

# Piller, pulver och plåster – ett kompendium om kemin i läkemedel

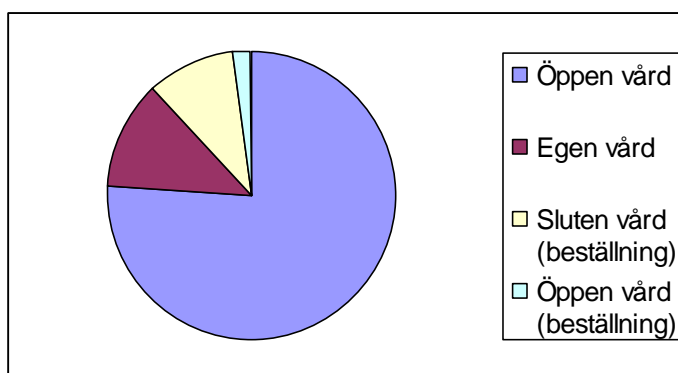
Författare: Karin Axberg, Vivi-Ann Långvik, Ulla Sandberg

## Förord

Läkemedel är en naturlig del av vårt välfärdsliv. Vi förväntar oss att det skall finnas ett botemedel för snart sagt varje sjukdom och varje symptom. Att läkemedlen har en betydande andel i Sveriges export kanske vi tänker mindre på. Men titta på nedanstående figur, som visar apotekens försäljning av läkemedel under ett år. Det är lätt att inse den samhällsekonomiska betydelsen, inte sant?

## Apotekens försäljning under år 2002 uppdelat enligt försäljningssätt

Total försäljning 31567 Mkr (exkl. moms)



Den öppna vården utgör 76 % av försäljningen (24087 Mkr), och egenvården 12 % (3707 Mkr). Den slutna vården/beställning utgör 10 % (3136 Mkr) och den öppna vården /beställning 2 % (636 Mkr). (Data är hämtat från Apotekets hemsida (<http://www.apoteket.se/content/1/c4/48/01/Grafer%202002.pdf>)).

Utvecklandet av läkemedel kräver bl.a. grundläggande kemiska kunskaper, men bara användning av läkemedel gör att det är nyttigt att veta litet om hur de fungerar.

Av dessa skäl tycker vi att det är en god idé att behandla läkemedlens kemi och läkemedelsverkan i skolans kemiundervisning. Att ämnet berör varje lärare och elev personligen gör det ju bara intressantare.

De **riskbedömningar** som förekommer avser endast kemikaliernas inneboende egenskaper. Laborationens fullständiga riksbedömning måste (som vanligt) göras av den enskilda läraren.

I innehållsförteckningarna är en del laborationer märkta med **CD** och sidhänvisning. Dessa laborationer finns endast på den medföljande CD-skivan. Sidnumreringen i häftet är diskontinuerlig, då sidhänvisningarna är samma på det tryckta materialet och på CD-skivan. Medföljande CD-skiva innehåller även en del trevliga bilder illustrerade av Fredrik Juhlin. De får användas i undervisningen.

KRC tackar samtliga som har hjälpt oss med idéer och laborationer.

Laborationerna har kontrollästs av prof. Tomas Cronholm på Karolinska institutet.

Kemilärarnas Resurscentrum, november 2003

# Innehållsförteckning efter ATC-klassificeringen

(Anatomic Therapeutic Chemical system)

	Sida	Stadium/kurs
	Högstadium	Kemi A/Kemi B
Förord	1	
Innehållsförteckning efter område	4	
Innehållsförteckning efter metod	6	
Läkemedel igår, idag och i morgon.	8	
 <i>A Matsmältningsorgan och ämnesomsättning</i>		
Absorption av läkemedel beror på pH	11	B
Enzymkinetisk bestämning av katalas från lever	13	B
Titration av ett saltsyrasubstitut	16	(H),A,B
Upplösning av en tablett	<b>CD 18</b>	A,B
Vid vilket pH fungerar amylas?	20	A,B
Vilket socker föredrar jästen?	22	H,A,B
 <i>B Blod och blodbildande organ</i>		
Hur bra buffrar plasman i blodet?	23	H,A,B
Tvådimensionell TLC av aminosyror	<b>CD 26</b>	B
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	H,A,B
Vad är blodtryck och hur kan man påverka det?	32	H,A,B
Testa om blodtrycksförändringen är signifikant!	35	H,A,B
 <i>C Hjärta och kretslopp</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i en	73	H,A,B
 <i>D Hud och membran</i>		
Analys av lipider i äggula med TLC	36	B
Framställning av salvor	37	H,A,B
Hur fungerar EMLA-kräm eller EMLA plåster?	39	H,A,B
Vad gör fluor med tanden?	41	H,A,B
 <i>G Urin och faeces</i>		
Hur fungerar ett bulkmedel?	43	H,A,B
Kolorimetrisk bestämning av kalcium	<b>CD 45</b>	B
Kväveutsöndring	46	H.A.B
Mineralmetabolism; kelation	48	A,B
Vad händer med olja på vägen till och genom tarmen?	<b>CD 50</b>	B
 <i>J Infektionssjukdomar</i>		
Att bestämma lipofilitetskonstanten	53	B
Bakterier i vår omgivning	55	H,A,B
Färgningsmetoder - Gramfärgning	57	H,A,B
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	B
Penicillinens antibiotiska verkan	64	B
Test av antibakteriella medel	65	H,A,B
 <i>L Tumörer/mutationer</i>		
Mutationsfrekvens med Ames standardmetod	<b>CD 67</b>	B
Selektion av mutanter hos en <i>E.coli</i> -bakterie	<b>CD 69</b>	B
 <i>M Rörelseapparaten</i>		
Frågeformulär till hälsoprofilbedömning	<b>CD 71</b>	H,A,B

Glykemiskt index	72	H,A,B
<i>N Nervsystemet, smärtstillande</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i en –	73	H,A,B
Analys av massprocent ASA i Aspirin	76	B
Småskalig syntes av acetylsalicylsyra i mikrovågsugn	76	B
Syntes av Paracetamol – förenklad metod	77	B
Sönderfall av ASA i badrummet	79	B
<i>P Antiparasitära, insektsdödande och repellerande</i>		
Hållbarhet hos livsmedel	80	H,A,B
Hälsofiler – håller de vad de lovar?	<b>CD 81</b>	B
<i>R Andningsorganen</i>		
Glukosoxidas: Demonstrationsförsök	<b>CD 84</b>	B
<i>S Öron</i>		
<i>V Varis, vitaminer, spårämnen</i>		
Funktionen av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillskott	85	A,B
Analys av spårämnen i receptfria mediciner	87	A,B
Hur kan ett proteins struktur påverkas?	93	B
Isolering och spektrofotometrisk analys av ett protein	96	B
Tillverka en tiohydantoin med en mikrovågsugn	99	B
<i>Ö Övrigt</i>		
Säkerhetsföreskrifter vid mikrobiologiskt arbete	101	H,A,B
Systematisk läkemedelsutveckling	<b>CD 102</b>	A,B
Ett screeningsförsök	105	A,B
Test av placebo-effekten.	106	H,A,B
Litteratur	<b>CD 108</b>	

## Innehållsförteckning efter område

<i>Salter</i>	Sid	Metod
Analys av spårämnen i mediciner och kosttillskott	87	Analys-schema
Funktion av spårämnen i mediciner /kosttillskott	85	Teori
Kolorimetrisk bestämning av kalcium	<b>45 CD</b>	Spektrofotometri
Kväveutsöndring	46	Löslighet/pH
Mineralmetabolism; Keltation	48	Utfällning
Upplösning av en tablett	<b>18 CD</b>	Ledningsförmåga
Vad gör fluor på tanden?	39	Reaktionshastighet
<i>Syra, bas, buffert</i>		
Absorption av läkemedel beror på pH	11	Extraktion
Hur bra buffrar plasma?	23	Titring
Kväveutsöndring	46	Löslighet/pH
Penicillinens antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	64	Extraktion och bakterieodling
Titring av ett saltsyra-substitut	16	Titring
Vid vilket pH fungerar amylas?	20	Olika pH, analys
<i>Organisk kemi: Analys</i>		
Absorption av läkemedel beror på pH	11	Extraktion
Analys av massprocent ASA i Aspirin	76	Analys i mikroskala
Att bestämma lipofilitetskonstanten för fyra sulfonamider	53	Jämvikter och TLC
Hur fungerar EMLA-krem eller EMLA-plåster?	39	Egna försök
Mutationfrekvens med Ames standardtest	<b>67 CD</b>	Extraktion, bakterier
Penicillinens antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	64	Bakterieodling
Sönderfall av ASA i badrum	79	Analys i mikroskala
<i>Organisk kemi; Syntes</i>		
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	Syntes och bakterieodling
Småskalig syntes av acetylsalicylsyra i mikrovågsugn	76	Syntes i mikroskala
Syntes av paracetamol	77	Syntes i mikroskala
Tillverka en tiohydantoin med en mikrovågsugn	99	Syntes i mikroskala
<i>Redox</i>		
Glukosoxidas: Demonstrationsexperiment med den blå flaskan	<b>84 CD</b>	Liknar NAD i andningskedjan
<i>Kemisk jämvikt</i>		
Att bestämma lipofilitetskonstanten för fyra sulfonamider	53	Jämvikt och TLC
Vad gör fluor på tanden?	41	Reaktionshastighet
<i>Metabolism</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i en	73	Blodprov och tidmätning
Funktion av spårämnen i receptfria mediciner /kosttillskott	85	Teori
Glukosoxidas: Demonstrationsexperiment	<b>84 CD</b>	Liknar NAD
Kväveutsöndring	46	Löslighet/pH
Mineralmetabolism; Keltation	48	Utfällning
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	Blodprovsmätning
Vad är blodtryck och hur kan man påverka det	32	Blodtrycksmätning
Testa om blodtrycksförändringen är signifikant	35	Statistik, t-test

### *Proteiner, aminosyror*

Enzymkinetisk bestämning av katalas från lever	13	Enzymlab, $K_m$
Hur kan ett proteins struktur påverkas?	93	Utfällning protein
Isolering och spektrofotometrisk analys av ett protein	96	Spektrofotometri
Tvådimensionell tunnskiktskromatografi av aminosyror	<b>26 CD</b>	TLC
Vid vilket pH fungerar amylas?	20	Glukosanalyser
High throughput screening	105	Trommers-,jodprov

### *Kolhydrater*

Glykemiskt index (GI)	72	Tabellvärden
Hur fungerar ett bulkmedel?	43	Dialys
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	Blodsockeranalyser
Vilket socker föredrar jästen?	22	Jästjäsnings

### *Fetter mm*

Analys av lipider i äggula med TLC	36	Extraktion och TLC
Framställning av emulsionssalvor	37	Hydrofil/fob
Vad händer med olja på väg till och genom tarmen	<b>50 CD</b>	Löslighet

### *Bioteknik (bakterier, jästceller)*

Bakterier i vår omgivning	55	Bakterieodling
Färgningsmetod enligt Gram	57	Färgning
Hållbarhet hos livsmedel	80	Bakterieodling
Hälsofiler – håller de vad de lovar?	<b>81 CD</b>	Bakterieodling
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	Syntes och odling
Mutationsfrekvens med Ames standardmetod	67	Bakterieodling
Selektion av mutanter hos en <i>E.coli</i> -bakterie	<b>69 CD</b>	Bakterieodling
Säkerhetsföreskrifter vid bakteriellt arbete	101	Föreskrifter
Test av antibakteriella medel	65	Bakterieodling

### *Analytisk kemi*

Analys av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillskott	87	Analyschema
Analys av massprocent ASA i Aspirin	76	Analys
Sönderfall av ASA i badrum	79	Analys i mikroskala

### *Projektarbete/ undersökande laborationer*

Acetylsalicylsyra är två mediciner i en	73	Undersökningar med
Bakterier i vår omgivning	55	egna
Frågeformulär till hälsoprofilbedömning	<b>71 CD</b>	försöksuppställningar
Hur fungerar EMLA-kräm eller EMLA-plåster	39	
Hur fungerar ett bulkmedel?	43	
Hälsofiler – håller de vad de lovar?	80	
Test av placeboeffekten	106	
Test av antibiotiska medel	65	
Mutationfrekvens med Ames standardmetod	<b>67 CD</b>	
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	
Vad är blodtryck och hur kan man påverka det!	32	
Testa om blodtrycksförändringen är signifikant	35	

### *Övrigt*

Ett screeningförsök	105	Trommers prov
Systematiskt läkemedelsutveckling	<b>102 CD</b>	Teori
Säkerhetsföreskrifter vid bakteriologiskt arbete	101	Odling
Litteratur	<b>108 CD</b>	Referenser
Läkemedel igår, idag och i morgon. Kort läkemedelshistorik	8	Teori

## Innehållsförteckning efter metod/teknik

<i>Metod/teknik</i>	<b>Sid</b>	<b>Beräknad tidsåtgång</b>
<i>Analys - kvantitativt och kvalitativt</i>		
Analys av lipider i äggula med TLC	37	60-75 min
Analys av massprocent ASA i Aspirin	77	60-75min
Analys av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillskott	87	flera laborationer
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	75min + 1dygn
Sönderfall av ASA i badrum	80	60min
Penicilliners antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	65	60-75min+1dygn
<i>Blod, mätning av blodsocker, blodtryck</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i ett	73	30min till 2dygn
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	90min
Vad är blodtryck och hur kan man påverka det	32	90min
Testa om blodtrycksförändringen är signifikant	36	Statistik, t-test
<i>Dialys</i>		
Hur fungerar ett bulkmedel?	43	30min+3dygn
<i>Enzymlaborationer</i>		
Enzymkinetisk bestämning av katalas från lever	13	75-90min
Systematisk läkemedelsutveckling med labbförslag.	<b>102 CD</b>	
High throughput screening	105	60-75min
Vid vilket pH fungerar amylas?	20	75-90min
<i>Extraktion</i>		
Absorption av läkemedel beror på pH	11	60-75min
Att bestämma lipofilitetskonstanten för fyra sulfonamider	53	60-75min
Penicilliners antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	64	60min+1dygn
<i>Löslighet, ledningsförmåga, pH, hydrofil/fob, fällning</i>		
Framställning av emulsionssalvor	39	60-75min
Hur bra buffrar plasma i blodet?	23	60-75min
Kväveutsöndring	46	60-75min
Mineralmetabolism; Kelation	48	60 min
Penicilliners antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	64	60-75min+1dygn
Upplösning av en tablett	<b>18 CD</b>	60min-1dygn
Vad händer med olja på väg till och genom tarmen	<b>50 CD</b>	60-75min
<i>Matematik, statistik</i>		
Test på placeboeffekten	106	Statistik
Testa om blodtrycksförändringen är signifikant	35	Statistik
<i>Reaktionshastighet</i>		
Vad gör fluor på tanden?	41	75-90 min
Enzymkinetisk bestämning av katalas i lever	13	75-90 min
Gluksoxidase: Demonstrationsförsök med den blå flaskan	<b>84 CD</b>	10-40 min
Hur fungerar EMLA-krem eller EMLA-plåster?	39	30-2h
<i>Odling</i>		
Bakterier i vår omgivning	55	60min+1dygn
Färgmetod enligt Gram	57	60min
Hållbarhet hos livsmedel	80	60min+1dygn
Hälsöfiter – håller de vad de lovar?	<b>81 CD</b>	90min+1dygn
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	75min+1dygn
Mutationsfrekvens med Ames standardmetod	<b>67 CD</b>	60min+1dygn
Penicilliners antibiotiska verkan vid olika distributionssätt	64	75min+1dygn

Selektion av mutanter hos en <i>E.coli</i> -bakterie	<b>69 CD</b>	60min+1dygn
Test av antibakteriella medel	65	60min+1dygn
Vilket socker föredrar jästen?	22	60min
<i>Proteiner, aminosyror - olika tekniker</i>		
Enzymkinetisk bestämning av katalas från lever	13	75-90min
Hur kan ett proteins struktur påverkas?	93	75min
Isolering och spektrofotometrisk analys av ett protein	96	75-90min
Tvådimensionell tunnskiktskromatografi av aminosyror	<b>26 CD</b>	2x30min+4h
High throughput screening	105	60-75min
<i>Spektrofotometri</i>		
Isolering och spektrofotometrisk analys av ett protein	96	60-90min
Kolorimetrisk bestämning av kalcium i serum eller urin	<b>45 CD</b>	60-75min
<i>Syntes</i>		
Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum	59	75-60min+1dygn
Småskalig syntes av acetylsalicylsyra i mikrovågsugn	76	40min
Syntes av paracetamol	77	40min
Tillverka tiohydantoin med en mikrovågsugn	99	40min
<i>Teori</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i ett	73	30min till 2dygn
Funktion av spårämnen i receptfria mediciner /kosttillägg	85	
Glykemiskt index (GI)	72	
Systematisk läkemedelsutveckling	<b>102 CD</b>	
Vad händer med olja på väg till och genom tarmen?	<b>50 CD</b>	
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	
<i>Titring</i>		
Titring av ett saltsyrasubstitut	16	60-75min
Hur bra buffrar plasma?	23	60-75min
<i>Tunnskikt(TLC)</i>		
Att bestämma lipofilitetskonstanen för fyra sulfonamider	53	60-75min
Tvådimensionell tunnskiktskromatografi av aminosyror	<b>26 CD</b>	2x30+1dygn
Analys av lipider i äggula med TLC	36	75min
<i>Undersökande</i>		
Acetylsalicylsyra är två mediciner i ett	73	30min-2dygn
Frågeformulär till hälsoprofilbedömning –En anamnes	<b>71 CD</b>	projekt
Glykemiskt index (GI)	72	tabell
Hur fungerar EMLA-kräm eller ett EMLA-plåster	39	60-90min
Hälsofiler - håller de vad de lovar?	<b>81 CD</b>	90-2dygn
Test av placeboeffekten	106	projekt
Vad påverkas ditt blodsocker av?	28	projekt
Vad är blodtryck och hur kan man påverka det	32	projekt
<i>Utfällning</i>		
Analys av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillägg	87	Flera labbar
Mineralmetabolism; Kelation	48	60min
Vad gör fluor på tanden?	41	75-90min
<i>Övrigt</i>		
Systematisk läkemedelsutveckling	<b>102 CD</b>	Teori
Läkemedelshistoria	8	Teori
Litteratur	<b>108 CD</b>	
Säkerhetsföreskrifter vid mikrobiologiskt arbete	101	

# Läkemedel, igår, idag och i morgon

## Kort historik

Neanderthal och Cro Magnon människor bodde i samhällen, dvs. de tog hand om varandra. Möjligen hade de också någon form av omvårdnad för sjuka, men det vet vi inte, eftersom arkeologisk bevisföring kräver fysiska efterlämningar. Vi vet däremot, att människan började odla mat för ca 10000 år sedan. Det är möjligt, att odling av medicinalväxter började ungefär samtidigt. Skillnaden mellan mat och medicin var knappast stor.

Det finns dokumenterat, att assyrierna kände till belladonna och att fenicierna använde hyoscin redan 2800 år före Kristus. Den babyloniska läkekonsten är känd från tusentals lertavlor. Man använde bl.a. saffran, koriander, kanel, vitlök och växthartsar som läkemedel. Den egyptiska läkekonsten anses ha grundats av Imhotep ca 1700-1800 f. Kr. Papyrus Ebers innehåller 800 recept och nämner över 700 droger. Den skrevs 1500 f. Kr. Bland medicinalväxterna finns Fingerborgsblomma (digitalis - används vid hjärtsvikt), idegran (taxol - används som cytostatika), hampa (hasch - kramplösande) och opium-vallmo (noskapin och morfin - hostdämpande resp. smärtstillande). Dessutom användes produkter från djurriket, som inälvor, exkrementer, maskar och ormar, liksom också ämnen som arsenik, svavel och kvicksilver. Läkemedlen gavs som piller, salvor, plåster, rökelse, lösningar och parfymer och tillverkades av prästerna. Till ordineringen hörde att uttala besvärjelser och trollformler. Ämnen med synbar effekt ansågs vara verksamma, eftersom man satte sjukdomarna i samband med "onda andar". Kräkningar, diarréer, svettningar, åderlåtning, upphostat slem osv. var tecken på att "onda andar" lämnade kroppen.

Läkekonsten utvecklades samtidigt i olika delar av världen. År 2800 f. Kr. uppgjorde kejsar Hung Ti i Kina en förteckning över mer än 365 verksamma örtmediciner. Bland dessa fanns ämnen som efedrin (stimulerande), ginseng (lugnande och potensgivande) och kamfer. Man kände till opium och cannabis, men om de användes som läkemedel i Kina är osäkert. Läroarna spreds till grannländerna Japan, Korea och Tibet, där de utvecklades. Indiska shamaner utvecklade en lära enligt vilken tillfrisknandet beror på en balans mellan fem element (vatten, eld, trä, metall och jord) och tre kroppsvätskor (blod, galla och slem). Genom att applicera örtblandningar i kroppsöppningar (ex. näshålan) kunde man uppnå den eftersträlvade balansen.

Inkafolken använde sig av ett stort antal ämnen, som fortfarande upptas i farmakopén, t.ex. efedrin, atropin och kamfer. Även kokain och meskalin (från kaktus) användes, och de här ämnena infördes till Europa av missionärerna på 1400-talet.

I Antikens Grekland var Gudarnas roll betydande. Hälsovården hörde i huvudsak till guden Asklepios. I hans tempel sköttes framför allt psykiska störningar som melankoli, psykogena förlamningar, stumhet och melankoli. Prästen delade ut hemliga, läkande örter. Under antiken ansågs sexualiteten vara en viktig del av hälsan. Arstoteles förordnade t.ex. vin och sexuell umgänge för att bota melankoli. Den mest kända läkaren under denna tid var Hippokrates på Kos (400 talet f. Kr.). Han införde etiska principer, som fortlever än idag (den hippokratiska eden känd för oss som läkareden). Han trodde inte på demoner som orsak till psykiska sjukdomar, utan underströk betydelsen av störningar i hjärnan, och såg som läkarens uppgift att hjälpa naturen att bota sjukdomen. Den grekiska medicinen började blomstra ca 500 f. Kr. Under Romartiden spreds den grekiska läkekonsten genom att romarna tog krigsfångar. Under medeltiden kom nya örter till Europa och handeln med dem var livlig.

År 760 antas det första självständiga apoteket ha inrättats i Bagdad, och yrkesgrupperna apotekare och läkare skilde sig från varandra. Apotekaren tillverkar mediciner medan läkaren ordinerar dem. Det första apoteket kom i Sverige i slutet på 1400-talet, men först på 1600-talet kan vi tal om mera regelrätt apoteksverksamhet. På apoteket framställde man mediciner av utgångsämnen.. Namnet apotek kommer från grekiskans ord *Apotheke*, som betyder bod,

förrådsrum. 1686 kom den första svenska farmakopén (farmakopé är en samling av fastställda föreskrifter för beredning, prövning och förvaring av läkemedel).

Under de första århundradena e. Kr. levde ett flertal män som samlade in växter och läkemedel och kartlade effekter av dem. De Materia Medica av Dioskorides beskriver läkemedel och hur de framställs. Denna skrift kom att dominera läkekonsten till 1500-talet tillsammans med skrifter av Galenos. Deras verk blev i stort sett lag inom läkekonsten.

En drog som användes i hela Europa och som dominerade marknaden helt under 1500 år kallades Theriac. Denna innehöll ca 60 olika ingredienser (bl.a. växtingredienser som opium, kryddor, balsam, men även djuringredienser) och sades hjälpa mot i stort sett alla åkommor. Tillverkningen av Theriac kontrollerades noga av magistraten, borgmästaren och läkaren i den stad den tillverkades. Theriac användes från 1686 till 1876, då användandet av opium i drogen begränsades av en giftstadga. I den första svenska farmakopén finns Theriac omnämnd.

På 1500-talet utvecklades läkekonsten, och alkemins kunskaper började användas även inom läkekonsten. Då kristendomen spreds och kyrkans makt med den, ifrågasattes den vetenskapliga forskningen, för att den inte stödde kyrkans makt. Istället kopplade kyrkan läkekonstens kunskaper till sataniska makter. Trots det odlades en del örtmediciner i munkkloster. Men demonologi och astrologi var förhärskande under medeltiden.

Under början av 1800-talet tillkom frenologi (förutspådde egenskaper från skallformen) och homeopati (en sjukdom botas med oändlig utspädning av ett i sig verksamt ämne). Först ca 1850 föddes den organiska kemin (urinämne syntetiserades, hemoglobinet upptäcktes) och därmed möjliggjordes farmakologin i sin nuvarande form. Den första akademiska lärostolen i Sverige i farmakologi torde ha inrättats vid universitetet i Dorpat.

### Moderna läkemedel

Läkemedelsutvecklingens historia indelas i en prevetenskaplig och vetenskaplig del. Den prevetenskapliga historien innefattar läran om de fyra vätskorna, signaturläran, som levde under medeltiden, skolastiken och medicinkonsten (*Ars Medica*). **Signaturläran** innebar att man såg utseendelikheter mellan växternas form och färg och deras sjukdomslindrande verkan; t.ex. antogs njurformade blad bota njursjukdomar och växten alrunas (*Mandragora officinalis*) tjocka rot, som har en egendomlig människoliknande form ansågs äga magisk kraft. **Skolastiken** var en teologisk-filosofisk lära som stödde sig på kristna trossatser och Aristoteles läror.

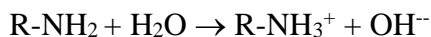
Läkemedlens vetenskapliga utveckling innefattar farmacin, kemin, farmakologin, patofysiologin, de kliniska prövningarna och de regulatoriska myndigheterna.

Insikten om hygienens betydelse för begränsning av sjukdomsspridning är vår tids allra viktigaste upptäckt i kampen mot sjukdomar (Wirchow 1868, Semmelweiss), medan upptäckten av antibiotika (penicillin) hör till våra viktigaste läkemedelsupptäckter. Betydelsen förminskas inte av att upptäckten var en slump. Historien om hur penicillinet upptäcktes är klassisk och kan läsas på t.ex. [www.pbs.org/wgbh/aso/databank/entries/dm28pe.html](http://www.pbs.org/wgbh/aso/databank/entries/dm28pe.html)

Modern läkemedelsforskning har funnits i ungefär 50 år. Ett modernt läkemedel innehåller en aktiv substans, beredningsform, förpackning och information. En omfattande testning av medlet sker före marknadsintroduktion (se t.ex. [www.astrazeneca.se/patienter/tillverkning.asp](http://www.astrazeneca.se/patienter/tillverkning.asp)) Många sjukdomar, som tidigare ansågs obotliga, kan idag botas av moderna läkemedel. Hit hör bl.a. tuberkulos, diabetes och en del cancerformer. En viss överanvändning av läkemedel har konstaterats i västvärlden (t.ex. antibiotika, lugnande medel). Den mest utpräglade skillnaden idag jämfört med tidigare, är att hälsa har blivit en självklar utgångspunkt.

Med våra kemiska kunskaper som bas, kan man fråga sig om det finns någon kemisk egenskap, som eftersträvas. Svaret är ja. Läkemedlet bör vara/bli vattenlösligt, för att kunna upptas i blodet

och fettlösligt för att transporteras över cellmembranet. Därför är läkemedel ofta organiska baser, närmare bestämt aminer, som beroende på pH-värdet är mer eller mindre vattenlösliga:



Aminer reagerar med vatten vid pH 7.4, alltså blodets pH-värde. Det fettlösliga organiska ämnet blir vattenlösligt i sin saltform. Då ämnet skall transporteras över ett lipofilt membran kan det återgå till aminformen och passera membranet. Aktiva transportmekanismer, som kan underlätta vissa mediciners transport, finns också. Bland laboratorerna i det här kompendiet hittar du många arbeten, som behandlar läkemedlens löslighet vid olika pH-värden.

En annan mycket viktig egenskap är läkemedlets rymdstruktur. Det har visat sig att ämnen som i övrigt är kemiskt identiska, men som till sin rymdstruktur utgör varandras spegelbilder, s.k. enantiomerer, kan ha t.o.m. motsatt biologisk effekt. Thalidomid, ett läkemedel som var lugnande och hjälpte vid sömnbesvär, var ett sådant. Det gavs åt gravida kvinnor för att det var verksamt och ansågs lindrigt. Senare visade det sig att läkemedlet störde normal fosterutveckling. Barnen föddes med defekt extremiteten. Denna insikt har lett till att dagens läkemedel ”designas” noggrant och kontrollen av läkemedel har skärpts. Material för undervisning om stereoisomerer finns på vår hemsida [www.krc.su.se](http://www.krc.su.se), under menyn Undervisning, OH-material.

### **Morgondagens läkemedel**

Att sia om framtiden är nästintill omöjligt. Den mycket snabbt framskridande kunskapen om cellkontroll och genetik ger ändå material för visioner om vad som kan tänkas ske inom en nära framtid. En del metoder är på ett lovande försöksstadium. Andra är mera utopiska.

Något som vi redan har idag och som sannolikt kommer att utvecklas vidare är s.k. funktionella livsmedel. De är inga egentliga läkemedel, men de förväntas kunna rätta till vad ett ”ohälsosamt leverne” eller medfödda brister förorsakat ”utan att man egentligen behöver anstränga sig”. Hit hör livsmedel för diabetiker, för personer med hyperkolesterolemi, medel som skall hjälpa överviktiga att banta (läkemedel för samma ändamål utvecklas också), xylitol i godis för att förhindra utveckling av karies i tänderna etc. etc.

Mera allmänt förväntas de nya läkemedlen vara specifika och selektiva. Det betyder att de skall vara riktade mot en bestämd sjukdom. Idag kan ett och samma läkemedel användas för flera olika symptom. Att läkemedlen skall vara selektiva betyder också att biverkningarna minskar och att läkemedlet bara påverkar sjuka vävnader/celler. Det kan ske så att läkemedlet söker upp sjuka vävnader/celler, t.ex. cancerceller (s.k. receptormediciner).

I takt med att antibiotika används allt oftare, har resistensen mot dem ökat. Det leder till att nya antibiotika mot resistenta bakteriestammar måste utvecklas. Man har också förespråkat en restriktivare användning av antibiotika, för att ”utrota” de resistenta bakteriestammarna. Tankegången bygger på att man antar att de resistenta bakterierna inte har någon speciell fördel i avsaknad av antibiotika och de därför skulle utrotas när antibiotikanivån i omgivningen sjunker. I västerlandet lever vi i ett åldrande och fetmande samhälle och mycket hopp ställs därför till s.k. genterapi, speciellt gällande gerontologi, dvs. läran om det biologiska åldrandet. En frisk åldrande befolkning skulle underlätta samhällets sociala belastning.

Vivi-Ann Långvik

### **Litteraturtips**

Tomas Gejrot (1994) Kompendium i medicinens historia 43 s. ISSN/ISBN 992-073258-3

Carl-Magnus Stolt (1997) Kaos och kunskap 288 s. ISSN/ISBN 91-44-00098-7

Anton Sebastian (2000) Dates in medicine 433 s. ISSN/ISBN 1-850-70-095-8

<http://home.swipnet.se/PharmHist/Historia/index.html>

## Absorption av läkemedel beror på pH

- Har du funderat på hur det fungerar när man sväljer en huvudvärkstablett som går ner till magen och vidare till tarmen. Efter ett tag försvinner huvudvärken!

**Teori:** Läkemedel absorberas i allmänhet via passiv diffusion genom lipidrika membran. En farmakons (ett läkemedels) passiva transport underlättas av hög fettlöslighet och liten joniseringsgrad. Förändringar i matsmältningskanalens pH påverkar basiska och sura substansers joniseringsgrad och därmed absorptionen. En sur substans absorberas i magen, medan en basisk absorberas i tarmen.

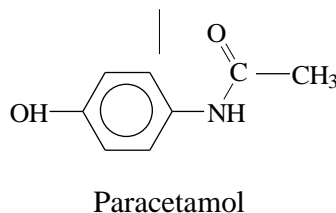
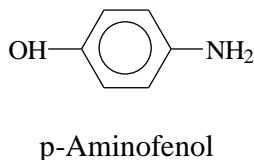
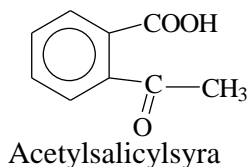
**Syfte:** Att åskådliggöra läkemedelsabsorption vid olika pH i mag-tarmkanalen. Med ett modellsystem jämförs läkemedlets löslighet i vatten resp etylacetat. Etylacetatfasen representerar lipidrika membran i mag-tarmkanalen. Efter extraktion påvisas substanserna som mörka fläckar i UV-ljus på kiselplattor HF 254. Extraktionerna utfördes vid pH 1,5, som motsvarar magens och pH 8, som motsvarar tarmens förhållanden.

**Riskbedömning:** Laborationen bedöms ha liten risk. Saltsyra är frätande. Etylacetat är brännbart. Samla etylacetatresten i uppsamlingskärl för organiska ämnen.

### Material:

Acetylsalicylsyra (ASA)  
4-aminofenol (hydrolyserad paracetamol)  
Paracetamol (N-acetyl-p-aminofenol)  
0,03 mol/dm<sup>3</sup> HCl (pH 1,5)  
Fosfatbuffert, 0,2 mol/dm<sup>3</sup> pH 8 (1:19 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Etylacetat  
Kapillärrör  
6 provrör med korkar  
ev. en vortexmixer  
UV lampa  
Tunnskiktspatta HF<sub>254</sub> av kiselgel med fluorescensindikator



### Utförande:

1. Väg in 50 mg av varje testsubstans i två provrör. Totalt 6 provrör.
2. För varje substans tillsätt 3 cm<sup>3</sup> 0.03 mol/dm<sup>3</sup> HCl till det ena och 3 cm<sup>3</sup> fosfatbuffert (pH 8) till det andra provröret.
3. Tillsätt 2 cm<sup>3</sup> etylacetat till alla provrör och skaka. Låt separera.
4. Markera ett rutmönster på en tunnskiktspatta. Applicera med kapillärrör lite av etylacetatfaserna på TLC-arket. Låt etylacetaten avdunsta och belys med UV-lampa. Mörka fläckar visar att substansen har överförs till etylacetatfasen. Notera fläckens intensitet som hög eller låg i tabellen nedan.

	ASA	p-aminofenol	Paracetamol
Etylacetatfas (pH 1,5)			
Etylacetatfas (pH 8,0)			

Sammanställ resultaten och förklara resultaten utgående från substansernas struktur. Acetylsalicylsyra hydrolyseras till salicylsyra. Var skulle den absorberas?

### Kommentar till läraren.

#### Resultat:

Konc. i etylacetatfasen (= Absorption)	ASA	4-aminofenol	Paracetamol
pH 1,5	Hög intensitet	Låg intensitet	Hög intensitet
pH 8	Låg intensitet	Hög intensitet	Hög intensitet

**Slutsats :** Det mesta av den sura acetylsalicylsyran finns i etylacetatet vid extraktion vid pH 1,5. Den basiska aminofenolen extraheras lättast vid pH 8. Extraktionen av neutral paracetamol är oberoende av pH. Neutrala läkemedel absorberas såväl av vävnader som av vatteninnehåll i mag- och tarmkanalen.

ASA som är en svag syra är inte joniserad vid  $\text{pH} < 3$  (magen); den har en låg löslighet i vatten och samtidigt hög löslighet i etylacetat (absorption). Detta förklarar varför svaga syror absorberas snabbare av slemhinnan i magen än svaga baser. Men joniserade svaga baser blir kvar i vattenlösningen i magen.

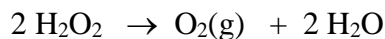
I magen med dess pH på ca 1,5 är den svaga basen 4-aminofenol nästan helt joniserad, och har hög löslighet i vatten, och samtidigt låg löslighet i etylacetat. Ingen absorption!  
I tarmen, med pH 8 är 4-aminofenol inte längre joniserad och är lös i etylacetat. Å andra sidan är ASA fullt joniserad vid pH 8 vilket gör den lös i vattenfasen. ASA har därmed låg löslighet i etylacetat.

Paracetamol har hög koncentration i etylacetat oberoende av pH. Paracetamol joniseras bara om pH är mycket över 8. I alla fysiologiska sammanhang förekommer den som en neutral molekyl och är alltid mera lös i etylacetat än vatten. Sådana mediciner absorberas både i magen och i tarmen.

J.Chem Ed.1997 74 855

## Enzymkinetisk bestämning av katalas från lever

**Teori:** Katalas är ett enzym som finns i aeroba organismer. Katalas deltar i försvarssystemet i cellen. I denna laboration ska du titta på sönderfall av väteperoxid till syre och vatten med hjälp av katalas. Katalaset kommer från homogeniserad nötlever.



Ett filterpapper indränkt i nötleverextraktet placeras i väteperoxidlösningen. Syrgasen, som bildas, kommer att lyfta filterpapperet i bägaren. Katalasaktiviteten beräknas ur tiden det tar att bilda en viss mängd syrgas vid olika koncentration väteperoxid.

**Extra uppgift:** Data sätts upp i ett koordinatsystem och ett linjärt samband erhålls.  $K_m$  (Michaelis Menten konstant) och mått på  $V_{\max}$  (maximal hastighet) avläses i diagrammet.

**Riskbedömning:** Väteperoxid över 20-30 % är oxiderande och frätande. Använd handskar vid spädning. Laborationen bedöms ha liten risk.

### Material:

Till en labbgrupp går det åt:

4 g färsk lever (det går bra med frusen lever)

ca 500 cm<sup>3</sup> iskall 0,1 mol/dm<sup>3</sup> kaliumfosfatbuffert, pH 7,0

Per grupp går det dessutom åt-

Ca 200 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-lösning av vardera med koncentration: 2%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,2%

1-2 st 200 cm<sup>3</sup> **höga** bägare

filterpapper som passar i den höga bägaren (filterpappret ska inte fastna på bägarens kanter), mixer, klocka, pincett, pappershanduk, is för kylning

### 1. Utförande:

Gruppen gemensamt eller läraren gör leverextraktet *Sönderdela* (homogenisera) levern med 50 cm<sup>3</sup> iskall 0,1 mol/dm<sup>3</sup> fosfatbuffert pH 7,0 med mixer eller mixerstav. Späd extraktet till 1:10 med iskall fosfatbuffert och förvara lösningarna på isbad. (Spara lite koncentrerat leverextrakt för justering av katalasaktivitet).

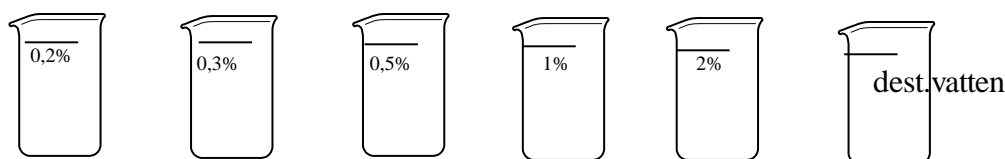
2. *Ställ in koncentrationen av leverextrakt.* Eftersom katalaskoncentrationen i extraktet kan variera görs först ett test av leverextraktets aktivitet på följande sätt:

Tag ett filterpapper och doppa i leverextraktet, torka av överflöd mot en pappershanduk.

Med hjälp av pincetten lägg (tryck) ner det indränkta filterpappret på botten i bägaren med den lägsta koncentrationen av väteperoxid.

Filterpappret kommer nu att flyta upp mot ytan av den bildade syrgasen. Tiden för att filterpappret ska flyta upp till ytan bör inte överstiga 40 sekunder. Justera tiden genom att öka eller minska koncentrationen av leverextraktet.

3. *För eleven:* Gör i ordning 200 cm<sup>3</sup> väteperoxidlösningarna av den lägsta koncentrationen



– 0,2%: i en hög bägare. Väteperoxidlösningen ska vara rumstempererad. Doppa ett filterpapper i leverextraktet som ovan. Mät tiden det tar för att filterpappret att stiga upp.

- Experimentet utförs för varje väteperoxidkoncentration, samt för enbart vatten (referens eller nollvärde). Doppa pappret så ”repeterbart” som möjligt. Om filterpappret vänder sig eller häftar vid kanten av bägaren vid uppstigandet, gör då ett nytt försök och/eller mät tiden det tar för centrum av eller mitten av filterpappret att nå ytan i bägaren vid de olika koncentrationerna. Observera att koncentrationen av väteperoxid ej är konstant under försökets gång. Den kommer att sjunka efter många försök. Väteperoxiden omvandlas till vatten och syrgas. Om du gör flera försök vid samma koncentration räknas medelvärdet ut.

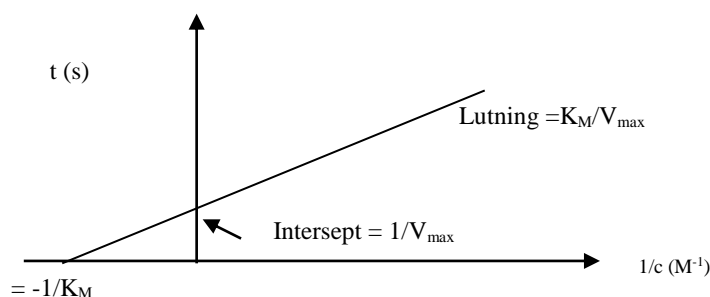
Fyll i följande schema:

c H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%) koncentration	1/c <sub>H2O2</sub> (x-axeln)	Tid t (s) (y-axeln)
2		
1		
0,5		
0,3		
0,2		
0 (dest.vatten)		

Redovisa resultatet i en linjär ekvation. Räta linjens ekvation är

$$y = kx + m$$

**Extra uppgift:** Michaelis konstant,  $K_M$  är ett mått på omsättningen av enzymet (=på hur snabb enzymet katalyserar en reaktion).  $K_M$  definieras som den substratkoncentration som ger halva maximala hastigheten. Enheten för  $K_M$  är mol/dm<sup>3</sup>.  $K_M = [S] \cdot \frac{d\alpha}{dt} \cdot V = \frac{V_{\max}}{2}$



Använd datorns Excel-program och redovisa resultatet genom att avsätta 1/c H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> på x-axeln och tiden på y-axeln. Om sträckan är lika (höjden på bägaren) så är tiden en funktion av den

inverterade hastigheten,  $t = f(1/V)$  ger ekvationen  $t = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$

där  $k$  = (lutningen)  $K_M/V_{\max}$ , avskärningen på y-axeln  $m = 1/V_{\max}$  och avskärningen på x-axeln är  $-1/K_M$ . Avläs värdena och räkna ut  $K_M$  och  $V_{\max}$ .  $K_M$ -värdet kan även beräknas genom att invertera interseptet och byta tecken (avskärning på x-axeln).

**Till läraren:**

Fosfatbuffert pH 7: 31 cm<sup>3</sup> 1 mol/dm<sup>3</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19 cm<sup>3</sup> 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> och 450 cm<sup>3</sup> dest.vatten



K<sub>M</sub> definieras som (k<sub>2</sub> + k<sub>-1</sub>)/k<sub>1</sub> eller som den substratkoncentration [S] som ger halva hastigheten ½V<sub>max</sub>.

$$K_M = [S] \text{ när } V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$$

Michaelis-Menten ekvationen transformeras till en linjär Lineweaver-Burk ekvation:

$1/V_0 = K_M/V_{\max} [S] + 1/V_{\max}$ . Eftersom tiden *t* är en funktion av 1/v avsätts denna mot 1/konc H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Anpassa en rät linje till mätvärdena. För utförligare förklaring hänvisas till en biokemibok tex Lehninger. Vid ett experiment erhöles följande värden:

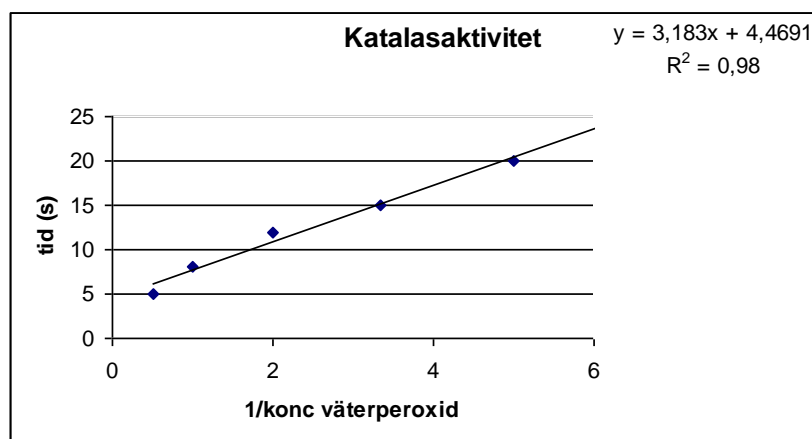
Konc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	1/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%) <sup>-1</sup> (x-axeln)	Tid (s) (y-axeln)
2	0.5	5
1	1	8
0,5	2	12
0,3	3,33	15
0,2	5	20
0 (dest.vatten)		oändligt

Detta ger ekvationen

$$y = 3,18x + 4,47$$

$$V_{\max} = 0,22$$

K<sub>M</sub> = 0,71% eller 226 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Värdet för "orenat" katalas anses rimligt då litteraturen ger K<sub>m</sub> för renat katalas 25 mM.



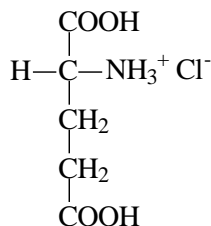
**Praktiska tips:** Det är enklast att läraren späder leverlösningen till lämplig koncentration för att gruppen ska kunna jämföra sina värden. Vissa elever får inte några bra värden (tider) medan andra kan anpassa sina avläsningar till "rimliga" tider även om filterpappren har fastnat i kanten /kantrat på bägaren. Uppmuntra dem att uppskatta vilken tid det skulle ta för filterpappret om inte dessa praktiska problem uppstod.

Omarbetad efter J.Chem Ed vol 77 nr 11 2000 sid 1451-14

## Titring av ett saltsyrasubstitut

**Teori:** pH i magsäcken ska ligga omkring 1,5. Om magen producerar för mycket saltsyra kan man känna det som sura uppstötningar. Då kan man äta ett syraneutraliserade medel, antacida eller ett syrasekretionshämmande medel som neutraliserar utsöndringen av saltsyra. Om man däremot lider av för lite saltsyra i magsäcken, kan man ta ett saltsyrasubstitut, t.ex.

Hypochylin. Hypochylin innehåller aciglumin, glutaminsyrahydroklorid som sönderdelas snabbt i magen och frigör saltsyra. Kvar blir då aminosyran glutaminsyra. 1 tablett motsvarar 1,6 mmol saltsyra.



**Uppgift:** Du ska titrera en tablett Hypochylin och räkna ut hur mycket saltsyraekvivalenter som finns i en tablett (eller hur många protoner som neutraliseras).

**Riskbedömning:** Försiktighet vid påfyllande av byretten. Natriumhydroxid är frätande. Använd skyddsglasögon. Laborationen bedöms ha liten risk.

### Material:

0,100 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

Hypochylintabletter från Apoteket

BTB

Ev. pH-meter

### Utförande:

1. Mortla sönder en tablett Hypochylin och för över den till en 100 cm<sup>3</sup> mätkolv. Tillsätt ca 50 cm<sup>3</sup> vatten och skaka om. Fyllnadsämnen löser sig inte helt. Späd med vatten till märket.
2. Låt fyllnadsmedlet sjunka till botten. Ta sen ut ett prov på 20 cm<sup>3</sup> med pipett och överför till en vidhalsad E-kolv.
3. Gör i ordning en byrett och fyll den med 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH-lösning
4. Tillsätt BTB som indikator till E-kolven. Gör ett dubbelprov eller upprepa titreringen flera gånger tills du får två likvärdiga resultat. Räkna ut medelvärdet.
5. Skriv reaktionsformeln för titreringen. Beräkna antalet saltsyraekvivalenter i en tablett. Förklara dina resultat. Skriv rapport

### Till Läraren.

Glutaminsyrahydroklorid uppför sig som en tvåvärd syra (tvåprotonig). Det gick åt 32 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> för en tablett. Titrerar man ren glutaminsyra med BTB uppför den sig som en envärd syra. (Den andra protonen protolyseras inte i vattenlösning).

Glutaminsyrans pK<sub>a</sub>-värden (etanol/vatten) ”Handbook of Chemistry and Physics” :

pK<sub>a1</sub> = 3,16

pK<sub>a2</sub> = 5,63

pK<sub>a3</sub> = 10,75

Detta borde ge omslagspunkter p<sub>i</sub> (mittemellan pK<sub>a</sub>-värdena) till 4,40 och 8,20.

*I Fass står*

**Hypochoylin®**

Tabletter 300 mg

Saltsyrasubstitut

**Deklaration.** 1 tablett innehåller: Aciglumin 300 mg, laktos 10 mg, vattenfri kolloidal kiseldioxid, mikrokristallin cellulosa, gelatin, glycerol, flytande paraffin, polysorbat 80, potatisstärkelse, stearinsyra, talk.

**Indikationer.** Achyli, hypochoyli.

**Dosering.** 1-3 tabletter före måltid. Tabletten nedsväljes hel tillsammans med ett halvt glas vatten.

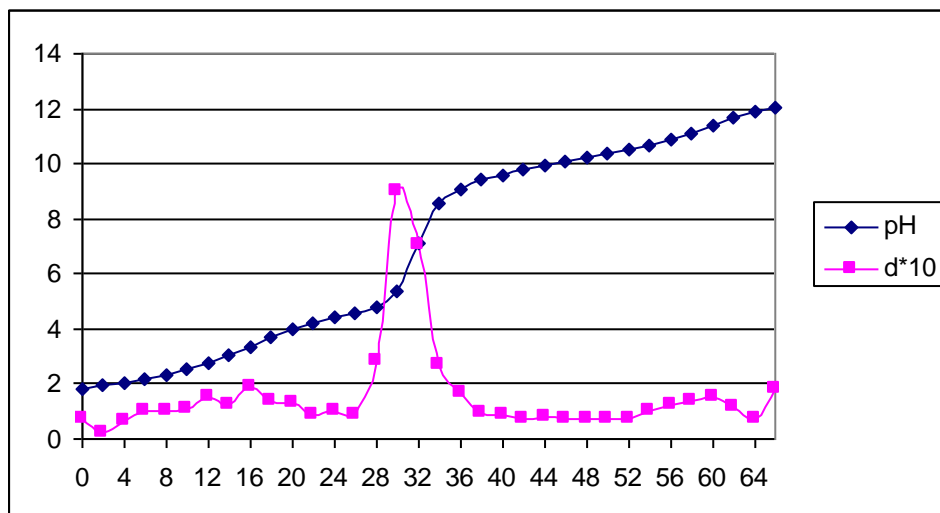
**Kontraindikationer.** Överkänslighet mot glutamat.

**Farmakodynamik.** Innehåller glutaminsyrahydroklorid som sönderdelas snabbt i ventrikeln under frigörande av saltsyra. Glutaminsyra är en i födan vanligt förekommande aminosyra. 1 tablett motsvarar 1,6 mmol saltsyra.

**Förpackningar och priser.**

Tabletter 300 mg (vita, runda, plana 10 mm) 100 st

Texten är reviderad: 1998-08-04.



Titrerkurva för Hydrochoylin med 0,1 M NaOH samt derivatan ( $\Delta\text{pH}/\Delta v$ ) gånger 10

## Upplösning av en tablett

När man tar en tablett vill man att den ska ha en speciell verkan. Tabletten skall verka-

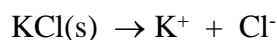
1. under en viss tid och sen vara utan effekt t.ex. sömntablett
2. snabbt så att t.ex. huvudvärken går över
3. under en lång tid med samma koncentration t.ex. antibiotika

För att läkemedlet ska få avsedd effekt måste det tas i rätt dos och vid rätt tidpunkt. Läkaren försöker att för varje patient finna den dos av ett läkemedel som är mest lämplig i den aktuella situationen. Dosen beror på

1. kroppens förmåga att ta upp läkemedlet
2. funktionen hos lever och njurar
3. individuell känslighet för medlet
4. patientens kroppsvikt och ålder
5. att andra mediciner kan påverka effekten
6. ev graviditet eller amning



**Uppgift:** Du ska studera hur en kaliumkloridtablett löses upp genom att mäta konduktiviteten.

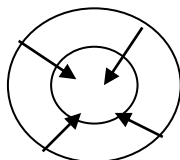


Kaliumklorid ordineras till patienter som får diuretika, ett urindrivande medel. Kaliumhalten sjunker hos patienter som behandlas med diuretika. Det används även av patienter med hjärtsvikt och benägenhet för ödem (vätskeansamling) samt mot högt blodtryck. Kalium har betydelse för nerv och muskelfunktioner.

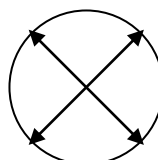
### Utförande:

1. Måla en kaliumtablett med nagellack. Låt torka och borra sedan ett hål i mitten.
2. Lägg sedan samtidigt den målade tabletten i en bägare med 100 cm<sup>3</sup> vatten och en omålad (obehandlad) tablett i en annan bägare med lika mängd vatten. Stoppa i magneter i bägarna och sätt på magnetomröraren. Se till att omrörningen blir lika i de båda bägarna.
3. Mät konduktiviteten varje minut i början, var 5 minut senare och var 10-15 minut mot slutet under ca 4 timmar. För in värdena på ett millimeterpapper.

**Variant:** Upplösningen går fortare i varmt vatten. Lämplig temperatur är 50°C. Mättiden blir då ca 2 h.



Tablett med hål



Normal tablett

Bild på hur upplösningen kan tänkas gå till

### Några råd till vid tablettanvändning:

- Använd aldrig någon annans receptbelagda medicin. Ge aldrig bort medicin du fått på recept. Samma symtom hos olika personer behöver inte betyda samma sjukdom och ska därför inte behandlas med samma läkemedel.
- Förvara medicinen i fabrikantens förpackning, annars kan en förväxling lätt ske eller hållbarheten försämrats
- Förvara all medicin utom räckhåll för barn och helst i låst skåp!
- Tänk på att barn är känsliga för vissa receptfria läkemedel, till exempel järntabletter och läkemedel som innehåller acetylsalicylsyra.
- Lämna överbliven och för gammal medicin till apotek för förstöring.
- Alkohol och läkemedel kan vara farligt tillsammans. Särskilt farligt kan det vara att ta alkohol tillsammans med lugnande medel, sömnmedel och medel mot värk.
- Se upp med bilkörning om du tar läkemedel som påverkar dig som förare, till exempel läkemedel vars förpackning har en röd varningstriangel.

### Till läraren.

Laborationen kan ta ganska lång tid! Därför kan det vara lämpligt att denna laboration går parallellt med en annan laboration och eleverna får mäta och se på resultatet i omgångar.

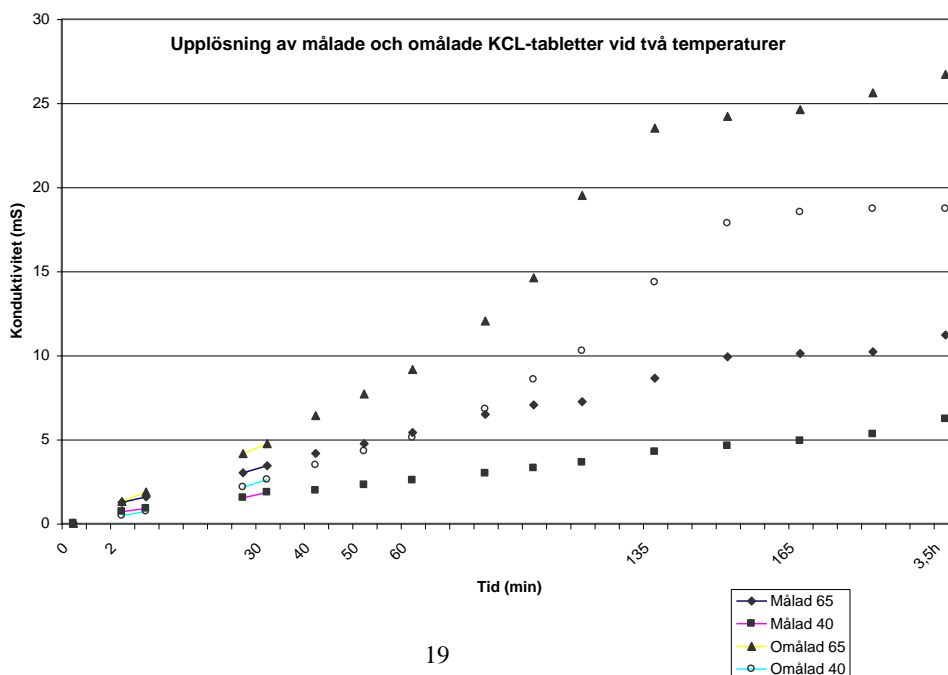
Köp receptfria Kaliumduretter eller Kalitabs på apoteket. De innehåller ca 10 mmol kaliumklorid förpackat i en polymer. När kaliumkloriden har löst upp sig så finns fortfarande ett skelett av polymeren kvar. Upplösningen i rumstemperatur tar ca 5-6 timmar. Man kan öka temperaturen för att förkorta tiden. Bäst resultat fås dock vid rumstemperatur då det är svårt att hålla temperaturen konstant och lika i de båda bägarna.

1) Genom att variera hålens storlek (1-3 mm) på den målade tabletten kan man variera frisättningshastigheten.

2) Upplösningen går långsammare när det finns nagellack på tabletten. Jonerna måste ta sig ut genom ”hålet”. Frisättningen blir linjär. Detta beror på att radien för den oupplösta kaliumkloriden ökar samtidigt som avståndet till frisättningszonen är längre

3) Upplösningen går fortare från en omålade tablett då frisättningszonen är hela tabletten. Frisättningen beskriver en vanlig tillväxtkurva i sigma-form. I början ökar konduktiviteten logaritmiskt men avtar sedan.

*Labbförslaget kommer från prof. Sven Engström, Farmakologen, Göteborg*



## Vid vilket pH fungerar amylas?

**Teori:** Enzymerna lipaser, amylaser och proteaser tillverkas, förvaras och distribueras av bukspottkörteln. Enzymerna finns tillgängliga i ett inaktivt stadium sk. enzymogener.

Enzymogenerna töms ut i tolvfingertarmen efter signaler från magen och aktiveras vid ett visst pH. Amylas spjälkar polysackarider.

Vid olika sjukdomar i bukspottkörteln kan den egna produktionen av enzymer helt eller delvis upphöra, vilket kan ge upphov till fettdiarré och risk för vitaminbrist. På apoteket kan man då köpa ett läkemedel Combizym som innehåller matsmältningsenzymerna.

**Syfte:** Du ska testa vid vilket pH (2 eller 8) bukspott-amylas är aktivt och vilka bindningar det kan spjälka. Du ska använda tre olika polysackarider

- a) stärkelse med 1,4- $\alpha$ -glykosidisk bindning,
- b) cellulosa med 1,4- $\beta$ -glykosidisk bindning och
- c) gummi arabikum, som består av polygalaktos med 1,3 bindningar

**Reagenset DNSA** = dinitrosalicylsyra påvisar med röd färg om det finns monosackarider. Om ingen nedbrytning har skett är färgen gul. Absorbansen läses vid 540 nm eller med ögat.

**Riskbedömning:** DNSA är irriterande. Undvik kontakt med hud och att få damm i ögon. Använd personligt skydd vid användning av reagenset.

### Material:

Buffertar: pH 2 av 0,5 mol/dm<sup>3</sup> trietanolamin·HCl alternativt TRIS buffert

pH 8 av sulfatbuffert (hälften 0,5 mol/dm<sup>3</sup> natriumsulfat och hälften 0,5 mol/dm<sup>3</sup> natriumvätesulfat).

1% löslig stärkelse

1% gummi arabikum

Cellulosa av bomull eller filterpapper

Amylaslösning av 50-70 mg amylas (porcine pancreas) i 100 cm<sup>3</sup> vatten

DNSA-reagens: Nygjord lösning av 1% 3,5-dinitrosalisylsyra, 30% Na,K-tartrat och 0,40 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

**Utförande:** Gör i ordning 8 provrör enl schemat

Tillsätt amylas sist och ställ provrören i tempererat vatten på 30°C i 30 minuter.

Prov nr	Vatten	Buffert	Ämne	Enzym
1. Blank:	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup> pH 8		-
2.	-	2 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	-
3.	-	1 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	1 cm <sup>3</sup>
4.	-	1 cm <sup>3</sup> pH 2	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	1 cm <sup>3</sup>
5.	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup> pH 8	Lite bomull	-
6.	1 cm <sup>3v</sup>	1 cm <sup>3</sup> pH 8	Lite bomull	1 cm <sup>3</sup>
7		2 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> gummi arabikum	
8		2 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> gummi arabikum	1 cm <sup>3</sup>

Efter 30 minuter tillsätt 8 droppar DNSA-reagens och provrören ställs i kokande vattenbad i ca 10 minuter. Späd med 4cm<sup>3</sup> vatten och läs av resultatet vid 540 nm eller se skillnader. Skriv rapport!

### Till Läraren:

Kolhydratbestämning med dinitrosalicylsyreareagens är beskrivet av P. Bernfeldt, Methods in enzymology, vol 1, 1955 s.149.

Försöket ger röd färg (positivt för aktivt amylas) endast för provrör 3, dvs. stärkelse i pH 8.

**Extra uppgift:** Man kan utöka försöket genom att ta alla kolhydrater i både pH 8 och pH 2. Eller utöka försöket genom att testa vid flera pH-värden för stärkelselösningen.

pH 4 ättiksyrabuffert

pH 6 bärnstensyrabuffert

pH 10 natriumbikarbonatbuffert

pH 12 dinatriumfosfatbuffert

Man erhåller då ett maximum för pH 6 eller 8. Men amylas har även en låg aktivitet vid pH 2 och kan ge svagt röd färg med DNSA-reagenset.

**Extra uppgift på Combizym:** Konstruera en egen laboration med den receptfria medicinen Combizym. Tabletten innehåller i ett yttre skikt växtenzymmer från *Aspergillus* extrakt (*Aspergillus* är en mögelsvamp) och i en inre magsaftresistent kärna pankreasenzymmer utvunna från svinpankreas. Detta göra att amylas fungerar vid flera pH. Visa planen för din lärare.

Resultaten blir annorlunda beroende på vilken Combizymtablett du använder till försöket. Det finns två olika. Se nedan. Tablettens enzymer i det yttre skiktet frigörs och aktiveras redan i magen (vid surt pH). Det innehåller även cellulas. Det inre skiktet är enzymer från bukspottkörtel från gris.

Lägg en tablett i 25 cm<sup>3</sup> pH-4 buffert och lös upp det yttre skiktet. Mortla sönder den inre delen och lös upp i vatten. Använd dessa lösningar till egna experiment!

Enheter	Amylas(I.E)	Proteas(I.E)	Cellulas(I.E)	Lipas(I:E)	Gallsyra(mg)
<b>Combizym</b>					
Yttre skiktet ( <i>Aspergillus</i> )	170	10	70		
Inre skiktet (Grispankreas)	7000	420		7400	
<b>Combizym compositum</b>					
Yttre skiktet ( <i>Aspergillus</i> )	850	50	400		60
Inre skiktet (Grispankreas)	13000	760		13500	

Försök från [www.mnsfld.edu](http://www.mnsfld.edu)

## Vilket socker föredrar jästen?

**Teori:** När du ska träna inför ett långt lopp t ex Vasaloppet så ska du fylla på din reservnäring med kolhydrater. Det finns olika sorter av kolhydrater och kroppen förbrukar de olika kolhydraterna olika snabbt. Du ska testa vilken kolhydrat som jäst tar upp snabbast. I denna laboration bryter jäst ner kolhydraterna anaerobt (utan tillgång till syre) enligt formeln:



Du ska mäta bildad mängd koldioxid när du ”matar” jästen med olika monosackarider, disackarider och polysackarider.

**Riskbedömning:** Laborationen har liten risk.

**Material:** 20% lösningar av:

Monosackarider: glukos, fruktos, galaktos,

Disackarider: sackaros, maltos, laktos,

Polysackarider: stärkelse, cellulosa

50% jästsuspension (50 g jäst och 50 cm<sup>3</sup> vatten)

små E-kolvar (en per kolhydrat)

ballonger (lika många som antal kolvar)

vattenbad på 40-44°C

**Utförande:** Välj ut vilka kolhydrater du ska testa. För varje sockerart hälls 20 cm<sup>3</sup> av kolhydratlösningen och 10 cm<sup>3</sup> av jästsuspensionen i en E-kolv. Trä en ballong över kolvmynnningarna. Ställ i vattenbad. Mät tiden tills ballongen fylls med koldioxid eller mät diametern på ballongen efter en viss tid. Ta sackaros som referenslösning. Hur kan du testa att ballongen innehåller koldioxid?

**Skriv rapport:** Försök att finna en förklaring till dina resultat!



### Till Läraren:

Man finner att glukos, fruktos och sackaros fermenterar (jäser) bra. Galaktos, laktos och stärkelse fermenterar inte lika bra. Vissa jäststammar fermenterar maltos lika bra som glukos. De kan ha högre maltasaktivitet än ”vanlig” jäst. Frystorkad jäst går bra att använda men behöver först ”väckas upp” i lite högre temperatur. Se på förpackningen. Koldioxiden påvisas med kalkvatten. Då det i denna laboration går åt stora mängder av kolhydrater till en hel klass kan man variera mängd sackaros och jäst enl förslag **Mängd strösocker**. Tag 5g, 10g, 20g och 40g strösocker Titta på inverkan. 20 g är det bästa. Om man tar för mycket blir sockerhalten för hög och vatten dras ur jästcellerna och de dör/(påverkas). **Temperaturens inverkan**. Studera 20 g socker vid olika temperaturer. Välj isvatten (mycket långsamt), rumstemperatur (långsamt), 37°C (det bästa) och 50°C (för högt, proteinerna denatureras). **Variera mängd jäst** eller jämför frystorkad jäst, vanlig jäst och jäst för söta degar. Denna labb kan man ta som introduktion till Glykemiskt index.;GI. Se denna laboration s. 28!

## Hur bra buffrar plasman i blodet

– ett in vitro experiment i syra-bas-kapacitet

**Teori:** Blodet måste hålla ett konstant pH för att fungera. Blodet består av blodkroppar och plasma. Plasma har en bra buffertförmåga och håller blodet på pH 7,4. Det får inte bli för surt (acidosis) eller för basiskt (alkalosis). Acidosis kan uppstå vid ansträngning, då det bildas mjölksyra, eller vid diarré. Vid alkalosis har kroppen blivit av med saltsyra genom kräkningar.

Buffertsystem som finns i plasman är:



Du ska tillverka en konstgjord plasma av karbonerat vatten, bakpulver och en aminosyra. Karbonerat vatten innehåller kolsyra, bakpulver består av ca 30% stärkelse, 40 % surt fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) eller pyrofosfat ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) samt 30% natriumvätekarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ). Stärkelse är inte vattenlösligt utan ska filtreras bort.

**Riskbedömning:** Natriumhydroxid och saltsyra är frätande. Använd förkläde och glasögon.

### Material:

Karbonerat vatten utan smaktillsats (typ Wichyvatten, Ramlösa),  
bakpulver (typ Blåvitt), glutaminsyra  
0,1 mol/dm<sup>3</sup> HCl, 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH  
BTB, våg, filterpapper, tratt, byrett och byrettställ

### Utförande:

1. Tillverka en konstgjord plasma av följande ämnen.
  - a) Lös upp 2 g bakpulver i ca 20 cm<sup>3</sup> vatten och filtrera ner lösningen i en 100cm<sup>3</sup> mätcylinder. Fyll sedan upp mätcylindern med vatten till 50cm<sup>3</sup>
  - b) Tillsätt 50 cm<sup>3</sup> karbonerat vatten
  - d) Tillsätt en knivsudd glutaminsyra
2. Häll över ”plasman” till en vidhalsad E-kolv. Din ”konstgjorda ” plasma kan vara lite för sur. Det beror på hur mycket kolsyra den karbonerade drycken innehåller. Genom att röra lite i bufferten går koldioxid bort. (Justera ev. in till rätt värde, alltså ca pH 7,4)
3. I en annan kolv har du 100 cm<sup>3</sup> dest.vatten som referens.

Om du ska testa hur mycket plasman buffrar åt den sura sidan eller den basiska bestämmer du och din lärare!

#### Acidos

4. Tillsätt BTB i båda kolvarna
5. Fyll en byrett med 0,1 M HCl. Tillsätt 1 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> HCl i kolven med rent vatten.
6. Tillsätt sen så mycket saltsyra i plasma-kolven, så att färgerna blir lika i de två kolvarna.

#### Alkalos

4. Tillsätt BTB i båda kolvarna
5. Fyll en byrett med 0,1 M NaOH. Tillsätt 1 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH i kolven med rent vatten.
6. Tillsätt sen så mycket natriumhydroxid i plasma-kolven, så att färgerna blir lika i de två kolvarna.

7. Anteckna värdet. (Du kan även registrera pH-värden med en pH-meter)

8. Dra slutsatser om plasmans buffrande egenskaper. Jämför med andra grupper. Skriv rapport.

### Till läraren:

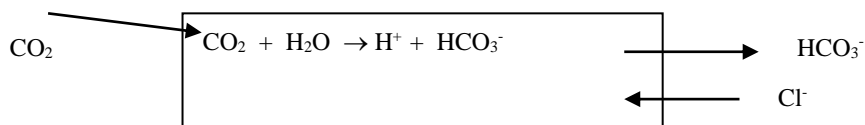
Denna laboration kan användas både i Kemi A och i Kemi B. Kraven på teori är då olika. Laborationen är skriven för Kemi A, då man går igenom buffertbegreppet. Labben är bättre än den vanliga laborationen på buffrande mjölk, som dessutom förstör elektroden med proteinutfällningar.

**Teori:** 60% av en människas massa består av vatten. En tredjedel av detta är extracellulär vätska (ECV) och 2/3 är intracellulär vätska (ICV). Det extracellulära vattnet genomgår hela tiden regleringar genom filtrering i njurarna. Njurarna filtrerar  $125 \text{ cm}^3/\text{min}$  eller ca  $180 \text{ dm}^3/\text{dygn}$ . Genom filtreringen regleras pH och salthalter i ECV.

### Buffertsystemen i ECV

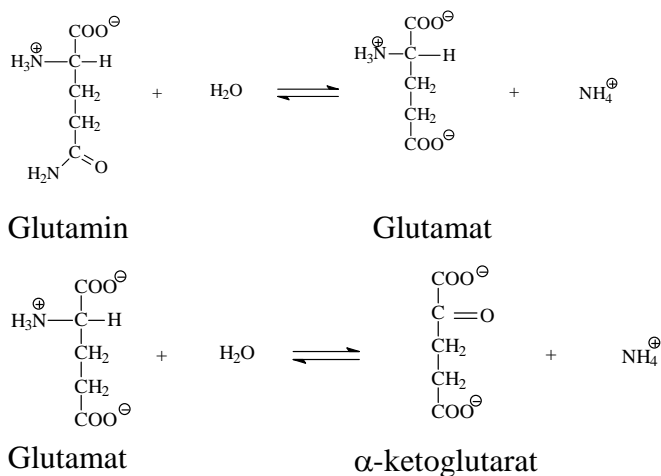
En människa har normalt ett pH i blodet som är svagt basiskt. pH i den extracellulära vätskan ligger mellan 7,35- 7,45 med ett medelvärde på 7,40. Det viktigaste buffertsystemet är kolsyra/bikarbonatsystemet. Syret från hemoglobinet avges lättare till vävnaderna vid acidosis, medan avgivning är försvårad vid alkalosis. Det innebär att hemoglobin fungerar dåligt som buffert vid  $\text{pH} > 7,45$ . Hela tiden produceras koldioxid och vätejoner vid metabolism i cellerna. Dessa produkter buffras så fort de lämnar cellerna och kommer därefter att utsöndras antingen via lungorna som  $\text{CO}_2$  eller via njurarna i form av  $\text{HCO}_3^-$ . Vid nedsatt lungfunktion kan  $\text{CO}_2$  lätt ansamlas med acidosis som följd. Kloridjonen har betydelse vid utförseln av vätekarbonatjonen. Med kloridskiftet menas att kloridjonen,  $\text{Cl}^-$  går in i erythrocyterna och vätekarbonatjonen,  $\text{HCO}_3^-$  går ut till ECV. I lungorna sker den motsatta reaktionen.

**Figur 1:** Klorid/bikarbonatutbytet i erythrocyterna. Koldioxid går in i erythrocyten genom diffusion och löser sig i



vatten. När bikarbonatjoner går ut ur erythrocyten går kloridjoner in. Membranets elektriska potential ändras inte. På detta sätt ökas den koldioxidbärande kapaciteten i blodet.

Fosfatjonkoncentrationen är störst i intracellulär vätska (ICV). I njurarna sönderfaller företrädesvis glutamin till  $\alpha$ -ketopyruvat och ammoniumjon. Produktionen av ammoniumjon kan vara betydande. Ammoniumjonens bildande är det viktigaste sättet att reglera vätejoner.



Vatten tillförs kroppen genom dryck, ca  $1,5 \text{ dm}^3$  och mat, ca  $1 \text{ dm}^3$  per dygn. Med det tillförda vattnet justeras pH och koncentrationen av viktiga joner. Totala koncentrationen av joner i ECV är ungefär  $0,05 \text{ mol/dm}^3$ , bestående av lika delar bikarbonat, fosfater och klorider. Natrium är den viktigaste jonen som kontrollerar volym och osmos i EVC och den är nästan uteslutande en extracellulär jon.

**Till labben** går det åt ca  $20 \text{ cm}^3$  syra eller natriumhydroxid. Det kan variera mellan grupperna eftersom man uppskattar färgen olika. Resultaten övertygar dock om att buffertsystemet fungerar. Tillsätt ganska mycket BTB för att se tydliga färgnyanser

**Alternativ:**

- a) Låt några snabba elever testa om kloridjoner har en buffrande effekt! ECV innehåller även kloridjoner. Dessa går in i röda blodkropparna för att utjämna laddningarna när vätekarbonatjoner går ut i ECV. Kloridjoner påverkar inte de buffrande egenskaperna i EVC.
- b) Man kan följa experimentet med en pH-meter eller välja en annan kombination av de ingående jonerna för att se viken jon som har den bästa buffertkapaciteten. Den största buffertkapaciteten har vätekarbonat.
- c) Ta bort glutamin. Buffertkapaciteten påverkas.

Från "Vätskebalans" av Finn Redke Studentlitteratur

## Tvådimensionell tunnskiktskromatografi av aminosyror

Vid uremi och fenylketonuri kan en fungerande behandling vara att äta en blandning av aminosyror. Med uremi eller njursvikt menas en svår nedsättning av njurarnas funktion med anhopning av kvävehaltiga nedbrytningsprodukter t.ex. vid diabetes eller immunologiskt betingad njurskada.

Fenylketonuri är en genetisk sjukdom där nedbrytningen av aminosyran fenylalanin är påverkad. Enzymet fenylalaninhydroxylas som med syre ( $O_2$ ) ska föra in en hydroxylgrupp till tyrosin, fungerar inte. Den andra syreatomen reduceras samtidigt med NADH till vatten. Istället transamineras fenylalanin och pyruvat av aminotransferas till alanin resp. fenylpyruvat – en keton. Det sker en ackumulering av den intermediära fenylketonen. Detta leder till defekter i hjärnas utveckling. En diet med lagom mängd fenylalanin rekommenderas. I de receptfria medicinerna Aminess finns 17 st olika aminosyror, och i Aminess N finns 10 st både essentiella och icke essentiella aminosyror.

**Riskbedömning:** Organiska lösningsmedel är brännbara. Ninhydrin är carcinogent. Endast lärare bör doppa TLC-plattan i ninhydrinlösning i dragskåp. Måttligt riskfri.

**Uppgift:** Du ska analysera något av dessa receptfria preparat med tunnskiktskromatografi TLC (efter engelska Thin Layer Chromatography). Med hjälp av två lösningsmedels-system, ett basiskt och ett surt, kan man erhålla en separation i två dimensioner av de flesta aminosyror.

**Teori:** Tunnskiktskromatografi är en relativ enkel separationsmetod för att kvalitativt bestämma sammansättningen hos en blandning. Separationen bygger på ämnenas olika fördelning mellan rörlig (mobil) och fast (stationär) fas. I denna laboration är den fasta fasen ett skikt på en platta av cellulosa. Den rörliga fasen är en blandning av organiska lösningsmedel. Ju mer löslig en komponent är i den rörliga fasen, desto snabbare vandrar den, dvs desto större  $R_f$ -värde har den.

$$R_f = a/b$$

a = den sträcka en komponent i provet vandrat

b = den sträcka lösningsmedelsfronten vandrat

Alla aminosyror har följande generella formel  $^+H_3N-CHR-COO^-$ . Skillnaden mellan aminosyror ligger i R-gruppen. Beroende på R-gruppens egenskaper, delar man in aminosyrorna i tre grupper

- R-gruppen opolär t.ex. Leu
- R-gruppen polär men oladdad vid pH 7,0 t.ex. Tyr
- R-gruppen polär och laddad vid pH-7,0 t.ex. Glu

Under denna laboration sker kromatografiseparationen inte vid pH 7 utan vid pH 1 resp. 12,5. En aminosyra vandrar efter sin polaritet vid olika pH. Det pH-värde vid vilket aminosyran har nettoladdning noll kallas isoelektrisk punkt (IP). En aminosyra har alltid positiv nettoladdning vid  $pH < IP$  och negativ vid  $pH > IP$ .

En aminosyra med större nettoladdning vandrar långsammare än en med en mindre nettoladdning. Om två aminosyror har samma nettoladdning, vandrar den med mest opolär R-grupp snabbast. Då  $R_f$ -värden för olika aminosyror ligger mycket nära varandra i många lösningsmedelsystem är det ofta fördelaktigt att använda två lösningsmedelsystem. Dessa elueras i 90° vinkel mot varandra. Man får då aminosyrorna att vandra efter sitt  $R_f$ -värde i respektive lösningsmedelsystem. Om man väljer lämpliga system, exempelvis det ena surt och det andra basiskt, samt lösningsmedel med olika polaritet, är det möjligt att erhålla en bra separation.

**Material:** Ninhydrinreagens. (0,3% ninhydrin i etanol alt 0,2g ninhydrin, 4 cm<sup>3</sup> kollidin, 30 cm<sup>3</sup> ättiksyra i 100 cm<sup>3</sup> etanol)

Cellulosaplattor MN200, 10x10 cm

Glasvanna med lock

Kapillärer

1 mol/dm<sup>3</sup> HCl

Ammoniak (25%)

Linjal, hårtork

Referensblandning: Leu(leucin), Glu(glutaminsyra), Thr(treonin), His(histidin)

Fas1 (sur): 2-propanol: etylmetylketon (2-butanon):1M HCl (12:3:5)

Fas2 (basisk): 2-metyl-2-butanol: etylmetylketon: aceton: metanol: vatten: ammoniak(25%) (10:4:2:1:3:1). Efter kromatografin samlas faserna upp i avfallskärl.

**Tabletterna** innehåller:

**Aminess N:** Isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, treonin, tryptofan, tyrosin, valin.

**Aminogran :** L-lysin, L-leucin, L-isoleucin, L-serin, L-arginin, L-valin, L-tyrosin, L-asparaginsyra, glycin, L-treonin, L-histidin, L-prolin, L-metionin, L-alanin, L-glutaminsyra, L-cystin, L-tryptofan.

**Utförande:** TLC-plattan tvättas ev en gång med lösningsmedelsystem 1 och lufttorkas i dragskåp, varefter 2-3 mm av cellulosaskiktet på varje sida skrapas av med hjälp av spatel. Krossa en tablett Aminess eller Aminogran i en mortel med en pistill och lös tabletten i en liten mängd avjoniserat vatten. Filtrera eller låt tabletten fyllnadsmaterial sjunka till botten, då detta annars kommer att störa separationen. Markera försiktigt med blyertspenna ett påsättningsställe på plattan. Applicera portionsvis den rena vattenlösningen av tabletten med en kapillär på det märkta stället. Torka med hårtork (svag värme) för att få så liten fläck som möjligt. Sätt på samma sätt referenslösningen i nedre högra hörnet. Se fig. 1.

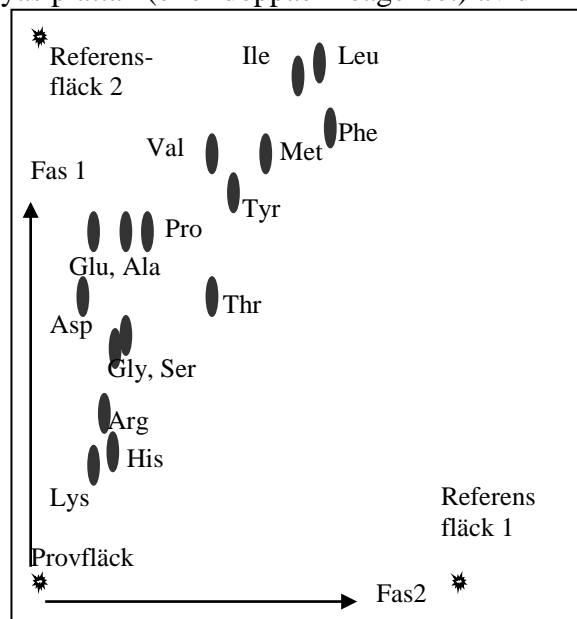
Plattan placeras därefter i en vanna innehållande lösningsmedelsystem 1. Se till att fläckarna är ovanför lösningsmedelsytan. Då lösningmedelsfronten vandrat till övre delen av plattan avbryts kromatografin och fronten markeras försiktigt med blyertspenna. Plattan får torkas i dragskåp med hårtork. En ny fläck med referenslösning sätts på enl figur1. Plattan sätts ner i vinnan, som nu innehåller lösningsmedelsystem 2 och i 90° vinkel mot tidigare. Låt fronten vandra lika långt i detta system. Efter torkning spayas plattan (eller doppas i reagenset) av din läraren i dragskåp med ninhydrinreagens. Plattan framkallas någon minut i värmeskåp, 110°C. Aminosyrorna framträder nu som blåviolettera fläckar. Identifiera fläckarna med hjälp av referenserna och fig. 2.

**Redovisning:** Rita av kromatogrammet.

Förklara med hjälp av aminosyrornas 1) laddning och 2) polaritet varför de fyra referenslösningarna vandrar olika långt i fas 1 resp 2. Identifiera aminosyrorna. Bestäm R<sub>f</sub>-värden för de fyra referenserna och motsvarande provfläck i de två faserna.

**Till Läraren:** Tunnskiktspaltor med cellulosa elueras långsamt. Gör denna laboration som ett demonstrationsförsök på den tvådimensionella TLC-tekniken.

Omarbetning av laboration ”Tunnskiktskromatografi av aminosyror från proteinhydrolysat” från Linköpings Universitet



## Vad påverkas ditt blodsocker av?

- En introduktion till glykemiskt index och en studie i vad som påverkar glukoshalten i blodet.

**Teori:** *Du blir vad du äter!*

Kolhydrater är den billigaste energikällan i våra livsmedel. Fett är det energitätaste och proteiner från kött är oftast det dyraste. Men proteiner från baljväxter (bönor och linser) är både nyttiga och billiga. Den viktigaste källan för kolhydrater i kosten är stärkelse som finns i ex bröd, potatis, ris och baljväxter men det finns även i godis, läsk och söta bakverk. Stärkelse är en polymer av glukos och den finns i två former: amylos (långa spiralformade kedjor) och amylopektin (grenade kedjor).

### Insulin

I vår mag-tarmkanal bryts stärkelsen ner till glukos och tas sedan upp i blodet. För att glukos ska tas upp från blodet till vävnaden (cellerna) behövs insulin (ett hormon). Insulin sänker blodsockerhalten i blodet. Cellerna bygger sedan ihop glukosmolekylerna till glykogen (kraftigt grenade kedjor). Olika stärkelserika livsmedel ger efter en måltid upphov till högst varierande glukoshalter i blodet och även till olika insulinhalter i blodet. Insulin bygger även upp musklerna och för in fett i fettcellerna och förhindrar fettförbränningen.

### Insulinkänslighet

När insulin produceras i samma takt som blodsockret sjunker, så säger man att man har en bra insulinkänslighet. Är känsligheten dålig behövs högre halter insulin för att få cellerna, och framförallt levern att ta upp glukosen från blodet. I vissa livsmedel finns ämnen eller strukturer som gör att stärkelsens nedbrytning fördröjs. Från dessa livsmedel, som brukar kallas "långsamma" kolhydrater, frigörs glukos långsamt till blodet och de resulterar därför i låga insulinnivåer. Sockerhalten i blodet bör hålla en jämn nivå, vilket är bra för både hjärnan och muskler.

### Glykemiskt index

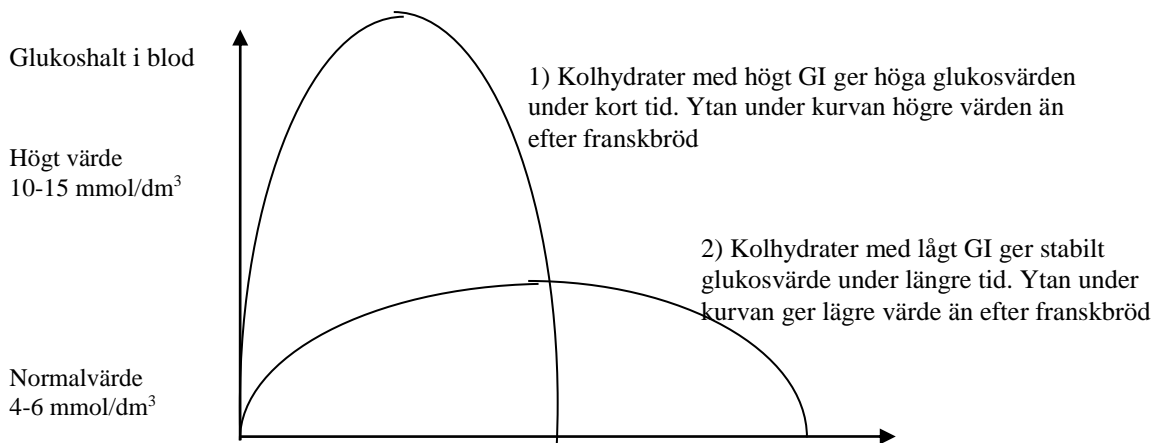
Glykemiskt index, GI är ett mått på hur mycket av hormonet insulin som frigörs när man äter ett visst livsmedel. Ju högre siffra, desto mer insulin behövs, och desto "snabbare" bryts kolhydraterna i livsmedlet ner. En "långsam" kolhydrat med ett lågt GI bryts ner långsamt och då behöver kroppen inte producera så mycket insulin. I baljväxterna finns det "långsam" stärkelse med låga GI-värden. Durumvete innehåller snabba kolhydrater av grenat amylopektin. Pasta och spagetti görs av durumvete. Men vid tillverkningen (upphettnings) får dock pastan eller spagettin en kompakt struktur som gör stärkelsen fiberlik och mindre tillgänglig. Risprodukter har varierande egenskaper. Det obehandlade klibbiga riset med hög halt av amylopektin har ett högt GI medan ris med hög halt amylos har lägre GI. Fruktos är den långsammaste monosackariden man känner.

glykemiskt index kan man använda sig av om man vill:	Ät kolhydrater med -
Förbättra sin hälsa genom att ha stabila och lagom höga sockervärden i blodet.	Lågt GI
Gå ner i vikt utan att vara hungrig genom att förlänga mättnadskänsla efter måltider.	Lågt GI
Öka sin fysiska uthållighet. Få större effekt på din träning utan att anstränga sig mer.	Lågt GI
Ha hjälp med sin medicinering vid diabetes.	Lågt GI
Sänkt blodfettnivå hos friska människor och patienter med förhöjt blodfett.	Lågt GI
Minskad syrabildning på tänderna och få minskad risk för karies.	Lågt GI
Träna intensivt en kort stund t.ex., sprinterlopp, tyngdlyftning.	Högt GI

## Hur mäter man det glykemiska indexet, GI, för ett livsmedel?

Personerna ska inte ha intagit någon föda/godis/mellanmål på minst 2 timmar innan försöket.

1. Mät 12 personers blodsockervärde (glukoshalt) vid försökets start. Detta sätts till normalvärde.
2. 6 personer får äta 100g franskbröd (motsvarar 50g kolhydrat) och de andra 6 personerna får äta den mängd av ett livsmedel som ska testas och som innehåller 50 g kolhydrater.
3. Därefter mäts testpersonernas blodsockernivåer varje 15 minut under en timme och en gång i halvtimmen i ytterligare en timme. Totalt 6 blodprover per person.
4. Rita en graf över blodsockervärdena per tidsenhet och räkna ut arean under kurvan. Värdena från franskbröds experimentet sätts till 100%. De andra jämförs med franskbrödet. Livsmedel med lågt index har  $GI < 60$ , medelhögt GI är mellan 60-90 och höga värden ligger på  $> 90$ .



### Tänkta kurvor över glukoshalter i blodet efter en måltid med

Fig. 1/ Snabba kolhydrater Ger höga värden under kort tid.

2/ Långsamma kolhydrater. Ger lägre värden och en mättnadskänsla under längre tid

Ett räkneexempel: Försökspersonerna äter 100g franskbröd. Franskbröd innehåller 50% kolhydrater. Äpplen innehåller 12,5% kolhydrater. En annan grupp måste äta 400g äpplen för att få i sig 50g kolhydrater.

**Uppgift:** Din uppgift är att med hjälp av en glukosmätare se hur glukoshalten i blodet påverkas av olika födoämnen samt att beräkna GI för födoämnena. Förslag till upplägg. Dela in klassen i grupper. Låt varje elev dricka/äta en kombination av följande

- a) Cola eller annan söt läsk/godis
- b) Colalight eller annan light läsk/sockerfritt godis
- c) Frallor av vete
- d) Motsvarande mängd grovt bröd
- e) Studera motionens inverkan

Se innehållsförteckningen för att få fram hur mycket som ska konsumeras för att man ska få i sig 50g kolhydrater. Mät halten blodsocker efter 15 minuter för att se förändringar eller enligt testschemat för GI-bestämning. Normal halt av blodsocker är 4-6 mmol/dm<sup>3</sup> blod. Blodsockret bör vara tillbaka till normalt värde 1,5 till 2 timmar efter måltid.

## Till läraren

### Hur man mäter blodsockerhalten:

Köp en enkel batteridrivnen blodsockermätare på apoteket för ca 100 till 150 kronor. På marknaden finns många märken t.ex. Roche: AccuCheck, Bayer: Glucometer, Abbot: SoftSense, Medisense: Precision Xtra m.fl. Alla är likvärdiga i funktion och kvalitet.

Köp tillbehören:

- Stickor eller glukos-sensorer som passar specifikt till mätaren. De är dyra, ca 2-3 kronor styck. Kanske sjuksyster på skolan kan köpa in billigare eller ge bort några?
- Lancetter. Det passar med vilka som helst. Det finns speciella blodprovtagare, men det är inte nödvändigt.

Mätningen på apparaten tar ca 20sek - 1minut. Det behövs minst 2-3 mätare till en labb-grupp.

### Kolhydraters väg

- Kolhydrater bryts ner i tarmen och omvandlas till glukos och andra enkla sockerarter
- Glukos tas upp i blodet och blodsockret stiger
- Bukspottkörteln frigör insulin
- Insulinet gör så att glukos lämnar blodet och bildar glykogen i framförallt i levern och muskler
- Blodsocker och även insulinhalten sjunker
- Glykogen frigör glukos med hjälp av glukagon och kortisol
- Hjärnan föredrar ”tänker” bäst” vid en jämn tillförsel av glukos

Lärare vet att elever inte ska äta godis på skrivningar om de vill uppnå bra resultat på ett prov. Blodsockret åker upp i topp efter att man ätit godis och man får en stimulerande socker-chock. En riktig kick! Men sedan sjunker blodsockret under normalnivån och samtidigt som man sitter stilla kommer inte glukagonet igång med nedbrytningen. Resultatet blir att efter 10 -15 minuter så innehåller blodet lägre halter glukos än före ätandet, hjärnan får inte glukos och man tänker sämre än om man inte hade ätit godis. Frukt och smörgås fungerar bättre. Rekommendera en banan som även innehåller kalium!

### Hur kan man använda GI :

- **För hälsa och välmående**  
Balansera kosten med mat som har ett GI under 90. Det första målet på dagen är extra viktigt då insulinhalten efter frukosten ”känner av och ställer in sig ” till dagens normalvärde.
- **För styrka och muskeltillväxt**  
Under fyra veckor tag livsmedel med GI mellan 60 – 100 delat på hälften högt och hälften medelhögt (uppbyggnadsfas). Under följande fyra veckor tas hälften av kolhydraterna från livsmedel med låga GI och hälften med medelhöga. (förbränningsveckor)
- **För uthållighet och prestation**  
Balansera kolhydratintaget med livsmedel mellan 60 – 100 för att fylla på glykogendepåerna
- **För maximal fettförbränning och viktsminskning:**  
Ät mat med låga GI (under 60) och bara i undantag med medelhöga GI. Det är acceptabelt med höga GI efter ett träningspass.

Här är några förslag om klassen vill bestämma GI för olika livsmedel.

<b>Livsmedel</b>	<b>g kolhydrat/ 100g vara</b>	<b>GI</b>	<b>Mängd vara med 50 g kolhydrater</b>	<b>Kommentarer</b>
Banan	22	43-84	230	Beror på om bananen är mogen (högt GI) eller omogen (lågt GI)
Chokladmjölk (typ O'Boy)	13	49	400	Innehåller socker och 3%-ig mjölk. Galaktos har lågt GI.
Franskbröd	50	100	100	Referensvärde
Fruktos	92	32	54	Lågt GI
Gelegodis	83	114	60	Innehåller mycket sackaros
Glass	20-28	51-114	180-250	GI beror på fetthinnehållet och val av sötningsmedel
Honung	82	104	60	Naturens renaste glukoskälla
Jordnötter	10	21	490	Jordnötter har lågt GI. Snickers (57) har lägre än Japp (97)
Majschips	58	103	90	Innehåller fett och amylopektin (lättnedbruten stärkelse)
Mjölk, 3%	5	39	1000	Laktos spjälkas till glukos och galaktos. Galaktos ger lågt GI
Popcorn	55	79	90	Innehåller fett och amylopektin (lättnedbruten stärkelse)
Potatischips	46	77	110	Innehåller fett och amylopektin (lättnedbruten stärkelse)
Russin	71	93	70	Innehåller mycket lättillgängligt glukos
Sackaros	100	92	50	Ger vid spjälkning glukos och fruktos. Fruktos har lågt GI
Salta kringlor	68	116	75	Låg fetthalt men amylopektin (lättnedbruten stärkelse)
Sportdryck	7,5	136	660	Innehåller mycket lättillgängligt glukos
Vindruvor	16	61	300	Innehåller mycket lättillgängligt glukos
Yoghurt med frukt, sötad	15	47	350	Lågt GI p.g.a. surheten. Organiska syror sänker kolhydratnedbrytning
Äpple	12,5	52	400	Lågt GI. Högt halt fruktos

Från boken "Glykemiskt index" Paulune och SLV Livsmedelstabeller

## Vad är blodtryck och hur kan man påverka det

**Teori:** Trycket i blodådrorna mäts enkelt med en blodtrycksmanschett eller handledsmätare. Vid mätning av blodtryck används måtenheten "millimeter kvicksilver" förkortat till mmHg. Hjärtat fungerar som en pump. När hjärtat drar ihop sig, pumpas blodet ut i kroppen och trycket stiger i ådrorna till ett maximalvärde. Detta kallas **systoliskt tryck** (hjärtats arbetsfas). När hjärtat vilar mellan varje slag fylls blodet på i hjärtat, trycket faller till ett minsta värde, som kallas **diastoliskt blodtryck**. Blodtrycket kan variera beroende av både psykiska och fysiska orsaker. Det är normalt att blodtrycket stiger vid kroppsliga aktiviteter, efter måltider, i stressituationer mm. Rökning, psykiska spänningar och ångest får också trycket till att stiga. Därför kan trycket variera från minut till minut, särskilt det översta (systoliska) trycket.

### Vad är normalt blodtryck?

Tryckvärdet skrivs (systoliskt/diastoliskt ) ex. 120/80. Det systoliska (högsta) skrivs först och bör inte vara över 140 mmHg. Det diastoliska (lägsta) skrivs efter och bör inte vara högre än 90 mmHg. Vid lågt blodtryck, hypotoni finns risk för svimning.

Pulsen kan säga något om konditionen. Ett lågt värde visar på bra kondition. Pulsen påverkas också lätt av "vita-rock-syndromet" alltså stressen av att någon mäter ditt blodtryck.

Blodtrycket är även genetiskt betingat. Vissa släkter kan ha högt eller lågt blodtryck.

**Högt blodtryck eller hypertoni** är kopplat till hormoner, elektrolyter, lipoproteiner och andra aktiva substanser i vävnad och blod. Högt blodtryck påverkar hjärtat och de stora pulsådrorna. Detta kan leda till åderförkalkning i pulsådror, hjärta eller njurar (kallas för arterio-cardio-resp. nefroscleros). Två allvarliga komplikationer är hjärnblödning (stroke) och njurskada som kan leda till njursvikt och urinförgiftning. Riskfaktorer för hjärnblödning är högt blodtryck, rökning, förhöjda lipidhalter (serumkolesterol) i blodet och blodets förmåga att bilda blodproppar.

Behandling mot förhöjt blodtryck utan mediciner är:

- a) Rökavvänjning- Sluta röka och snusa!
- b) Viktminskning
- c) Är bra mat! –mindre mängd mättat fett t.ex animaliskt fett och större andelen omättat fett t.ex vegetabiliska oljor samt ökat intag av fibrer
- d) Motion skadar aldrig!
- e) Lägre intag av salt. Kan ha en effekt på ca 5-10 mmHg.
- f) Stressreduktion (mot ångest, oro, sömnstörning mm.)
- g) Alkohol höjer blodtrycket generellt, men har även andra negativa effekter.

**Syfte :** Fundera i grupper ut vilka tester ni vill göra för att påvisa att något höjer eller sänker blodtrycket. Redovisa för er lärare.

### **Till läraren:**

Denna laboration kan mycket väl få variera beroende på vad eleverna vill mäta. Diskutera vad som ska studeras, gör upp en plan hur det ska mätas, dokumenteras, vilka och hur många, hur ofta, när osv. Ta upp frågan om man får göra vilka försök som helst på elever och om det behövs tillstånd av föräldrar. Det kan vara lämpligt att sjuksyster är närvarande vid mätningen. Laborationen får då mera tyngd och inslag av medicinsk vetenskap, samtidigt som det ger en ökad säkerhet för lärare och elever.

### **Riskbedömning:** Låg risk

Epileptiker och elever med hjärtproblem ska inte delta i studien. Vid högt blodtryck ska eleven hänvisas till syster. Det är viktigt att syster informeras om laborationen, innan ni sätter igång.

### **Hur mäter man och när ska man mäta blodtrycket?:**

1. Det är viktigt hur och när man mäter. Mäter man med en handledsmätare ska det vara på vänster hand, och mätaren vara i samma höjd som hjärtat. Ett bra sätt är att lägga handen på bröstet upp mot halsen, så mätaren hålls i jämnhöjd med hjärtat. Läs instruktionen för blodtrycksmanschetten.
2. Mäter man trycket på båda armarna så bör trycket vara ganska lika mellan vänster och höger arm. Detta gäller även för benen. En viss skillnad som beror på mätonoggrannhet kan accepteras. (En förträngning i blodcirkulationen kan vara orsaken till olikheten).
3. Viss medicinering och ärftliga komponenter kan orsaka avvikelser från det normala blodtrycket. Vid alla extrema värden bör syster informeras.

### **Förslag till laboration:**

Mät blodtrycket vid olika tidpunkter och gör en t-test (student t-test). Se nedan!

- a) på morgonen, på dagen, före eller efter lunch,
- b) före och efter ett gymnastikpass,
- c) när du har huvudvärk.
- d) när du är glad/ledsen,
- e) före eller efter ett prov.
- f) kalla ut en elev att gå till rektor eller något annat "obehagligt – ångestladdande"

### **Några saker som höjer blodtrycket:**

1. Lakrits – inom 5 minuter har trycket gått upp ca 20 % för att sen gå ner igen på 20 minuter. Sötlakrits fungerar lika bra som saltlakrits. Prova även lakritsrot från en hälsokostaffär.
- Förslag : Gör ett dubbeltest genom att vissa elever får lakrits och springa upp och ner för en trappa, en grupp får bara lakrits och en grupp får bara springa. Gör en t-test på Excel.
2. Rökare/snusare har i allmänhet högre blodtryck än icke rökare. Kontrollera med chi 2 test! (Se Placebolab i detta häfte.)
  3. Konditionen spelar en viss roll. Elever med bra kondition har oftast lägre puls än andra. Muskelbyggare kan ha högre. (Man vet att de som använder anabola steroider har förhöjt blodtryck) Överviktiga elever kan ha ett förhöjt blodtryck.
  4. Ginseng höjer blodtrycket
  5. Koffeintabletter finns receptfritt på apotek. Används endast med föräldrars medgivande
  6. Vitamin B<sub>6</sub> höjer blodtrycket som en "flush" efter ca 15 minuter på **tom** mage:
  7. Kaffe eller vanligt te höjer blodtrycket, medan vissa te-sorter kan vara rogivande och borde kanske? sänka blodtrycket. Testa valeriana-te!

8. Red bull (sportdryck) innehåller bl.a. koffein och guajana som höjer blodtrycket. Därför varnas det för ett alltför vidlyftigt användande av denna dryck. Förr kunde vissa sportdrycker innehålla efedrin.
9. Gör ett projekt med idrotten! Låt eleverna fylla i sina hälsoprofiler - anamneser. Finns i detta häfte. Gör upp ett träningsprogram med eleverna och följ upp resultaten med en ny deklaration, mätning av puls och blodtryck

**Blodtrycksänkande** mediciner finns också men kan, ur etisk synpunkt, vara svårare att göra en laboration på. Förslag till blodtryckssänkande aktiviteter.

1. Liggande, vilande, efter lunch. Följ med skillnader under en dag, och registrera hur blodtrycket varierar.
2. Vegetarianer får lägre blodtryck än köttätare. Dock, om man pressar i sig t.ex. 300g kött under en måltid sänks trycket. Vegetarianer som "slarvar med maten" har mycket lågt blodtryck!! Räkna ut medelvärden på en klass och gör en chi2-test för att se om grupperna skiljer sig åt.
3. Trycket sänks efter att man tagit en paracetamol p.g.a. t.ex. en stukad fot. Trycket kan vara 160 mmHg med smärta och 130 efter en smärtstillande tablett
4. Brikanyl sänker blodtrycket, men ska bara användas på elever som har det föreskrivet. Mekanismen är oklar.
5. Om Johannesört-te ingår i studien så ska flickor upplysas om att p-piller påverkas av hypericin från johannesörten. Se läkemedelsverkets hemsida [www.mpa.se](http://www.mpa.se)

Mediciner som används vid förhöjt blodtryck	Mekanismer
1. Betareceptorblockerare sk. beta-blockerare sänker blodtrycket. Man skiljer mellan beta-1 (påverkar hjärtmuskulaturen) och beta-2 blockerare (påverkar i huvudsak bronkerna). De används idag mest för att skydda hjärtat mot stress, behandling efter hjärtinfarkt, förebyggande migrän och vid arytmier (rytmrubbningar).	Beta-blockerare hämmar reninutsöndringen från njurarna. Renin är ett enzym, som styr blodtryck och salt-vattenbalansen via peptiden angiotensin I, vilken i sin tur omvandlas av hormonet ACE till angiotensin II. Angiotensin är en mycket potent kärlsammandragande substans. Betablockerare har troligen också en positiv inverkan på CNS (centrala nervsystemet) genom att de påverkar hjärtats stressnerv.
2. Alfa-blockerare sänker blodtrycket	Alfa-blockerare blockerar receptorer för de sympatiska signalsubstansen noradrenalin och sänker blodtrycket genom att vidga blodkärlen.
3. Diuretika, urindrivande medel	Diuretika hämmar natriumupptaget och ökar utsöndringen av salt via njurarna. Blodvolymen minskar på kort sikt.
4. Kalciumantagonister har blodtryckssänkande effekt. De används för att behandla angina pectoris eller arytmier	Kalciumantagonister gör så att blodkärlen utvidgas och motverkar att kalcium kommer in i blodkärlen. Medlet borde kallas kalciumkanalblockerare.
5. ACE-hämmare står för Angiotensin Converting Enzyme. Påverkar blodtryckstegrande substanser i kroppen s.k. angiotensin II	ACE-hämmare hämmar enzymet angiotensin I att omvandlas till det blodtryckshöjande angiotensin II. Resultatet blir att blodkärlen inte drar ihop sig.

Kontrollerat av leg.läkare Hans-Erik Boiert

## Testa om blodtrycksförändringen är signifikant!

**Hur gör man en t-test på Excel?** Hypotesen är

$H_0$ : Det finns ingen skillnad mellan stickproven

$H_1$ : Det finns en skillnad mellan stickproven

1. Starta Excelprogrammet. Gå in på *funktioner* under *Infoga*. Välj *statistik* under *funktionskategori* och *t-test* under *funktionsnamn*.
2. Nu kommer det upp en skärm med fyra rutor att fylla i.

*Matris 1* Sätt in alla värden "före lakrits" alltså 106....84

*Matris 2* Sätt in alla värden "Efter lakrits" alltså 118...98

*Sida:* Skriv **2** (om man har en normalfördelning ska man ta bort 2,5% på båda sidorna vid 5% signifikansnivå)

*Typ:* Skriv **1** (det är samma person som man mäter före och efter)

OK

Avbryt

3. Tryck på **OK** Svaret ger sannolikheten för att värdeserierna är stickprov från samma normalfördelning. I detta fall förkastas  $H_0$  hypotesen Lakrits höjer signifikant blodtrycket. (Om  $p = 0,005$  så är det ingen signifikant skillnad ens på 95% nivån.)

### Primärvärden:

Person	Före lakrits		Efter lakrits		
	Övre	Undre	Övre	Undre	
1	106	56	118	70	P(t-test)= 4,90522E-05
2	112	82	120	86	
3	141	82	141	86	
4	116	78	128	86	
5	119	66	137	83	
6	130	84	144	98	
Medelvärde	120,7	74,7	131,3	84,8	

## Analys av lipider i äggula med TLC

Lipider spelar en väsentlig roll i allt levande och har många biologiska funktioner. De kan t.ex. var reservnärning, skyddande och vattenavstötande funktion (vaxer), strukturella lipider i membran, budbärare mellan vävnader s.k. steroidhormoner, vitaminer mm. Vid en hälsoundersökning kan man analysera halten blodfetter och kolesterol i blodet. Varken för höga eller för låga halter är bra.

**Uppgift:** Du ska separera lipiderna i äggula och identifiera dessa med några referenser. Lipider innefattar både lipofila och hydrofila ämnen. Neutrallipider och fosfolipider kan separeras med hjälp av tunnskiktskromatografi och lämpligt elueringsmedel.

### Material:

Lösning av äggula = 1 volym äggula och 5 volymer 5% NaCl-lösning.

2-propanol, petroleumeter (eller heptan),

Referenslösningar: 0,2% av lecitin, kolesterol, en triglycerid (veg.olja), alla lösa i petroleumeter.

Centrifug, TLC-platta (kiselgel) och kromatografikärl, kapillärrör

Mobilfas: petroleumeter: dietyleter: ättiksyra (75:25:1)

Framkallningsvätska: 5% ammoniumsulfatlösning

Ugn 150-160°C

**Riskbedömning:** Organiska lösningsmedel är brandfarliga.

### Utförande:

1. Tag 1 cm<sup>3</sup> äggulelösning och 1,5 cm<sup>3</sup> 2-propanol i ett litet centrifugrör med kork (helst skruvkork). Tillsätt 1cm<sup>3</sup> petroleumeter, skaka ordentligt och centrifugera isär faserna.
2. Klipp till en kiselgelplatta som passar kromatografikärlet. Markera en svag linje ca 1-2 cm från kanten och markera för 4 fläckar. Gör i ordning kromatografikärlet med den rörliga fasen och låt jämvikt inställt sig.
3. Tag ca 10 µl av äggulelösningens övre fas (petroleumeter) med ett kapillärrör och applicera på tunnskiktspattan. Sätt på referenserna lecitin, kolesterol, och triglycerid. Sätt ner plattan i kromatografikärlet.
4. Markera vätskefronten och torka plattan i dragskåp. Spraya på 5% ammoniumsulfatlösning eller påför försiktigt med en pipett. Placera plattan i ett värmeskåp för framkallning i ca 30 minuter. Kontrollera då och då. för bästa framkallning Räkna ut R<sub>f</sub>-värden.
5. Vilka lipider finns i äggula. Vilken finns det mest resp. minst av? Varför har ämnena olika R<sub>f</sub>-värden. Titta på formlerna och ge en förklaring.

---

**Till läraren:** Det kan vara svårt att framkalla fläckarna om plattan ligger direkt på en ugnsplåt. Sätt in några porslinsdeglar i ugnen som tunnskiktspattorna kan ligga på. Lecitin rör sig inte mycket, kolesterol kommer halvvägs och triglyceriderna finns längs fronten.

R<sub>f</sub>-värden i heptan:dietyleter:ättiksyra

R<sub>f</sub> (lecitin)= 0,21

R<sub>f</sub> (kolesterol)=0,64

R<sub>f</sub> (triglycerider)=1,0

Försök från [www.mnsfld.edu](http://www.mnsfld.edu)

## Framställning av salvor

### Tillverka en salva (recept från farmakologen i Uppsala)

Vid Uppsala universitet utbildas farmaceuter och apotekare. Apoteken har alltid använt latin som yrkesspråk, varför vissa kemikalier får andra namn än vad som står i en kemibok. Recepten nedan är skrivna för blivande apotekare. Prova att tillverka två olika salvor. En emulsionssalva är en s.k. nattkräm och är fetare än en lösningssalva. Man har en kallberedning och en varmberedning. Lösningssalvan här nedan är mjukgörande och kan användas som en fotkräm. Din lärare talar om för dig vilken salva du ska göra och hur mycket du ska väga in.

**Framställning av en emulsionssalva** kan göras på två olika sätt. Det beror på vid vilken temperatur faserna blandas.

### A Kallberedning. Vattenfasen inarbetas i fettfasen vid rumstemperatur

		Invägd mängd
Sorbitani oleas	1,25 g	_____
Vaselinum album	23,75 g	_____
Aqua purificata	25 g	_____

#### Tillverkningsgång:

1. Väg in sorbitani oleas (sorbitanoleate, Span 80, v/o-emulgator) i den skål (mortel med pistong) som salvan ska tillverkas i. Arbeta in vaselinum album (vitt vaselin) i skålen med exempelvis en pistill. Dela upp vaselinet på ett par omgångar så att emulgatorn blir väl inblandad.
2. Arbeta in vattnet i små portioner, det är svårt att arbeta med för stora portioner

**B Varmberedning.** Den till ca 60 - 70°C uppvärmda fettfasen försätts med den till samma temperatur värmda vattenfasen och blandningen omröres, tills salvan svalnat - särskilt effektivt då stelandet börjar. Det finns risk för brännskador vid hanteringen

		Invägd mängd
Sorbitani oleas	1,25 g	_____
Vaselinum album	23,75 g	_____
Aqua purificata	25 g	_____

#### Tillverkningsgång:

1. Väg in sorbitani oleas i den skål som salvan ska tillverkas i
2. Väg in vaselinum album i samma skål
3. Väg upp vattnet i en separat skål
4. Värm båda faserna till 65-70°C
5. Häll vattnet ner i fettfasen och blanda med pistill till dess att salvan blir homogen och halvfast

### Framställning av lösningssalva

		Invägd mängd
Ureum	2 g	_____
Natrii chloridum	1,2 g	_____
Essex kräm	36,8g	_____

#### Tillverkningsgång:

1. Väg upp Essex kräm i den skål som salvan ska tillverkas i
2. Väg upp ureum (=karbamid, urea) och blanda ner i krämen
3. Väg upp natrii chloridum (koksalt) och blanda ner i krämen
4. Salvan blandas till dess att man känner att det inte finns några fasta substanspartiklar kvar

**Till läraren:**

Den första salvan är en fet kräm, en nattkräm medan den andra är en fuktighetsbevarande kräm, en dagkräm. I detta fall innehåller den salter och är en användbar fotkräm.

**En emulsionssalva**

Köp vitt vaselin (Vaselinum album, kan köpas på Apotek) och Span 80 (Sorbitani oleas, kan köpas hos kemikalieleverantör). Det är viktigt att man använder rätt emulgator: Span 80 är en v/o, vatten i olja medan Tween 80 är o/v, olja i vatten. Det är omöjligt att arbeta in vatten (Aqua purificata ) i en Tween o/v salvabas.

**Emulgatorer**

Span (Sorbitani oleas) och Tween (Polysorbatum) är icke-joniska ytaktiva föreningar av komplexa estrar och etrar av sorbitol och fettsyror.

Span innehåller även polyoxyetylen kedjor. Span är lösligt i metanol, flytande paraffin och i oljor, men nästan olöslig i vatten och etanol.

Tween är lös i vatten, metanol och etanol men olöslig i oljor och flytande paraffin.

**En lösningssalva**

Essex kräm är en o/v (olja i vatten) emulsionssalva med ca 28 % fetthalt och ca 70 % vattenhalt. Karbamid (Ureum) och natriumklorid (Natrii chloridum ) löser sig mycket lätt i vattenfasen.

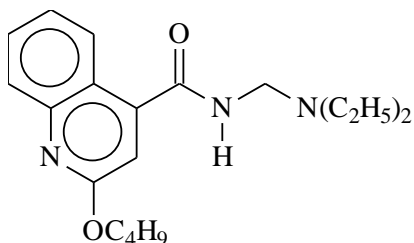
Detta är en fuktighetsbevarande kräm som t.ex. den registrerade krämen Fenuril. Lämpar sig för eleverna att ta med hem och spara. Tillsätt litet parfym för att göra den personligare. På apoteken vill man inte tillsätta parfym. Man vill plocka bort alla onödiga tillsatser som ev. kan ge upphov till allergiska reaktioner. Parfym: Tag t.ex. rosenvatten, mentol eller annan doft som kan köpas i hälsokostaffärer (massageoljor).

För att öka hållbarheten tillsätt metylparahydroxybensoat till 0,1 %.

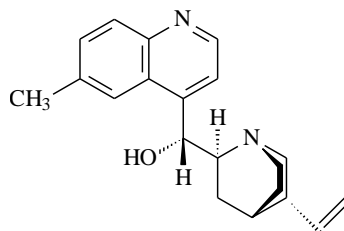
Av Christin Magnusson, Inst. för Farmakologi Uppsala

## Hur fungerar EMLA-kräm eller EMLA plåster

Tänk dig att du ska få en spruta och du inte känner sticket!! Det är möjligt genom att använda ett lokalanestetikum (ett bedövande medel) som består av bland annat lidokain. Anestetika är ett samlingsnamn för bedövningsmedel.



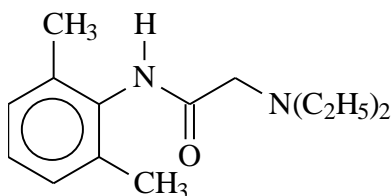
Cinkokain



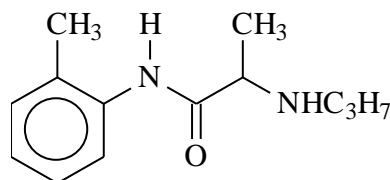
Kinin

Redan på 1600-talet använde Peruanska kvinnor barken från kinaträdet *Cinchona ledgeriana* som smärt- och febernedsättande medel. Kunskapen om kinabarkens effekter överfördes till Europa genom spanjorerna. Nu vet man att cinkokain från barken verkar lokalbedövande och kinin har en febernedsättande effekt. Idag används kinin mest som profylax (förebyggande eller förhindrande medel) mot malaria.

Det var två svenska kemister, Nils Löfgren och Bengt Lundquist, som på 1940-talet syntetiserade (tillverkade) lidokain (även känt som xylokain). Lokalbedövningsmedlet EMLA, som finns både som plåster och kräm, innehåller förutom lidokain även prilokain. Studera strukturformlerna och se likheterna och även olikheterna mellan cinkokain, prilokain och lidokain.



Lidokain



Prilokain

**Experimentet:** Du ska lägga upp ett experiment som testar EMLAS egenskaper som lokalanestetika. Gör själv din försöksplan, dvs hur du ska göra för att testa EMLAS effekt. Här får du några tips men du får själv välja. Visa upp planen för din lärare innan du startar. EMLA krämen eller plåstret sättes på huden. Låt verka ca 30 minuter-1 timme. Vid full effekt ska du inte känna någon smärta eller åtminstone ha en reducerad smärtupplevelse, där EMLA är applicerat. Lokalbedövningen ska hålla i sig i ca 2-4 timmar. Det betyder att du har ingen känsel på det stället och kan inte känna smärta.

Du kan variera

1. Tiden eller mängden (kräm) och/eller på olika ställen på huden
2. Testa beröring, kyla och värme
3. Testa smärtan med olika föremål (sticka, trubbigt föremål, nål mm)
4. Ta en kräm som inte innehåller EMLA och testa placeboeffekten genom att göra ett dubbelt blindtest. Eller tag två plåster som liknar varandra - ett med EMLA och ett utan.

### Till läraren:

**Riskbedömning:** Elever som tidigare varit överkänsliga mot lokalbedövningsmedel och elever som äter sulfapreparat ska inte använda EMLA.

EMLA ska inte användas på slemhinnor, nära ögon, på skadad hud eller på eksem.

I ögon ska EMLA sköljas bort med ljummet vatten. EMLA påverkar inte reaktionsförmågan.

Om plåstret sitter på under 1-2 timmar varar bedövningen ytterligare minst 2 timmar efter det att plåstret tagits bort.

Vid användning av plåster: Tag bort skyddsfilmerna och vidrör inte den runda vita ytan som innehåller EMLA. Undvik att trycka på mitten av plåstret då detta medför att EMLA sprids ut till plåstrets fästande kanter. Sätt fast på ren torr hud.

**Biverkningar enligt Fass:** 1 person på 100 kan få en rodnad och/eller svullnad på den behandlade huden. Mindre vanligt även klåda.

**Så här syntetiseras Lidokain**, ett lokalanestetikum:

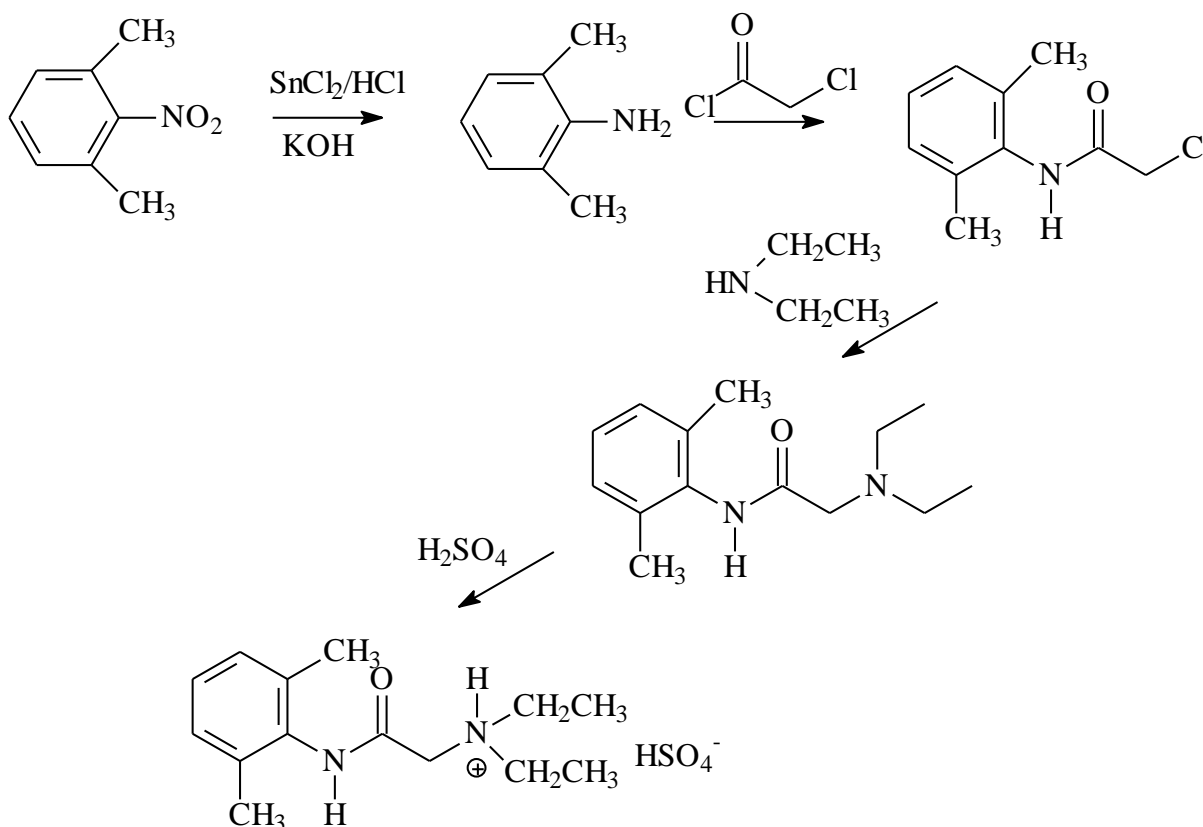
Syntesen sker i fyra steg.

Steg 1. Reduktion av en aromatisk nitrogrupp till amin med tenn(II)klorid i syra.

Steg 2. Acylering av en aromatisk amin med en syraklorid

Steg 3. Nukleofil substitution av en primär alkylhalid med en sekundär amin.

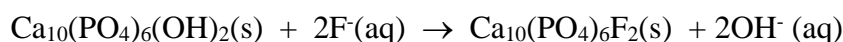
Steg 4. Lidokain isoleras som vätesulfat.



## Vad gör fluor med tanden?

**Teori:** Man vet att fluoridjonen skyddar tänder men man vet inte mekanismen hur. Det kan vara en av följande förklaringar eller en kombination av förklaringar:

1) Emaljen på dina tänder består till 97% av hydroxyapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Vid närvaro av fluoridjoner kommer några av hydroxidjonerna i yttersta emaljlagret att bli utbytta mot fluoridjoner och bilda fluorapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ . Processen kallas jonbyte och beskrivs med följande reaktionsformler. Fluorapatit är hårdare och kan stå emot korrosion av syra bättre än hydroxyapatit



2) Äggskal och kalksten består liksom tandbenet (under emaljen) av kalciumkarbonat,  $\text{CaCO}_3$ . Om jonbyte sker även här, så skulle kalciumfluorid bildas,  $\text{CaF}_2$ . En annan möjlighet är att fluorid helt enkelt adderas till ytan.

3) Bakterier bryter ner kolhydrater till syror. Syror har en karaktäristisk reaktion med karbonater: Fluoridjoner minskar den totala bakterieproduktionen.



### Riskbedömning:

Natriumfluorid är toxiskt. När du tar i äggskalen som legat i fluoridlösning skall du använda en pincett. **Doppa inte ner fingrarna i natriumfluoriden.** Fluoridjoner tillsammans med syra bildar mycket giftig gas (HF). Lösningar av natriumfluorid slängs i destruktionsflaskor. Använd glasögon och förkläde.

### Material:

Lösningar av natriumfluorid  
(1, 0,5, 0,25 mol/dm<sup>3</sup>)  
1,0 mol/dm<sup>3</sup> ättiksyra  
Äggskal minst tre bitar

Pincett  
Bägare  
Klocka  
Våg (mg-våg)  
Ev. Hårtork



### Utförande:

1. Tag minst tre, ungefär lika stora äggskalsbitar.
2. Behandla två skal enligt följande. Antingen studerar du tidens eller koncentrationens inverkan på äggskalen. Använd pincett när du lyfter äggskalen från fluoridlösningen!

*Tiden:* Lägg två äggskal i 1 mol/dm<sup>3</sup> natriumfluoridlösning. Låt det ena ligga i 5 minuter. Plocka upp äggskalet och skölj i vatten. Det andra äggskalet får ligga i 10 – 20 minuter. Anteckna tiden. Har du flera äggskal kan du variera tiderna på ett lämpligt sätt!

*Koncentration:* Lägg skalen i natriumfluoridlösningar med olika koncentrationer i 10 minuter. Tag upp skalen och skölj i vatten.

3. Lägg de behandlade och det obehandlade skalen i ättiksyralösningen. Registrera skillnaderna i antal bubblor och storlek på bubblorna på behandlade och obehandlade äggskal. Har fluor någon effekt?

### Laborationen kan utökas med följande:

**Om du har tid** så kan du även studera viktnedgången hos skalorna för de olika behandlingsmetoderna. Till detta behöver du en mycket noggrann våg. Gör upp en plan. Visa din lärare!

4. Studera skillnader mellan frekvens bildade bubblor. Ju längre skalorna ligger i natriumfluoridlösningen desto tydligare blir resultaten. Kortaste tiden är 15 minuter.
5. Skalorna tar upp vatten under behandlingen. Därför måste skalorna torkas innan vägning. Torka skalorna försiktigt med en hårtork eller i värmeskap. Väg! Räkna ut den procentuella förändringen med och utan behandling!
6. Försök att studera skillnaderna i skörhet hos de olika äggskalorna. Studera hur stort tryck som äggskallet tål innan det krossas. Lägga på vikter eller något annat på skalorna.
7. Skriv en rapport. Fundera på felkällor i experimentet

---

### Till läraren:

Som introduktion kan man borsta utsidan på ett äggskal med tandkräm som innehåller fluor och stoppa ner det i en svag ättiksyralösning. De bildade bubblorna på ett obehandlat äggskal och det behandlade skalet visas på en overhead-projektor. Testa själv först hur länge/hur mycket tandkrämen måste på innan fluoren visar någon effekt! Tandkräm innehåller inte mycket fluor.

**Laborationen:** Det syns en tydlig skillnad mellan behandlat och obehandlat äggskal. Massskillnaderna är däremot mycket små och det krävs en noggrann våg för att registrera dem. På de bruna äggskalorna syns bubblorna på obehandlade skal tydligare än på vita skal. Det syns inga bubblor alls på de behandlade bitarna under de första minuterna.

När äggskalorna läggs i en vattenlösning sugas vatten upp i skalet och det är svårt att omedelbart mäta viktsändringar under försökets gång. Om man vill registrera ändringarna så måste skalorna torkas med hårtork eller i värmeskap före och efter försöket. Man kan även låta äggskalorna lufttorka och väga nästa gång.

Om man tar bort det inre skinnet på ägget (medan det är färskt), så kan man *dränka* hela skalet i lösningarna. Man får då större yta som behandlas och snabbare resultat. Det är dock svårare att torka på insidan av skalet utan att skalorna går sönder.

**Resultat: Procentuell viktändring/ g äggskal.** Om inget anges har äggskalorna "flutit" i lösningarna

Minuter i 1 M NaF	Obehandlat 0	obehandlat 0	Behandlat 5	Dränkt 10	Behandlat 20
Minuter i 1 M HAc	30	Dränkt 20	30	Dränkt 25	15
Tot % minskning	5,7	7,6	2,8	1,3	0,26
%minskning/ tid i HAc	0,19	0,38	0,093	0,052	0,018

Det tar ca 4-5 gånger så lång tid att fräta sönder ett äggskal i ättiksyra som behandlats med natriumfluorid jämfört med utan denna behandling. Så "Fluortanten" gjorde nytta!

Dental Chemistry analogy

## Hur fungerar ett bulkmedel och vilka fibrer är bäst på att absorbera vatten?

**Teori:** Tarmen fungerar som ett osmotiskt membran. Maten från magsäcken går genom tolvfingertarmen ner till tunntarmen och tjocktarmen. Tunntarmen är ca 2 meter lång och där ska maten absorberas. Fibrer rekommenderas mot obstipation (förstoppning) och som kosttillskott.

### Vi behöver äta mycket fibrer eller bulkmedel för att -

- 1 - de lösliga delarna i maten ska få lagom konsistens så att de lätt kan absorberas från tarmarna.
- 2 - stimulera tarmrörelser så att det inte tar för lång tid för maten att passera genom tarmen.
- 3 - vi ska få en mättnadskänsla, inte äta för mycket och gå upp i vikt.

Om man inte får i sig tillräckligt med fibrer, så kan man äta ett bulkmedel som innehåller mycket fibrer. Ett sådant är Vi-siblin som innehåller fibrer från växten *Testa ispaghula*

### Utförande:

1. Välj ut vilka ämnen du vill jämföra. Se förslag nedan.
2. Klipp 10 – 15 cm av en dialysslang till varje ämne som ska testas. Blöt upp dialysslangen i vatten. Sätt på en påsförslutare eller knyt en knut i ena änden. Öppna den andra änden.
3. Väg upp 1 g av ”testämnet” och stoppa in i den dialysslangen. Förslut andra änden av dialysslangen. Se till att all luft pressas ut ur slangens annars flyter dialysslangen upp.
4. Väg slangarna och testämne. Anteckna värdet. Stoppa slangarna i en bägare med vatten. Låt stå tre dygn och väg dialysslangarna varje dag.
5. Jämför vikterna på dialysslangarna. Dra slutsatser om vilket ämne som fungerar bäst som bulkmedel (drar åt sig mest vatten)

### Förslag till ämnen som är bra att testa:

- Vi-siblin, Lunelax eller liknande bulkmedel (går att köpa på apotek)
- Cellulosa
- Dextrin, en enzymatiskt hydrolyserad stärkelse ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>. H<sub>2</sub>O
- Potatismjöl
- Vattenlösligt stärkelse består av amylopektin (kokt eller okokt)
- Mortlat (sönderdelat) havregryn
- Kli av olika slag
- Krossade linfrön
- Physalisfrön
- Laktulos, Laktitol, Laktiplex (tarmreglerande medel)

### Till läraren:

Vi har testat 1 g av följande ämnen. Den procentuella förändringen redovisas.

Ämne/ Vikt	%-förändring efter ett dygn	%-förändring efter två dygn	%-förändring efter tre dygn
Vi-Siblin	24	34	37
Dextrin	29	26	
Cellulosa	0	0	1
Havregryn	0	6	8
Potatismjöl (okokt)	0	2,5	2

- Cellulosa är en kolhydrat med  $\beta$ -glykosid bindning som människor inte kan bryta ner.
- Dextrin eller stärkelsegummi är en nedbrytningsprodukt av stärkelse som tillverkas genom upphettning av eller hydrolys med enzymer av omodifierat stärkelse. Det är ett vitt luktlöst pulver. Kan representera halvt nedbruten stärkelse.
- Dextran är en polysackarid med hög molmassa som produceras av bakterier (oftast av *Leuconostoc*) från sackaros. Dextran används vid gelfiltrering.
- Amylos är vattenlöslig stärkelse. Långa raka  $\alpha$ -glykosidiska bindningar mellan glukos.
- Amylopektin är grenat och liknar glykogen, vattenolösligt. Potatismjöl innehåller mycket amylopektin. Amylopektin tar upp mycket vatten (sväller) över gelatineringstemperaturen. Detta sker när potatismjöl används till kräm eller sås.
- Havregryn innehåller  $\beta$ -glukaner.  $\beta$ -glukaner är polysackarider, som bygger upp stärkelsekornets cellväggar i frövitarna och har en positiv effekt på tarmens funktion och kan bland annat motverka förstoppning. Säger sänka halten blodfetter.
- Laktulos, Laktitol, Laktiplex är handelsnamnen för laktulos och består av en icke naturlig disackarid. Laktulos absorberas inte i tarmen utan bryts ner till organiska syror, främst mjölksyra. Syrorna binder vatten och åstadkommer en bulkeffekt. Används även som sötningsmedel. Laktulos i högre doser har en laxerande effekt och används även som laxermedel
- Kli av olika slag består av fibrer (cellulosa)
- Krossade linfrön består av fibrer (cellulosa)
- Physalisfrön säljs i hälsokostaffärer som ett bulkmedel.

## Kolorimetrisk bestämning av kalcium i serum eller urin

**Teori:** Kalcium är viktig beståndsdel i skelettet och finns där i form av kaliumfosfat och hydroxiapatit. Kalciumjonen deltar i nerv- och muskelfunktioner och i blodets koagulation. Dagsbehovet är ca 1g. Omsättningen styrs av bla D-vitamin. Vid sjukdomstillstånd som angina pectoris, högt blodtryck och hjärtarytmier finns för höga halter kalcium i blodet. Då används kalcium-antagonister, som minskar cellmembranens genomsläpplighet för kalcium, och dämpar hjärtats syrebehov.

**Principen:** Kolorimetrisk bestämning av halten kalcium i plasma eller i urin utan föregående borttagning av proteiner. Metyltymolblått är indikator. Då magnesiumjoner kan påverka reaktionen elimineras dessa med 8-hydroxyquinolin upp till en koncentration av 4 mmol/cm<sup>3</sup>

**Riskdömning:** Ögonskydd och skyddshandskar. Monoetanolamin är hälsoskadligt, irriterar ögon, andningsorgan och hud, 8-hydroxyquinolin är farligt vid hudkontakt och förtäring.

<b>Standard</b>	Kalciumjoner (Ca <sup>2+</sup> )	2,5 mmol = 100 mgCa <sup>2+</sup> = 278 mg CaCl <sub>2</sub> /1dm <sup>3</sup> dest.vatten
<b>Reagens 1</b> Färgreagenet blandas till 1 dm <sup>3</sup> dest.vatten	Metyltymolblå	80 mg
	8-hydroxyquinolin	1,6 g
<b>Reagens 2</b> Alkalisk reagens pH >11	Monoetanolamin (= 2-aminoetanol)	200 cm <sup>3</sup> /dm <sup>3</sup> dest.vatten

### Provmängd:

**Serum:** 5 cm<sup>3</sup> blod centrifugeras och serumet tas till vara

**Urin:** Späds ut med 1/3 med destillerat vatten (till 4 cm<sup>3</sup> urin tillsätts 2 cm<sup>3</sup> dest.vatten). Justera pH till 3-4 med HCl. Vid beräkning ta hänsyn till utspädningen!

**Utrustningen:** Glasvaror som används ska vara rena.

**Reagensen** ska förvaras i 2-8°C och håller sig stabila i ett år. Reagensen ska ha rums-temperatur vid användning. En blandning av lika mängd reagens 1 och 2 är stabil i ca 4 h.

**Färgförändringen** är stabil i 1h. Absorbansen är linjär till 3,75 mmol/dm<sup>3</sup> eller 150 mg/dm<sup>3</sup>

Utförande:	Blank - nollställ spektrofotometern!	Referenser: motsvarar 10-100 mg Ca <sup>2+</sup> /dm <sup>3</sup>	Prov
<b>Blodprov/urin</b>			50µl
<b>Standard</b>		5 – 50 µl	
<b>Reagens 1</b>	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5 cm <sup>3</sup>
<b>Reagens 2</b>	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5 cm <sup>3</sup>
<b>Blandas väl och mäts vid 612 nm (Hg lampa) efter 1 minut</b>			

**Beräkningar:**  $\frac{A_p}{A_s} * n$

A<sub>p</sub> = Absorbansen i provet

A<sub>s</sub> = Absorbansen i standarden

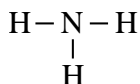
n = koncentrationen i standarden i mmol/dm<sup>3</sup> (eller mg /dm<sup>3</sup>)

**Normalvärde i serum:** 2,2-2,55 mmol/dm<sup>3</sup> vilket motsvarar 88-102 mg/dm<sup>3</sup>

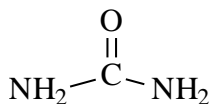
Laborationen kommer från BioMerieux (Labora)

## Kväveutsöndring

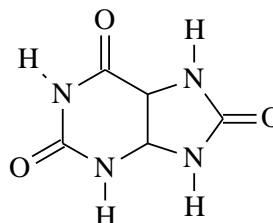
**Teori.** Protein i maten bryts ner i cellerna till koldioxid och vatten, men det kväve som inte återanvänds måste utsöndras. Det finns olika möjligheter och beror på i vilken omgivning djuret/organismen lever. Kvävet kan avges som ammoniak, urinämne eller urinsyra. Du ska studera löslighet, pH förändring i en vattenlösning, ta fram värden för toxicitet och beräkna kväveinnehållet för de tre olika kväveföreningarna.



Ammoniak



Urea (karbamid)



Urinsyra

### Utförande:

1. Märk fyra centrifugrör 1,2,3 och 4 och tillsätt 2 cm<sup>3</sup> dest.vatten i varje rör. Väg och anteckna vikterna!
2. I provrör **1** tillsätts urea (karbamid), lite i taget tills inget mera löser sig. Väg röret igen. Räkna ut hur många g urea som löst sig i 2 cm<sup>3</sup>.
3. Upprepa samma sak med urinsyra i provrör **2**.
4. Bestäm pH på de båda lösningarna provrör **1** och **2**.
5. I provrör **3** tillsätt så mycket kväve i form av ammoniak som du kunde lösa urea i provrör 1. Mät pH på ammoniaklösningen.
6. I provrör **4** görs samma sak men med urinsyran.
7. Räkna ut hur många % kväve som finns i ammoniak, urinsyra och urea. Fyll i följande tabell. Dra slutsatser på olika djurslags kväveutsöndring och levnadssätt.

Ämne	Mängd ämne som löst sig i 2cm <sup>3</sup>	pH i lösningen	% Kväve i ämnet	g kväve/2cm <sup>3</sup>
<b>1.</b> Urea				
<b>2.</b> Urinsyra				
<b>3.</b> Ammoniak				
<b>4.</b> Ammoniak				
<b>Ta reda på</b>	<b>Toxicitet</b>	<b>Löslighet enl litt.</b>	<b>Djurslag som använder-</b>	
Urea				
Urinsyra				
Ammoniak				

**Till läraren:**

Ämne	Mängd ämne som löst sig i 2cm <sup>3</sup>	pH i lösningen	% Kväve i ämnet	g kväve/2cm <sup>3</sup>
1.Urea	tot. ca 2g	pH = 7	$(2 \cdot 14) / 60 = 47\%$	$2 \cdot 47\% = 0,93 \text{ g}$
2.Urinsyra	Endast lite löser sig	Neutralt pH	$(4 \cdot 14) / 168 = 33\%$	~0
3.Ammoniak	tag ca 1,3 g NH <sub>3</sub>	pH =12	$14/17 = 72\%$	0,93 g
4.Ammoniak	inget!			

Ämne	Toxicitet	Löslighet enl litt.	Djurslag som använder
Urea	100-25% miljöskadligt	1000g/dm <sup>3</sup>	Människa och övriga däggdjur, vuxna amfibier, hajar
Urinsyra	Inget värde	Svårslösligt	Fåglar, reptiler
Ammoniak	Gas 18ng/m <sup>3</sup> 100-25% miljöfarligt 3 mol/dm <sup>3</sup> är irriterande	Konc. 18 mol/dm <sup>3</sup>	Vattenlevande djur såsom benfiskar, larver till amfibier (som NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )

[www.mnsfld.edu/dganong/201.html](http://www.mnsfld.edu/dganong/201.html)

## Mineralmetabolism; kellation

**Teori:** Det är viktigt för alla organismer att kunna behålla mineraljoner i vissa halter. Därför finns det kelatbindare (metallbindare). En artificiell (konstgjord) kelatbindare är EDTA. Testa följande system och se likheter med kroppens kofaktorer, koenzymmer och prostetiska grupper.

**Riskbedömning:** Liten risk.

**Material:** 0,1 mol/dm<sup>3</sup> kalciumklorid,  
0,1 mol/dm<sup>3</sup> kopparsulfat  
0,5 mol/dm<sup>3</sup> EDTA,  
1 mol/dm<sup>3</sup> natriumcitrat,  
1 mol/dm<sup>3</sup> natriumkarbonat,  
1 mol/dm<sup>3</sup> natriummalat (saltet av äppelsyra)  
1 mol/dm<sup>3</sup> natriumfumarat, (saltet av fumarsyra)  
de två sista är båda butendioater

### Utförande:

Till 5 rör tillsätts följande ämnen

Rör	Kalciumjoner	Tillsätt 10 droppar av	Sen 1 droppe	Observation
1	1cm <sup>3</sup> 0,1 M CaCl <sub>2</sub>	vatten	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
2	1cm <sup>3</sup> 0,1 M CaCl <sub>2</sub>	0,5 M EDTA	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
3	1cm <sup>3</sup> 0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1M Na-citrat	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
4	1cm <sup>3</sup> 0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1 M Na-malat	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
5	1cm <sup>3</sup> 0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1 M Na-fumarat	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	

### Extra uppgift

Upprepa försöket med 1 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> CuSO<sub>4</sub>. Gör en tabell och skriv in dina observationer

### Svara på följande frågor:

1. Du känner säkert till att kalciumkarbonat är ett svårslösligt salt, men varför bildas det inte i alla rör?
2. Vilken jon, koppar eller sulfat, ger upphov till den blå färgen? Och vilken effekt har kelatjonen på kopparjonens initiala blekblå färg.
3. Skriv formeln av butendioaterna (salterna), malat och trans-fumarat. Studera skillnaden och försök att förklara kelatbildningen med de olika formerna.

**Till Läraren:** *Kofaktor* = oorganiska joner t.ex.  $\text{Fe}^{2+}$  eller en komplex organisk eller metallorganisk molekyl (koenzym).

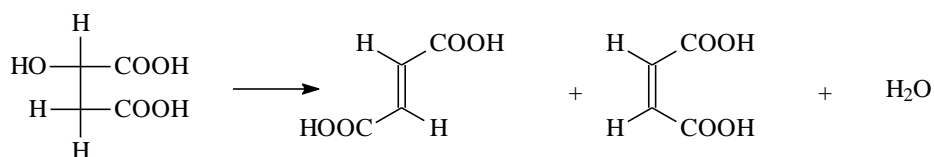
*Prostetisk grupp* = metalljon eller koenzym som är kovalent bundet till enzymet

Rör	Kalciumjoner	Tillsätt 10 droppar	Sen 1 droppe	Observation
1	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CaCl}_2$	vatten	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Fällning av $\text{CaCO}_3(\text{s})$
2	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CaCl}_2$	0,5 M EDTA	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Ca-jonen är komplexbunden
3	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CaCl}_2$	1M Na-citrat	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	-"-
4	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CaCl}_2$	1M Na-malat	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	-"-
5	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CaCl}_2$	1M Na-fumarat	1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Fällning av $\text{CaCO}_3$

### Extra uppgift

6	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CuSO}_4$	vatten	Ljusblått
7	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CuSO}_4$	0,5 M EDTA	Djupblå lösning
8	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CuSO}_4$	1M Na-citrat	Djupblå lösning
9	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CuSO}_4$	1 M Na.malat	Djupblå lösning
10	1cm <sup>3</sup> 0,1 M $\text{CuSO}_4$	1 M Na-fumarat	Ljusblått

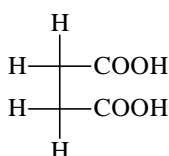
Ett exempel på geometrisk isomeri är äppelsyrans reaktion vid uppvärmning.



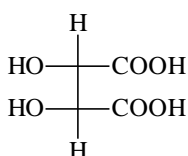
Äppelsyra

Fumarsyra

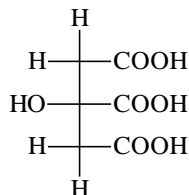
Maleinsyra



Malonsyra  
(Malonat)



Vinsyra  
(Tartrat)



Citronsyra  
(Citrat)

Det finns människor som ansamlar kopparjoner och får på så sätt en kopparförgiftning. De får då äta en liten dos av penicillin varje dag som botemedel. Penicillin komplexbinder kopparjoner. Försök om du har tillgång till penicillin att undersöka om komplexbindningen fungerar. Alla sorter fungerar inte! Medicinen Desferal (desferrioxamin) används vid akut järnförgiftning och binder med hög affinitet järn och andra tvåvärda metalljoner.

[www.mnsl.edu](http://www.mnsl.edu)

## Vad händer med olja på vägen till och genom tarmen?

### - Undersök och fundera!

Fundera på följande begrepp. Repetera det du inte kommer ihåg eller känner dig osäker på  
Hydrofil-Hydrofob

Lipofil-lipofob

Primär bindningar: Kovalent bindning, jonbindning

Sekundär bindningar: vätebindningar, dipol-dipolbindningar, jon-dipolbindning, van der Waals-bindning och hydrofob interaktion

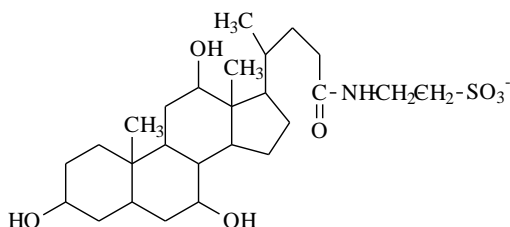
Emulsion = två vätskor som inte är lösliga i varandra (finns i form av små droppar) t ex gravlaxsås eller majonnäs

Suspension = en vätska och en fast fas t.ex. lera och vatten

Aggregation = aggregering av molekyler med svagare växelverkan än kovalenta bindningar

Emulgeringsmedel :ex tvål, äggula (lecitin), syntetiska detergent (SDS) eller naturliga gallsalter såsom taurocholat eller taurocholsyra.

I hårt vatten (innehåller  $\text{Ca}^{2+}$  och  $\text{Mg}^{2+}$ ) faller fettsyror ut som svårslösligt salt



Taurokolinsyra<sup>-</sup> ett gallsalt

Laddad fettsyra

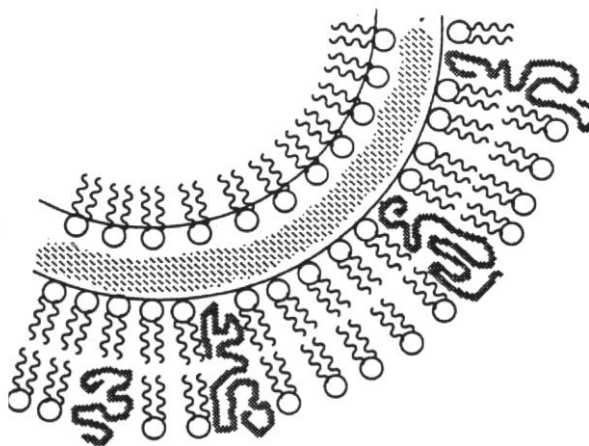


## Lipider

a) *neutralfett* (kallas också *triglycerider*) Ett neutralfett är bara lösligt i opolära lösningsmedel. Fettet kan genomgå en sur hydrolys (jämvikt) eller basisk hydrolys (förtvålning). De laddade fettsyror är lösliga i vattensystem, medan de i oladdad form är olösliga i vatten men de är lösliga i organiska lösningsmedel.

b) *fosfolipider* har en polär grupp som gör att de är vattenlösliga.

Triglyceriderna är omgivna av ett membran med fosfolipider. De ordnar sig runt fettkulorna med den hydrofoba molekyldelen inåt. Den hydrofila delen av molekylen kan attrahera vatten. Mellan detta monomolekylära skikt och ett bimolekylärt skikt hålls vatten. Det bimolekylära skiktet kan vända de hydrofila grupperna utåt. Fettkulans yta blir hydrofil och den kan sväva fritt i vattenlösningen.



Lipider i vatten kan bilda 3 olika typer av aggregat:

1. Miceller är relativt små kompakta sfäriska strukturer med flera dussin till tusentalet molekyler arrangerade så att deras hydrofoba del riktas mot mitten och deras hydrofila huvud utåt mot ytan. Micellen löses lätt upp i ett ytspänningsnedsättande medel som tvål, diskmedel och dylikt.
2. Bimolekylärt skikt "Bilayer" (dubbellager i två dimensioner = area) är två polära lipidlager som lagt sig intill varann med fettdelarna mot varandra. Det sker lättast då lipidernas huvud och svans är lika stora
3. En tredje form är liposomen. Den bildas när ett "bilayer" viker runt sig självt och formar en ihålig sfär som en ihålig tennisboll Liposomer bildas vid neutralt pH.

### **Nu är du beredd för din uppgift:**

Du får ut en fettsyra och ett fett (vanlig matolja) som du ska testa i olika vattensystem. Har du egna funderingar, gör upp en plan och testa även detta.

### **Frågeställningar**

1. Vad händer med fett och fettsyror i magsäcken som har ett pH på ca 1,5? Testa lösligheten av ett fett och en fettsyra med saltsyra.
2. Vad händer när lipiderna når början av tolvfingertarmen (ca pH= 9).
3. Vad händer i slutet av tolvfingertarmen när fettsyrorna möter gallsyrorna från levern? Tillsätt en gallsyra t.ex. natriumtaurocholat eller en tvållösning.
4. Testa vad som händer lipiderna med kalcium- eller magnesiumjoner (hårt vatten).
5. Teoretisk uppgift: Tarmens väggar består av många celler med stor yta. Cellmembranet är uppbyggt av fosfolipider. En emulsion har lättare att tränga in i celler för vidare transport till blodet. När absorberas lipiderna lättast?

**Rapport:** Beskriv hur du har lagt upp försöken och diskutera vad som händer vid de olika stegen. Använd begrepp som hydrofil, hydrofob, pH, emulsion, micell, liposom och lipidmembran. Begreppen ska komma in i diskussionen. Knyt an till många biologiska, tekniska och vardagliga fenomen i din beskrivning.

## Till läraren:

Detta skriver professor Sven Engström vid Chalmers Tekniska högskola, Institutionen för Material och ytkemi, och som har gett idén till labben.

"Bajslabben" eller snarare "en droppe matoljas öde i tarmen" fordrar eftertanke. De flesta elever förknippar kemi med kemiska reaktioner av mer traditionellt slag och inte att det också handlar om aggregering av molekyler med svagare växelverkan än kovalenta bindningar. Kort sagt, så tillverkar eleverna ett antal blandningar av lipider i vatten. Systemen får vara modeller för fettnedbrytningens olika komponenter i tarmen (triglycerid, monoglycerid, fettsyra). pH varierades

Om man sätter till gallsalt, t ex natriumtaurocholat, till provrören finfördelas eller löser sig lipiderna. Hela andemeningen med försöket är att visa att den olösliga matoljan, via nedbrytning till monoglycerider och fettsyror, överförs i en mer löslig form med hjälp av hydrolys och gallsalter. Begrepp som emulsion, liposom/vesikel, micell, lipidmembran kommer in i diskussion och knyter an till många biologiska, tekniska och vardagliga fenomen.

1. Fettsyra	+ vatten		liposomer
2. Fettsyra	+ H <sup>+</sup>	Grumligt, fällning	Ej lösligt
3. Fettsyra	+ OH <sup>-</sup>	Simmig	lösligt
4. Fettsyra	+ OH <sup>-</sup> + gallsyra	Simmig	Lösligt, grönfärgas av gallsyra
5. Fett	+ vatten		Bildar emulsion vid skakning
6. Fett	+ H <sup>+</sup>	Ej lösligt	
7. Fett	+ OH <sup>-</sup>		Hydrolyseras med tiden
8. Fett	+ OH <sup>-</sup> + gallsyra		Lösligt

Fett passerar magen oförändrat. I tolvfingertarmen emulgeras fetterna i gallsalterna från gallan och bildar miceller. Från bukspottkörteln och från tarmen kommer lipaser och hydrolyserar fett till fria fettsyror och monoglycerider. Fettsyrorna tas upp av mukosan (tarmludd) och det omvandlas till fetter igen. Triglyceriderna kopplas sedan ihop med kolesterol och apoproteiner till kylomikroner. Apoproteiner är lipidbindande proteiner i blodet som transporterar fett, fosfolipider och kolestesterol mellan organ. Kylomikronerna passerar genom det lymfatiske systemet och förs med blodbanan till vävnaderna. Olika kombinationer av proteiner och lipider formar lipoproteiner med olika densitet, alla med olika uppgift att fylla. Det finns minst 9 olika grupper, från mycket låg densitet (kylomikroner och VLDL) till hög densitet (HDL). De med hög densitet kallas "det goda kolesterolet" medan de med låg densitet kallas "det onda kolesterolet". Ärftliga faktorer och högt intag av fett ökar andelen LDL och risken för åderförkalkning. Se s 23 i Kemin i Maten (Material från [www.krc.su.se](http://www.krc.su.se))

## Att bestämma lipofilitetskonstanten för fyra sulfonamider med hjälp av "reversed-phase" tunnsliktskromatografi

**Teori:** När ett läkemedel absorberas (tas upp) till blodet, binds den till specifika receptorer i cellmembranet. Den hydrofoba effekten är den viktigaste drivkraften. Läkemedlet måste vara oladdat för att absorption ska ske.

Att mäta den hydrofoba kraften hos ett läkemedel är svårt. Men man kan mäta fördelningen av en substans i ett system med en hydrofob och en hydrofil fas. Man använder ett standardsystem av faserna 1-okanol och vatten.

För att få bra absorptionsegenskaper för ett läkemedel modifieras en grundsubstans med olika substituent. Man jämför sedan ändringarna i fördelningskoefficienterna och väljer sedan ut den mest lämpliga substituenterna på grundstrukturen. Om fördelningskoefficienten för grundstrukturen är  $P$  och för den substituerade föreningen  $P_x$  kan skillnaden i lipofilitet mellan dessa två substanser anges som i ekvation 1.

$$\pi = \log\left(\frac{P_x}{P}\right) = \log P_x - \log P \dots \dots \dots \text{Ekvation.1}$$

Lipofilitetskonstanten,  $\pi$  indikerar på den logaritmiska förändringen av jämviktsfördelningen i systemet mellan substituerad (X) och osubstituerad (H) förening. Det finns inte någon enkel direkt metod att mäta  $\pi$ , så man bygger upp en modell där förändringen i den lipofila karaktären,  $\Delta R_m$  bestäms med hjälp av  $R_f$ -värden från tunnslikt i ett 1-oktanol/vatten i system.  $R_f$ -värden för både substituerad ( $R_{mX}$ ) och osubstituerad ( $R_{mH}$ ) förening bestäms.  $R_m$ -värden beräknas med två olika ekvationer beroende på om molekylen är neutral (ekvation 2) eller för sur alternativt basisk (ekvation 3).

$$R_m = \log(R_f^{-1} - 1) \dots \dots \dots (\text{för neutrala ämnen}) \dots \dots \dots \text{Ekvation.2}$$

$$R_m = \log(R_f^{-1} - 1) + \log\left(\frac{(K_a + [H^+])}{[H^+]}\right) \dots \dots \dots (\text{för sura / basiska ämnen}) \dots \dots \dots \text{Ekvation.3}$$

där  $K_a$  är dissociationskonstanten och  $[H^+]$  är vätejonskoncentrationen i den mobila fasen. Förändringen i  $R_m$  värde ( $\Delta R_m$ ) för substituerade och osubstituerade föreningar har samma mening som  $\pi_x$  lipofilitetskonstanten när en substituent  $x$  sätts på en grundstruktur (ekv. 4)

$$\pi = R_{mX} - R_{mH} \dots \dots \dots \text{Ekvation.4}$$

**Uppgift:** Att med hjälp av "reversed-phase" bestämma olika substituenters påverkan på absorptionen (fördelning i oktanol/vatten-system) av ett antibiotika med hjälp av lipofilitetskonstanten,  $\pi$ .

**Riskbedömning:** Alla sulfonamider är farliga att förtära. Undvik kontakt och inandning. Personer som är allergiska mot antibiotika bör ej utsättas för dessa ämnen. Konc. saltsyra är frätande. Organiska lösningsmedel är brännbara. Hantera jod i dragskåp.

### Kemikalier:

Sulfanilamid  
Sulfametazin

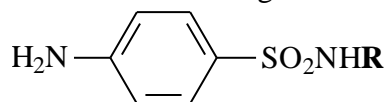
Sulfatiazol  
Sulfametyloxyridin

5% 1-oktanol i etyleter  
buffert pH 7,4 av 50 cm<sup>3</sup> 0,1 M kaliumvätefosfatlösning och 39,5 cm<sup>3</sup> 0,1 M natriumhydroxidlösning

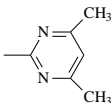
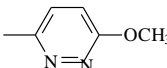

TLC-platta kiselgel 60:  
Jod, konc. saltsyra eller 0,1% p-dimetylamino-bensaldehyd i etanol för framkallning av TLC

### Utförande:

- 10 mg av vardera ämnet löses i 2,5 cm<sup>3</sup> aceton i 4 olika rör.
- Impregnera tunnskiktspattan för "reversed-phase" genom att doppa plattan i 5%-1-oktanollösning i dietyleter. Plattan har fått en stationär ickepolär fas och är klar för användning efter torkning i dragskåp.
- Tag bort några millimeter gel från långsidorna. Sätt ett svagt blyertsstreck ca 1,5 cm från nedre kanten. Plattan är färdig för användning. Mobil fas för tunnskikt-kromatografin består av bufferten pH 7,4.
- Lösningar av sulfonamiderna sätts sedan på TLC-plattan med kapillärrör. När fläckarna torkat, stoppas plattan ner i den mobila fasen. Låt den mobila fasen vandra upp till kanten. Tag upp plattan, markera vätskelinjen och låt torka i värmeskåp. Framkalla fläckarna med jod-ånga eller koncentrerad saltsyra i dragskåp.
- Räkna ut R<sub>f</sub>-värdena för sulfonamiderna. Beräkna R<sub>m</sub> enl formel (3) för sulfonamid och formel (2) för sulfatiazol, sulfametazin och sulfametoxypyridazin. Vilken är mest/minst lipofilt? Verkar det rimligt? Förklara!



#### Sulfonamider

Ämne	Sulfonamid	Sulfametazin	Sulfametoxypyridazin	Sulfatiazol
R	H			
pK <sub>a</sub>	10,45	7,70	7,05	7,10
R <sub>m</sub>	-0,48	0,49	0,64	0,43
π	-	0,76	1,02	0,82

**Till läraren:** Kemikalierna går att köpa hos kemikalieleverantör.

Ämne		R <sub>f</sub>			R <sub>m</sub>	
	Lägsta	Högsta	Medel	Lägsta	Högsta	Medel
Sulfonamid	0,76	0,66	0,73	-0,51	-0,28	-0,42
Sulfametazin	0,44	0,30	0,38	0,75	0,29	0,39
Sulfametoxypyridazin	0,47	0,36	0,41	0,76	0,57	0,57
Sulfatiazol	0,63	0,51	0,54	0,46	0,25	0,33

Sulfonamider och dess derivat fungerar som enzymhämmare-antimetaboliter till inkorporeringen av 4-amino-bensoesyra (PABA) i dihydrofolsyra. De liknar substratet 4-aminobensoat. Det betyder att den primära aminogruppen inte får ha några substituent. Gemensamt för de antibakteriella sulfonamiderna är att de är svaga syror med pK<sub>a</sub> runt 10. SDet betyder att de är joniserade och har god löslighet vid fysiologiskt pH. Urinen däremot har pH 5,5-6,5 och det finns risk för att de faller ut till svårslösliga acetylderivat med njurskador till följd.

## Bakterier i vår omgivning

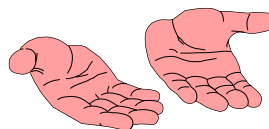
Syftet med denna laboration är att med några enkla övningar:

1. Undersöka förekomst av bakterier i vår närmaste omgivning
2. Pröva effekten av en steriliseringsmetod (tvätta händerna)
3. Pröva att isolera en bakteriestam på fast substrat

**Riskbedömning:** Vid mikrobiologisk arbete se säkerhetsföreskrifter!

**Material:** 1 tejprulle, 3 (– 4) näringsagarplattor (1 st till extrauppgift), märkpenna, ev kristallviolett-lösning.

**Utförande:** Behandla tre plattor på följande sätt. (Den fjärde sparas till extrauppgift.)



- a) *Platta nr 1.* Tag av locket och låt plattan stå öppen på bänken i 15 minuter. Sätt därefter på locket.
- b) *Platta nr2.* Rita med en märkpenna 4 kvadrater med ett kryss på undersidan av plattan. Sätt ett tumavtryck var (2 elever) per fjärdedel av plattan. Tvätta händerna **mycket noggrant och omsorgsfullt** med tvål. Sätt ytterligare var sitt tumavtryck på den andra halvan av plattan.
- c) *Platta nr 3.* Dela in en ny platta i kvadrater enl försöket i pkt. b). Välj ut tre platser som du vill testa bakteriemängden på. Välj t.ex. dörrhandtag, jord, ledstänger mm. Märk petriskålens undersida med de tester du valt. Tag en bit tejp och tryck den mot t.ex. dörrhandtaget och överför bakterierna genom att pressa tejpbiten mot näringsagarn i petriskålen. Den sista kvadranten är en sterilkontroll av enbart tejp.
- d) Inkubera de tre plattorna (upp och ner) i 37°C över natten

**Utförande dag 2:** Studera de olika plattorna och räkna kolonier. Se om du ser någon skillnad på kolonierna. Varje koloni har vuxit fram ut en bakterie.

**Extra uppgift:** Med en steril platinös (platinatråd som har bränts av i en gaslåga) tas en bakteriekoloni upp och ett tunt utstryk görs på en objektglas. Färga bakterierna med kristallviolett-lösning. Studera bakterierna i mikroskop. Behandla alla bakterier som om de vore sjukdomsalstrande. Arbeta sterilt och tvätta händerna efteråt.

**Extra uppgift. Isolering (renframställning) av en bakterie.** Tag en koloni av bakterier från petriskålen och för över dem sterilt med en steril platinös till en ny agarplatta och gör ett nytt utstryk. Se bilden! Låt stå i 37 °C ett par dagar. Eftersom du inte vet vilken bakterie som du har isolerat och din renkultur kan vara smittsam så måste du vara extra försiktig och renlig så att du inte blir smittad! Agarplattorna ska autoklaveras innan de destrueras.



### **Till läraren:**

Platta 1: 15 minuter i luft ger normal litet utslag och kan betraktas som en bakgrundsreferens.

Platta 2: Att handen härbärgerar bakterier blir ingen särskilt förvånad över, men att en tvättad hand ger ifrån sig mera bakterier än en otvättad hand förvånar. På huden sitter ”snälla” bakterier (micrococcer) i symbios som skyddar oss mot ”otäcka” bakterier. När man tvättar sig extra noggrant så kommer de ”snälla” fram. Om några inte får detta resultat så har de inte tvättat händerna tillräckligt noggrant.

Platta 3: Välj där man kan förvänta sig många bakterier, handtag, ledstång, jord mm. Välj inte en vattenkran. Där ska det inte finnas bakterier. Ta inte från näsan på en förkyld elev som har ”smittosamma” bakterier.

Platta 4: Tag helst bakterier från plattan med den tvättade handen, då dessa oftast är ”snälla” bakterier.

Köp näringsagar (NA) och sterila petriskålar eller köp färdiggjutna petriskålar. Om man gjuter själv och ska man använda petriplattorna direkt efter gjutningen. Då behöver man normalt inte autoklavera mediet utan det räcker att koka mediet i så rena (antiseptiskt) kolvar som möjligt. Koka mediet i ca 20 minuter. Plattorna går inte att spara under någon längre tid. Man kan använda en vanlig tryckkokare som autoklav i liten skala.

Normalt brukar inte mögel växa på näringsagar. Till mögel används maltagar (men visst förekommer det att mögel växer på NA, särskilt i vått och varmt väder!)

## Färgningsmetoder - Gramfärgning

Metoden har fått sitt namn efter dansken Christian Gram. Han upptäckte metoden av en slump då han utarbetade färgningsmetoder. Han behandlade bakterier med en gentianaviolettlösning och därefter en jod-kaliumjodidlösning (Lugols lösning). Vid avfärgning med etanol försvann all färg från vissa bakterier (gramnegativa) men blev kvar hos vissa (grampositiva). Gram fann att man även kunde kontrastfärga bakterier med kristallviolett.

Den används som en av de första metoder för att identifiera bakterier. Alla bakterier färgas av Lugols lösning. Vid färgningen bildas ett komplex mellan färgämnet och jod inuti cellväggen. Hos grampositiva bakterier, med mycket tjock och tät cellvägg, hålls färgkomplexet kvar medan den tunnare och porösare gramnegativa cellväggen lättare kan tvättas ut med etanol.

- Material:**
1. Kristallviolet i droppflaska
  2. Lugols lösning i droppflaska
  3. Aceton-alkohol i droppflaska
  4. Saffraninlösning i droppflaska

- Bakterier:**
- Bacillus subtilis (grampositiva)
  - Echerichia coli (gramnegativa)
  - Ev. okänd bakterie



Det kan vara lämpligt att testa sin okända bakterie mot referensbakterierna på samma objektsglas. Lägg den okända i mitten och en grampositiv och en gramnegativ på var sin sida.

### Utförande:

1. En liten droppe vatten placeras mitt på ett rent objektsglas.
2. Ta **lite** bakteriemassa med en platinaögla och suspendera (lös upp) i vattendroppen.
3. Lufttorka preparatet i 37-50 °C
4. Fixera preparatet genom att föra objektsglas, med bakteriesidan uppåt, försiktigt 4-5 gånger genom brännarens **sparlåga**.
5. Täck bakterierna med kristallviolet och låt verka 1 minut.
6. Skölj försiktigt bort färgen med Lugols lösning.
7. Täck bakterierna med mera Lugols lösning och låt verka i 1 minut. Häll av lösningen.
8. Avfärpa i aceton-alkohol tills ingen blå färg längre löser sig. Det kan ta ca 20-60 sekunder.
9. Skölj försiktigt i vatten i ca 5 sekunder.
10. Täck bakterierna med saffranin. Låt verka i 1 minut.
11. Skölj försiktigt i vatten ca 5 sekunder. Låt lufttorka.
12. Undersök i mikroskop

Gramnegativa bakterier förblir blåvioletta och grampositiva blir rosa till röda.

### **Till Läraren:**

Detta är en klassisk metod som fortfarande används.

Vissa bakterier – de gramnegativa - avfärgas med etanol, medan de grampositiva inte kan avfärgas av etanol. Det beror på att bakterierna skiljer sig i sin uppbyggnad av cellväggen. Indelningen är emellertid inte solklar. Det finns övergångsformer. Vissa bakterier kan uppvisa oklar gramfärgning. Hos en del bakterier ändras cellväggens egenskaper med stigande ålder, varför gramreaktionen kan ge diskutabla resultat

Denna beskrivning kommer från Institutionen för Mikrobiologi, KTH

### **Recept för reagens till Gramfärgning**

#### Stamlösning kristallviolett

Gentianaviolett eller kristallviolett	15 g
96 % alkohol	300 cm <sup>3</sup>

#### Kristallviolettlösning

Stamlösning	10 cm <sup>3</sup>
Destillerat vatten	40 cm <sup>3</sup>
1 % ammoniumoxalatlösning	50 cm <sup>3</sup>

#### **FILTRERAS**

#### Jodjodkaliumlösning enligt Lugol till Gramfärgning

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 cm <sup>3</sup>

#### Acetonsprit

Aceton	20 cm <sup>3</sup>
96 % alkohol	80 cm <sup>3</sup>

#### Safraninlösning

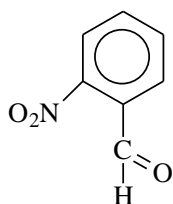
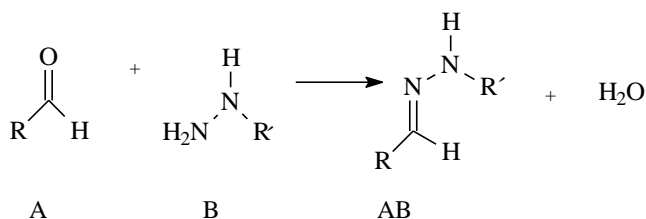
Safranin 0,25g/10 ml 95% sprit	10 cm <sup>3</sup>
Destillerat vatten	90 cm <sup>3</sup>

## Kombinationssyntes och undersökning av ett antibiotikum.

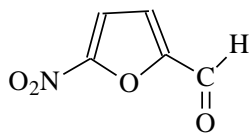
**Teori:** Kombinatorisk kemi är en generell metod som används vid syntes av nya föreningar då man vill testa vissa egenskaper. Ett viktigt fält för denna teknik är att på ett enkelt sätt hitta nya läkemedel. Man kan utgå ifrån substanser från naturen, och testa varianter av dessa, för att se om effekten höjs eller sänks, och på så sätt optimera de önskade effekterna. Egenskapen man letar efter kan vara nästan vad som helst; elektrisk konduktivitet, lukt, färg eller t.ex. ett ämne som reagerar med en histamin receptor.

**Uppgift:** Du ska genom att kombinera tre aldehyder med tre hydraziner syntetisera 9 olika hydrazone. Sen ska du studera om hydrazone har en antibiotisk effekt på bakterier. Du gör det i en kombination så att antalet tester bara blir 6. Samtidigt som få du färre tester kan du ändå avläsa resultatet, och dessutom få säkrare resultat med inbyggd kontroll!

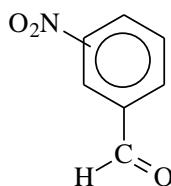
Se den generella formeln för bildningen av en hydrazon.



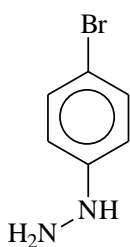
A<sub>1</sub>



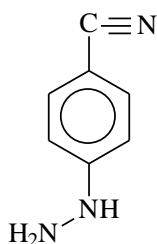
A<sub>2</sub>



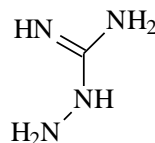
A<sub>3</sub>



B<sub>1</sub>



B<sub>2</sub>



B<sub>3</sub>

### Material:

- |    |                            |
|----|----------------------------|
| A1 | 2-nitrobenzaldehyd         |
| A2 | 5-nitro-2-furaldehyd       |
| A3 | 3-nitrobenzaldehyd         |
| B1 | 4-bromofenylhydrazin·HCl   |
| B2 | 4-cyanofenylhydrazin·HCl   |
| B3 | aminoguanidin vätekarbonat |

Rita upp strukturerna för de 9 hydrazoner som kan bildas av de 3 aldehyderna och de 3 hydrazinerna.

**Riskbedömning:** Läs säkerhetsföreskrifter vid mikrobiologiskt arbete. Arbetet sker i dragskåp och i små mängder. Måttlig risk.

*Escherichia coli* används i många biologiska tester. Bakterien finns normalt i tarmen hos människa. Vissa stammar kan bilda ett enterotoxin som orsakar magsjukdomar såsom turistdiarre. Emellertid innehåller inte dessa laboratoriestammar några farliga gener utan är helt harmlösa under normala förhållanden. Vissa försiktighets åtgärder bör ändå vidtas.

- Tvätta labbänken med 10% klorinlösning, tvålatten eller tvättsprit innan du börjar.
- När du ska hantera bakterierna *E.coli*, se till att hålla bakteriesuspensionen från näsa och munnen. Inhalering av aeroler ska undvikas.
- Tvätta labbänken när du avslutat arbetet. Tvätta händerna innan du lämnar lab.
- Samla ihop bakteriekulturen i provrör och allt material, som har kommit i kontakt med bakterierna. Man kan desinficera materialen på två sätt:
  - a) Behandla med 10% klorinlösning (hypoklorit) i 15 minuter och släng
  - b) Autoklavera vid 121°C i 15 minuter. Släng.
- Använd glasögon och skyddshandskar. Några av de övriga föreningarna är irriterande på hud och öga. Ta upp spill omedelbart.
- 2-nitrobensaldenyd är mutagent. Arbeta i dragskåp eller med punktutsug
- Fenylhydrazin är giftig vid inandning, hudkontakt och förtäring irriterar ögonen. Det är mycket giftigt för vattenorganismer. Miljöfarligt.

#### Utförande:

3 st agarplattor

6st 1,5 cm<sup>3</sup> Eppendorfrör

1 ställ för Eppendorfrör

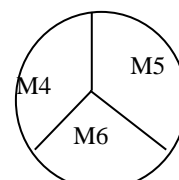
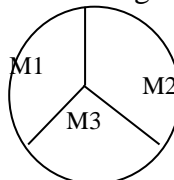
7st pasteurpipetter varav minst en av glas

1 märkpenna

1st rör märkt 1/100 *E.coli*

1. Märk upp de två agarplattorna på undersidan i tre fält som figuren visar. Märk även med dina initialer. Lyft inte på locken.

2. Överför 1 cm<sup>3</sup> bakteriekultur *E.coli* 1/100 till plattan märkt M1, M2 och M3. Sätt på locket. Vicka försiktigt på plattan så att det bildas ett jämt lager av bakteriesuspensionen. Upprepa och gör samma sak med den andra plattan.



3. Ta bort överskott av vätskan genom att tippa lätt på plattan och ta bort vätskan med en pasteurpipett. Överskottet ska föras tillbaka till provröret märkt 1/100. Gör samma sak med den andra plattan. Pipetten och provröret ska lämnas in för destruktion.
4. Nu ska du träna dig att stansa ut hål i agar i den tredje oanvända plattan med pasteurpipetten av glas. Tryck ner ”bakändan” av pasteurpipetten i agarn och försök att pilla upp agarbiten. När du känner dig säker, gör tre hål jämt fördelade i de tre fälten av de infekterade plattorna. Observera att de utstansade bitarna har bakterier på sig och ska därför destrueras på lämpligt sätt.
5. Märk upp sex st 1,5 cm<sup>3</sup> eppendorfrören M1, M2, M3, M4, M5 och M6.
6. Använd de 6 pipetterna, en för varje förening och överför **i nämnd ordning** reagens enligt tabell nedan till eppendorfrören

Rör nummer	Tillsätt 5 droppar	Sedan 5 droppar	Därefter 5 droppar	Till sist 15 droppar
M1	B1	B2	B3	A1
M2	B1	B2	B3	A2
M3	B1	B2	B3	A3
M4	A1	A2	A3	B1
M5	A1	A2	A3	B2
M6	A1	A2	A3	B3

- Sätt korkar på rören och skaka i 10-15 sekunder. Observera lösningarna och notera färgförändringar.
- Använd nya pipetter för varje eppendorfrör och överför försiktigt 2 droppar av varje blandning till motsvarande agarhål i petriskålarna. Se till att dropparna hamnar i mitten av agarfördjupningarna. Stöd handen mot något så att inga skakningar stör påsättandet
- Inkubera de två plattorna vid 37°C i 24 h. Var försiktig när du bär plattorna till värmeskåpet.

### Dataanalys av kombinations kemi

- Efter ett dygn tas plattorna ut för analys. Mät området där det inte växer några bakterier eller sätt ”+” där det inte växer (en inhibition) och ”-” där det växer och inte har varit något inhibition av tillväxten.

Rör nr	Blandning	Resultat
M1	A1, B1, B2, B3	
M2	A2, B1, B2, B3	
M3	A3, B1, B2, B3	
M4	B1, A1, A2, A3	
M5	B2, A1, A2, A3	
M6	B3, A1, A2, A3	

Varje blandning innehåller tre produkter. Till exempel innehåller M1 föreningarna A1-B1, A1-B2 och A1-B3. Utläs vilken förening som har den antibiotiska effekten.

- Insidan av tabellen representerar varje blandning M1 till M6. Till exempel är första kolumnen representerad av först kolumnen, likaså M2 och M3 är andra och tredje kolumnerna. Fyll i nästa tabell. Den ska även ingå i rapporten!

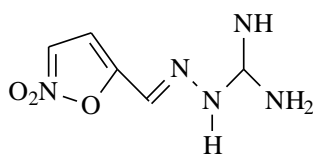
	M1	M2	M3	Resultat
M4	A1-B1	A2-B2		
M5	A1-B2			
M6	A1-B3			
Resultat				

- Fyll nu i resultatet från punkt 1. Du får ut resultatet där de två med positivt resultat korsar varandra. Här ser du fördelarna med att arbeta med blandningar.
- Tänk dig att du har ett mycket större antal utgångsämnena, t.ex. 10 aldehyder och 10 hydraziner. Det kan bildas 100 hydrazoner! Hur många experiment behöver du utföra?

## Lärarhandledning

**Teori:** Under de senaste åren har kombinatorisk kemi varit utgångspunkten för utveckling av nya antibiotika. Genom denna kombinatoriska teknik har man möjlighet att identifiera flera aktiva och inaktiva substanser i färre tester än vad som annars skulle vara nödvändigt. Eleverna stimuleras att göra ett databibliotek och dra slutsatser om föreningarnas antibiotiska effekt. Resultatet kommer att synas som en inhibering av utväxt av E.coli-bakterien. Inhiberingen ska vara klar, tydlig och ge en ca 1,5-2,0 cm klar cirkel utan bakterier på agarplattan. Den aktiva substansen är guanofuracin, kallad A2-B3 i experimentet. Föreningen upptäcktes på 1950-talet och används nu till både djur och människa. Ett tvåkomponent system för syntes av hydrazoner är basen för biblioteket. Utbytet är högt, ingen uppärbetning krävs, reaktionen sker i vatten, reaktionen är snabb och uppföljs med en färgreaktion.

I experimentet används tre aldehyder (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>) och tre hydraziner (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) som reagerar i vatten och bildar 6 lösningar (M<sub>1</sub>-M<sub>6</sub>) med tre hydrazoner i varje. Ämnena är utvalda så att 8 inaktiva föreningar och en aktiv förening bildas (hit), antibiotikan guanofuracin bildas. Den antibiotiska effekten blir synlig efter 12-24 timmars inkubation. Om man skulle ta de tre



Guanofuracin

aldehyderna mot de tre hydrazinerna så skulle det behövas en matris om 9 experiment. Nu kombineras utgångsämnen så att det bara behövs 6 experiment för att få ut resultat från 9 kombinationer. I de 6 kombinationerna (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>...M<sub>6</sub>) finns kombinationer av utgångsämnen enl tabell 1. I M<sub>1</sub> finns en kombination av A<sub>1</sub> med B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> och B<sub>3</sub> osv... I experiment M<sub>2</sub> och M<sub>6</sub> finns positiva resultat (dvs. en hämning av bakterietillväxt). Den aktiva ”rätta” kombinationen är A<sub>2</sub> och B<sub>3</sub>.

**Tabell 1**

Tabell 1	M1	M2	M3
M4	A1-B1	A2-B1	A3-B1
M5	A1-B2-	A2-B2	A3-B1
M6	<b>A1-B3</b>	<b>A2-B3</b>	A3-B1

## Lärarens förberedelser

1-5 dagar före laborationstillfället:	Option 1	Option 2
Preparera steril LB (Luria-Bertani) medium för vätskekulturen	5 g LB-näringsmedel 190 cm <sup>3</sup> avjoniserat vatten autoklaveras 20 min. 121 °C	Köp sterilt LB medium
Gjut ca 35-50 st sterila petriplattor med agarn (2-3 plattor/grupp)	40 g LB-agar 950 cm <sup>3</sup> avjonat vatten autoklaveras 20 min. 121 °C. Håll ca 20 cm <sup>3</sup> 65°C medium/ platta. Låt det svalna.	Köp sterila LB-plattor
<b>1 dag före experiment</b>		

Preparera en ”över natten kultur” av <i>E.coli</i> TG1	Märk ett 15 cm <sup>3</sup> sterilt provrör med ” <i>E.coli</i> ”. Häll i ca 10 cm <sup>3</sup> sterilt LB-medium. Med en inkubationsnål överför ett par kolonier <i>E.coli</i> från startplattan. Sätt på korken. Rör genom att försiktigt rotera provröret. Inkubera över natten i 37°C i 18-24h med skakning, då bakterien behöver syre för att växa till.(Det fungerar även utan skakning med tag då flera bakteriekolonier)
Gör i ordning till experimentet	Sätt på ett vattenbad 37°C
	Märk 6 st 15 cm <sup>3</sup> rör med A1, A2, A3, B1, B2, B3 Tillsätt rätt mängd i varje rör se materialtabell Tillsätt 12 cm <sup>3</sup> avjoniserat vatten till varje rör Då ämnena är svårslösliga sätts rören i vattenbadet 3-5 min tills allt är upplöst.
<b>På experimentdagen</b>	.
Gör 1/100 lösningar av <i>E.coli</i> (Om tillväxten har varit dålig används 1/10 spädningen till experimentet)	Märk 17 st 15 cm <sup>3</sup> sterila provrör. Ett med 1/10 <i>E.coli</i> och 16 st med 1/100. Häll i 18 cm <sup>3</sup> sterilt LB-medium i 1/10-röret och 9 cm <sup>3</sup> i övriga rör(1/100). Överför försiktigt 2 cm <sup>3</sup> av övernatt kulturen till det första röret(1/10), skaka och överför sedan 1cm <sup>3</sup> av den spädda lösningen till var och en av de 16 röret. Förvara i rumstemperatur till experimentet.

Risk- och skyddsfraser , CAS-nummer och ungefärligt pris

	Ämne och Molmassa (g/mol)	Väg in för 32 elever	Cas nr	Riskfras	Gram	Pris -02
A1	2-nitrobensaldehyd 151,12	54mg	55289-6	R22-36/37/38-40 S26-36	5	287
A2	5-nitro-2-furaldehyd eller 5-nitro-2-furfural 141,09	51mg	698-63-5	R10	5	211
A3	3-nitrobensaldehyd 151,12	54mg	99-61-6	R36/37/38-40; S26-36	5	146
B1	4-bromofenylhydrazin·HCl 223,52	80mg	41931-18-4	R36/37/38; S25-36	10	398
B2	Cyanofenylhydrazin·HCl 169,62	61mg	2863-98-1	Irriterande	5	374
B3	Aminoguanidin HCO <sub>3</sub> 136,11	49mg	2582-30-1	R36/37/38. S26-36	100	95
	LB-medium				250	283
	LB-agar				250	388
	<i>E.coli</i>					

Prisuppgifterna gällde i maj 2003 och de är tagna från Sigma-Aldrich 08-742 42 00 [www sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com). Alla kemikalier är lagervaror med en veckas leveranstid. De kan även köpas av Labora Chemicon som säljer ICNs biokemiska produkter 08-625 18 50, 040-21 21 00

J.Chem.Edu. 2001 78 784-785

## Penicilliners antibiotiska verkan vid olika distributionssätt

**Teori:** Penicillinet upptäcktes 1928 av Alexander Flemming. Han var bakteriolog och av en slump såg han att bakterietillväxten hämmades vid kontamination av en mögelsort av arten *Penicillium*. 10 år senare kunde Howard Florey, en patolog och Ernst Chain, en biokemist isolera och bestämma penicillinets struktur. 1957 beskrev Joshua Lederberg hur penicillinet fungerade. Penicillin stör bildandet av nya cellväggar hos bakterier. Bakterierna kan inte föröka sig utan de dör.

Många halvsyntetiska penicillinmediciner tillverkas ur ett grundskelett av penicillin. Bakterierna kan med tiden genom mutationer ”lära sig” att undvika penicillinets verkan och blir då resistenta mot det speciella penicillinet. Vi har använt för mycket penicillin och ser nu att det uppstår allt fler bakteriestammar som blir resistenta. Läs på hemsidan för föreningen mot penicillinresistenta stammar. [http://. www.strama.se](http://www.strama.se)  
Blir man ordinerad penicillin så ska man ta hela penicillinkuren även om man känner sig bra efter ett par dagar, annars ökar risken för mutation och resistensbildning. Normalt får man penicillin som tabletter. Men vissa sorters penicillin klarar inte att passera magens pH utan måste tas intravenöst (via spruta eller dropp in i blodet)

**Risbedömning:** Se forskrifter vid bakteriehantering! Elever som har penicillinallergi ska ej arbeta med penicilliner.

**Uppgift:** Du ska se vilken penicillinsort som kan tas genom munnen (tål pH 1,5) och vilken som måste tas intravenöst (tål inte pH 1,5).

### Material:

Bakteriesuspension av t.ex. <i>E.coli</i>	0,03 mol/ dm <sup>3</sup> saltsyra
en färdiggjuten pertiskål med näringsagar	natriumhydroxid för neutralisation
fenoxipenicillin och bensylpenicillin	pH-papper
små filterpapper från t.ex. ett håslag	pincett

### Utförande:

1. Märk noggrant ut ställen på undersidan av plattan där du ska lägga penicillinerna.
2. Överför sterilt 1 cm<sup>3</sup> bakteriesuspension till plattan och fördela den jämnt på näringsagarn genom att vicka försiktigt .
3. Väg upp i två provrör 50 mg av vardera fenoxipenicillin och bensylpenicillin
4. Behandla penicillinrören med 1 cm<sup>3</sup> 0,03 mol/dm<sup>3</sup> saltsyra i 10 minuter. Det ska föreställa påverkan av magens saltsyra
5. Neutralisera lösningarna med natriumhydroxid. Testa med pH-papper.
6. Sterilisera en pincett i en gasbrännare. Tag med pincetten de små filterlapparna och dränk in med de behandlade penicillinsorterna och lägg dem på de förutbestämda platserna på plattan. Se till att de fäster/stannar kvar.
7. Sätt plattorna i ett värmeskåp 37°C över natten
8. Mät diametern på den klara bakteriefria ytan runt filterpappret.

**Till rapporten:** Vilken har bäst effekt? Vilken penicillin kan tas genom munnen och vilken måste tas intravenöst. Varför kan det ena, men inte det andra penicillinet intas i tablettform?

Labben är framtagen av farmakologie doktorand Ulrika Rolén.

## Test av antibakteriella medel

- desinficerande verkan hos vanliga rengöringsmedel

Till många av våra vanliga rengöringsmedel tillsätts numera även speciella kemikalier eller andra biologiskt aktiva substanser, som ska ta död på bakterier i vår omgivning. Dessa ämnen kan vara väteperoxid, organiska syror t.ex. ättiksyra eller salicylsyra, bensylklorid eller natriumhypoklorit. Ett medel är triklosan som förekommer till och med i tandkräm.

**Riskbedömning:** Bakterierna som ska användas, *E.coli* eller *Bacillus subtilis* är ofarliga men ska hanteras med respekt! Se särskilda säkerhetsföreskrifter.

**Uppgift:** Du ska testa vilket ämne som har en antibakteriell effekt. Du ska jämföra den antibakteriella effekter med 70%-ig etanol (medicinsk sprit)

**Material:** Näringsagar (NA-agar), sterila petriplattor, en bakteriekultur, brännare, steril pipett, platinös, kristallviolett, mikroskop, medel att testa.

**Utförande:** Din lärare instruerar dig hur man arbetar sterilt. Tvätta händerna före och efter laborationen!

1. *Gör i ordning de medel du ska testa.* Tandkräm med triklosan behöver lösas upp i vatten. Väg in en mängd och späd med sterilt (kokt) vatten. Anteckna utspädningen för att du senare ska kunna jämföra medlen.
2. *Koka och autoklavera näringsagar.* Gjut en platta och låt gelen stelna. Du kan testa upp till fem olika medel på en NA-agarplatta. Märk med spritpenna på undersidan av petriskålen fem jämt fördelade platser. Den sjätte platsen är för referens (etanol).
3. *Tillsätt ca 1 cm<sup>3</sup> bakterielösning* till NA-agar och vicka försiktigt så att ett jämt lager av bakterier bildas.
4. *Stämpla ut små filterpapper* med ett hålslag så sterilt (antiseptiskt) som möjligt av vanliga filterpapper.
5. *Sterilisera en pincett* genom att bränna av den på en gaslåga. Doppa de små filterpappren i de bakteriedödande lösningarna som du ska testa och lägg dem jämnt fördelade på markerade platser i petriskålen. Doppas så "enhetligt" och reproducerbart som möjligt. Låt stå över natt i värmeskåp, 37°C.

**Resultat:** Bakterierna har nu växt ut och bildar en matta i petriskålen. Om medlen du testat har en antibakteriell effekt kan inte bakterierna växa runt om det indränkta papperet. Den fria zonen är ett mått på den effekten. Mät diametern. Det kan vara svårt att se kanten och därför kan du försöka färga bakterierna med en lösning av kristallviolett. Bakterier tar upp färgen och blir lättare synliga.



**Till läraren:** Ett sätt att bestämma den antibiotiska resistensen hos en bakterie görs med en så kallad **lappmetod** (Paper Disc method, PDM). Den antibiotiska effekten beror både på bakteriéstam, antal bakterier på plattan och koncentrationen av medlet som testas. Se nedan!

Effekten av ett antibiotikum in vitro brukas referera dels till ett MIC (Minimum Inhibitory Concentration)- värde och dels till ett MBC (Minimal Bacterial Concentration)- värde. MIC-värde avser den lägsta koncentrationen av ett antibiotikum som krävs för att inhibera tillväxt (= bakteriostatiskt) av den mikroorganism som testas. MBC avser den lägsta koncentration av ett antibiotikum som kan döda (=baktericid). Förhållandet mellan en bakteriostatisk och en baktericid koncentration varierar från ett antibiotikum till ett annat.

**NA = Näringsagar.** Ett rikt medium där många mikroorganismer kan tillväxa. Det innehåller köttextrakt, pepton (halvnedbrutet protein), NaCl och agar. Agarmediet steriliseras (autoklaveras) i en autoklav. Det går bra att göra det i en vanlig tryckkokare, som man köper i en järnaffär. Koka upp och låt koka i 20 minuter. Öppna inte tryckkokaren förrän den har svalnat till under 100°C. Kyl i ett vattenbad.

**Gjutning av plattor.** Köp sterila petriskålar. Bänken (dragskåpet) som ska användas tvättas ordentligt av med 70%-ig etanol. Sterila petriskålar placeras i små högar med locket uppåt. En bunsenbrännare tänds. Kolven eller flaskan med agarlösning roteras försiktigt så att lösningen blandas om, men utan att bubblor bildas. Flambera och håll cirka 25 cm<sup>3</sup> agar i varje petriskål. Locket på petriskålen ska tas av så kort tid som möjligt, då agarn hålls i, och sedan läggas på igen. Då agarn stelnar (svalnar) kan locket ligga lite på ”sned” för att kondensvattnet ska evaporera ut.

#### **Bakterier som kan användas:**

*Bacillus subtilis* (grampositiva)

*Escherichia coli* (gramnegativa)

Bakteriekulturer kan man ofta be att få från ett laboratorium eller universitet.

Ca 10 kolonier slammas i 1 cm<sup>3</sup> steril 0,9% NaCl-lösning (salin). Tillsätt ca 20 cm<sup>3</sup> agarlösning som har en temperatur under 40°C. Detta räcker till två petriskålar.

*Ett alternativ:* Håll bakteriesuspensionen på en NA-platta. Se till att hela plattan flödas och sug därefter av överskottet. (Ev. torkas plattan i 37°C i 30 minuter). Köp sterila engångsplatinöser av plast.

*Destruktion av material:* Autoklavera infekterat material eller låt det stå i en 10%-ig klorinlösning över natten.

*Diskutera med* dina elever vad de tror kommer att hända om tandkrämer, diskmedel, disktrasor mm innehåller antibakteriella medel. Vi kommer att få bakterier som är resistent mot medlen. Det är bättre att tvätta ur och torka trasor och borsta tänder ordentligt!

*Resultat från en lärare:* Eleverna tog med sig diverse lösningar hemifrån. Piercingtvätt var mest effektiv. Någon tog klorin. Den löste upp agarn. Olika linstvätt gav ganska enhetligt och bra resultat. WC-rengöring och diskmedel var bra liksom McDonalds bakteriedödande tvål.

Laborationen är utvecklad och testad av Ulrika Rolén, farmakologie doktorand vid KI

## Mutationsfrekvens med Ames standardmetod

**Teori:** Vid replikation av DNA kan det ibland bli en felavläsning av någon nukleotid. Då finns det en reparationsmöjlighet och funktionen blir återställd. Men någon gång träder inte reparationsmekanismen igång och det blir en basförändring. Vi har fått en mutation. Denna förändring kan vara allvarlig om den överförs och permanentas till nästa generation.

### Mutationen kan vara en

- Substitution - en nukleotid ersätts med en annan
- Addition - en extra nukleotid har kommit in
- Borttagande (deletion) - en nukleotid färre än förut

### Mutationen kan delas in i

- Tyst mutation, det genetiska materialet tar sig inte uttryck (silent)
- Förbättrade egenskaper (evolutionen)
- Försämrade egenskaper

Hos djur och människor finns det en stark korrelation mellan mutation och cancer.

Det finns ett enkelt standardtest för att testa om ämnen är mutagena dvs. lätt kan orsaka mutation. Testet bygger på en speciell stam av muterad bakterie *Salmonella typhimurium*, som inte kan tillverka histidin. Salmonellan saknar det enzym, som behövs för att göra aminosyran histidin, och den växer bara i medium, som innehåller denna aminosyra. Om Salmonellan utsätts för ett mutagent ämne så är chansen större att den muterar och börjar producera histidin själv. Salmonellan kan nu växa utan tillskott av histidin.

**Riskbedömning:** Aminoantracen irriterar ögon, hud och andningsorgan, är carcinogent och är sensibiliserande vid ljusexponering. Arbeta i dragskåp och använd skyddsglasögon och handskar. Ämnet ska destrueras efter användning.

### Material:

*Salmonella typhimurium*

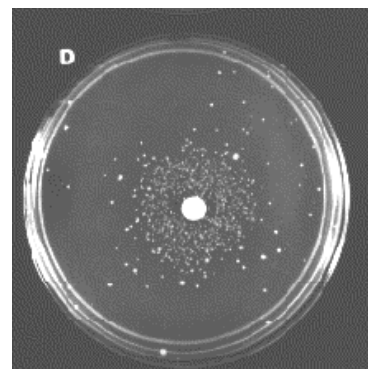
petriskålar

näringsagar (NA)

ämne som ska testas t.ex. 2-aminoantracen 0,5 µg

### Utförande:

1. Gjut petriskålar med näringsagar.
2. Späd bakteriesuspensionen och tag ut  $10^9$  bakterier. Gjut in dessa i näringsagar och sprid dem som ett jämt tunt lager på plattorna. Det går åt en platta per ämne och en blank. Plattan med blanken ska visa hur många mutationer som uppstår spontant.
  1. Placera 0,5 µg av ämnet, som du vill testa i mitten på plattan.
  2. Placera plattan i värmeskap i 2 dygn vid 37°C
  3. Avläs antal kolonier på plattor med och utan ämne.



Bilden visar isoniazid (en tuberkulosmedicin) som visar sig mutagen i denna test

### **Till läraren**

Enligt Stryer "Biochemistry" är mutationsfrekvensen för 0,5 µg 2-aminoantracen 11.000 (det växer 11.000 kolonier på plattan) att jämföras med 30 spontanmutationer. Om man testar olika koncentrationer av ett ämne erhåller man en linjär dos-respons-kurva. En fördubbling av antalet revertanter (muterade kolonier) jämfört med nollprov och endast om man får en linjär dos-respons kurva anses kriterier för mutagenitet var uppfyllt i Ames-testet.

Läs i Lehninger sid 831-2

Säkerhetsföreskrifter vid användning av 2-aminoantracen eller antramin.

R36/37/38,S26

Första hjälpen:

- efter inandning: Ämnet irriterar slemhinnor och övre luftvägar. Kan vara farligt vid inandning. Flytta personen till friska luften. Kontrollera andningen.(ge syrgas vid dålig andning och konstgjord andning om andning upphört)
- efter hudkontakt: Orsakar hudirritation. Tvätta med tvål och mängder med vatten
- efter stänk i ögon: Orsakar ögonirritation. Spola omedelbart med stora mängder vatten i minst 15 minuter
- efter förtäring: Kan vara farligt vid förtäring Skölj munnen med vatten för personer vid medvetande. Sök läkare!

Lagring: Förvaras torrt och svalt (2 – 8 °C i tätslutande kärl). Ämnet är stabilt men bör ej utsättas för oxidationsmedel. Sönderfallsprodukter: koldioxid, koloxid och nitrosera gaser.

Ingen polymerisering

Vid spill: Sopa upp och placera i en säck och vidarebefordra till avfallshantering. Undvik att röra upp damm. Ventilera området och tvätta utspillningsplatsen sedan allt material avlägsnats.

Sensibilisering: Orsakar ljuskänslighet. Exponering av ljus kan resultera i allergiska reaktioner på huden som solbränna till blåsiga bulnader.

Cancerframkallande: Ämnet är misstänkt cancerframkallande och mutagent genom oplanerad DNA-syntes och DNA-inhibering.

Laborationen kommer från universitetslektor Monica Rydén-Aulin, Institutionen för Mikrobiologi, Stockholms Universitet.

Den speciella stammen kan erhållas av

FD Monica Rydén-Aulin

Department of Microbiology

Stockholm University

S-106 91 Stockholm

Tel# +46-8-16 41 55

Fax# +46-8-612 95 52

E-mail Monica.Ryden-Aulin@mibi.su.se

## Selektion av mutanter hos en *E.coli*-bakterie

**Teori:** De flesta naturligt förekommande bakterier är känsliga för antibiotika. Problemet idag är att med den stora användningen av antibiotika följer att många bakterier utvecklar antibiotikaresistens.

I denna laboration ska du använda dig av en kultur som är känslig mot antibiotika och med den bestämma mutationsfrekvensen och därmed resistensen hos två olika antibiotika. Mutationsfrekvensen är ett mått på hur många mutationer som uppstår per cell.

En mutation är en ärftlig förändring i genomet. Mutationer uppstår oftast under replikationsprocessen. Antingen genom fel i replikationssystemet eller genom påverkan utifrån. Vi kan bara studera de mutationer, som ger upphov till förändrad fenotyp.

Streptomycin binder till ribosomer och inhiberar proteinsyntesen. Resistens uppstår om någon aminosyra byts ut i proteinet S12 som ingår som en del i ribosomen. Det är bara ett fåtal aminosyror som vid utbyte kan ge upphov till resistens. S12 är ett litet protein.

Rifampicin binder till RNA-polymeras och inhiberar transkriptionen. Resistens uppstår om någon aminosyra byts ut i  $\beta$ -subenheten i RNA-polymeraset. Många aminosyrautbyten kan ge upphov till resistens.  $\beta$ -subenheten är ett stort protein.

**Riskbedömning:** Hantering av bakterier se särskild instruktion för mikrobiologiskt arbete. Penicilliner kan för vissa personer vara allergiframkallande. Personlig skyddsutrustning och handskar.

### **Material:**

Bakteriestam MG1655, eller valfri vildtypsstam.

LB-medium

6 LA-plattor

1 LA+Str-platta (100  $\mu$ g Streptomycin /ml)

6 LA+Rif-plattor (50  $\mu$ g Streptomycin /ml)

**Utförande:** Odla upp en kultur MG1655 i 25 ml LB-medium över natten. (Detta har din lärare gjort)

### **Dag 1:**

1. Tvätta av en bänk med 70% etanollösning. Använd en bunsenlåga för instrument vid allt sterilarbete.
2. Tag 0,1 ml av övernatt-kulturen och gör en spädningsserie på  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .
3. Tag 0,1 ml av utspädningarna  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  och sprid ut på LA-plattorna. Gör dubbelprov. Totalt 6 plattor.
4. Tag 0,1 av den utspädda kulturen och spädningarna  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  och sprid upp på LA+Rif-plattorna. Gör dubbelprov. Totalt 6 plattor.
5. Resten av den utspädda kulturen centrifugeras på en bordcentrifug. Supernatanten (överlösningen) hålls av. Pelleten suspenderas (löses upp) i 0,2 ml LB-medium. Sprid ut suspensionen på LA+Str-plattan.
6. Inkubera alla plattorna upp-och-ner i ett värmeskåp på 37 °C.

## Dag 2

7. Räkna kolonierna och beräkna mutationsfrekvensen för båda antibiotikaresistenserna.

### Beräkning av mutationsfrekvensen:

8. Räkna antalet kolonier på LA-plattorna. Ha mest tilltro till den spädning som ger ca 50-300 kolonier/platta. Detta är av rent statistiska skäl, med färre antal kolonier ökar variationen (med fler kolonier finns risken att man missar någon koloni eftersom det blir för tätt att urskilja och räkna dem).
9. Räkna med hjälp av spädningarna ut hur många bakterier som fanns per  $\text{cm}^3$  i övernattkulturen på första plattan. (Tänk på att ni bara har spritt  $0.1\text{cm}^3$  på plattan). Detta blir totala antalet bakterier som fanns i övernattkulturen.
10. Räkna därefter, på samma sätt, ut hur många rifampicinresistenta bakterier ni har per  $\text{cm}^3$ .
11. Sist räknar ni hur många kolonier som finns på streptomycinplattan. De kommer att vara få och svåra att se mot bakgrunden av svagt växande bakterier. Leta efter små distinkta upphöjningar. Räkna ut antalet streptomycinresistenta bakterier ni har per  $\text{cm}^3$ . Tänk på att ni har spritt ut  $25\text{cm}^3$  övernattkultur!
12. För att få mutationsfrekvensen dividerar ni antalet mutanter med totala antalet bakterier.

### Skriv en rapport

#### Till läraren:

Mutationsfrekvensen när man selekterar för Rif<sup>R</sup> blir mycket högre än om man selekterar för Str<sup>R</sup>. Skälet till detta är att det finns fler möjliga nukleotidutbyten som kan ske, genen som ger Rif<sup>R</sup> är större och fler aminosyrautbyten ger resistens. Proteinets som ger Str<sup>R</sup> är litet och mycket få aminosyrautbyten ger resistens. Skillnaden är flera tiopotenser.

Bakteriestammen kan erhållas från Monica Rydén-Aulin (kontaktuppgifter nere på sidan).. Stammen kan förvaras på en LB-platta väl inplastad i rumstemperatur eller kyl. Ännu bättre är att stoppa den i en 1:1 blandning av LB och glycerol och stoppa i frysen. Köp sterila petriskålar. Följ receptet på förpackningarna. Det går åt ca  $10\text{cm}^3$  LB-medium till över natt-kulturen. ca  $25\text{cm}^3$  näringsagar per platta och alltså  $325\text{cm}^3$  per grupp.

Laborationen kommer från Universitetslektor Monica Rydén-Aulin, Mikrobiologiska institutionen.

Den speciella stammen kan erhållas av:

FD Monica Rydén-Aulin

Tel# +46-8-16 41 55

Department of Microbiology

Fax# +46-8-612 95 52

Stockholm University

E-mail Monica.Ryden-Aulin@mibi.su.se

S-106 91 Stockholm

## Frågeformulär till hälsoprofilbedömning (en anamnes)

Namn	Ålder	Klass
------	-------	-------

Besvara följande frågor. Alla frågor gäller den senaste månaden. Markera med kryss

<b>Färdsätt till skolan</b>	Bil, buss <input type="checkbox"/>	Promenad < 2km <input type="checkbox"/>	Promenad > 2km <input type="checkbox"/>	Cykel < 5km <input type="checkbox"/>	Cykel > 5km <input type="checkbox"/>
<b>Fritidsaktiviteter</b>	Aldrig	Sällan	Då och då	Ofta	Mycket ofta
<b>Föreningsverksamhet</b> (politik, religion etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> v	<input type="checkbox"/>
<b>Studier</b> (kurser, cirklar etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Evenemang</b> (bio, utställningar etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Dans, disco</b> etc	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Målning</b> , snickeri, städning, etc	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Promenader</b> , jakt, friluftsliv etc.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Hobbies</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Övrigt</b> Skriv ner:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Motion</b> Fysisk aktivitet i träningskläder	Aldrig <input type="checkbox"/>	Då och då <input type="checkbox"/>	1-2 ggr/vecka <input type="checkbox"/>	3-5 ggr/vecka <input type="checkbox"/>	På elitnivå <input type="checkbox"/>
<b>Kost</b> När jag äter tänker jag ....på kostråd	Aldrig <input type="checkbox"/>	Försöker då och då <input type="checkbox"/>	Försöker <input type="checkbox"/>	Tillämpar kostråd <input type="checkbox"/>	Planera r allt <input type="checkbox"/>
<b>Tobak</b> Jag röker (En dosa snus = 60 cigaretter)	>15cig/d <input type="checkbox"/>	10-5cig/d <input type="checkbox"/>	5-10cig/d <input type="checkbox"/>	1-5cig/d <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>
<b>Alkohol</b> Jag dricker alkohol såsom öl, vin, sprit	Flera gångar/v. <input type="checkbox"/>	Ca en gång/v <input type="checkbox"/>	Sällan <input type="checkbox"/>	Mycket sällan <input type="checkbox"/>	Aldrig <input type="checkbox"/>
<b>Medicin</b> Jag använder lugnande, uppiggande, Sömnmedel eller värktabletter	Varje vecka <input type="checkbox"/>	Ofta <input type="checkbox"/>	Då och då <input type="checkbox"/>	Sällan <input type="checkbox"/>	Aldrig <input type="checkbox"/>
<b>Symptom</b> Jag känner rygg-, magbesvär, huvudvärk, trötthet mm	Mycket ofta <input type="checkbox"/>	Ofta <input type="checkbox"/>	Då och då <input type="checkbox"/>	Sällan <input type="checkbox"/>	Aldrig <input type="checkbox"/>
<b>Upplevd stress</b> Jag upplever stress på skolan och /eller fritid	Mycket ofta <input type="checkbox"/>	Ofta <input type="checkbox"/>	Då och då <input type="checkbox"/>	Sällan <input type="checkbox"/>	Aldrig <input type="checkbox"/>
<b>Upplevd ensamhet</b> Jag upplever ensamhet på skolan och/eller på fritiden	Mycket ofta <input type="checkbox"/>	Ofta <input type="checkbox"/>	Då och då <input type="checkbox"/>	Sällan <input type="checkbox"/>	Aldrig <input type="checkbox"/>
<b>Upplevd hälsa</b> Jag upplever att min hälsa, för både kropp och själ, är	Mycket dålig <input type="checkbox"/>	Dålig <input type="checkbox"/>	Varken eller <input type="checkbox"/>	Bra <input type="checkbox"/>	Mycket bra <input type="checkbox"/>

**Glykemiskt index****Vara... g kol/hydrat/100 g GI****Potatisprodukter**

Pommes frites	31	107
Potatis (bakad)	19	121
Potatis (färsk-, kokt)	16	80
Potatischips	46	77
Potatismos (pulver)	12	118

**Grönsaker**

Gröna ärtor	9	68
Majskorn	19	78

**Baljväxter (kokta)**

Sojaböner	6	20
Röda linser	15	36
Gröna linser	16	42
Vita böner (på burk)	12	70
Bondböner	7,5	113

**Ris (kokt)**

Ris (råris)	21	81
Ris pasta, -nudlar	21	113

**Sädeslag(torra)**

Havregryns	62	70
Korn (hela korn)	64	30
Råg (hela korn)	60	48

**Bröd**

Bagel	50	103
Glutenfritt vetebröd	70	129
Knäckebröd	64	95
Muffins, äpplesockrad	57	63
Riskakor	70	117
Rågbröd (fullkorn)	46	89
Rågbröd m.hela korn	51	68
Sockerkaka	57	66

**Vetebröd**

Vetebröd (fralla)	50	97
-------------------	----	----

**Frukt**

Ananas	11	94
Apelsin	10	62
Apelsinjuice	11	74
Banan (gul)	22	84
Grapefrukt	6,5	36
Kiwi	10	75
Körsbär	14	32
Mango	15	80
Papaya	9	83
Persika	9	40
Plommon	10	32

Päron	11	51
Russin	69	92
Vattenmelon	9	103
Vindruvor	16	61
Äpple	12	52
<b>Mat</b>		
Hamburgare	30	89
Korv	10	40
Pizza	25	86
Spagetti (fullkorn)	25	53
Tomatsoppa	6	54
Ärtsoppa	9	94
<b>Frukostmat</b>		
Cornflakes	79	122
Müsli	67	92
Yoghurt med frukt	15	47
Mjölk		
Fet mjölk (3%)	5	39
Minimjölk	5	46
Chokladmjölk. O'boy	10	49
<b>Snacks mm</b>		
Choklad mörk	57	70
Chokladljus	55	70
Energidryck	139	136
Gele'godis	79	114
Glass	22	69
Glass lågfett	27	71
Japp, Mars mm.	55	97
Jordnötter	10	21
Läsk	10	97
Majschips, nachos	90	105
Popcorn	55	79
Snicker	55	57
Karameller m.socker	94	115
Karameller sockerfria	99	0-34
Sötningsmedel		
Fruktos	32	32
Glukos	92	138
Honung	82	104
Laktitol	100	-1
Laktos(mlöjljsocker)	51	65
Sackarin	100	0
Saft	10	94
Saft, light	4	0
Socker	100	92
Sötningsmedel		20
Xylitol	100	7

## Acetylsalicylsyra är två mediciner i en – Antikoaguleringsmedicin och värktablett

En studie i ökad blödningsrisk med acetylsalicylsyra och paracetamol.

Ofta när du tar en huvudvärkstablett av acetylsalicylsyra (ASA), så tar du den för att du vill ha smärtlindring eller för att minska febern. Man kan även ta en liten mängd ASA för att inte få en blodpropp. ASA har minst två effekter, en smärtstillande och en som gör att trombocyterna inte överreagerar och bildar en tromb eller blodpropp i en artär eller ven. Genom att ta lite ASA minskas risken att få en hjärtinfarkt eller stroke. Däremot ökar risken för blödning.

**Uppgift:** Du ska studera den ökande blödningen, när du tar en ASA och/eller när du tar en paracetamol.

**Riskbedömning:** Laborationen får bara göras av de elever, som inte har astma samt de som har använt och då konstaterats tåla ASA eller paracetamol. Det kan vara lämpligt att be föräldrar om tillstånd.

**Varningar och försiktighet.** Enl Fass. Vid antikoagulationsbehandling. Vid behandling av patienter med lätt till måttlig hjärtsvikt, njursjukdom eller leversjukdom, speciellt vid samtidig diuretikabehandling (vätskedrivande), måste risken för vätskeretention (kvarhållande av vätska) och försämrad njurfunktion beaktas. Vid behandling av personer med astma. Personer med tidigare ulcusanamnes (inre och yttre magsår) eller med känd överkänslighet mot acetylsalicylsyra, ibuprofen eller andra antiinflammatoriska medel. Se vidare: [www.fass.se](http://www.fass.se)

### Utförande:

1. Stick ett finger med en lancett. Ta tiden från det att en liten blodsdroppe kommer fram tills blödningen stoppat. Torka försiktigt av blodet genom att endast nudda med en pappersservett så att blodet sugas upp. Avläs tiden när inte mera blod sipprar fram.
2. Ät en barnalbyl, bamyl minor eller motsvarande mängd ASA. En barnalbyl innehåller 250 mg ASA. En grupp annan kan ta motsvarande mängd paracetamol.
3. Efter en halv timme görs samma blodtest som ovan. Har tiden för koagulering ändrats?.
4. Om möjlighet finns, gör ett test efter 2 timmar, ett dygn och 3 dygn.

**Rapport:** När har tiden för koagulering av blodet återgått till det normala. Skiljer sig de olika värktablettarna åt? Räkna ut medelvärden för gruppen av de olika tablettarna. Vilka slutsatser drar du om riskerna för blödning? När kan effekten vara bra? Diskutera resultaten. Finns det skillnader mellan elever?

### Till läraren:

Läs gärna mer i Fass: <http://www.fass.se> Normaltid för att ett blodstick ska sluta blöda är 1-2 minuter. Vid intag av ASA ökar tiden till 5-6 minuter. Effekten sitter kvar och minskar först efter någon till några dagar. För paracetamol är effekten inte lika långvarig. ASA påverkar blödningstendensen och ökar risken för blödande magsår. Det är **serin** i den aktiva delen hos receptorn som acetyleras.

**Alternativ:** Gör testet som en blindtest. Alla elever får dricka en lösning av del av en brustablett eller lika stor mängd karbonerat vatten. Brustabletter absorberas fortare så resultatet syns snabbare. Variera mängden ASA Vissa elever får en halv barnalbyl

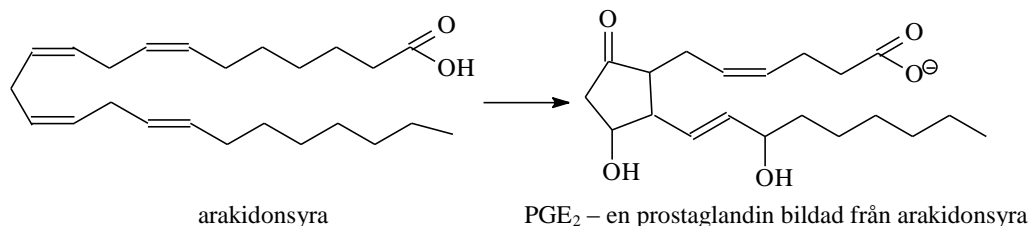
**Salicylsyra** är den aktiva delen för smärtreduktion, febernedsättning och den är dessutom antiinflammatorisk. För att minska magslemhinnans påverkan av syran så förestras den till acetylsalicylsyra. ASA sönderdelas i magen eller början av tarmen till salicylsyra och ättiksyra. **Ättiksyran** sätter sig irreversibelt på receptorer på trombocyterna och påverkar trombocyternas funktion i den primära hemostasen (blodstillning). Effekten sitter kvar några dagar eller tills trombocyterna har ersatts med nya.

**Trombocyterna** även kallade blodplättar eller blodplattor bildas i benmärgen av megakaryocyter och har en överlevnad på ca 8 dagar. Antalet varierar mellan 125 till 350 miljoner per liter blod. Vid skada på blodkärl klistrar sig trombocyterna till det skadade området varvid en plugg bildas. Pluggen förstärks genom koagulation av blodet

**Pacacetamol** liksom **ibuprofen** hör till gruppen icke steroidala antiinflammatoriska mediciner (**NSAID** = *nonsteroidal antiinflammatory drugs*).

**Cyklooxogenas**, COX deltar i bildningen av **prostaglandiner**, **prostacyklin** och **tromboxan** ur arakidonsyra

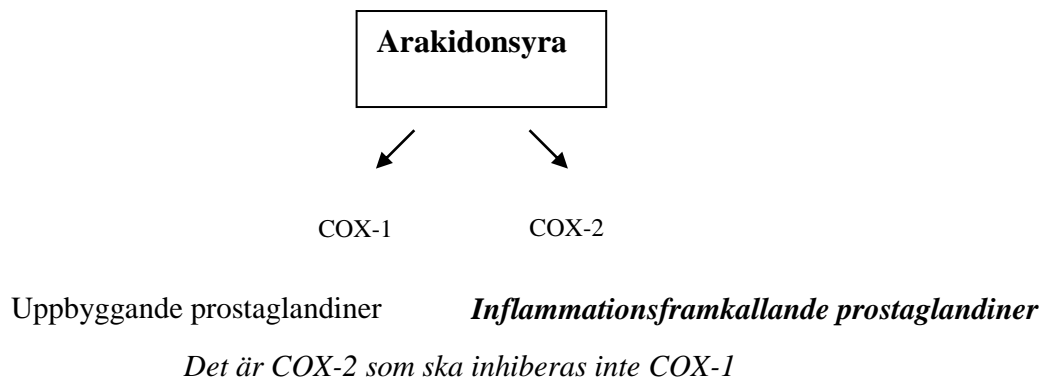
**Prostaglandiner** är en grupp verksamma föreningar som finns i de flesta vävnader och organ. Prostaglandiner är kortlivade hormoner som påverkar olika processer i kroppen och gör oss känsligare för smärta, medverkar i inflammationsprocesser och förmår höja kroppstemperaturen.



Prostaglandinerna har betydelse för reglering av blodtryck och genomblödning av vävnader och organ, muskelaktiviteten vid förlossning, för utveckling av svullnad, smärta och rodnad.

ASA och NSAID verkar genom att hämma bildningen av prostaglandiner. Genom den normala formen av cyklooxigenas, COX-1 produceras små mängder av de prostaglandiner, som kroppen behöver för att fungera.

Vid vissa sjukdomstillstånd som t ex reumatism bildas stora mängder av COX-2, som med ökad produktion av prostaglandiner ger ökade inflammationer.



I blodet finns tromboxan, som får blodplättar att klibba ihop och prostacyclin som motverkar blodproppar. Prostacyclin finns i blodkärlsväggarna och har en kärlvidgande effekt. Tromboxan stimulerar trombocyterna att aggregera vid en skada. Effekten motverkas av prostacyclin, en liknande substans med motsatt effekt. Övervikt av prostacyclin kan ge blödningsbenägenhet. Acetylsalicylsyra i små doser hämmar bildningen av tromboxan i högre grad än bildningen av prostacyclin, vilket förklarar den blödningsbenägenhet man ofta ser efter intag av ASA. Det är den effekten som är grunden till användning av ASA för att förebygga uppkomst av blodpropp.

Om man förbehandlar patienter med NSAID (nonsteroidal inflammatory drugs) tex ibuprofen före intag av ASA mildras eller jämnas antikoagulerings effekten ut. Den antikoagulerande effekten beror på att ASA irreversibelt inhiberar aktiviteten hos enzymet cyklooxygenas kallas COX. Paracetamol innehåller en amidgrupp. En acetylgrupp avspjälkas lätt och den har liknande effekt som ASA. Paracetamols acetylgrupp är dock reversibelt inhibitorisk på COX. Antikoagulerings effekten sitter inte kvar lika länge som hos ASA

Acetylsalicylsyra inhiberar Cox-1 10 – 100 gånger mer än Cox-2. Det är COX-2 som ska inhiberas, inte COX-1 vilket nyare NSAID (nonsteroidal inflammatory drugs) gör. Det finns modifierat aspirin med en sidokedja som frigör kväveoxider. Frigörande av kväveoxid motverkar förlusten av prostacyclin.

Läkemedel som hämmar COX-2 är rofecoxib (Vioxx, Merck) och Celecoxib (Celebrex, Pharmacia). Effekterna på dessa mediciner är omstridda. Celecoxib (Celebrex) är dock 375 gånger effektivare som COX-2 inhibitor än COX-1

På hälsokostmarknaden saluförs medel som *sägs* bara hämma COX-2. Dessa påstås motverka reumatism, menstruationssmärta, cancer och även Alzheimer mm. Örter, som *påstås* ha COX-2 hämmande effekt är grönt te, ingefära, gurkmeja, basilika, kamomill och oregano.

Läs mer om ASA i

<http://www.Lakemedelsvärlden.nu>

Modern Drug Discovery October 2000 p 223 – 27

J. Chem. Ed 1998 75 1233

J. Chem. Ed 1998 75 1261

<http://arthritis.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http%3A%2F%2Fwww.arthritis.co.za%2Fcox.html>

## Analys av massprocent ASA i Aspirin - (Kemiolympiaduttagning 1996)

**Teori:** När acetylsalicylsyra får reagera med natriumhydroxid neutraliseras och hydrolyseras den. Överskottet av tillsatt natriumhydroxid återtitreras med saltsyra och substansmängden acetylsalicylsyra kan bestämmas.

**Riskbedömning:** Måttligt riskfylld laboration. Var försiktig med natriumhydroxiden. Använd skyddsglasögon.

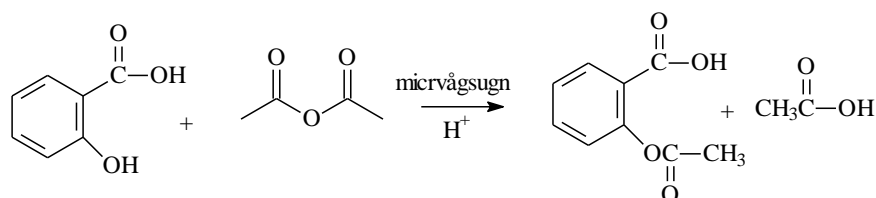
**Standardisering av natriumhydroxid.** Bestäm natriumhydroxidlösningens koncentration med hjälp av 0,100 mol/dm<sup>3</sup> HCl och BTB som indikator.

### Utförande:

1. Väg in och krossa 3 aspirintabletter, lägg i en E-kolv. Tillsätt 25,00 cm<sup>3</sup> natriumhydroxid med känd koncentration (ca. 2 mol/dm<sup>3</sup>). Tillsätt ca 25 cm<sup>3</sup> vatten och låt koka i 10 minuter: Stor risk att koka med 2 M NaOH – det kan lätt stänka. Akta speciellt ögon!
2. Överför lösningen till en 200 cm<sup>3</sup> mätkolv och späd med avjoniserat vatten till märket.
3. Tag ut 10 cm<sup>3</sup> av lösningen och titrera med 0,100 mol/dm<sup>3</sup> saltsyra. med fenolftalein.
4. Beräkna massprocenten acetylsalicylsyra.)

## Småskalig syntes av acetylsalicylsyra i mikrovågsugn

Efter lång tids användning av mikrovågsugn i köket har den nya energikällan börjat användas för organisk syntes och reaktionstiderna förkortas. Under ett och samma laborationstillfälle kan acetylsalicylsyra och paracetamol syntetiseras och analyseras.

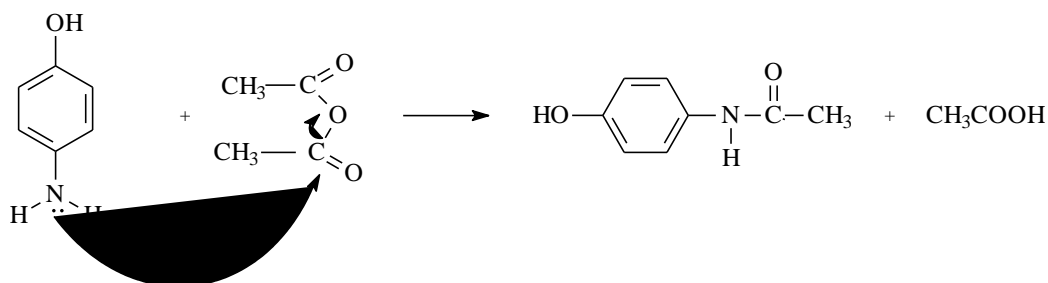


### Utförande:

1. Väg in 0,15 g salicylsyra och 0,3 g ättiksyraanhydrid i en 10 cm<sup>3</sup> bägare. Tillsätt en droppe 85% ig fosforsyra. Rör om och lägg på en liten petriskål som lock.
2. Ställ en bägare med 10 cm<sup>3</sup> vatten bredvid reaktionskärlet i ugnen för att absorbera överskottet av energi. Kör 1 minut med full effekt. Ta ut bägaren och rotera den så att innehållet blandas. Låt bägaren med reaktionsblandningen svalna och kyl i isbad .
3. Sugfiltrera råprodukten med hjälp av en pasteurpipett med lite glasull och ett minifiltrerpapper klippt med hålslag. Sätt pipetten i en gummimanschett eller liten slangbit i ett provrör med avledningsrör och anslut till vattensugen.
4. Omkristallisera råprodukten ur vatten i en E-kolv. Sätt till lite hett vatten i taget och precis så mycket vatten som behövs för att lösa acetylsalicylsyran. Låt lösningen svalna lite och kyl kolven med lösning i isbad. Sugfiltrera och torka kristallerna. Väg produkten , beräkna utbytet och bestäm smältpunkt.
5. Visa på fenolfri produkt med 0,1 mol/dm<sup>3</sup> järn(III)-lösning. Spara substans för TLC

**Riskbedömning:** Laborationen är måttligt riskfylld. Handskas försiktig med ättiksyraanhydrid. Skriv rapport, som innehåller beräkning av utbyte och identifikation av produkten.

## Syntes av Paracetamol – förenklad metod



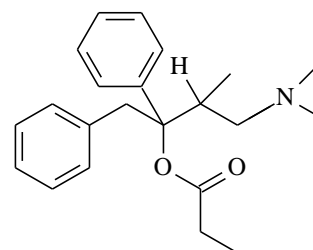
### Utförande:

1. Rör med en glasstav 1,0 g p-aminofenol med 0,5 cm<sup>3</sup> vatten i en liten bägare och tillsätt därefter 2,0 cm<sup>3</sup> ättiksyraanhydrid. Fortsätt omrörningen.
2. Omkristallisera ur vatten (ca 2 cm<sup>3</sup>) se ovan. Sugfiltrera, torka, väg och bestäm smältpunkt.
3. Spara substans för TLC (tunnskiktskromatografi).

**Riskbedömning:** Laborationen är måttligt riskfylld. Handskas försiktig med ättiksyraanhydrid.

### Frågor

- 1- Varför tillsätts vatten vid syntes av paracetamol?
- 2- Nisse öppnar en gammal burk Magneacyl hemma i farfars badrum. Han känner doften av ättika. Varför?
- 3- ASA tillhör läkemedelsgruppen lätta analgetika. Dextropropoxifen (nedan) är ett starkare s.k. opoidanalgetikum. Hur många optiska isomerer finns det av dextropropoxifen? Bygg dem. Vad är deras absolutkonfiguration? (Använd R och S).



4. Saltsyra är nästan lika stark syra som svavelsyra. Varför är inte saltsyra bra som katalysator i denna reaktion?
5. Kan man identifiera paracetamol med järn(III)lösning?

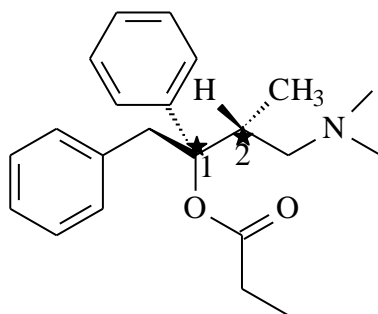
Mirafzal, G., A.. Summer, J., M. J. Chem. Ed.2000 77 356 Microwave Irradiation Reactions: Synthesis of Analgesic Drugs

Whittaker. A., G. Education in Chemistry September 2002 135 Preparing aspirin in a microwave

## Till läraren

Svar på frågorna

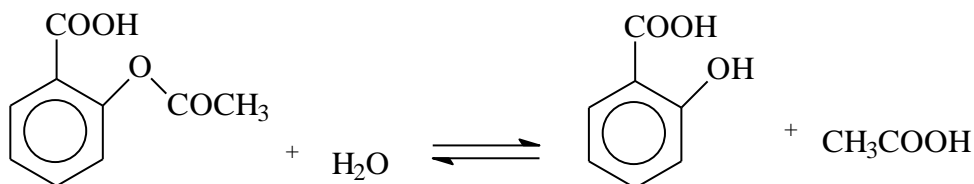
1. Vad tror du händer om man inte sätter till vatten vid paracetamolsyntesen? Kan det bli en förestring vid den fenoliska hydroxylgruppen? Vi vill skapa en amidbindning inte en esterbindning.
2. Acetylsalicylsyran sönderdelas/hydrolyseras/ med tiden av fukt och ättiksyra bildas. Se laboration "Sönderfall av ASA i badrummet".
3. I Dextropropoxifen finns två kirala kol. I Dexofen, Dolotard Doloxene m fl används 1S, 2R (se fig. nedan). Totalt finns det fyra isomerer.



4. Svavelsyra kan binda till sig bildat vatten. På så sätt driver man reaktionen åt höger.
5. Paracetamol är en fenol och bildar färgat komplex med järn(III)joner. Observera att det är p-aminofenol också och vi kan alltså inte identifiera slutprodukten med järn(III)joner.

## Sönderfall av ASA i badrummet

**Inledning och frågeställning:** Acetylsalicylsyra tar ner feber och tar bort smärta och huvudvärk. Den kan ha olika kommersiella namn som Magnecyl, Albyl, Asprin, Treo mm. Den aktiva delen är salicylsyra. Men salicylsyra är sur och kan därför irritera magens slemhinna. För att lösa dessa problem har man förestrat salicylsyran med ättiksyra. Estern är inte särskilt stabil om man förvarar den fuktigt och under lång tid. Lukta på en gammal burk ASA som stått i badrummet en tid så känner du kanske att det luktar ättiksyra. Vad har hänt? I detta experiment ska du bestämma mängden fri salicylsyra i en huvudvärkstablett som har förvarats under olika förhållanden och tider. Studera följande jämviktsreaktion. Salicylsyra, en fenol som bildar ett färgat komplex med järn(III)-joner.



### Material:

1st mikroplatta	olika värktabletter av acetylsalicylsyra
4st 1 cm <sup>3</sup> mikropipetter	droppflaskor med:
1st graderad jumbo pipett	50% etanol
1st bägare	0,10 mol/ dm <sup>3</sup> järn(III)nitrat
våg	standardlösning av salicylsyra (5-50mg/10 cm <sup>3</sup> i 50% EtOH
1st mortel med pistong	vilket motsvarar 1 till 10% sönderfall),
1st 10 cm <sup>3</sup> mätcylinder	dest.vatten

**Riskbedömning:** Liten risk.

### Utförande:

1. Tillsätt enl schema nedan antal droppar standardlösning av salicylsyra och vatten i en mikroplatta. Detta är din standardserie.

Droppar	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Salicyl-syra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
vatten	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

2. Tillsätt 1 droppe järnnitratlösning i varje brunn. Notera färgförändringen. Sparas och används som referens.
3. Du kanske måste späda referenslösningen. Gör det i 24- brunnars mikroplatta med jumbopipetten. Anteckna hur mycket du späder.
4. Väg och anteckna massan på huvudvärkstabletterna som ska analyseras.
5. Mortla sönder en tablett i taget. För över pulvret i en bägare och lös upp det i 10 ml 50%-ig etanol. En del av tabletten kommer inte att lösa upp sig. Låt det sjunka till botten.
6. Tillsätt 10 droppar av lösningen i en brunn och tillsätt 1 droppe järnnitratlösning
7. Jämför färgen med standardserien. Om lösningen på din tablett är för stark, späd lösningen med 50% etanol.
8. Återupprepa med nästa tablett.

### Analys:

1. Beräkna mängd salicylsyra i de olika brunnarna på din standardserie.
2. Bestäm mängden salicylsyra i provtablettarna.
3. Dra slutsatser om hur du ska förvara dina huvudvärkstabletter i ett fuktigt badrum? Varför finns det "Bäst före"-datum på huvudvärkstabletter?

### Variationer:

Samla olika sorter av huvudvärkstabletter. Förvara dem under olika förhållanden (olika tider, fuktigt, torrt, ljus, mörkt). Studera hur fort estern sönderdelas och under olika förhållanden (olika pH, tider, temperatur).

Bearbetad laboration från "Microscale

79 Chemistry, A Slater, G Canham"

## Hållbarhet hos livsmedel

**Uppgift:** Vi undersöker några faktorer som påverkar hållbarheten hos livsmedel. Vi testar på buljong, som ett bra substrat för bakterier.

**Riskbedömning:** Tvätta händerna före och efter laborationen. Arbeta med bakterierna som om de vore sjukdomsalstrande! Buljongen kokas före destruktion.

**Material:** 6 små kolvar eller provrör, buljonglösning, socker och aluminiumfolie till lock

**Utförande:** Märk noga upp rören och fördela buljongen i de sex behållarna och behandla provrören på följande sätt:

### Provrör nr:

1. Sätt på folielock och låt stå i rumstemperatur. (referens)
2. Sätt på folielock och låt stå i kylskåp
3. Sätt på folielock och låt koka i ca 5 minuter. Låt stå i rumstemperatur
4. Sätt på folielock och låt koka i ca 5 minuter. Låt stå i kylskåp
5. Tillsätt 1 g socker och se till att det löser sig. Sätt på folielock och låt stå i rumstemperatur.
6. Tillsätt 5 g socker eller till mättnad. Sätt på folielock och låt stå i rumstemperatur  
Inkubera kolvarna i minst två dygn.

**Rapport:** Titta om du ser någon skillnad mellan de olika kolvarna. Är någon eller några buljonger grumliga? Vad kan det bero på? Vad drar du för slutsatser om hållbarhet hos livsmedel.



### Till läraren: Provrör nr:

1. Rumstemperatur. Låt denna vara referens
2. Kylskåp. Kylan gör att i denna växer det bara lite.
3. Koka i ca 5 minuter. Låt stå i rumstemperatur. Här har man avdödat alla bakterier. I den ska det inte växa något om man inte fått in en sekundärinfektion.
4. Koka i ca 5 minuter. Låt stå i kylskåp. Här borde inte ens en sekundärinfektion växa.
5. Tillsätt 1 g socker. Här växer det mest. Socker är näring för alla bakterier.
6. Tillsätt 5 g socker eller till mättnad. För hög sockerhalt för att det ska kunna växa något. Hög sockerhalt konserverar. Förr tillsattes 50% socker till sylten istället för natriumbensoat.

## Hälsofiler – håller de vad de lovar?

### Ett upplägg för att kontrollera *Lactobacillus* överlevnad i matsmältningskanalen

Alla känner till vad antibiotika är och har kanske t.o.m. fått en antibiotikakur ordinerad av läkare. Begreppet probiotika är inte lika känt men kommer från orden ”pro” som betyder ”för” och ”biotika” som står för ”liv”. Antibiotika betyder alltså mot livet (bakterierna ska dö). Probiotika består av mikroorganismer som stimulerar tillväxten av en annan organism. Probiotika definieras som " levande mikroorganismer som tillförs med födan och som positivt påverkar värdjuret genom att förbättra dess mikrobiella balans i mag-tarmkanalen "

Numera talar man även om prebiotika vilket syftar på " icke nedbrytbara livsmedelsingredienser som positivt påverkar värden genom att selektivt stimulera tillväxten och/eller aktiviteten av vissa bakterier i tjocktarmen, vilket kan förbättra värdens hälsa " Med prebiotika avses t. ex oligomerer av socker och sockeralkoholer som inulin, laktulos och oligofruktos. En blandprodukt av pre- och probiotika benämns symbiotika.

#### Inledning:

Det finns många hälsofiler som alla innehåller olika probiotiska mikroorganismer av *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* m.fl. på marknaden och det påstås ha många positiva effekter på människan bl.a. annat

- för hälsan;
- kontroll av patogener (sjukdomsalstrande)
- förbättrad laktostolerans (för de som saknar enzymet laktas som bryter ner mjölksocker)
- kontroll av cancer och antimutagena effekter
- kontroll av serumkolesterol (ett slags lipider i blodet)
- positiv påverkan på immunsystemet
- behandling av antibiotikaassocierade diarréer
- behandling av kroniska tarminflammationer,
- behandling av vaginit och urinvägsinfektioner

Mekanismen hur organismerna fungerar är inte helt känd men man tänker sig att en probiotisk bakterie kan förhindra en patogen att kolonisera tarmen genom att tävla om tillgängliga bindningsställen på slemhinnan. En annan mekanism är att patogenernas tillväxt hämmas sker genom produktion av antimikrobiella substanser som kan vara olika organiska syror.

#### Uppgiften:

För att den probiotiska mikroorganismen från t.ex. en hälsofil ska kunna ha den effekten som påstås så måste den överleva passagen genom magen och ut i tarmen. Din uppgift blir att kontrollera denna överlevnad och jämföra med vanlig filmjölk som standard.

Magen är sur och maten stannar ca 1 timme. Därefter neutraliseras magsyrans saltsyra med gallsalter och bukspott. Gallsalterna löser upp fett och cellmembran. I tarmen är pH återställt till neutral. Här sker upptaget av näringsämnen till blodet. I tarmen lever olika bakterier. Miljön är förstås anaerob.

#### Riskbedömning: Laborationen anses ha liten risk.

#### Material:

Pepton (halvnedbrutet protein, näringsmedel och ger bra jonstyrka till bakterier där de inte kan föröka sig i men överlever

Saltsyra	12 petriskålar (plattor)
Gallsyra	12 st pasteurpipetter
Natriumhydroxid	Kak/godisburk, eller kraftig plastpåse
MRC-medium	Automatpipetter sterila spetsar, 10-1000 µl

### Utförande:

1. Väg upp MRS medium (de Man Rogosa Sharp Medium) enl instruktion på burken till 150 cm<sup>3</sup>, agar eller motsvarande mängd näringsämnen. Gjut 12 st petriplattor. Det räcker till att testa två hälsofiler och en referens (vanlig filmjolk).
2. Gör i ordning 100 cm<sup>3</sup> 1%ig peptonvatten och dela upp i fyra små bägare.
  - a) Den första bägare ska inte behandlas utan ska tjäna som en kontroll på om bakterier finns i filmjölken.
  - b) Justera innehållet i den andra bägaren (magen) till pH till 2 med saltsyra (kan variera mellan grupperna mellan pH 1 till 3)
  - c) Tillsätt gallsyra i den tredje bägaren (tolvfingerarmen) så att den innehåller håller 1% (kan variera mellan grupperna 0,5-5%)
  - d) Justera innehållet i den fjärde bägaren (tarmen) till pH 8 med natriumhydroxid (kan variera mellan grupperna mellan pH 7-9)
3. Överför 5 cm<sup>3</sup> av ovanstående lösningar från bägarna till provrör enl schema nedan (Totalt 12 provrör – 4 x 3 st räcker för att testa två hälsofiler och en vanlig filmjolk). Autoklavera rören enligt en standardmetod (121°C 15 minuter i 1 atm övertryck)

Provrör	Obehandlat	Sur	Gallsyror	Basisk
Fil/hälsofil	1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup> av föregående lösning	1 cm <sup>3</sup> av föregående lösning
Tid	0	30 min	15 min	30 min
Sätt på platta	10 µl	10 µl	50 µl	250 µl

4. Tag 1 cm<sup>3</sup> av den filmjolk/hälsofil som ska provas och tillsätt till provröret med det obehandlade peptonvattnet. Skaka försiktigt om till homogen lösning. Överför 10 µl till en petriplatta med MRS-medium och rackla ut det på plattan med hjälp av en avbränd, böjd pasteurpipett.
5. Tag ytterligare 1 cm<sup>3</sup> av filmjölken och tillsätt till provröret med peptonvattnet som har justerats surt. Skaka försiktigt om och låt stå i 30 minuter. Detta får motsvara tiden i magen!
6. Överför därefter 10 µl från den sura lösningen (magen) till en petriplatta och rackla ut på plattan som ovan! Tillsätt 1 cm<sup>3</sup> av ”bakterie-mag”-lösning till provröret med gallsyror (tolvfingerarmen). Rör om och låt stå 15 minuter.
7. Överför nu 50 µl ”tolvfingerarm-lösning” till en petriplatta. Rackla ut. På detta sätt sätts lika stor mängd bakterier på plattorna m.a.p. utspädning. Tillsätt 1 cm<sup>3</sup> till provröret med basisk lösning (tarmen). Rör om och låt stå 30 minuter.
8. Överför nu 250 µl till en petriplatta.
9. Låt de 12 st petriskålarna växa anaerobt i 37°C i 3-4 dagar. Avläs resultatet som antal kolonier per platta. Om det är många kolonier på plattan, kan man räkna t.ex. ¼ av en representativ del av plattan och multiplicera med 4. Sätt en prick på baksidan av petriskålen med en tuschpenna för varje koloni när du räknar. Skriv rapport. Hur var överlevnaden? Hur stämmer teorierna?

## Till läraren:

### Resultat från Hälsofiler

Fil/antal kolonier	pH 3	Gallsyra 1%	pH 8
Vanlig filmjolk	~300	~400	65
Gajo	~200	240	~160
Dofilus	1	3	0

1. I filmjolk finns normal  $10^9$ – $10^{11}$  bakterier/cm<sup>3</sup>.
2. Många filmjölksbakterier överlever magens pH på ca 1,2-1,5 i 30 minuter men med en 100-faldig reduktion för pH1. Vätejonskoncentrationen påverkar alla proteiner.
3. Organiska syror påverkar bakterier i högre grad än oorganiska syror. Gallsyran i koncentrationen 0,5% påverkade inte bakterierna nämnvärt och t.o.m. i 5%. gallsyra överlever de flesta. Gallsyran är en effektiv emulgator för fett och borde påverka cellmenbranens fosfolipider negativt vilket den inte gör. (Information av Arla)
4. Bakterierna växer även aerobt fast då mycket långsammare. Om man inte kan hålla bakterierna anaerobt så är det bättre att gjuta ytterligare ett nytt lager MRS-agar på det uttagna provet. Agarn ska optimalt ha en temperatur på 45-46°C. Den får maximalt vara 54°C annars dör bakterierna. Vid för låg temperatur är det svårt att få agarn att rinna ut och täcka.

Anaerob miljö för bakterierna i petriskålarna kan skapas i en vanlig kakburk/godisburk av plast med snäpplås eller i en kraftig plastpåse och en speciell påse som köps in genom Oxoid eller Becton Dickinson. Om möjligt ska plattorna ligga upp och ner i burken. Uttorkningen påverkar då mindre. Se dock till att de påsatta 250 µl har torkat in och inte rinner ut.

## Inköp:

BBL Gaspak Plus f(271040) som gör ”plastburken/plastpåsen anaerob köps hos Becton Dickson eller AnaeroGen (ANO 025A) går att köpa hos OXIOID, Sjöängsvägen 7 192 72 Sollentuna, tel 08-626 60 50 fax 08-626 60 59

MRS-medium (CMO 361B),

pepton

MRS-medium innehåller		Dinatriumvätefosfat	2,0g
Pepton	10,0g	Natriumacetat-trihydrat	5,0g
Köttextrakt	8,0g	Triammoniumcitrat	2,0g
Jästextrakt	4,0g	Magnesiumsulfat-heptahydrat	0,2g
Glukos	20,0g	Mangansulfat-tetrahydrat	0,05g
Tween 20	1,0 cm <sup>3</sup>	Agar	10,0g

Suspenderas i 1000cm<sup>3</sup> dest.vatten. Blandas ordentligt under uppvärmning till kokpunkten. Autoklaveras vid 121°C i 15 minuter.

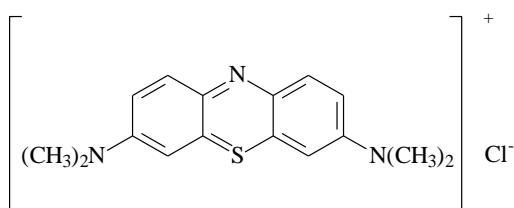
Det går bra att autoklavera i en vanlig tryckkokare. Läs instruktioner och var försiktig vid öppnandet efter färdig autoklivering av tryckkokaren så att temperaturen har sjunkit till under 100 °C. Kyl ner kastullen i kallt vatten.

## Andra labbförslag:

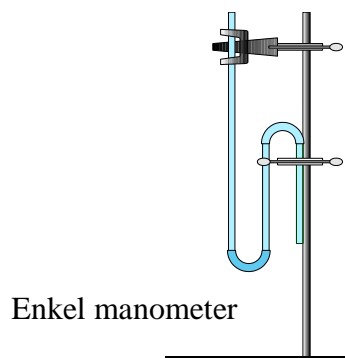
1. Testa pH i olika filer och mjölk. När mjölk surnar (surkoagulering) bildar bacillus sporer som gör att proteiner faller ut.
2. Låt stå och testa varje dag, kolla proteinerna
3. Tillsätt olika kulturer (fil, yoghurt, hälsofiler) i mjölk. Låt stå i olika temperaturer. Smaka. Normalt ska yoghurt stå i högre temperatur (37°C) och vanlig filmjolk vid ca 25°C.
4. Köp en ask Trevis på apoteket. En tablett innehåller  $10^9$  *Lactobacillus*. Tabletterna är förebyggande mot turistdiarreé. Gör samma labb som ovan på olika hälsofiler.

## Glukosoxidas: Demonstrationsförsök med den blå flaskan

**Teori:** Cellerna använder  $\text{NAD}^+$  och  $\text{FAD}$  i metabolismen som elektrontransportörer när glukos oxideras till glukuronsyra. Men metylenblått kan också i alkalisk miljö ta emot elektroner (reduceras) av glukos, som oxideras. Det reducerade formen är färglös. Den reducerade och färglösa metylenblått kan återoxideras av luftens syre (vid skakning) och det blå metylenkomplexet bildas åter. Syreförbrukningen mäts med en enkel barometer (pipetter med slangbitar, se fig.)



Metylenblått



**Riskbedömning:** Natriumhydroxid är frätande: Liten risk.

**Material:** 5% KOH

7% glukoslösning

0,2% metylenblått

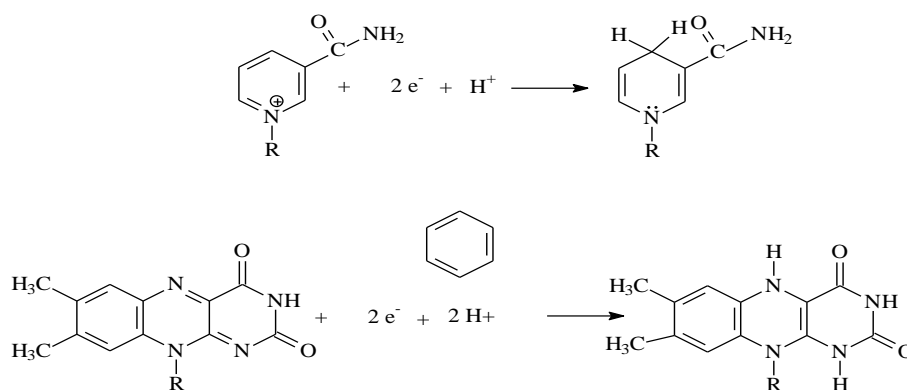
2 pipetter 5 och 10  $\text{cm}^3$  gummislang

E-kolv men kork och avledningsrör, flaska med pip eller sugkolv med kork

**Utförande:** Till en 125  $\text{cm}^3$  E-kolv tillsätts 50  $\text{cm}^3$  KOH och 50  $\text{cm}^3$  glukoslösning och en droppe metylenblått. Sätt på en kork med glasrör och koppla på "barometern". Två pipetter ansluts med en bit gummislang och fylls på med liten mängd vatten (halva pipetten upp). Koppla "barometern" till E-kolven med en ny slangbit och mät lufttrycket. Sätt ett streck! Skaka E-kolven försiktigt 20 gånger, vänta till den blå färgen försvinner. Gör om försöket! Efter några omgångar kan du mäta gasförändringen med din "barometer".

**Rapport:** Se hur  $\text{NAD}^+$  och metylenblått ser ut. Jämför och fundera ut en mekanism.

**Till läraren:** Det brukar gå åt ca 2-3  $\text{cm}^3$  syrgas (luft)



Reduktionsreaktionerna av  $\text{NAD}^+$  och  $\text{FAD}$  [www.mnsfld.edu](http://www.mnsfld.edu)

## Funktionen av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillskott

Om någon ser blek och kraftlös ut så kan han eller hon ha järnbrist. Men man bör inte ha för höga halter järn heller. Lagom är bäst. Det finns andra spårämnen som vi kan få brist på eller ibland ha för mycket av. Både för lite och för mycket kan ge sjukdomssymtom. Alla vitaminer och spårämnen har ett lägsta och högsta rekommenderat värde. Men variationen mellan olika etniska grupper, olika livsstilar, olika åldrar och olika livsbetingelser kan vara ännu större. En varierad och nyttig kost är bästa säkerheten för att du ska få i dig rätt mängd av spårämnen. Här ska du läsa om spårämnens funktion i kroppen. De flesta näringstillskott ges inte som rent grundämne utan i en förening, där de förekommer som en jon. För att kunna tillverka en tablett som ska innehålla en viss mängd av ett verksamt ämne måste man ta med ett fyllnadsmedel. Detta för att kunna forma en tablett och ibland för den ska få rätta kompletterande egenskaper, t.ex. för att kroppen ska kunna ta upp ämnet genom absorption. Fyllnadsämnen är inte alltid lösliga i vatten.

Ämne	Funktion
<b>Aluminium, <math>\text{Al}^{3+}</math></b>	Räknas till de toxiska metallerna utan funktion. Andra toxiska metaller är arsenik, bly, kadmium, krom (i höga halter) och kvicksilver.
<b>Fluor, <math>\text{F}^-</math></b>	Fluoridjoner ger stark tandemalj, bromsar kariesaktiviteten. Den hämmar bakterietillväxten genom att påverka bakteriernas vidhäftningsförmåga. De syrabildande bakterierna påverkas så att mindre syra produceras.
<b>Jod, <math>\text{I}^-</math></b>	I sköldkörteln bildas ämnesomsättningshormoner som bl a stimulerar förbränning och proteinsyntes. Dessa hormoner innehåller jod. Brist: Struma, förstorad sköldkörtel och störningar i kroppens ämnesomsättning. Numera mycket sällsynt i Sverige eftersom koksalt jodberikas.
<b>Järn, <math>\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}</math></b>	Järn ingår i hemoglobin och myoglobin i blodets resp muskelvävnadens färgämne. Hemoglobinet transporterar syre från lungorna genom blodbanorna till kroppens alla vävnader. Brist: Med blodbrist menas oftast järnbrist. Järnbrist ger blekhet, trötthet och kraftlöshet. Den drabbar kvinnor oftare än män
<b>Kalcium, <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	Påverkar musklernas och nervernas funktion och blodets koagulering. Kalcium reglerar många av cellens funktioner och behövs för vissa enzyms aktivitet. Vitamin D deltar i kalcium- och fosfatmetabolismen. Vitamin D bildas i huden mha. den ultravioletta komponenten i solljus. Brist: Urkalkning av skelettet och bennedbrytning. Rakitis (engelska sjukan).
<b>Kalium, <math>\text{K}^+</math></b>	Kaliumjoner behövs för att hålla syra/bas balansen rätt men också för musklernas och njurarnas funktion. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ pumpen upprätthåller cellens elektriska membranpotential och elektrolytbalans. Kaliumhalten är högre inne i cellen än utanför. Brist ger muskelsvaghet.
<b>Klor, <math>\text{Cl}^-</math></b>	Reglerar vätskebalansen och det osmotiska trycket i blodet, finns i magsaften som saltsyra samt deltar i syrabasjämvikterna i den karbanhydras-katalyserade reaktionen när blodet lämnar koldioxid till lungorna, sk kloridskiftet.
<b>Koppar, <math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	Finns i flera av kroppens enzymer, bl a sådana som påverkar omsättningen av järn och syre. Även i cellens försvar mot fria radikaler. Brist: Sällsynt hos friska personer. Kan uppstå i samband med vissa tarmsjukdomar och som följd av långvarig överdosering av zink.

<b>Krom, Cr<sup>3+</sup></b>	Påverkar omsättning av blodsockret. Brist: Troligen mindre vanlig, men kan leda till försämrat utnyttjande av blodsocker
<b>Magnesium, Mg<sup>2+</sup></b>	Är med i nerv- och muskelfunktionerna samt ingår i ett stort antal av de enzymer som behövs för att cellerna ska fungera. Brist: Koncentrationssvårigheter, förvirring, depressioner, krampanfall, domningar, stickningar, förstoppning, diarré
<b>Mangan, Mn<sup>2+</sup></b>	Ingår i cellens försvar mot fria radikaler. Deltar även i omsättningen av kolhydrater och fetter. Brist: Hittills ej rapporterad hos människan. Hos djur: Skelettförändringar, förmodligen därför att broskbildningen störs.
<b>Molybden, Mo<sup>2+</sup></b>	Finns i olika enzymer, bl a för urinsyraomsättningen. Hur ämnet omsätts i kroppen och vilken effekt det har är ännu ganska okänt. Brist: Man känner inte till några sjukdomstillstånd som skulle bero på molybdenbrist hos människan. Hos djur har man sett att lågt molybdenintag har sänkt aptiten och hämmat tillväxten.
<b>Natrium, Na<sup>+</sup></b>	Natriumjonen är den viktigaste metalljonen. Den reglerar blodvolymen och det osmotiska trycket. Normalt har vi 140 mmol/ dm <sup>3</sup> i den extracellulära vätskan men bara ca 10 mmol/dm <sup>3</sup> i den intracellulära vätskan. Totalt ger det ca 90 g NaCl i kroppen. Natriumhalten reglerar blodtrycket via ett hormon – aldosteron. Symtom vid för låg halt av natriumjoner: Trötthet, lätt huvudvärk och illamående. Symptomen går snabbt över vid intag av salt och vatten. Vid mycket för låga halter: Kräkningar, aggressivitet, delirium och koma.
<b>Selen, Se<sup>2+</sup></b>	Behövs för cellernas skydd mot fria radikaler. God funktion hos vissa vita blodkroppar i kroppens immunförsvar. Skydd mot tungmetaller. Brist: I Sverige är jorden selenfattig. Sjukdom i hjärtmuskulaturen såsom muskelförtvining. Vegetarianer rekommenderas ta tillskott av selen och vit B <sub>12</sub>
<b>Zink, Zn<sup>2+</sup></b>	Behövs för många enzyms funktioner, bl a vid transport av koldioxid från vävnaderna till lungorna och proteinsyntes. Zink binds också till hormonet insulin som reglerar kolhydratomsättningen i kroppen. Brist: Försämrad tillväxt hos barn och tonåringar, försämrat infektionsförsvar och sårhäkning, förändring i huden och avtrubbat smaksinne.

Rekommenderat intag per dag för ungdomar

Ämne	Mängd	Ämne	Mängd
Fluor	1,5 mg	Krom	0,05 mg
Fosfor	500 mg	Magnesium	100 mg
Jod	0,15 mg	Mangan	1-2 mg
Järn	10-18 mg	Molybden	0,10 mg
Kalcium	200 mg	Natrium	1-3 g
Kalium	2 g	Selen	0,05 µg + vit.E.
Koppar	2 mg	Zink	9 mg

## Analys av spårämnen i receptfria mediciner och kosttillskott

**Riskbedömning:** Kaliumjodat, kaliumperjodat och väteperoxid över 20% är frätande och oxiderande. Koncentrerade syror är frätande. Organiska lösningsmedel är brännbara. Eftersom laborationen består av många moment, skrivs riskerna särskilt ut på dessa. Om inget annat anges, används koncentrationer på lösningar med 1-2 mol/dm<sup>3</sup>. Var försiktig vid vissa arbetsmoment t.ex. föraskning i degel och kokning i provrör. Använd förkläde och glasögon. Laborationen sker i liten skala och bedöms vara måttligt riskfylld.

### Generellt utförande för de flesta tabletterna:

1. Stöt försiktigt sönder en tablett i en mortel med pistill. En del tabletter är hårda! Var noggrann så du inte skvätter ut pulvret.
2. Tillsätt ca 2 cm<sup>3</sup> avjoniserat vatten och rör runt med pistillen så att allt som kan lösa sig gör det.
3. Tag ett pH-papper och doppa i lösningen. Anteckna.
4. Dekantera, filtrera eller sug med pipett upp den klara lösningen. Gör försöken med denna lösning.

Ämne	Analysbeskrivning	Några exempel
<b>Aluminium, Al<sup>3+</sup></b>	Aluminiumsalter i lösning ger med en blandning av lika volymer ammoniumkloridlösning och utspädd ammoniak en gelatinös vit fällning som är löslig i saltsyra, ättiksyra och i utspädd natriumhydroxid men olöslig i ammoniak.	I många antacida
<b>Fluor, F<sup>-</sup></b>	Mortla <b>två</b> tabletter med fluoridsalt och överför till <b>ett</b> provrör. Tillsätt järn(III)joner i röret samt i ett referensrör utan tabletter. Tillsätt droppvis och lika mycket jodidjoner i de båda rören tills jod syns i röret utan fluoridjoner. I det röret bildas fritt jod enl. formeln. (Jod kan konstateras i en organfas som färgas rödviolett. Se nedan.) $\text{Fe}^{3+} + 2\text{I}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{I}_2$ I röret med fluoridjoner bildas en komplexjon med fluoridjonen. $\text{Fe}^{3+} + 6\text{F}^- \rightarrow \text{FeF}_6^{3-}$	Fludent Fluorette Dental
<b>Jod, I<sup>-</sup></b>	1) Jodidjoner i lösning som behandlas med silvernitratlösning ger en svagt gul fällning, som är olöslig i utspädd salpetersyra och i ammoniak. 2) När jodidjoner behandlas med ett oxidationsmedel t.ex. väteperoxid eller kaliumjodat (KIO <sub>3</sub> ) bildas jod, som löser sig i organiskt lösningsmedel t.ex. heptan, petroleumeter och ger en rödviolett färg åt organfasen.	Kaliumjodid Recip
<b>Järn, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup></b>	Järn förekommer som oorganiskt järn, organiskt bundet i hemoglobin och i två oxidationstal, Fe(II) och Fe(III). Läs på innehållsförteckningen innan du gör analyserna. 1) Järn(II)salt i lösning behandlas med kaliumhexacyanoferrat(III)lösning (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ) ger en mörkblå fällning som är olöslig i saltsyra 2) Järn (II)joner oxideras till järn(III) med ett oxidationsmedel i sur lösning. Tag väteperoxid eller	Duroferon Erco-fer Ferritamin  Ferromyn Anjojärn

	kaliumperjodat ( $\text{KIO}_4$ ) 3) Järn(III)salt i lösning surgörs med saltsyra och ger med kaliumtiocyanatlösning ( $\text{SCN}^-$ ) en blodröd lösning. 4) Järn(III) salter i lösning behandlas med kaliumhexacyanoferrat(II)lösning ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) ger en blå fällning som är olöslig i saltsyra. 5) Järn(III) reduceras till järn(II) med natriumditionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )	
<b>Kalcium, <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	Kalcium förekommer i tablettform mest som svårlösligt kalciumkarbonat. 1) Testa först på karbonatjonen: Lös upp tabletten genom att tillföra utspädda syror och låt koldioxiden avgå. 2) Kalciumsalt i lösning behandlas med ammoniumoxalat som ger en vit fällning som är olöslig i ättiksyra och i ammoniak men löslig i utspädd saltsyra. 3) Kalciumkarbonat löser sig i överskott av koldioxid och bildar lösligt kalciumvätekarbonat.	Calcichew Kalcipos Macalvit
<b>Kalium, <math>\text{K}^+</math></b>	1) Fukta kaliumsalt med några droppar koncentrerad saltsyra. Varning ! Testa ”pastan” med bunsenbrännare som ger lila lågfärg. 2) Kaliumsalt i lösning surgjord med ättiksyra behandlas med natriumkoboltnitritlösning ( $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ ), ger en gul eller gul-orange fällning. <b>Riskbedömning:</b> Riskabelt arbetsmoment med konc, HCl	Kajos Kaliumduretter Kalium retard Kaliumjodid recip
<b>Klor, <math>\text{Cl}^-</math></b>	1) Kloridjoner behandlas med silverjoner och ger en vit fällning. Fällningen är olöslig i utspädd salpetersyra men löslig i utspädd ammoniak. 2) Då klorider upphettas med utspädd svavelsyra och kaliumpermanganat (eller mangandioxid) bildas klorgas som en svagt färgad gas. Gasen identifieras med stärkelse-jodidpapper som färgas blått (alt tillsatt några droppar kaliumjodid- och stärkelselösningar).	Kaliumdurett Kalium retard Kalitabs Salures
<b>Koppar, <math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	1) Koppar faller ut som koppartiocyanat i närvaro av sulfidjoner och svagt sur lösning. I mycket sur lösning blir produkten löslig. $2\text{Cu}^{2+} + 2\text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CuSCN(s)} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$ 2) Då 2 mol/dm <sup>3</sup> $\text{NH}_3$ tillsätts en lösning med kopparjoner bildas blått tetraaminkopparkomplex, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$	Multivitamintab etter Ascoxal
<b>Krom, <math>\text{Cr}^{3+}</math></b>	En tablett föraskas genom upphettning i en degel. Låt svalna. Krom(III)jonen oxideras sedan till den orange-färgade kromat(VI)jonen, $\text{CrO}_4^{2-}$ med ett oxidationsmedel. Oxidationen sker i lätt basisk lösning med väteperoxid. <b>Riskbedömning:</b> Krom(VI)joner är carcinogent.	Multivitamin tabletter Rinil Lomudal Hälsokostaffär
<b>Magnesium, <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	För att lösa magnesiumsalter i vatten behövs ofta lite utspädd salpetersyra. Om lösningen behandlas med ammoniumklorid och ett	Link Novalukol Magnesiumrecip

	överskott av ammoniak bildas inte någon fällning. Om en natriumfosfatlösning tillsätts den ammoniakalkaliska lösningen ovan bildas en vit fällning.	Rennie I hälsokostaffär
<b>Mangan, Mn<sup>2+</sup></b>	En tablett föraskas genom uppvärmning i degel. Mangan(II)jonerna oxideras under försiktig kokning med kaliumperjodat (KIO <sub>4</sub> ) i sur lösning till permanganatjon. Den bildade jonen är lilafärgad i vattenlösning. <b>Riskbedömning:</b> Riskabelt arbetsmoment vid föraskning	Multivitamintab etter I hälsokostaffär
<b>Molybden, Mo<sup>2+</sup></b>	Det finns ingen enkel analysmetod. Identifiering sker med atomabsorbtion.	Multivitamin- tabletter Hälsokost
<b>Natrium, Na<sup>+</sup></b>	Fukta natriumsalt med några droppar koncentrerad saltsyra. Varning! Testa ”pastan” med bunsenbrännare som ger gul lågfärg. <b>Riskbedömning:</b> Riskabelt arbetsmoment med konc.HCl	Fluor-tabletter Natrium- bikarbonat
<b>Selen, Se<sup>2+</sup></b>	Det finns ingen enkel analysmetod. Identifiering sker med atomabsorbtion.	Mjällschampo Selentabletter
<b>Svavel i organiska föreningar</b>	Svavel oxideras till sulfat och identifieras som sulfat. Se nedan.. Lös ca 20 mg substans i 15 cm <sup>3</sup> vatten och tillsätt 2 cm <sup>3</sup> väteperoxidlösning. Låt oxidationen fortgå och mot slutet kokas lösningen försiktigt i 10 minuter. Tillsätt vatten om det är nödvändigt.	Sevorex mjällschampo
<b>Sulfatjon, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfatjoner bildar en fällning med bariumjoner. Fällningen är olöslig i saltsyra	Fyllnadmedel Ascoxal Solvezink
<b>Zink, Zn<sup>2+</sup></b>	Zinksalt i lösning behandlas med kalilumhexacyanoferratlösning (K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ), ger en vit eller grönvit fällning. Fällningen är olöslig i utspädd saltsyra	Solvezink Multivitamin- tabletter I hälsokostaffär

## Till läraren

<b>Aluminium, Al<sup>3+</sup></b>	<p>Aluminium förekommer i vår miljö men inte i organismer. Sura födoämnen som varit i kontakt med aluminium kan innehålla förhöjda värden. Vissa antacida, medel som neutraliserar syror, innehåller aluminiumhydroxid. Absorptionen i tarmen är låg ty aluminiumjonens löslighet är liten vid tarmens pH. Aluminiumjoner kan binda till järntransportörerna vid järnbrist. Aluminiumjoner har hög affinitet till fosfatföreningar och lagras i skelettet där de ersätter kalciumjoner. Under en människas livstid tycks en långsam ackumulering ske i neuroncellkärnor och detta misstänks ha samband med Alzheimers demens.</p>
<b>Fluor, F<sup>-</sup></b>	<p>Fluoridjoner har frakturprofylaktisk effekt tillsammans med kalcium, D-vitamin, östrogen och anabola steroider. Fluoridjoner förekommer i olika mediciner där väte substituerats. Motgift mot höga halter av fria fluoridjoner i blodet är mjölk eller laktat.</p>
<b>Jod, I<sup>-</sup></b>	<p>Kroppen innehåller normalt 80 µmol jod (10 mg), det mesta finns i sköldkörteln (tyroidea). Jod är beroende av kontinuerlig tillförsel. Mängden jod i kroppen är proportionell mot utsöndring i urin. Upptag av jod sker genom aktiv transport.</p> <p>Jod finns mest i havsfisk och endast låga halter i insjöfisk, kött och mejeriprodukter. Därför tillsätts jodidjoner i salt.</p>
<b>Järn, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup></b>	<p>Hemoglobinhalten är ett mått på mängd järn i blod. Venblod eller kapillärblod tas i rör med EDTA (som antikoagulant). Fe<sup>2+</sup> oxideras till Fe<sup>3+</sup> med Drakins lösning (kaliumcyanid och kaliumferrihexacyanid) och mäts i spektrofotometer vid 540 nm. Normalvärde är 110–160 g/dm<sup>3</sup>. Höga värden (&gt;190 g/dm<sup>3</sup>) kallas polyglobuli och kan bero på</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Absolut ökning av totala hemoglobinvärdet</li><li>• Låg halt av plasmavolym (vanligare) vid vätskeförlust, intorkning, diabetes, diuretikaanvändning</li><li>• Sekundär ökning p.g.a. erytropoetinutsöndring vid sjukdom</li><li>• Dopning av EPO (erytropoetin är ett naturligt förekommande hormon som reglerar mängden blodkroppar. Halten EPO ökar vid vistelse på hög höjd eller med "höghöjds" träning)</li><li>• Stresspolycytemi hos rökare</li></ul> <p>Låga värden innebär anemi. Orsakade av t.ex. kraftiga menstruationer, vit B<sub>12</sub> och/eller folsyra brist t. ex. hos veganer, malabsorption och/eller malnutrition, alkoholism eller graviditet</p> <p>Järnbrist är vanligt hos människor i stora delar av världen, mera sällan hos djur. Järn är mera svårtillgängligt i jordbruksprodukter än i animalisk kost. Det mesta av behovet av järn kommer från järnets inre kretslopp, från sönderfallande erythrocyter. Absorption av järn sker med vitamin C.</p>
<b>Kalcium, Ca<sup>2+</sup></b>	<p>Ca 2% dvs. 1,2 kg av kroppen består av kalciumjoner. 45 % är i joniserad form eller bundet till albumin. Kalcium behövs för musklerna och nervernas funktion, för att bygga upp benvävnad och för att blodet ska koagulera. Behövs även för vissa enzymer och mot benskörhet.</p> <p>Kalcium är viktigt för :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Neuromuskulär funktion</li><li>• Hjärt-kärlfunktion</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tromocytfunktionen och koagulering</li> <li>• <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math> -pumpen och membranpotentialen</li> <li>• Fungerar som antagonist till kaliumjonen</li> </ul> <p><math>\text{Ca}^{2+}</math> regleras av vitamin <math>\text{D}_3</math>, som är den aktiva delen av vitamin D. Vitamin <math>\text{D}_3</math> ökar resorbtionen av kalcium från njurar och ökar även resorbtionen av fosfat från tarmen.</p> <p>Symptom: Trötthet, svaghet, muskelryckningar som kan öka till kramper i framförallt i händer och fötter och stickningar kring munnen.</p>
<b>Kalium, <math>\text{K}^+</math></b>	<p>är de viktigaste jonen i den intracellulära vätskan där den upprätthåller den neuromuskulära transmissionen, deltar i <math>\text{H}^+</math>-regleringen samt i <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math> -pumpen. Kalium är nödvändig för proteinsyntesen och många enzymatiska processer. I kroppen finns ca 3500 mmol. 75% av halten kalium finns i musklerna</p> <p>Symptom vid låga halter kalium: Nedsatt koncentrationsförmåga, trötthet, irritabilitet, muskelsvaghet.</p>
<b>Klor, <math>\text{Cl}^-</math></b>	<p>Ca 2,1 mol eller 75 g i kroppen. Kloridjonen är den vanligaste extracellulära jonen. Natriumklorid återupptas (resorberas) av njurarna. I magen finns 140 mmol/dm<sup>3</sup>. Svett innehåller ca 40 mmol/dm<sup>3</sup>.</p> <p>Analys av natriumklorid sker vid misstanke på cystisk fibros. Svett från dessa patient har höga halter av natriumklorid.</p>
<b>Koppar, <math>\text{Cu}^{2+}</math></b>	<p>Den totala mängden koppar är ca 1,3 mmol (80mg). Den största delen är lagrad i levern bundet till depåproteinet metallotionein och i hjärnan. Koppar absorberas i tarmen och transporteras med albumin. Koppar ingår i flera enzymer t.ex.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cytokromoxidas tillsammans med järn</li> <li>• vid deaminering av lysin i brosk,</li> <li>• i superoxiddismutas som tillsammans med ett zink-enzym oskadliggör reaktiva peroxider och hydroxylradikaler.</li> </ul> <p>Koppar förekommer i katekolaminmetabolismen (katekolamin är grupp som består av bl.a. dopamin, noradrenalin, adrenalin och är transmittorsubstanser). Vid Mb Wilsons sjukdom anlagras koppar till skadliga nivåer. Patienten med den sjukdomen får en liten mängd penicillinamin som komplexbinder koppar.</p>
<b>Krom, <math>\text{Cr}^{3+}</math></b>	<p>Deltar i omsättningen av blodsocker. Brist ovanligt. Då krom förekommer inom metallurgin, färgindustrin och i många kemiskt tekniska sammanhang förekommer förgiftningar inom vissa yrkesgrupper. Krom(III) föreningar är svårslösliga, tas inte upp i kroppen och klassas inte som giftig. Däremot klassas krom(VI) som giftig, carcinogen och ett miljögift. Krom(VI) tas lätt upp i tarmen eftersom den liknar sulfatjonen. Där omvandlas den med glutationsystemet till krom(III). Kromjonen bildar komplex med många biomolekyler, som troligen svarar för de toxiska effekterna.</p>
<b>Magnesium, <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	<p>är en intracellulär jon och nödvändig för</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolhydrat-, protein-, lipid- och nukleinsyra-metabolismen.</li> <li>• <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-pumpen</li> <li>• Oxidativ fosforylering i mitokondrier</li> <li>• Syntes av acetylkolin samt muskulaturens känslighet för stimuli.</li> </ul> <p>Det finns ca 1 mol i kroppen. Behovet ökar vid uppbyggnad (anabolism) av vävnad. Kaliumhalten påverkar upptaget av magnesium eftersom jonerna</p>

konkurrerar om samma resorptionsmekanism.

Några orsaker vid låg halt av magnesium: Alkoholism, långvariga förluster (kräkningar, diarréer), kalciumbrist, sen behandling av diabeteskoma

Symptom: Trötthet, nedsatt koncentrationsförmåga och depression. Patienten har en känsla av att vara inpackad i bomull samt upplever en osäker gång

<b>Mangan, Mn<sup>2+</sup></b>	Mangan förekommer som kofaktor vid glykolysen. Pyruvatkinas katalyserar reaktionen när ATP bildas genom överföring av en fosfatgrupp till ADP från fosfoenolpyruvat. Mangan deltar i fotosyntesen.
<b>Molybden, Mo<sup>2+</sup></b>	Vid nerbrytning av puriner (t ex från nukleinsyror) ingår xantoxidas, ett flavoenzym med molybden och fyra järn-svavelcentra. Resultatet är urinsyra.
<b>Natrium, Na<sup>+</sup></b>	<p>Natriumbrist kopplas alltid med vattenbrist då natrium bara kan utsöndras med vatten. Det är den extracellulära vätskan (ECV) som påverkas. Kombinerad vatten/natriumbrist sker på tre sätt</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kräkningar, diarré och förluster av vätska, saltsyra och K<sup>+</sup> och Na<sup>+</sup></li><li>• Brännskador och kraftiga svettningar via huden</li><li>• Njurförluster med osmotisk diures och njursvikt</li></ul> <p>Natriumöverskott förekommer vid höga vid ökat intag av salt, dålig njurfunktion och vid hjärtsvikt.</p>
<b>Selen, Se<sup>2+</sup></b>	<p>Är en essentiell, icke metalliskt jon som liknar svavel. Selen tas upp från jorden till växter och inkorporeras i stället för svavel i aminosyror selenocystein och selenometionin. Biotillgängligheten varierar beroende på i vilken form den tillförs i och ökar i närvaro av antioxidanter vit. A, C och E. Selen ingår i aktiva centrum i glutathionperoxidas (tre aminosyror = glutamat-cystein-glycin) som katalyserar två olika reaktioner</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• reaktionen med peroxid och glutathion (GSH): Denna reaktion sker även med katalas.</li></ul> <p><math>\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ROH} + \text{GSSG}</math></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Reducerar lipohydroxiperoxider till hydroxysyror</li></ul> <p>Brist: I Kina förekommer Keshansjukdomen som är en kardiovaskulär sjukdom hos framför allt kvinnor och barn. Behandlas med framgång med natriumselenit. Vid låga halter av selen: minskad prostaglandinsyntes, ökad trombocyttaggregation och låg glutathionperoxidasaktivitet.</p>
<b>Zink, Zn<sup>2+</sup></b>	<p>150-250 µmol zink i kroppen. Mer än 200 zink-metallenzym har identifierats. Nödvändig för tillväxt, reproduktion och sårhäkning.</p> <p>Zink</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• ingår i biomembran och i hormon-receptorkomplex.</li><li>• stabiliserar RNA- och DNA-strukturer och reglerar DNA-transkriptionen,</li><li>• deltar i celldelning, cellulär immunitet och</li></ul>

European Pharmacopeia, 1977

Vätskebalans av Finn Redke Studentlitteratur ISBN 91-44-49181-6

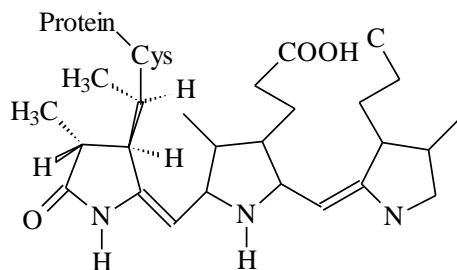
## Hur kan ett proteins struktur påverkas?

En studie i intermolekylära krafter.

Naturliga proteiner är polymerer av 20 olika aminosyror. Proteinets egenskaper bestäms av de aminosyror som ingår i proteinet. Proteiner är veckade och har en specifik tredimensionell struktur, som hålls ihop av vätebindningar och svavelbryggor, jonbindningar och van de Waals krafter. Rymdstrukturen bildas spontant genom hydrofob effekt. Denaturering innebär att proteinets naturliga struktur ändras så att proteinets funktion förloras. Höga och låga pH-värden gör att proteiner denatureras genom att vätebindningar och jonbindningar bryts. Denaturering kan också göras med organiska lösningsmedel, som medför att lösligheten för sidokedjor på opolära aminosyror ökar.

Proteinet som ska studeras kommer från i en cyanobakterie (blå-grön alg), *Spirulina*.

*Spirulina* kan köpas i hälsokostaffärer och äts som näringstillskott med höga halt av proteiner och antioxidanter. Det protein som ska studeras kallas fykocyanin. Proteinets innehåller en liten molekyl som sitter bunden i proteinet. Molekylen är tetrapyrrol som samlar upp fotoner i fotosyntesen. Om proteinkomplexet är blått sitter tetrapyrrol korrekt bunden i proteinet.



Proteinkomplexet kan emittera rött ljus (fluorescens) vid belysning. Detta visar att fotoner tas upp. Om färgen försvinner (avfärgas) så är inte tetrapyrrolen intakt eller korrekt bunden, kanske har den till och med lossnat från proteinet. Om färgen är mjölkvit så har även proteinet denaturerats.

**Riskbedömning:** Urea kan vara miljöskadligt för vattenorganismer. Lösningar samlas upp. Aceton är brandfarligt. Laborationen bedöms ha liten risk.

**Utrustning:** Mortel, pistong, sand, centrifug med rör, provrör, UV-lampa, lösningar (nedan)

### Utförande:

1. Väg upp 0,5 g spirulinapulver eller ta en kapsel och häll ut innehållet.
2. Väg upp ca 0,5 g fin sand.
3. Mortla Spirulina och sand ordentligt i ca 3 min så att alla cellväggar går sönder och släpper ut proteinet. Ju mer du mal desto bättre utbyte.
4. Dela upp innehållet i två centrifugrör och tillsätt 7 ml 0,1 mol/dm<sup>3</sup> fosfatbuffert pH 7 i varje rör. Sätt kork på rören och blanda genom att vända rören eller röra med en glasstav. Se till att rören väger lika mycket vid centrifugeringen.
5. Centrifugera i en bordcentrifug i ca 2 min.
6. Efter centrifugeringen sug upp med pipett så rent som möjligt supernatanten (överlösningen). Du bör ha fått fram en klar och mörkblå lösning. Späd den med fosfatbuffert till ca 15 cm<sup>3</sup> (Om lösningen är grönfärgad så centrifugera ännu en gång eller filtrera lösningen genom ett filterpapper till en E-kolv. Blöt filterpappret med lite buffertlösning före filtreringen.)
7. Gör följande experiment och fyll i tabellen. Till 13 rör tillsätts 1 cm<sup>3</sup> proteinlösning och 5 cm<sup>3</sup> av följande lösningar:

	Tillsätt följande lösningar till proteinlösning	Hur ser lösningen ut? -klar eller grumlig -blå eller vit	Ger lösningen röd fluorescens vid belysning? Hur många % av referens	Är proteinet intakt, eller denaturerat? Vad är orsaken till denaturering
1.	0,10 mol/dm <sup>3</sup> fosfatbuffert pH 7 (Ref.)	Referens klar blå	100%	Proteinet är intakt
2.	0,10 mol/dm <sup>3</sup> natriumklorid			
3.	Dest.vatten			
4.	Aceton			
5.	6,0 mol/dm <sup>3</sup> Urea			
6.	Ca 5% tvållösning			
7.	1,0 mol/dm <sup>3</sup> sackaros			
8.	1,0 mol/dm <sup>3</sup> HCl			
9.	1,0 mol/dm <sup>3</sup> NaOH			
10.	Kyld 0,10 mol/dm <sup>3</sup> fosfatbuffert			
11.	0,10 mol/dm <sup>3</sup> fosfatbuffert, värm till 50°C			
12.	fosfatbuffert, skaka <b>mycket kraftigt</b>			
13.	Testa med en tungmetalljon t.ex. Pb <sup>2+</sup>			

Hur påverkar aceton, syra och bas, kyla/värme och skakning proteinet och varför?

Urea är mycket vattenlösligt och har starka intermolekylära krafter. 6 mol/ dm<sup>3</sup> är möjligt att tillverka. Vilken molekyl binder starkast till vatten, proteinet eller urean?

Hur klarar proteinet socker, tvål och salt?

Rapporten ska innehålla: Resultat och förklaringar till varje delexperiment.

**Till läraren:**

	<b>Tillsätta lösningar</b>	<b>Resultat</b>	<b>Orsak och förklaring</b>
1	0,10 mol/dm <sup>3</sup> fosfatbuffert pH7	Blå	Rätt pH och jonstyrka för att proteinets struktur ska bibehållas
2	0,10 mol/dm <sup>3</sup> natriumklorid	Blå	Rätt pH och jonstyrka för att proteinets struktur ska bibehållas. Koncentrationen av fosfat är tillräcklig för att ge rätt pH.
3	Dest.vatten	Blå	Rätt pH och jonstyrka för att proteinets struktur ska bibehållas. Koncentrationen av fosfat är tillräcklig för att ge rätt pH. Utspädningen är minimal
4	Aceton	Grumlig/vit	Aceton ändrar lösningens polaritet. Proteinet denatureras eftersom lösligheten för opolära aminosyror ökar. Aceton är en vattenlöslig keton som står i jämvikt med enolformen (liknar alkohol)
5	6,0 mol/dm <sup>3</sup> Urea	Klar lösning Alt.fällning	Liten molekyl som binder upp vattnet med vätebindningar, hydrofoba effekten påverkas, proteinets struktur ändras, t ex runt tetrapyrrol. Proteinet kan även aggregera och bilda en fällning. Urea "tar allt vatten".
6	Ca 5% tvållösning	Klar lösning	Tvålens lipofila ände "kryper in i proteinet", bryter upp strukturen. Proteinet hålls i lösning eftersom "tvålens" polära ände ger en polär funktion till proteinet.
7	1,0 mol/dm <sup>3</sup> sackaros	Blått	Koncentrationen av fosfat är tillräcklig för att ge rätt pH. Sackaros har ingen egen effekt.
8	1,0 mol/dm <sup>3</sup> HCl	Vitt eller klar	Påverkar vätebindningar och jonbindningar. Mängd och tid inverkar
9	1,0 mol/dm <sup>3</sup> NaOH	Klar eller vitt	Påverkar vätebindningar och jonbindningar. Mängd och tid inverkar
10	Kyld fosfatbuffert	Blått eller mörkare blått	Strukturen kan ändras eftersom molekylers rörelse minskar. Förstörs dock normalt inte om inte sänks så att vattenstrukturen ändras.
11	Fosfatbuffert, värm i vattenbad	Vitt	Proteinet denatureras. Ökad värmerörelse stör de intermolekylära intraktionerna
12	Fosfatbuffert, skaka i minst 2 minuter	Vitt skum vit/klar lösning	Mekanisk chock. Det ska bildas en skum ovanpå lösningen. Proteinet är inte längre vattenlösligt.
13	Tungmetall-jon	Vi fällning	Det bildas en irreversibel fällning med svavlet i metionin.

# Isolering och spektrofotometrisk analys av ett protein

Denatureringsstudier av icke-kovalenta krafter i ett protein i *Spirulina*

Aminosyrorna bestämmer den primära strukturen i ett protein. Veckningsmönstret i proteinet uppehålls av svavelbindningar och bibehålls av de icke-kovalenta krafterna. Dessa är:

1. Van der Waals krafter,
2. Vätebindningar,
3. Elektrostatisk interaktion och
4. Hydrofoba effekter.

Varje förändring i en proteinlösningen kan påverka dessa krafter och proteinet kan denatureras. Denatureringen kan ske reversibelt eller icke reversibelt. För att studera förändringar i ett protein kan man variera

- a) Temperatur,
- b) Jonstyrka,
- c) pH,
- d) Polariteten hos proteinet eller
- e) Tillsats av kaotropiskt medel. Guanidin HCl, urea och kaliumtiocyanat ökar lösligheten av icke polära substanser i vatten och stör den hydrofoba interaktionens kontroll i proteinets veckning.

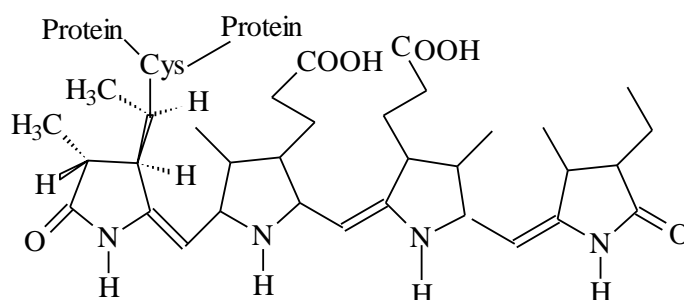
*Spirulina* kan köpas i hälsokostaffärer och äts som näringstillskott för med höga halt av proteiner och antioxidanter. Du ska studera ett fykobiliprotein, ett proteinkomplex hos den procaryota blågrönalgen, *Spirulina*.. Proteinkomplexet sitter membranbundet i tylakoiderna och deltar i fotosyntesen. Det blå intakta proteinkomplexet ger ifrån sig ett rött fluorescerande ljus när man lyser med en UV-lampa på provet (254nm). Detta kan man även se med ett obeväpnat öga!

Proteinkomplexet kallas fykocyanoblobilin och består av proteinerna allofykocyanin och fykocyanin. Proteinerna kan identifieras genom absorbans av synligt ljus. Allofykocyanin har sitt absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max}$ ) vid 650nm och fykocyanin vid 625nm. Pigmenten består av tetrapyrroler som är kovalent bundna till polypeptider med svavelbryggor från cystein. Proteinkomplexet är känsligt mot förändringar i lösningen. Varje förändring kan registreras med absorptionspektrum.

Olika lab-grupper får olika denatureringsmedel och redovisar resultaten för kamraterna.

**Riskbedömning:** Urea och kaliumtiocyanat är miljöfarlig i höga koncentrationer.

Fig. 1. Strukturen av den fotoninfångande delen hos fykocyanoblobilin binder kovalent till polypeptiden med en cystein



## Lösningar och material:

*Spirulina*

0,1 mol/dm<sup>3</sup> kaliumfosfatbuffert pH 7

Ammoniumsulfat

8M urea

8M kaliumtiocyanat

etanol

30mM ättiksyra

30mM natriumhydroxid

**Utförande:** Denna mängd räcker för en hel labgrupp.

1. Väg upp 2 g spirulinapulver eller töm 4 kapslar tillsammans med lika mängd sand. Mortla sönder cellväggarna i 4 minuter. Effektiv malning ökar utbytet.
2. Överför massan med ca 50 cm<sup>3</sup> 0,1 M kaliumfosfat pH 7 buffert till centrifugrör och centrifugera ner partiklar i en bordcentrifug.
3. Pipettera av överlösningen (supernatanten) till en 250 cm<sup>3</sup> bägare och tillsätt buffert till ca 100 cm<sup>3</sup>.
4. Fäll ut fykobili-proteinerna genom att tillsätta 29,5 g ammoniumsulfat. Rör försiktigt i 15 min och centrifugera ner fällningen i maximal hastighet ca 10 min.
5. Släng bort supernatanten (supen) och lös upp fällningen i 25 cm<sup>3</sup> fosfatbuffert. Lösningen kan förvaras i kylskåp i ca en vecka.
6. Var noga med att mäta upp rätt mängder av de potentiella denaturanterna.
  - a) 8 M urea
  - b) 8M KSCN
  - c) etanol
  - d) destillerat vatten
  - e) 30 mM ättiksyra
  - f) 30 mM natriumhydroxid
  - g) tillförd värme från 20 till 50°C
  - h) aceton

**Försöksplan för urea, kaliumtiocyanat, destillerat vatten, ättiksyra eller natriumhydroxid**

Rör nr	Volym fykobili-proteinlösning (cm <sup>3</sup> )	Volym K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -buffert (cm <sup>3</sup> )	Volym av potentiell denaturant (cm <sup>3</sup> )	pH vid HAc/NaOH eller temp. (20-50°C)	Absorbans vid 625 nm
1	0,10	3,00	0,00		
2	0,10	2,25	0,75		
3	0,10	1,50	1,50		
4	0,10	0,75	2,25		
5	0,10	0,00	3,00		

**Försöksplan för etanol**

Rör nr	Volym fykobili-proteinlösning (cm <sup>3</sup> )	Volym K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -buffert (cm <sup>3</sup> )	Volym av potentiell denaturant (cm <sup>3</sup> )	Absorbans vid 625 nm
1	0,10	3,00	0,00	
2	0,10	2,60	0,40	
3	0,10	2,20	0,80	
4	0,10	1,80	1,20	
5	0,10	1,50	1,50	

7. Gör en graf på rör nr 1 genom att mäta varje 25 nm med start från 500 till 750nm. På övriga rör görs mätningar på 625nm eller den våglängd som har den högsta absorbansen. Samma våglängd för hela gruppen
8. Studera skillnaderna i absorbans. Redovisa resultaten inför gruppen

**Till läraren:**

Proteinreningen kan göras i förväg till hela gruppen. Istället för att mala sönder cellväggarna kan man ta en sondikator eller inkubera med lysozym (0,1 mg/ml enzymkoncentration) i 1 timme vid 37°C. Om lösningen är grön så finns det klorofyll kvar. Närvaro av klorofyll gör att man inte kan se fytyocyaninets fluorescens men påverkar inte denatureringsstudierna. Gör en ny centrifugering. Kaliumfosfat och kaliumtiocyanat kan ersättas med motsvarande natriumsalter. Aceton har samma effekt som tillsats av dodecylsulfat (SDS)

Detergent	Resultat och förklaring
Urea	Konkurrerar om vattnet.
Kaliumtiocyanat	Höga halter fäller proteinet (Se nedan abs 0,820)
Dest.vatten	Ingen större påverkan. Bra som jämförelse!
Etanol	Stör den hydrofoba effekten. Proteinets kan denatureras vid höga halter
Ättiksyra	Har lite påverkan. Koncentrationen kan inte höjas ty då denaturerar proteinet. Ta upp diskussion om isoelektrisk punkt
Natriumhydroxid	Har lite påverkan. Koncentrationen kan höjas se nedan
Värme	Ej kontrollerat men bör denaturera proteinet vid höga temperaturer

**Absorbans**

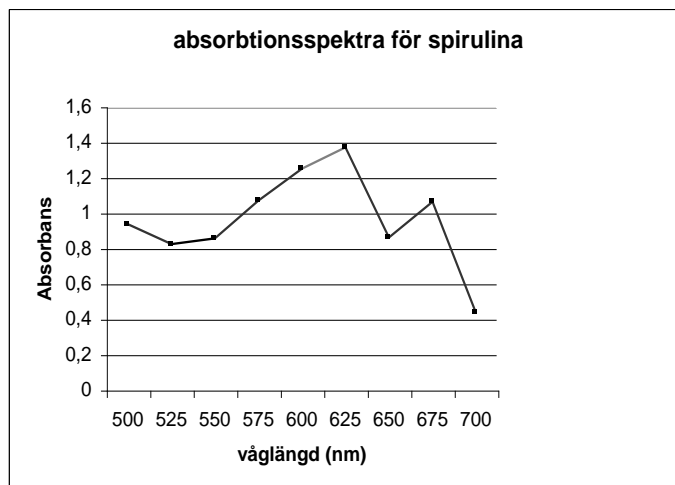
Rör nr	Urea	KSCN	Etanol	Dest vatten	HAc	NaOH	värme
1	0,309	0,313	0,320		0,340	0,344	
2	0,295	0,293	0,090		0,320	0,336	
3	0,260	0,245	0,085		0,301	0,287	
4	0,178	0,253	0,320		0,305	0,336	
5	0,174	0,176	0,031		0,295	0,372	
6	0,072	0,820	0,090		0,288	0,325	

Man kan även ta andra ämnen eller koncentrationer såsom

Sackaros	0,1 M	1 M
lösning 1	NaOH	NaOH
M		

0,345	0,312	0,310
0,350	0,337	0,174
0,357	0,342	0,065
0,392	0,328	0,106
0,405	0,210	0,062
0,425	0,159	0,040

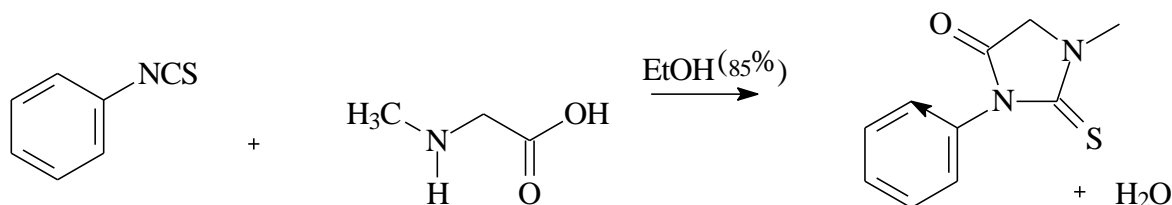
J.Chem.Edu. 2000 77 1458



## Tillverka tiohydantoin med en mikrovågsugn

**Teori:** Tiohydantoin är ett utgångsämne till några mediciner tex vid syntetisk tillverkning av hormonet tyroxin. Organisk syntes med hjälp av mikrougn är en teknik på starkt kommande. Fördelen är att man kan ha högt tryck och temperatur, syntestiden går ner och produkten blir renare. Man använder en speciell mikrovågsugn och inte ugnar för hemmabruk. Du ska i denna laboration använda dig av en konventionell ugn för hemmabruk när du tillverkar din tiohydantoin.

**Utgångsämnen:** Fenylisotiocyanat och en N-substituerad aminosyra. Här ser du reaktionsformeln när man som i detta fall använder N-metyl glycin (Sarcosine)



Fenylisotiocyanat

N-metylglycin

Tiohydantoin

### Utförande:

1. Väg upp 5 mmol fenylisotiocyanat och 5 mmol N-metylglycin. i en kolv. (Ekvivalenta mängder)
2. Tillsätt ca 10 cm<sup>3</sup> 85% etanol
3. Sätt in kolven i en vanlig mikrovågsugn och sätt på maximal effekt i 3 minuter
4. Ta ut kolven och se om tiohydratiolen faller ut. Om inte kör ytterligare 2 min
5. Filtrera genom filtertratt med sugfiltrering. Tvätta fällningen med kall etanol. Sug torr och väg produkten

**Rapport:** Räkna ut molförhållandet mellan fenylisotiocyanaten och den N-substituerade aminosyran. Beräkna utbytet från den föreningen som det fanns minst av (begränsande reagens).

Titta i FASS eller en läkemedelsbok efter läkemedel som liknar tiohydantoin. Försök att se om man kan använda tiohydantoiner vid syntes av dessa läkemedel.

### Till läraren:

Här några exempel där en tiohydantoin kan ha varit utgångsämne.:

Tiokrom liknar även Vitamin B<sub>1</sub> (tiamin)

Tiopental

Kloropromazin verksamt substans Hibernol

Karbimazol, Tiamazol (Thacaprazol) och Propyltiouracil (Tiotil)

Hydantionderivat som phenytoinum och fosphenytoinum

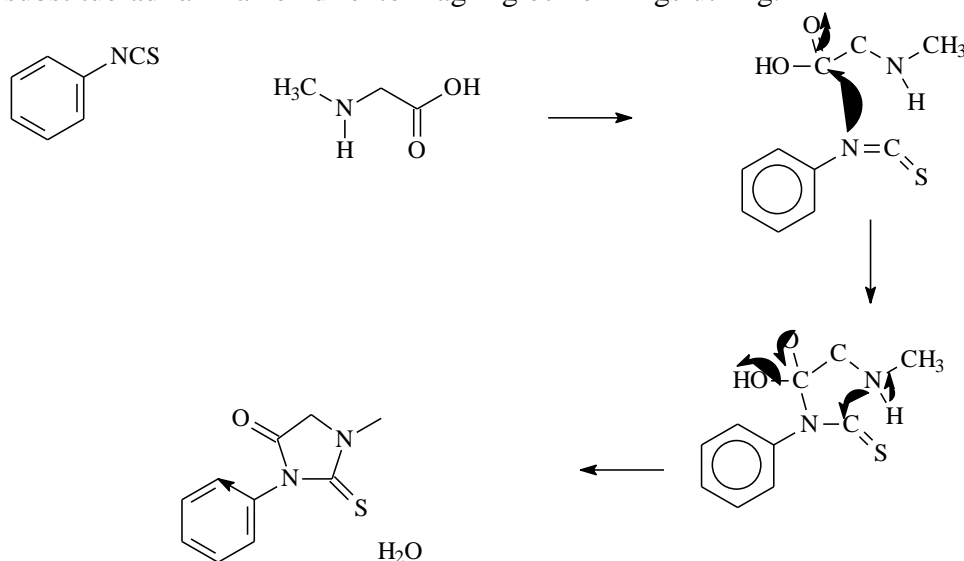
Tag ca 500 mg N-metylglycin och 750 mg fenylisotiocyanat.

Om man använder andra N-metylerade aminosyror än den föreslagna N-metylglycin så behövs en bas. Tillsätt en ekvivalent mängd trietylamin (Et<sub>3</sub>N) eller pyridin.

Tiden kan variera beroende på mikrovågsugnens effekt. Men ca 1 min vid 45 °C borde ge bra resultat. Etanol har en ganska hög dielektricitetskonstant och tar upp värme bra. Dipoler tar upp vågorna bättre än icke dipoler.

Om inte produkten faller direkt, så vänta ett tag och/eller tillsätt lite vatten.

Mekanismen liknar Erdman degradering av polypeptid, men eftersom aminosyran är substituerad får man en direktomlagring och en ringslutning.



Av Jacob Westman, Personal Chemistry, Uppsala

## Säkerhetsföreskrifter vid mikrobiologiskt arbete

Vid mikrobiologiskt arbete finns det i princip tre sätt att bli infekterad av de organismer som man arbetar med.

- Genom huden, särskilt om den är skadad
- Genom munnen och slemhinnor
- Genom luftvägar

### Generella säkerhetsföreskrifter

1. Tvätta händerna med tvål och vatten före, efter laborationen och vid ev. avbrott i arbetet.
2. Rengör på bänkar och i dragskåp före och efter arbete med 70%-ig etanol. Använd hela tiden personligt skydd – glasögon och labbrock (med långa ärmar). **Bind upp håret!**
3. Alla mikroorganismer ska betraktas som potentiellt patogena.
4. Använd ej peluesboll för att pipettera lösningar med mikroorganismer. Om du ändå måste göra det proppas pipetterna med bomull för att förhindra spridning.
5. Allt infekterat material ska avdödas innan det slängs eller diskas. Detta görs beroende på mikroorganism, material som ska rengöras mm
  - a) genom autoklavering (upphetning i 20 minuter med 1 atm överttryck),
  - b) nedsänkning i 70 %-ig etanollösning (s.k medicinsk sprit)
  - c) 10% klorin-lösning (natriumhypoklorit)
6. Öppna mögelplattor med stor försiktighet så att inte sporer dammar ut. Inandning kan vara riskabelt.
7. För aldrig en platinös med mikroorganism direkt in i en låga. Då stötkokar nämligen vattnet och en aerosol av mikroorganismer uppkommer. Detta är ett av de mest kritiska arbetsmomenten då stora mängder mikroorganismer kan spridas genom ovarsamhet.

### Förberedelser före varje arbetstillfälle med mikrobiologisk arbete

Inför varje laboration där det förekommer mikroorganismer skall laborationshandledningen vara genomläst. Elever som inte visar nödvändiga kunskaper och förståelse får ej laborera förrän detta har inhämtats.

**Riskavfall** Sterila pipetter, E-kolvar, medier mm. lämnas ut vid laborationens början. Tänk på att bryta sterilförseglingar så att innehållet inte kontamineras med mikroorganismer. Utlämnat material återlämnas på särskild plats. Petriskålar med mikroorganismer, objektsglas och engångsutrustning kastas i rätt typ av riskavfallskartong märkt ”Smittförande glas eller papper”.

**Disk** Använda lösningar av mikrobiologiska kulturer samlas in i ett gemensamt kärl och autoklaveras före disk. Infekterat glas placeras i diskorgar, vilka sedan tas om hand och diskas. All märkning med tejp, penna etc. skall dock tas bort först.

**Agarmedier** Näringsmedier med agar bereds i mängder efter behov. Agarn behöver inte smältas, utan flaskorna autoklaveras med löst åtdragen kork. Plattorna gjuts eller agarn tempereras till 50°C för senare gjutning. Flaskorna ska före autoklavering märkas med spritpena på maskeringstejp (Märkning direkt på glaset försvinner vid autoklavering). Överbliven agar får inte spolas ner i vaskarna, då man lätt får agarproppar i avloppssystemet. Agarn hålls i plastpåsar som tillsluts och kastas. Flaskorna måste sedan omedelbart sköljas ur i hett vatten.

## Systematisk läkemedelsutveckling

Anteckningar efter samtal med Fil.dr. Kent Axelsson, Biovitrum

Att få fram nya läkemedel är en grannlaga uppgift. Med en systematisk metod ”finkammas” alla möjligheter. Metoden heter *High throughput screening*. Man kan snabbare få fram *aktiva substanser* som testas och sedan modifieras för att så småningom komma till fram till en läkemedelskandidat. Läkemedelskandidaten går vidare till kliniska prövningar. De kliniska prövningarna indelas i tre faser innan ett nytt läkemedel kan tillverkas, saluföras och användas. Här en genomgång av proceduren från idé till den inledande kliniska prövningen. Biovitrum är ett bioteknikföretag som har avknoppats från Pharmacia. Affärsidén är att ta fram läkemedelskandidater, som sedan säljs vidare till andra läkemedelsföretag. Man har identifierat två stora indikationsområden, där man vill utveckla nya läkemedel. Det handlar om de metaboliska sjukdomar: diabetes och fetma

### “*High throughput screening*”.

Man kan hitta nya mediciner genom att extrahera biologiskt aktiva föreningar ur naturen. Det kan dock vara ett mödosamt projekt med varierande resultat. Nu utvecklas potentiella läkemedel genom ett nytt tänkesätt och ett nytt koncept, ”High throughput screening”, dvs. snabb genomsökning med hjälp av kemiska bibliotek. I ett kemiskt bibliotek med kemiska föreningar med mycket varierande egenskaper.

DNA från många organismer är idag kartlagda. I *Hugoprojektet (Human Genom)* har man bestämt det mänskliga genomet. Evolutionärt lägre stående arter har likheter med människans DNA-kedja. Mänskliga gener kan därför sig uttryckas i bakterie- eller insektsceller. Även rekombinanta humana proteiner kan produceras i cellodlingar som efter rening användas som läkemedelstargets. Proteinerna testas med substansbiblioteket.

### **Targetvalidering**

*Tid: 6-12 mån*

En sjukdom kan bero på att för mycket, för litet eller felaktigt protein bildas. Detta kan bero på fel i DNA-kedjan, fel i regleringen eller fel i kontrollen av ett genuttryck. Det kan vara en förändring i ett operon eller i en repressor (de reglerar transkriptionen). Felet kan vara ärftlig eller inducerat av något i miljön eller livsstilen.

För att utveckla ett läkemedel mot en sjukdom måste man först identifiera felet och sjukdomens konsekvenser, den så kallade måltavlan eller ”target”. Man kan förändra genen som kodar för tillverkning av ett protein genom:

- mutation
- knock-out (inaktivering av en gen).
- amplifiering (förstärker så att det finns många duplikat)

och får på detta sätt fram symptomen för sjukdomen.

Förändringen påverkar cellerna så att mer eller ibland mindre mängd av ett protein tillverkas, beroende på vilket mål (target) man har valt. Förändringen kan vara:

- ett enzym som kanaliserar en reaktion
- ett hormon
- en receptor
- ett protein
- en jonkanal mm.

### **Targetproduktion.**

*Tid: 2-3 mån.*

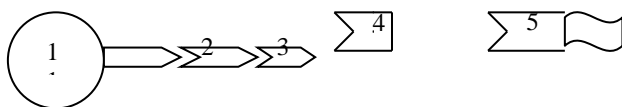
I detta skede väljer man en lämplig celltyp för cellodling. I cellen transfekteras en vektor in med hjälp av traditionell hybridteknik. Ett restriktionsenzym klipper upp DNA-kedjan och en

extra DNA-kedja sätts in. Enzymet ligas återsluter kedjan. Vektorn är den DNA-sträng som kodar för ett humant protein t.ex. en insulinreceptor.

### **Analys(test)utveckling**

**Tid: 2 mån**

På små plastkuler av polyvinylklorid sätts en bit av den konstanta delen av en antikropp från mus (1). Om man vill studera t.ex. insulinets inverkan på cellen, sätter man på en anti-insulinreceptor (2), alltså ett antikropp mot människans (human) insulinreceptor. En sådan antikropp fås om man sprutar in receptorprotein i en mus. Då bildar musen en antikropp mot den mänskliga insulinreceptor. På anti-insulinreceptorn (2) fäster sig nu human-insulinreceptorn (3). På den yttersta receptorn, som är human, kan ett humant insulin fästa. Insulinet som används kopplas i sin tur till ett fluorescerande ämne. Ämnet stör inte effekten hos insulinet. Om man inte hittar ett fluorescerande ämne med lämpliga egenskaper kan man isotopmärka insulinet. När insulinet binder till receptorn, avges en ljusstråle, som kan mätas i en scintillator (en apparat som bestämmer fluorescensen). Fluorescensen är proportionell mot antalet märkta insulinmolekyler som fäster. Kemikalier från ett s.k. kemibiblioteket tillsätts i olika brunnar och får tävla med insulinet. Om en kemikalie fäster sig snabbare och/eller med högre attraktionskraft än insulinet, så blir det inget utslag på scintillationsräknaren. Man har fått en sänkning av aktiviteten.



Kula+antimus(1)  $\approx$  anti-receptor (2) $\approx$ receptor från människa (3)  
insulin (4) tävlar med "läkemedel"(5)

### **HTS med kemiskt bibliotek**

**Tid: 1-2 veckor Antal: ca 25000**

I ett kemiskt bibliotek finns ett stort antal olika molekyler. Det innehåller ett urval av kemiska/biologiska egenskaper som sura, basiska, lipofila, hydrofila, elektronegativa, stora och små molekyler. Listan kan göras lång. De representerar en "divergerad kemisk rymd" och består av ungefär 25000 substanser. Alla dessa ämnen testas genom att en robot sätter till vart och ett av ämnena till en framodlad target t.ex. ett humant enzym. Resultatet mäts därefter med en väl karakteriserad och standardiserad mätmetod (assay). Om man har fått en effekt av något slag (en interaktion) av ett ämne så kallas resultatet en "hit". Helst vill man ha flera "hits". "Hitsen" testas sedan i så kallade dos-responskurvor och man räknar ut  $K_i$  för reaktionen.  $K_i$  = inhibitions-konstant, Ett lågt värde på  $K_i$  (<100 nM) tyder på att det är en bra hämmare. Det optimala är att vid olika koncentrationer har man olika responser så att det bildas en sigmoidal dos-responskurva, dvs. ju mer av ämnet desto större effekt. Om ämnet inte har en dos-responskurva så betyder det att ämnet inte kan utsöndras. Då kan man inte reglera effekten, utan ämnet kommer att ackumuleras i kroppen. Detta kan ge svåra doseringsproblem och är helt oacceptabelt. Substansen kan inte användas som läkemedel. Substanserna rankas efter aktivitet och efter  $K_i$  (inhibitionskonstant). Låga värden på  $K_i$  eftersträvas. Man önskar få fram cirka 25 olika potenta substanser med lämpliga dos-responskurvor.

### **Kombinatorisk kemi, Substansoptimering**

**Tid: 12-18 mån**

Man studerar de 25 substansernas egenskaper och försöker förstå hur och varför substanserna kan fästa till receptorn, samt vilka likheterna och olikheterna som finns. Man syntetiserar ett varierande antal (300-500) analoger till dessa potenta substanserna genom att tillsätta substituenten och testa deras aktiviteter. Dessa kallas "Lead finding" och "lead"- optimering vilket slutligen ger "lead candidates" (1-4st).

### **Preklinisk forskning**

**Tid: 2-3 mån**

Nu testas "lead candidates" genom cellulär test med djurceller. Man studerar hur

- substanserna kommer in i cellen
- snabbt de tas upp
- de omsätts
- de metaboliseras (nedbryts)
- de utsöndras
- stor lösligheten är i cellen

Om en substans inte tas upp i cellen, men annars har intressanta egenskaper i cell-fria system går substansen tillbaka till organkemisterna. Då kan t.ex. en hydroxylgrupp på substansen öka lösligheten, och sedan testas detta på nytt. Denna process är också en del av "Lead" optimering. Läkemedelskandidater går vidare för att testas i djurförsök.

### **"Proof of principle" och toxicitet**

**Tid: 3-6 mån**

Den bästa eller de bästa kandidaterna undersöks vidare och en validering sker. Detta sker dels *in vivo* dels *in vitro*. *In vivo* ska enligt reglerna testerna ske med minst två djurarter (gnagare och däggdjur). Ofta används råttor och ett annat djur som inte är gnagare, t.ex. hund eller apa. Man följer naturligtvis upp, om man fortfarande erhåller avsedda effekter, om man får ökade eller minskade biverkningar och ämnenas toxiciteten.

### **Klinisk testning**

**Tid: 2-3 mån**

Fas 1 är test på människa där friska, frivilliga män testas. Syftet är att få fram information om tolerabelt dosintag, läkemedlets absorption, metabolism och biverkningar.

### **Fas 2 och fas 3**

**Tid: 3-4 år**

Denna fas omfattar kliniska test på riktiga patienter. Patientgruppens ålder och kön bör variera, men får inte ha andra sjukdomar än den som undersöks. Man optimerar effekten i dos-respons studier och tittar på biverkningar.

**Biovitrum och andra mindre läkemedelsföretags affärsidé:** Parallellt med den inledande kliniska fasen försöker man sälja hela konceptet till ett större läkemedelsbolag, som kan göra de stora kliniska prövningarna (Fas 3). De kliniska prövningarna är dyrbara och tar lång tid. Om produkten säljs ut, så är det nu först som den kan regenerera pengar. Ett komplicerat kontrakt säkerställer villkor och garantier för ev. framtida produkt. Royalties är vanliga. Alla kandidater kommer aldrig så långt som till "lead" optimering, utan ett projekt kan avbrytas när som helst. På Biovitrum arbetar ca 200 personer med ca 15 parallella och olika projekt. De anställda har ofta en akademisk utbildning, ofta från högskola och universitet. Biokemister, organiska kemister, läkare, apotekare och farmakologer finns representerade. Många är disputerade.

**Kent Axelsson** arbetar som forskare med ansvar för analys(test)utveckling inom flera projekt. Han är disputerad biokemist från Stockholms Universitet. Han har varit med om att utveckla 2 rekombinanta tillväxthormoner (Somatostatin, Somatotropin) och en rekombinant tillväxtfaktor (IGF). Han tycker att det är ett spännande arbete och ångrar inte sitt yrkesval. Ibland kan det vara tungt att lägga ner en läkemedelskandidat som man arbetat på länge. Å andra sidan, så känns det som att vinna högsta vinsten på lotto när det går bra, säger Kent med glimten i ögat,

## Ett screeningsförsök enligt *High throughput screening*

**Teori:** Du ska få fram en läkemedelskandidat till en tänkt sjukdom. Sjukdomen yttrar sig så att kolhydrater bryts alldeles för fort ner till mono- och disackarider. Du har tillgång till ett kemiskt bibliotek med många olika ämnen. Alla ämnen har olika egenskaper. Du ska ta fram den eller de bästa substanserna, som kan hämma enzymet.

**Starttarget** är det överaktiva enzymet amylas. Amylas bryter ner stärkelse till disackariden, maltos som senare bryts ner till glukos. Saliv innehåller amylas.

**Material:** 16 brunnar- microtiterplattor med lösningar se nedan,  
1% stärkelselösning,  
amylaslösning eller saliv,  
jodlösning,  
lösningar av kopparsulfat och natriumhydroxid,  
microvågsugn eller värmeskåp.

**Riskbedömning:** Laborationen anses ha liten risk. Natriumhydroxid är frätande. Kopparsaltet samlas upp bland tungmetaller.

**”Det kemiska biblioteket”** består av substanser som kan stimulera eller hämma stärkelsenedbryningen. Det kan vara

- syra som koagulerar enzymer
- bas som förstör enzymet
- joner av tungmetaller som binder kovalent till svavel i aminosyran cystein
- koncentrerad ammoniumsulfatlösning som genom sin höga jonstyrka får enzymet att falla ut. Utfällningen är reversibel genom tillsats av vatten
- aceton/etanol organisk lösningsmedel konkurrerar med vatten och enzymet faller ur
- tom brunn som en referens eller nolla. Här är maximal nedbrytning.

### Targetvalidering och homogen assay

Till en platta med brunnar som innehåller ”det kemiska biblioteket” och en svag stärkelselösning sätts amylas i form av lika stor mängd saliv. Enzymet är mest aktivt vid kroppstemperatur. Låt mikrotiterplattan stå i 37°C i 15 min i värmeskåp eller över ett vattenbad med lämplig temperatur. Låt aldrig temperaturen gå över 37°C då kan enzymet koagulera (denaturera) och blir overksam.

**Screeningmodellen.** Tillsätt en droppe jodlösning. Jod färgar stärkelse blått.

**Proof of principle** Gör Trommers test för att konstatera var det har bildats glukos. Tillsätt en droppe natriumhydroxid och en droppe kopparsulfat. Sätt in plattan med brunnar i mikrovågsugn för ”framkallning” av röd koppar(I)oxid.

Skriv rapport och använd så många medicinska termer du har lärt dig!

**Till läraren:**

## **Test av placebo-effekten.**

Denna laboration är tänkt att mäta effekten av placebo. Köp några tabletter av olika färg men med samma utseende. Det kan vara svårt att få tag på tabletter som inte eleverna känner till. Vi har sett EMSER-tabletter med olika färger. Man kan lägga dem i vatten ett tag och ta bort den blanka hinnan och/eller färga tabletter med karamellfärg och låta dem torka.

Informera eleverna att de ska delta i en klinisk prövning på en medicin som gör att:  
Välj något av följande:

- Hjärnan fungerar bättre på matematiklektioner
- Effekten på fysisk träning blir påtagligt högre
- Man kommer att sova mer effektivt, behöver inte lika mycket sömn eller
- Sockersuget kommer att gå ner
- Något annat

Håll upp den ena sorten (färgen), medan du berättar om effekten. På detta sätt kommer du att påverka elevgruppen något. Säg att leverantören vill testa vilken av tabletterna som är mest effektiv. Dock finns en indikation att den ena tabletten kommer att ge några biverkningar.

Dessa kan vara (välj efter grupp och tillfälle).

- visst illamående
- ökad/minskad vattenkastning
- ökad /minskad aptit
- ökad yrsel
- något annat

Be eleverna fylla i en anamnes (hälsodeklARATION) och ge slumpvis ut tabletterna. Be eleverna markera i anamnesen vilken sort de fick. Ge eleverna en eller två tabletter med instruktioner hur de ska tas.

Nästa gång (senare på dagen) får eleverna fylla i den andra anamnesen. Sammanställ resultatet och räkna ut statistiskt om det finns någon skillnad

	Illamående	Ingen påverkan	summa
Grön tablett	12	3	15
Röd tablett	5	10	15
summa	17	13	30

*Prediktionsvärde (Förväntningsvärde):*

Placebo  $12/15 = 0,8$

Ej placebo  $10/15 = 0,67$

Sensitivitet  $12/15 = 0,8$

Specificitet  $10/13 = 0,77$

Gör en  $\chi^2$ -test

*Hypotesen är att*

$H_0$  : Det är ingen skillnad på de två populationerna. Det är stickprov från samma population

$H_1$ : Det finns en skillnad.

Så här gör du en  $\chi^2$ -test på Excel

Faktisk fördelning	Illamående	Ingen påverkan	Summa
Grön tablett	12	3	15
Röd tablett	5	10	15
Summa	17	13	30

Förväntad fördelning	Illamående	Ingen påverkan	summa
Grön tablett	=15*17/30 =8,5	=15*3/30 =6,5	15
Röd tablett	=15*17/30 =8,5	=15*10/30 =6,5	15
Summa	17	13	30

1. Skriv in de faktiska värdena (resultatet)
2. Summera
3. Räkna ut de förväntade värdena ( de värden man skulle förvänta sig om det inte var någon skillnad på behandlingarna enl schemat ovan)
4. Under Infoga gå in på  $f_x$  funktion.
5. Välj under funktionskategori –Statistik och under Funktionsnamn –  $\chi^2$ -TEST
6. I rutan med Värde 1 måla in din fyrkant med resultat och i rutan Värde 2 dina förväntade värdena. Tryck på OK
7. Svaret är sannolikheten (P) för att populationerna skulle vara från samma population.
8. Räkna ut sannolikheten att den är olika (det finns en placeboeffekt) genom  $(1 - p) \cdot 100 \%$   
Om  $P = 0.05$  så är sannolikheten att populationerna är olika 95%  
Om  $P = 0.005$  så är sannolikheten att det är olika 99,5%

Sannolikheten att det skulle vara ett stickprov från samma population  $P$  är 0,00997. Därför är de sannolikt olika. Placeboeffekten finns!

Det går även att göra en  $\chi^2$ test med flera variabler:

Uppmätta värden					Förväntade värden				
	ja	nej	Vet ej	sum		ja	nej	Vet ej	sum
Röd	1	2	3	6	Röd	1,692308	$6 \cdot 26/78 = 2$	2,307692	6
Grön	4	5	6	15	Grön	4,230769	$15 \cdot 26/78 = 5$	5,769231	15
Blå	7	8	9	24	Blå	6,769231	$24 \cdot 26/78 = 8$	9,230769	24
vit	10	11	12	33	Vit	9,307692	$33 \cdot 26/78 = 11$	12,69231	33
summa	22	26	30	78	Sum	22	26	30	78

$P = 0,996134$  Slutsats Det är ingen skillnad mellan grupperna.

## Litteratur

European Pharmacopeia III, Maisonneuve 1975

Claesson, A., Danielsson, B., Svensson, U., Läkemedelskemi, Apotekarsocieteten 1996, ISBN 9191-8627-4678

Ganrot, P., O., Grubb, A., Stenflo, J., Laurells Klinisk Kemi, Studentlitteratur 1997, ISBN 91-44-00490-7

Ingelman-Sundberg, M., Persson, B., Människokroppens Kemi, Natur och Kultur 1989, ISBN 91-27-50394-1

Lundh, B., Malmquist, J., Medicinska Ord, Studentlitteratur 2001, ISBN 91-44-01718-9

Redke, F., Vätskebalans, Studentlitteratur 2000, ISBN 91-44-49181-6

Samuelsson, G., Drugs of Natural Origin, Apotekarsocieteten 1999, ISBN 91-8627-481-3

Torsell, K., B., Natural Product Chemistry, Apotekarsocieteten 1997, ISBN 91 8627-463-5

Lehninger, A., L., Nelson, D., L., Cox, M., M., Principle of Biochemistry Worth Publishers, 1993, ISBN 0-87901-711-2

Stryer, L., Biochemistry, Freeman, 1981, ISBN 0-7167-1226-1

Mirafzal, A., Summer, J., M., J. Chem. Ed., 2000, 77, 356 Synthesis of Analgesic Drugs

Cawley, J., J., J. Chem. Ed., 1995, 72, 273, The Identification of Aspirin-Free Bayer Products

Olmsted, J., J. Chem. Ed., 1998, 75, 1261, Synthesis of Aspirin

Whittaker, A., G., Education in Chemistry, 2002, 135 Preparing Aspirin in a Microwave

Hickman, R., J., S., Neill, J., J. Chem. Ed., 1997, 74, 855 Influence of pH on Drug Absorption from Gastrointestinal Tract

Johnson, K., A., J. Chem. Ed., 2000, 77, 1451 A Simple Method for Demonstrating Enzyme Kinetics Using Catalase from Beef Extract

Wolkenberg, S., E., Se, A., I., J. Chem. Ed., 2001, 78, 784 Combinatorial Synthesis and Discovery of an Antibiotic Compound

Fonyes Prado, M., A., J. Chem. Ed., 2001, 78, 533 Determination of Lipophilicity Constants of Sulfonamide Substituents

Bowen, R., Hartung, R., Gindt, Y., M., J. Chem. Ed., 2000, 77, 1456 A Simple Protein Purification and Folding Experiment