vědomostí žáka v daném tématu	
časové zařazení do výuky	vstupní	průběžné	výstupní
tematický rozsah	monotematické		polytematické
míra objektivního skórování	objektivně skórovatelné		subjektivně skórovatelné

**Test** - je soubor úloh, které jsou stejné pro všechny zkoumané objekty. Všechny jeho části jsou přesně ohodnocené prostřednictvím bodů a výsledek je dán úspěšností řešení (dosažením určitého počtu bodů). Druhy testových úloh mohou být otevřené široké (rozsáhlejší odpověď, komplexnější znalosti), otevřené se stručnou odpovědí (např. uvedení vzorce, značky prvku atd.), uzavřené dichotomické (dvě alternativy), uzavřené s výběrem odpovědi (více nabídnutých odpovědí), uzavřené přiřazovací (např. ke značce prvku přiřadit správný název) a uzavřené seřazovací (uspořádání pojmů na základě určitého kritéria)<sup>38</sup>.

**Anamnéza** - vyšetřovaná osoba si vzpomíná na předcházející zážitky a zkušenosti (může být subjektivní - osoba popisuje sama sebe, nebo objektivní - osoba je popisována jinými osobami)

**Dotazník** - patří mezi nejrozšířenější metody, protože lze zkoumat velký okruh respondentů. Nevýhodou je nižší reliabilita, proto je nutné, aby otázky byly přesně formulované a pečlivě seřazené. Typy dotazníků jsou:

- a) s uzavřenými otázkami - respondent volí z nabízených variant (nejjednodušší jsou dichotomické s ano-ne možnostmi, jinou formou mohou být stupňované)
- b) s polouzavřenými otázkami - kromě nabízených variant může dotazovaný formulovat vlastní odpověď
- c) s otevřenými otázkami - respondent zcela sám formuluje své odpovědi

**Anketa** - varianta dotazníku, určená velkému okruhu respondentů

**Interview** - otázky jsou kladeny ústně, což umožňuje užší kontakt mezi tazatelem a dotazovaným, klade vyšší nároky na přípravu. Rozhovor může být *volný* (držíme se zvoleného tématu) nebo *vázaný* (předem připravené otázky). Variantou je hromadný rozhovor (beseda).

**Obsahová analýza textu** - analyzujeme různé typy dokumentů (osobní, školské nebo příslušné ukazatele). Pokud analyzujeme po stránce obsahové, označujeme metodu jako kvalitativní.

**Pozorování** - vyžaduje zkušeného pozorovatele. Sledujeme činnost zkoumaných objektů systematicky a plánovaně. Nejčastěji je pozorování *zjevné* (sledované osoby vědí, že jsou pozorovány), jiným způsobem může být pozorování *skryté* (např. prostřednictvím kamer) nebo *zúčastněné* (pozorovatel je součástí dění, ostatní nevědí o pozorování). O záznamu se vede protokol, který je vyhodnocen většinou po skončení pozorování.

**Tab. 2. - Druhy pozorování při pedagogickém výzkumu.**

<b>KLASIFIKAČNÍ HLEDISKO</b>	<b>DRUHY POZOROVÁNÍ</b>	
časové nároky	krátkodobé - většinou jedna vyučovací hodina	dlouhodobé - sledování určitého jevu
osoba pozorovatele	sebepozorování (introspekce)	pozorování jiných (extrospekce)
kontakt s testovanou osobou	přímé	nevlastní (zprostředkované)
míra specifčnosti učení zjišťovaného testem	standardizované (systematické, objektivní)	nestandardizované (intuitivní, běžné školní)

**Sociometrie** - slouží ke zjišťování interpersonálních vztahů (sympatie, sociální statut - prestiž). Výsledky jsou zapsány do tabulek a graficky vyhodnoceny<sup>37</sup>.

**Experiment** - metoda je založena na principu ovlivňování tzv. závislé proměnné jinou proměnnou - nezávislou. Výsledkem je pak zjišťování změn v souvislosti této závislosti obou proměnných. Na rozdíl od chemického experimentu lze jen těžko v experimentu pedagogickém zaručit přítomnost pouze jedné nezávislé proměnné nebo opakování experimentu za zcela identických podmínek. V klasickém pojetí pracujeme se dvěma skupinami, experimentální a kontrolní, která slouží jako srovnávací. Obě skupiny jsou na konci experimentu srovnávány prostřednictvím testů.

2) Kvalitativní přístup - je zaměřen spíše na obsahovou stránku získaných výsledků, vyžaduje bližší zkoumání pokusné osoby a sledovaných situací. Presentace výsledků je uváděna spíše slovní formou. Mezi kvalitativní metody patří kazuistiky a metoda etnografická<sup>37</sup>.

**Kazuistika** - je podrobný popis daného případu, na jehož základě lze vyslovit závěr či řešení. Obsahuje *anamnézu* (dosavadní vývoj osobnosti a poměry, ve kterých se probant nacházel), *diagnózu* (výsledek poznání) a *prognózu* (další vývoj)

**Etnografická metoda** - pozorovatel proniká do zkoumaného prostředí tak, aby nenarušil jeho dění. Někdy je přímo účastníkem vlastního pozorování. Výzkumník nemá přesně dané cíle pozorování, proces probíhá výrazně intuitivně.

## Vyhodnocení pedagogického výzkumu <sup>39, 40</sup>

Pro vlastní vyhodnocení pedagogického výzkumu byl sestrojen dotazník s otevřenou formou odpovědí, které byly ohodnoceny na základě uvažované složitosti dané odpovědi. Kvantitativní zhodnocení výsledků bylo provedeno zjištěním středních hodnot (konkrétně aritmetického průměru) bodového ohodnocení pro danou třídu a celkový výsledek.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

kde  $x_i$  je hodnota  $i$ -tého pozorování ( $x_1 + x_2 + \dots + x_n$ )

$N$  je počet všech pozorování.

Pro zobrazení střední hodnoty znaku při lichém rozsahu byl zjištěn medián

$$\mathbf{E} = x_{(n+1)/2}.$$

Pro statistické zhodnocení výsledků byly dále použity statistické funkce střední (průměrná) odchylka a směrodatná odchylka. Střední odchylka určuje průměr absolutních odchylek dat od jejich střední hodnoty, je měřítkem variability a je dána vztahem:

$$d = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|.$$

Pomocí směrodatné odchylky lze přibližně určit, jak jsou nalezené hodnoty v souboru vzdálené od průměrné hodnoty resp. od střední hodnoty.

$$s = \sqrt{\left[ \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]}.$$

## 5. VÝSLEDKY

Testování proběhlo nezávisle na dvou školách, na Gymnáziu Friedricha Schillera v Pirně v Německu a na Gymnáziu v Přelouči. Pedagogický výzkum musel být modifikován s ohledem na vnější podmínky v rámci česko-německého projektu, který na této škole probíhá. V rámci projektu zde studují čeští studenti, kteří přicházejí do zdejší sedmé třídy (odpovídá naší sedmé třídě nebo sekundě osmiletého studia) a svým počtem doplňují německou část, která společně funguje již od páté třídy. Na prvním stupni (Grundstufe/Sekundarstufe I) mají čeští žáci některé předměty v mateřském jazyce, jiné v německém, tento poměr se mění s rostoucím ročníkem ve prospěch jazyka německého. Na druhém stupni (Oberstufe/Sekundarstufe II) třídy prakticky zanikají a studenti jsou rozděleni do kurzů podle zaměření. Studium je již pouze v jazyce německém. Na této úrovni vyučují pouze němečtí učitelé, kromě výuky jazyka českého. Výuka chemie začíná pro české žáky v osmé třídě a je vedena v jazyce mateřském. Zvláštností u těchto skupin jsou jejich osobní vztahy, protože děti spolu tráví téměř veškerý čas, ve dne ve škole a odpoledne na internátu, vytváří se různé sociální skupiny, které mají odlišnou charakteristiku, než v případě tříd obvyklých.

K dispozici byly tedy pouze tři skupiny (8.-10. třída) o malém počtu studentů (11-15). V druhém případě byl výzkum prováděn za podmínek zcela běžných na gymnaziální úrovni (osm tříd s průměrem 26,4 žáka na třídu).

Studenti byli rozděleni do dvou výkonnostně souměřitelných skupin. Náhodným výběrem bylo určeno, která z těchto dvou skupin bude mít výzkum doplněn i vybranými experimenty. Pedagogický experiment byl uskutečněn přibližně uprostřed druhého pololetí, tedy ještě v době před uzavřením klasifikace za zcela regulérního průběhu školního roku. Jedná se o školní rok 2010/2011.

### **Charakteristika sledovaných tříd:**

1) Friedrich-Schiller-Gymnasium Pirna, Seminarstr. 3, 01796 Pirna, Německo

8. třída - Experimentu se zúčastnilo 10 dětí (8 děvčat, 2 chlapci). Tato třída je ze zkoumaných skupin na německé škole jednoznačně výkonnostně nejslabší. Pouze dva žáci jsou

přírodovědně orientováni, mají odpovídající schopnosti a znalosti. Ostatní jsou zaměřeni spíše humanitně, dva další žáci z této skupiny zlepšují studijní průměr třídy svou plí. S výukou chemie se poprvé setkali v tomto roce.

9. třída - Experimentu se zúčastnilo 14 žáků (9 děvčat, 5 chlapců). Na rozdíl od předchozí skupiny výkonnostně nejlepší třída. Poměr humanitně a přírodovědně zaměřených žáků je vyrovnaný, žáci mají také celkem dobré znalosti matematiky a fyziky. Jeden žák v chemii významně převyšuje ostatní. Čtyři žáci zlepšují studijní průměr třídy svou plí.

10. třída - Experimentu se zúčastnilo 11 žáků (7 děvčat, 4 chlapci). Skupina je méně výkonná než předchozí, ale s výhodou jednoho roku chemie navíc. Žáci jsou v této době již zapsaní do jednotlivých kurzů v 11. ročníku a tím je dána i preference jejich předmětů a s tím související motivace. Pouze chlapci se rozhodli pro studium chemie na dalším stupni a jsou i výrazně úspěšnější než dívky. Obecně je tato třída studijně spíše slabší.

2) Gymnázium Přelouč, Obránců míru 1025, 53501 Přelouč, Česká republika

Pedagogický výzkum na Gymnáziu v Přelouči byl proveden s pomocí paní Mgr. Lucie Stříbrné, Ph.D., která na tomto gymnáziu vyučuje předměty biologii a chemii. Výzkumu se zúčastnilo celkem 8 tříd s následující charakteristikou:

kvarta - (25 žáků - z toho 5 chlapců). Pasivní třída s převahou dívek, bezproblémová, ale vlastní iniciativy. Žáci jsou schopni přesně interpretovat výklad učitele.

kvinta - (21 žáků – z toho 11 chlapců). Iniciativní třída s velmi dobrými studijními výsledky. Žáci jsou významně motivováni studijními úspěchy. Žáci se vyznačují samostatným přístupem ke studiu. Ve třídě panuje soutěživá atmosféra, která přináší nadprůměrné studijní výsledky ve všech předmětech. Žáci náleží k premiantům školy.

sexta - (24 žáků – z toho 14 chlapců). Žáci ve třídě jsou chytrí, ale pasivní. Vytvářejí zájmové skupiny vzájemně nespolupracující, ve třídě panuje značná rivalita. Žáci jsou soutěživí, ale ne v chemii. 4 žáci maturují z chemie.

septima - (28 žáků – z toho 13 chlapců). Žáci ve třídě jsou chytří, sebevědomí, založeni převážně sportovně nebo technicky. Jsou soutěživí, dosahují i vynikajících výsledků ve studiu, jejich aktivita je ale účelová, chemie je příliš nezajímá. 4 žáci maturují z chemie

oktáva - (22 žáků – z toho 10 chlapců). Žáci ve třídě jsou chytří, kooperují, osobnostně kvalitní, vyžadují i kvalitní práci učitele. Jsou cílevědomí. 4 žáci maturovali z chemie.

2.A - (14 žáků – z toho 8 chlapců). Průměrná třída, polovina žáků je velmi slabá, vyžaduje individuální přístup. Navzdory studijním problémům tvoří dobrý kolektiv. 2 žáci budou maturovat z chemie.

3.A - (31 žáků – z toho 13 chlapců). Iniciativní třída s dobrými studijními výsledky, tvoří dobrý kolektiv. Žáci jsou zvědaví, učenliví. Váží si kvalitních učitelů. 6 žáků bude maturovat z chemie

4.A - (28 žáků – z toho 9 chlapců). Vcelku aktivní třída, dobře kooperující. Žáci jsou komunikativní, příjemní a iniciativní, s dobrým vztahem k chemii. 10 žáků z chemie maturovalo.

### **Hypotéza**

- 1) V rámci výzkumu budou úspěšnější žáci, kteří měli do výuky zařazen experiment, než žáci, kteří experiment do výuky zařazen neměli.
- 2) Výsledky výzkumu budou korespondovat s věkem žáků a tedy s jejich znalostmi a zkušenostmi.
- 3) Výsledky výzkumu budou v relaci s charakteristikou jednotlivých tříd.

Jak již bylo výše uvedeno, ověření vlivu začlenění modelového experimentu na pochopení a osvojení si obtížného učiva bylo prováděno na základě porovnání dvou paralelních skupin žáků, přičemž jedna z těchto dvou skupin měla výklad rozšířen o experimentální část, která následovala ihned po dokončení teoretické části. Následně bylo po jednom týdnu pomocí explorativní metody (dotazníku) ověřeno, do jaké míry si studenti danou látku osvojili a jaký vliv mělo zařazení příslušných experimentů. Pro relevantnost

výsledků bylo vhodné žáky rozdělit do skupin tak, aby tyto dvě skupiny byly výkonnostně srovnatelné. Obě porovnávané skupiny by měly mít jak žáky "odborně zdatnější", tak i žáky, kteří jsou v tomto oboru "méně schopní".

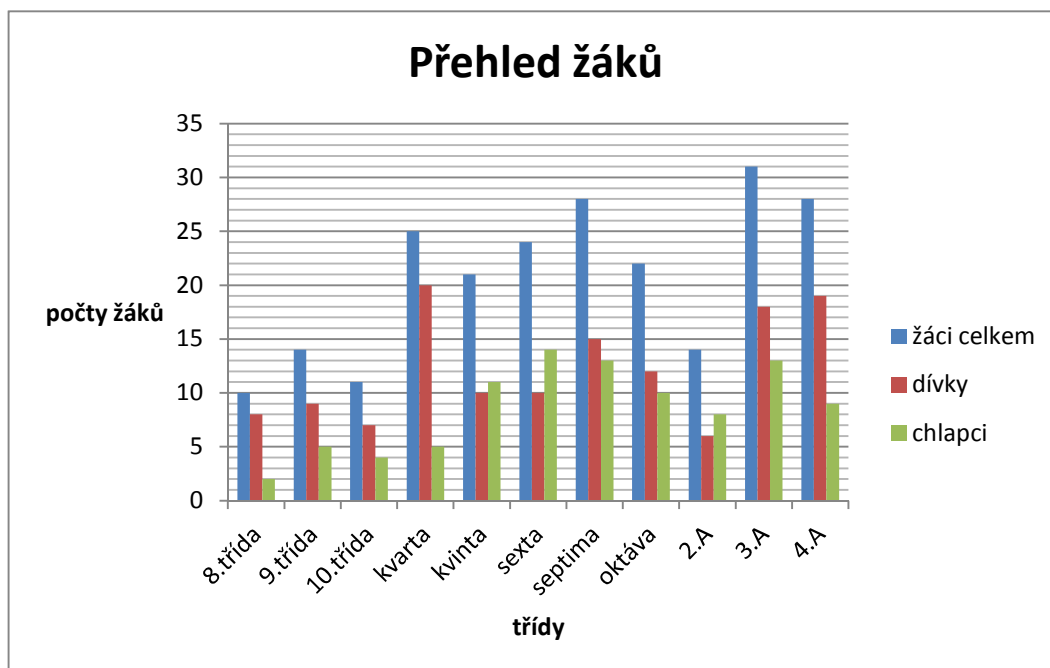
Kapitola o antidotních prostředcích byla obsahem pedagogického výzkumu a to pro nás z několika zásadních důvodů. Příslušné modely jsou jednoduché srážecí nebo komplexotvorné reakce, které lze provádět v mikroměřítku ve zkumavkách a tedy s minimálními nároky na laboratorní vybavení. Z hlediska struktury látek nebo biochemických změn, které tyto modely představují, patří mezi jednodušší a lze je provádět s určitými obměnami na všech úrovních škol, tzn. lze je použít jak na základní škole, tak na škole vysoké. Pro vlastní teoretickou část výkladu byl připraven ucelený přehled o toxických látkách a jejich antidotech, který může být zařazen jako celek do výuky, např. v našem případě jako součást kapitoly o bezpečnosti práce v chemické laboratoři. Na vysoké škole je pak problematika antidotních prostředků součástí předmětu Toxikologie a vzhledem k větší orientaci na školy základní a střední, byla tato kapitola zpracována jako pojednání o látkách jedovatých (toxických) a odpovídajících protijedech. Učitel dle svého vlastního uvážení prováděl výklad především se zaměřením na problematiku jedů a jejich odstranění z organismu. Samozřejmě důraz byl kladen na soubor takových toxických látek, aby obsah korespondoval s experimentální částí a studenti byli seznámeni se strukturou antidotních látek, strukturou příslušných komplexů a rovnicemi, popisujícími interakce antidotní látky s látkou toxickou. Tato teoretická příprava učitele byla nazvána "Jedy a protijedy" (viz. příloha - Metodický list pro učitele).

Následně bylo dotazníkovým šetřením zkoumáno, zda mělo provedení příslušných experimentů pozitivní vliv na osvojení učiva. Tento test řešili studenti po několikadenní pauze (jeden týden) od provedení experimentů.

### **Hodnocení dotazníku.**

Pedagogického výzkumu se zúčastnilo celkem 228 žáků z 11 tříd, což činí průměrně 20,7 žáka na třídu. Z toho bylo 134 dívek (průměrně 12,2 dívky na třídu) a 94 chlapců (průměrně 8,5 chlapce na třídu).

**Obr. 22. - Přehled počtu žáků v jednotlivých třídách.**

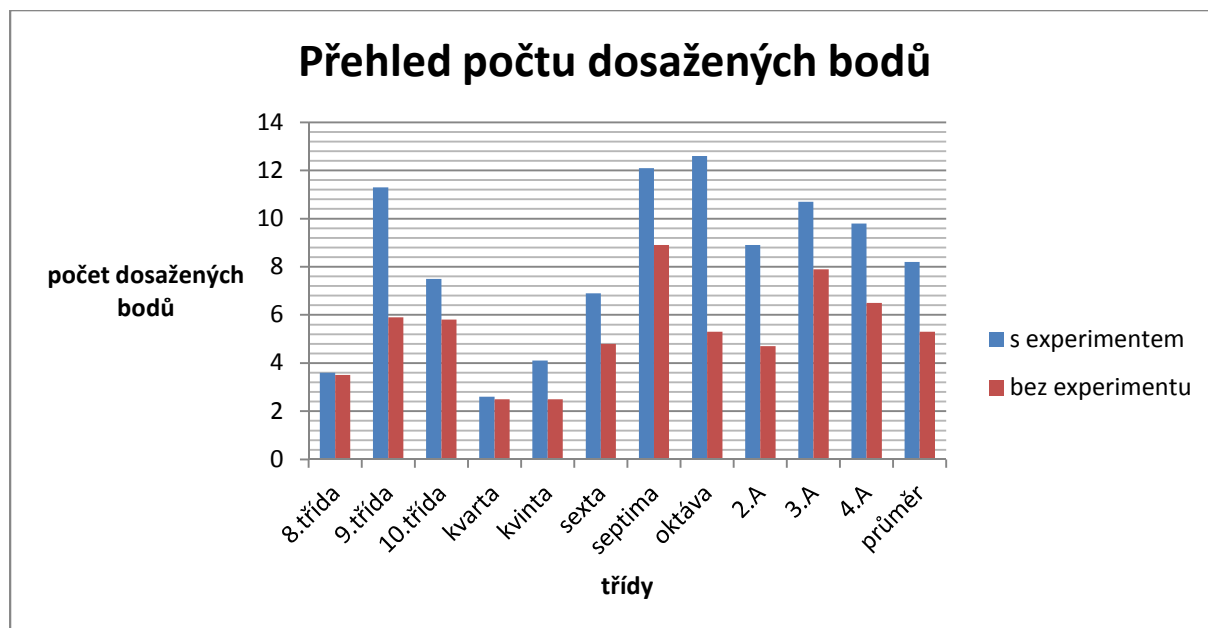


Každý žák mohl v testu získat maximálně 16 bodů. V následující tabulce a grafu je přehled získaných bodů u obou zkoumaných skupin ve všech třídách.

**Tab. 3. - Počty dosažených bodů v jednotlivých třídách.**

Třída	Počet bodů (průměr)	
	Skupina s experimentem	Skupina bez experimentu
8.třída (FSG Pírna)	3,6	3,5
9.třída (FSG Pírna)	11,3	5,9
10.třída (FSG Pírna)	7,5	5,8
kvarta (Gy Přelouč)	2,6	2,5
kvinta (Gy Přelouč)	4,1	2,5
sexta (Gy Přelouč)	6,9	4,8
septima (Gy Přelouč)	12,1	8,9
oktáva (Gy Přelouč)	12,6	5,3
2.A (Gy Přelouč)	8,9	4,7
3.A (Gy Přelouč)	10,7	7,9
4.A (Gy Přelouč)	9,8	6,5
<b>celkem</b>	<b>90,1</b>	<b>58,3</b>
<b>průměr</b>	<b>8,2</b>	<b>5,3</b>

Obr. 23. - Přehled dosažených bodů v jednotlivých třídách.



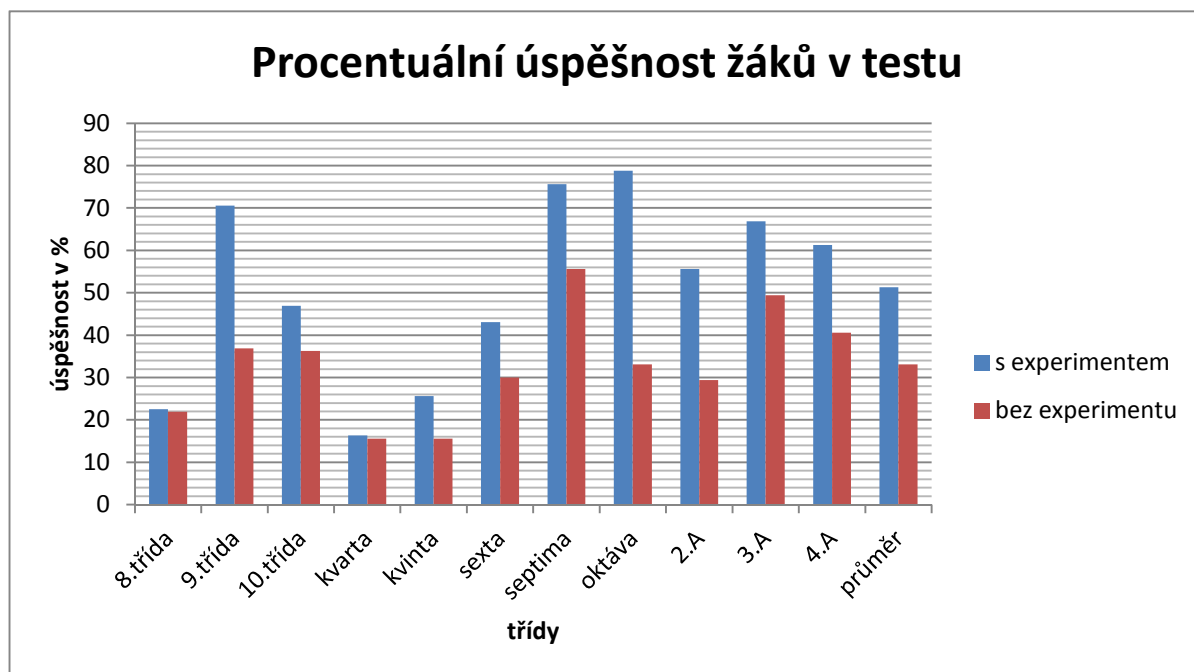
Tab. 4. - Výpočet statistických ukazatelů-dosažené body.

	Skupina s experimentem	Skupina bez experimentu
Počet hodnot	11	11
Minimum	2,6	2,5
Maximum	12,6	8,9
Průměr	8,19	5,3
Medián	8,9	5,3
Průměrná odchylka	2,96	1,55
Směrodatná odchylka	3,37	1,94

Tab. 5. - Úspěšnost v testu (v %) v jednotlivých třídách.

Třída	Úspěšnost v testu (v procentech)	
	Skupina s experimentem	Skupina bez experimentu
8. třída (FSG Pírna)	22,5	21,9
9. třída (FSG Pírna)	70,6	36,9
10. třída (FSG Pírna)	46,9	36,3
kvarta (Gy Přelouč)	16,3	15,6
kvinta (Gy Přelouč)	25,6	15,6
sexta (Gy Přelouč)	43,1	30,0
septima (Gy Přelouč)	75,6	55,6
oktáva (Gy Přelouč)	78,8	33,1
2.A (Gy Přelouč)	55,6	29,4
3.A (Gy Přelouč)	66,9	49,4
4.A (Gy Přelouč)	61,3	40,6
<b>průměr</b>	<b>51,3</b>	<b>33,1</b>

Obr. 24. - Úspěšnost žáků (v %) v jednotlivých třídách.



Tab. 6. - Výpočet statistických ukazatelů – úspěšnost v %.

	Skupina s experimentem	Skupina bez experimentu
<b>Počet hodnot</b>	11	11
<b>Minimum</b>	16,3	15,6
<b>Maximum</b>	78,8	55,6
<b>Průměr</b>	51,3	33,1
<b>Medián</b>	55,6	33,1
<b>Průměrná odchylka</b>	18,47	9,67
<b>Směrodatná odchylka</b>	21,07	12,11

## 6. Diskuze

Prvním úkolem této práce bylo vytvoření určitého souboru experimentů, které by za stanovených podmínek modelovaly složité biochemické procesy a to v oblastech, které byly nastíněny v teoretické části. Snahou takového modelování je zachování podmínek reálného děje, minimalizace nároků na laboratorní vybavení a chemikálie, přiměřená názornost a srozumitelnost daná úrovní, pro kterou je určeno, tedy především pro žáky. Tato práce obsahuje celkem šest vytvořených či modifikovaných experimentů jako modelů, které demonstrují konkrétní procesy probíhající v živých organizmech:

- 1) Biuretová reakce jako důkaz bílkovin, kde biuret a další sloučeniny představují model bílkoviny.
- 2) Štěpení škrobu prostřednictvím slinné amylasy a následná identifikace produktů pomocí chromatografie na tenké vrstvě, jejíž výsledek dokazuje aktivitu enzymu za určité časové období. Stejným způsobem v přítomnosti těžkých kovů či změnou pH se provádí inhibice amylasy, což lze opět snadno demonstrovat pomocí TLC chromatografie.
- 3) Methylenová modř pro své redoxní vlastnosti spojené se změnou barvy jako model kofaktorů transhydrogenas.
- 4) Demonstrace účinku některých antidotních prostředků a způsobu zneškodnění toxické látky.
- 5) Modelování působení mutagenů na příkladu deaminace cytosinu za vzniku uracilu a následná identifikace produktu TLC chromatografií.
- 6) Demonstrace a model působení glutathionu jako antioxidantu prostřednictvím vzniku cystinu oxidací cysteinu s následnou identifikací produktů pomocí TLC chromatografie, srovnání s produkty vlastní oxidace glutathionu peroxidem vodíku.

Všechny experimenty jsou proveditelné za zcela běžných podmínek školní laboratoře. Pouze v případě experimentů s detekcí látek na tenké vrstvě (škrob, mutageny, antioxidanty) je nutné použití UV-lampy pro vlastní detekci. Reakce probíhají za pokojových teplot, což koresponduje s podmínkou reálnosti modelace biochemického procesu. Reakce jsou též nenáročné na materiálové zabezpečení pokusů, všechny lze provádět v semimikroměřítku a mikroměřítku. Jedná se o běžné chemikálie, základní pravidla bezpečnosti práce v chemické laboratoři pro práci s nimi je možné snadno dodržet. Možná rizika lze více eliminovat v

některých případech snížením koncentrace daných látek či přípravou roztoků a látek ze strany vyučujícího (především příprava elučních činidel pro tenkovrstvou chromatografii). Zvýšená opatrnost pak platí při manipulaci s UV-lampou. Z didaktického hlediska je velice důležité, že ve všech případech je zkoumaný proces zcela transparentní, studenti mohou vidět barevnou změnu látky v závislosti na sledovaném jevu, vznik sraženiny nebo barevného komplexu a v případě tenkovrstvé chromatografie zřetelně patrný výsledek eluce, který lze navíc velice snadno interpretovat.

Druhým úkolem bylo prostřednictvím pedagogického výzkumu ověření, zda návrhy modelů mají pro vlastní využití ve výuce chemie pro osvojení si učiva studenty přínos. Jak již bylo zdůvodněno, pro tento výzkum byla vybrána kapitola o modelech působení antidotních přípravků. V každé zkoumané třídě byly srovnávány dvě skupiny, přičemž jedna měla výklad doplněný o experimentální část. Výsledky, které byly zjištěny po vyhodnocení uvedeného dotazníku, zcela jasně ukazují na pozitivní vliv takového zavedení modelových pokusů do výuky chemie. Úspěšnost řešení testových otázek ve skupinách, které měly výklad doplněný ještě o experimentální část, byla více jak o 14 % vyšší než u skupin s pouhým výkladem. Pokud se porovnají výsledky testu v jednotlivých třídách, je možné také pozorovat i vliv věku žáků. Souvisí to se zkušeností, které studenti s výukou chemie mají a jak jsou jejich znalosti chemie hluboké. Určitým problémem pro nižší ročníky byly formulace některých otázek v dotazníku (otázka č. 2 a 3), které se z jejich pohledu zdály být příliš obecné, téměř abstraktní a často se význam jejich odpovědí překrýval. Na druhou stranu byly jejich odpovědi v případě komplexních sloučenin jako je hexakynoželeznan sodný či měďnatý nebo látek typu 2,3 – dimerkatopropanol nebo merkaptojantarová kyselina značně obecné, spíše se jednalo o nepřesné a neurčité náznaky odpovědí na tyto otázky. Zřejmě je to dáno nízkou úrovní jejich chemických znalostí. Kromě malého počtu bodů je i rozdíl mezi zkoumanými skupinami velice malý. To se mění ve vyšších ročnících, kde se bodový zisk zvyšuje téměř lineárně s rostoucím věkem. Výjimkou v tomto směru je pouze 9. třída FSG v Pirně, která je oproti věkově srovnatelným třídám výrazně výkonnější. Vystává tím i otázka věkové hranice vhodnosti realizace takových experimentů. V tomto směru je to z velké části dáno zařazením dané problematiky do učiva chemie na základních a středních školách. Ve všech případech se jedná o velmi složitou problematiku z hraniční oblasti biochemie, biologie, toxikologie či lékařství. Příslušné modely mají být sice příkladem zjednodušené prezentace této problematiky, nicméně je k pochopení daných principů nutná určitá vyzrálость osobnosti,

stejně tak i značné biologické a chemické znalosti v dané oblasti. Výsledky výzkumu ve vyšších ročnících mohou být také ovlivněny strukturou zkoumaných skupin, profilací studentů (chemické semináře, volba maturitních předmětů). Je možné, že na celkový rozdíl v úspěšnosti mezi skupinami nebo spíše na efektivitu zařazení experimentální části do výuky měly i vliv jisté neobvyklosti vedení výuky, která může působit motivačně. Výsledky dotazníkového šetření korespondují do značné míry s celkovým hodnocením jednotlivých tříd.

Téma "Modely působení toxických a antidotních látek" se stejným postupem zpracovali a dále rozšířili dva žáci Gymnázia Přelouč (D. Hývl, V. Kopáč) a s výsledky své práce se zúčastnili IV. ročníku Festivalu vědy a techniky pro děti a mládež v Pardubickém kraji, přičemž se umístili v krajském kole na třetím místě a získali Cenu děkana Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice s ročním stipendiem pro studium na Univerzitě Pardubice (viz samostatná příloha).

## 7. Závěr

1) Bylo navrženo celkem šest modelových bioorganických experimentů, které přibližují a tím napomáhají objasnit strukturu přírodních látek nebo mechanismus konkrétních biochemických reakcí.

2) Jednotlivé experimenty nejsou významně náročné na vybavení chemikáliemi a laboratorní technikou.

3) Vybraná témata po obsahové stránce navazují na učivo s biochemickou, bezpečnostní a toxikologickou problematikou, která je na gymnáziích v současné době podle tematických plánů probírána na vyšším stupni (septima, 3. ročník).

4) Pro pochopení dané problematiky je nezbytná adekvátní úroveň chemických znalostí žáků. Aplikace daných úloh ve výuce je tedy zřejmě na základních školách v této podobě nerealizovatelná. Výsledky dotazníkového šetření do značné míry korespondují s obecnou charakteristikou žáků v jednotlivých třídách.

5) Doplnění teoretické výuky příslušnými experimenty výrazně zvyšuje efektivitu výuky cílové skupiny a osvojení si učiva žáky.

6) Téma "Modely působení toxických a antidotních látek" bylo použito pro odbornou práci dvou žáků Gymnázia Přelouč v rámci soutěže IV. ročníku Festivalu vědy a techniky pro děti a mládež v Pardubickém kraji. Tito žáci se v krajském kole umístili na třetím místě a obdrželi cenu děkana Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

## 8. Použitá literatura

1. VODRÁŽKA, Z., KRECHL, J.: *Bioorganická chemie*. SNTL, Praha 1991, 480 s. ISBN 80-03-00547-7.
2. DUGAS, H., PENNEY, Ch.: *Bioorganic chemistry - A chemical approach to enzyme action*. Rus. vyd. Moskva: Mír, 1983. 263-341. s.
3. WAISSER, K., PALÁT, K.: *Bioorganická chemie*. 2. přepracované vyd. Praha: Karolinum, 2001. 173-187. s. ISBN 80-246-0382-9.
4. McMURRY, J.: *Organic chemistry - sixth edition*. 1. české vyd. Brno: Vutium, 2004. 654-655. s. ISBN 978-80-214-3291-8.
5. HRNČIAR, P.: *Organická chémia*. 3. přepracované vyd. Bratislava: SPN, 1990. 351-353. s. ISBN 80-08-00028-7.
6. KRÁL, V.: *Supramolekulární chemie biologicky významných systémů* [online]. Praha: ÚOCHB AV ČR, 2004 [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <[http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/2\\_Kral.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/2_Kral.pdf)>.
7. ZDRAŽIL, J., ŠMEJKALOVÁ, J., KUŠIČKA, M., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Výukové modely působení antidotních přípravků*. Zborník příspěvků z mezinárodní konference Súčasnost a perspektívy didaktiky chemie. Banská Bystrica: FPV UMB, 2006, s. 48. ISBN 80-8083-286-2.
8. CAMPBELL, J. A.: *Proč probíhají chemické reakce?* 1. vyd. Praha: SNTL, 1972. 17-34. s.
9. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Methylenová modř a její využití v chemických výukových experimentech*. Sborník příspěvků z Mezinárodní konference Aktuální aspekty pregraduální přípravy a postgraduálního vzdělávání učitelů chemie 2006. Ostrava: Ostravská Univerzita, 2006, s. 72-76.
10. COOK, A. G., ENGERER, S. C.: *The Blue Bottle reaction as a general chemistry experiment on reaction mechanisms*. Journal of Chemical Education. 1999, roč. 76, č. 11, 1519-1590. s. ISSN 0021-9584.
11. ROSYPAL, S.: *Úvod do molekulární biologie*. 1 vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1996. 406-431 s. ISBN 80-902562-5-2.

12. WELLMAN, W. E., NOBLE, M. E.: *Greening the Blue Bottle*. Journal of Chemical Education. 2003, roč. 80, č. 5, 537-540. s. ISSN 0021-9584.
13. BOHNE, U., KREHER, R. P.: *Methylenblau, Geschichte eines Farbstoffs - ein Farbstoff mit Geschichte*. Naturwissenschaften im Unterricht Chemie, Friedrich Verlag, Seelze. 1999, roč. 10, č. 52, s. 193-198. ISSN 0946-2139.
14. HOLFELD, M.: *Das Blue-Bottle- experiment einmal anders*. Praxis der Naturwissenschaften (Chemie), Aulis Verlag, Hallbergmoos. 2000, roč. 49, č.3, s. 39-40. ISSN 1617-5638.
15. MOWRY, S., OGREN, P. J.: *Kinetics of methylene blue reduction by ascorbic acid*. Journal of Chemical Education. 1999, roč. 76, č. 7, 970-974. s. ISSN 0021-9584.
16. RAJANNA, K. C., SAIPRAKASH, P. K., SNEHALATHA, T.: *Methylene blue-ascorbic acid (An undergraduate experiment in kinetics)*. Journal of Chemical Education. 1997, roč. 74, č. 5, 228-233. s. ISSN 0021-9584.
17. WAGNER, A.: *Schardinger-Enzym als Nachweis auf Hitzebehandlung in Milch*. Naturwissenschaften im Unterricht Chemie, Friedrich Verlag, Seelze. 1997, roč. 8, č. 40, s. 29. ISSN 0946-2139.
18. HORÁK, J., LINHART, I., KLUSOŇ, P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1 vyd. Praha: VŠCHT, 2004. 26-28, 98-99 s. ISBN 80-7080-548-X.
19. JEŘÁBEK, J.: *Deriváty hemoglobinu* [online]. Praha: WikiSkripta, projekt sítě lékařských fakult MEFANET, 2010 [cit. 2010-09-11]. Dostupné z WWW: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Deriv%C3%A1ty\\_hemoglobinu](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Deriv%C3%A1ty_hemoglobinu)>.
20. SKOUMALOVÁ, A.: *Metabolizmus erytrocytů* [online]. Praha: 2. LF UK Praha, 2004 [cit. 2010-09-05]. Dostupné z WWW: <<http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/erytrocyty.ppt#31>>.
21. BRANDL, H.: *Menschen mit „blauer Hautfarbe“*. Praxis der Naturwissenschaften (Chemie), Aulis Verlag, Hallbergmoos. 1991, roč. 40, č.2, s. 12-16. ISSN 1617-5638.
22. ŠÍPEK, A.: *Molekulárně-biologická diagnostika v onkologii* [online]. Praha: WikiSkripta, projekt sítě lékařských fakult MEFANET, 2009 [cit. 2010-03-20]. Dostupné z WWW: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Molekul%C3%A1rn%C4%9B-biologick%C3%A1\\_diagnostika\\_v\\_onkologii](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Molekul%C3%A1rn%C4%9B-biologick%C3%A1_diagnostika_v_onkologii)>.
23. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K. aj.: *Jednoduchý model působení mutagenů*. Biologie-chemie-zeměpis. 2009, roč. 18, s. 41-43. ISSN 1210-3349

24. KŘEMEN, J.: *Mutace a oprava DNA* [online]. Praha: 1. LF UK Praha [cit. 2010-03-16]. Dostupné z WWW: <<http://ubeo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/DNA%20-%20Mutace%20a%20oprava.pdf>>.
25. LAIER, B., PFEIFER, P.: *Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) - Die Reduktion und Reoxidation - nur ein "Zauberversuch"?*. Naturwissenschaften im Unterricht Chemie, Friedrich Verlag, Seelze. 1996, roč. 7, č. 31, s. 28-29. ISSN 0946-2139.
26. MUSÍLEK, K.: aj. *Testování schopnosti známých oximů reaktivovat chlorpyrifosem inhibovanou acetylcholinesterázu in vitro* [online]. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2005 [cit. 2011-05-13]. Dostupné z WWW: <[http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5\\_6\\_2005/013-Musilek.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5_6_2005/013-Musilek.pdf)>.
27. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., HOLÝ, I., KOLÁŘ, K.: *Biuretová reakce a bioorganické modely*. Sborník příspěvků z Mezinárodní konference Soudobé trendy v chemickém vzdělávání 2006. Hradec Králové: Gaudeamus, Hradec Králové 2006, s. 169-171. ISBN 80-7041-560-6.
28. KRTIL, J.: *Praktické cvičení z lékařské biochemie (Bílkoviny – kvalitativní průkaz, precipitace/denaturace, dialýza, elektroforéza)* [online]. Praha: 1. LF UK Praha [cit. 2011-05-16]. Dostupné z WWW: <[http://che1.lf1.cuni.cz/html/Bilkoviny\\_praktika.pdf](http://che1.lf1.cuni.cz/html/Bilkoviny_praktika.pdf)>.
29. LEIENBACH, K.W.: *Biochemie in der gymnasialen Oberstufe am Beispiel des Kohlenhadrat-Stoffwechsels*. Praxis der Naturwissenschaften (Chemie), Aulis Verlag, Hallbergmoos. 1990, roč. 39, č.3, s. 2-8. ISSN 1617-5638.
30. BUKATSCH, F.: *Experimentelle Schulchemie – Organische Chemie III*. 1 vyd. Köln: Aulis Verlag Deubner & Co, 1976. 133-135 s. ISBN 3-7614-0284-8.
31. KEUSCH, P.: *Biuret reaction – Protein in egg albumen (Organic Chemistry Demonstration Experiments on Video Chemistry Vizualized)* [online]. Regensburg: Universität Regensburg [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <[http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_IV/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Biuret-e.htm](http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Biuret-e.htm)>.
32. ROE, B.: *Determination of amino acid composition and sequence of a protein* [online]. Oklahoma: University of Oklahoma [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <[http://www.genome.ou.edu/3653/Lecture13-9\\_20\\_06.htm](http://www.genome.ou.edu/3653/Lecture13-9_20_06.htm)>.

33. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Štěpení škrobu amylasou a jeho kontrola TLC chromatografií jako výukový experiment*. Sborník příspěvků z Mezinárodní konference Význam chemie pro život společnosti - výukové aplikace 2008. Hradec Králové: Gaudeamus, Hradec Králové 2008, s. 193-195. ISBN 978-80-7041-214-5.
34. LOFTSSON, T.: European Cyclodextrin Society: *What are cyclodextrins?* [online]. Reykjavik: University of Iceland, [cit. 2011-05-13]. Dostupné z WWW: <[http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=67:what-are-cyclodextrins&catid=37:article](http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com_content&view=article&id=67:what-are-cyclodextrins&catid=37:article)>.
35. KRAUS, T.: *Cyklodextriny* [online]. Praha: ÚOCHB AV ČR, 2004 [cit. 2011-05-14]. Dostupné z WWW: <[http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8\\_Kraus.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf)>.
36. CHANG, R.: *Physical biochemistry for the Biosciences*. Mill Valley: University Science Books, 2005. 483 s. ISBN 1-891389-33-5.
37. JANIŠ, K., KRAUS, B., VACEK, P.: *Kapitoly ze základů pedagogiky*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2004. 125-142 s. ISBN 80-7041-102-3.
38. PRŮCHA, J.: *Pedagogická encyklopedie*. Praha: Portál, 2009. 936 s. ISBN 978-80-7367-546-2
39. BARTSCH, H. J.: *Matematické vzorce*. 3. revidované vyd. Praha: Mladá fronta, 2000. 743-751 s. ISBN 80-204-0607-7.
40. CHRÁSKA, M.: *Metody pedagogického výzkumu (základy kvantitativního výzkumu)*. Praha: Grada Publishing, 2007. 39-59. ISBN 978-80-247-1369-4.
41. KOLÁŘ, K., MYŠKA, K., ZDRAŽIL, J.: *Methylenová modř jako výukový model koenzymů oxidoreduktas*. Sborník příspěvků z Mezinárodní konference Badania w dydaktyce przedmiotów przyrodniczych 2006. Kraków: Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie, 2006, s. 197-199.
42. VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie [1]*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992. 121. s. ISBN 80-200-0438-6.
43. VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie [3]*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993. 138. s. ISBN 80-200-0471-8.
44. TAUSCH, M. W.: *Chemie und ihre Didaktik* [online]. Wuppertal: Bergische Universität Wuppertal, [cit. 2013-01-14]. Dostupné z WWW: <[http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/disido\\_cy/cyde/exp/06\\_cy\\_phenol.htm](http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/disido_cy/cyde/exp/06_cy_phenol.htm)>.

45. ZDRAŽIL, J., KREJČÍKOVÁ, A., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Jednoduchý model působení glutathionu jako antioxidantu*. Biologie-chemie-zeměpis. 2012, roč. 21, s. 235-238. ISSN 1210-3349.
46. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Demonstrace podstaty toxických vlastností některých těžkých kovů a jejich sloučenin*. Biologie-chemie-zeměpis. 2012, roč. 21, s. 127-129. ISSN 1210-3349.
47. ZDRAŽIL, J., MYŠKA, K., KOLÁŘ, K.: *Modely biuretové reakce*. Biologie-chemie-zeměpis. 2012, roč. 21, s. 80-82. ISSN 1210-3349.
48. KRUSKA, G., PATZER, P., WENCK, H.: *Die Nucleinsäuren im Schulchemischen Experiment*. Praxis der Naturwissenschaften Unterricht (Chemie), Aulis Verlag, Hallbergmoos. 1991, roč. 40, s. 2-11. ISSN 1617-5638.

## **9. Seznam příloh**

1. Metodický list pro učitele - Jedy a protijedy
2. Seznam experimentů
3. Obrázky

## **10. Přílohy**

## Metodický list pro učitele - Jedy a protijedy

Je známa celá řada historek z dějin lidstva, kdy jedovaté látky dokázaly změnit nebo alespoň ovlivnit životy skupin lidí, ne-li celých národů. Otázku, zda jsou tyto historiky pravdivé či ne, ponechme historikům, ale v každém případě existuje celá řada chemických látek, které mohou výrazně negativně ovlivnit životy konkrétních lidí. Využití chemických látek je v průmyslu, zemědělství, energetice a dalších oblastech lidské činnosti stále čtenější, souběžně s tím se však zvyšují rizika kontaktu člověka s jedovatými látkami. Také příroda nás obklopila nepřeborným množstvím rostlin a živočichů, jež mohou být životu člověka nebezpečné v důsledku toho, že produkují jedovaté látky.

Určitě nás v této souvislosti napadne celá řada otázek. Co to vlastně jedovatá látka je, jak ji poznáme, jak můžeme v případě, že jsme se s takovou látkou dostali do kontaktu zamezit jejímu vlivu na náš zdravotní stav? Jedovaté látky můžeme také označit pomocí cizího slova jako **látky toxické** a jejich působení na živý organismus jako **toxicitu**. Toxické látky jsou v širším slova smyslu látkami, které mohou vyvolat u živých organismů jejich poškození, které může končit až jejich smrtí. Již v roce 1527 významný učenec Paracelsus vyslovil názor, že: „**Pouze dávka rozhoduje, je-li látka jedem**“, s tímto tvrzením je možné se ztotožnit také v současnosti. Lze říci, že všechny látky mohou být jedem, pokud se požijí v množství, které je pro člověka a jeho zdraví nebezpečné. Příkladem může být ethanol, který se vyskytuje v alkoholických nápojích a patří mezi tzv. nervové jedy. V malých dávkách zvyšuje sebevědomí a vyvolává pocity euforie. Ve vyšších dávkách dochází ke ztrátě vědomí a zástavě dýchání. V těžkých případech může nastat i smrt. Při opakovaných otravách alkoholem však dochází k trvalému poškození jater s rizikem rakovinného onemocnění. Ještě zajímavějším příkladem je látka, která nás obklopuje v každodenním životě - kuchyňská sůl. Všichni známe pohádku "Sůl nad zlato", ve které princezna přesvědčuje svého otce krále o důležitosti kuchyňské soli, i když je to v tomto případě pouze kvůli chuti královských jídel, tak ve skutečnosti jak sodné kationy, tak chloridové aniony patří mezi částice odvozené od biogenních prvků a jsou nezbytné pro přenos nervového vzruchu nebo pro udržení hodnoty osmotického tlaku buněk. Pokud dospělý člověk průměrné váhy kolem 70 kg přijme zhruba 250 g chloridu sodného, může dojít k úmrtí z důvodu popraskání buněk. Toto jsou jen dva příklady protichůdného působení látek, kdy organismu prospěšné látky mohou být zároveň

látkami škodlivými a záleží pouze na množství dané látky. Podobných příkladů je samozřejmě mnohem více, existuje též mnoho látek, které v tomto smyslu nebyly prozkoumány. Jedy jsou rozděleny podle bezprostřední schopnosti usmrtit průměrně těžkého člověka (70 kg) do několika kategorií:

**Tab. 7. - Kategorie toxicity látek.**

Kategorie	Přibližná smrtelná dávka po požití		Příklad
	v mg/kg	celkové množství pro člověka	
<b>prakticky netoxické</b>	> 15000	> 1 l	BaSO <sub>4</sub>
<b>málo toxické</b>	5-10000	0,5-1 l	ethanol
<b>mírně toxické</b>	500-5000	0,5 dl – 0,5 l	NaCl, FeSO <sub>4</sub>
<b>silně toxické</b>	50-500	lžička – 0,5 dl	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , methanol
<b>extrémně toxické</b>	5-50	7 kapek – lžička	BaCO <sub>3</sub> , KClO <sub>3</sub>
<b>supertoxické</b>	5 <	méně než 7 kapek	botulotoxin, As <sup>3+</sup> tetrachlordibenzodioxin

Tabulka je pouze přehledem vybraných látek. Působení toxických látek na organismus může být krátkodobé i dlouhodobé. Proto je také důležitým faktorem **expozice** dané látky, neboli doba, po jakou je člověk vystaven působení toxické látky.

Jedovaté látky mohou také působit na lidský organismus různými způsoby. Mohou mít tzv. **přímý účinek** – škodlivé jsou již jen svojí přítomností v organismu. Příkladem látky s přímým účinkem může být kyselina šťavelová, která reakcí s vápennými ionty tvoří nerozpustný šťavelan vápenatý, jehož částice se mohou usazovat v močových cestách a tím je mechanicky poškozovat. Kyselina šťavelová odstraňuje z organismu volný rozpustný vápník, nezbytný pro řadu fyziologických procesů, např. pro stah svalů nebo růst a obnovu kostní tkáně. Zcela obdobně fungují ve vodě rozpustné fluoridy, které tvoří nerozpustný fluorid vápenatý. Jiná alternativa může vycházet z reakce s příslušnou jinou látkou a tím ovlivnit odpovídající biochemický proces či fyziologické procesy v buňce. Velice často může touto látkou být enzym a tímto může docházet k jeho **inhibici** nebo **denaturaci** (enzym mění svou strukturu a ztrácí katalytickou aktivitu). Toxická látka se buď váže na tzv. **aktivní centrum** enzymu, což je místo v molekule enzymu, které zodpovídá za katalytickou funkci enzymu nebo na jiné místo, ale enzym pak již není schopen fungovat jako katalyzátor. Látky, které se váží v aktivním centru, mají strukturu podobnou substrátu. Příkladem inhibitoru vázajícího se v aktivním centru místo substrátu jsou antibiotika sulfonamidy. Tyto látky se přednostně váží

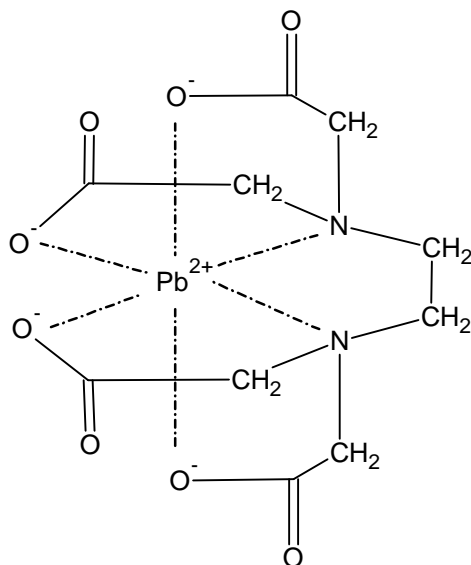
před kyselinou *p*-aminobenzoovou a tím inhibují syntézu kyseliny listové (vitamin B<sub>9</sub>), která je růstovým faktorem bakterií. Významnými zástupci druhé skupiny látek, vázajících se mimo aktivní centrum enzymu, jsou těžké kovy (Pb, Hg, Cd), které tvoří komplexy s thiolovými (sulfhydrylovými) -SH skupinami, obsaženými v cysteinu, tím je denaturují a enzym ztrácí svou katalytickou funkci. Zcela identickým způsobem reagují s jakoukoliv bílkovinou, která obsahuje cystein. Příkladem takové bílkoviny může být vaječný albumin. Odlišnou skupinou látek jsou toxické látky schopné reagovat se složkami imunitního systému nebo měnit strukturu nukleových kyselin (DNA). Všechny tyto procesy jsou složitými biochemickými reakcemi, výsledkem je nefunkčnost nebo zánik „napadených“ molekul s negativními účinky na živý organismus, vedoucími v některých případech až ke vzniku nádorového onemocnění.

Na začátku jsme si kladli otázku, jak poznáme jedovatou látku od nejedovaté. Už nyní víme, že i zdánlivě nejedovaté látky mohou být jedem, pokud jejich koncentrace v organismu dosáhne úrovně, která je již pro organismus nebezpečná. Na straně druhé, pomineme-li předchozí tvrzení, můžeme také říci, že jedovatou látku na první pohled poznáme velmi těžko, ne-li vůbec. Lidský organismus si během milionů let svého vývoje vytvořil určité obranné mechanismy - reflexy, které ho mohou včas na takovou látku upozornit, např. chutí nebo čichem. Ale to funguje jen ve velmi omezené míře a rozhodně by nemělo sloužit k poznávání těchto látek. V přírodě mohou být jedovaté rostliny a živočichové určitým způsobem zvýraznění barvou, tvarem či chováním, aby odradili případného predátora. V případě toxických látek, používaných v chemii nebo každodenním životě, bychom se bez adekvátního označení neobešli. Každá nebezpečná látka je označena příslušným symbolem, který je doplněn slovní charakteristikou prostřednictvím R-vět (popisují nebezpečnost látky) a S-vět (popisují manipulaci s nebezpečnými látkami). Samozřejmostí je velice obezřetné zacházení s dodržování pravidel bezpečnosti práce tak, aby nedošlo k ohrožení vlastního života a života jiných lidí.

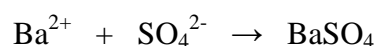
S mnohem častějším používáním chemických látek dochází i přes všechna bezpečnostní opatření k otravám. Jednou z možností, jak jedovatou látku ve svém působení eliminovat či alespoň co nejvíce omezit její působení na živý organismus, je použití „protijedu“, tzv. antidotního přípravku. **Antidotní látky** (zkráceně antidota) jsou v širším slova smyslu látky s opačným účinkem proti působení jiné látky. Pro otravy vodorozpustnými sloučeninami těžkých kovů, například olova, se mohou použít organické sloučeniny obsahující již zmiňovanou thiolovou skupinu, např. dimerkaprol (2,3-dimerkaptopropanol),



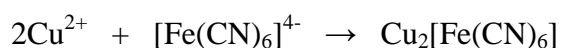
**Obr. 26. - Komplex EDTA s olovnatými ionty <sup>36</sup>.**



Převedení rozpustné toxické látky na nerozpustnou a tím i netoxickou lze použít i u otrav barnatými a měďnatými solemi. V prvním případě lze využít k tomuto účelu síran sodný, přitom vzniká nerozpustný a tedy netoxický síran barnatý.



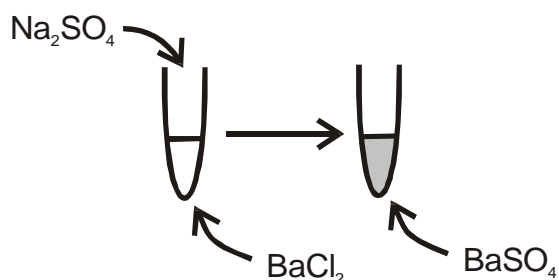
Měďnaté soli reakcí s hexakynoželeznatanem sodným tvoří hnědou nerozpustnou sraženinu hexakynoželeznatanu měďnatého.



Na tomto místě tedy končí jedna polovina zkoumané skupiny, druhá polovina studentů bezprostředně po výkladu (ihned nebo na další vyučovací hodině) provádí experimentální část podle následujícího protokolu (včetně příložených schémat).

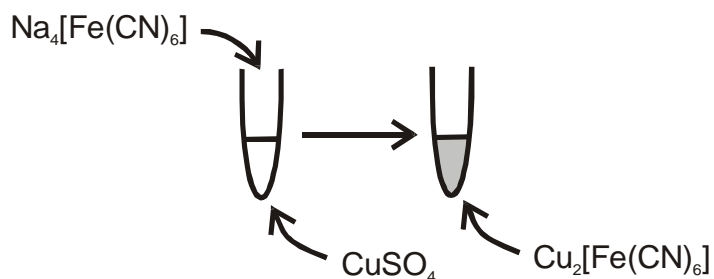
1) Působení síranu sodného jako antidotního přípravku při intoxikaci vodorozpustnou barnatou solí

Reakci proveďte ve zkumavce se 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku chloridu barnatého, k nim přidejte několik kapek 5 % roztoku síranu sodného. Vytvoří se bílá sraženina síranu barnatého, který je netoxický.



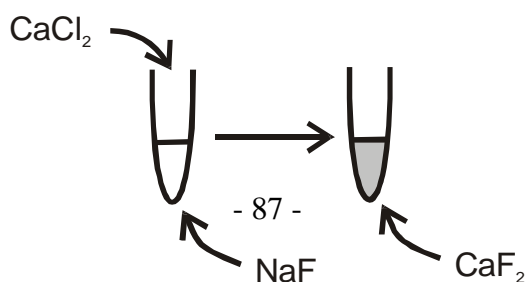
2) Působení hexakyanoželeznatanu sodného jako antidotního přípravku při intoxikaci vodorozpustnou měďnatou solí

Reakci proveďte ve zkumavce se 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku síranu měďnatého a k němu přidejte několik kapek 3 % roztoku hexakyanoželeznatanu sodného. Reakcí vzniká nerozpustný produkt (hnědá sraženina), která je netoxická.

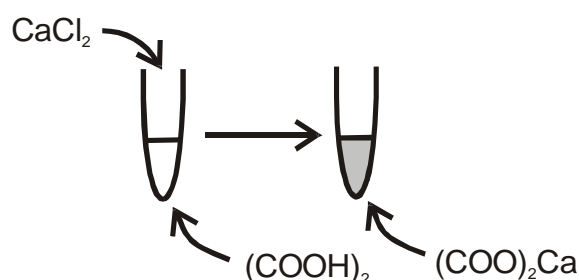


3) Působení vápenaté soli jako antidotního přípravku při intoxikaci vodorozpustnými fluoridy a kyselinou šťavelovou

Do zkumavky odměřte 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku fluoridu sodného a pipetou přidejte několik kapek 3 % roztoku chloridu vápenatého. Vyloučí se bílá sraženina fluoridu vápenatého.



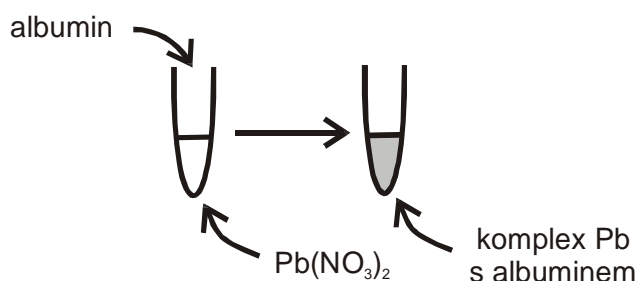
Do zkumavky odměřte 3 cm<sup>3</sup> 3 % kyseliny šťavelové a pipetou přidejte několik kapek 3 % roztoku chloridu vápenatého. Vyloučí se bílá sraženina šťavelanu vápenatého.



V obou případech vážou z roztoku toxické látky vápník do nerozpustných sloučenin a tím brání jeho dalšímu využití pro živý organismus.

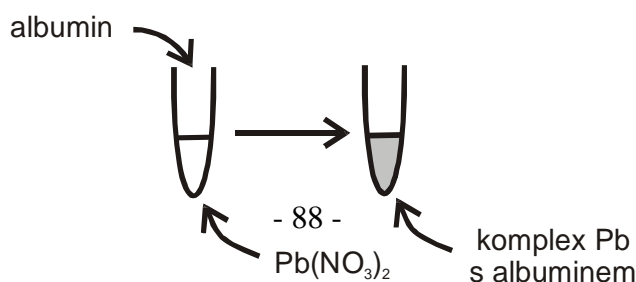
#### 4) Toxické působení vodorozpustných olovnatých solí na bílkovinu albumin

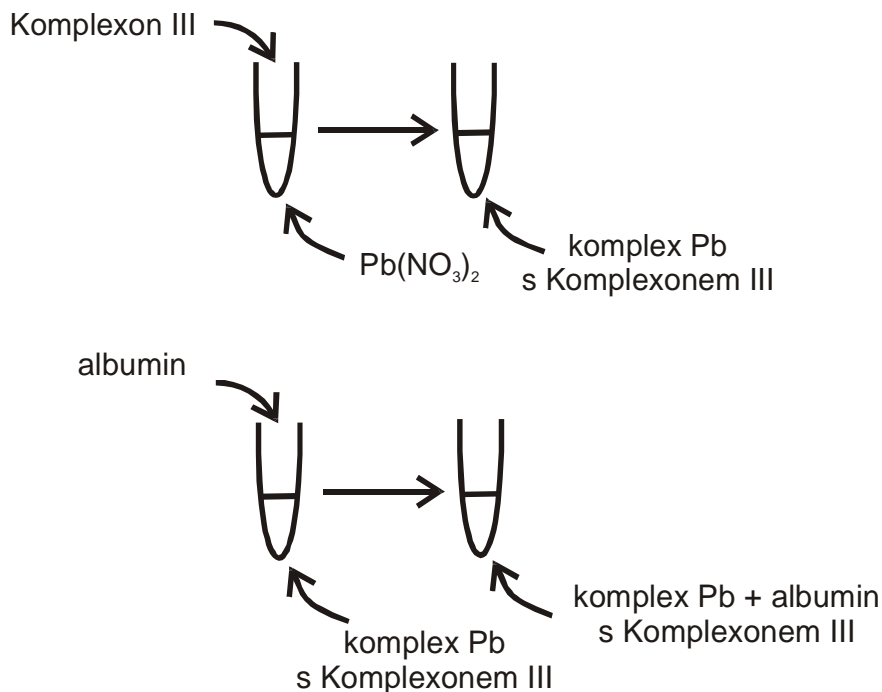
Do zkumavky se 3 cm<sup>3</sup> 1 % roztoku dusičnanu olovnatého přidejte několik kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu. Dochází k denaturaci bílkoviny, vytvoří se bílá sraženina.



#### 5) Působení Komplexonu III jako antidotního přípravku při interakci albuminu s vodorozpustnou olovnatou solí

Přidejte několik kapek 3 % roztoku disodné soli EDTA (Komplexon III) k 3 cm<sup>3</sup> 1 % roztoku dusičnanu olovnatého a následně přidejte několik kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu. Žádný nerozpustný produkt se netvoří, neboť ionty olova jsou již vázány do pevného komplexu s EDTA.





### Dotazníkové šetření - úlohy

- 1) Co jsou antidotní přípravky? (1 bod)
- 2) Jaký může být obecný princip odstranění toxické látky? (2 body)
- 3) Uveď konkrétní příklad obecného principu působení antidota. (2 body)
- 4) Který antidotní prostředek lze použít k odstranění vodorozpustných sloučenin barya z organismu? (1 bod)
- 5) Popiš reakci antidota s toxickou látkou pomocí rovnice. Jaká je podstata detoxikace jedu? (2 body)
- 6) Který antidotní prostředek lze použít k odstranění vodorozpustných sloučenin mědi z organismu? Popiš reakci antidota s toxickou látkou pomocí rovnice. Jaká je podstata odstranění toxické látky? (3 body)
- 7) Jaké antidotní prostředky se používají při otravách fluoridy nebo šŕavelany? Uveď k reakcím antidota s toxickou látkou rovnice a vysvětli podstatu detoxikace. (3 body)
- 8) Při otravách vodorozpustnými sloučeninami těžkých kovů (např. olova) se používají látky, obsahující určitý typ charakteristické skupiny v molekule. Uveďte charakteristickou skupinu, příklady těchto látek a princip jejich antidotního působení. (2 body)

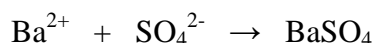
**Maximální počet bodů:** 16 (v průměru dva body na jednu úlohu)

Každý bod je za faktickou odpověď, která se týká obsahu dané otázky. Vyčíslení rovnice, slovní nedostatky nerozhodují. Součástí teoretické přípravy jsou i vzorce některých sloučenin pro doplnění působení antidotních látek (např. sloučeniny s SH- skupinou nebo EDTA).

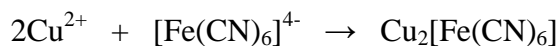
Následně je uvedena jedna z možností řešení dotazníkového šetření pro hodnocení, podle kterého byly vyhodnoceny celkové výsledky vlivu experimentální části na osvojení si složité problematiky žákem.

### **Řešení pro hodnocení dotazníku.**

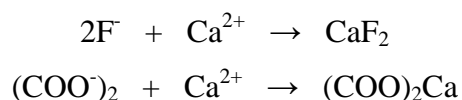
- 1) Antidotní přípravky – antidota jsou látky, které se používají jako protijed při otravách a k odstranění následků působení toxických látek.
- 2) Podstata působení takového prostředku může spočívat v převedení toxické látky v organismu na látku netoxickou.
- 3) Příkladem může být převedení toxické vodorozpustné látky na produkt, který je ve vodě nerozpustný a tedy netoxický.
- 4) Síran sodný se používá jako antidotum při otravách vodorozpustnými sloučeninami barya.
- 5) Ve vodě rozpustné sloučeniny barya reagují se síranem sodným za vzniku nerozpustného síranu barnatého (bílá sraženina).



6) Pro odstranění vodorozpustných sloučenin mědi se používá hexakynoželezatan sodný (známý též pod názvem žlutá krevní sůl). Při reakci vzniká hnědá nerozpustná sraženina hexakynoželezatanu měďnatého.



7) Při otravách fluoridy nebo šťavelany se používají jako antidota vápenaté soli, např. chlorid vápenatý. Produkty reakce jsou ve vodě nerozpustné látky, fluorid vápenatý a šťavelan vápenatý.



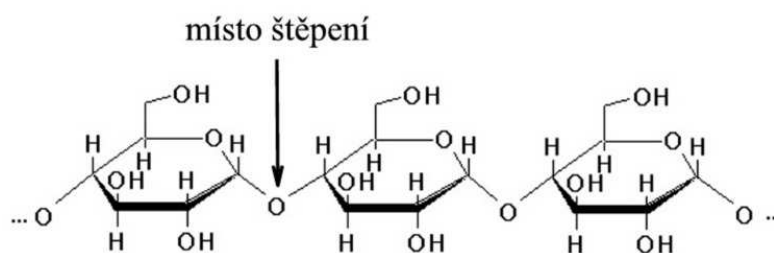
8) Při otravách vodorozpustnými sloučeninami těžkých kovů (např. olova) vykazují látky které obsahují SH- skupinou antidotní účinky. Mezi takové látky náleží cystein, glutathion, bílkoviny (obsažené např. v mléce nebo ve vaječném bílku), které jsou přirozenou součástí živých organismů, ale i látky syntetické povahy, připravené speciálně k tomuto účelu, např. 2,3 – dimerkatopropanol (British Anti Lewisite – BAL) nebo merkaptojantarová kyselina. Prostřednictvím skupiny SH- tyto látky vážou ionty těžkých kovů za vzniku nerozpustných produktů.

## Seznam experimentů - Pracovní listy

Téma: Enzymy - působení hydroláz

Úkol: Štěpení škrobu amylasou a jeho kontrola chromatografií na tenké vrstvě

Teoretická část: Enzym  $\alpha$ -amylasa je u člověka tvořena především ve slinných žlázách a v slinivce břišní. V trávicím systému katalyzuje hydrolytické štěpení glykosidické vazby v molekule škrobu. Výsledkem procesu jsou postupně kratší řetězce tvořené D-glukosovými jednotkami (maltosa, maltotriosa aj.).



Chemikálie: škrob, ethyl-acetát, isopropylalkohol, difenylamin, anilin, destilovaná voda, kyselina trihydrogenfosforečná.

Pomůcky: odměrný válec (50 cm<sup>3</sup>), kádinky (50 cm<sup>3</sup>, 100 cm<sup>3</sup>), váhy, elektrický vaříč, skleněná tyčinka, zkumavky, mikrokapiláry, stopky, chromatografická komora s krycím sklem, tenká vrstva silikagelu (Silufol), pipeta (10 cm<sup>3</sup>), sušárna

Postup:

- 1) Zásobní roztok se připraví z 1 g škrobu, který se za horka rozpustí v 50 cm<sup>3</sup> destilované vody a roztok se ochladí na 25 °C.
- 2) K objemu 25 cm<sup>3</sup> roztoku škrobu se přidají 2 cm<sup>3</sup> roztoku slin, zředěných v poměru 1:1, směs se promíchá.
- 3) Z reakční směsi se mikrokapilárami v předem stanovených časových intervalech (3,6,9,12,15 min.) odebírají vzorky reakční směsi a nanášejí se na tenkou vrstvu.
- 4) Chromatogram se vyvíjí v chromatografické komoře s krycím sklem, elučním činidlem je směs ethyl-acetát : isopropylalkohol : voda v poměru 3 : 3 : 1.
- 5) Detekce se provádí postříkem detekčním činidlem (směs difenylaminu, anilinu a kyseliny trihydrogenfosforečné) a následným zahřátím v sušárně (lze i opatrně provádět nad elektrickým vaříčem).

- 6) Na chromatogramu jsou patrné skvrny glukosy ( $R_F = 0,43$ ) a maltosy ( $R_F = 0,30$ ) a dále neidentifikovaných látek ( $R_F = 0,17$ ,  $R_F = 0,08$ ), pravděpodobně dalších oligosacharidů (maltotriosa, maltotetrosa aj.)

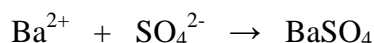
Závěr:



Téma: Působení toxických látek a antidotních přípravků

Úkol č.1: Převedení vodorozpustné barnaté soli na nerozpustný síran barnatý

Teoretická část: Všechny ve vodě rozpustné soli barya jsou prudce jedovaté. K otravě chloridem barnatým stačí množství asi 0,2 g, smrtelná dávka je asi 0,8 - 2 g BaCl<sub>2</sub>. Smrt nastává za plného vědomí zástavou srdce. Jako protijed se používá roztok síranu sodného.



Chemikálie: chlorid barnatý (1 %), síran sodný (3 %)

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

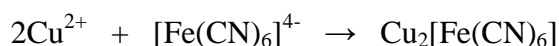
Postup:

- 1) Do zkumavky se 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku chloridu barnatého se přidá několik kapek 5 % roztoku síranu sodného.
- 2) Vytvoří se bílá sraženina síranu barnatého, který je netoxický.

Závěr:

Úkol č.2: Působení hexakyanoželeznatanu sodného jako antidotního přípravku při intoxikaci vodorozpustnou měďnatou solí.

Teoretická část: Měď je pro živý organismus nepostradatelným elementem. Je součástí některých enzymů, ovlivňuje krevtvorbu a fungování nervového systému. Při požití minimálně 250 mg se začínají projevovat negativní vlivy těžkých kovů, které působí na enzymy inhibičně. Měďnaté kationty lze z roztoku vyvázat prostřednictvím komplexních sloučenin, např. hexakyanoželeznatanem sodným. Vzniká nerozpustný hexakyanoželeznatan měďnatý.



Chemikálie: síran měďnatý (1 %), hexakyanoželeznatan sodný (3 %)

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

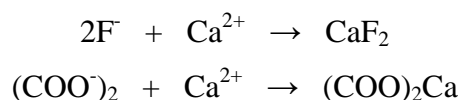
Postup:

- 1) Do zkumavky se 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku síranu měďnatého se přidá několik kapek 3 % roztoku hexakyanoželeznatanu sodného.
- 2) Reakcí vzniká nerozpustný produkt - hnědá sraženina, která je netoxická.

Závěr:

Úkol č.3: Působení vápenaté soli jako antidotního přípravku při intoxikaci vodorozpustnými fluoridy a kyselinou šťavelovou.

Teoretická část: Ve vodě rozpustné fluoridy jsou toxické mimo jiné tím, že vážou v organizmu potřebné vápenaté kationty. Při požití dochází k těžkému poškození jater a trávicího systému. Vápenaté kationty jsou dále nutné pro stah svalu a správnou funkci nervového systému. Podobně funguje i kyselina šťavelová, která reaguje s  $\text{Ca}^{2+}$  kationty za vzniku nerozpustného šťavelanu vápenatého, jehož krystaly mohou způsobit selhání ledvin. Jako protilátka může v obou případech sloužit chlorid vápenatý.



Chemikálie: chlorid vápenatý (3 %), fluorid sodný (3 %), kyselina šťavelová (3 %)

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

Postup:

- 1) Do dvou zkumavek se 3 cm<sup>3</sup> 3 % roztoku fluoridu sodného a 3 cm<sup>3</sup> 3 % kyseliny šťavelové se pipetou přidá několik kapek 3 % roztoku chloridu vápenatého.
- 2) V obou případech se vyloučí bílé sraženiny fluoridu vápenatého a šťavelanu vápenatého, které jsou netoxické.

Závěr:

Úkol č.4: Toxické působení vodorozpustných olovnatých solí na bílkovinu albumin.

Teoretická část: Olovo patří mezi toxické prvky a vzhledem ke svému využití je celkem běžným kontaminantem vody a prostředí. Vodorozpustné olovnaté kationty stejně jako další těžké kovy způsobují denaturaci bílkovin. Olovnaté soli tvoří s bílkovinami, obsahující -SH skupiny, nerozpustné produkty.

Chemikálie: dusičnan olovnatý (1 %), albumin - vodný roztok (vhodné přefiltrovat)

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

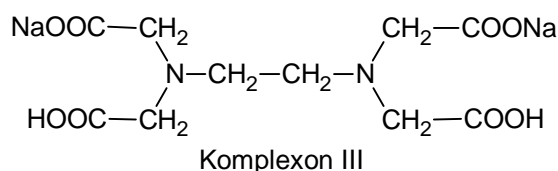
Postup:

- 1) Do zkumavky se 3 cm<sup>3</sup> 1 % roztoku dusičnanu olovnatého se přidá několik kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu.
- 2) Dochází k denaturaci bílkoviny, vytvoří se bílá sraženina.

Závěr:

Úkol č.5: Působení Komplexonu III jako antidotního přípravku při interakci albuminu s vodorozpustnou olovnatou solí.

Teoretická část: Při léčbě otrav olovnatou solí se používají silná chelatační činidla, která váží olovnaté kationty za vzniku komplexních sloučenin. Mezi taková chelatační činidla patří i deriváty kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA), např. disodná sůl EDTA, známá pod názvem Komplexon III.



Chemikálie: Komplexon III (3 %), dusičnan olovnatý (1 %), albumin - vodný roztok (vhodné přefiltrovat)

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

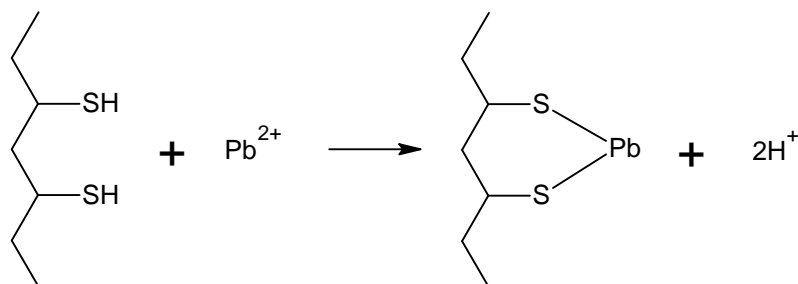
Postup:

- 1) Do zkumavky se 3 cm<sup>3</sup> 1 % roztoku dusičnanu olovnatého se přidá několik kapek 3 % Komplexonu III.
- 2) Následně se přidá několik kapek za studena nasyceného roztoku vaječného albuminu.
- 3) Žádný nerozpustný produkt se netvoří, neboť ionty olova jsou již vázány do pevného komplexu s EDTA.

Závěr:

Úkol č. 6: Interakce iontů Pb<sup>2+</sup> a Cd<sup>2+</sup> s -SH skupinami molekuly enzymu

Teoretická část: Principem denaturace enzymů těžkými kovy je tvorba vazby mezi kationtem kovu a sírou thiolové (sulfhydrylové) skupiny (-SH) bílkoviny za vzniku příslušného komplexu. Struktura bílkoviny je tímto procesem pozměněna a enzym ztrácí svou katalytickou funkci. Stejný komplex tvoří všechny látky, které obsahují ve své struktuře -SH skupinu, např. aminokyselina cystein. Aminokyselina cystin obsahuje disulfidický můstek, aminokyselina serin obsahuje hydroxylovou skupinu, tyto aminokyseliny na rozdíl od cysteinu a albuminu, který cystein obsahuje, nerozpustný komplex netvoří.



Chemikálie: dusičnan olovnatý (5 %), dusičnan kademnatý (5 %), albumin, cystein, cystin, serin

Pomůcky: zkumavky, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), stojánek na zkumavky

Postup:

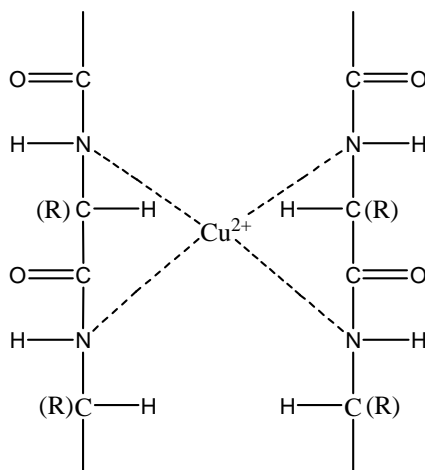
- 1) Do pěti zkumavek s 2 cm<sup>3</sup> destilované vody se předloží 2 cm<sup>3</sup> nasyceného roztoku albuminu, cysteinu, cystinu a serinu.
- 2) Po promíchání se do každé zkumavky přidá několik kapek roztoku dusičnanu olovnatého.
- 3) Ve zkumavce s albuminem a cysteinem se vytvoří intenzivní bílá sraženina, ve zkumavce s cystinem a serinem sraženina nevznikne.
- 4) Pokus se zopakuje s roztokem dusičnanu kademnatého.
- 5) Ve zkumavce s cysteinem se vytvoří bílá sraženina, ve zkumavce s albuminem vznikne bílý zákal, cystin a serin opět sraženinu netvoří.

Závěr:

Téma: Struktura komplexů aminokyselin a bílkovin

Úkol č.1: Porovnání průběhu interakce látek z řady amoniak-močovina-biuret-albumin s měďnatou solí.

Teoretická část: Biuretová reakce se používá pro důkaz bílkovin. Vznik komplexu bílkoviny s měďnatou solí souvisí s přítomností peptidické vazby v molekule bílkoviny. Pozitivní výsledek této reakce lze očekávat u látek strukturně jednodušších, které mají peptidickou vazbu. Charakteristické modrofialové zbarvení je způsobeno vznikem komplexu  $\text{Cu}^{2+}$  kationtů a atomů dusíku peptidické vazby. Látky obsahující dusíkaté skupiny odlišné od peptidické vazby tvoří s  $\text{Cu}^{2+}$  kationty také komplexní sloučeniny, zbarvení roztoků těchto komplexů je ale jiné.



Komplex peptidového řetězce s  $\text{Cu}^{2+}$  kationtem

Chemikálie: síran měďnatý (5 %), albumin, močovina, hydroxid sodný (10 %), amoniak, biuret (lze ho připravit zahříváním močoviny)

Pomůcky: zkumavky, stojánek na zkumavky, pipeta ( $10 \text{ cm}^3$ ), váhy, kahan, držák na zkumavky

Postup:

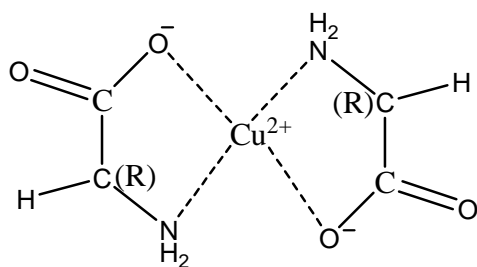
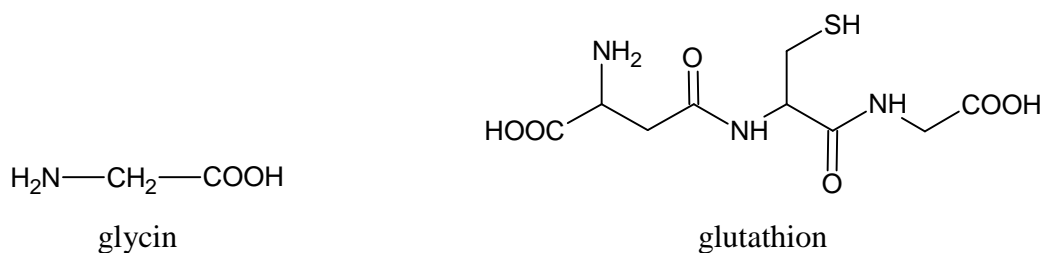
- 1) Pro přípravu biuretu se opatrně zahřívá přibližně 0,5 g močoviny. Proces tvorby biuretu je provázen únikem amoniaku, který lze detekovat čichem či vlhkým pH papírkem, přiloženým k ústí zkumavky.
- 2) Do pěti zkumavek se přidá  $2 \text{ cm}^3$  amoniaku, močoviny, biuretu, albuminu a síranu měďnatého (srovnávací vzorek).
- 3) Ke zkoumaným vzorkům se přidá  $2 \text{ cm}^3$  hydroxidu sodného a poté několik kapek 5 % roztoku síranu měďnatého.

4) Vznikají příslušné komplexy, což je provázeno charakteristickým zbarvením roztoků.

Závěr:

Úkol č.2: Porovnání průběhu interakce látek řady aminokyselina-peptid-bílkovina s měďnatou solí.

Teoretická část: Aminokyseliny jsou stavebními částicemi bílkovin, ale neobsahují ve své struktuře peptidickou vazbu, a proto jeví příslušná reakce odlišné výsledky než je tomu v případě bílkovin. Rozdíl v reakci nastává i při různé délce peptidického řetězce u strukturně podobných látek, např. při srovnání tripeptidu glutathionu a bílkoviny albuminu.



Chemikálie: síran měďnatý (5 %), albumin, hydroxid sodný (10 %), glycín, glutathion

Pomůcky: zkumavky, stojánek na zkumavky, pipeta ( $10 \text{ cm}^3$ ), váhy, kahan, držák na zkumavky

Postup:

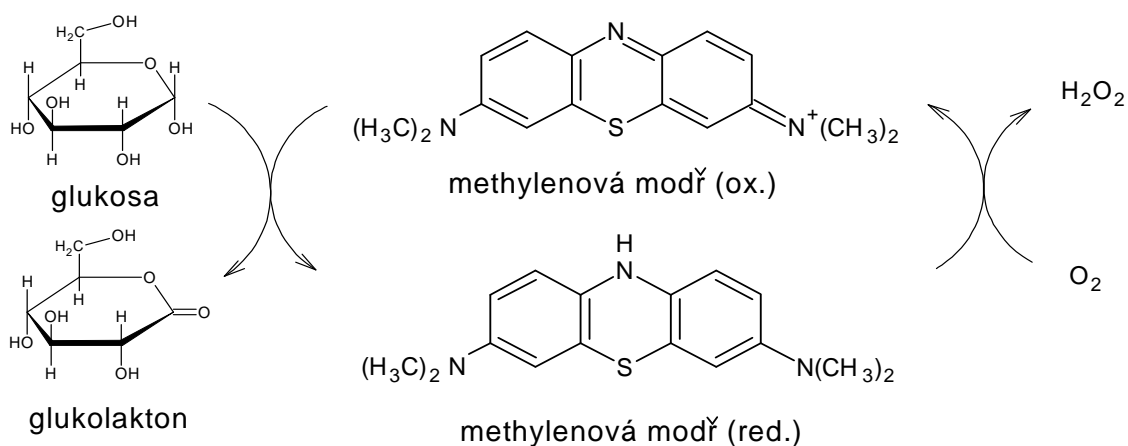
- 1) Do tří zkumavek se předloží po  $3 \text{ cm}^3$  nasyceného roztoku glycínu, glutathionu a albuminu a  $3 \text{ cm}^3$  10 % hydroxidu sodného.
- 2) Po promíchání se ke směsi přidá několik kapek 5 % roztoku síranu měďnatého, dochází k zbarvení roztoků, které se liší zbarvením vzniklých komplexů (obzvláště komplex glycínu s měďnatou solí).
- 3) Může se též přidat vinan draselno-sodný, který v alkalickém prostředí zabraňuje srážení měďnaté soli.

Závěr:

Téma: Enzymy - funkce kofaktorů

Úkol: Methylenová modř jako model koenzymu

Teoretická část: Většina enzymů patří mezi tzv. složené enzymy, které jsou tvořeny bílkovinou a nebičkovinnou částí, neboli kofaktorem, jehož přítomnost je nutná pro funkci daného enzymu. Pevně vázaný kofaktor k molekule bílkoviny se nazývá prostetická skupina, slabě vázaný kofaktor je označován jako koenzym. Hlavní funkcí kofaktorů je přenos atomů, skupin atomů (transferasy) nebo elektronů (oxidoreduktasy) při katalyzovaných reakcích. Kofaktory přenášející elektrony nebo atomy vodíku jsou vratné (reverzibilní) systémy, které se mohou střídat oxidovat a redukovat (např. NAD, FAD nebo FMN). Redoxní indikátor methylenová modř představuje model těchto koenzymů, změna oxidačního stavu je vratná a navíc provázena charakteristickým zbarvením. Substrátem je glukosa.



Chemikálie: destilovaná voda, hydroxid sodný, roztok methylenové modři v ethanolu (1 %), glukosa

Pomůcky: kuželová baňka se zátkou (1000 cm<sup>3</sup>), odměrný válec (500 cm<sup>3</sup>), pipeta (10 cm<sup>3</sup>), váhy

Postup:

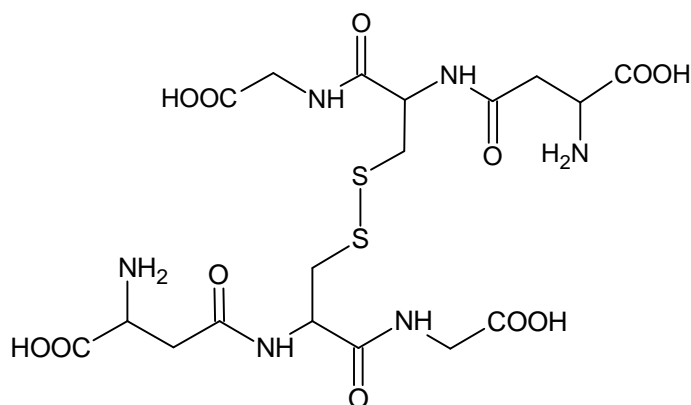
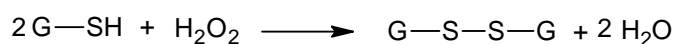
- 1) V 500 cm<sup>3</sup> destilované vody se rozpustí 10 g hydroxidu sodného, 10 g glukosy a přidá se 1 cm<sup>3</sup> methylenové modře
- 2) Vyčká se, dokud nedojde k odbarvení roztoku.
- 3) Roztok se protřepe, vzniká modré zbarvení.
- 4) Po několika minutách modré zbarvení opět mizí.

Závěr:

Téma: Antioxidanty

Úkol: Působení glutathionu jako antioxidantu

Teoretická část: Antioxidanty jsou látky přírodního i syntetického původu, které reagují s oxidujícími látkami. Obecně mají tyto oxidující látky negativní vliv na živý organizmus. Mezi oxidující látky patří i různé reaktivní formy kyslíku, např. peroxid vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$  a volné radikály. Možným antioxidačním činidlem je tripeptid glutathion, který obsahuje ve své struktuře aminokyselinu cystein s thiolovou (sulfhydrylovou) skupinou (-SH). V přítomnosti peroxidu vodíku dochází k tvorbě disulfidické vazby mezi dvěma molekulami glutathionu za vzniku vody.



Chemikálie: cystein (1 %), glutathion (1 %), peroxid vodíku (3 %), butan-1-ol, ninhydrin v acetonu (1 %), kyselina octová, destilovaná voda

Pomůcky: zkumavky, mikrokapiláry, rozprašovač, chromatografická komora s krycím sklem, tenká vrstva celulosy, pipeta (10 cm<sup>3</sup>), sušárna

- 1) Do dvou zkumavek se předloží 3cm<sup>3</sup> 1% roztoku cysteinu a 3cm<sup>3</sup> 1% roztoku glutathionu a do obou se přidá 1cm<sup>3</sup> 3% roztoku peroxidu vodíku.
- 2) Obsah zkumavek se promíchá a ponechá cca 2 min. stát (je-li doba stání delší, začíná se z reakční směsi cystein-peroxid vodíku vylučovat cystin).
- 3) Vzorek reakčních směsí se nanese mikrokapilárou na tenkou vrstvu celulosy společně se standardy – výchozími látkami (cystein, glutathion).
- 4) Chromatogram se vloží do komory a vyvíjí se v elučním činidle butan-1-ol : octová kyselina : voda (60 : 15 : 25).
- 5) Po ukončení vyvíjení se chromatogram vyjme z komory a ponechá se odpařit eluční činidlo.

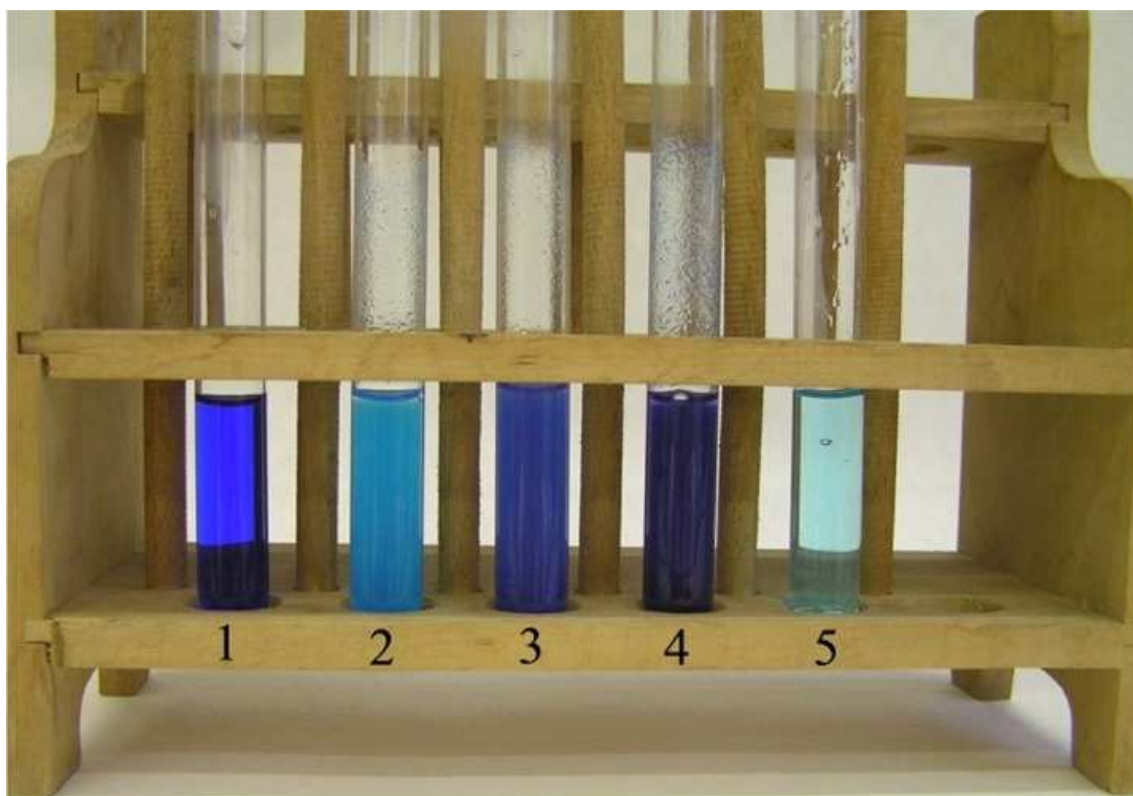
- 6) Pomocí rozprašovače se nanese na chromatogram 1% roztok ninhydrinu v acetonu.
- 7) Chromatogram se vloží do sušárny vyhřáté na cca 80 °C, vyjme se v okamžiku, kdy na tenké vrstvě se vytvoří růžové až fialové skvrny

Závěr:

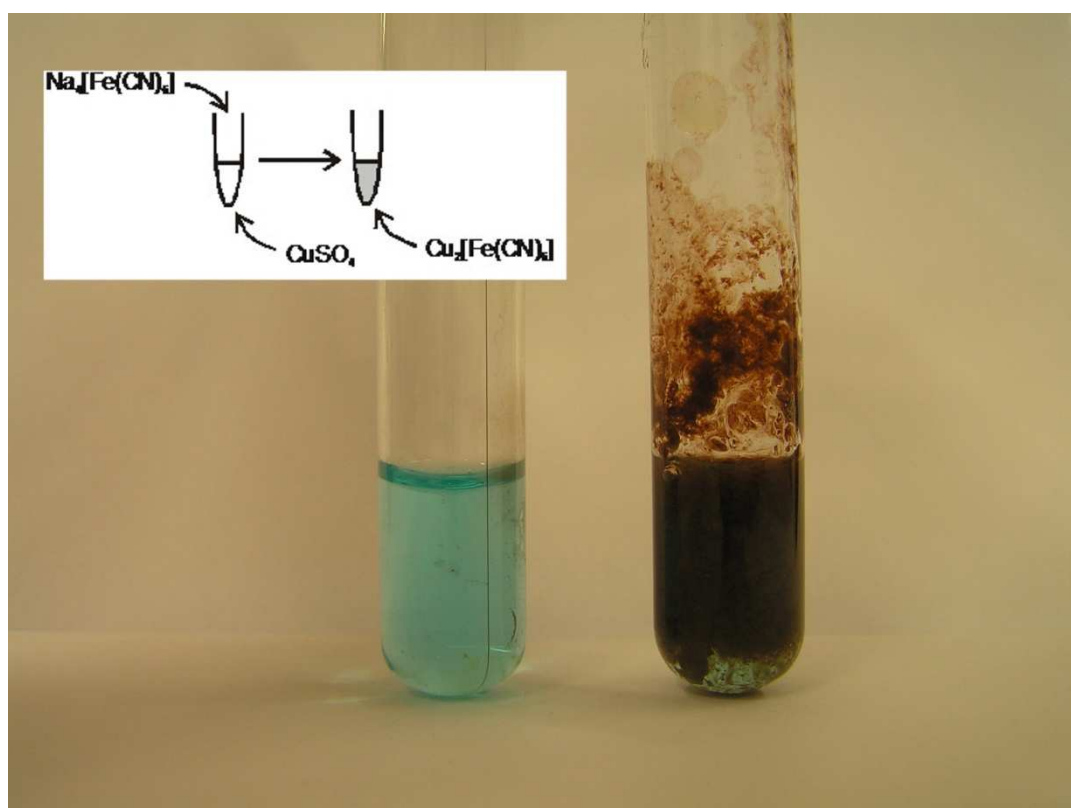
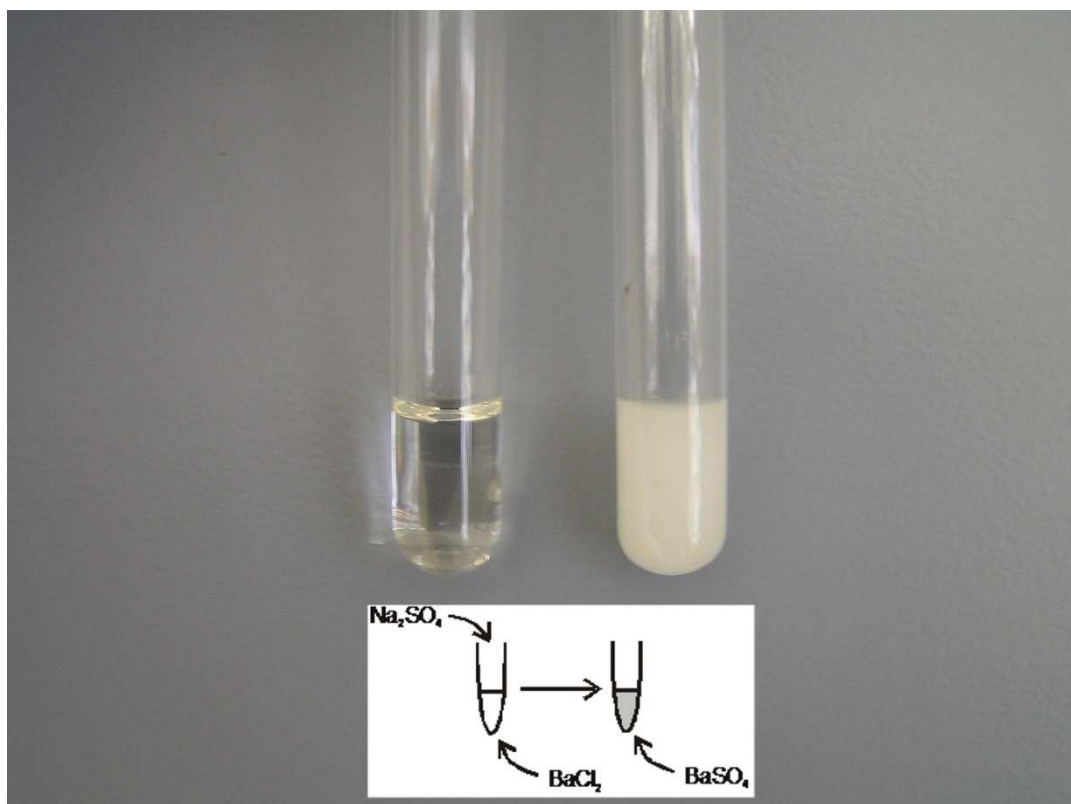
## Obrázky

**Obr. 27. - Komplexy s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty při modelování biuretové reakce**

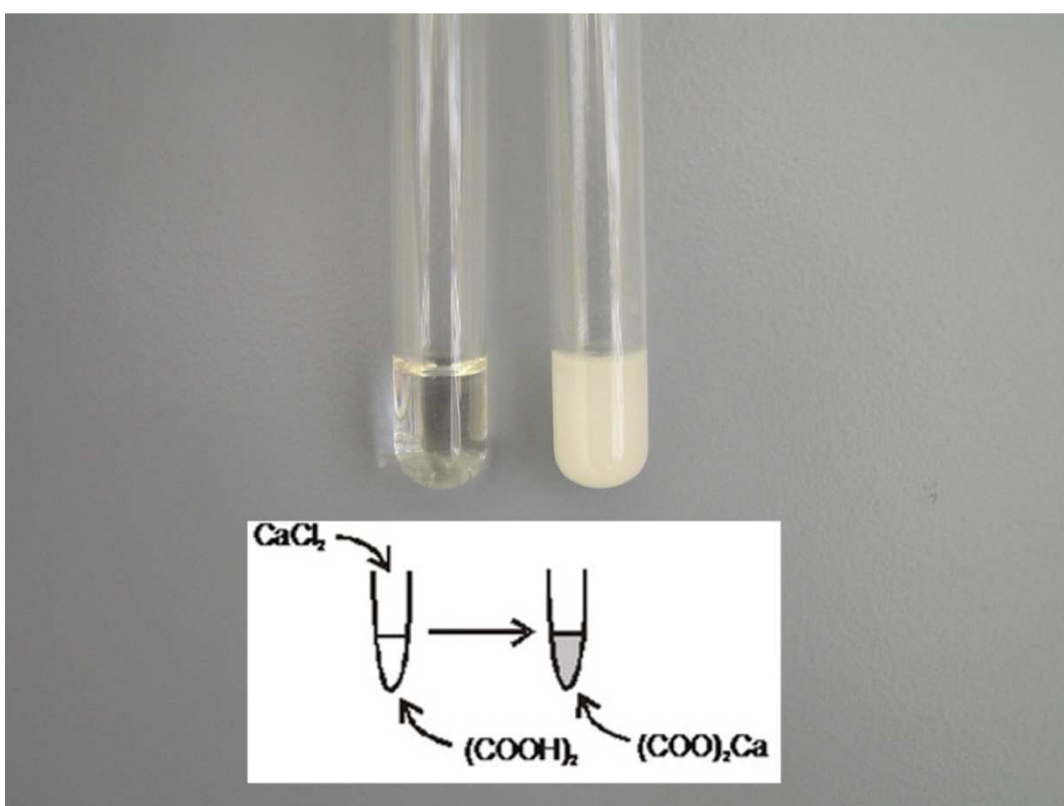
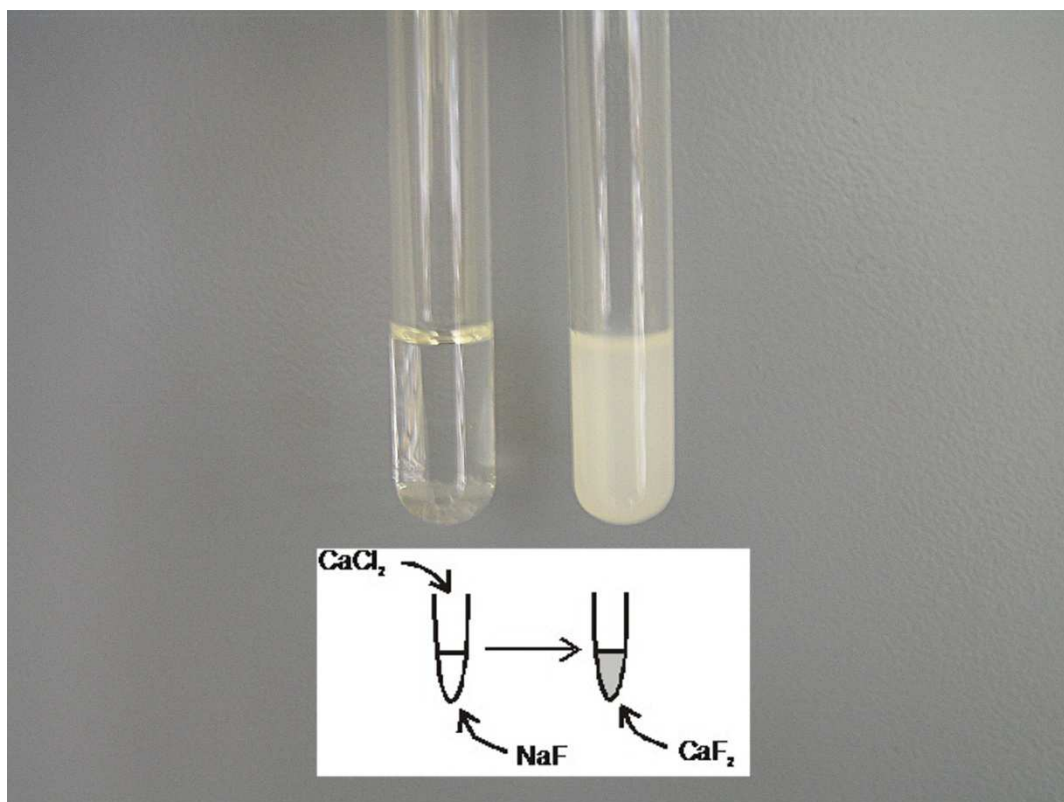
(1- $\text{NH}_3$ , 2-močovina, 3-biuret, 4-albumin, 5- $\text{CuSO}_4$ )



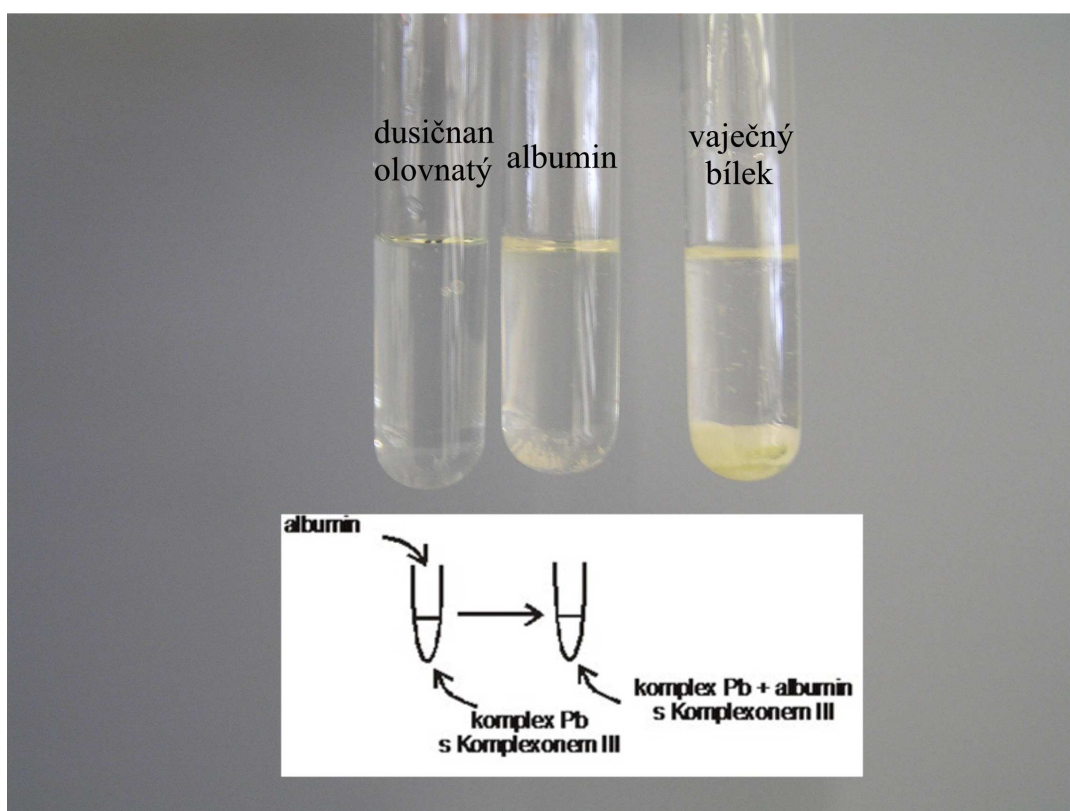
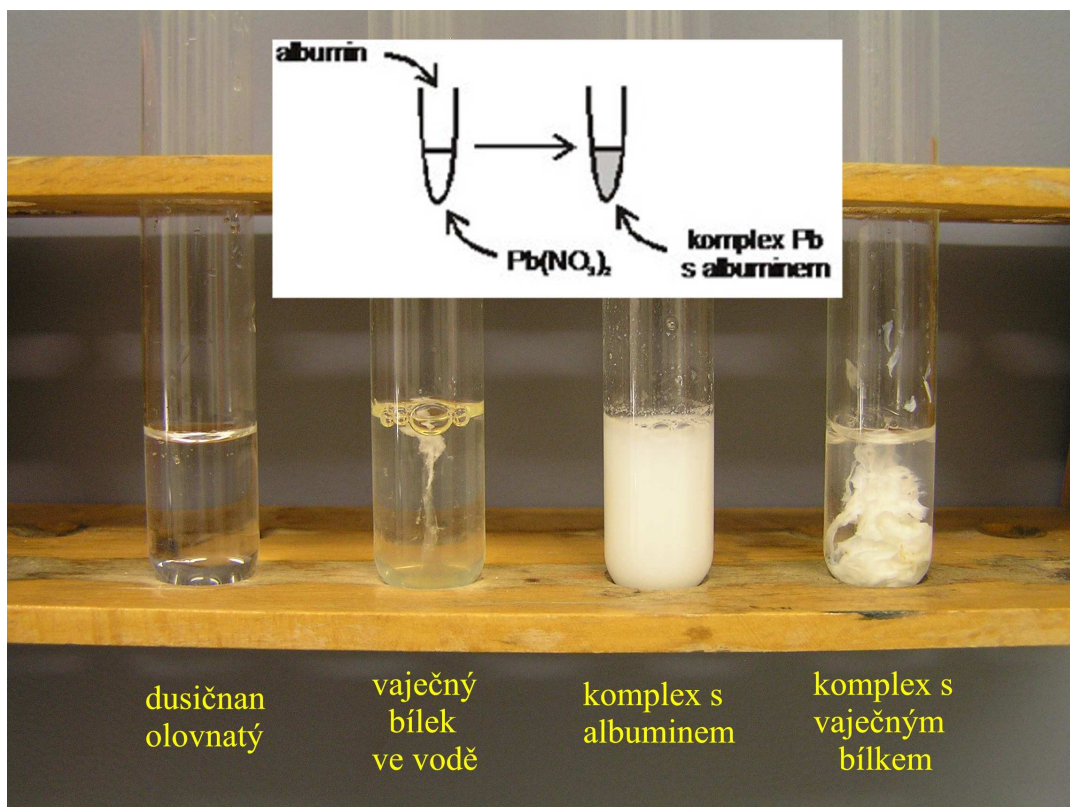
Obr. 28. a 29. – Modely působení antidotních přípravků I



Obr. 30. a 31. - Modely toxického působení



Obr. 32. a 33. – Modely působení antidotních přípravků II



Obr. 34. - Blue Bottle

