

JEDNODUCHÉ REAKCE VE ZKUMAVCE

PRAKTICKÁ ČÁST

Úlohy jsou kvalitativního charakteru – záleží na poměru jednotlivých složek nikoliv na jejich absolutním množství. Objemy lze odměřovat pomocí graduované plastové pipetky nebo pouze „od oka“ přímo ze zásobní lahve – **1 ml** představuje výšku roztoku ve zkumavce přibližně **1 cm**.

Úkol 12.1 Oxidace alkoholů a vyčíslení redoxní rovnice

Primární a sekundární alkoholy poskytují při oxidaci poměrně snadno karbonylovou sloučeninu - aldehyd nebo keton. Lze použít kterýkoliv účinný oxidační prostředek (CuO, K₂Cr₂O₇, KMnO₄). Silná oxidační činidla, zvláště za vyšších teplot, oxidují karbonylové sloučeniny dále na kyseliny, příp. za štěpení až na CO₂ a H₂O. Oxidace alkoholů oxidem měďnatým za vyšší teploty probíhá za vzniku příslušné karbonylové sloučeniny.

Materiál: Vodný roztok (50%) ethanolu a propan-2-olu, dichroman draselný kryst., 50% H₂SO₄ (ŽÍRAVINA). Stočený měděný drát. Trubičky Detalcol nebo Alcotest. Plastové pipetky, zkumavky, popisovač.

Provedení:

a) Oxidace alkoholů oxidem měďnatým

- Do jedné zkumavky odlijte přibližně 1 ml vodného roztoku ethanolu a do druhé zkumavky 1 ml vodného roztoku propan-2-olu.
- Stočený měděný drát žihejte v plameni tak dlouho, až se pokryje vrstvou CuO (ztmavne).
- Rozžhavený drát vložte opatrně do roztoku alkoholu a okamžitě jej vytáhněte ven, zkumavku zchladte pod tekoucí vodou. Pozorujte změnu zbarvení měděného drátu.
- Předchozí dva kroky opakujte 5–7krát.
- Produkty oxidace dokažte Schiffovým a Lestradetovým činidlem (viz úkol 12.2).

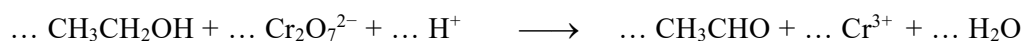
b) Oxidace ethanolu dichromanem draselným

- K přibližně 1 ml roztoku ethanolu přidejte malé množství krystalického dichromanu draselného a opatrně několik kapek 50% H₂SO₄ (ŽÍRAVINA). Průběh reakce se projeví redukcí dichromanu na zelenou chromitou sůl.

1. Pozorujte zbarvení rozžhaveného měděného drátu v průběhu oxidace alkoholu ve zkumavce a bezprostředně po vytažení ven ze zkumavky na vzduch. Vysvětlete.
2. Doplňte rovnice probíhající redoxních dějů ve zkumavce, včetně stechiometrie (oxidace alkoholů na karbonylové sloučeniny je dvouelektronovým dějem):



3. Doplňte stechiometrické koeficienty v iontové rovnici redoxního děje (dvouelektronový děj):



Obecný postup při vyčíslování stechiometrických koeficientů v redoxní rovnici:

1. pomocí stechiometrických koeficientů vyrovnejte změny v oxidačním čísle na obou stranách rovnice (počet elektronů uvolněných při oxidaci musí odpovídat počtu elektronů spotřebovaných při redukci)
2. pokud je třeba, pomocí vody vyrovnejte počet atomů kyslíku na obou stranách rovnice (kolik je atomů O v oxidantu, tolik jich bude ve vodě)
3. pokud je třeba, pomocí H^+ vyrovnejte náboje na obou stranách rovnice

Úkol 12.2 Důkaz aldehydů a ketonů

a) Důkaz aldehydů Schiffovým činidlem

Schiffovo činidlo je roztok trifenylmethanového barviva fuchsinu, který byl odbarven hydrogensířičitanem za vzniku fuchsinleukosulfonové kyseliny. Aldehydy dávají s činidlem červeně fialové až modré zbarvení. Nejedná se o pouhé uvolnění fuchsinu, ale o specifickou reakci s aldehydickou funkční skupinou. V silně kyselém prostředí takto reaguje pouze formaldehyd, čehož lze využít k jeho důkazu v přítomnosti jiných aldehydů.

Materiál: Roztok formaldehydu (0,3 mol/l), Schiffovo činidlo (1 g fuchsinu rozpuštěný v litru vody, 50 ml nasyceného roztoku NaHSO_3 , 1 ml konc. HCl a ponechat stát do odbarvení). Plastové pipetky, zkumavky, popisovač.

Provedení:

- Přibližně k 1 ml testovaného roztoku ve zkumavce přidejte několik kapek Schiffova činidla a promíchejte.
- Porovnejte zbarvení v obou zkumavkách.
- Jako testovaný roztok použijte: a) roztok ethanolu po oxidaci oxidem měďnatým; b) roztok formaldehydu (pozitivní test).

4. Porovnejte zbarvení ve zkumavkách.

b) Důkaz ketonů nitroprusidem sodným

Nitroprusidy jsou železité koordinační sloučeniny, obsahují komplexní anion $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$. Nejběžnější z nich je nitroprusid sodný, pentakyanonitrosylželezitan disodný. V alkalickém prostředí reaguje nitroprusid s mnohými ketony (i některými aldehydy) za vzniku červeně, červeně fialově až modře zbarvených komplexních produktů.

Nejde o specifickou reakci pouhého karbonylu, k reakci jsou nezbytné reaktivní atomy vodíku vázané na sousedící uhlík. Přes nedostatek specifčnosti je reakce velmi užitečná k důkazu acetonu a acetacetátu - dvou ze tří sloučenin označovaných v biochemii jako ketolátky (nezaměňovat s obecným označením ketony, ketokyseliny, apod.) - při analýze moče.

Materiál: Vodný roztok acetonu (20 ml/l), Lestradetovo činidlo (v prachovnici, jemně rozetřená směs 1 g nitroprusidu, 100 g bezvodého Na_2CO_3 a 100 g síranu amonného). Lopatička, zkumavky.

Provedení:

- Na stěnu k ústí nakloněné zkumavky s 2–3 kapkami testovaného roztoku vneste lopatičkou práškovité Lestradetovo činidlo a opatrně zvlhčete činidlo roztokem ve zkumavce, poté umístěte zkumavku do stojanu.
- V průběhu 5 minut porovnejte zbarvení v obou zkumavkách.
- Jako testovaný roztok použijte: a) roztok propan-2-olu po oxidaci oxidem měďnatým;
b) acetonu (pozitivní test).

✍ 5. Porovnejte zbarvení ve zkumavkách.

Úkol 12.3 Stanovení ethanolu v krvi (demonstrace)

Dechová zkouška. Koncentrace ethanolu v krvi může být orientačně zjištěna podle obsahu ethanolu ve vydechovaném vzduchu pomocí **alkoholových testerů**.

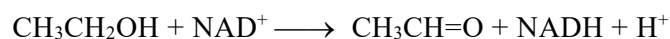
Princip detekce ethanolu, obecně alkoholu, ve vydechovaném vzduchu pomocí detekčních trubiček Altest[®] spočívá v oxidaci alkoholu dichromanem draselným – jsou-li ve vydechovaném vzduchu přítomné páry alkoholu, žlutooranžově zabarvený silikagel s dichromanem draselným v trubičce se změní na modrozelenou chromitou sůl.



V současnosti se k detekci alkoholu používají testery založené na elektrochemickém principu (např. tester Alcotest[®]). Elektrony uvolněné při oxidaci alkoholu na anodě putují ke katodě, na které dochází k redukci kyslíku na vodu. Velikost proudu protékajícího mezi anodou a katodou je přímo úměrná množství alkoholu. Při správném použití alkohol testerů se měření provádí 15–30 minut po posledním požití alkoholického nápoje, jinak získáme falešně pozitivní výsledek, hrozí též zničení senzoru. Před měřením se nesmí 30 minut jíst ani kouřit.

Detekce ethanolu ve vydechovaném vzduchu není zcela specifická, dle konstrukce senzoru lze stanovit i jiné těkavé, snadno oxidovatelné látky (např. aceton).

Enzymové stanovení využívá alkoholdehydrogenasu, která katalyzuje dehydrogenaci ethanolu za vzniku acetaldehydu. Současně je redukován pyridinový koenzym.



Vzestup absorbance redukováného koenzymu při 340 nm je přímo úměrný koncentraci alkoholu v krvi. Enzymová metoda je často využívána v biochemických analyzátoch. Tato reakce není zcela specifická pro ethanol, i jiné alkoholy jsou substrátem pro alkoholdehydrogenasu (propanol, propan-2-ol, ethylenglykol).

Zcela přesné a jednoznačné je stanovení ethanolu **plynovou chromatografií**, které je zpravidla prováděno v ústavech soudního lékařství. Podle retenčního času jednotlivých píků v chromatogramu lze

rozlišit ethanol od jiných těkavých látek, které se mohou nacházet v krvi nebo moči: methanol nebo propan-2-ol (v případě intoxikace), aceton (u diabetiků).

Koncentrace alkoholu v krvi se obvykle vyjadřuje v promilích (‰ přibližně odpovídá koncentraci v g/l). Bez požití alkoholu se v krvi stanoví méně než 0,05 ‰, nález nad 0,3 ‰ znamená vždy požití alkoholu. Při hladinách alkoholu 0,5–1,5 ‰ nastupují nejprve pocity uklidnění a ztráty úzkosti, posléze snížení zábran a porušení svalové souhry. 2–3 ‰ působí těžkou opilostí s poruchou hybnosti, vyšší hladiny alkoholu narkotické stadium až smrt následkem centrálního selhání dýchání a oběhu (smrtelná dávka pro dospělého se udává 250–750 g alkoholu při rychlém požití).

Obsah alkoholu v krvi lze přibližně odhadnout pomocí vztahu:

$$\text{Alkohol v krvi (‰)} = \frac{m}{h \times f}$$

kde m je hmotnost požitého (100%) alkoholu (g), h je tělesná hmotnost (kg), f je faktor 0,67 (muži) nebo 0,55 (ženy).

Pokles hladiny alkoholu činí **průměrně 0,12 ‰ za 1 h**.

Obsah alkoholu v alkoholických nápojích je udáván v objemových procentech (obj. %), pro výpočty je však důležitější hmotnostní koncentrace (hustota ethanolu je přibližně 0,8 kg/l).

Obsah ethanolu v některých alkoholických nápojích

Nápoj	Obj. % ethanolu	g/l	Nápoj	Obj. % ethanolu	g/l
Pivo nealkoholické	< 0,5	< 4	Běžná stolní vína	10–12	80–96
Pivo výčepní*	3–4,5	24–36	Sherry a portské	14–16	112–128
Pivo ležák ⁺	4,5–6	36–48	Likéry, běžné lihoviny	30–40	240–320
Lehká vína	6–8	48–64	Destiláty	40–50	320–400

*Pivo 8–10% (dříve 8–10°); ⁺Pivo 11–12% (dříve 11–12°); Označení v % se nevztahuje k obsahu alkoholu.

Materiál: Detekční trubičky Altest[®], elektronický tester.

Provedení:

- Seznamte se s demonstrovanými alkohol testery a způsobem jejich použití.

6. Muž (80 kg) a žena (55 kg) vypili každý v krátké době po 2 dcl bílého vína (11 obj. % alkoholu). Odhadněte koncentraci alkoholu v jejich krvi po 2 hodinách. Porovnejte údaje.
7. Muž (80 kg) vypil 5 výčepních piv (4 obj. % alkoholu) a 2 odlivky (po 20 ml) destilátu (40 obj. % alkoholu). Za jakou dobu pravděpodobně klesne obsah alkoholu v krvi pod 0,3 ‰?

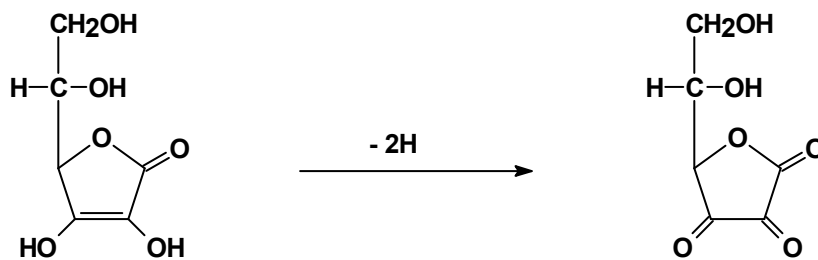
8. Vyšetřovaný muž (90 kg) požil určité množství alkoholických nápojů. Za dvě hodiny byl zadržen při řízení motorového vozidla. Za další dvě hodiny byl proveden odběr krve a zjištěno 1,1 ‰ alkoholu. Odhadněte koncentraci ethanolu v době řízení vozidla a celkovou hmotnost vypitého alkoholu.

Úkol 12.4 Redukční vlastnosti cukrů a L-askorbové kyseliny

Cukry obsahující volný poloacetalový (anomerní) hydroxyl nebo volnou karbonylovou skupinu sousedící s uhlíkem nesoucím alkoholický hydroxyl mají schopnost redukovat i poměrně slabá oxidační činidla, např. Benedictovo činidlo. Proto se označují jako **cukry redukující**. Patří k nim všechny monosacharidy, z oligosacharidů pouze ty, které mají volný poloacetalový hydroxyl. Reakci s Benedictovým činidlem lze též použít k nespécifickému důkazu redukujících látek v moči.

Vůči silným oxidačním činidlům mají redukční účinky všechny rozpustné cukry, tedy i neredukující.

L-Askorbová kyselina má poměrně silné redukční účinky, oxiduje se snadno na dehydroaskorbovou kyselinu:



Redukuje např. ionty Fe^{3+} na Fe^{2+} , čímž usnadňuje resorpci těchto iontů v trávicím traktu.

Ve vodě jsou roztoky L-askorbové kyseliny poměrně stálé a nemění se ani krátkodobým varem, avšak již nepatrné množství kovových iontů (např. Fe^{3+} , Cu^{2+}) katalyzuje oxidaci askorbové kyseliny vzdušným kyslíkem na dehydroaskorbovou kyselinu za současného vzniku peroxidu vodíku.

Materiál: Benedictovo činidlo (připravené rozpuštěním 0,7 mol Na_2CO_3 a 0,6 mol citrátu trisodného v 700 ml vody za tepla, po ochlazení přilít roztok obsahující 70 mmol CuSO_4 a objem doplnit vodou na 1 litr), roztoky D-glukosy, laktosy, sacharosy a škrobu (přibližně 10 g/l). Čerstvý roztok askorbové kyseliny (500 mg/l), roztok hexakynoželezitanu draselného (0,1 mol/l), roztok methylenové modři (0,02% v 3% ethanolu), roztok FeCl_3 (0,005 mol/l), roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,025 mol/l), roztok NaOH (5 mol/l), plastové pipetky.

Provedení:

a) *Reakce s Benedictovým činidlem*

Činidlo je silně alkalické, **musí se zahřívát opatrně**, jinak snadno vzkypí.

- K přibližně 1 ml Benedictova činidla přidejte 1–2 kapky roztoku testovaného sacharidu a obsah zkumavky promíchejte – doporučený poměr činidla a vzorku je nutno zachovat!
- Zkumavku se směsí umístěte do vroucí vodní lázně a udržujte ve varu 1–2 minuty.
- Jako testovaný roztok použijte roztok:
 - a) D-glukosy
 - b) laktosy
 - c) sacharosy
 - d) škrobu

- ✂ 9. Výsledky reakcí zaznamenejte do protokolu a vysvětlete je na základě struktury jednotlivých sacharidů.
- ✂ 10. Napište rovnici reakce β -D-glukopyranosy s Benedictovým činidlem (ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí v přítomnosti citrátu). Při reakci vznikají nerozpustný Cu_2O (červený) a CuOH (žlutý).

b) Redukce iontů Fe^{3+} L-askorbovou kyselinou

- Do dvou zkumavek odlijte přibližně po 1 ml roztoku chloridu železitého. Do první zkumavky přidejte přibližně 1 ml L-askorbové kyseliny, do druhé 1 ml demi-vody (negativní výsledek).
 - Do obou zkumavek přidejte několik kapek roztoku hexakynoželezitanu draselného a promíchejte.
 - Přítomnost iontů Fe^{2+} se projeví vznikem sytě modrého zbarvení, tzv. berlínské modři (komplexní sloučeniny Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů s anionty CN^-), zelené zbarvení není průkazné.
- ✂ 11. Napište rovnici reakce mezi L-askorbovou kyselinou a Fe^{3+} ionty.
- ✂ 12. Zdůvodněte průběh reakce na základě hodnot standardních redoxních potenciálů:
 $E^\circ(\text{dehydroaskorbát/askorbát}) = 0,081 \text{ V}$; $E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0,770 \text{ V}$.

c) Oxidace L-askorbové kyseliny vzdušným kyslíkem

- Do 4 očíslovaných zkumavek odlijte přibližně po 1 ml roztoku L-askorbové kyseliny.
- Do druhé a třetí zkumavky přidejte 2–3 kapky roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Obsah druhé a čtvrté zkumavky zahřívejte přibližně 5 minut ve vroucí vodní lázni.
- Obsah třetí zkumavky chvíli intenzivně protřepávejte.
- Přidejte do každé zkumavky (2. a 4. zkumavka je zchladlá) 1 kapku roztoku methylenové modři a poté 5 kapek roztoku NaOH, obsah každé zkumavky promíchejte a zkumavky postavte do stojanu.
- Po půl minutě zkontrolujte zbarvení roztoku ve zkumavkách.
- Vymizení modrého zbarvení je důkazem přítomnosti askorbové kyseliny, která zredukovala methylenovou modř na její bezbarvou leukoformu. Při opětovném protřepání obsahu zkumavky dojde k obnovení modrého zbarvení v důsledku reoxidace leukoformy

vzdušným kyslíkem; v klidu se činidlo znovu zredukuje askorbovou kyselinou, která je v nadbytku, na bezbarvou leukoformu.

- ✎ 13. Popište a vysvětlete chování L-askorbové kyseliny za výše uvedených podmínek.

Úkol 12.5 Barevné reakce aminokyselin a proteinů

Charakteristické seskupení atomů v peptidové vazbě nebo vedlejších řetězcích aminokyselin lze prokázat tzv. barevnými reakcemi:

Biuretová reakce spočívá ve tvorbě červeně fialově zbarvených komplexů iontů Cu^{2+} s látkami, které obsahují seskupení nejméně dvou skupin $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{CS}-\text{NH}-$ nebo $=\text{CH}-\text{NH}-$. Reakci poskytují tedy proteiny, peptidy skládající se nejméně ze tří aminokyselin, z volných aminokyselin např. asparagin a histidin a rovněž řada dalších látek, např. biuret (*N*-karbamoylurea), podle něhož byla reakce pojmenována. Reakce se běžně používá ke kvantitativnímu stanovení proteinů.

Důkaz síry v thiolech a disulfidech lze dokázat vznikem černé sraženiny PbS , která vznikne z uvolněného anionu S^{2-} po hydrolýze v alkalickém prostředí s olovnatou solí. Reakce prokazuje cystin, cystein (volný i vázaný v proteinu či peptidu), ne methionin, který je dialkylsulfidem.

Xanthoproteinová reakce spočívá v reakci aromatických aminokyselin tyrosinu a tryptofanu s koncentrovanou kyselinou dusičnou na žlutě zbarvené nitroderiváty (fenylalanin není za daných podmínek nitrován). Alkalizací nitroslooučenin se získají soli *aci-nitroslooučenin*, intenzivněji zbarvené. Reakce je příčinou žlutého zbarvení prstů při neopatrné manipulaci s kyselinou dusičnou.

Materiál: Roztok proteinů (10 g/l), alkalický roztok olovnatanu (octan olovnatý 0,25 mol/l; zalkalizovaný roztokem NaOH (5 mol/l) do rozpuštění sraženiny, JED), roztok CuSO_4 (0,01 mol/l), roztok NaOH (5 mol/l), konc. HNO_3 . Plastové pipetky, zkumavky, popisovač.

Provedení:

a) Biuretová reakce

- Asi 1 ml roztoku proteinů ve zkumavce zalkalizujte několika kapkami roztoku NaOH.
- Stejný postup proveďte s 1 ml demi-vody.
- Do obou roztoků přidejte několik kapek roztoku CuSO_4 . Obsah zkumavky promíchejte.
(při použití koncentrovanějšího roztoku CuSO_4 je zbarvení překryto sraženinou $\text{Cu}(\text{OH})_2$).

b) Důkaz síry v cysteinu a cystinu

- K přibližně 1 ml roztoku proteinů ve zkumavce přidejte stejný objem alkalického roztoku olovnatanu (jed!) a obsah zkumavky promíchejte.
- Zkumavku se směsí zahřívejte 5 min ve vroucí vodní lázni.

c) *Důkaz tyrosinu a tryptofanu (xanthoproteinová reakce)*

- K přibližně 1 ml roztoku proteinů ve zkumavce přidejte malé množství koncentrované kyseliny dusičné a promíchejte.
- Zkumavku se směsí zahřívejte 5 min ve vroucí vodní lázni.
- Po ochlazení zalkalizujte roztok nadbytkem NaOH.

✍ 14. Popište, k jakým změnám došlo v jednotlivých bodech postupu.