

ÚLOHA 2

Důkaz přítomnosti solaninu v hlízách bramboru

T Teoretická příprava

V odborné literatuře vyhledejte základní údaje o solaninu, jeho chemickém složení, konstitučním vzorci, zařazení do systému organických sloučenin a fyziologickém působení.

Uveďte některé látky chemicky příbuzné solaninu.

P Chemikalie a činidla

koncentrovaná kyselina sírová, koncentrovaná kyselina octová, 1 % vodný roztok formaldehydu, 0,5 % roztok peroxidu vodíku,

Pomůcky a materiál

bramborové hlízy (zelené, nezelené, s očky, bez oček a s klíčky), Petriho miska - dno, 4 krátké kapiláry nebo mikropipety, nerezový nůž, pinzeta, filtrační papír, podložní sklíčko, mikroskop

Pracovní postup

Z bramborové hlízy zelené i nezelené se slupkou nakrájejte dvakrát čtyři co nejtenší řezy a položte je do řady za sebou na dno Petriho misky nebo pro případ, že budete reakce sledovat mikroskopicky na podložní mikroskopické sklíčko. Potom na jednotlivé řezy postupně kápněte na první řez 1 - 3 kapky konc. kyseliny sírové, na druhý kapku koncentrované kyseliny octové, na další kapku vodného roztoku formaldehydu a na poslední kapku 0,5 % vodného roztoku peroxidu vodíku.

Přítomnost solaninu se projeví po chvílce vznikem trvalého načervenalého až třešňově červeného zbarvení.

Hodnocení a závěry

Uveďte, kterou reakcí vzniklo jaké zbarvení a jeho intenzitu.

Co je to Albertiho reakce ?

Cvičení z biochemie č. 4

Úloha č. 1

Chemické reakce sacharidů II

Úloha č. 1 Důkaz škrobu v rostlinném materiálu

Úloha č. 2 Hydrolýza bramborového škrobu

Chemikálie a činidla

1 % vodný škrobový maz, 1% kyselina chlorovodíková, 10 % vodný roztok uhličitanu disodného, Lugolův roztok, Fehlingovo reagens I a II, vodný nebo ethanoločkový roztok jodu, Schweitzerovo činidlo, koncentrovaná HCl, koncentrovaná kyselina sírová, vodný roztok fenolu, pevný floroglucin, ethanol

Pomůcky, materiál a zařízení

bramborová hlíza, semena hrachu, fazole, obilky pšenice, ova nebo ječmene, mikroskop, podložní a krycí mikroskopické sklo, stojan na zkumavky, 20 zkumavek, nedělená pipeta 5 ml, 2 kádinky 250 ml, kovový stojan, varný kruh, železná síťka s asbestovou vložkou, zápalky, plynový kahan, destilovaná voda, nůž, filtrační nálevka, plátěný hadřík, ruční odstředivka se dvěma zkumavkami, třecí miska s pistilem, porcelánová miska, kapátko, pipeta

Pracovní postup

Úloha č. 1 Důkaz přítomnosti škrobu v bramborové hlíze a semenech luštěnin a obilkách

Bramborovou hlízu dobře operete, aby na ní nelpěly žádné stopy zeminy, potom ji oloupejte a z oloupané hlízy ukrojíte několik kousků, které ve třecí misce dokonale rozetřete. Přidejte destilované vody a směs přefiltrujete přes kousek plátěného hadříku. Potřebujete oddělit drť tvořenou stěnami buněk od škrobových zrn. Filtrát dejte i s trochou vody do centrifugační zkumavky, do druhé zkumavky dejte stejný objem vody. Potom odstředíte škrobová zrna od vody, vodu slejte a usazená škrobová zrna dejte na porcelánovou misku. Kapátkem odeberte minimální množství vody se škrobovými zrny a dejte je na podložní mikroskopické sklíčko na pracovním stole mikroskopu. Jiným kapátkem opatrně přikápněte alkoholického roztoku jodu nebo Lugolova roztoku. Počkejte asi 2 – 3 minuty a potom pozorujte mikroskopem při středně velkém zvětšení. Zakreslete několik škrobových zrn včetně jejich barvy. Jaký mají škrobová zrna tvar a velikost?

Obdobný experiment proveďte se semeny obilovin nebo luštěnin. Porovnejte jak velikost, tak také tvar škrobových zrn z různého materiálu. Bylo by možné této skutečnosti v praxi využít?

Úloha č. 2 Hydrolýza bramborového škrobu

Kyselou hydrolýzou působením kyseliny chlorovodíkové o pH = asi 2,0 – 2,5 se škrob postupně štěpí na dextriny (což jsou vyšší maltosacharidy), maltosu až glukosu. Dextriny o různé velikosti molekul lze rozlišit pomocí barevných reakcí s jodem. Maltosu a glukosu,

jejichž obsah v hydrolyzátu postupně vzrůstá, je možné dokázat na základě jejich redukčních vlastností.

Pracovní postup

V kádince o objemu asi 250 ml rozmíchejte asi 5 gramů škrobu s destilovanou vodou – a potom vařte na asbestové síťce tak dlouho, až se vytvoří škrobový maz. Během vaření musíte mazem míchat skleněnou tyčinkou, aby se maz nepřilepil na dno a nebo nepřipálil. Po uvaření mazu odeberte do další kádinky objemu 250 ml asi 15 ml škrobového mazu, přidejte asi 25 ml vody (destilované) a nakonec 2 ml 10 % kyseliny chlorovodíkové a směs dále zahřívejte. *1 ml*

Každých 5 minut odebírejte z kádinky vzorek 1 ml do zkumavky, přidejte asi 5 ml destilované vody a postupně tolik roztoku uhličitanu sodného, dokud se uvolňuje oxid uhličitý. Potom přikápněte kapilárou 2-3 kapky alkoholického roztoku jodu a nebo Lugolova roztoku. Pozorujte zbarvení soustavy. Pokus ukončete až se roztok hydrolyzátu přestane barvit modře. Hydrolyza je ukončena za asi 35 – 40 minut. S roztokem v poslední zkumavce po neutralizaci kyseliny chlorovodíkové proveďte důkaz glukosy např. reakcí s Fehlingovým reagens. *1 ml*

Hned při začátku experimentu proveďte slepý srovnávací pokus tím, že do čisté zkumavky přidáte 5 ml destilované vody a tolik kapek Lugolova roztoku, kolik dáváte do zkumavek s hydrolyzátem.

Experiment vyhodnoťte časově.

Poznámka: Pokud do zkumavky přidáte nadměrné množství uhličitanu sodného, dojde v zásaditém prostředí k disproportionaci jodu na jodid a jodnan, které jsou bezbarvé. Tím se však ztrácí značná část jodu pro reakci s dextry a škála barevných změn je pak zkreslena.

Pokud budete pracovat přesně, získáte sadu zkumavek s postupně se měnící modrou barvou až do bezbarvé. Každá zkumavka. Přitom každá zkumavka představuje časový interval 5 minut.

8.4. Reakce celulózy

8.4.1. REAKCE CELULÓZY SE SCHWEITZEROVÝM ČINIDLEM

Schweitzerovo činidlo je jedno z mála rozpouštědel, v němž se celulóza rozpouští, aniž se chemicky mění.

Pracovní postup: Do čisté zkumavky nastříhejte několik proužků čistého filtračního papíru, potom přidejte 2 ml Schweitzerova činidla a jednu až dvě minuty důkladně protřepávejte. Celulóza se začne rozpouštět.

8.4.2. VZNIK HYDROLYZÁTU CELULÓZY

Pracovní postup: K roztoku celulózy ve Schweitzerově činidle z předchozí úlohy opatrně po kapkách přidávejte koncentrovanou kyselinu chlorovodíkovou. Roztok se zpočátku nemění, ale postupně začíná zelenat vzniklým chloridem měďnatým a z roztoku se vyloučí celulóza ve formě hydrátové celulózy, což je rosolovitá hmota.

8.4.3. VZNIK AMYLOIDU REAKCÍ CELULÓZY S KYSELINOU SÍROVOU

Pracovní postup: Ve třecí misce opatrně roztírejte tloučkem kousky čistého filtračního papíru s koncentrovanou kyselinou sírovou. Celulóza se rozpouští na nažloutlý roztok, který opatrně vlijte do kádinky objemu 250 ml, v níž je 200 ml destilované studené vody. Voda se zakalí vyloučeným amyloidem. Odeberte vzorek a přesvědčete se, zda reaguje na jódovou zkoušku. Výsledek pozorování zaznamenejte do pracovního protokolu.

8.4.4. HYDROLÝZA CELULÓZY NA GLUKÓZU

Pracovní postup: Ve zkumavce rozpusťte za neustálého protřepávání několik proužků čistého filtračního papíru v koncentrované kyselině sírové a roztok opatrně vlijte do kádinky se 100 ml destilované studené vody. Vařte potom na sířce 20 minut a po 5 minutách odebírejte do zkumavek vzorky na důkaz glukózy Fehlingovým nebo Tollensovým činidlem. Tyto reakce probíhají pouze v neutrálním nebo alkalickém prostředí, proto vždy před přidáním Fehlingova nebo Tollensova činidla roztok zalkalizujte roztokem hydroxidu sodného. Jakmile bude reakce na glukózu pozitivní, přestaňte zahřívát. Vysvětlete, jaká reakce proběhla a zapište její chemickou rovnici.

8.5. Důkaz laktózy v mléce

Pracovní postup: Do čisté kádinky dejte 50 ml čerstvého syrového mléka, přidejte pár kapek kyseliny octové a zvolna protřepejte. Vysráží se kasein, který odfiltrujte. Filtrát zneutralizujte přidáním uhlíčitanu vápenatého a pH roztoku změřte univerzálním indikátorovým papírkem. Upravte na neutrální prostředí. Odeberte 2 ml roztoku a proveďte zkoušku s Fehlingovým činidlem a Tollensovým činidlem.

Důkaz přítomnosti sacharidů v přírodních produktech
(ovoce, zelenina, kravské mléko)

T Teoretická příprava

Vypracujte schéma rozdělení sacharidů.

Napište konstituční vzorce (Fischerovy projekce, Tollensovy a Haworthovy)

- D- a L- aldopentosy (ribosa)

- D- a L- deoxiribosy

Napište konstituční vzorce (Fischerovy projekce) všech

- D- a L- aldohexos

- D- a L- ketohexos

U všech uveďte jejich názvy.

P Praktická část

Chemikálie, činidla a odměrné roztoky

Fehlingovo reagens I a II, 10 % vodný roztok AgNO_3 , vodný roztok a moniaků o $c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$, koncentrovaná HNO_3 , Nesslerovo činidlo, 30 % HCl , roztok 1-naftolu v ethanolu, koncentrovaná kyselina sírová, 3 % ethanolický roztok thymolu, pevný NaCl , octan anilínu, fe-nylhydrazinové činidlo, koncentrovaný vodný roztok NaOH (min. 30 %), 1 % vodný roztok CuSO_4 , ethanol, mořský písek, močovina, resorcinol,

Pomůcky, materiál a zařízení

jablko, kořen mrkve, kravské mléko, pomeranč, porcelánová třenka s tloučkem, filtrační papír, filtrační nálevka, filtrační kruh, stojan, nůžky, Erlenmeyerova baňka $150 - 250 \text{ cm}^3$, třepačka, stojan na zkumavky, 12 zkumavek, kartáč na zkumavky, zápalky, plynový kahan, dělená pipeta (10 cm^3 po 1 cm^3), ruční odstředivka se zkumavkou.

Pracovní postup

1 Příprava vodných extraktů z přírodních produktů - ovoce, zelenina.

Z čistě omytého kořene mrkve ukrojíte několik men-

ších Fezů, dejte je do třech misky, přidejte trochu čistého mořského nebo křemenného písku a materiál dobře rozetřete. Po rozetření jej dejte do Erlermeyerovy baňky a umístěte do třepačky. Směs potom nechajte 10 minut třepat.

Po uplynutí 10 minut extrakt přefiltrujte a uchovejte ve zkumavce pro odebrání vzorků na jednotlivé důkazy sacharidů.

Stejným způsobem si připravíte extrakt z jablka nebo pomeranče.

Při práci se snažte používat co nejmenšího objemu vody, aby extrakt byl co nejkonzentrovanejší.

2 Příprava syrovátky z kravského mléka pro důkazy cukrů.

Do kádinky (150 - 250 cm³) dejte kolem 100 cm³ mléka (ne kondenzovaného nebo sušeného), přidejte několik kapek kyseliny octové a mírně zahřejte. Potom směs důkladně protřepejte, aby se vysrážel veškerý kasein. Suspensi dejte do xetrifugační zkumavky a odstřeďte na ruční odstředivce. Proces odstřeďování opakujte 2x, abyste získali větší objem syrovátky pro další použití. Kasein pro další práci nebudete potřebovat.

3 Důkaz přítomnosti sacharidů

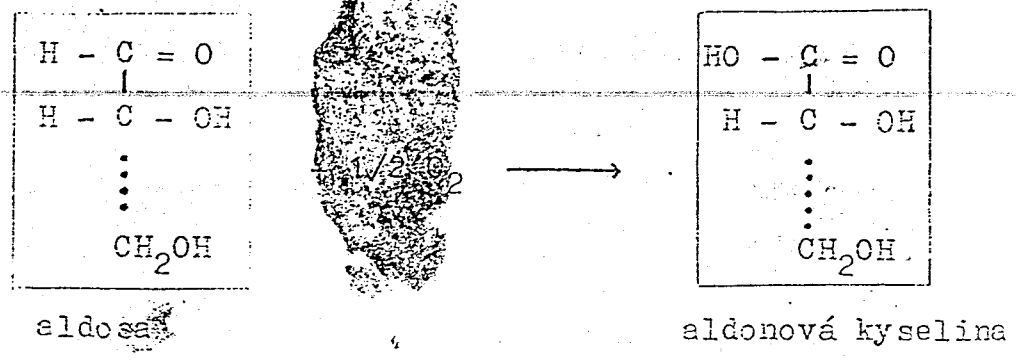
V získaných extraktech a syrovátce dokažte přítomnost sacharidů

- reakcí Selivanovovou
- reakcí Tollensovou
- reakcí Thymolovou
- reakcí Molischovou
- reakcí s močovinou

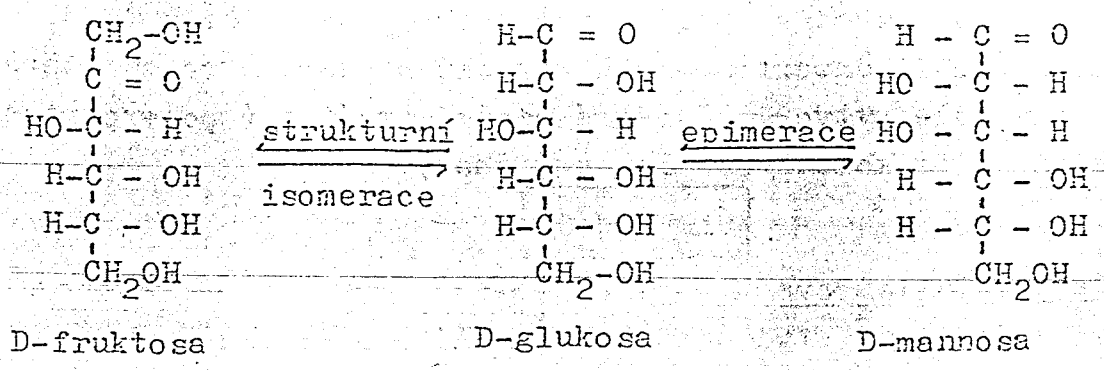
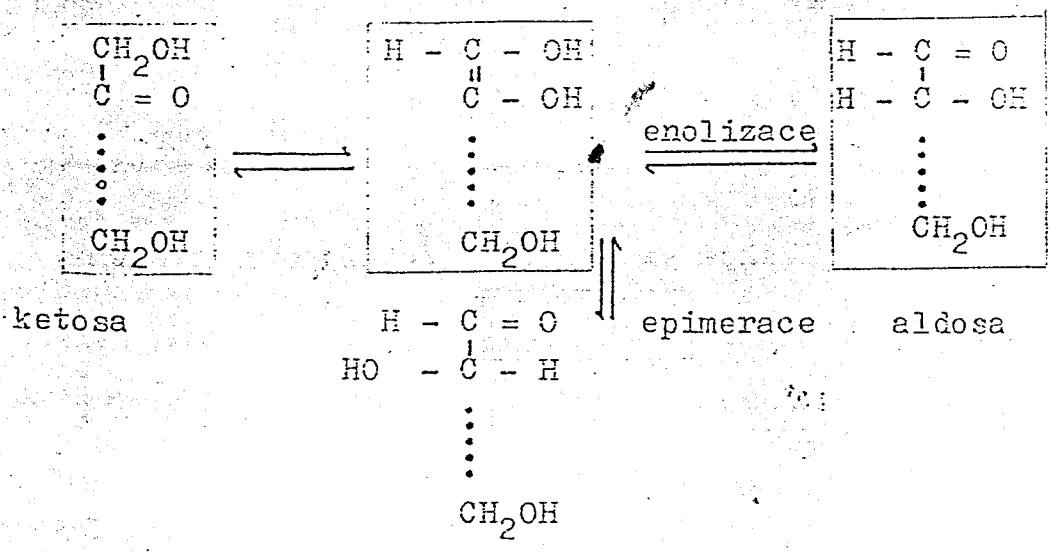
Vždy uveďte výsledek důkazu a zdůvodněte jej.

A Reakce založené na redukčních reakcích (redukčních vlastnostech sacharidů)

Monosacharidy, aldosa, ketosa a ty oligosacharidy, které mají volnou alespoň jednu polcacetálovou hydroxylovou -OH skupinu mají redukční účinky, proto se působením oxidačních činidel oxidují na aldonové kyseliny. Při těchto reakcích se oxiduje karbonylová aldehydická skupina na karboxylovou a vzniká aldonová kyselina:



Ketosa by takto reagovat neměly, protože nemají volnou polcacetálovou hydroxyskupinu, ale v závislosti na reakčních podmínkách pravděpodobně izomerují na aldosa, a proto podle reakčních podmínek reagují stejně jako aldosa:

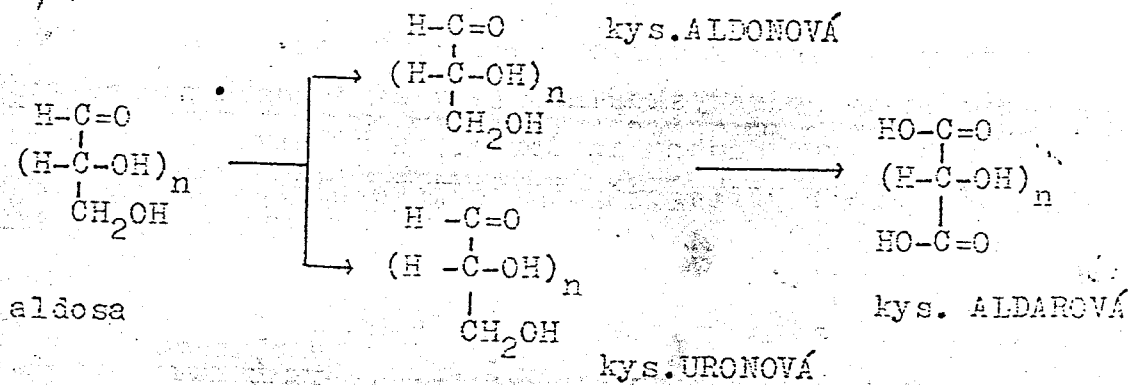


Na redukčních vlastnostech cukrů je založeno celé řada reakcí využívaných k jejich sčítání i stanovení. Reakce se obvykle uskutečňují v alkalickém prostředí roztoky solí těžkých kovů, např.:

- mědi (reakce Fehlingova)
- bismutu (reakce Nylanderova)
- železa (reakce Legendornova - Jensenova s fenylhydrazinem)
- stříbra (reakce Tollensova)

Obecně: za různých reakčních podmínek vznikají různé oxidační produkty - kyseliny polyhydroxykarboxylové. Významnější jsou ty, které se odvozují od aldosa:

- a) kyseliny aldonové jsou kyseliny polyhydroxymonokarboxylové
- b) kyseliny alderové jsou kyseliny polyhydroxydikarboxylové
- c) kyseliny uronové jsou kyseliny aldopolyhydroxykarboxylové



Reakce sacharidů s Fehlingovým reagens

ÚLOHA 4-1

Reakce Fehlingova

Do 1 cm³ zahřátého vzorku sacharidu dáme 1 cm³ Fehlingova reagens (připraví se smícháním 0,5 cm³ roztoku I a 0,5 cm³ roztoku II).

Při reakci se vyredukuje červený oxid měďný Cu₂O, v případě použití koncentrovaných roztoků sacharidů se na stěně zkumavky může vytvořit červené měděné zrcátko (po experimentu je odstraníme konc. kyselinou dusičnou).

ÚLOHA 4-2

Reakce Tollensova

Do 1 cm³ studeného nebo zahřátého vzorku sacharidu přidejte

5

stejný objem amoniakálního roztoku oxidu stříbrného (Tollensovo činidlo). Podle typu sacharidu ve vzorku a teploty vznikne šedý koloidní roztok stříbra, sraženina nebo až stříbrné zrcátko na stěnách zkumavky.

Poznámka: Tollensovo činidlo nikdy nepřipravujte do zásoby, protože stáním v něm vznikají explozivní sloučeniny stříbra !!

ÚLOHA 4-3

Reakce Barfoedova

Octan měďnatý se v prostředí octové kyseliny redukuje na oxid měďnatý. Jeho přítomnost se projeví červeným zbarvením reakční směsi.

Pro zvýšení citlivosti reakce lze použít Nelsonova činidla (je to kyselina arsenomolybdenová), jehož reakcí s oxidem měďným vzniká molybdenová modř.

B Další reakce sacharidů

ÚLOHA 4-4

Reakce Selivanova-WEEHUIZENOVA ✓

Do zkumavky dejte 1-2 cm³ 30 % HCl a potom 1 cm³ roztoku vzorku cukru, dále jeden krystalek resorcinolu a směs důkladně promíchejte třepáním. Po promíchání dejte zkumavky (podle počtu vzorků) do zahřáté vodní lázně (kádinka s teplou vodou) a 10 minut zahřívejte.

Ketosy dávají třešňové zbarvení (aldosy takto nereagují, proto je tato reakce specifická pro ketosy).

Podstatou reakce je reakce 5-hydroxymethylfuralu (ten se tvoří dehydratací sacharidů např. minerálními kyselinami) s resorcinolem.

Zkoušek udělejte tolik, kolik máte vzorků sacharidů.

ÚLOHA 4-5

Reakce sacharidů s močovinou ✓

Deriváty furalu vznikající dehydratací sacharidů např. minerálními kyselinami, reagují s močovinou za vzniku barevných produktů:

fruktosa medvězílová

aliohexosy červené nebo purpurové

aldopentosy žluté

ketohexosy modré (po přidání ethanolu a mírném zalkaliování přechází zbarvení na červené)

Podle počtu vzorků cukrů si připravte potřebný počet zkumavek, do každé dejte 0,3 - 0,5g močoviny, přidejte 5-6 kapek koncentrované HCl a maximálně 5 kapek vodného roztoku sacharidu. Směsi protřepejte a dejte na dvacet minut do horké vodní lázně. Barevné změny se projevují za 15 - 20 minut.

ÚLOHA 4-6

Reakce Molischova ✓

Mono-, di- a polysacharidy dávají s konc. kyselinou sírovou a 1-naftolem intensivní fialové zbarvení, jehož vznik není dosud spolehlivě vysvětlen. Pravděpodobně vzniká di- -naftohydroxy-fenylmethan, který se dále oxiduje na příslušné trifenylmethanové barvivo.

Do zkumavek (podle počtu vzorků) dejte 2 cm³ roztoku sacharidu, přidejte vždy po 5 kapkách roztoku 1-naftolu v ethanolu a směs dokonale protřepejte. Potom směs velice opatrně, ale zejména pomalu podvrstvěte konc. kyselinou sírovou. Za přítomnosti sacharidu u monosacharidů a disacharidů hned, u polysacharidů po několika minutách objeví modro- nebo červenofialový prstenec.

Reakci dává také fural a jeho deriváty, to zn. také ty sloučeniny, které během reakcí vznikají. Proto reakce není specifická pro sacharidy, ale nevznikne-li příslušné zbarvení, není v reakční směsi sacharid přítomen.

ÚLOHA 4-7

Reakce thymolová ✓

Některé sacharidy reagují v silně kyselém prostředí s alkalickým roztokem thymolu za vzniku karmínového zbarvení.

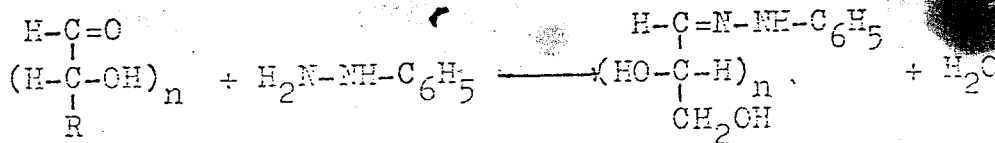
Do sady zkumavek (podle počtu vzorků cukrů) dejte postupně proužek filtračního papíru, do druhé 0,1 g škrobu, do další 1 cm³ vodného roztoku glukosy, dále 1 cm³ roztoku sacharosy a nakonec 1 cm³ roztoku maltosy. Ke škrobu přidejte 1 cm³ destilované vody.

Potom do všech zkumavek dejte po 3 kapech 3% etanolic-
kého roztoku thymolu, 3 cm³ konc.HCl a několik krystalků NaCl.
Směsí několik minut pomalu, ale důkladně třepajte, aby se pro-
míchala. Po 3-4 minutách třepání ponořte zkumavky do horké vod-
ní lázně a za třepání vařte minimálně 5 minut. Výsledky reakce
zapište do tabulky. Jako kontrolní proveďte tentýž experiment
s fruktosou.

ÚLOHA 4-8

Reakce sacharidů s fenyldrazinem

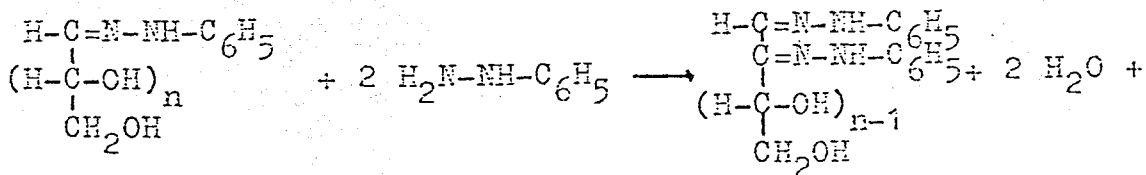
Positivní reakci s fenyldrazinem (a jinými hydraziny)
dávají aldosa i ketosa. Reakce probíhá tak, že nejprve reaguje
aldosa s jednou molekulou fenyldrazinu za vzniku fenyldra-
zonu:



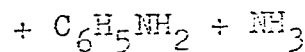
aldosa fenyldrazin fenyldrazon

Fenyldrazony se dají izolovat - jsou to krystalické lát-
ky, zpravidla dobře rozpustné ve vodě. Pouze fenyldrazon manno-
sy je málo rozpustný (lze ho proto využít pro izolaci mannosy
ze směsi sacharidů.)

V další fázi reaguje fenyldrazon s dalšími dvěma moleku-
lami fenyldrazinu a vznikne osazon :



fenyldrazon fenyldrazin OSAZON



ÚLOHA 4-9

Reakce nitrochromová

Mezi skupinové reakce sacharidů patří i t.zv. nitrochromová
reakce. Je založena na oxidaci sacharidů v kyselém prostředí chro-
many. Reakci nedávají nehydrolyzující sacharidy. Produkty reakce
jsou modře zbarveny.

Do dvou zkumavek dejte - do první 2 cm³ roztoku glukosy a do druhé stejný objem roztoku sacharosy, přidejte vždy 3 cm³ koncentrované HNO₃ (nepipetujte, ale odměřte odměrnou zkumavkou nebo odměrným válečkem) a 5 kapek 10 % roztoku chromanu draselného. Směsi dobře promíchejte a pozorujte průběh reakcí.

ÚLOHA 4- 10

Rozlišení pentos a hexos

Ve zkumavce zahříváte 1-2 cm³ roztoku pentosy se stejným objemem konc. HCl. Jakmile začne roztok vřít, přiložte k ústí zkumavky proužek filtračního papíru smočeného roztokem octanu anilinu. Vznikne červené zbarvení, typické pro pentosy.

Proveďte tutéž zkoušku s glukosou. Jaký je výsledek reakce ?

8.5. Důkaz laktózy v mléce

Pracovní postup: Do čisté kádinky dejte 50 ml čerstvého syrového mléka, přidejte pár kapek kyseliny octové a zvolna protřepejte. Vysráží se kasein, který odfiltrujte. Filtrát zneutralizujte přidáním uhličitanu ^{Na₂CO₃} vápenatého a pH roztoku změřte univerzálním indikátorovým papírkem. Upravte na neutrální prostředí. Odeberte 2 ml roztoku a proveďte zkoušku s Fehlingovým činidlem a Tollensovým činidlem.

2 ml roztoku a provede zkoušku s Fehlingovým a Tollensovým činidlem

Úloha č. 2

Důkaz přítomnosti sacharidů ve vzorcích ovocných šťáv

Chemikálie a činidla

Pro důkazy sacharidů použijeme stejné Chemikálie a činidla jako ve cvičení č. 3

Pomůcky, materiál a zařízení

V práci použijeme stejné pomůcky a zařízení jako ve cvičení č. 3

Pracovní postup

Důkaz sacharidů ve vzorcích ovocných šťáv provedeme minimálně dvěma způsoby a výsledky zaznamenáme do pracovního protokolu.

Úloha 3 Chemické reakce sacharidů I

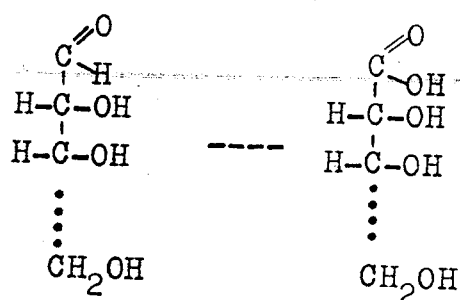
Chemikálie a činidla: 3 % vodné roztoky dostupných monosacharidů a disacharidů, škrob, celulóza, zásobní roztok Fehlingova reagens (I a II), 10 % vodný roztok AgNO_3 , vodný roztok amoniaku o $c = 2 \text{ mol/dm}^3$, vodný roztok NaOH ($c = 2 \text{ mol/dm}^3$, kyselina dusičná, Nelsonovo činidlo, 30 % kyselina chlorovodíková, roztok 1-naftolu v ethanolu, kyselina sírová koncentrovaná, 3 % ethanolický roztok thymolu, pevný NaCl , octan anilinu, fenyldrazinové činidlo, koncentrovaný vodný roztok NaOH (min. 30 %), 1 % vodný roztok CuSO_4 , suspence Ca(OH)_2 ve vodě, ethanol; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ / Fehlingovo činidlo, Barfordovo činidlo, Močovina,

Pomůcky a materiál: stojan na zkumavky, minimálně 20 ks zkumavek, kádinky objemu min. 250 cm^3 , kovová trojnožka nebo kovový stojan s varným kruhem, železná síťka s asbestovou vložkou, lžice na chemikálie, filtrační papír, nůžky, plynový kahan, zápalky, pipeta 10 cm^3 dělená, podložní mikroskopické sklíčko a mikroskop, kartáč na čištění zkumavek, mikropipety zhotovené z tenkostěnné skleněné trubice na dávkování vzorků sacharidů, nůž na sklo ;

Poznámky: při práci pracujte mimořádně pečlivě, aby nedošlo ke znečišťování roztoků jednotlivých sacharidů jinými, protože by to rušilo správný průběh reakcí. Po ukončení práce veškeré sklo důkladně vymyjte a zkumavky dejte sušit do stojanu dnem vzhůru.

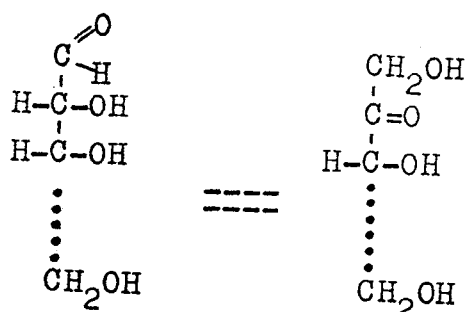
Úloha 3.1 FEHLINGOVA REAKCE

Monosacharidy, aldosa a ketosa (ale také ty oligosacharidy, které mají volnou alespoň jednu poloacetálovou -OH skupinu), mají redukční účinky, proto se účinkem oxidačních činidel oxidují na aldonové kyseliny. Při reakci se oxiduje aldehydická skupina na skupinu karboxylovou, kov, který je součástí oxidačního činidla se redukuje, někdy až na elementární formu. Redukované kovy se snadno poznávají, což je základem mnohých reakcí cukrů. Ketosa by se oxidovat neměly, ale protože pravděpodobně izomerují na příslušné aldosa, tyto reakce rovněž poskytují.



aldosa

kyselina glukonová



aldosa

ketosa

Pracovní postup:

Do sady zkumavek dejte postupně po 1 cm³ vodného roztoku glukosy, fruktosy, sacharosy, maltosy, galaktosy a laktosy a všechny zkumavky dejte zahřát do kádinky s vroucí vodou. Po dvou až třech minutách přidejte do každé zkumavky po 1 cm³ Fehlingova činidla (0,5 cm³ roztoku I a 0,5 cm³ roztoku II). Pozorujte změny ve zkumavkách a zaznamenejte je do pracovních protokolů. Doložte je chemickými rovnicemi.

Při reakcích se vyredukuje červený Cu₂O, v případě použití koncentrovaných roztoků dokonce elementární Cu.

Úloha 3.2 TOLLENSOVA REAKCE

Tato reakce je rovněž založena na redukčních vlastnostech sacharidů. V tomto případě se však (na rozdíl od úlohy 3.1) vyredukovává kovové stříbro, někdy ve formě stříbrného zrcátka.

Pracovní postup:

Do sady zkumavek dejte vzorky vodných roztoků sacharidů jako v úloze 3.1 a zkumavky postavte do stojanu. V samostatné zkumavce si připravte z příslušných roztoků maximálně 5 cm³ Tollensova činidla. Potom do každé zkumavky dejte asi 0,5 cm³ tohoto činidla a pozorujte, zda dochází ve zkumavkách k barevným změnám. Tu zkumavku, kde se žádná změna neprojevila dejte do kádinky s horkou vodou a sledujte, za jakou dobu se barevná změna projeví. Pokud po 5 minutách zahřívání směs nereaguje, pokus ukončete. Příslušný sacharid je neredukující.

Po ukončení pokusu ty zkumavky, kde se vyredukovalo kovové stříbro vymyjte několika kapkami koncentrované kyseliny dusičné, potom vodou.

Úloha 3.3 BARFOEDOVA REAKCE

V prostředí kyseliny octové se redukuje octan měďnatý na oxid měďný (ten je červený). Tuto reakci dávají přednostně monosacharidy, redukující disacharidy až po delším zahřívání. Citlivost reakce lze zvýšit přidáním několika kapek Nelsonova činidla.

Pracovní postup:

Podle postupu v předchozích úlohách si připravte sadu zkumavek se vzorky sacharidů, přidejte po 1 cm³ Barfoedova činidla a zkumavky postavte do kádinky s vroucí vodou. Zahřívajte 30 minut. Potom zkumavky ochlaďte vnějším chlazením studenou vodou buď pod tekoucí vodou a nebo ponořením do kádinky se studenou vodou.

Zapište si výsledky pozorování a potom do každé zkumavky přidejte 0,5-1 cm³ Nelsonova činidla. Pozorujte změny a zapište si je do protokolu.

Monosacharidy dávají modré zbarvení, disacharidy žlutozelené.

Úloha 3.4 SELIVANOVA A WEEHUIZENOVA REAKCE

Reakce je založena na vzniku červeného zbarvení, které dává 5-hydroxymethylfural s resorcinolem a kyselinou HCl. Deriváty furalu vznikají dehydratací sacharidů např. působením minerálních kyselin.

Pracovní postup:

Připravte si vodní lázeň se zahřátou vodou pro ohřev sady zkumavek. Do sady zkumavek (podle počtu vzorků sacharidů) si dejte 1-2 cm³ 30 % HCl, potom přidejte vždy 1 cm³ vzorku vodného roztoku sacharidu a zkumavky dejte ohřívát do vodní lázně. Zahřívajte 10 minut. Potom přidejte do každé zkumavky několik krystalků resorcinolu (lépe je přidat resorcinol před začátkem zahřívání). Ketonické sacharidy dávají třešňově červené zbarvení. Proto je tato reakce specifická pro ketosy.

Úloha 3.5 REAKCE S MOČOVINOU

Působením minerálních kyselin na sacharidy vznikají deriváty furalu, které reagují s močovinou za vzniku barevných produktů; fruktosa dává zelenomodré zbarvení
aldohexosy červené nebo purpurové
aldopentosy žluté
ketohehexosy modré; po přidání ethanolu a mírném zalkalizování přechází na červené.

Pracovní postup:

Připravte si podobně jako v předchozích úlohách vodní lázeň a zahřejte ji do varu. Do zkumavek (počet závisí na počtu vzorků sacharidů) dejte vždy 0,3 - 0,5 g močoviny, přidejte 5-6 kapek koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 2 - 3 kapky vodného roztoku vzorku sacharidu. Směsí ve zkumavkách vždy důkladně, ale opatrně třepujte a potom vložte do horké vodní lázně. Reakce by se měly projevit po 15 - 20 minutách.

Úloha 3.6 MOLISCHOVA REAKCE

Sacharidy (mono-, di- a polysacharidy) dávají s koncentrovanou kyselinou sírovou a 1-naftolem intenzivní fialové zbarvení. Jeho vznik není ještě přesně vysvětlen, ale

zdá se, že při reakci vznikají pravděpodobně di-1-nafto-hydroxyfurylmethany, které se zřejmě oxidují na příslušné trifenylmethanové barvivo.

Pracovní postup:

Do sady zkumavek (podle předchozích úloh) dejte po 2 cm³ vodných roztoků sacharidů, zkumavky postavte do stojanu a přidejte do nich po 5 kapkách roztoku 1-naftolu v ethanolu a směsí vždy dobře promíchejte. Potom obsah každé zkumavky opatrně podvrstvěte 1 cm³ koncentrované kyseliny sírové (pracujte velice opatrně a pomalu). Za přítomnosti sacharidu se na rozhraní kapalin objeví modrofialový nebo červenofialový prstenec. (U monosacharidů a disacharidů ihned, u polysacharidů po chvíli).

Poznámka:

Tuto reakci dává fural a jeho deriváty a tedy i ty látky, z nichž za podmínek reakce fural vzniká. Proto reakce není specifická pro sacharidy. Negativní výsledek ale svědčí o nepřítomnosti sacharidu.

Úloha 3.7 THYMOLOVÁ REAKCE

Některé sacharidy reagují v silně kyselém prostředí s alkoholickým roztokem thymolu za vzniku karmínového zbarvení.

Pracovní postup:

Do sady zkumavek dejte postupně: proužek filtračního papíru, 0,1g škrobu a 1 cm³ destilované vody, 1 cm³ vodného roztoku glukosy, 1 cm³ vodného roztoku sacharosy a 1 cm³ vodného roztoku vzorku maltosy. Potom do všech zkumavek dejte po 3 kapkách 3 % ethanolického roztoku thymolu, 3 cm³ koncentrované HCl a několik krystalků chloridu sodného. Směsí vždy velmi opatrně ale důkladně protřepejte a potom za třepání 2-5 minut vařte. Po ukončení experimentu proveďte tuto reakci s fruktosou.

X Úloha 3.8 ROZLIŠENÍ PENTOS A HEXOS

Pracovní postup:

Ve zkumavce zahřívajte 1-2 cm³ roztoku pentosy se stejným objemem koncentrované HCl. Jakmile začne roztok vřít, přiložte k ústí zkumavky proužek filtračního papíru smočeného v roztoku octanu anilinu.

Pentosy dávají touto reakcí červené zbarvení. Proveďte tutéž reakci s glukosou. Dávají hexosy stejné zbarvení?

Úloha 3.9 NITROCHROMOVÁ REAKCE

(Je to skupinová reakce mono-^o a oligosacharidů)

Roztok chromanu v kyselém prostředí oxiduje všechny sacharidy (s výjimkou nehydrolyzujících polysacharidů) . Redukční produkty chromanu jsou zbarveny modře.

Pracovní postup:

Do zkumavky dejte asi 2 cm³ vzorku roztoku sacharidu, přidejte asi 3 cm³ koncentrované kyseliny dusičné (tu nepipetujte, ale odměřujte odměrným válečkem) a 5 kapek roztoku chromanu didraselného. Směs dobře, ale velice opatrně protřepejte a pozorujte průběh reakce. Podobné úlohy proveďte s různými sacharidy; zvolte ty, které máte k dispozici.

Úloha 3.10 TVORBA OSAZONŮ

Mono-případně disacharidy lze charakterizovat na základě jejich kondenzačních reakcí s fenyldrazinem případně 2,4-dinitrofenyldrazinem. Produkty těchto reakcí se málo rozpouštějí ve vodě ale dobře krystalizují a tvoří krystaly s typickým tvarem a ostrou teplotou tání. Nutno je pozorovat mikroskopicky.

Pracovní postup:

Roztok cukru o objemu 1 cm³ zahřívejte ve zkumavce se 3 cm³ fenyldrazinového činidla na vodní lázni asi 20 minut. Po této době začně vzorek se sacharidem pomalu žloutnout a po jeho ochlazení pod tekoucí vodou se vyloučí žluté krystalky osazonu. V případě pomalého chladnutí při teplotě místnosti se vytvoří dobře vyvinuté a dobře pozorovatelné krystalky. Pozorujte při mírném zaclo-nění rozného pole.

Reakci proveďte se všemi sacharidy, které máte k dispozici.

Úloha 3.11 REAKCE GLUKOSY

a) Reakce Mooreova

Ve zkumavce zahřívejte 1 cm³ roztoku glukosy se 3-4 kapkami koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného .

Glukosa se začne rozkládat na aceton, kyselinu mravenčí a mléčnou a roztok začne žloutnout až hbědnout a voní karamellem.

Tuto reakci nedává sacharosa - dokažte to příslušným experimentem.

e b) Reakce Trommerova

Do čisté zkumavky dejte 1 cm³ vodného roztoku glukosy, přidejte 0,25 cm³ roztoku NaOH a velice pomalu po stěně zkumavky přidejte 1 kapku ředěného vodného roztoku síranu měďnatého. Vznikne temně modře zbarvený roztok (někdy až modrofialový), který se při dalším přidávání roztoku síranu začne kalit. Přestaňte přidávat další síran a obsah zkumavky zahřejte do varu. Sloučenina měďnatá se zredukuje na měďnou. Podle koncentrace použitých roztoků se reakční směs zbarví zelenavě, žlutavě až červeně.

c) Reakce Tollensova

Tuto reakci glukosy proveďte podle již dříve uvedeného návodu.

Úloha 3:12 VZNIK SACHARÁTU VÁPENATÉHO

Pracovní postup:

Do větší zkumavky dejte 1,5-2 cm³ vodného roztoku sacharosy a po malých dávkách přidávejte suspenzi hydroxidu vápenatého (vápenné mléko). Po každé dávce vápenného mléka směsí důkladně protřepejte, nechejte chvíli ustát. Přidávejte vápenné mléko tak dlouho, dokud se roztok nezakalí. Potom čirý roztok přelejte do druhé zkumavky a rozdělte jej na tři části a proveďte s nimi následující reakce:

- Obsah první zkumavky zvolna zahřívejte a pozorujte změny, které při zahřívání probíhají;
- Do druhé zkumavky dejte k roztoku asi 0,5 cm³ ethanolu a pozorujte změny;
- Do třetí zkumavky foukejte pipetou vzduch z plic 2-3 minuty a rovněž pozorujte změny.

Ve všech zkumavkách byl roztok sacharátu vápenatého, který je ze studena dobře rozpustný ve vodě, ale nerozpustný za tepla, proto se obsah první zkumavky při zahřívání zakalí vyloučeným Ca(OH)₂; sacharát vápenatý je rovněž nerozpustný v ethanolu a rovněž se vysráží; ve třetím případě oxid uhličitý vytěsňuje Ca ze sacharátu a vzniklý CaCO₃ se rovněž vysráží.

- Úkol 1 Vypracujte podrobné schema rozdělení sacharidů.
- 2 Na příkladu libolné aldohexosy a ketohexosy uveďte všechny užívané vzorce sacharidů (vzorce molekulové souhrnné, Fischerovy, Tollensovy s poloacetálovou vazbou, vzorce Haworthovy, vzorce konformační) a potom udejte příklady D- a L-konfigurací, epimerii, anomerii, furanosu, pyranosu, židličkové uspořádání 4C_1 (dříve C1) a 1C_4 (dříve 1C).
 - 3 Na příkladu glukosy nebo jiné hexosy vysvětlete oxidaci sacharidů na kyselinu glukuronovou, glukonovou a cukrovou a vznik glukuronidů.

Úloha 9 Chemické vlastnosti a reakce bílkovin

Chemikálie a činidla: síran amonný - pevný, destilovaná voda, ředěný roztok CuSO_4 (0,5%), ředěný roztok BaCl_2 (0,5%), ředěný roztok $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0,5%), vodný roztok formaldehydu, octová kyselina, 10% vodný roztok hydroxidu sodného, chlornan alkalického kovu, 1-naftol, kyselina dusičná konc., sulfanilová kyselina, dusitan sodný, Na_2CO_3 , glyoxalová kyselina, kyselina sírová konc., ninhydrin, octan olovnatý,

Palchyho roztok

Pomůcky a materiál: plynový kahan, zápalky, syrové vejce, stojan na zkumavky, 15 zkumavek, kádinka 250 cm^3 , tyčinka na míchání, stojan, filtrační nálevka, vata, kádinka 100 cm^3 , filtrační kruh, špachtlička a nebo malé lžičky na chemikálie, držák na zkumavky

Poznámky: všechny úkoly v tomto laboratorním cvičení patří mezi srážecí nebo barevné reakce bílkovin. Jsou to reakce citlivé, proto je třeba používat čistého skla, čerstvých roztoků činidel a používat také ředěných roztoků činidel, protože při použití koncentrovaných roztoků jsou zbarvení produktů špatně a nebo vůbec nepozorovatelná.

Po každé reakci nutno zkumavky vymýt za použití kartáče na zkumavky a ne pouze vypláchnout.

Během všech experimentů používejte destilovanou vodu

Vajíčko 1

Bílkovina I 2

1. Příprava roztoku bílkoviny vaječného bílku

Nad kádinkou objemu 250 cm^3 se 150 cm^3 destilované vody opatrně rozbijeme syrové vejce tak, abychom oddělili bílek od žloutku. Žloutek přeneseme do čisté kádinky, stačí objem 150 cm^3 a použijeme jej k dalším zkouškám. Bílek rozpustíme v kádince za míchání tyčinkou. Po dokonalém rozpuštění bílku roztok přefiltrujeme přes chomáček čisté vaty nebo čistý plátěný hadřík do čisté Erlenmeyerovy baňky objemu kolem 250 cm^3 . Filtrát budeme používat ke zkouškám a dalším experimentům.

2. Nevratné srážení bílkoviny teplem

Do zkumavky dáme $1-2 \text{ cm}^3$ roztoku bílku a za protřepávání zahříváme nad plynovým kahanem. Bílkovina se vysráží. Pozorujte, zda zůstane sráženina zachována i po ochlazení roztoku. Zůstane-li zachována vysvětlete o jaký typ srážení jde.

3. Působení neutrálních solí na roztoky bílkovin

Do zkumavky s $1,5 \text{ cm}^3$ roztoku vaječného bílku přidejte špachtličkou po malých dávkách asi $0,5 \text{ g}$ pevného síranu amonného. Po každé dávce síranu obsahem zkumavky zvolna, ale důkladně protřepejte. Sůl přidávejte tak dlouho, dokud se nezačne bílkovina srážet. Potom přidejte ještě jednu dávku soli, protřepejte, nechte chvíli ustát, pozorujte a výsledek pozorování zapište do protokolu.

Po zápisu výsledku pozorování přidejte do zkumavky asi 1 cm^3 destilované vody, obsahem opět protřepejte a znovu pozorujte. Výsledek pozorování opět zapište do protokolu. O jaký proces šlo?

4. Reakce bílkovin s roztoky solí těžkých kovů

Do tří zkumavek dejte po $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku a potom do

první zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku CuSO_4
 druhé zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku BaCl_2
 třetí zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku
 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Obsahy zkumavek protřepejte a pozorujte. Výsledky pozorování zapište. Potom do všech zkumavek přidejte po dvou cm^3 destilované vody a opět protřepejte. Rozpustila se sraženina? Jak typ srážení proběhl?

5. Reakce bílkovin s aldehydy a karboxylovými kyselinami

Do dvou zkumavek dejte po $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku a potom do první zkumavky dejte několik kapek vodného roztoku formaldehydu (formalinu) a do druhé zkumavky stejné množství kyseliny octové. Obsahy zkumavek protřepejte, pozorujte a výsledky pozorování zapište. Po zápisu výsledku pozorování zředte obsahy zkumavek 2 cm^3 destilované vody, protřepejte, znovu pozorujte a výsledky pozorování opět zaznamenejte do protokolu.

Jaký typ srážení se ve zkumavkách uskutečnil?

6. Biuretová reakce bílkovin

Do zkumavky dejte $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku nebo jiné bílkoviny a roztok zalkalizujte přidáním $0,5 \text{ cm}^3$ 10% vodného roztoku NaOH . Směsí důkladně protřepejte a potom do roztoku přidejte kapku silně zředěného vodného roztoku CuSO_4 a znovu obsahem zkumavky důkladně protřepejte. Pozorujte změny ve zkumavce a zaznamenejte výsledky pozorování.

Reakce se nazývá biuretová od biuretu, kondenzačního produktu dvou molekul močoviny:

Tuto reakci dávají i jiné sloučeniny, které mají aspoň dvě peptidické skupiny $-\text{NH}-\text{CO}-$. K těm patří peptidy od tripeptidů výše a samozřejmě i bílkoviny. Pozitivní reakci dává i seskupe-

4

Bílkoviny I

ní $-CS-NH-$ a $=CH-NH-$, histidin a arginin.

7. Reakce Sakaguchiho

Bílkoviny poskytují s bromnanem, případně s chlornanem a alfa naftolem v alkalickém prostředí červené zbarvení. Reakce je podmíněna přítomností guanidinové složky argininu.

Reakci provedeme tak, že ke zalkalizovanému vzorku bílkoviny nebo argininu přidáme $0,5 \text{ cm}^3$ alkoholického roztoku alfa naftolu a nakonec několik kapek roztoku bromnanu. Vznikne malinově červené zbarvení.

8. Reakce xanthoproteinová

Aromatické aminokyseliny (tyrozin, tryptofan) dávají výraznou reakci s HNO_3 . Jejich benzenová jádra se nitrují a dávají žlutě zbarvené nitrosloučeniny. Rovněž většina bílkovin se při zahřátí s kyselinou dusičnou barví žlutě (řecky xanthos - žlutý). Při působení koncentrované kyseliny dusičné na kůži, nehty, vlnu a pod. se rovněž objevuje žluté zbarvení. Působením alkalií vzniká oranžově zbarvená sul aci-formy nitrosloučeniny.

5

Bílkoviny I

K 1,5 cm³ vodného roztoku bílkoviny ve zkumavce přidáme opatrně asi 0,5 cm³ konc.HNO₃. Vzniká žluté zbarvení až sraženina. Po ochlazení a zalkalizování 10% roztokem NaOH se barva změní ze žluté na oranžovou.

9. Pauliho reakce

Tyrosin spolu s heterocyklickým histidinem je reagující složkou při Pauliho reakci. Tyto aminokyseliny ať volné nebo jejich zbytky vázané v bílkovinách, poskytují s diazotovanou kyselinou sulfanilovou v alkalickém prostředí oranžově červené kopulační produkty.

Ve zkumavce si připravíme Pauliho reagens tak, že smísíme 2 cm³ roztoku kyseliny sulfanilové s 0,5 (případně 0,2) cm³ roztoku dusitanu a smísíme protřepáním. Do zkumavky dáme 1-2 cm³ roztoku vzorku bílkoviny a přidáme asi 0,5 cm³ Pauliho činidla a tolik roztoku Na₂CO₃ o koncentraci 3 mol/dm³, aby reakce byla zřetelně alkalická. V případě přítomnosti uvedených aminokyselin nebo jejich zbytku se objeví oranžově červené zbarvení.

10. Adamkiewiczova reakce

Do zkumavky nalijeme vzorek bílkoviny, t.j. asi 1 cm³ a přidáme téměř stejný objem kyseliny glyoxalové (Adamkiewiczovo činidlo) nebo kyseliny octové, která téměř vždy obsahuje kyselinu glyoxalovou, velmi opatně v silně nakloněné zkumavce podvrstvíme asi 1 cm³ kyseliny sírové koncentrované. Po chvíli se na rozhraní kapalin objeví červenofialový prstenec.

11. Reakce ninhydrinová

Reakci s ninhydrinem poskytují všechny volné aminokyseliny a peptidy. Z aminokyselinových zbytků vázaných v bílkovinách reaguje ovšem pouze lysin. Zkoušku provedeme tak, že ke vzorku 1-2 cm³ bílkoviny přidáme asi 0,3 cm³ roztoku ninhydrinu a důkladně povaříme. V pozitivním případě vzniká fialově modré zbarvení.

12. Reakce Hellerova

Do zkumavky dáme asi 1 cm³ konc. kyseliny dusičné a potom pomalu po stěně zkumavky, kterou držíme šikmo opatrně přidáváme vodný roztok bílku tak, aby se kapaliny nesmísily. Na jejich rozhraní se vytvoří bílý prstenec sražené bílkoviny.

13. Reakce na síru v bílkovinách

Zkoušku na přítomnost síry provedeme následujícím způsobem. Do zkumavky nalejeme asi 1 cm³ 0,5% octanu olovnatého a 10% roztoku NaOH. Vytvoří-li se bílá sraženina, přidáme právě tolik roztoku hydroxidu, aby se sraženina rozpustila. K tomuto roztoku přilejeme několik kapek bílkovinného roztoku a směs opatrně chvíli povaříme. Roztok zhnědne nebo zčerná.

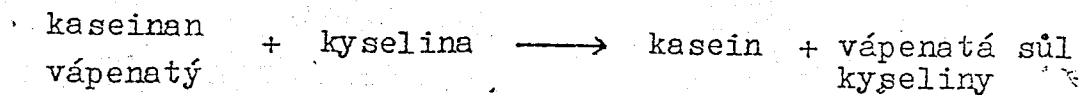
ÚLOHA 10

T Teoretická příprava

Bílko viny složené, heteroproteiny, proteidy, bílkoviny konjugované

Tato skupina organických sloučenin biochemicky a biologicky velice významných patří mezi sloučeniny obsahující dusík. Jsou složeny z vlastní bílkoviny, na niž je vázána nebílkovinná složka, t.zv. prostetická skupina. Mezi složené bílkoviny patří také fosfoproteidy, které jsou tvořeny bílkovinou, na niž je vázán zbytek kyseliny HPO_3 nebo H_3PO_4 . Jednou z nich je KASEIN, hlavní bílkovina mléka.

Kasein je přítomen v kravském mléce v množství asi 35 g v 1 dm^3 , tedy asi 2,5 %, v mateřském mléce je ho kolem 1 %. V mléce se nachází ve formě své rozpustné vápenaté soli, kaseinanu vápenatého, který se teplem nesráží. Z mléka se dá vysrážet octovou kyselinou nebo minerální kyselinou.



Kasein je nerozpustný ve vodě, ale rozpouští se roztocích alkalických hydroxidů. V nadbytku kyseliny se rovněž rozpouští, protože obsahuje bazické skupiny.

Při kysání mléka vzniká vlivem enzymů způsobujících kvašení laktosy mléčná kyselina, která způsobí vysrážení kasienu.

Tak jako většina bílkovin i kasein má nejmenší rozpustnost v okolí svého izoelektrického bodu, který je $\text{pH} = 4,8$. Samotné mléko má $\text{pH} 6,6 - 6,9$.

Bílkoviny jednoduché, prosté, proteiny, holoproteiny

Jsou to látky složeny z mnoha zbytků aminokarboxylových kyselin (molekulová hmotnost do 10.000 přísluší peptidům, nad 10.000 pak bílkovinám). Patří k nim např. albuminy a globuliny.

ALBUMINY obsahují vázané diaminkarboxylové kyseliny. Ve vodě jsou rozpustné. Ze svých neutrálních roztoků se nesrážejí nasyceným roztokem NaCl a síranem hořečnatým, ale srážejí se síranem amonným a varem.

Albuminy se srážejí rovněž minerálními kyselinami.

V mléce je v malém množství přítomen albumin mléčný, v krevním seru albuminy serové (serumalbuminy), v oční čočce jsou přítomny krystaliny, součástí hemoglobinu je albumin globin, ve vaječném žloutku je albumin vaječný, semenech hrachu legumelin, v obilí leukosin a pod.

GLOBULINY jsou ve vodě nerozpustné, ale rozpouštějí se už v ředěných roztocích solí, zředěných kyselinách a loužících. Z neutrálních roztoků se srážejí např. síranem amonným, hořečnatým a dalšími solemi nebo varem. Mezi globuliny patří např. globuliny serové, mléčné (laktoglobuliny), svalové (myoglobuliny), fibrinogen, globuliny vaječné (ovoglobuliny), v bramborách je tuberin a pod.

P Praktická část

Chemikálie a činidla

ředěný roztok síranu měďnatého, 5-10 % vodný roztok hydroxidu sodného, octová kyselina, kyseliny chlorovodíková, dusičná, sírová, destilovaná voda, pevný síran amonný, vodný roztok formaldehydu, octan olovnatý, ethanol, Millonovo činidlo, nekondenzované syrové kravské mléko, nabotnalá semena hrachu,

Pomůcky a materiál

plátěný hadřík, filtrační nálevka, filtrační kruh, stojan na zkumavky, sada zkumavek, lžice na chemikálie, mikropipeta, plynový kahan, zápalky, odsávací nálevka, Büchnerova baňka, filtrační papír, nůžky, kádinka 250 cm³, tyčinka (skleněná), železná síťka s azbestovou vložkou, *odměrný valeček*, *teploměr*, *pH papírky*

ÚKOL 10.1

Isolace kaseinu z mléka

Pracovní postup

Do kádinky dejte asi 100 cm³ syrového mléka, zahřejte je na teplotu kolem 40°C a za míchání pomalu přidávejte octovou kyselinu nebo kyselinu minerální). Během přidávání sledujte pH roztoku, které by nemělo klesnout pod pH=5. Jakmile se vysráží kasein, přestaňte přidávat kyselinu a vysrážený kasein odfiltrujte buď na odsávací baňce a nebo

přes plátěný nebarvený hadřík. (Filtrační papír se často nehodí, protože jeho póry se ucoupí a filtrace i se sníženého tlaku probíhá pomalu a špatně).

Filtrát uschovejte pro další reakce, kasein z filtru a nebo z hadříku po dvoj- až trojnásobném promytí destilovanou vodou přeneste do čisté zkumavky, přidejte asi 5 cm³ destilované vody a protřepejte.

V další fázi postupujte takto: ze zkumavky s dobře protřepanou suspenzí kaseinu v destilované vodě odeberte asi 1 cm³ do další zkumavky, po kapkách přidávejte 5-10 % vodný roztok NaOH a vždy dobře protřepejte, kasein se bude rozpouštět. Porozpuštění kaseinu opět odeberte asi 1 cm³ roztoku do další zkumavky a přidávejte po mikrokapkách silně zředěného roztoku síranu měďnatého. Roztok se modro- až červenofialově zbarví - důkaz přítomnosti bílkoviny.

Do zbytku zalkalizovaného roztoku kaseinu přidávejte po malých kapkách kyseliny chlorovodíkové. Postupujte opatrně, protože ve zkumavce bude probíhat neutralizace, bude se uvolňovat teplo a obsah zkumavky by mohl vystříknout do očí! Sraženina se bude opět vytvářet.

ÚKOL 10.2

Další úkoly provádějte s filtrátem získaným po oddělení kaseinu.

Roztok filtrátu bývá bezbarvý, někdy až nazelenalý - to je závislé na tom, jakým krmivem se krmí dobytek. Obsahuje ve vodě rozpustné bílkoviny, zejména mléčný albumin, který lze dokázat řadou reakcí.

Ze zkumavky s filtrátem odebírejte asi po 1 cm³ roztoku vždy do nové zkumavky a proveďte následující zkoušky - reakce.

- a) srážení vodným roztokem formaldehydu
- a) srážení vodným roztokem formaldehydu
- d) reakci biuretovou (CuSO₄ a NaOH)
- e) reakci xantoproteinovou
- f) srážení roztokem soli těžkého kovu

Všechna pozorování podrobně zapište do protokolu.

ÚKOL 10.3

Reakce leguminu ze semen hrachu setého

Několik semen hrachu (nebo čočky) nechejte ve vlažné vodě dokonale nabobtnat. Potom několik semen dejte do třecí misky a s asi 3 cm³ destilované vody dobře rozetřete. Potom homogénát dejte do Erlenmayerovy baňky kterou uzavřete a nechejte na třepačce asi 10 minut třepat, aby se maximálně vyluhovaly rozpustné bílkoviny.

Po protřepání proveďte filtraci přes plátěný hadřík; tuhé zbytky vyhoďte do odpadu a s filtrátem, který obsahuje bílkovinu legumin proveďte reakce na bílkoviny - viz úkol 10.2 .

Výsledky srovnajte s výsledky reakcí kaseinu.

Přidat
k J. stol
u dig

Úloha 9 Chemické vlastnosti a reakce bílkovin

Chemikálie a činidla: síran amonný - pevný, destilovaná voda, ředěný roztok CuSO_4 (0,5%), ředěný roztok BaCl_2 (0,5%), ředěný roztok $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0,5%), vodný roztok formaldehydu, octová kyselina, 10% vodný roztok hydroxidu sodného, chlornan alkalického kovu, 1-naftol, kyselina dusičná konc., sulfenilová kyselina, dusitan sodný, Na_2CO_3 , glyoxalová kyselina, kyselina sírová konc., ninhydrin, octan olovnatý,

Paluhyho
roztok

Pomůcky a materiál: plynový kahan, zápalky, syrové vejce, stojan na zkumavky, 15 zkumavek, kádinka 250 cm^3 , tyčinka na míchání, stojan, filtrační nálevka, vata, kádinka 100 cm^3 , filtrační kruh, špachtilčka a nebo malé lžíce na chemikálie, drátěná síťka na zkumavky

Poznámky: všechny úkoly v tomto laboratorním cvičení patří mezi srážecí nebo barevné reakce bílkovin. Jsou to reakce citlivé, proto je třeba používat čistění skla, čerstvých roztoků činidel a používat také čerstvé roztoky činidel, protože při použití kontaminovaných roztoků jsou zbarvení produktů špatně nebo vůbec nepozorovatelná.

Po každé reakci nutno zkumavky vymýt za použití kartáče na zkumavky a ne pouze vypláchnout.

Během všech experimentů používejte destilovanou vodu.

1. Příprava roztoku bílkoviny vaječného bílku

Nad kádinkou objemu 250 cm^3 se 150 cm^3 destilované vody opatrně rozbijeme syrové vejce tak, abychom oddělili bílek od žloutku. Žloutek přeneseme do čisté kádinky, stačí objem 150 cm^3 a použijeme jej k dalším zkouškám. Bílek rozpustíme v kádince za míchání tyčinkou. Po dokonalém rozpuštění bílku roztok přefiltrujeme přes chomáček čisté vaty nebo čistý plátěný hadřík do čisté Erlenmeyerovy baňky objemu kolem 250 cm^3 . Filtrát budeme používat ke zkouškám a dalším experimentům.

2. Nevratné srážení bílkoviny teplem

Do zkumavky dáme $1-2 \text{ cm}^3$ roztoku bílku a za protřepávání zahříváme nad plynovým kahanem. Bílkovina se vysráží. Pozorujte, zda zůstane sráženina zachována i po ochlazení roztoku. Zůstane-li zachována vysvětlete o jaký typ srážení jde.

3. Působení neutrálních solí na roztoky bílkovin

Do zkumavky s $1,5 \text{ cm}^3$ roztoku vaječného bílku přidejte špachtličkou po malých dávkách asi $0,5 \text{ g}$ pevného síranu amoného. Po každé dávce síranu obsahem zkumavky zvolna, ale důkladně protřepejte. Sůl přidávejte tak dlouho, dokud se nezačne bílkovina srážet. Potom přidejte ještě jednu dávku soli, protřepejte, nechte chvíli ustát, pozorujte a výsledek pozorování zapište do protokolu.

Po zápisu výsledku pozorování přidejte do zkumavky asi 1 cm^3 destilované vody, obsahem opět protřepejte a znovu pozorujte. Výsledek pozorování opět zapište do protokolu. O jaký proces šlo ?

f 4. Reakce bílkovin s roztoky solí těžkých kovů

Do tří zkumavek dejte po $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku a potom do

první zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku CuSO_4
druhé zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku BaCl_2
třetí zkumavky přidejte několik kapek 0,5% roztoku
 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Obsahy zkumavek protřepejte a pozorujte. Výsledky pozorování zapište. Potom do všech zkumavek přidejte po dvou cm^3 destilované vody a opět protřepejte. Rozpustila se sraženina ? Jak typ srážení proběhl ?

a) 5. Reakce bílkovin s aldehydy a karboxylovými kyselinami

Do dvou zkumavek dejte po $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku a potom do první zkumavky dejte několik kapek vodného roztoku formaldehydu (formalinu) a do druhé zkumavky stejné množství kyseliny octové. Obsahy zkumavek protřepejte, pozorujte a výsledky pozorování zapište. Po zápisu výsledku pozorování zřeďte obsahy zkumavek 2 cm^3 destilované vody, protřepejte, znovu pozorujte a výsledky pozorování opět zaznamenejte do protokolu.

Jaký typ srážení se ve zkumavkách uskutečnil ?

a) 6. Biuretová reakce bílkovin

Do zkumavky dejte $1,5 \text{ cm}^3$ vodného roztoku bílku nebo jiné bílkoviny a roztok zalkalizujte přidáním $0,5 \text{ cm}^3$ 10% vodného roztoku NaOH . Směsí důkladně protřepejte a potom do roztoku přidejte kapku silně zředěného vodného roztoku CuSO_4 a znovu obsahem zkumavky důkladně protřepejte. Pozorujte změny ve zkumavce a zaznamenejte výsledky pozorování.

Reakce se nazývá biuretová od biuretu, kondenzačního produktu dvou molekul močoviny:

Tuto reakci dávají i jiné sloučeniny, které mají aspoň dvě peptidické skupiny $-\text{NH}-\text{CO}-$. K těm patří peptidy od tripeptidů výše a samozřejmě i bílkoviny. Pozitivní reakci dává i seskupe-

ní $-CS-NH-$ a $=CH-NH-$, histidin a arginin.

7. Reakce Sakaguchiho

Bílkoviny poskytují s bromnanem, případně s chlornanem a alfa naftolem v alkalickém prostředí červené zbarvení. Reakce je podmíněna přítomností guanidinové složky argininu.

Reakci provedeme tak, že ke zalkalizovanému vzorku bílkoviny nebo argininu přidáme $0,5 \text{ cm}^3$ alkoholického roztoku alfa naftolu a nakonec několik kapek roztoku bromnanu. Vznikne malinově červené zbarvení.

9) 8. Reakce xanthoproteinová

Aromatické aminokyseliny (tyrozin, tryptofan) dávají výraznou reakci s HNO_3 . Jejich benzenová jádra se nitrují a dávají žlutě zbarvené nitrosloučeniny. Rovněž většina bílkovin se při zahřátí s kyselinou dusičnou barví žlutě (řecky xanthos - žlutý). Při působení koncentrované kyseliny dusičné na kůži, nehty, vlasy a pod. se rovněž objevuje žluté zbarvení. Působením alkalií vzniká oranžově zbarvená sulaci-formy nitrosloučeniny.

K 1,5 cm³ vodného roztoku bílkoviny ve zkumavce přidáme opatrně asi 0,5 cm³ konc.HNO₃. Vzniká žluté zbarvení až sraženina. Po ochlazení a zalkalizování 10% roztokem NaOH se barva změní ze žluté na oranžovou.

9. Pauliho reakce

Tyrosin spolu s heterocyklickým histidinem je reagující složkou při Pauliho reakci. Tyto aminokyseliny ať volné nebo jejich zbytky vázané v bílkovinách, poskytují s diazotovanou kyselinou sulfanilovou v alkalickém prostředí oranžově červené kopulační produkty.

Ve zkumavce si připravíme Pauliho reagens tak, že smísíme 2 cm³ roztoku kyseliny sulfanilové s 0,5 (případně 0,2) cm³ roztoku dusitanu a smísíme protřepáním. Do zkumavky dáme 1-2 cm³ roztoku vzorku bílkoviny a přidáme asi 0,5 cm³ Pauliho činidla a tolik roztoku Na₂CO₃ o koncentraci 3 mol/dm³, aby reakce byla zřetelně alkalická. V případě přítomnosti uvedených aminokyselin nebo jejich zbytku se objeví oranžově červené zbarvení.

10. Adamkiewiczova reakce

Do zkumavky nalijeme vzorek bílkoviny, t.j. asi 1 cm³ a přidáme téměř stejný objem kyseliny glyoxalové (Adamkiewiczovo činidlo) nebo kyseliny octové, která téměř vždy obsahuje kyselinu glyoxalovou, velmi opatně v silně nakloněné zkumavce podvrstvíme asi 1 cm³ kyseliny sírové koncentrované. Po chvíli se na rozhraní kapalin objeví červenofialový prstenec.

11. Reakce ninhydrinová

Reakci s ninhydrinem poskytují všechny volné aminokyseliny a peptidy. Z aminokyselinových zbytků vázaných v bílkovinách reaguje ovšem pouze lysin. Zkoušku provedeme tak, že ke vzorku 1-2 cm³ bílkoviny přidáme asi 0,3 cm³ roztoku ninhydrinu a důkladně povaříme. V pozitivním případě vzniká fialově modré zbarvení.

c) 12. Reakce Hellerova

Do zkumavky dáme asi 1 cm³ konc. kyseliny dusičné a potom pomalu po stěně zkumavky, kterou držíme šikmo opatrně přidáváme vodný roztok bílku tak, aby se kapaliny nasmísily. Na jejich rozhraní se vytvoří bílý prstenec sražené bílkoviny.

13. Reakce na síru v bílkovinách

Zkoušku na přítomnost síry provedeme následujícím způsobem. Do zkumavky nalejeme asi 1 cm³ 0,5% octanu olovnatého a 10% roztoku NaOH. Vytvoří-li se bílá sraženina, přidáme právě tolik roztoku hydroxidu, aby se sraženina rozpustila. K tomuto roztoku přilejeme několik kapek bílkovinného roztoku a směs opatrně chvíli povaříme. Roztok zhnědne nebo zčerná.