

## Projekt badawczy

### **Temat: Chemiczne i spektroskopowe metody analizy cholesterolu - związku o dużym znaczeniu biologicznym**

#### **Wprowadzenie:**

Analiza związków organicznych obejmuje zarówno problemy jakościowe dążące do ustalenia składu chemicznego badanej substancji, szeroko pojętej struktury oraz identyfikacji związków już poznanych, jak też problemy ilościowe związane z wyznaczeniem masy cząsteczkowej, wzoru strukturalnego czy też stężenia badanego połączenia. Analiza chemiczna pozwala ustalić obecność grup funkcyjnych, charakterystycznych struktur oraz struktury szkieletu.

Klasyczna analiza chemiczna opiera się na reakcjach chemicznych jakim ulegają związki organiczne. W pierwszym etapie poznawania związku określany jest skład jakościowy połączenia chemicznego, czyli z jakich pierwiastków jest zbudowany (C, H, O). W kolejnym etapie jest poznawany wzór sumaryczny ( $C_{27}H_{46}O$ ). Pod postacią powyższego wzoru sumarycznego może się kryć wiele związków, należących do różnych grup. W zakwalifikowaniu do jednej z grup związków organicznych jest pomocne określenie rozpuszczalności w różnych rozpuszczalnikach oraz wykonanie szeregu charakterystycznych reakcji. Metody klasycznej analizy związków organicznych są bardzo czasochłonne i wymagają dużych ilości substancji do badań, bez możliwości odzyskania.

W miarę rozwoju chemii organicznej, syntezy wielu nowych związków, wydzielania nieznanymi substancji z produktów naturalnych rosły wymagania stawiane metodom analitycznym. Nowe, spektroskopowe metody analityczne (IR, UV, NMR, MS) wyparły metody klasycznej analizy. Stosowana w laboratoriach naukowo-badawczych coraz nowocześniejsza aparatura pomiarowo-badawcza wymaga niewielkich ilości substancji, pozwala na szybkie oznaczenie i jest bardzo dokładna.

#### **Cel projektu:**

Celem praktycznym projektu jest zastosowanie różnych metod: chemicznych, spektroskopowych i programów komputerowych w celu identyfikacji i oznaczania zawartości substancji chemicznych w żywności i materiale biologicznym. Zwieńczeniem pracy laboratoryjnej będzie komputerowe opracowanie uzyskanych wyników pomiarowych i opracowanie sprawozdania/prezentacji.

## Cele kształcenia:

### Uczeń:

- wymienia i wyjaśnia podstawowe zasady obowiązujące podczas pracy w laboratorium chemicznym,
- wymienia podstawowy sprzęt laboratoryjny stosowany podczas pracy w laboratorium chemicznym,
- definiuje pojęcie barwy i **wyjaśnia** skąd biorą się barwy w przyrodzie i w produktach będących wytworem ludzkiej pracy.
- **podaje przykłady** barwników naturalnych i syntetycznych. Czy wszystkie barwniki można stosować w przemyśle spożywczym?
- **wymienia** znane związki chemiczne charakteryzujące się określoną barwą.
- **opisuje** budowę spektroskopu i oddziaływanie fal elektromagnetycznych, o różnych zakresach energii, na molekuły.
- **planuje** kolejność wykonywanych reakcji chemicznych.
- **wykonuje** samodzielnie reakcje charakterystyczne na wykrywanie cholesterolu.
- w pracowni spektroskopowej **wykonuje** pomiary absorbancji roztworów kompleksu cholesterolu z odczynnikiem żelazowym przy stałej długości fali monochromatycznego promieniowania elektromagnetycznego (tutaj 550 nm) wobec ślepej odczynnikowej.
- po wykonaniu analiz chemicznych, uczniowie myją szkło laboratoryjne i sprzątajają swoje stanowisko pracy. Cel - nauka odpowiedzialnej i bezpiecznej pracy w laboratorium chemicznym.
- **bada** reaktywność cholesterolu z kwasem siarkowym w odmiennych warunkach (reakcja Salkowskiego ze stężonym kwasem siarkowym oraz reakcja Libermann-Burchardta z kwasem siarkowym wobec bezwodnika octowego) oraz z odczynnikiem żelazowym. Obserwuje zmianę zabarwienia mieszaniny reakcyjnej.
- **analizuje**: wpływ środowiska reakcji na rodzaj powstającego produktu, poprzez zmianę barwy oraz intensywność zabarwienia powstającego kompleksu barwnego cholesterolu w zależności od jego zawartości w analizowanej próbce.
- **odczytuje** wyniki i dokumentuje pomiar wypełniając tabelkę z danymi pomiarowymi (wartość absorbancji, zawartość cholesterolu, długość fali promieniowania elektromagnetycznego).
- **obserwuje wykonanie pomiaru** widma cholesterolu metodą spektroskopii IR.
- **analizuje** zależność wartości absorbancji od stężenia (zawartości) badanej substancji.
- **stosuje** programy komputerowe: ORIGIN i arkusz kalkulacyjny Excel do zidentyfikowania badanej substancji i obliczenia jej zawartości w badanej próbce.
- **interpretuje** uzyskane wyniki reakcji charakterystycznych, pomiarów fotokolorymetrycznych i widma IR. Na podstawie tych badań identyfikuje związek chemiczny i jego zawartość w roztworze.

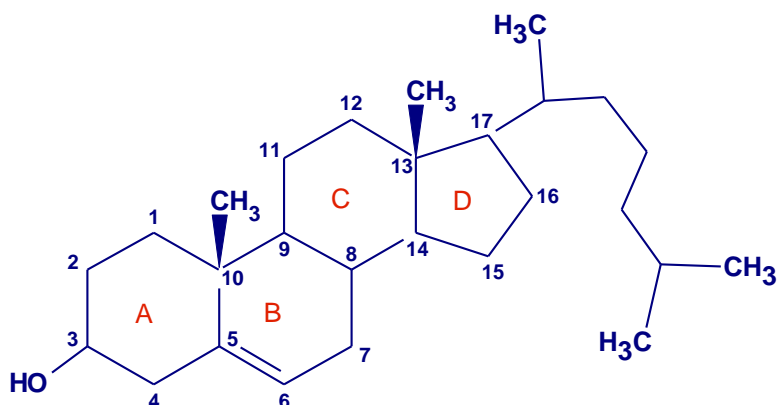
### Pytanie kluczowe:

Do jakiej grupy związków chemicznych należy cholesterol i jaka jest jego budowa chemiczna?

Podaj źródła występowania cholesterolu i rolę jaką odgrywa w procesach życiowych organizmu ludzkiego.

### Przynależność cholesterolu do steroli wchodzących w skład lipidów

Cholesterol jest związkiem chemicznym należącym do bardzo licznej grupy związków organicznych określanej mianem lipidów. W skład lipidów wchodzi związek organiczny, które w przeciwieństwie do węglowodorów, białek, węglowodanów i innych nie wykazują, jak wcześniej wymienione, typowych cech budowy, a głównym powodem zakwalifikowania ich do tej grupy związków jest dobra rozpuszczalność w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Lipidy dzielimy na: lipidy proste (inaczej właściwe) będące estrami gliceryny i kwasów tłuszczowych, woski oraz lipidy złożone: fosfolipidy i sterole. Sterole charakteryzują się 4-pierścieniową budową, zawierającą rdzeń steranu z grupą -OH w pozycji 3 oraz łańcuch boczny w pozycji 17.



Cholesterol jest sterolem pochodzenia zwierzęcego, zbudowanym z czterech połączonych pierścieni węglowodorowych z jednej strony podstawiony grupą hydroksylową, a z drugiej hydrofobowym ogonem węglowodorowym. Reaktywność cholesterolu głównie związana jest z grupą hydroksylową z pozycji 3.

### Występowania cholesterolu i jego funkcje w procesach życiowych organizmu ludzkiego

Cholesterol wraz z fosfolipidami i glikolipidami stanowi lipidowy **składnik błon biologicznych**. Cholesterol stanowi materiał budulcowy prawie wszystkich błon komórkowych organizmów zwierzęcych. Cząsteczki cholesterolu układają się w nich równoległe do łańcuchów kwasów tłuszczowych fosfolipidów. Takie ułożenie w błonach jest stabilizowane oddziaływaniem grupy hydroksylowej przy C3 z sąsiadującymi grupami główek fosfolipidów. Z niektórymi fosfolipidami łatwo tworzy swoiste kompleksy, które koncentrując się w specyficznych regionach błony, formując struktury zwane *tratwami*

*lipidowymi*, wpływające na płynność błon. Zawartość cholesterolu w lipidach błonowych niektórych komórek nerwowych stanowi ok. 25%.

Cholesterol może być dostarczany do organizmu wraz z pożywieniem lub syntezowany *de novo*, podczas trzyletowego procesu biosyntezy, wyprowadzanego z acetylo-CoA. Zatem w organizmie człowieka występuje cholesterol *egzo-* i *endogenny*. Organizm dorosłego człowieka, będącego na diecie niskocholesterolowej, syntezuje ok. 800 mg cholesterolu dziennie. Biosynteza odbywa się w głównie w wątrobie, chociaż znaczne ilości cholesterolu syntezowane są również w jelicie. Kontrola nad syntezą cholesterolu w organizmie jest regulowana przez receptory "wyczuwające" obecność cholesterolu we krwi.

Nadmiar cholesterolu w stosunku do zapotrzebowania wątroby jest eksportowany/przenoszony w postaci lipoprotein (kompleksów białko-lipid) o bardzo małej gęstości VLDL (very low density lipoproteins) do tkanki tłuszczowej i innych tkanek, gdzie ulega uwolnieniu. Uwolniony cholesterol może być wykorzystany do biosyntezy błon lub ponownie zestryfikowany. Cholesterol dostarczony z pożywieniem trafia do jelita, skąd rozpoczyna swoją wędrówkę pod postacią wielkich chylomikronów, cząsteczek o najmniejszej gęstości. W wątrobie ulegają one przemianom i wychodzą z niej w postaci lipoprotein VLDL (very-low-density-lipoproteins) o bardzo małej gęstości, która spowodowana jest dużą zawartością triacylogliceroli i cholesterolu we wnętrzu przenoszącej lipoproteidy. Ubytek triacylogliceroli w wyniku enzymatycznej hydrolizy i przekazanie uwolnionych kwasów tłuszczowych do komórek tłuszczowych powoduje wzrost gęstości cząsteczek z utworzeniem kolejno lipoproteid o pośredniej gęstości IDL oraz o małej gęstości LDL.

#### Czy cholesterol jest potrzebny organizmowi do prawidłowego funkcjonowania?

Z pochodnych cholesterolu ergosterolu i 7,8-didehydrocholesterolu (prowitaminy witaminy D występującej wraz z cholesterolem w lipidach skóry), pod wpływem promieni UV i następnie podwyższonej temperatury, powstają odpowiednio **witaminy D<sub>2</sub>** i **D<sub>3</sub>**. Witaminy z grupy D odgrywają bardzo ważną rolę w gospodarce wapniowo-fosforanowej organizmu.

Cholesterol jest również przekształcany w wątrobie w bardzo ważne **kwasy żółciowe**, tj. kwas cholowy (3,7,12-trihydroksycholanowy), kwas deoksycholowy (3,12-dihydroksycholanowy) i kwas lithocholanowy (3-hydroksycholanowy), które, po przekształceniu i przetransportowaniu do woreczka żółciowego, wchodzi w skład żółci dozowanej dalej do jelit. Zmniejszenie wydzielania kwasów żółciowych przez wątrobę utrudnia trawienie i wchłanianie tłuszczów oraz przyswajanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Zdrowy dorosły organizm ludzki wydziela w ciągu doby około 20 g kwasów żółciowych, z czego ok. 2 g stanowią nowe kwasy wytworzone przez wątrobę.

Cholesterol stanowi podstawowy substrat w biosyntezie **hormonów sterydowych**, tj. płciowych i kortykosterydowych. Hormony płciowe wytwarzane są przez gruczoły płciowe i w niewielkim stopniu przez korę nadnerczy i następnie, w bardzo małym stężeniu, wydzielane do krwiobiegu. Hormony płciowe dzielą się na dwie zasadnicze grupy: męskie

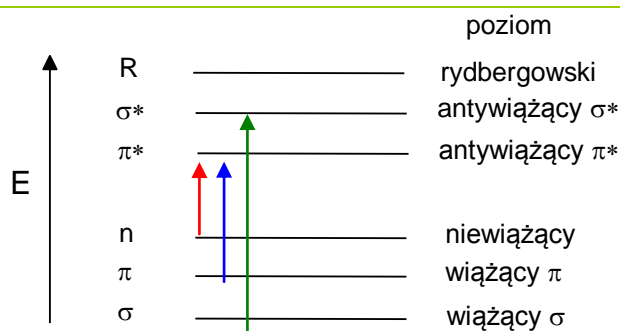
hormony płciowe tzw. *androgeny* ( od greckiego słowa *andros*=mężczyzn) i żeńskie hormony płciowe tzw. *ginogeny* (*geny*=kobieta). Powstałe w wyniku przemian cholesterolu hormony są cząsteczkami sygnałowymi, odpowiedzialnymi za prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Hormony płciowe wpływają na rozwój narządów płciowych oraz kształtowanie się drugorzędowych i trzeciorzędowych cech płciowych. Są również czynnikami wpływającymi na zachowania osobnicze.

### Metody spektroskopowe w analizie chemicznej

Działanie światła na materię wywołuje procesy fizyczne i procesy chemiczne. Dla odróżnienia od procesów zachodzących bez udziału światła określa się je odpowiednio procesami fotofizycznymi i fotochemicznymi.

Podstawowym procesem fotochemicznym jest wytwarzanie materii organicznej w procesie fotosyntezy zachodzącej w zielonych roślinach w wyniku reakcji wody z ditlenkiem węgla z udziałem światła. Przykładem fotochemicznego procesu jest także magazynowanie energii cieplnej podczas przemiany materiału organicznego w paliwa kopalne: węgiel, ropę naftową i gaz. Znaną reakcją fotochemiczną jest również reakcja biosyntezy witaminy D.

W procesach fotofizycznych materia absorbująca światło nie ulega żadnym przemianom chemicznym. Przechodzeniu wiązki światła przez materię (np. związek chemiczny) mogą towarzyszyć takie procesy jak: absorpcja, rozpraszanie, luminescencja, transmisja. Te procesy powodują, że po przejściu przez materię natężenie wiązki światła padającego  $I_P$  zostaje zredukowane do natężenia  $I_T$ . Światło zaabsorbowane znika bezpowrotnie, ulegając przemianie na energię wzbudzenia próbki. Zaabsorbowana energia ulega ostatecznie degradacji na energię cieplną lub w przypadku związków o szczególnych cechach budowy, po absorpcji światła z zakresu UV/VIS może być emitowana w sposób bezpromienisty lub/i promienisty. Emitowanie w sposób promienisty, zaabsorbowanej wcześniej energii, wywołuje efekt świecenia materii (kamizelki drogowe, znaki drogowe itp.). Zaabsorbowana przez materię energia wykorzystywana jest do przeniesienia cząsteczek w stan wzbudzony. W zależności od wielkości tej energii następują wzbudzenia: translacyjne, rotacyjne, oscylacyjne lub elektronowe. Zaabsorbowanie przez cząsteczkę światła z obszaru ultrafioletowego i widzialnego skutkuje przeprowadzeniem jej ze stanu elektronowego podstawowego do jednego ze stanów wzbudzonych. W stanie podstawowym wszystkie elektrony walencyjne atomów tworzących dany związek znajdują się na wiążących orbitalach molekularnych typu  $\sigma$ ,  $\pi$ , a w przypadku atomów takich jak na przykład azot (N), tlen (O), chlor (Cl), również na orbitalach niewiążących  $n$ . Zaabsorbowanie energii z obszaru UV/VIS powoduje przeniesienie elektronów z orbitali wiążących i niewiążących na wyżej energetyczne orbitale antywiążące w jednym ze stanów wzbudzenia. Przejścia typu  $n \rightarrow \pi^*$  zazwyczaj są przejściami elektronowymi o najniższej energii wzbudzenia, natomiast przejścia typu  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  wymagają wysokich energii.



Poziomy elektronowe cząsteczki.

Za powstawanie barwy związku odpowiedzialne są przemieszczenia tych elektronów na skutek pochłonięcia pewnego kwantu energii promieniowania elektromagnetycznego z obszaru ultrafioletowego i widzialnego. Postrzeganie barwy jest zjawiskiem złożonym, i aby zrozumieć związek między przejściami elektronowymi w cząsteczkach substancji, a jej barwą, należy przypomnieć sobie, iż obserwowana przez nas barwa substancji jest **barwą komplementarną** do zaabsorbowanej przez nią barwy światła. I tak, zaabsorbowanie przez substancję barwy czerwonej ze światła białego (stanowiącego mieszaninę światła wszystkich kolorów) powoduje, że postrzegamy je jako zielone, ponieważ komplementarną barwą do czerwonej jest leżąca po przeciwnej stronie koła barw – barwa zielona. Zieloną barwę zaobserwujemy również, jeżeli substancja będzie absorbować ze światła białego wszystkie kolory poza zielonym. Nasze oko zarejestruje barwę czerwoną, gdy dotrze do niego promieniowanie o danej długości fali  $\lambda \sim 750 \text{ nm}$ , jak też złożona wiązka światła (dopełniająca), zawierająca wszystkie długości światła białego, ale pozbawiona pochłoniętej fali światła zielonego o długości  $\sim 550 \text{ nm}$ .

Barwa substancji jest ściśle uzależniona od jej budowy chemicznej. Związki, w których atomy połączone są tylko wiązaniami pojedynczymi, charakteryzują się wysokoenergetycznymi przejściami  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , dlatego są w zakresie bliskiego nadfioletu przezroczyste. Aby związek był barwny musi posiadać w swej budowie co najmniej jedno wiązanie wielokrotne, bądź grupę funkcyjną z nienasyconym wiązaniem. Substancje absorbujące fale fioletowo-niebieskie wykazują barwę od żółtej do pomarańczowej. Pochłanianie światła o dużych długościach fali (małych energiach) jest relatywnie rzadkie i prowadzi do powstania barwy od niebieskiej do fioletowej.

**Spektroskopia** bada oddziaływania między promieniowaniem elektromagnetycznym a materią, polegające na pochłanianiu (absorpcji) lub oddawaniu (emisji) przez tę materię części energii w postaci promieniowania. Określa rodzaje przejść i przyporządkowuje im odpowiednie pasma i linie. Jest bardzo dobrym narzędziem do identyfikowania i określania budowy chemicznej związku.

**Spektrofotometria** (absorpcjometria) stosowana jest do określania stężenia lub zawartości atomów lub cząsteczek w danym układzie absorbującym, np. w roztworze. Jest rodzajem ilościowej analizy chemicznej. W spektrometrii nie analizuje się rodzaju przejść (jak w spektroskopii) lecz wyznacza się funkcję określającą zależność natężenia

widma od stężenia lub zawartości badanej substancji. Absorpcjometria wykorzystuje zdolność substancji rozpuszczonej w rozpuszczalniku do pochłaniania światła. Podstawowym prawem absorpcjometrii jest prawo Bouguera-Lamberta-Beera, ilustrujące wprost proporcjonalną zależność absorbancji substancji absorbującej światło do stężenia i grubości warstwy roztworu.

$$A = \epsilon c l$$

gdzie:  $\epsilon$  - współczynnik absorpcji,  $c$  – stężenie substancji,  $l$  – grubość warstwy roztworu, przez którą przechodzi światło, tzw. droga optyczna.

W ramach tego ćwiczenia poznamy dwie metody spektroskopowe służące do badania związków organicznych, tj. spektroskopię IR oraz spektrofotometrię (absorpcjometrię). Do analizy jakościowej zastosujemy spektroskopię FT-IR, natomiast do oznaczenia zawartości badanej substancji – spektroskopię UV/VIS w jej obszarze widzialnym.

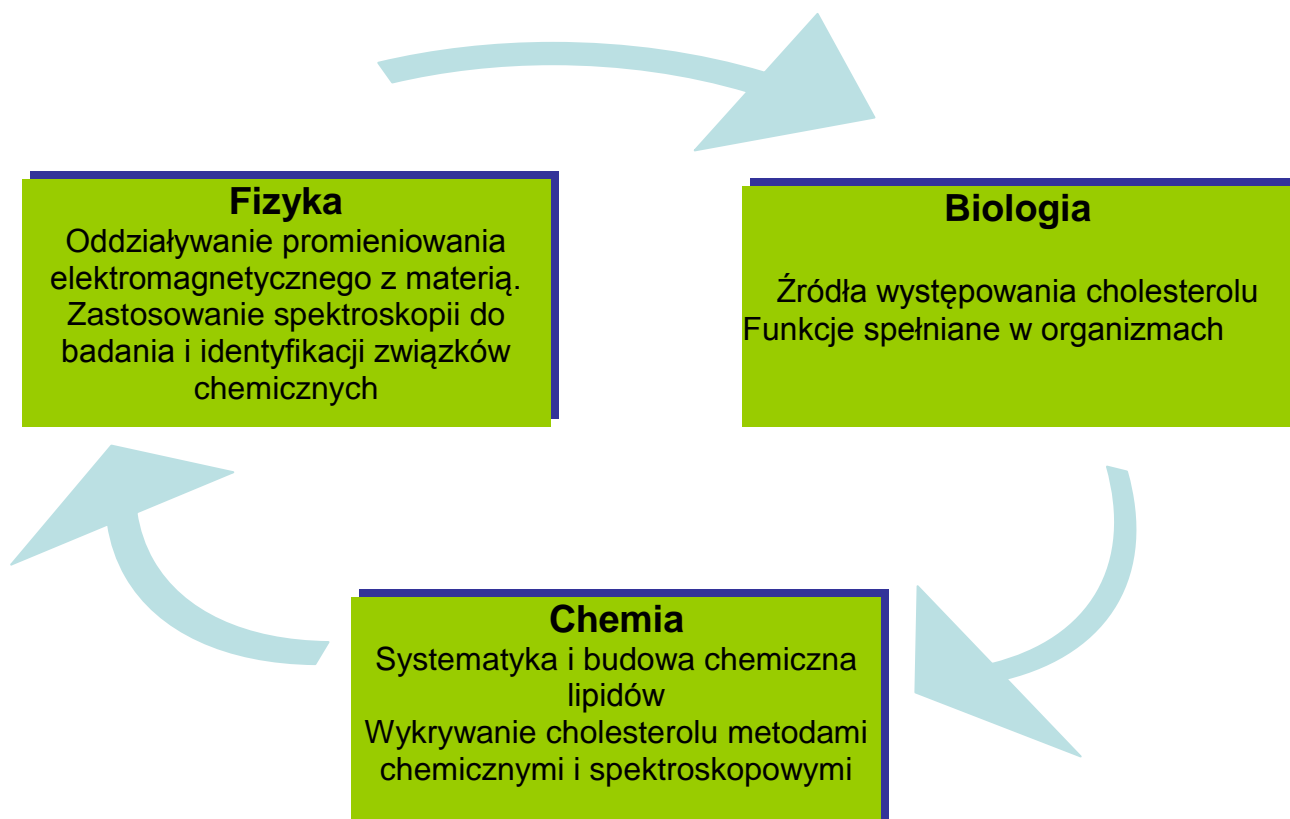
**Spektroskopia IR** zostanie wykorzystywana w tym projekcie, jedynie do wykrycia substancji na zasadzie porównania widma IR badanej substancji z widmami kilku innych związków chemicznych o nieznannej budowie. Zarejestrowane widmo IR badanej substancji uczniowie będą mogli zapisać na nośnikach zewnętrznych, a następnie wygenerować w programie komputerowym ORIGIN, tworząc identyczne widmo jak na ekranie monitora spektroskopu FT-IR. Wykorzystując część możliwości programu komputerowego ORIGIN, nałożą zmierzone widmo na widma związków znajdujących się w udostępnionym zbiorze widm. Dokonają porównania kształtu widma i intensywności poszczególnych pasm, i na zasadzie odcisku palca, przypiszą identyczne widmo ze zbioru widm, określając tym samym nazwę i budowę związku.

**Spektrofotometrię** (fotokolorymetrię) zastosują do oznaczenia zawartości cholesterolu w badanym roztworze. Pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali, przy której absorbancja ma największą wartość. Zmierzą wartość absorbancji przy długości fali 550 nm dla wzorcowych roztworów żelazowego kompleksu cholesterolu wobec ślepej próby tzw. odczynnikowej, a następnie próbki o nieznannej zawartości cholesterolu. Wykorzystując dane pomiarowe: zawartość substancji i wartość absorbancji sporządzą wykres kalibracyjny z zastosowaniem arkusza kalkulacyjnego Excel. Odczytają funkcję absorbancji w stosunku do zawartości cholesterolu w jednostce objętości. W oparciu o równanie i krzywą kalibracyjną utworzą formułę i obliczą zawartość substancji w analizie.

### UWAGA

Znajomość zasad bezpieczeństwa i higieny pracy jest bezwzględnym elementem bezpieczeństwa uczniów w laboratorium chemicznym. Aby zapobiec przypadkowym zranieniom lub oparzeniom w trakcie wykonywania poszczególnych czynności w laboratorium, uczniowie są **bezwzględnie zobowiązani** do zapoznania się z podstawowymi zasadami bezpiecznej pracy w laboratorium chemicznym jeszcze w trakcie zajęć szkolnych. W załączniku 1 zostały zebrane najważniejsze zasady. Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczeń w laboratorium, zostaną one powtórzone. Zostanie przypomniany również schemat postępowania na wypadek zagrożenia.

## Integracja treści przedmiotowych:



## Wykorzystanie matematyki i technologii informacyjnej:

- gromadzenie i porządkowanie informacji i danych niezbędnych podczas wykonywania kolejnych zadań (analitycznych i pomiarowych),
- wykorzystanie arkusza kalkulacyjnego do opracowywania wyników analizy ilościowej cholesterolu (sporządzanie wykresu w oparciu o metodę najmniejszych kwadratów) obliczenie zawartości cholesterolu w próbce,
- wykorzystanie oprogramowania ORIGIN do wygenerowania widma IR badanego związku, a następnie identyfikacji na podstawie analizy porównawczej z innymi widmami,
- tworzenie prezentacji efektów pracy w laboratorium i pracowni spektroskopowej z wykorzystaniem programu PowerPoint.



**Materiały i środki dydaktyczne:**

- spektroskop UV/VIS
- spektroskop FT-IR,
- komputer z oprogramowaniem ORIGIN do generowania eksperymentalnych widm IR,
- komputer z oprogramowaniem kalkulatoryjnym Excel,
- zestawy przygotowanych odczynników i analitów do oznaczania cholesterolu,
- szkło i drobny sprzęt laboratoryjny,
- instrukcje do ćwiczeń laboratoryjnych,
- karty pracy.

**Metody pracy:**

- praca laboratoryjna - wykonywanie reakcji charakterystycznych na wykrywanie cholesterolu,
- praca z wykorzystaniem spektroskopu UV/VIS - pomiar absorbancji roztworów wzorcowych i analizowanych,
- rejestracja widma IR cholesterolu (obserwowanie pomiaru i zapisu widma IR),
- praca z komputerem z wykorzystaniem arkusza kalkulacyjnego Excel oraz ORIGIN w celu opracowania wyników badań,
- dyskusja i porównanie wyników,
- przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint.

**Etapy projektu:**

<b>etap</b>	<b>działania</b>	<b>czas</b>
<b>Organizacja</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- omówienie zasad bezpiecznej pracy w laboratorium chemicznym,</li><li>- zapoznanie uczniów z podstawowym sprzętem laboratoryjnym wykorzystywanym w trakcie pracy,</li><li>- krótkie wprowadzenie teoretyczne w świat spektroskopii,</li><li>- podział grupy na podgrupy.</li></ul>	<b>30 minut</b>
<b>Planowanie</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- przypisanie podgrupy do asystenta oraz wskazanie miejsca pracy,</li><li>- przedstawienie zadań do realizacji podczas zajęć</li><li>- harmonogram pracy w laboratorium</li></ul>	<b>10 minut</b>
<b>Realizacja</b>	1. Wykonanie reakcji Salkowskiego na wykrywanie cholesterolu w próbkach A i B (dokumentacja fotograficzna) .	<b>15 minut</b>

	2. Wykonanie reakcji Liebermanna-Burchardta na wykrywanie cholesterolu w próbkach A i B (dokumentacja fotograficzna).	<b>15 minut</b>
	3. Wykonanie reakcji z odczynnikiem żelazowym na 3 próbkach wzorcowych o znanej zawartości cholesterolu (pokazuje asystent)	<b>15 minut</b>
	4. Wykonanie reakcji z odczynnikiem żelazowym na próbce roztworu o nieznannej zawartości cholesterolu (wykonuje uczeń).	<b>20 minut</b>
	7. Wykonanie pomiarów absorbancji trzech wzorcowych próbek i analizów.	<b>60 minut</b>
	8. Obserwowanie rejestracji widma IR cholesterolu.	<b>15 minut</b>
	9. Opracowanie wyników pomiarów kolorymetrycznych w oparciu o arkusza kalkulacyjnym Excel (wykreślenie krzywej wzorcowej, wyznaczenie określonej funkcji, a następnie obliczenie zawartości cholesterolu w analizie).	<b>20 minut</b>
	10. Wygenerowanie widma IR analizowanego związku w programie ORIGIN i przypisanie mu odpowiednika z zapisanych na komputerze widm.	<b>30 minut</b>
	11. Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć badań i obserwacji oraz z wyciągniętych wniosków.	<b>40 minut</b>
<b>Prezentacja</b>	- karty pracy, - prezentacja wykresów i obliczeń wykonanych w arkuszu kalkulacyjnym Excel, - prezentacja nałożonych widm IR, - prezentacja wykonana w programie PowerPoint.	-
<b>Ocena</b>	- samoocena (uczeń), - ocena opisowa (nauczyciel).	-

### Szczegółowy opis zadań na etapie realizacji projektu:

#### **Zadanie 1**

#### **Wykrywanie cholesterolu metodami chemicznymi**

##### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Reakcje Salkowskiego oraz Liebermanna-Burchardta są reakcjami charakterystycznymi na wykrywanie cholesterolu w badanej próbce. W obu reakcjach kwas siarkowy powoduje dehydratację pierścienia A cholesterolu, kondensację dwóch cząsteczek i sulfonowanie w pierścieniu B. Przy dużym nadmiarze kwasu siarkowego w reakcji Salkowskiego, powstaje kwas disulfonowy bicholestadienu o czerwonej barwie. W reakcji Liebermanna-

Burchardta wobec mniejszej ilości kwasu siarkowego tworzy się zielony kwas monosulfonowy bicholestadienu.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Uczniowie wykonujący reakcje charakterystyczne na wykrywanie cholesterolu po raz pierwszy, mogą mieć problemy z rozpoznawaniem barw i kolejnością ich pojawiania się. Aby ułatwić to zadanie prowadzący ćwiczenia, przed przystąpieniem uczniów do pracy, wykona obydwie reakcje i skomentuje wyniki.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Reakcje Salkowskiego oraz Liebermanna-Burchardta, na wykrywanie cholesterolu, uczniowie wykonują indywidualnie na dwóch, losowo przydzielonych próbkach. Jedna z nich zawiera cholesterol, druga jest ślepą próbą.

Sposób wykonania

Wykrywanie cholesterolu metodami chemicznymi należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zawartymi w **Instrukcji nr 1**, umieszczonej w dalszej części tego opracowania.

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania **zadania 1** należy zwrócić na następujące kwestie:

- w obu reakcjach zachodzi proces dehydratacji cząsteczek cholesterolu. Obecność nawet śladowych ilości wody w środowisku reakcji uniemożliwia jej przebieg, dlatego szczególną uwagę należy zwrócić na próbówki; używać do reakcji **tylko suchych**.
- nie przeoczyć szybkiej zmiany zabarwienia w reakcji Liebermanna-Burchardta.
- prawidłowo odczytać kolory i kolejność ich występowania w próbie Salkowskiego.
- zachować ostrożność w trakcie wykonywania analiz z użyciem stężonych kwasów.
- w razie niebezpieczeństwa zawiadomić prowadzących ćwiczenie i stosować się do jego poleceń.

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Oczekuje się, że w ramach wykonywania **zadania 1** uczeń opanuje znajomość podstawowego sprzętu laboratoryjnego, wykonywania prostych czynności laboratoryjnych, odczytywania i interpretacji wyników prostych analiz chemicznych opartych na barwnych reakcjach charakterystycznych. Uczeń powinien opanować wiedzę teoretyczną dotyczącą zachodzących przemian chemicznych. Oczekiwany efekt pracy w ramach tego zadania będzie również wypełnienie przez ucznia **Karty pracy do zadania 1**.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Od nauczyciela oczekuje się sprawdzenia wiedzy teoretycznej ucznia z obowiązującego zakresu materiału, przydzielenia uczniom próbek do analizy. Rolą nauczyciela jest szkolenie i nadzorowanie wykonywanych przez ucznia czynności. Nauczyciel powinien motywować ucznia pytaniami i sugestiami, zachęcać do pracy oraz sprawdzać i

korygować jego techniki laboratoryjne. Nie jest wskazane wykonywanie pracy za ucznia, nawet wówczas, gdy wykonywane przez niego zadanie wymaga więcej czasu niż jego kolegom. Nauczyciel powinien dać uczniowi szansę na powtórzenie zadania, powinien zachęcić do samodzielnego rozwiązywania problemu, do zadawania pytań nauczycielowi, do proszenia o wsparcie i radę. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością.

Rolą nauczyciela jest również dbanie o bezpieczeństwo pracy w laboratorium chemicznym. W trakcie zajęć kontrolują czy uczniowie wykonują prace w okularach ochronnych i fartuchu laboratoryjnym, i czy utrzymują stanowisko pracy w czystości.

Nauczyciel rozdaje, nadzoruje wypełnianie oraz zbiera wypełnione przez uczniów **Karty pracy do zadania 1.**

## **Zadanie 2**

### **Przygotowanie roztworów żelazowych kompleksów cholesterolu do kolorymetrycznego oznaczenia zawartości cholesterolu w próbce**

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

W ramach **zadania nr 2** grupa uczniów otrzymuje trzy roztwory wzorcowe o znanej zawartości cholesterolu, mieszczącej się w granicach 20 -100  $\mu\text{g}$ , a każdy uczeń indywidualnie otrzymuje od prowadzącego ćwiczenie roztwór o nieznannej zawartości cholesterolu. Prowadzący ćwiczenie pokazuje w jaki sposób należy odparować rozpuszczalnik z próbki, a następnie wykonuje reakcję kompleksowania cholesterolu odczynnikami żelazowym w środowisku stężonego kwasu octowego.

#### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Odparowywanie rozpuszczalników wymaga skupienia i dokładności oraz znajomości zasad bezpieczeństwa. Podstawową trudnością w tym zadaniu jest uchwycenie właściwego momentu, w którym należy przerwać ogrzewanie próbki, aby nie dopuścić do jej spalenia. Należy zatem bacznie obserwować pokazowe odpędzanie rozpuszczalnika wykonane przez prowadzącego ćwiczenie. Pod koniec zmniejszyć szybkość ogrzewania. Inną trudnością może być brak doświadczenia w posługiwaniu się pipetami. Najlepszym rozwiązaniem będzie przeciwiczenie dozowania np. wody destylowanej. Uczeń mający trudności z posługiwaniem się tą techniką odmierzania cieczy, powinien prosić o pomoc nauczyciela, którego zadaniem jest wspieranie i współpraca z uczniem.

#### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń wykonuje samodzielnie reakcję kompleksowania cholesterolu odczynnikami żelazowym.

#### Sposób wykonania

Syntezę kompleksu cholesterolu z odczynnikami żelazowym należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zawartymi w **Instrukcji nr 2**, umieszczonej w dalszej części tego opracowania oraz w oparciu o pokaz wykonany przez nauczyciela na jednej z

próbek wzorcowych

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania **zadania 2** należy zwrócić na następujące kwestie:

- kwas octowy stosowany do sporządzenia roztworów cholesterolu jest cieczą wrzącą powyżej 100 °C, dlatego odparowanie prowadzi się bezpośrednio nad palnikiem gazowym.
- zwrócić uwagę na dokładność dozowania odczynników (kwasu octowego i odczynnika żelazowego) mającą wpływ na końcowy efekt pracy, tj. dokładność oznaczenia zawartości substancji w roztworze.
- koniecznie przygotować „ślepą odczynnikową”.
- przed przystąpieniem do dalszych czynności pozostawić mieszaninę reakcyjną na 10 minut.

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

W efekcie wykonania **zadania 2** uczeń powinien opanować umiejętność odparowywania rozpuszczalników oraz dozowania niewielkich pojemności cieczy przy pomocy pipety automatycznej. Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie wykonanie kompleksu cholesterolu, zastosowanie umiejętności przeliczania stężeń roztworów i wypełnienie przez ucznia **Karty pracy do zadania 2**.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Od nauczyciela oczekuje się przygotowania i sprawdzenie wiedzy z zakresu obliczania stężeń roztworów. Nauczyciel przydziela każdemu z uczniów po jednej próbce roztworu do analizy. Do powinności nauczyciela należy instruowanie, szkolenie i nadzorowanie wykonywanych przez ucznia czynności. Nauczyciel powinien motywować ucznia pytaniami i sugestiami, zachęcać do pracy oraz sprawdzać i korygować jego techniki laboratoryjne. Nie jest wskazane wykonywanie pracy za ucznia, nawet wówczas gdy wykonywane przez niego zadanie wymaga więcej czasu niż przewidziano. Nauczyciel powinien dać uczniowi szansę na powtórzenie zadania, powinien zachęcić do samodzielnego rozwiązywania problemu, stwarzać atmosferę pracy zachęcającą do zadawania pytań nauczycielowi oraz do proszenia o wsparcie i radę. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością.

Do zadań nauczyciela należy dbanie o bezpieczeństwo pracy w laboratorium chemicznym. Nauczyciel rozdaje, nadzoruje wypełnianie oraz zbiera wypełnione przez uczniów **Karty pracy do zadania 2**.

### **Zadanie 3**

**Pomiar absorbancji kompleksów barwnych cholesterolu metodą fotokolorymetrii z zastowaniem spektroskopu UV/VIS**

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Absorbpcjometria wykorzystuje zdolność rozpuszczonych związków chemicznych do

absorbowania światła całą swoją objętością. Zdefiniowana substancja pochłania promieniowanie świetlne o ściśle określonej długości fali  $\lambda$  i intensywności. Podstawowe prawo absorpcjometrii, które stosuje się jedynie do roztworów o niskich stężeniach, ilustruje zależność absorbancji materiału pochłaniającego światło od iloczynu współczynnika absorpcji, stężenia oraz długości drogi optycznej w roztworze. Przy stałych wartościach współczynnika absorpcji (charakterystyczny dla danej substancji) i długości drogi optycznej (grubość kuwety pomiarowej), wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia (lub zawartości) badanej substancji w roztworze. Zależność tę wykorzystuje się do kolorymetrycznego oznaczania zawartości substancji barwnych w roztworach. W zadaniu nr 2 uczniowie przygotowali roztwory barwnych kompleksów cholesterolu z odczynnikami żelazowym z otrzymanych do analizy próbek. Wcześniej przygotowane zostały (przez prowadzącego ćwiczenie i uczniów ochotników) kompleksy z trzech roztworów wzorcowych (o znanej zawartości cholesterolu). **Zadanie 3** koncentruje się na wykonaniu pomiarów absorbancji trzech roztworów wzorcowych i wszystkich przydzielonych i skompleksowanych przez uczniów analitów oraz zapisaniu wyników. Pierwszy pokazowy pomiar wzorcowego roztworu wykonuje prowadzący ćwiczenie.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Spektrometr UV/VIS zostanie włączony co najmniej 1 godzinę przed przystąpieniem do wykonywania pomiarów, w celu ustabilizowania jego parametrów. Najczęściej pojawiającymi się trudnościami w trakcie wykonywania tego zadania jest niedostateczne opanowanie budowy spektrometru, lęku przed pracą na skomplikowanym, nowoczesnym sprzęcie pomiarowo-badawczym lub zwykłe rozkojarzenie. Trudności te mogą być wyeliminowane przez dobre przygotowanie ucznia do zajęć oraz współpraca z nauczycielem. Uczeń ma prawo prosić nauczyciela o pomoc w sytuacjach kiedy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń pracuje indywidualnie, zgodnie z informacjami zawartymi w przygotowanej dla ucznia **instrukcji do zadania 3**.

Sposób wykonania

Pomiary absorbancji należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zawartymi w **Instrukcji nr 3**, umieszczonej w dalszej części tego opracowania oraz w oparciu o pokaz wykonany przez prowadzącego ćwiczenie na jednej z próbek wzorcowych

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania **zadania 3** należy zwrócić na następujące kwestie:

- umieszczenie kuwety z próbą ślepą odczynnikową we właściwej, prawej komorze pomiarowej,
- przez cały czas wykonywania pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych i analitów

kuweta ze ślepą próbą odczynnikową znajduje się w prawej komorze pomiarowej,

- przed przystąpieniem do wykonywania pomiaru, kuetę zawierającą badany materiał umieszcza się w prawej komorze pomiarowej.
- kuetę kwarcową, do której jest wlewany roztwór badanego kompleksu muszą być bezwzględnie czyste i suche,
- dokładne wpisywanie wyników pomiaru do przygotowanej tabeli, zamieszczonej w

### **Karcie pracy 3.**

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Wymiernym efektem pracy ucznia realizującego **zadanie 3** będzie indywidualne przygotowanie kuetę z badanym roztworem, samodzielne wykonanie pomiaru absorbancji na dwuwiązkowym spektrometrze UV/VIS, jak też naniesienie danych z pomiarów do tabeli zawartej w Karcie pracy 3. Uczeń może wykonać zdjęcie spektroskopu do ewentualnego wykorzystania w prezentacji w ramach ostatniego zadania.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Przed przystąpieniem do pomiarów, nauczyciel powinien sprawdzić znajomość lub przypomnieć budowę spektroskopu i zasadę jego działania. Powinien wspierać prowadzącego ćwiczenie w dyscyplinowaniu uczniów do właściwego zachowania w pomieszczeniu, w którym zgromadzony jest bardzo wartościowy sprzęt naukowo-pomiarowy. Rolą nauczyciela jest również instruowanie ucznia i nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności, służenia radą i pomocą, zachęcanie do pracy.

## **Zadanie 4**

### **Pokazowy pomiar widma IR cholesterolu na spektrometrze FT-IR**

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Pomiar widma IR cholesterolu rozproszonego w bezwodnym KBr zostanie zmierzony przez prowadzącego ćwiczenie. Powodem wykonania tego pomiaru jest przedstawienie nowoczesnych metod analizy substancji chemicznych z zastosowaniem najnowocześniejszej aparatury pomiarowo-badawczej. W tym projekcie uczniowie zapoznają się z metodą spektroskopową stosowaną do identyfikacji związków chemicznych, ich czystości między innymi w przemyśle farmaceutycznym. Pomiarowe dane zostaną zapisane na nośniku zewnętrznym i posłużą uczniom, w kolejnym zadaniu, do zidentyfikowania widma cholesterolu spośród trzech widm różnych substancji. Zaobserwowanie zgodności wszystkich pasm widma nieznanego związku z widmem wzorca (zdefiniowana czysta substancja) jest dowodem na identyczność badanych związków. Każdy związek chemiczny posiada niepowtarzalny obraz widma w obszarze promieniowania IR, z wyjątkiem enantiomerów.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Nie przewiduje się żadnych trudności w trakcie wykonywania tego zadania. Pastyłkę

cholesterolu w KBr, pomiar widma oraz zapis na zewnętrznym nośniku wykona prowadzący ćwiczenie.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Zadanie wykonuje prowadzący ćwiczenie lecz wyniki jego pracy wykorzystuje uczeń w kolejnym zadaniu.

Sposób wykonania

Prowadzący ćwiczenie zna sposób wykonania tego zadania.

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Uczeń powinien obserwować sposób przygotowania próbki i ilość materiału potrzebną do wykonania pomiaru widma IR. Powinien obserwować czynności jakie wykonuje prowadzący ćwiczenie podczas pomiaru i rejestracji widma.

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Uczeń otrzymuje elektroniczny zapis danych, które posłużą mu do dalszych prac analitycznych z zastosowaniem komputera i oprogramowania ORIGIN.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Nauczyciel powinien wspierać prowadzącego ćwiczenie w dyscyplinowaniu uczniów do właściwego zachowania w pomieszczeniu, w którym zgromadzony jest bardzo wartościowy sprzęt naukowo-pomiarowy.

## **Zadanie 5**

### **Opracowanie w arkuszu kalkulacyjnym Excel wyników pomiarów kolorymetrycznych roztworów kompleksu cholesterolu z odczynnikiem żelazowym**

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Tę część zadania uczniowie wykonują w laboratorium komputerowym zgodnie z **Instrukcją nr 4**. W oparciu o wykonane w pracowni spektroskopowej pomiary fotokolorymetryczne roztworów wzorcowych należy, w arkuszu kalkulacyjnym Excel, wykreślić krzywą kalibracyjną, a następnie wygenerować równanie funkcji absorbancji badanego roztworu od zawartości cholesterolu w próbce. Utworzyć, na podstawie równania funkcji, formułę do obliczenia zawartości cholesterolu w otrzymanych analitach, i obliczyć zawarty w nich cholesterol. Zaznaczyć na wykresie tę wartość i zapisać w celu wykorzystania w prezentacji.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Narzędziem pracy w **zadaniu 5** będzie arkusz kalkulacyjny Excel, który posłuży do wykreślenia krzywej kalibracyjnej i następnie obliczenia zawartości cholesterolu w próbce. Trudności podczas wykonywania tego zadania mogą wynikać z nieznaności arkusza kalkulacyjnego. Dla ułatwienia tego zadania w **Instrukcji nr 4** zamieszczono „screiny” i komentarz do kolejno wykonywanych operacji.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Przy jednym komputerze pracuje jeden uczeń. W pracy pomaga i nadzoruje prowadzący



ćwiczenia. Pomocą jest również dokładna, ilustrowany „krok po kroku” instrukcja nr 4.

#### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 4** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie i umieszczonej w dalszej części opracowania.

#### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Wygenerowanie krzywej kalibracyjnej jest zadaniem prostym, pod warunkiem prawidłowego wprowadzenia danych z pomiarów kolorymetrycznych i stosowania się do poleceń zawartych w instrukcji. Zadanie to jest zadaniem stosunkowo prostym, nie wymagającym dużej ilości czasu czy szczególnej znajomości tematu. Wszystkie obliczenia wykonywane są w arkuszu kalkulacyjnym, więc uczeń powinien skupić się przede wszystkim na tym, żeby prawidłowo wprowadzić do arkusza wszystkie wartości liczbowe, wybrać właściwą opcję wykresu oraz prawidłowo określić formułę. Zastosować formułę do obliczenia wymaganej wartości.

#### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Efektom pracy ucznia wykonanej w ramach **zдания 5** będzie wykreślenie krzywej kalibracyjnej na podstawie pomiarów kolorymetrycznych roztworów kompleksów wzorcowych oraz, na jej podstawie, obliczenie zawartości substancji przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel, jak też wypełnienie karty pracy.

#### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia oraz nadzorowanie wykonywanych przez niego zadań. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą podczas wykonywania prezentacji, powinien dawać wskazówki, stymulować do działania, jednak nie powinien podsuwać gotowych rozwiązań. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością.

Rolą nauczyciela jest również zebranie wszystkich gotowych opracowań na jeden dysk przenośny w celu oceny pracy ucznia wykonanej podczas zajęć.

### **Zadanie 6**

#### **Identyfikacji widma cholesterolu na podstawie analizy porównawczej widm nieznanymi substancji ze zmierzonym w zadaniu 4 widmem IR cholesterolu z zastosowaniem programu komputerowego ORIGIN**

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Tę część zadania uczniowie wykonują w laboratorium komputerowym zgodnie z **Instrukcją nr 5**. W oparciu o zarejestrowany w pracowni spektroskopowej i zapisaniu na nośniku zewnętrznym pomiar widma IR cholesterolu uczniowie generują widmo IR stosując oprogramowanie komputerowe ORIGIN. Następnie, wykonując proste czynności, dokładnie przedstawione w instrukcji 5, nakładają na wygenerowane widmo cholesterolu widma nieznanymi związków chemicznych. Wykonują proste operacje matematyczne służące poprawieniu czytelności nałożonych widm. Opisują skale wykresu i poszczególne widma. Porównują, analizują i zapisują otrzymany obraz w celu wykorzystania w

prezentacji. Dokonują wyboru identycznych widm. Efekt swojej pracy wykorzystają w prezentacji.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Narzędziem pracy w **zadaniu 5** będzie program komputerowy wykorzystywany tutaj do obróbki widm spektroskopowych (wygenerowania, nakładania, wykonywania na nich działań matematycznych). Trudności podczas wykonywania tego zadania mogą wynikać z nieznamomości programu ORIGIN. Dla ułatwienia tego zadania w opracowanej instrukcji zamieszczono „screiny” i komentarze do kolejno wykonywanych operacji.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Przy jednym komputerze pracuje jeden uczeń. W pracy pomaga i nadzoruje prowadzący ćwiczenia. Pomocą jest również dokładna, ilustrowana „krok po kroku” **Instrukcja nr 5**.

Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 5** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie i umieszczonej w dalszej części opracowania.

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Wygenerowanie krzywej kalibracyjnej jest zadaniem prostym, pod warunkiem prawidłowego wprowadzenia danych z pomiarów kolorymetrycznych i stosowania się do poleceń zawartych w załączniku. Kolejna trudność mogą uczniowie napotkać podczas Zadanie to jest zadaniem stosunkowo prostym, nie wymagającym dużej ilości czasu czy szczególnej znajomości tematu. Wszystkie obliczenia wykonywane są w arkuszu kalkulacyjnym, więc uczeń powinien skupić się przede wszystkim na tym, żeby prawidłowo wprowadzić do arkusza wszystkie wartości liczbowe, wybrać właściwą opcję wykresu oraz prawidłowo określić formułę. Zastosować formułę do obliczenia wymaganej wartości.

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Efektom pracy ucznia wykonanej w ramach zadania 5 będzie wygenerowanie widma IR zarejestrowanego w pracowni spektroskopowej, a następnie nałożenia na nie widm nieznanymi substancji w celu identyfikacji spośród nich widma odpowiadającego widmu cholesterolu. Obraz powstały z nałożenia widm będzie wykorzystany do przygotowania prezentacji.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia oraz nadzorowanie wykonywanych przez niego zadań. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą podczas wykonywania prezentacji, powinien dawać wskazówki, stymulować do działania, jednak nie powinien podsuwać gotowych rozwiązań. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością. Rolą nauczyciela jest również zebranie wszystkich gotowych opracowań na jeden dysk przenośny w celu oceny pracy ucznia wykonanej podczas zajęć.

## **Zadanie 7**

### **Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć analiz**

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Krótką prezentacją w programie PowerPoint wykonywaną w laboratorium komputerowym będzie zwieńczeniem pracy uczniów. W prezentacji tej uczniowie zamieszczą najistotniejsze informacje, spostrzeżenia i wnioski wynikające z przeprowadzonych w laboratorium i pracowni spektroskopowej badań. Będą mogli ubogacić swoją prezentację fotografiami, wykresami i widmami wykonanymi w pracowni komputerowej z zastosowaniem dwóch programów komputerowych.

#### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Trudności związane z wykonaniem tego zadania mogą być związane z różnym stopniem opanowania przez uczniów obsługi komputera, a w szczególności programu PowerPoint niezbędnego do zilustrowania i podsumowania wykonanych analiz.

#### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Przy jednym komputerze znajduje się jeden, indywidualnie pracujący, uczeń wspierany pomocą i nadzorem nauczyciela.

#### Sposób wykonania

**Zadanie nr 7** należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 5** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie i umieszczonej w dalszej części opracowania.

#### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Prezentacja ma stanowić podsumowanie całej wykonanej przez ucznia pracy laboratoryjnej, dlatego nie powinno zabraknąć w niej własnych spostrzeżeń i wniosków. Uczeń powinien wystrzegać się przytaczania informacji zawartych w instrukcjach, powinien wykazać się kreatywnością i samodzielnością. Powinien zaprezentować efekty swojej pracy z nowymi programami komputerowymi, umieszczając w prezentacji widma i wykresy. Przygotowanie dokładnego planu pracy może być pomocne w prawidłowym i efektywnym wykorzystaniu czasu.

#### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Efektami pracy ucznia wykonanej w ramach tego zadania będą obliczenia zdolności rozdzielczej oraz powiększenia mikroskopu wykonane w komputerze przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel, a także opracowanie wykonane w programie PowerPoint zawierające obserwacje, wyniki badań, zdjęcia oraz wnioski wynikające z realizowanych w ramach zajęć laboratoryjnych zadań.

#### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia oraz nadzorowanie wykonywanych przez niego zadań. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością. Nauczyciel powinien służyć uczniowi

radą i pomocą podczas wykonywania prezentacji, powinien dawać wskazówki, stymulować do działania, jednak nie powinien podsuwać gotowych rozwiązań. Rolą nauczyciela jest również zebranie wszystkich gotowych opracowań na jeden dysk przenośny w celu oceny pracy ucznia wykonanej podczas zajęć.

### **Instrukcja - krok po kroku dla ucznia (w języku ucznia)**

#### **Instrukcja nr 1**

##### **Wykrywanie cholesterolu metodami chemicznymi**

Otrzymałeś dwie próbki analityczne lecz tylko jedna z nich zawiera cholesterol. Twoim zadaniem jest wykonanie dwóch reakcji (na każdej z próbek) i stwierdzenie, która z nich zawiera cholesterol.

Próba Salkowskiego:

- przygotuj dwie czyste i suche probówki i oznacz je numerami próbek,
- w każdej z nich umieść po 1 cm<sup>3</sup> chloroformu (spełnia rolę rozpuszczalnika),
- do każdej z probówek dodaj przy pomocy pipety po 5 kropli próbek (zwróć uwagę na zgodność oznaczenia próbki i probówki),
- odmierzą pipetą automatyczną 1 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego i ostrożnie, po ściąganiu wprowadź do probówki, obserwuj zmianę zabarwienia,
- czerwone zabarwienie warstwy chloroformowej i dolnej z zieloną fluorescencją wskazuje na obecność cholesterolu w próbce,
- porównaj zabarwienie w obu probówkach, zapisz w **karcie pracy 1** wynik, wyciągnij wnioski.

Próba Libermann-Burchardta:

- przygotuj dwie czyste i suche probówki i oznacz je numerami próbek,
- do każdej z probówek odmierzą automatyczną pipetą 1 cm<sup>3</sup> chloroformu,
- zgodnie z oznaczeniami na probówce dodaj po 5 kropli próbek,
- do każdej z probówek dodaj 7 kropli bezwodnika octowego,
- wybierz jedną tak przygotowaną probówkę i dodaj do niej 1-2 krople stężonego kwasu siarkowego, natychmiast wstrząśnij i obserwuj powstające zabarwienie,
- jeśli w próbce znajduje się chloroform, po dodaniu kwasu siarkowego powinieneś zaobserwować szybką zmianę barwy od czerwonego poprzez niebieski aż do zielonego,

- powtórz tę czynność z drugą próbką,
- porównaj zabarwienie w obu probówkach, zapisz w **karcie pracy 1** wynik, wyciągnij wnioski.

### Instrukcja nr 2

#### Przygotowanie roztworów żelazowych kompleksów cholesterolu:

Od prowadzącego ćwiczenie otrzymałeś probówkę z roztworem zawierającym określoną ilość cholesterolu,

- uchwycić probówkę drewnianym uchwytem i delikatnie ogrzewaj nad palnikiem aż do usunięcia rozpuszczalnika. W trakcie ogrzewania lekko wstrząsaj probówką, aby nie dopuścić do miejscowego przegrzania mieszaniny reakcyjnej,
- do suchej, oziębionej pozostałości dodaj odmierzony pipetą automatyczną  $1,5 \text{ cm}^3$  kwasu octowego i  $1 \text{ cm}^3$  odczynnika żelazowego
- wstrząsając probówką, dokładnie wymieszaj składniki,
- odczekaj 10 min. obserwuj zawartość próbki,
- przejdź do pracowni spektroskopowej w celu wykonania zadania 3

### Instrukcja nr 3

#### Instrukcja wykonania pomiaru absorbancji z zastosowaniem spektrometru UV/VIS

Czynności związane z uruchomieniem spektroskopu zostały wykonane na co najmniej godzinę przed rozpoczęciem pomiaru w celu ustabilizowania aparatu.

Czynności wykonywane przez uczniów:

- do czystej i suchej kuwety kwarcowej, przepuszczającej promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu pomiarowego, wlej przygotowaną w zadaniu 2 próbę ślepa odczynnikową do 2/3 wysokości kuwety,
- do drugiej, czystej i suchej, tego samego rodzaju, kuwety wlej przygotowany w zadaniu 2 roztwór kompleksu żelazowego do 2/3 wysokości kuwety,
- otwórz komorę pomiarową w spektroskopie UV/VIS,
- do lewego uchwytu wstaw kuwetę z próbką ślepa odczynnikową,
- do prawego uchwytu wstaw kuwetę z analizowaną próbką,
- kliknij start, automatycznie pojawi się wartość absorbancji,
- wynik pomiaru odnotuj w **karcie pracy 3**.

Takie same czynności należy wykonać dla próbek wzorcowych.

Obliczenie zawartości cholesterolu w próbce wykonasz w pracowni komputerowej na podstawie wyznaczonej w arkuszu kalkulacyjnym Excel krzywej kalibracyjnej.

### Instrukcja nr 4

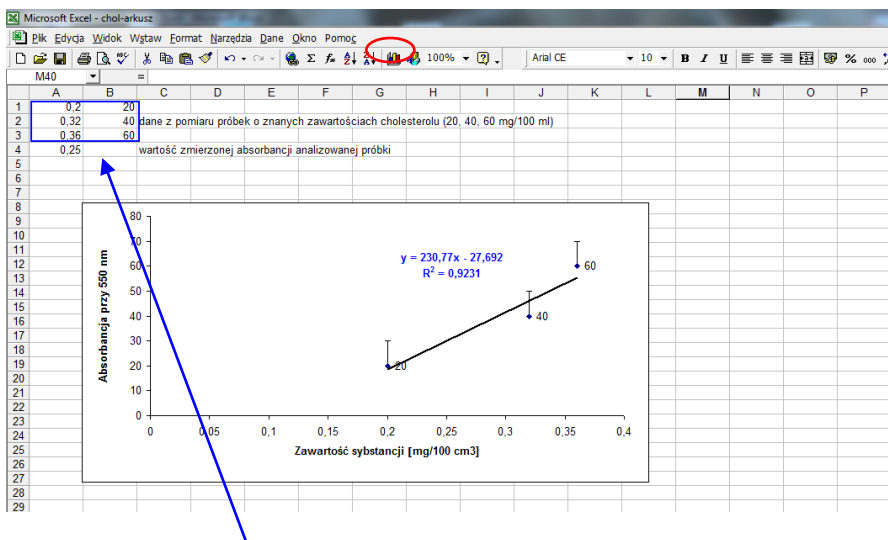
#### Instrukcja wykonania krzywej kalibracyjnej i zawartości cholesterolu w próbce na podstawie pomiarów fotokolorymetrycznych z zastosowaniem arkusza kalkulacyjnego Excel:

- Nanieś wartości danych do arkusza Excela,

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	0,2	20								
2	0,32	40								
3	0,36	60								
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										

W kolumnach A i B wpisz wartości absorbancji i zawartości cholesterolu w 100 cm<sup>3</sup> wzorcowych roztworów [mg/100 cm<sup>3</sup>],

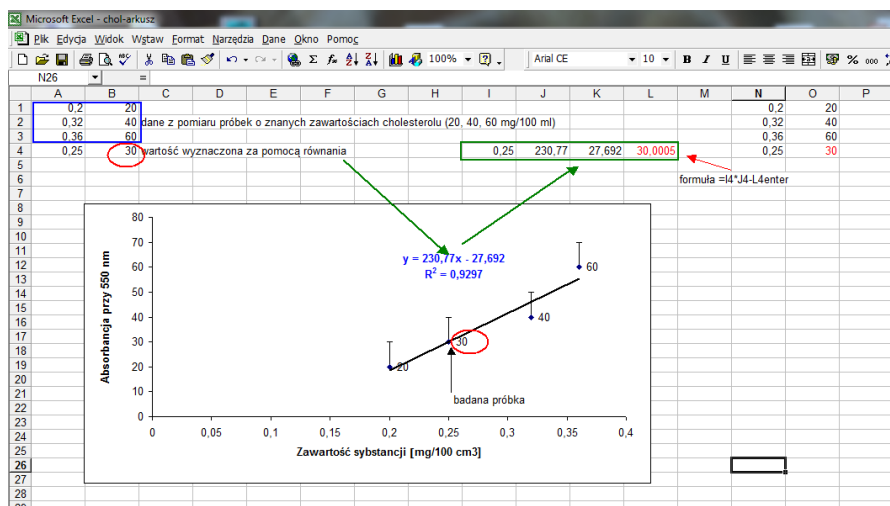
- Utwórz krzywą kalibracyjną,



- zaznacz naniesione wartości (obszar zakreślony na niebiesko),
- na pasku poleceń wybierz punktowy typ wykresów- dalej- wybierz rodzaj krzywej (prosta, zależność wprost proporcjonalna) -dalej -zakończ,
- pasek narzędzi → opcje wykresu → dodaj linię trendu [wybieramy liniowy], wyświetl równanie na wykresie, wyświetl wartości R<sup>2</sup> na wykresie → dalej zajmij się opisem osi, obszaru wykresu , itd.

Oblicz zawartość badanej substancji w analizie.

- na podstawie równania utwórz formułę i oblicz zawartość substancji w badanej próbce (tutaj 30 mg/100 cm<sup>3</sup>),
- uzupełnij dane i ponownie wygeneruj wykres, który możesz zapisać, przenieść np. do worda, zamieścić w prezentacji....

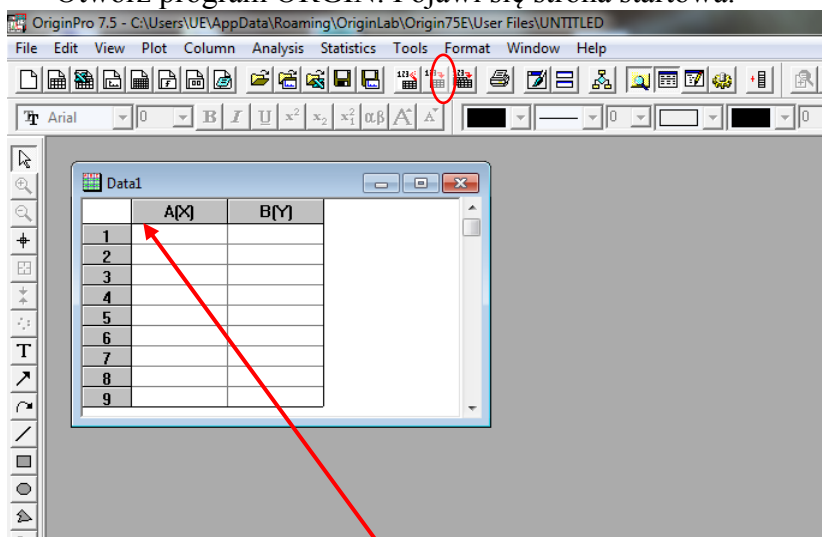


- Wypełnij **kartę prac 3**.

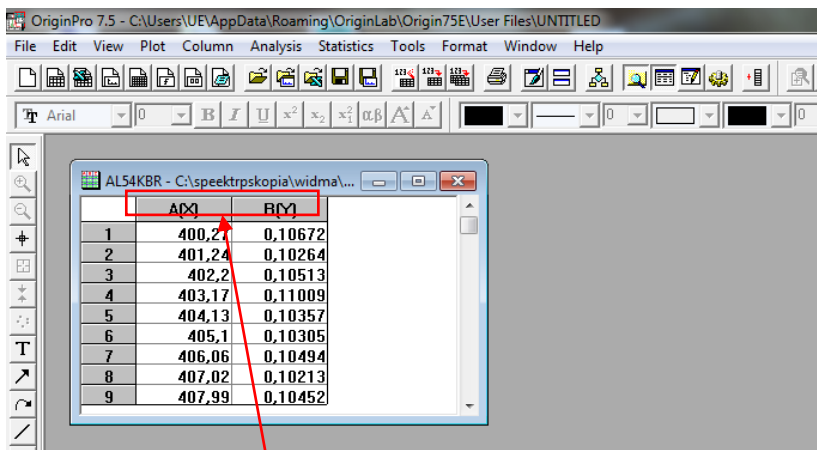
### Instrukcja nr 5

Instrukcja dokonania identyfikacji związku chemicznego na podstawie analizy porównawczej widm IR z zastosowaniem programu komputerowego ORIGIN:

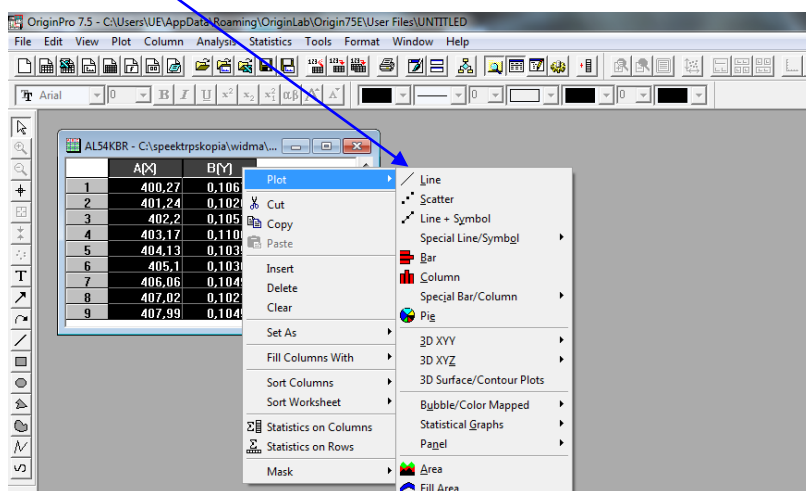
- Otwórz program ORIGIN. Pojawi się strona startowa.



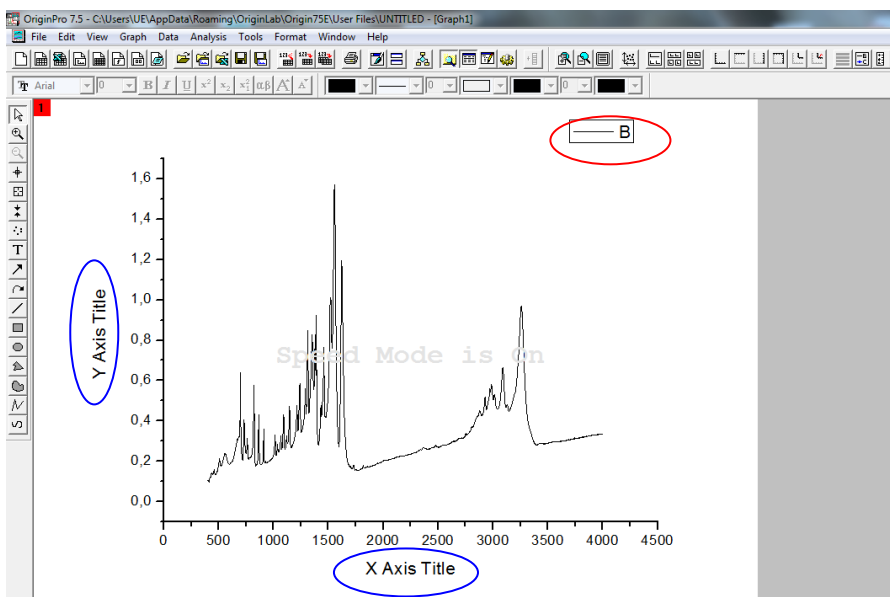
- Wybierz Import ASCII, a następnie znajdź zapis widma w formie współrzędnych X, Y.
  - Ustaw kursor na polu 1,A[X] i wklej zawartość tabeli.



- Zaznacz A[X] i B[Y], a następnie prawym klawiszem myszki kliknij **Plot** i kolejno wybierz **Line**.

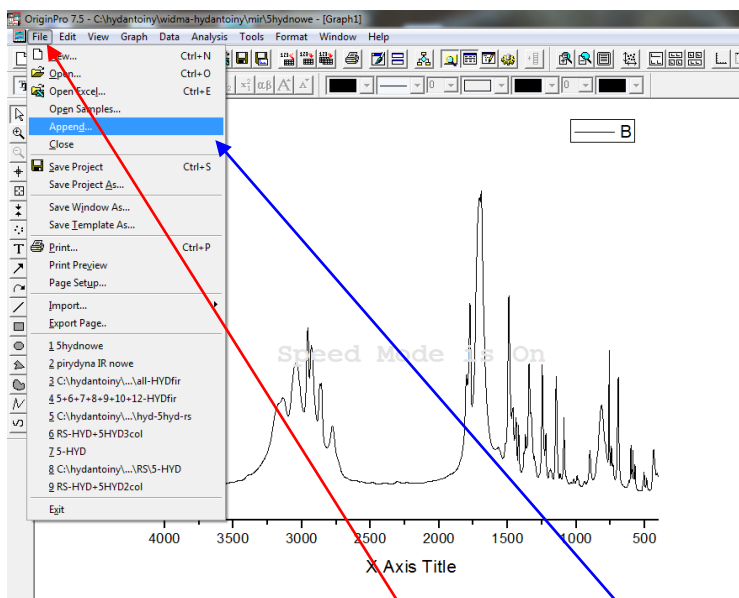


- Program narysuje zmierzone wcześniej widmo (opis osi i legendę wykonasz na końcu pracy z programem ORIGIN). Klikając na widmo możesz zmieniać kolor linii.

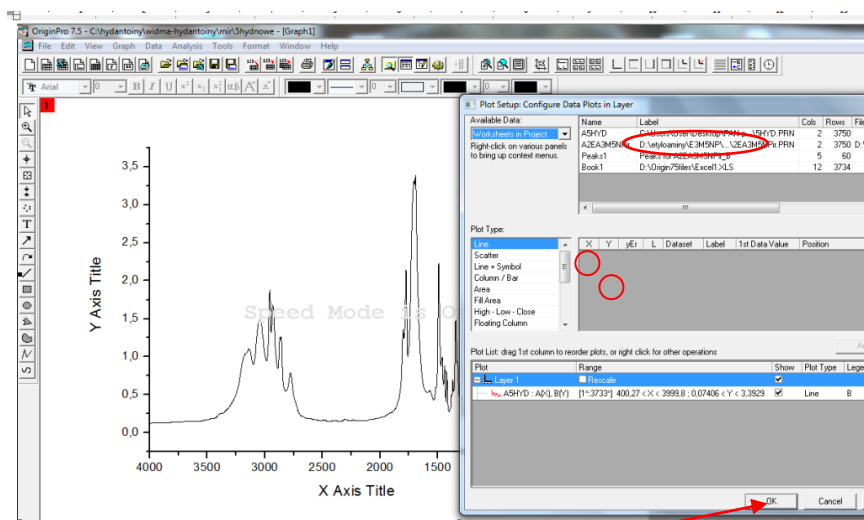




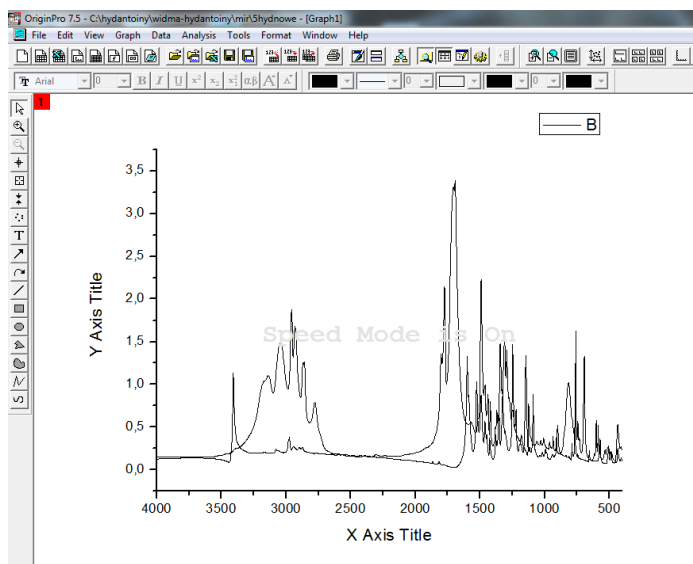
- Rozpocznij nakładanie kolejnych widm w celu zidentyfikowania substancji.



- Z paska narzędzi wybierz File, następnie Append, z którego wybierzesz np. widmo A. Po kliknięciu na czerwony kwadracik w lewym górnym rogu, na ekranie pojawia się nowe okno dialogowe z danymi (X, Y) drugiego widma, które należy zaznaczyć i dodać współrzędne x i y.



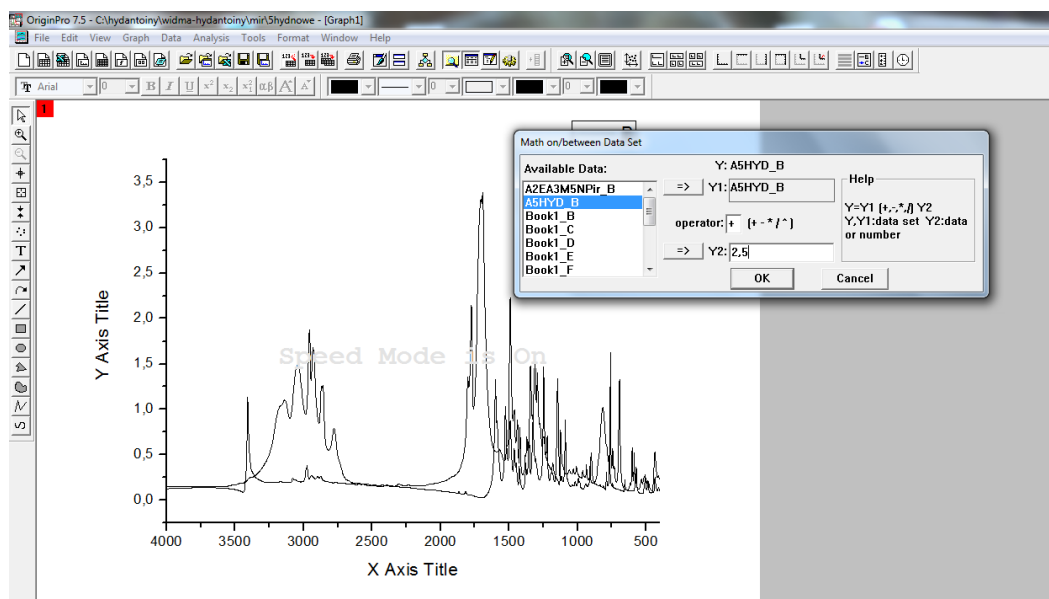
- Potwierdź wybór OK, uzyskując obraz dwóch nałożonych na siebie widm. Zapisz je pod nową nazwą, np. widmo A+B.



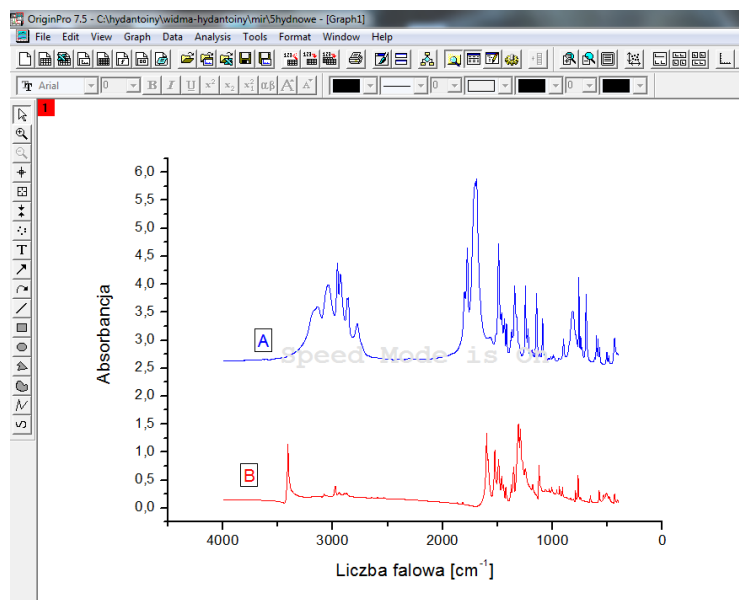
- Jeśli chcesz nałożyć kolejne widma, powtarzaj procedurę aż wszystkie widma znajdą się na ekranie.

Gdy wszystkie widma są już nałożone przystęp do przesuwania widm w stosunku do siebie w celu poprawienia przejrzystości obrazu.

- Wykonaj proste obliczenia matematyczne wybierając z paska narzędzi Analysis i następnie Simple Math. Wybierz widmo, które chcesz przesunąć w górę i określ o ile jednostek (patrz poniżej). Potwierdź wybór OK.



- Otrzymasz nowy obraz z widmami przesuniętymi w górę o 2,5 jednostki w stosunku do siebie.
  - klikając na tytuły osi wpisz właściwe nazwy,
  - klikając na linię widma zmień jego kolor.
  - wprowadź oznaczenie widm (pełną nazwą lub symbolem)



Gotowe widmo zapisz na nośnik zewnętrzny.

- Przeprowadź analizę porównawczą widm A i B. Wyciągnij wnioski.
- Zapisz na nośniku przygotowane widmo, które wykorzystasz do przygotowania prezentacji.

### Instrukcja nr 6

Instrukcja wykonania prezentacji komputerowej w programie PowerPoint, zatytułowanej „Chemiczne i spektroskopowe metody analizy cholesterolu - związku o dużym znaczeniu biologicznym”, podsumowującej zadania i obserwacje wykonane w ramach projektu.

Na podstawie zadań wykonywanych w laboratorium chemicznym i pracowni spektroskopowej należy przygotować prezentację podsumowującą projekt. Prezentacje są pracami autorskimi uczniów, dlatego pozostawia się im dużą swobodę w sposobie ich realizacji. W każdej prezentacji powinny jednak znaleźć się opracowane wyniki analiz w formie wykresów i widm, wykonane w celu przeprowadzenia analizy jakościowej i ilościowej cholesterolu. Nie może zabraknąć poczynionych podczas wykonywania zadań obserwacji, oceny trudności wykonywanych analiz, oceny stosowanych metod oraz wniosków. Każda prezentacja powinna oddawać osobiste zaangażowanie ucznia podczas wykonywania zadań oraz umiejętność interpretowania wyników badań i wyciągania właściwych wniosków.

Ze względu na krótki czas realizacji zadania, uczniowie powinni zaplanować treść i formę prezentacji przed przystąpieniem do jej realizacji, aby maksymalnie wykorzystać przeznaczony na jej wykonanie czas.

**Zasady bezpieczeństwa w laboratorium chemicznym - załącznik 1**

**Karta pracy do zadania 1 - załącznik 2**

**Karta pracy do zadania 2 - załącznik 3**

**Karta pracy do zadania 3 - załącznik 4**

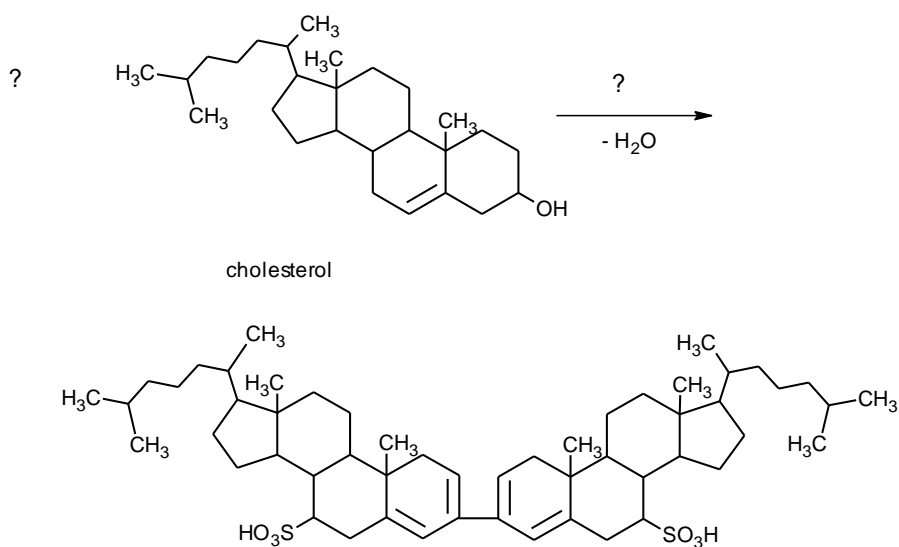
## KARTA PRACY DO ZADANIA 1

### Wykrywanie cholesterolu metodami chemicznymi

1. Cholesterol (zawierający wiązanie podwójne) pod wpływem stężonego kwasu siarkowego ulega odwodnieniu, kondensacji i sulfonowaniu. Po eliminacji dwóch cząsteczek wody powstają sprzężone wiązania podwójne, które są odpowiedzialne za pojawienie się czerwonego zabarwienia. W próbie Salkowskiego cholesterol w obecności kwasu siarkowego tworzy rozpuszczalny w chloroformie kwas disulfonowy bicholestadienu.

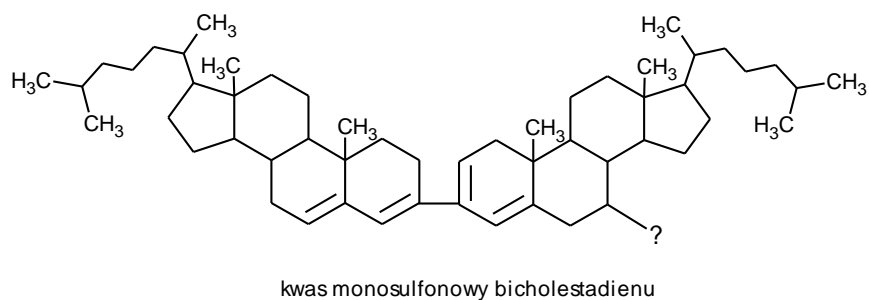
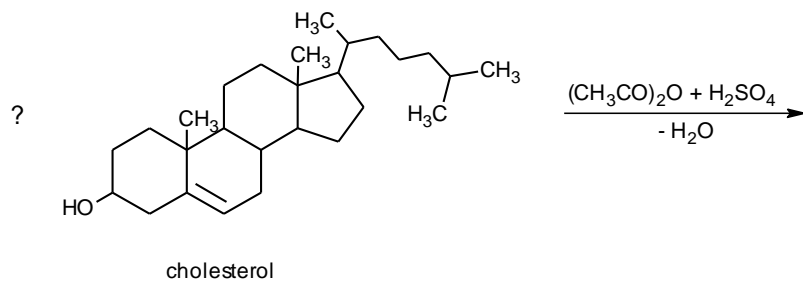
Zgodnie z instrukcją 1a wykonaj reakcję Salkowskiego na wykrywanie cholesterolu na dwóch przygotowanych próbkach. Zaobserwuj, w której z próbek pojawiło się czerwone zabarwienie w warstwie chloroformowej roztworu. Zapisz wynik obserwacji. Uzupełnij równanie zachodzącej reakcji.

próbka **A**    wynik    +    -    próbka **B**    wynik    +    -



2. W próbie Libermann-Burchardta w obecności kwasu siarkowego i bezwodnika octowego również zachodzi reakcja odwodnienia, kondensacji i sulfonowania cholesterolu, lecz w wyniku tej reakcji powstaje kwas monosulfonowy bicholestadienu o charakterystycznej zielonej barwie. Zgodnie z instrukcją 1b wykonaj reakcje Liebermanna-Burchardta na wykrywanie cholesterolu na dwóch przygotowanych próbkach. Zaobserwuj zabarwienie mieszaniny reakcyjnej. Czy zabarwienie pojawiło się natychmiast po dodaniu kwasu siarkowego do próbki? Czy zabarwienie ulegało zmianie w czasie i o czym ta zmiana świadczy? Zapisz wyniki poczynionych obserwacji. Uzupełnij równanie chemiczne zachodzącej reakcji.

próbka **A**    wynik    +    -    próbka **B**    wynik    +    -



3. Porównaj wyniki przeprowadzonych reakcji. Wyjaśnij brak zabarwienia lub różne zabarwienie powstałe w wyniku reakcji z odczynnikami Salkowskiego i Liebermanna-Burcherda. Wyciągnij wnioski z przeprowadzonych prób analitycznych i wskaż próbkę, w której był obecny cholesterol.

## KARTA PRACY DO ZADANIA 2

### Przygotowanie roztworów żelazowych kompleksów cholesterolu do kolorymetrycznego oznaczania zawartości cholesterolu w próbce

1. Zgodnie z instrukcją 3 wykonaj reakcje odczynnika żelazowego z trzema roztworami o znanej zawartości cholesterolu mieszczącej się w granicach 20 – 100  $\mu\text{g}$ . Roztwory o znanej zawartości cholesterolu nazywamy roztworami wzorcowymi. Reakcje z roztworami wzorcowymi są wykonywane przez prowadzącego ćwiczenie i dwóch uczniów – ochotników. Uczniowie obserwują kolejno wykonywane czynności i notują spostrzeżenia. Wypełniają tabelkę.

Próbka	cholesterol [ $\mu\text{g}$ ]	kwasy octowy [ $\text{cm}^3$ ]	odczynnik żelazowy [ $\text{cm}^3$ ]
P1			
P2			
P3			
PA			

2. Zgodnie z instrukcją 3, każdy uczeń indywidualnie wykonuje reakcję odczynnika żelazowego w analitem o nieznannej zawartości cholesterolu. Notuje spostrzeżenia: barwę i intensywność. Wypełnia tabelkę.

Próbka	cholesterol [ $\mu\text{g}$ ]	kwasy octowy [ $\text{cm}^3$ ]	odczynnik żelazowy [ $\text{cm}^3$ ]
PA	?		

3. Wzrokowo porównuje zabarwienie i jego intensywność w roztworach kompleksów żelazowych cholesterolu, otrzymanych w wyniku reakcji odczynnika żelazowego z roztworami wzorcowymi i analitem. Próbuje oszacować zawartość cholesterolu w próbce.

### KARTA PRACY DO ZADANIA 3

#### Pomiar absorbancji kompleksów barwnych cholesterolu metodą fotokolorymetrii z zastosowaniem spektroskopu UV/VIS

- Wykonaj pomiary absorbancji dla trzech próbek roztworów kompleksu o znanej zawartości cholesterolu (pierwszy pomiar wykonuje prowadzący ćwiczenie, pozostałe dwaj ochotnicy z grupy ćwiczeniowej). Zanotuj wartości absorbancji A1 dla próbki P1, A2 dla próbki P2 i A3 dla próbki P3. Wyjaśnij dlaczego przy pomiarze stosujemy próbę odczynnikową?
- W analogiczny sposób wykonaj pomiar absorbancji dla roztworu kompleksu o nieznannej zawartości cholesterolu (PA) wobec próby odczynnikowej. Zapisz wartość zmierzonej absorbancji.
- Uzupełnij tabelę, którą wykorzystasz do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej i obliczania zawartości cholesterolu w analizowanej próbce.

Próbka	cholesterol [ $\mu\text{g}$ ]	absorbancja	długość fali [nm]
P1			550
P2			
P3			
PA	?		