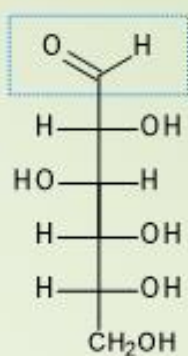
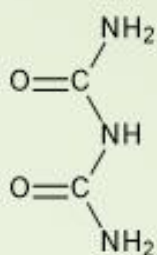


LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOCHÉMIE

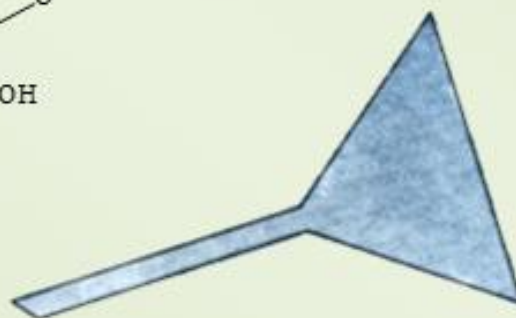
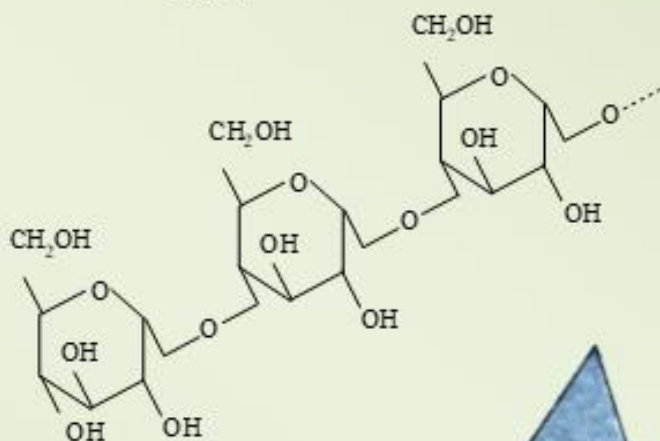
Protokoly a riešenia pre študentov
rozširujúceho štúdia učiteľstva chémie



Lenka Hudecová

Marián Valko

Klaudia Jomová



Fakulta prírodných vied a informatiky v Nitre

LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOCHÉMIE

**Protokoly a riešenia pre študentov
rozširujúceho štúdia učiteľstva chémie**

Lenka Hudecová

Marián Valko

Klaudia Jomová

2023

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE

LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOCHÉMIE

Protokoly a riešenia pre študentov rozširujúceho štúdia učiteľstva chémie

Edícia Prírodovedec č. 816

Autori:

Mgr. Lenka Hudecová, PhD.

prof. Ing. Marián Valko, DrSc.

prof. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

(c) 2022 Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre

Publikácie je podporená z projektu 001UKF-2-1/2022 Zvyšovanie kvality prípravy budúcich učiteľov matematiky, fyziky, chémie, informatiky, anglického jazyka, slovenského jazyka a techniky formou doplňujúceho pedagogického štúdia a rozširujúceho štúdia na UKF v Nitre.

ISBN 978-80-558-2038-5

Predslov

Predkladaný študijný materiál je určený študentom rozširujúceho štúdia učiteľstva chémie, ktorí v rámci predmetu Biochémia absolvujú základné laboratórne cvičenia z biochémie blokovou formou. Experimentálna práca v laboratóriu má za cieľ overovať teoretické poznatky v praxi a podporiť hlbšie pochopenie biochemických princípov.

Obsahovo je dokument zostavený prevažne z kvalitatívnych (dôkazových) reakcií k jednotlivým témam preberaným v základnom kurze prednášok z biochémie. Cieľom bolo vybrať časovo nenáročné experimenty, niektoré realizovateľné v podmienkach základných a stredných škôl, aby neboli viazané na náročné laboratórne vybavenie. Po formálnej stránke je text rozdelený na dve hlavné časti – *Protokoly* a *Riešenia*. Návrh uvedenej štruktúry učebného textu vzišiel z doterajších skúseností blokových cvičení študentov rozširujúceho štúdia. Zefektívni prípravu, realizáciu aj spracovanie laboratórneho cvičenia.

Prvá časť je zostavená zo súboru protokolov jednotlivých experimentov k témam Sacharidy, Lipidy, Aminokyseliny/Proteíny, Enzýmy, Vitamíny a Nukleové kyseliny. Jednotlivé tematické celky začínajú krátkym teoretickým úvodom k danej problematike. Každý experiment je spracovaný formou samostatného protokolu, v ktorom je študent oboznámený s princípom reakcie, použitým materiálom a návodom na realizovanie experimentu. V protokole je vytvorený priestor na doplnenie vlastného pozorovania, diskusie a poznámok. Súčasťou protokolu sú kontrolné otázky a úlohy. Časová náročnosť uvedená pri experimentoch je len orientačná, ale tento údaj pomôže pri organizovaní práce v laboratóriu. Študent si pred plánovaný laboratórny cvičením vyberie protokoly, s ktorými bude pracovať.

Druhá časť študijného materiálu *Riešenia* ponúka študentovi pozorovanie, diskusiu, výsledky úloh, s ktorými študent konfrontuje vlastné výstupy.

Hoci sú laboratórne cvičenia z biochémie určené pre študentov, ktorí už získali experimentálne zručnosti v laboratóriu, v závere študijného materiálu je tretia časť *Podmienky práce v laboratóriu*. V tejto časti sú uvedené pravidlá bezpečnosti práce v laboratóriu, základné postupy prvej pomoci, zoznam používaných chemikálií s popisom zdravotných rizík pri práci a k tomu prislúchajúce grafické označenia vo forme piktogramov.

Autori

OBSAH

<i>Predslov</i>	3
-----------------------	---

I PROTOKOLY

1 Sacharidy

1.1 Príprava vzorky z rastlinného materiálu	11
1.1.1 Extrakcia sacharidov z ovocia.....	11
1.1.2 Extrakcia škrobu zo zemiakov.....	11
1.2 Molischova reakcia – dôkaz prítomnosti sacharidov	13
1.3 Dôkaz škrobu jódovou skúškou a hydrolýza škrobu	16
1.4 Stanovenie redukujúcich sacharidov	19
1.4.1 Dôkaz redukujúcich sacharidov Fehlingovou reakciou.....	19
1.4.2 Dôkaz redukujúcich sacharidov Trommerovou reakciou.....	22
1.4.3 Dôkaz redukujúcich sacharidov Tollensovou reakciou.....	25
1.4.4 Dôkaz redukujúcich sacharidov Nylanderovou reakciou.....	28
1.5 Selivanova reakcia na rozlíšenie aldóz a ketóz	30

2 Lipidy

2.1 Rozpustnosť a emulgácia lipidov	34
2.2 Akroleínová reakcia – dôkaz prítomnosti glycerolu	37
2.3 Dôkaz lipidov v semenách rastlín	39
2.4 Dôkaz cholesterolu Salkowského reakciou	41
2.5 Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu	44
2.6 Stanovenie čísla zmydelnenia	47

3 Aminokyseliny / proteíny

3.1 Izolácia kazeínu a albumínov z mlieka	51
3.2 Ninhydrínová reakcia - dôkaz aminoskupiny	53

3.3 Xantoproteínová reakcia – dôkaz aromatických aminokyselín.....	56
3.4 Biuretova reakcia – dôkaz peptidovej väzby.....	59
3.5 S-Pb reakcia.....	62
3.6 Zrážacie (precipitačné) reakcie bielkovín.....	64
3.7 Dialýza.....	67

4 Enzýmy

4.1 Enzýmová aktivita slinnej amylázy.....	71
4.2 Rozklad potravy pankreatickými enzýmami.....	73
4.3 Reakcia na dôkaz ureázy.....	76
4.4 Kataláza v zelenine.....	78

5 Vitamíny

5.1 Vitamín A – dôkazová reakcia.....	81
5.2 Vitamín C.....	83
5.2.1 Vitamín C – dôkazová reakcia.....	83
5.2.2 Vitamín C – vplyv teploty na redukčné vlastnosti.....	86
5.2.3 Vitamín C je kyselina - stanovenie pH.....	88
5.3 Vitamín B2 – dôkazová reakcia.....	91

6 Nukleové kyseliny

6.1 Izolácia DNA z ovocia.....	95
6.2 Izolácia RNA z droždia.....	97
6.3 Dôkaz zložiek DNA a RNA.....	99

II RIEŠENIA (R)

R1 Sacharidy

R1.1 Príprava vzorky z rastlinného materiálu.....	102
---	-----

R1.1.1 Extrakcia sacharidov z ovocia.....	102
R1.1.2 Extrakcia škrobu zo zemiakov.....	102
R1.2 Molischova reakcia – dôkaz prítomnosti sacharidov.....	104
R1.3 Dôkaz škrobu jódovou skúškou a hydrolýza škrobu.....	106
R1.4 Stanovenie redukujúcich sacharidov.....	109
R1.4.1 Dôkaz redukujúcich sacharidov Fehlingovou reakciou.....	109
R1.4.2 Dôkaz redukujúcich sacharidov Trommerovou reakciou.....	112
R1.4.3 Dôkaz redukujúcich sacharidov Tollensovou reakciou.....	115
R1.4.4 Dôkaz redukujúcich sacharidov Nylanderovo reakciou.....	118
R1.5 Selivanova reakcia na rozlíšenie aldóz a ketóz.....	120

R2 Lipidy

R2.1 Rozpustnosť a emulgácia lipidov.....	122
R2.2 Akroleínová reakcia – dôkaz prítomnosti glycerolu.....	125
R2.3 Dôkaz lipidov v semenách rastlín.....	126
R2.4 Dôkaz cholesterolu Salkowského reakciou.....	128
R2.5 Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu.....	130
R2.6 Stanovenie čísla zmydelnenia.....	131

R3 Aminokyseliny

R3.1 Izolácia kazeínu a albumínov z mlieka.....	134
R3.2 Ninhydrínová reakcia - dôkaz aminoskupiny.....	136
R3.3 Xantoproteínová reakcia – dôkaz aromatických aminokyselín.....	139
R3.4 Biuretova reakcia – dôkaz peptidovej väzby.....	141
R3.5 S-Pb reakcia.....	144
R3.6 Zrážacie (precipitačné) reakcie bielkovín.....	146
R3.7 Dialýza.....	149

R4 Enzýmy

R4.1 Enzymová aktivita slinnej amylázy.....	151
---	-----

R4.2 Rozklad potravy pankreatickými enzýmami.....	153
R4.3 Reakcia na dôkaz ureázy.....	156
R4.4 Kataláza v zelenine.....	157

R5 Vitamíny

R5.1 Vitamín A – dôkazová reakcia.....	159
R5.2 Vitamín C.....	161
R5.2.1 Vitamín C – dôkazová reakcia.....	161
R5.2.2 Vitamín C – vplyv teploty na redukčné vlastnosti.....	163
R5.2.3 Vitamín C je kyselina - stanovenie pH.....	165
R5.3 Vitamín B2 – dôkazová reakcia.....	167

R6 Nukleové kyseliny

R6.1 Izolácia DNA z ovocia.....	168
R6.2 Izolácia RNA z droždia.....	170
R6.3 Dôkaz zložiek DNA a RNA.....	172

III PODMIENKY PRÁCE V LABORATÓRIU

A Príprava študenta na laboratórne cvičenie.....	175
B Bezpečnosť práce.....	175
C Prvá pomoc.....	176
D Nebezpečné látky v laboratóriu.....	177
E Nebezpečné látky v laboratóriu pri vybraných experimentoch.....	179

LITERATÚRA.....	182
------------------------	------------

I PROTOKOLY

1 SACHARIDY

Sacharidy reprezentujú variabilnú skupinu zlúčenín, ktoré tvoria väčšinu organickej hmoty na Zemi. Sú stálou zložkou všetkých živých buniek, v ktorých plnia množstvo rôznych funkcií. Hlavným zdrojom sacharidov v prírode sú rastliny, ktoré ich produkujú v procese **fotosyntézy**.

Základný molekulový vzorec sacharidov je $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Z prepisu vzorca na $(\text{C}\cdot\text{H}_2\text{O})_n$ vyplýva, že sú to hydráty uhlíka, odkiaľ pochádza starší názov *uhl'ohydráty*. Z chemického hľadiska sú definované ako polyhydroxyaldehydy (aldózy) a polyhydroxyketóny (ketózy). Deriváty sacharidov okrem uhlíka, vodíka a kyslíka obsahujú aj iné prvky, ako dusík, fosfor a síru.

Sacharidy sú rozdeľované na tri hlavné skupiny: **monosacharidy**, **oligosacharidy** a **polysacharidy**. Väzba, ktorou sa spájajú molekuly sacharidov navzájom alebo s inou molekulou, sa nazýva **glykozidová (glykozidická)**.

Monosacharidy (molekula obsahuje 3-9 uhlíkových atómov) sa nazývajú aj **jednoduché cukry**. Sú rozpustné vo vode a majú sladkú chuť. Najrozšírenejšie sú hexózy (C_6). Aldózy a ketózy (okrem dihydroxyacetónu – ketotrióza) obsahujú chirálne centrá so špecifickou konfiguráciou (D-, L-) a sú opticky aktívne. V prírode prevládajú D-formy sacharidov. Sacharidy od C_5 môžu intramolekulovo cyklizovať za vzniku hemiacetálu/hemiketálu. Cyklické formy (pyranózy, furanózy) sú dominantnými štruktúrami monosacharidov vo vodnom roztoku (v rovnováhe je prítomnosť lineárnej formy menej ako 1%). Cyklizáciou vzniká nové chirálne centrum (α -/ β -anomér) a mení sa **optická otáčavosť**, ktorá je stanovovaná **polarimetricky**. Zmena optickej otáčavosti roztoku monosacharidu po ustálení rovnováhy medzi α - a β -formou sa nazýva **mutarotácia**. Jednoduché cukry môžu byť enzymatickými alebo chemickými reakciami premenené na rôzne deriváty. Oxidáciou vznikajú cukorné kyseliny, redukciou cukorné alkoholy. **Oxido-redukčné reakcie** sú základom analytického stanovenia sacharidov. Hydrazínovou reakciou vznikajú osazóny s typickou kryštalickou štruktúrou. Enzymatickými reakciami vznikajú rôzne deriváty sacharidov s biologickou aktivitou (deoxysacharidy, fosfátové estery, aminosacharidy). V kyslých podmienkach podstupujú monosacharidy dehydratáciu za vzniku nových aldehydových foriem furfuralu alebo hydroxymetyl furfuralu, ktoré sú základom kvalitatívnych a kvantitatívnych analýz sacharidov.

Oligosacharidy (2–10 monosacharidových jednotiek; m.j.) a **polysacharidy** (>10 m.j.) vznikajú z relatívne malého množstva rozdielnych m.j. Z hexóz sú to najmä glukóza, fruktóza, manóza a galaktóza, z pentóz ribóza a xylóza).

Najjednoduchšie **oligosacharidy** sú disacharidy sacharóza, laktóza a maltóza:

laktóza	(O-β-D -galaktopyranozyl-(1 → 4)-D-glukopyranóza)	- mliečny cukor
maltóza	(O-α-D -glukopyranozyl-(1 → 4)-D-glukopyranóza)	- sladový cukor
sacharóza	(O-α -D -glukopyranozyl-(1 → 2)-D-fruktofuranóza)	- stolový cukor.

Laktóza a maltóza majú voľný anomerický uhlík schopný mutarotácie, čo im umožňuje zúčastniť sa oxido-redukčných reakcií a nazývajú sa **redukujúce** disacharidy. V prípade molekuly sacharózy substituované anomerické uhľíky nedovoľujú konverziu na aldehydovú konfiguráciu, preto sa nezúčastňujú oxido-redukčných reakcií typických pre redukujúce sacharidy. Sacharóza je **neredukujúci** disacharid. Zriedenými kyselinami je sacharóza ľahko hydrolyzovaná.

Polysacharidy, nazývané glykany, sú zložené z monosacharidov alebo ich derivátov. **Homopolysacharidy** obsahujú jeden druh monosacharidovej molekuly, **heteropolysacharidy** obsahujú viac ako jeden druh monosacharidu. Prítomnosť ďalších hydroxylových skupín na molekule sacharidu (okrem poloacetálovej) umožňuje vytvárať aj vetvené polymérne reťazce. Polysacharidy poskytujú pre živé bunky zásobu energie (škrob, glykogén), štruktúrne komponenty (celulóza, chitín) a ochranné látky (kyselina hyalurónová). Sacharidy sa spájajú aj s inými nesacharidovými molekulami a vytvárajú komplexné štruktúry (glykolipidy, glykoproteíny, proteoglykán) s rôznymi funkciami. Najbežnejším rastlinným polysacharidom je škrob. Je to zásobná energetická látka uložená vo forme granúl v strome plastidov rastlinných buniek (vysoký výskyt v hľuzách zemiakov, v zrnách kukurice). Je zložený z lineárnych reťazcov amyulózy s helikálnou štruktúrou a vetvených reťazcov amylopektínu, ktoré vytvárajú vo vode micelárne suspenzie (sú nerozpustné v studenej vode). Štruktúry sú rozlíšiteľné po reakcii s jódou.

Vybrané experimenty sú zamerané na kvalitatívnu analýzu sacharidov. Analyzované sú ich redukčné vlastnosti a schopnosť vytvárať furánové deriváty. Na realizáciu týchto dôkazových reakcií sme použili chemicky čisté látky a extrakty z rastlinného materiálu.

1.1 Príprava vzorky z rastlinného materiálu

1.1.1 Extrakcia sacharidov z ovocia



Chemikálie a pomôcky: trecia miska, sklená tyčinka, lievnik, kadičky, destilovaná voda

Analyzovaná vzorka: rastlinný materiál (ovocie, zelenina)

Pracovný postup:

1. Navážime 5 g vybraného rastlinného materiálu a dokonale rozotrieme v trecej miske.
2. Na extrakciu sacharidov pridáme k homogenátu 30 cm³ destilovanej vody a dôkladne premiešame.
3. Výluh homogenátu prefiltrujeme, filtrát zriedime destilovanou vodou v pomere 1:1 a použijeme na dôkazové reakcie.

1.1.2 Extrakcia škrobu zo zemiakov



Chemikálie a pomôcky: etanol, odmerný valec, filtračný papier, gáza, strúhadlo

Analyzovaná vzorka: zemiak

Pracovný postup:

1. Očistený zemiak nastrúhame a vyžmýkame cez viac vrstiev gázy do kadičky cez lievnik pripevnený na stojane.
2. Po usadení škrobových zŕn na dne nádoby kvapalinu zlejeme a škrob premiešame s 50 cm³ destilovanej vody.
3. Postup opakujeme ešte raz s destilovanou vodou a raz s etanolom.
4. Suspenziu prefiltrujeme cez skladaný filter a usadeninu na filtračnom papieri vysušime na vzduchu a použijeme na ďalšie experimenty.

Kontrolné otázky:

1. Prečo je vhodné na extrakciu sacharidov zvoliť skôr rastlinné bunky a nie živočíšne?
2. Ktoré nízkomolekulové sacharidy sú bohato zastúpené v ovocí a zelenine?
3. Ktoré časti rastlín sú najvhodnejšie na izoláciu sacharidov? Zdôvodnite.
4. Popíšte štruktúru a funkciu škrobu a celulózy.
5. Aká je rozpustnosť polysacharidov vo vode?

1.2 Molischova reakcia – dôkaz prítomnosti sacharidov

Molischova reakcia slúži na detekciu prítomnosti sacharidov v skúmanej vzorke.

V prítomnosti kyseliny sacharidy dehydratujú. Z pentóz vzniká furfural

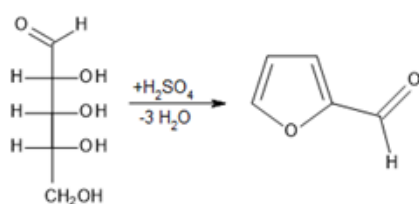
a z hexóz 5-(hydroxymetyl)furfuralu. V ďalšom kroku reakcie kondenzuje

furfural, resp. 5-(hydroxymetyl)furfural s dvoma molekulami α -naftolu. Táto reakcia je

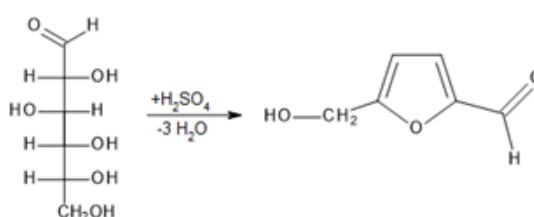
sprevádzaná výraznou farebnou zmenou. Reakcia nie je špecifická, môže byť pozitívna za

prítomnosti iných aldehydov. Preto umožňuje rozlíšiť sacharidy len od nesacharidových

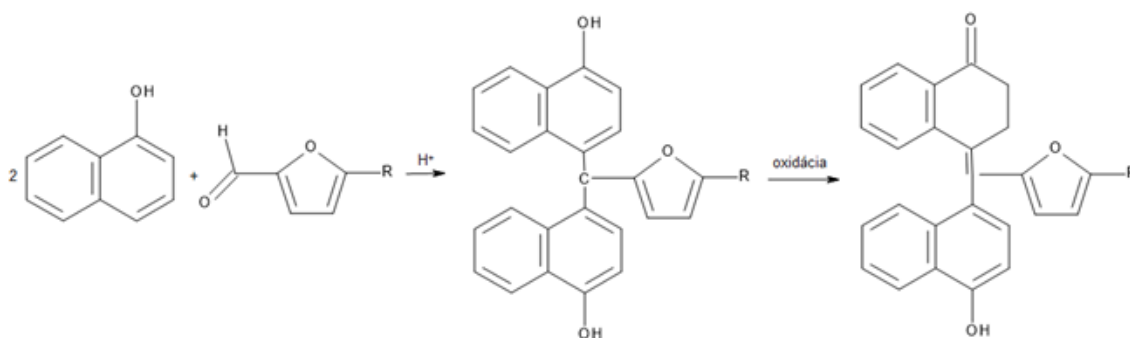
molekúl bez aldehydovej skupiny.



dehydratácia D-ribózy za vzniku furfuralu



dehydratácia D-glukózy za vzniku 5-(hydroxymetyl)furfuralu



kondenzácia furfuralu, resp. 5-(hydroxymetyl)furfuralu (v závislosti od R) s dvoma molekulami α -naftolu (Molischovo činidlo)

Chemikálie a pomôcky: Molishovo činidlo (10% roztok α -naftolu v etanole), koncentrovaná H_2SO_4 , sklené skúmavky, pipeta

Analyzovaná vzorka: 1% vodný roztok glukózy, fruktózy, sacharózy, laktózy, destilovaná voda, neznáma vzorka

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm³ analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 3 kvapky Molischovho činidla.
3. Zmes opatrne podvrstvíme 1 cm³ kyseliny sírovej.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

1.3 Dôkaz škrobu jódovou skúškou a hydrolýza škrobu

Niektoré polysacharidy, napríklad glykogén a škrob reagujú s jódmi. Škrob sa skladá z amylózy (20%) a amylopektínu (80%). Kým amylóza je rozpustná v studenej vode, amylopektín vo vode napučíava a rozpúšťa sa v horúcej vode, z ktorej po ochladiení vzniká škrobový maz. Obe formy obsahujú α -D-glukopyranózové monoméry. Amylóza tvorí dlhé lineárne reťazce stočené do α -helixu, kým amylopektín vytvára rozvetvený reťazec s krátkymi helixami. Pridaním Lugolovho roztoku obsahujúceho jód dochádza k interkalácii molekúl jódu do štruktúry závitnice (helixu) a objavuje sa charakteristické sfarbenie, ktoré koreluje s dĺžkou reťazca. Zahrievaním, resp. ochladzovaním roztoku škrobu dochádza k linearizácii, resp. obnoveniu štruktúry závitnice, čo má vplyv aj na sfarbenie roztoku.



Chemikálie a pomôcky: Lugolov roztok (5 g I₂ a 2 g KI rozpustené v 300 cm³ horúcej vody; roztok je potrebné uchovávať v tmavej fľaši a v tme, je citlivý na svetlo), HCl, skúmavky, teplomer, držiak na skúmavky, vodný kúpeľ, kahan

Analyzovaná vzorka: 1% vodný roztok škrobu (použijeme škrob izolovaný zo zemiakov) a 1% vodný roztok sacharózy

Pracovný postup:

A. Dôkaz škrobu

1. Extrahovaný zemiakový škrob zalejeme horúcou destilovanou vodou.
2. Do skúmaviek napipetujeme po 5 cm³ roztoku škrobu a roztoku sacharózy.
3. Ku každej analyzovanej vzorke pridáme niekoľko kvapiek Lugolovho roztoku.
4. Skúmavky opatrne zahrejeme vo vodnom kúpeli na teplotu 60 °C.
5. Skúmavky následne ochladíme pod prúdom tečúcej vody na teplotu 25 °C.

B. Hydrolýza škrobu

1. K 10 cm³ roztoku zemiakového škrobu pridáme niekoľko kvapiek koncentrovanej HCl.
2. Skúmavku vložíme do vodného kúpeľa s vriacou vodou.
3. Vždy po 5 minútach odoberieme približne 0,5 cm³ vzorky z hydrolyzovaného škrobového roztoku.
4. K vzorke prikvapneme Lugolov roztok.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

A.

Obsah skúmavky	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena	Zohriatie na 60°C	Ochladenie na 25°C
Sacharóza + Lugolov roztok				
Škrob + Lugolov roztok				

B.

Doba zahrievania skúmavky (škrobový roztok + HCl)	Sfarbenie vzorky po pridaní Lugolovho roztoku
0 min	
5 min	
10 min	
15 min	
20 min	
25 min	

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

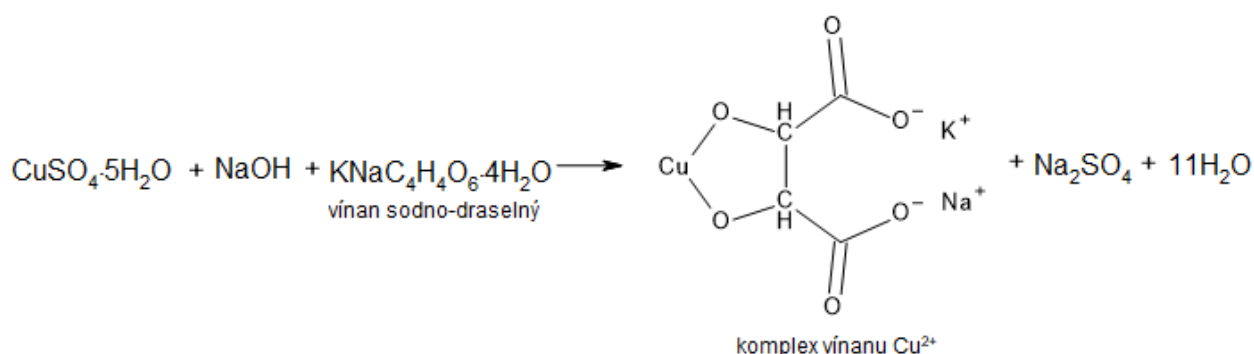
.....

.....

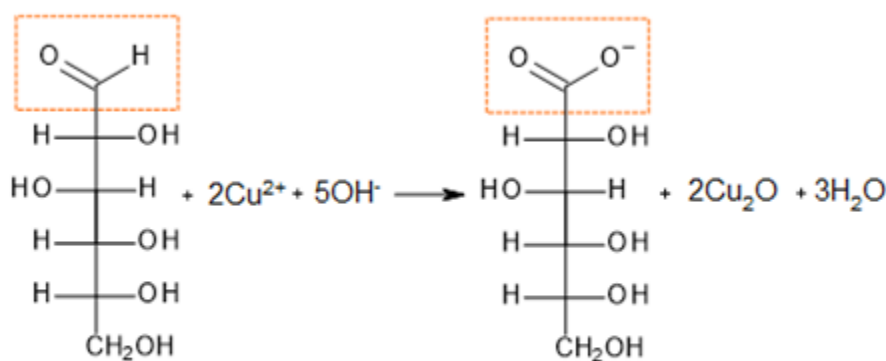
1.4 Stanovenie redukujúcich sacharidov

1.4.1 Dôkaz redukujúcich sacharidov Fehlingovou reakciou

Na realizáciu Fehlingovej reakcie je potrebné vopred pripraviť Fehlingovo činidlo. Pri príprave Fehlingovho činidla dochádza k reakcii medzi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a NaOH za vzniku svetlomodrej zrazeniny hydroxidu meďnatého. Táto zrazenina je rozpustná v nadbytku, preto vzniká komplex Cu^{2+} s vínanom, ktorý tak bráni vypadnutiu $\text{Cu}(\text{OH})_2$ z roztoku:



Sacharidy s redukčnými vlastnosťami redukujú z Fehlingovho roztoku meď Cu^{2+} a vzniká oxid meďný. Reakcia je sprevádzaná výraznou farebnou zmenou. Ak nie je pozorovaná farebná zmena, prítomný sacharid nemá redukujúce vlastnosti. V tejto dôkazovej reakcii je popri redukcii meďnatých iónov oxidovaná aldehydová skupina na karboxylovú:



Oxidácia glukózy a redukcia meďnatého katiónu

Pozn.: Pozitívnu reakciu však možno pozorovať aj v prítomnosti chloroformu, kyseliny močovej, amónnych solí a pod. Fehlingovu reakciu je potrebné doplniť aj inými reakciami dokazujúcimi prítomnosť redukujúcich sacharidov.

Chemikálie a pomôcky: Fehling roztok I (7% vodný roztok $\text{Cu}(\text{SO}_4)$), Fehling roztok II (vodný roztok 35 g vínanu sodno-draselného v 100 cm^3 10% NaOH), pipety, vodný kúpeľ

Analyzovaná vzorka: 1 % vodné roztoky glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, sacharózy, rastlinný extrakt

Pracovný postup:

1. V kadičke zmiešame rovnaké objemy oboch roztokov Fehling I a II.
2. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm^3 analyzovanej vzorky a 2 cm^3 Fehlingovho činidla.
3. Skúmavky zahrievame vo vodnom kúpeli približne 10 minút.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Fehlingov roztok I je 7% vodný roztok $\text{Cu}(\text{SO}_4)$. Vypočítajte návažok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ na prípravu 100 cm^3 vodného roztoku.
2. Fehlingov roztok II sa pripravuje navážením 35 g vínanu sodno-draselného v 100 cm^3 10% NaOH. Vypočítajte, koľko percentný vínan sodno-draselný je v tomto roztoku a aký návažok NaOH je potrebné na prípravu jeho 10% vodného roztoku.
3. Vypočítajte relatívne mólové hmotnosti vybraných sacharidov: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza.
4. Vypočítajte návažky sacharidov na prípravu 1 %-ných vodných roztokov s objemom 50 cm^3 .

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

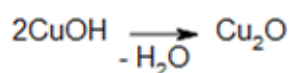
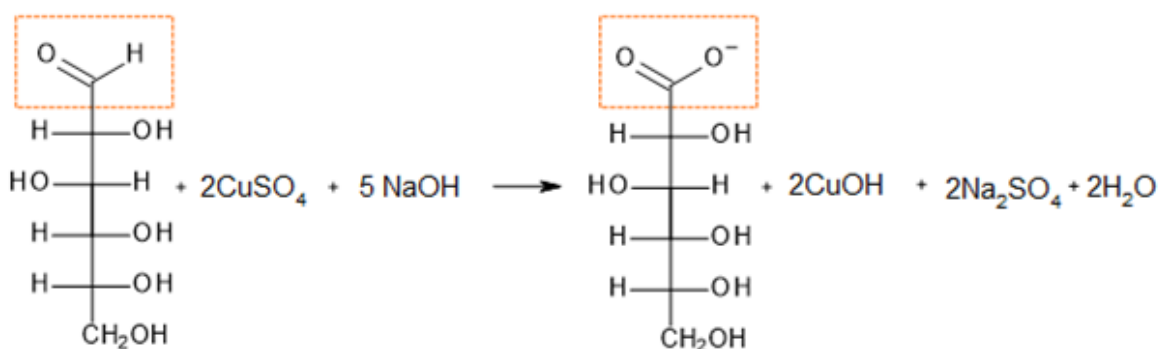
.....

.....

1.4.2 Dôkaz redukujúcich sacharidov Trommerovou reakciou



Princíp Trommerovej reakcie je podobný ako pri Fehlingovej skúške, avšak je použité iné komplexotvorné činidlo. Reakciou CuSO_4 a NaOH vzniká zrazenina $\text{Cu}(\text{OH})_2$, ktorá sa po pretrepaní postupne rozpúšťa a sfarbuje roztok na modro. Redukujúce sacharidy redukujú meďnatý kation Cu^{2+} v alkalickom prostredí hydroxidu meďnatého na Cu^+ v zrazenine CuOH , ktorá sa postupne mení na Cu_2O . Obe formy výskytu Cu^+ katiónu majú charakteristické sfarbenie.



Oxidácia glukózy a redukcia meďnatého katiónu

Chemikálie a pomôcky: 10% vodný roztok hydroxidu sodného, 5% vodný roztok síranu meďnatého, skúmavky, pipety

Analyzovaná vzorka: 1% vodný roztok glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, sacharózy, rastlinný extrakt

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm^3 analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 2 cm^3 roztoku NaOH a po kvapkách za stáleho miešania pridávame roztok síranu meďnatého až do vzniku zákalu.
3. Obsah skúmaviek opatrne zahrejeme vo vodnom kúpeli do varu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Vypočítajte návažok NaOH na prípravu 50 cm³ 10% vodného roztoku NaOH.
2. Vypočítajte návažok Cu(SO₄)·5H₂O na prípravu 50 cm³ 5% vodného roztoku Cu(SO₄).
3. Z akých monosacharidových jednotiek sú zložené disacharidy laktóza a sacharóza a akým typom väzby sú viazané?
4. Na základe chemickej štruktúry laktózy a sacharózy vysvetlite redukujúce, resp. neredukujúce vlastnosti týchto disacharidov.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

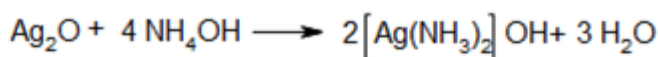
.....

.....

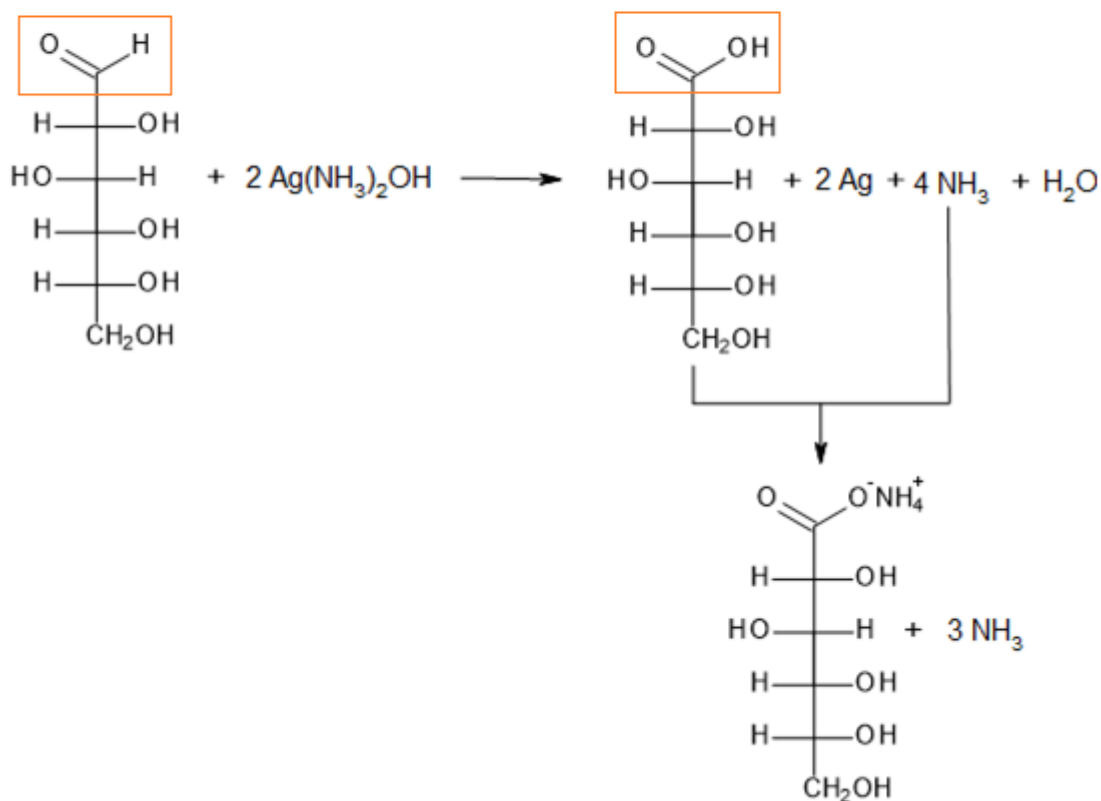
.....

1.4.3 Dôkaz redukujúcich sacharidov Tollensovou reakciou

Na dôkaz redukujúcich sacharidov Tollensovou skúškou je potrebné pripraviť Tollensove činidlo. Pri príprave činidla reaguje dusičnan strieborný s hydroxidom sodným za vzniku hnedo-šedej zrazeniny oxidu strieborného. Zrazeninu je potrebné rozpustiť v nadbytku zriedeného roztoku amoniaku, pričom vznikne bezfarebný diaminostrieborný komplex (diaminostrieborný kation), ktorý je ako silné oxidačné činidlo kľúčovou zložkou Tollensovho činidla. Komplex môže oxidovať aldehydy na karboxylové kyseliny, preto reakcia umožňuje odlíšiť aldehydy od ketónov. Pozitívnu reakciu poskytujú však α -hydroxyketóny, ktoré sú činidlom oxidované na aldehydy. Vzniknutá karboxylová kyselina môže vytvárať v danom prostredí amónnu soľ.



Príprava Tollensovho činidla



Oxidácia glukózy a redukcia strieborného kationu na elementárne striebro

Chemikálie a pomôcky: Tollensovo činidlo (do 5% roztoku AgNO_3 pridáme kvapku roztoku 10% NaOH a vzniknutú šedo-hnedú zrazeninu rozpustíme postupným prikvapkáváním 2 % roztoku amoniaku), skúmavky, vodný kúpeľ

Pozn.: *Tollensovo činidlo neuskladňujeme, pretože stáťm vzniká výbušný nitrid strieborný.*

Analyzovaná vzorka: 1% vodný roztok glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, sacharózy, rastlinný extrakt

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme 2 cm^3 analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 2 cm^3 Tollensovho činidla.
3. Obsah skúmaviek zahrievame 3 minúty vo vodnom kúpeli do varu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. V laboratóriu máme pripravený 25% vodný roztok amoniaku (NH_4OH). Ako by ste pripravili 100 cm^3 2% vodného roztoku amoniaku potrebného na rozpustenie zrazeniny, ktorá vzniká pri príprave Tollensovho činidla?
2. Aký produkt poskytuje glukóza pri Tollensovej skúške?
3. Princíp reakcií prípravy Tollensovho činidla a následnej oxidácie aldehydu je uvedený v skrátenej forme. Napíšte úplný zápis reakcie, v ktorej bude zohľadnená prítomnosť dusičnanu sodného pri rozpúšťaní Ag_2O .

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

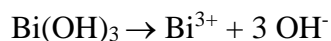
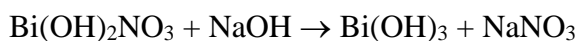
.....

.....

.....

1.4.4 Dôkaz redukujúcich sacharidov Nylanderovou reakciou

Nylanderova reakcia je založená na redukcii Bi^{3+} katiónov redukujúcimi sacharidmi. Výsledkom tejto reakcie je vznik bizmutu Bi^0 .



Pozn.: Reakcia nie je špecifická, pozitívny výsledok dávajú aj bielkoviny.

Chemikálie a pomôcky: Nylanderovo činidlo (1g dusičnanoxidu bizmutitého $\text{BiNO}_3(\text{O})$ a 50 g NaOH rozpustíme a doplníme do 50 cm^3 destilovanej vody), skúmavky, držiak na skúmavky, kahan

Analyzovaná vzorka: 1% vodný roztok glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, sacharózy

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm^3 analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 2 cm^3 Nylanderovho činidla.
3. Obsah skúmaviek opatrne zahrievame vo vodnom kúpeli do varu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Kontrolné otázky:

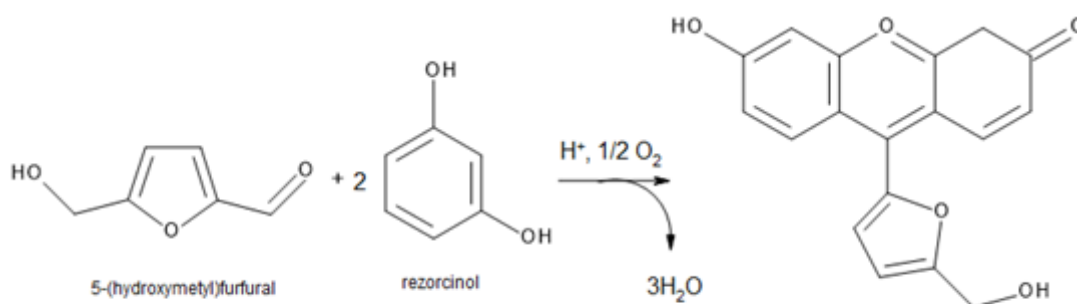
- 1. Aké iné katióny kovov by sme mohli použiť na detekciu redukčných vlastností sacharidov?
- 2. Dochádza k redukcii bizmutitého katiónu aj v prítomnosti polysacharidov? Ak áno, vysvetlite za akých podmienok.

Poznámky:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

1.5 Selivanova reakcia na rozlíšenie aldóz a ketóz

Táto reakcia sa používa na odlíšenie aldóz od ketóz. Pri zahrievaní ketózy dochádza k dehydratácii vplyvom kyseliny chlorovodíkovej. Výsledkom tejto reakcie je furfural a jeho deriváty. Reakciou ketohexózy s kyselinou chlorovodíkovou vzniká 5-(hydroxymetyl)furan-2-karbaldehyd, reakciou ketopentózy vzniká furfural. Pridaním rezorcinolu sa vzorka s obsahom ketózy výrazne zafarbí. Vo vzorke s obsahom aldózy po dlhšom varení vzniká iba zákal. V prípade aldóz dochádza k dehydratácii omnoho pomalšie, keďže musí najskôr dôjsť k izomerizácii na ketózu (ketohexózu – D-fruktózu). Táto izomerizácia je zásadito, alebo kyslo hydrolyzovaná. Aldózy preto reagujú výrazne pomalšie ako ketózy.



Kondenzácia 5-(hydroxymetyl)furfuralu a rezorcinolu

Chemikálie a pomôcky: 25% HCl, rezorcinol, skúmavky, pipety

Analyzovaná vzorka: 1% roztok glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, sacharózy, rastlinný extrakt

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm^3 analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 2 cm^3 25% HCl a niekoľko kvapiek rezorcinolu.
3. Obsah skúmavky krátko a mierne zahrejeme.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na realizáciu experimentu potrebujeme 25% kyselinu chlorovodíkovú. Vypočítajte, v akom pomere musíme zriediť 35% HCl, aby sme pripravili 10 cm³ roztoku s požadovanou koncentráciou 25%.
2. Selivanova reakcia sa používa na odlíšenie aldóz a ketóz. Môžeme predpokladať pozitívnu reakciu s polysacharidom?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2 LIPIDY

Lipidy reprezentujú veľmi heterogénnu skupinu hydrofóbných biomolekúl, ktoré sa nerozpúšťajú vo vode, ale naopak, sú dobre rozpustné v organických rozpúšťadlách, napríklad v chloroforme, dietylétere, benzéne, hexáne. Podľa štruktúrnych znakov sú lipidy klasifikované na niekoľko skupín.

Jednoduché lipidy, nazývané aj neutrálne tuky, sú z chemického hľadiska triacylglyceroly. Ich hydrolýzou vzniká glycerol a mastné kyseliny. Ak je hydrolýza uskutočnená v prostredí alkalických hydroxidov (v zásaditom prostredí), vznikajú alkalické soli mastných kyselín (mydlá). Reakcia má preto označenie zmydlenie, alebo saponifikácia.

Označenie *mastné* kyseliny je pre vyššie monokarboxylové kyseliny prítomné v lipidoch (od C₄). Väzby v mastných kyselinách môžu byť nasýtené (napríklad C₁₂, kyselina laurová,; C₁₆, kyselina palmitová, C₁₈, kyselina steárová) a nenasýtené (napríklad C₁₈ Δ⁹, kyselina olejová,; C₁₈ Δ^{9,12}, kyselina linolová, C₁₈ Δ^{9,12,15}, kyselina linolénová, C₂₀ Δ^{5,8,11,14}, kyselina arachidónová). Charakter mastných kyselín ovplyvňuje skupenský stav triacylglycerolov. Označenie tuky je pre triacylglyceroly s vysokým zastúpením nasýtených mastných kyselín (pri izbovej teplote sú tuhé). Oleje sú triacylglyceroly bohaté na nenasýtené mastné kyseliny a pri izbovej teplote sú tekuté.

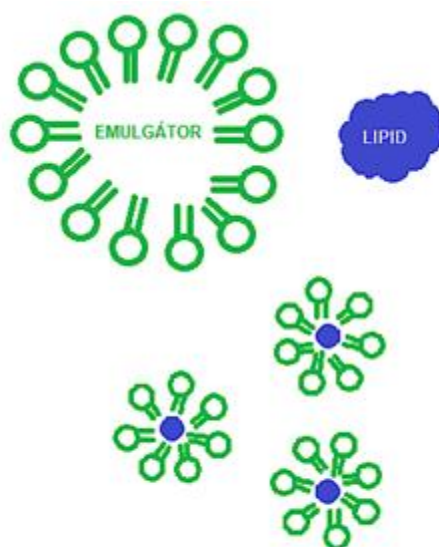
Mastné kyseliny s nenasýtenými väzbami poskytujú reakcie typické pre alkény (halogenácia, hydrogenácia, ozonolýza a ďalšie). Tieto reakcie poskytujú aj triacylglyceroly obsahujúce mastné kyseliny s nenasýtenými väzbami. Rozsah halogenácie sa využíva na vyjadrenie stupňa nenasýtenosti tukov/olejov.

Medzi jednoduché lipidy sú zaraďované aj vosky (včelí, palmový), estery mastných kyselín s vyššími jedno- a dvojsýtnymi voskovými alkoholmi, ako aj látky so steroidnou štruktúrou (steroidy). Ich spoločným znakom je štruktúra cyklopentanoperhydrofenantrénu. Látky s uvedenou štruktúrou sú napríklad živočíšny cholesterol, z ktorého sú syntetizované významné molekuly s biologickou aktivitou (napríklad steroidné hormóny), alebo rastlinný lanosterol.

Ďalšie skupiny lipidov sú zložené lipidy (fosfolipidy a glykolipidy). Sú významnou zložkou biologických membrán. Fosfolipidy sú klasifikované ako saponifikovateľné lipidy.

2.1 Rozpustnosť a emulgácia lipidov

Lipidy sú nerozpustné vo vode, ale dobre rozpustné v organických rozpúšťadlách. Hydrofóbny charakter lipidov spôsobuje, že pri ich kontakte s vodným prostredím vznikajú nestabilné emulzie (zmes dvoch navzájom nemiešateľných kvapalín), ktoré sa po čase oddelia. Stabilitu emulzií zvyšujú emulgátory, ktoré znižujú povrchové napätie v mieste styku dispergovaných častíc. Úlohu emulgátorov plnia hydroxidy, bielkoviny, mydlá a pod.



Mechanizmus pôsobenia emulgátora

Chemikálie a pomôcky: dietyléter, chloroform, etanol, 1% roztok vajcového bielka, 1% roztok KOH, 1% roztok detergentu, , skúmavky, vodný kúpeľ

Analyzované vzorky: bravčová masť, potravinársky olej

Pracovný postup:

A Rozpustnosť lipidov

1. Do štyroch skúmaviek dáme po pol lyžičke bravčovej masti.
2. Do prvej skúmavky nalejeme 2 cm³ destilovanej vody, do druhej 2 cm³ dietyléteru, do tretej 2 cm³ chloroformu a do štvrtej 2 cm³ etanolu.
3. Obsah skúmaviek pretrepeme a necháme stáť 5 minút.
4. Pozorujeme rozpustnosť tuku v jednotlivých rozpúšťadlách.

B Emulgácia lipidov

1. Do troch skúmaviek dáme po 5 kvapiek potravinárskeho oleja a po 3 cm³ vody.

2. Do prvej skúmavky navyše pridáme 5 kvapiek roztoku bielkoviny, do druhej 5 kvapiek roztoku KOH a do tretej skúmavky 5 kvapiek roztoku detergentu.
3. Skúmavky 5 minút zahrievame vo vriacom vodnom kúpeli.
4. Po vychladnutí dobre pretrepeme a pozorujeme, v ktorej zo skúmaviek sa vytvorila najhomogénnejšia a najstabilnejšia emulzia.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

A Rozpustnosť lipidov

Rozpúšťadlo	Pozorovaná zmena

B Emulgácia lipidov

Emulgátor	Pozorovaná zmena

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

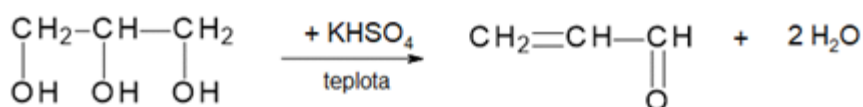
1. Navrhните iné rozpúšťadlá, okrem chloroformu a dietyléteri, v ktorých by sa tuk mohol dobre rozpúšťať.
2. Ako sú emulgované tuky v tráviacej sústave človeka?
3. Uved'te komerčne dostupné detergenty, ktoré môžu byť v pokuse použité.

Poznámky:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

2.2 Akroleínová reakcia – dôkaz prítomnosti glycerolu

Akroleínová reakcia slúži na dôkaz prítomnosti glycerolu v tukoch. Glycerol prítomný v tukoch je pri miernom zahrievaní s KHSO_4 dehydratovaný a oxidovaný na propenál (akrylaldehyd, akroleín) s charakteristickým dráždivým a štipľavým zápachom. Reakciu nedávajú vosky a iné lipidy, ktoré v molekule neobsahujú glycerol.



Dehydratácia glycerolu na akroleín

Chemikálie a pomôcky: KHSO_4 , skúmavky, držiak na skúmavky, kahan

Analyzované vzorky: glycerol, olivový olej, včelí vosk, bravčová masť

Pracovný postup:

1. Do jednotlivých skúmaviek pridáme vzorky - pár kvapiek glycerolu, olivového oleja, malé množstvo včelieho vosku a bravčovej masti.
2. Do každej vzorky pridáme niekoľko kryštálikov bezvodého KHSO_4 .
3. Obsah každej skúmavky zahrievame niekoľko minút.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Lipid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

- 1. Ktoré z nasledovných lipidov budú dávať pozitívnu akroleínovú reakciu: včelí vosk, cholesterol, tripalmitoylglycerol, sitosterol, fosfatidyl inozitol?
- 2. Vymenujte 3 druhy voskových alkoholov.
- 3. Glycerol je zložkou zložených lipidov. Aký iný alkohol je prítomný v zložených lipidoch?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2.3 Dôkaz lipidov v semenách rastlín

Prítomnosť lipidov v rastlinných častiach môžeme dokázať aj pomocou červeného farbiva Sudan III. Je to azofarbivo 1-[[4-(fenyldiazenyl)fenyl]diazenyl]naftalén-2-ol, ktoré sa v lipidoch dobre rozpúšťa za vzniku veľmi výrazného sfarbenia, ale s lipidmi nereaguje. Sudan III je rozpustný v organických rozpúšťadlách ako je chloroform alebo toluén (2 mg/cm^3), rozpustnosť v etanole je menšia (1 mg/cm^3) a vo vode je rozpustnosť len $0,1 \text{ mg/cm}^3$.



Chemikálie a pomôcky: 0,5% etanolový roztok farbiva Sudan III, etanol, skúmavky, držiak na skúmavky, vodný kúpeľ, mažiar na rozdrvenie semien

Analyzované vzorky: 3 vzorky rastlinných semien (vlašské orechy, arašidy, kešu orechy, mak, slnečnicové semená a iné)

Pracovný postup:

1. Do jednotlivých skúmaviek nasypeme po pol lyžičky rozdrvených semien.
2. Ku každej vzorke pridáme 3 cm^3 destilovanej vody a obsah skúmavky varíme približne 5 minút.
3. Do každej skúmavky pridáme 3 kvapky farbiva Sudan III.
4. Obsah skúmaviek premiešame a necháme postáť.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Rastlinná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. V ktorých častiach rastlín sú uchovávané lipidy ako zásoba energie?
2. Aké masné kyseliny sú prevažne zastúpené v rastlinných triacylglyceroloch?
3. Vysvetlite, prečo je pre rastliny výhodnejšie používať v semenách ako zásobnú energetickú látku pri klíčení lipidy a nie polysacharidy?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

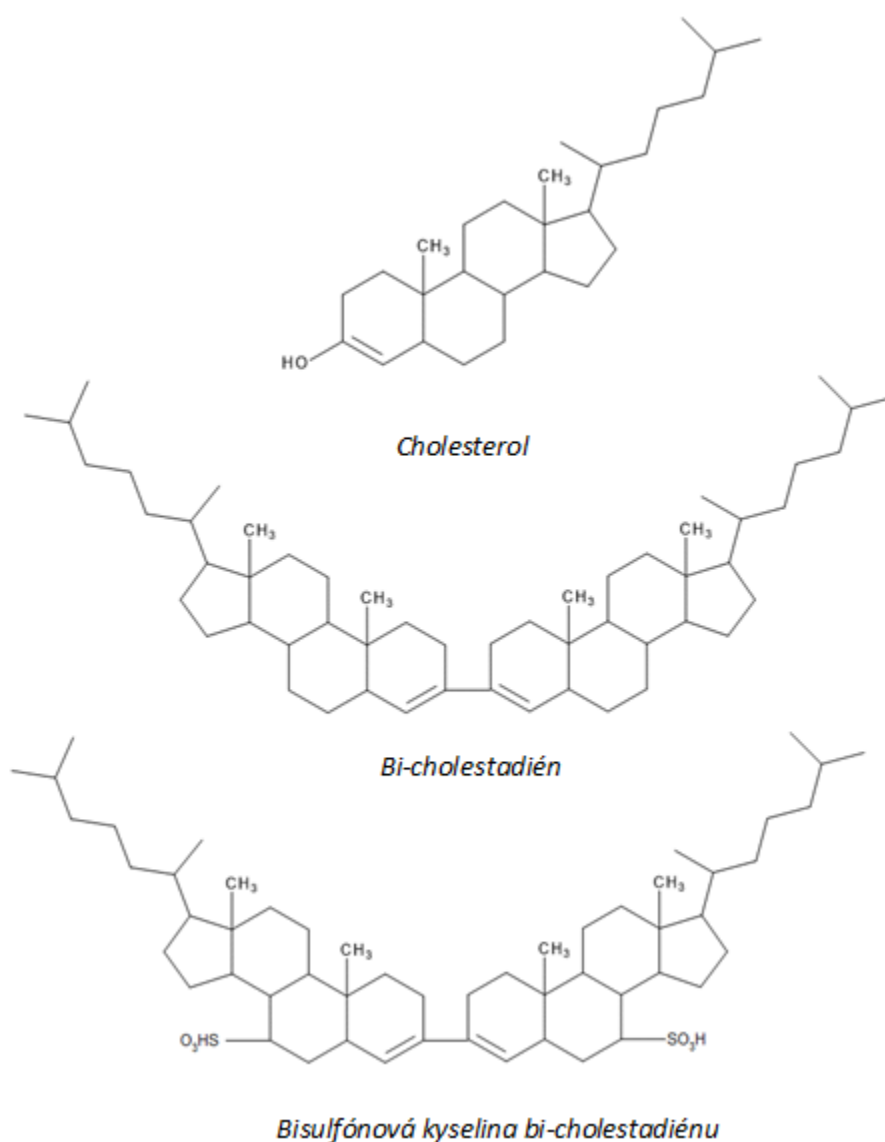
.....

.....

.....

2.4 Dôkaz cholesterolu Salkowského reakciou

Salkowského reakcia sa používa na dokázanie prítomnosti cholesterolu a terpenoidných látok v skúmanej vzorke. Princíp reakcie je pri oboch typoch látok podobný. Pridávaná kyselina sírová pôsobí ako hygroskopická látka, v prítomnosti ktorej dochádza k eliminácii vody. V prípade cholesterolu dochádza k spojeniu dvoch molekúl cholesterolu cez polohy C₃ za vzniku medziproduktu bi-cholestadiénu. Bi-cholestadién sa následne sulfonuje a vzniká tak finálny produkt bisulfónová kyselina bi-cholestadiénu.



Chemikálie a pomôcky: chloroform, konc. H₂SO₄, skúmavky, stojan na skúmavky, pipety
Analyzované vzorky: 2 vzorky živočíšneho tuku (maslo, bravčová masť), 2 vzorky rastlinného oleja, 2% roztok cholesterolu v chloroforme

Pracovný postup:

1. Do prvých dvoch skúmaviek dáme po 1 g živočíšnych tukov, do ďalších dvoch skúmaviek po 1 cm³ rastlinných olejov, do poslednej skúmavky 1 cm³ roztoku cholesterolu.
2. Do každej skúmavky pridáme 4 cm³ chloroformu a 2 cm³ konc. H₂SO₄.
3. Obsah skúmavky premiešame a necháme stáť.
4. Pozorujeme farebné zmeny.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Lipid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia**Diskusia** (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Pomenujte základný skelet štruktúry cholesterolu a skupinu lipidov, medzi ktoré je cholesterol zaradený.
2. Cholesterol patrí medzi nezmydeliteľné živočíšne lipidy. Vysvetlite.
3. Aký biologický význam má esterifikácia cholesterolu u živočíchov?
4. Molekula cholesterolu má celkovo 8 chirálnych centier. V koľkých stereoizomérnych formách môže existovať?
5. Vymenujte 3 biologické funkcie cholesterolu.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

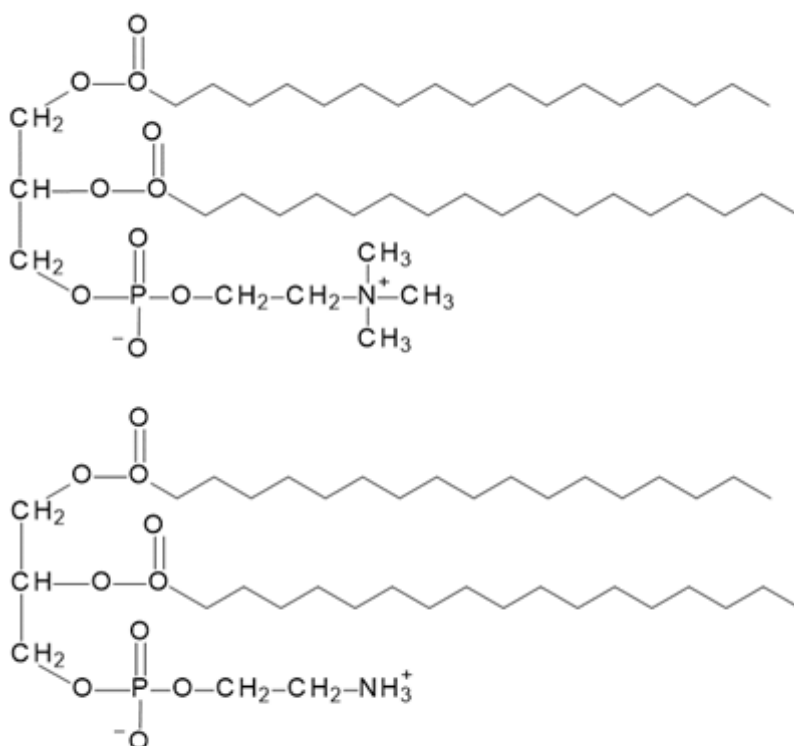
.....

.....

.....

2.5 Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu

Fosfatidylcholín (lecitín) a fosfatidyletanolamín (kefalín) patria medzi fosfolipidy a môžeme ich nájsť napríklad vo vaječnom žĺtku. Na izoláciu týchto dvoch foriem lipidov využijeme rozdielnu rozpustnosť ich kademantých solí v organických rozpúšťadlách. Kademnatá soľ fosfatidyletanolamínu sa v dietyléri rozpúšťa, naopak kademnatá soľ fosfatidylcholínu nie.



Fosfatidylcholín (lecitín) a fosfatidyletanolamín (kefalín)

Chemikálie a pomôcky: etanol, dietyléter, acetón, 10% etanolový roztok CdCl_2 , kadičky, filtračná aparatura, varné hniezdo

Analyzované vzorky: vaječný žĺtok

Pracovný postup:

1. Žĺtok oddelíme od bielka. Žĺtok zmiešame s 10 cm^3 etanolu a 15 cm^3 dietyléru.
2. Zmes za občasného miešania necháme stáť približne 10 minút a následne prefiltrujeme cez filtračný papier.
3. Filtrát odparíme vo vodnom kúpeli až do zostatku olejovitej kvapaliny.
4. Kvapalinu necháme ochladiť a premývame ju postupným pridávaním 10 cm^3 acetónu až dotedy, kým acetón nezostane bezfarebný.
5. Zrazeninu rozpustíme v 10 cm^3 etanolu a pridáme 10 cm^3 etanolového roztoku CdCl_2 .

6. Do novovytvorenej zrazeniny pridáme 10 cm³ éteru.
7. Rozpustenú časť zrazeniny prefiltrujeme a necháme vysušiť (získame lecitín).
8. Získaný filtrát odparíme (získame kefalín).

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky a úlohy:

1. Pomenujte skupinu lipidov, do ktorej patrí lecitín?
2. Napíšte štruktúru cholínu.
3. Vymenujte aspoň 2 biologické funkcie lecitínu.
4. Ktoré potraviny sú bohaté na prítomnosť lecitínu?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

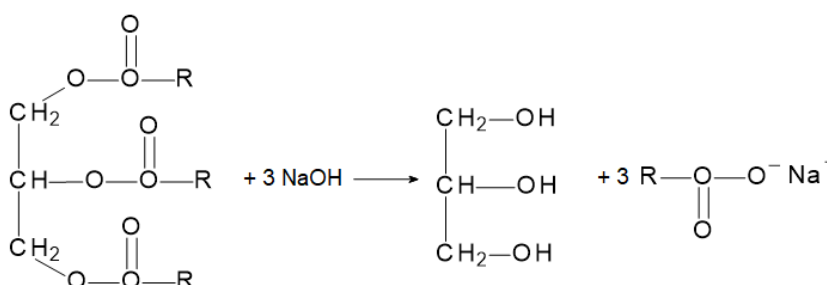
.....

.....

.....

2.6 Stanovenie čísla zmydelnenia

Číslo zmydelnenia je definované ako množstvo miligramov hydroxidu sodného, ktoré je potrebné na úplnú neutralizáciu nižších mastných kyselín (číslo kyslosti) a na zmydelnenie esterových väzieb (esterové číslo), obsiahnutých v 1 g tuku. Táto hodnota vyjadruje množstvo mastných kyselín v danom tuku a je nepriamo úmerná priemernej molekulovej hmotnosti mastných kyselín v zmydelňovanom tuku. Číslo zmydelnenia je tým vyššie, čím sú molekulové hmotnosti mastných kyselín nižšie, teda čím sú reťazce kratšie. V jednom grame tuku ich teda bude viac.



Chemikálie a pomôcky: 0,5 mol. dm⁻³ etanolový roztok NaOH, 0,5 mol. dm⁻³ vodný roztok HCl, fenolftaleín, varná banka, spätný chladič, varné guľičky, vodný kúpeľ, kadičky, byreta

Analyzované vzorky: olivový olej

Pracovný postup:

1. Do banky so zábrusom dáme 2 g olivového oleja, 25 cm³ etanolového roztoku NaOH s koncentráciou 0,5 mol.dm⁻³ a niekoľko varných guľičiek.
2. Banku uzavrieme spätným chladičom a varíme vo vodnom kúpeľi minimálne 30 minút.
3. Po odstavení vodného kúpeľa musí byť kvapalina číra bez tukových kvapôčok.
4. Chladič vypláchneme 30 cm³ destilovanej vody, vodu lejeme zhora cez chladič.
5. Do horúceho roztoku pridáme 3 - 4 kvapky fenolftaleínu.
6. Titráciu 0,5 mol. dm⁻³ roztokom HCl zistíme prebytok hydroxidu.
7. Titrujeme za tepla až do odfarbenia roztoku.
8. Za rovnakých podmienok robíme aj slepý pokus, teda bez navážku tuku. Pri slepom pokuse nerefluxujeme.
9. Z nameraných hodnôt vypočítame prebytok hydroxidu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Objem 0,5 mol.dm ⁻³ HCl použitý na titráciu
olivový olej	
slepá vzorka	

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Vypočítajte návažok NaOH potrebný na prípravu 30 cm³ 0,5 mol.dm⁻³ etanolového roztoku NaOH.
2. Vypočítajte objem HCl potrebný na prípravu 30 cm³ 0,5 mol. dm⁻³ vodného roztoku HCl. K dispozícii máme 35% HCl, s hustotou ρ (35% HCl) = 1,175 g.cm⁻³.
3. Vypočítajte číslo zmydelnenia vami zmydelneného lipidu podľa vzťahu:

$$\check{C}Z = \frac{(V(0) - V(vz)) \cdot 28,05}{m} \text{ mg KOH/g}$$

ČZ = číslo zmydelnenia

V(0) – objem roztoku HCl spotrebovaný pri titrácii slepého pokusu (cm³)

V(vz) – objem HCl spotrebovaný pri titrácii vzorky (cm³)

m – hmotnosť naváženej vzorky (g)

28,05 – faktor

3 AMINOKYSELINY A PROTEÍNY

Peptidy a proteíny sú biopolyméry zložené z L- α -aminokyselín kovalentne spojených peptidovými väzbami. Na skladbe peptidov a proteínov sa zúčastňuje 20 aminokyselín, ktoré sa líšia bočným reťazcom. Z chemického hľadiska sú aminokyseliny primárne amíny, okrem prolínu a hydroxyprolínu, ktoré sú iminokyseliny. Tento štruktúrny rozdiel môže byť zachytený ninhydrínovou reakciou.

Presné poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci predstavuje jeho primárnu štruktúru, ktorá zároveň určuje vyššie štruktúry (II – IV) a biologickú funkciu. **Sekundárnu štruktúru** tvorí najmä α -helix a β -skladaný list, ktoré sú stabilizované vodíkovými väzbami. Ohýbaním reťazcov α -helixu a β -skladaného listu vzniká **terciárna štruktúra** proteínu/peptidu. V tejto štruktúre sú reťazce orientované na základe interakcií medzi bočnými reťazcami aminokyselín. Okrem slabých interakcií (vodíkové, van der Waalsove, hydrofóbne, elektrostatické) môžu byť bočné reťazce spojené aj kovalentnou disulfidovou väzbou (napríklad medzi SH- skupinami cysteínov). **V kvartérnej štruktúre** sú vzájomne spájané viaceré molekuly proteínov, ktoré nazývame podjednotky.

Aminokyseliny môžu byť uvoľnené z proteínov po hydrolýze. Rozdiely v bočných reťazcoch aminokyselín umožňujú ich identifikáciu, napríklad na základe farebných reakcií. Farebné reakcie môžu poskytovať aj aminokyseliny viazané v proteínoch.

Na delenie aminokyselín je využívaná veľmi často papierová, tenkovrstvová a iónovymenná chromatografia. Ďalšia vlastnosť využívaná na delenie aminokyselín, peptidov a proteínov je ich iónový charakter (proteíny sú polyelektrolyty). Celkový náboj aminokyselín, peptidov a proteínov závisí od hodnoty disociačnej konštanty pK_a ionizovateľných skupín a pH prostredia. V izoelektrickom pH (pI) tieto molekuly nemajú náboj, preto sa nepohybujú v elektrickom poli. Naopak, pod / nad touto hodnotou získavajú náboj, vďaka ktorému sa v elektrickom poli pohybujú, čo je využívané v elektroforetickej separácii a izoelektrickej fokusácii. Aromatické aminokyseliny a proteíny vykazujú charakteristické UV absorpčné spektrum. Peptidy a proteíny obsahujúce aromatické aminokyseliny tyrozín a tryptofán majú absorpčné maximá v oblasti 280-295 nm. Absorpcia pri nižších vlnových dĺžkach prislúcha peptidovým väzbám. Treba mať však na pamäti, že v týchto oblastiach absorbujú aj iné zlúčeniny.

Peptidy a proteíny ako makromolekulové látky je možné z roztoku oddeliť od nízkomolekulových látok dialýzou.

3.1 Izolácia kazeínu a albumínov z mlieka

Kravské mlieko obsahuje okrem mliečneho cukru laktózy a tukov aj proteíny, najmä kazeín a albumín. Oba proteíny je možné získať z mlieka zrážaním. Kazeín je citlivý na zmenu pH a albumín je citlivý na teplo.



Chemikálie a pomôcky: 8% roztok kyseliny octovej, kadička, filtračná aparátúra, skúmavky, pipeta, stojan na skúmavky, držiak na skúmavky

Analyzovaná vzorka: kravské mlieko

Pracovný postup:

1. K 100 cm³ mlieka pridáme niekoľko kvapiek roztoku kyseliny octovej (pridávame do vytvorenia zrazeniny 1).
2. Vzniknutú zrazeninu 1 oddelíme filtráciou.
3. Filtrát zahrievame vo vodnom kúpeli až do vytvorenia zrazeniny 2.
4. Zrazeninu 2 opäť filtrujeme.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Vzorka	Proces zrážania	Vyzrážaný proteín
Mlieko	prídavok kyseliny octovej	
Filtrát	zahrievanie	

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

- 1. Navrhните inú kyselinu používanú v domácom prostredí na denaturáciu kazeínu?
- 2. Uveďte príklady činidiel spôsobujúcich denaturáciu proteínov?
- 3. Aký má pre človeka význam tepelná úprava potravín?
- 4. Na zrážaní mliečnych bielkovín je založená výroba tvarohu. Zistite, aké zrážacie činidlá sú v tomto procese používané?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

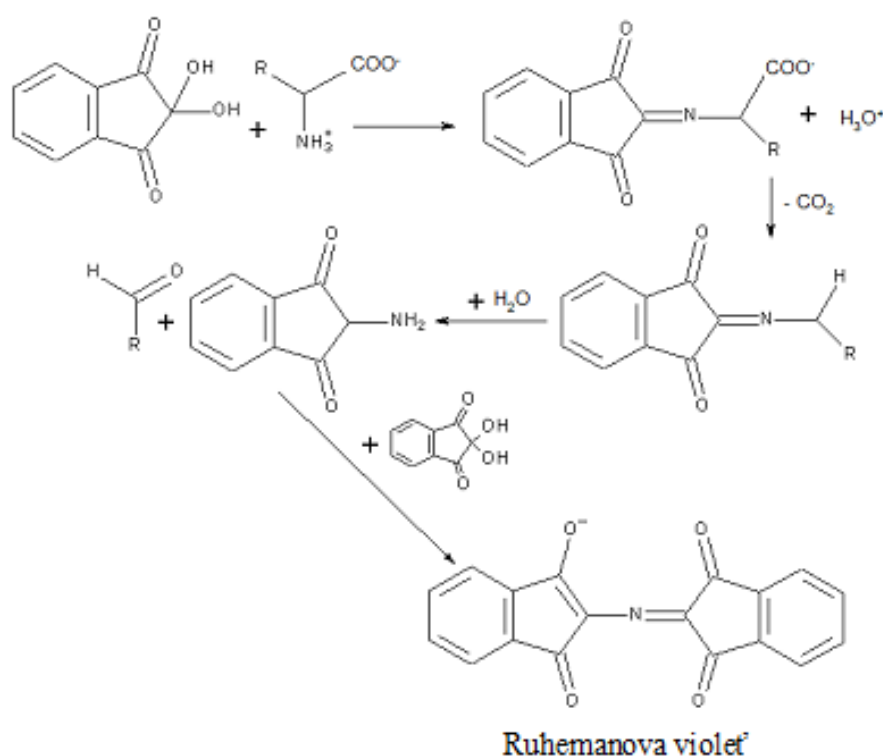
.....

.....

.....

3.2 Ninhydrínová reakcia - dôkaz aminoskupiny

Ninhydrínová reakcia slúži na dôkaz amino skupiny v aminokyselinách, peptidoch a v proteínoch. Je to oxidačno-redukčná reakcia založená na reakcii ninhydrínu (2,2-dihydroxy-1,3-indandion) s voľnými amino- a imino-skupinami sprevádzaná výraznou farebnou zmenou. Pri reakcii ninhydrínu a aminokyseliny vzniká Schiffova báza - ketimín, ktorá sa následne oxidačne dekarboxyluje za vzniku aldimínu. Aldimín hydrolyzuje na nestály amín, ktorý reaguje s ďalšou molekulou ninhydrínu a pozorujeme intenzívne sfarbenie pomenované ako Ruhemanova violet'. Reakciou ninhydrínu s iminokyselinami prolín a hydroxyprolín je pozorované žlté sfarbenie.



Chemikálie a pomôcky: 2% ninhydrín v acetóne, etanol, skúmavky, pipeta, stojan na skúmavky, držiak na skúmavky

Analyzovaná vzorka: 1 % alanín, 1 % histidín, 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka, destilovaná voda (slepá vzorka)

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme 1 cm³ analyzovanej vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 1 cm³ roztoku ninhydrínu a 2 cm³ etanolu.
3. Obsah skúmavky zahrejeme a pozorujeme farebné zmeny.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Vypočítajte množstvo aminokyselín alanínu a histidínu potrebné na prípravu 10 cm^3 1%-ných roztokov týchto aminokyselín.
2. Aký objem vody je potrebné pridať k vaječnému bielku, aby sme získali 20 cm^3 10x zriedeného roztoku vaječného bielka?
3. Aký objem vody je potrebné pridať k mlieku, aby sme získali 20 cm^3 5x zriedeného roztoku mlieka?
4. Napíšte štruktúru produktu reakcie ninhydrínu s prolínom.
5. Ktorý proteín je najviac zastúpený vo vajcovom bielku?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

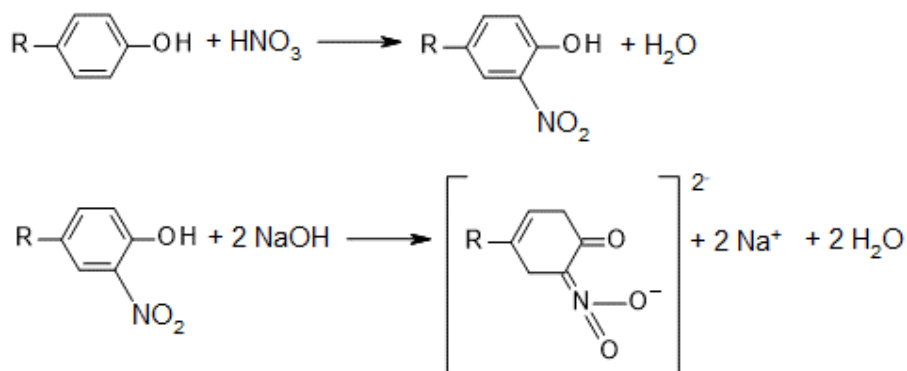
.....

3.3 Xantoproteínová reakcia – dôkaz aromatických aminokyselín

Xantoproteínová reakcia slúži na dôkaz peptidov a proteínov, ktoré obsahujú aromatické aminokyseliny, akými sú napríklad tryptofán, tyrozín, fenylalanín.



Zahrievaním s kyselinou dusičnou dochádza k nitrácii týchto aminokyselín za vzniku nitrozlučenín. Pridaním zásady vzniká amónna soľ, čo sa prejavuje zmenou sfarbenia.



Chemikálie a pomôcky: koncentrovaná HNO₃, 20% roztok NaOH, skúmavky, vodný kúpeľ, pipety

Analyzovaná vzorka: 1% alanín, 1% tyrozín, 1%, 5x riedený roztok nízkotučného mlieka, 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka, destilovaná voda (slepá vzorka)

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme 1 cm³ vzorky.
2. Ku každej vzorke pridáme 5-6 kvapiek koncentrovanej HNO₃.
3. Obsah skúmaviek zahrejeme a následne ochladíme.
4. Postupne prikvapkávame 20% roztok NaOH do zmeny sfarbenia.

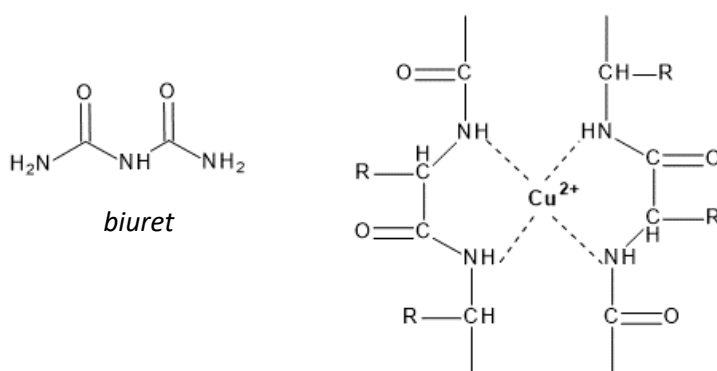
Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

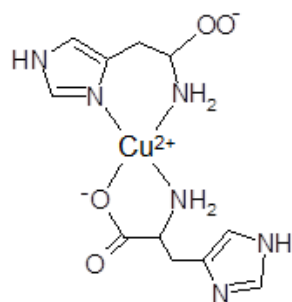
3.4 Biuretová reakcia – dôkaz peptidovej väzby

Biuretová reakcia je využívaná na dôkaz peptidov a proteínov. Reakcia je založená na vzniku komplexu medzi meďnatými iónmi a amidovými skupinami peptidových väzieb v alkalickom prostredí. Reakcia je pozitívna, ak sú v peptide prítomné aspoň 3 aminokyseliny (2 peptidové väzby) a je sprevádzaná vznikom intenzívne sfarbeného produktu. Zafarbenie komplexu závisí od veľkosti molekuly peptidu. Názov Biuretová reakcia pri peptidoch je používaný vzhľadom na podobnosť reakcie meďnatých iónov s karamoylmočovinou (biuretom, $(\text{NH}_2\text{-CO})_2\text{NH}$).

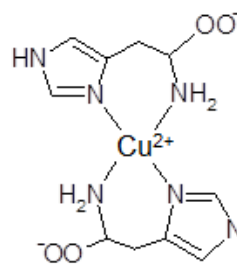


Reakcia nie je špecifická len pre peptidy. Pozitívnu reakciu pozorujeme aj pri zlúčeninách, ktoré vo svojej molekule obsahujú skupiny $-\text{CSNH}_2$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$ -, $-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, a tiež samostatné aminokyseliny histidín a asparagín.

V ľudskom organizme meď viazaná s histidínom predstavuje vymeniteľnú zásobu $\text{Cu}(\text{II})$ v rovnováhe so sérovým albumínom. Hoci už je vyriešená kryštalická štruktúra $\text{Cu}(\text{II})\text{-(L-His)}_2$ komplexu, koordinácia v tekutom roztoku pri fyziologickom pH nie je jednoznačne objasnená. Z výsledkov EPR spektroskopie pri nízkych teplotách boli navrhnuté 2 potenciálne štruktúry vykazujúce väzbovú podobnosť s inými zlúčeninami. Jedna predstavuje koordináciu $\text{Cu}(\text{II})$ podobnú glycínu a druhá koordináciu $\text{Cu}(\text{II})$ podobnú histamínu.



koordinácia podobná glycinu



koordinácia podobná histamínu

Chemikálie a pomôcky: 10% roztok CuSO_4 , 12 % roztok NaOH , skúmavky, pipety, stojan na skúmavky

Analyzovaná vzorka: 1% histidín, 1% alanín, 5x riedený roztok nízkotučného mlieka, 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka, destilovaná voda (slepá vzorka)

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme 1 cm^3 analyzovanej vzorky.
2. Ku každej zo skúmaviek pridáme 2 cm^3 roztoku NaOH a 2 kvapky roztoku CuSO_4 .
3. Skúmavky pretrepeme a pozorujeme.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Výpočty a kontrolné otázky:

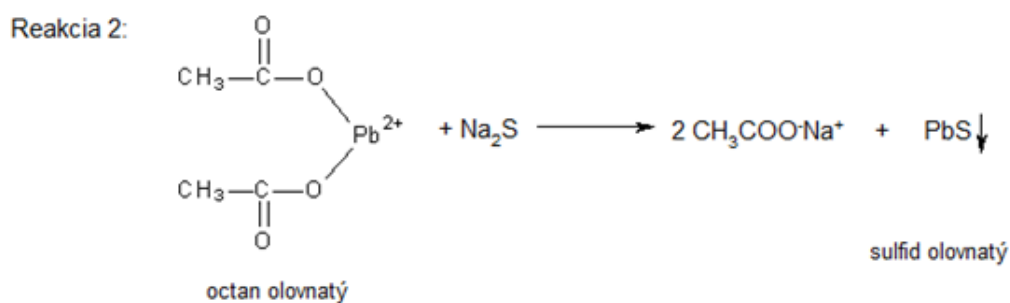
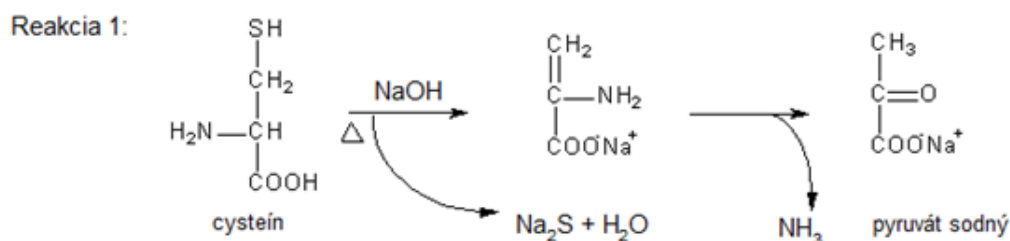
1. Vypočítajte množstvo NaOH potrebné na prípravu 20 cm³ 12% vodného roztoku NaOH.
2. Vypočítajte množstvo CuSO₄·5H₂O potrebné na prípravu 20 cm³ 10% vodného roztoku CuSO₄.
3. Prečo je dôležitá chelatácia meďnatých iónov v živých organizmoch?
4. Napíšte produkt reakcie meďnatých iónov s biuretom.

Poznámky:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

3.5 S-Pb reakcia – dôkaz cysteínu

Aminokyseliny obsahujúce síru (cysteín, cystín) a bielkoviny obsahujúce síru aminokyselinu uvoľňujú vplyvom tepla za prítomnosti hydroxidu sodného sírovodík, z ktorého vzniká sulfid sodný. Vzniknutý sulfid sodný je detegovaný pridaním octanu olovnatého za vzniku zrazeniny sulfidu olovnatého.



Chemikálie a pomôcky: 10 % roztok octanu olovnatého, 40 % roztok NaOH, skúmavky, pipety, vodný kúpeľ

Analyzovaná vzorka: 5x riedený roztok nízkotučného mlieka, 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka, destilovaná voda (slepá vzorka)

Pracovný postup:

1. Do skúmaviek napipetujeme 1 cm³ analyzovanej vzorky.
2. Do každej skúmavky pridáme 2 cm³ roztoku NaOH a 4 kvapky roztoku octanu olovnatého.
3. Skúmavky pretrepeme, necháme v horúcom vodnom kúpeli približne 10 minút.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Aký návažok je potrebný na prípravu 10 cm³ 5 % roztoku octanu olovnatého?
2. Poskytuje pozitívny Pb-S test aj aminokyselina metionín obsahujúca síru vo svojej štruktúre?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3.6 Zrážacie (precipitačné) reakcie bielkovín

Vplyvom rôznych chemických látok môže dôjsť k zrážaniu bielkovín. Dochádza k porušeniu hydratačného obalu bielkoviny a vytvoreniu zrazeniny. Ak sa po odstránení denaturačného činidla štruktúra bielkoviny obnoví, ide o reverzibilnú denaturáciu. Naopak, pri ireverzibilnej (nevratnej) denaturácii sa štruktúra bielkoviny neobnoví.



Chemikálie a pomôcky: etanol, éter, kryštalický NaCl, 0,5% roztok octanu olovnatého, 1% roztok síranu meďnatého, 20% roztok kyseliny sulfosalicylovej, konc. HCl, konc. HNO₃, stojan na skúmavky, skúmavky, pipeta

Analyzovaná vzorka: 5x riedený roztok nízkotučného mlieka, 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka

Pracovný postup:

Reakcia	Pracovný postup
Zrážanie bielkovín organickými rozpúšťadlami: etanol	K 2 cm ³ roztoku bielkoviny, pridáme niekoľko kryštálikov NaCl a 6 cm ³ organického rozpúšťadla.
Zrážanie bielkovín soľami ťažkých kovov: octan olovnatý, síran meďnatý	K 2 cm ³ roztoku bielkoviny, pridáme 2 cm ³ roztoku soli ťažkého kovu.
Zrážanie bielkovín organickými kyselinami: kyselina sulfosalicylová	K 2 cm ³ roztoku bielkoviny, pridáme niekoľko kvapiek kyseliny sulfosalicylovej.
Zrážanie bielkovín silnými minerálnymi kyselinami: HCl, HNO ₃	K 2 cm ³ roztoku bielkoviny, pridáme 1 cm ³ koncentrovanej kyseliny, tak aby sa kvapaliny nezmiešali.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Bielkovina	Zrážadlo		Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena po pridaní zrážadla
vaječný bielok	organické rozpúšťadlo	etanol		
		soľ ťažkého kovu	octan olovnatý	
	síran meďnatý			
	organická kyselina	kyselina sulfosalicylová		
	minerálna kyselina	HCl		
		HNO ₃		
mlieko	organické rozpúšťadlo	etanol		
		éter		
	soľ ťažkého kovu	octan olovnatý		
		síran meďnatý		
	organická kyselina	kyselina sulfosalicylová		
	minerálna kyselina	HCl		
HNO ₃				

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3.7 Dialýza – oddelenie nízkomolekulových látok od bielkovín

Dialýza je metóda založená na princípe difúzie nízkomolekulových látok cez polopriepustnú (semipermeabilnú) dialyzačnú membránu, ktorej mikropóry sú pre makromolekuly nepriepustné. Je to jednoduchá metóda, ktorou sú separované látky na základe rozdielnej veľkosti molekúl. V biochémií sú často bielkoviny vyzrážané síranom amónnym. Na odstránenie nízkomolekulových častíc (na prečistenie bielkovín) je využívaná dialýza. V jednoduchých experimentoch môžu túto funkciu plniť celofán, ale v súčasnosti sú komerčne dostupné umelé dialyzačné membrány s definovanou veľkosťou pórov.



Chemikálie a pomôcky: 10% roztok NaCl, 5 % roztok AgNO₃, 0,1% CuSO₄, nasýtený roztok glukózy, 10% NaOH, Fehlingov roztok I, Fehlingov roztok II, skúmavky, stojan na skúmavky, gumička, Petriho miska, celofán, pipety, kadičky, lievnik

Analyzovaná vzorka: 10x riedený a filtrovaný vodný roztok vajcového bielka

Pracovný postup:

1. Na obrátený sklený lievnik pripevníme celofán.
2. Pomocou gumičky ho zafixujeme pri stopke lievika.
3. Cez stopku napipetujeme 10 cm³ roztoku vajcového bielka, 10 cm³ roztoku NaCl a 10 cm³ nasýteného roztoku glukózy.
4. Lievnik upevníme pomocou držiaka na stojan a ponoríme do Petriho misky s destilovanou vodou tak, aby sa nedotýkal dna misky, ale aby bol zároveň ponorený vo vode.



Petriho miska naplnená destilovanou vodou a lievnik v celofáne s obsahom vajcového bielka, roztoku NaCl a glukózy. Celofán predstavuje dialyzačnú membránu.

- Po desiatich minútach z roztoku v Petriho miske odoberieme do 3 skúmaviek po 2 cm^3 .
- Do prvej skúmavky k vzorke pridáme rovnaký objem roztoku AgNO_3 .
- S druhou vzorkou vykonáme Biuretovu reakciu.
- Do tretej skúmavky pridáme Fehlingovo činidlo.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Skúmavka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
vzorka + AgNO_3		
vzorka + reagenty Biuretovej reakcie		
vzorka + Fehlingovo činidlo		

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Vypočítajte aké množstvo NaOH je potrebné na prípravu 10 cm³ 10% vodného roztoku NaOH.
2. Ako sa proces dialýzy uplatňuje v medicínskej praxi?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4 ENZÝMY

Enzýmy sú katalyzátory reakcií živých buniek (biokatalyzátory). Významne zvyšujú reakčnú rýchlosť znížením aktivačnej energie, ktorú potrebujú molekuly reagujúcich látok na priebeh reakcie (všeobecný princíp katalýzy). Enzýmy sú však vysoko špecifické, pretože veľmi selektívne vyberajú a viažu substrát, premenu ktorého katalyzujú (**substrátová špecifita**).

Z chemického hľadiska sú enzýmy bielkoviny (proteíny), s výnimkou katalytickej aktivity niektorých RNA molekúl (ribozýmy). Proteínová zložka enzýmu sa nazývanú **apoenzým**. So substrátom nereaguje enzým celým svojim povrchom, ale substrát sa viaže na špecifické miesto enzýmu nazývané **aktívne miesto**. Toto miesto je tvorené priestorovým usporiadaním funkčných skupín bočných reťazcov aminokyselín a zodpovedá za substrátovú špecifitu.

Väčšina enzýmov využíva pre svoje katalytické pôsobenie aj nebielkovinovú zložku – kofaktor. V úlohe kofaktora vystupujú buď katióny kovov, alebo organické molekuly – **koenzýmy / prostetické skupiny** (sú to buď **vitamíny alebo deriváty vitamínov**). Koenzým sa aktívne podieľa na katalytickej reakcii enzýmu (spolu s enzýmom zodpovedá za **špecifitu účinku**), teda akým typom reakcie je substrát premenený na produkt. Väčšinou slúžia ako nosiče elektrónov, atómov a funkčných skupín. Enzým viazaný s koenzýmom tvorí katalyticky aktívny komplex nazývaný **holoenzým**. Apoenzým (proteín bez koenzýmu) je katalyticky neaktívny.

Podľa typu chemickej reakcie je zostavená aj klasifikácia enzýmov do 7 tried: **(1) oxidoreduktázy, (2) transferázy, (3) hydrolázy, (4) lyázy, (5) izomerázy, (6) ligázy a (7) translokázy**. Pre mnohé enzýmy sú používané aj triviálne názvy.

Aktivita enzýmov podlieha prísnej regulácii, ktorá zabezpečuje, že rýchlosť metabolických reakcií zodpovedá požiadavkám bunky.

Katalytická aktivita enzýmu je vyjadrovaná v jednotkách **kataloch**. 1 katal (kat) zodpovedá množstvu enzýmu, ktoré premení 1 mol substrátu za 1 sekundu pri definovaných experimentálnych podmienkach. Aktivita enzýmov je ovplyvnená viacerými faktormi, ako je koncentrácia substrátu, teplota, pH, iónová sila, oxidačno-redukčný potenciál, prítomnosť aktivátorov a inhibítorov.

4.1 Enzýmová aktivita slinnej amylázy

Slinná amyláza, známa aj ako ptyalín, je prvým enzýmom, ktorý sa dostáva do kontaktu s prijatou potravou. Jej úlohou je štiepiť škrob z potravy na menšie fragmenty. Trávenie sacharidov pokračuje v ďalších častiach tráviacej sústavy.



Chemikálie a pomôcky: 1% roztok zemiakového škrobu, Lugolov roztok, skúmavky, stojan na skúmavky, vodný kúpeľ, teplomer, pipety

Analyzované vzorky: ľudské sliny

Pracovný postup:

1. Do skúmavky nalejeme približne 3 cm³ roztoku škrobu.
2. Pridáme 2 cm³ ľudských slín a pridáme kvapku Lugolovho roztoku.
3. Skúmavku vložíme do vodného kúpeľa a temperujeme pri teplote 37 °C.
4. Pozorujeme zmenu sfarbenia približne po 7 a 15 minútach inkubácie.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Vzorka	0. minúta	7. minúta	15. minúta

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4.2 Enzymatický rozklad potravy pankreatickými enzýmami

Trávenie prijatej potravy začína v ústnej dutine a pokračuje v ďalších častiach tráviacej sústavy. Väčšina tráviacich enzýmov je vylučovaná do duodena z podžalúdkovej žľazy pankreasu. V niektorých prípadoch tráviacich problémov je možné použiť liečivo Pancreolan, ktoré obsahuje pankreatické enzýmy. Prítomnosť týchto enzýmov je možné dokázať jednoduchými kvalitatívnymi experimentami.



Chemikálie a pomôcky: 1mol.dm⁻³ NaOH, Pancreolan, Lugolov roztok, fenolftaleín, trecia miska, skúmavky, kadičky, pipeta, filtračná aparátúra

Analyzované vzorky: pečivo, kravské mlieko

Pracovný postup:

A Trávenie potravy s obsahom sacharidov

1. Z tablety Pancreolanu odstránime vrchný obal a rozdrvíme ju na jemný prášok.
2. Malý kúsok pečiva nalámeme do kadičky a pridáme 10 cm³ destilovanej vody.
3. Obsah kadičky premiešame a necháme stáť približne 3 minúty, prefiltrujeme.
4. Filtrát rovnomerne rozdelíme do dvoch skúmaviek.
5. Do oboch skúmaviek pridáme kvapku Lugolovho roztoku.
6. Iba do jednej skúmavky pridáme rozdrvený liek.
7. Skúmavky necháme stáť 15 minút pri laboratórnej teplote.

B Trávenie potravy s obsahom lipidov

1. Do dvoch skúmaviek napipetujeme 0,5 cm³ mlieka a 2,5 cm³ destilovanej vody.
2. Pridáme 2 kvapky 1mol.dm⁻³ NaOH a 1 kvapku fenolftaleínu.
3. Do jednej vybranej skúmavky pridáme rozdrvený liek.
4. Premiešame a necháme stáť 5 minút pri izbovej teplote.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

A Trávenie potravy s obsahom sacharidov

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

B Trávenie potravy s obsahom lipidov a bielkovín

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

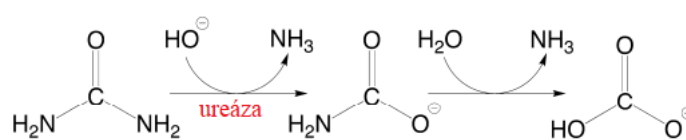
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

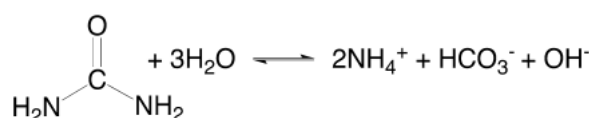
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

4.3 Reakcia na dôkaz ureázy

Ureáza (močovinová amidohydroláza E.C. 3.5.1.5) je metaloproteín obsahujúci nikelnaté ióny. Nachádza sa vo veľkom množstve organizmov, najmä v rastlinách, riasach, hubách a niekoľkých prokaryotoch. Je schopný katalyzovať rýchly hydrolytický rozklad močoviny za vzniku amoniaku a karbamátu, ktorý sa nakoniec spontánne rozloží na druhú molekulu amoniaku a hydrogenuhličitanu. Amoniak sa pri kontakte s vodou mení na amónne kationy a spôsobuje tak zvýšenie pH prostredia (2. reakcia), ktoré má negatívne účinky na ľudské zdravie a na poľnohospodárstvo. Alkalizačný efekt využívajú mnohé ľudské patogénne mikroorganizmy, ktoré využívajú ureázu ako faktor virulencie na infikovanie a kolonizáciu hostiteľa. Napríklad, u *H. pylori* ureáza predstavuje až 10 % z celkového obsahu bielkovín a je nevyhnutná pre prežitie tohto ľudského patogénu v kyslom prostredí žalúdka udržiavaním jeho cytoplazmatického pH blízke neutrálnemu.



Postupné reakcie rozkladu močoviny ureázou



Celková reakcia hydrolyzy močoviny vplyvom ureáza

V rastlinách sóje vzniká močovina degradáciou arginínu a jej rozklad ureázou má význam pre remobilizáciu dusíka. Prítomnosť tohto enzýmu v sóji je možné stanoviť jednoduchým kvalitatívnym experimentom.

Chemikálie a pomôcky: 2% roztok močoviny, fenolftaleín, kadičky, skúmavky, odmerný valec

Analyzované vzorky: sójové mlieko

Pracovný postup:

1. Do jednotlivých skúmaviek napipetujeme 2 cm³ analyzovanej vzorky.
2. Do skúmavky pridáme 5 cm³ 2% roztoku močoviny.

3. Skúmavku uzatvoríme zátkou a premiešame.
4. Necháme stáť 2-3 minúty a pridáme 2 kvapky kvapiek fenolftaleínu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. V experimente bol použitý na dôkazovú reakciu ureázy indikátor fenolftaleín. Môže byť použitý indikátor metylová žltá? Zdôvodnite.
2. Aminokyselina L-arginín je využívaná na syntézu anorganickej molekuly, ktorá v ľudskom organizme pôsobí ako neuromodulátor. Uveďte jej vzorec a názov.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

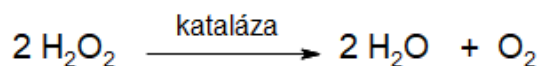
.....

.....

.....

4.4 Kataláza v zelenine

Kataláza patrí medzi enzýmy oxidoreduktázy a katalyzuje rozklad peroxidu vodíka na kyslík a vodu.



Rozklad peroxidu vodíka vplyvom katalázy

Peroxid vodíka je v rastlinách generovaný z rôznych zdrojov, napríklad počas transportu elektrónov v mitochondriách, ale najmä počas fotorespiračnej oxidácie. Peroxid vodíka sa ako signálna molekula podieľa na vývoji rastlín. Keďže patrí medzi reaktívne formy kyslíka, jeho koncentrácia v živých bunkách je kontrolovaná enzýmom kataláza.

Prítomnosť katalázy môžeme potvrdiť jednoduchým kvalitatívnym testom. Ak sa rastlinná potravina obsahujúca tento enzým, napríklad zemiaková hľuza, alebo iné druhy zeleniny dostanú do kontaktu s peroxidom vodíka, dôjde k rýchlej reakcii sprevádzanej penením.

Chemikálie a pomôcky: 3% roztok H_2O_2

Analyzované vzorky: zemiaková hľuza, vzorky zeleniny

Pracovný postup:

1. Zo zemiakovej hľuzy a vzoriek zeleniny odkrojíme približne rovnaké množstvá a položíme ich na Petriho misky.
2. Na reznú plochu kvapneme niekoľko kvapiek peroxidu vodíka.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....
.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Akú funkciu plní kataláza v živých bunkách?
2. V experimente používame 3% peroxid vodíka. V laboratóriu sa často stretávame s koncentrovanejším 35% roztokom. Vypočítajte, ako zriedime 35% roztok peroxidu vodíka, aby sme získali 3% roztok v objeme 50 cm³.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5 VITAMÍNY

Vitamíny sú nízkomolekulové esenciálne organické molekuly exogénneho pôvodu, ktoré človek musí prijímať rastlinnou a živočíšnou potravou (určité množstvo niacínu syntetizuje človek z aminokyseliny tryptofán, niektoré vitamíny sú tvorené črevnou mikroflórou). Látkový metabolizmus ovplyvňujú už pri malých koncentráciách. V kooperácii s bielkovinovými molekulami enzýmov zodpovedajú za správny priebeh množstva enzymatických reakcií v živých organizmoch.

Vitamíny sú klasifikované podľa rozpustnosti. **Lipofilné vitamíny** sú rozpustné v lipidoch (vitamín A, D, E, K), alebo **hydrofilné vitamíny** sú rozpustné vo vode (vitamín B₁, vitamín B₂, kyselina nikotínová a nikotínamid, kyselina pantoténová, vitamín B₆, biotín, kyselina listová a jej deriváty, vitamín B₁₂, vitamín C).

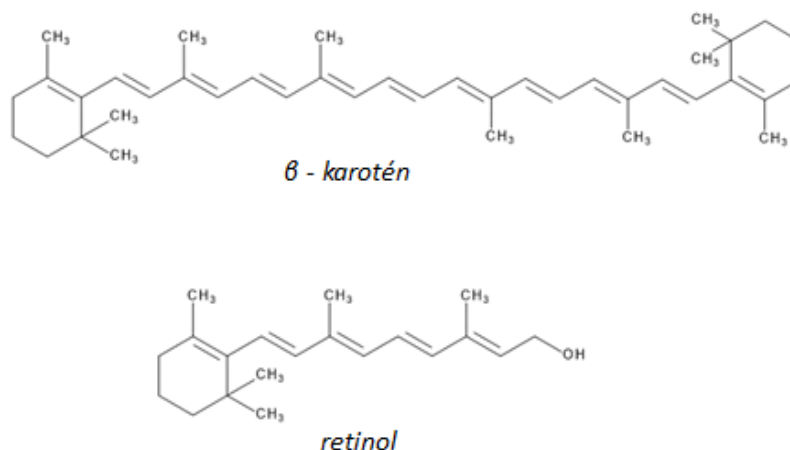
Nedostatok, resp. nadbytok vitamínov v tele je sprevádzaný rôznymi chorobnými stavmi. Počiatočný nedostatok niektorého z vitamínov vyvoláva **hypovitaminózu**. Úplný nedostatok vitamínu spôsobuje **avitaminózu**. Naopak, ochorenia spôsobené nadbytkom vitamínu, zapríčiňuje vznik **hypervitaminózy**. Ide hlavne o lipofilné vitamíny so schopnosťou hromadiť sa v tukovom tkanive a pečeni. Hydrofilné vitamíny sú odstránené močom.

5.1 Vitamín A – dôkazová reakcia

Provitamín A (β -karotén) je prítomný v ovocí a zelenine. V tráviacom trakte človeka dochádza k premene tohto prekursora na vitamín A (retinol).



Provitamín A patrí medzi karotény, ktoré v prítomnosti kyseliny sírovej menia svoje sfarbenie. Jednoduchým kvalitatívnym testom je možné určiť prítomnosť uvedeného vitamínu.



Chemikálie a pomôcky: konc. H_2SO_4 , benzén, skúmavky, stojan na skúmavky, pipety

Analyzované vzorky: mrkva, paradajky

Pracovný postup:

1. Do jednej zo skúmaviek dáme postrúhanú mrkvu a do druhej podrvenú paradajku.
2. Do oboch skúmaviek pridáme 5 cm^3 benzénu.
3. Skúmavky zazátkujeme a dôkladne pretrepeme.
4. Obsah skúmavky necháme ustáliť pár minút a výluh zlejeme do nových skúmaviek.
5. K výluhu pridáme 5 cm^3 kyseliny sírovej a pozorujeme zmenu sfarbenia na styčnej ploche oboch kvapalín.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. Aké sú najvýznamnejšie zdroje vitamínu A v potrave?
2. Koľko rôznych izomérov tvorí karotén? Ktorý z nich je najvýznamnejší z hľadiska výživy?
3. Aký je rozdiel medzi karoténmi a karotenoidmi?
4. Ktoré väzby zodpovedajú za farebnosť karotenoidov?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

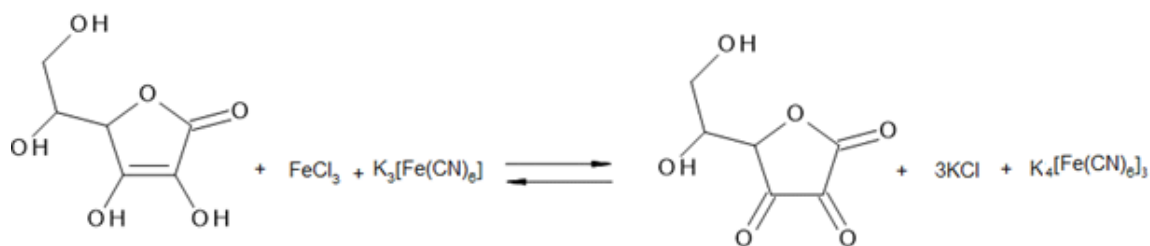
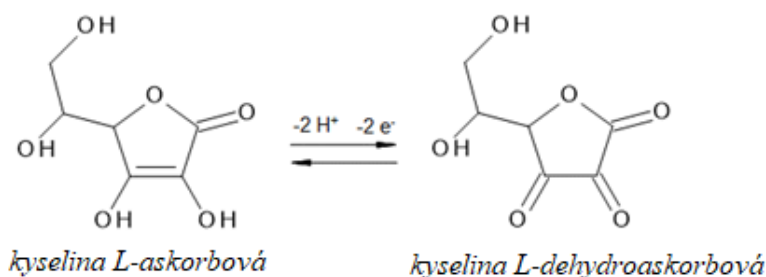
5.2 Vitamín C

5.2.1 Vitamín C – dôkazová reakcia

Dôkazová reakcia na prítomnosť vitamínu C (kyseliny L-askorbovej) je založená na jeho redukčných vlastnostiach. Kyselina L-askorbová redukuje hexakynoželezitan draselný na hexakynoželeznatan draselný, ktorý ďalej reaguje so železitým kationom a vytvára charakteristické sfarbenie hexakynoželeznatoželezitanu draselného, Berlínskej modrej. Z kyseliny L-askorbovej vzniká kyselina L-dehydroaskorbová.



Na rovnakom princípe (redukčné vlastnosti vitamínu C) je založený aj dôkaz prítomnosti vitamínu C v ovocí a zelenine jednoduchým testom s manganistanom draselným. Manganistan draselný je vystavený redukčnému účinku vitamínu C a vzniká oxid manganičitý. Dochádza k výraznej zmene sfarbenia.



Chemikálie a pomôcky: 1 % roztok hexakynoželezitanu draselného, 1 % roztok chloridu železitého, 1 % roztok manganistanu draselného

Analyzované vzorky: 1% roztok kyseliny L-askorbovej, roztok vitamínu C (celaskon – 2 tablety necháme rozpustiť v 100 cm³ vody), citrónka, šťava z citróna, vzorky ovocia (najlepšie citrusového), destilovaná voda (slepá vzorka), rôzne vzorky ovocia a zeleniny

Pracovný postup:**A. Dôkaz vitamínu C v tekutých vzorkách**

1. Zmiešame 2 cm³ roztoku hexakynoželezitanu draselného a 2 cm³ chloridu železitého.
2. Do skúmaviek napipetujeme po 2 cm³ analyzovanej vzorky.
3. Ku každej vzorke pridáme 2 kvapky zmiešaných roztokov hexakynoželezitanu draselného a chloridu železitého.

B. Dôkaz vitamínu C v ovocí a zelenine

1. Z ovocia alebo zeleniny odrežeme malý kúsok a preložíme na Petriho misku.
2. Na každú vzorku pridáme 3 kvapky 1 % roztok manganistanu draselného.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

A. Dôkaz vitamínu C v tekutých vzorkách

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

B. Dôkaz vitamínu C v ovocí a zelenine

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. Vyberte rozpúšťadlo / rozpúšťadlá, v ktorých sa vitamín C nerozpúšťa: voda, etanol, chloroform.
2. Ako sa nazýva produkt oxidácie kyseliny askorbovej?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5.2.2 Vitamín C – vplyv teploty na redukčné vlastnosti

Vitamín C je pri vyšších teplotách nestabilný a ľahko oxidovateľný. Varením dochádza k stratám vitamínu C v závislosti od druhu zeleniny a procesu spracovania (varenie, blanžirovanie, parenie, mikrovlnný ohrev). Stanovenie obsahu vitamínov po tepelnej úprave má význam z hľadiska odhadu príjmu živín.



Vplyv teploty na vitamín C sa prejaví stratou jeho redukčných vlastností, preto uvedený efekt môžeme pozorovať jednoduchým kvalitatívnym testom s Fehlingovým činidlom, v ktorom redukciou meďnatých iónov dochádza ku vzniku oxidu meďného, ak je prítomné redukčné činidlo, kyselina L-askorbová.

Chemikálie a pomôcky: Fehlingovo činidlo, skúmavky, stojan, držiak na skúmavky, kadička, kahan

Analyzované vzorky: 1 % roztok kyseliny L-askorbovej (pozitívna kontrola), citrónová šťava čerstvá, citrónová šťava prevarená, destilovaná voda (negatívna kontrola)

Pracovný postup:

1. Z citróna vytlačíme šťavu, ktorú následne prefiltrujeme.
2. Polovicu zo získaného objemu odložíme, druhú polovicu v kadičke povaríme približne 10 minút a necháme vychladnúť.
3. Do skúmaviek napipetujeme z každej vzorky 3 cm³ a pridáme kvapku Fehlingovho činidla.
4. Obsah skúmaviek premiešame a pozorujeme zmenu sfarbenia.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Kontrolné otázky:

1. Ktoré ďalšie faktory, okrem teploty, môžu znižovať hladinu vitamínu C?
2. Ktorý enzým chýba človeku a primátom na syntézu vitamínu C?
3. Vitamín C je známy svojimi antioxidačnými účinkami v živých organizmoch. Ktorá forma vitamínu C vstupuje do reakcie s radikálmi?

Poznámky:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

5.2.3 Vitamín C je kyselina - stanovenie pH

Na rýchle a orientačné určenie hodnoty pH vzorky (roztoky chemicky čistých látok, biologické vzorky ako sliny, moč) je možné použiť jednoduchý test s univerzálnym indikačným lakmusovým pH papierikom, ktorý meria pH v rozsahu od 1-12. Papierik sa po namočení do tekutiny rýchlo zafarbí a hodnota pH je odčítaná porovnaním sfarbenia papierika s farebnou škálou na obale. Presnú hodnotu pH roztoku je možné zistiť meraním pH na kalibrovaných digitálnych pH metroch.



Chemikálie a pomôcky: Petriho miska, skúmavka, kadička, indikátorový pH papierik, digitálny pH meter Consort 1010

Analyzované vzorky: 1 % roztok kyseliny L-askorbovej

Pracovný postup:

A. Stanovenie pH roztoku kyseliny askorbovej pH papierikom

1. Pripravený roztok kyseliny L-askorbovej nalejeme do skúmavky.
2. Do roztoku ponoríme pH papierik.
3. Približne po 5-10 s papierik vyberieme, otrasieme od zvyšnej tekutiny. Farbu porovnáme s farbou na stupnici a odčítame hodnotu pH a porovnáme s hodnotou nameranou digitálnym pH metrom.

B. Stanovenie pH roztoku kyseliny askorbovej digitálnym pH metrom

1. Pripravený roztok kyseliny L-askorbovej nalejeme do kadičky.
2. Digitálny pH meter je potrebné pred každým meraním kalibrovať pomocou kalibračných tlmivých roztokov s konštantnou hodnotou pH uvedenou na obale nádoby.
3. Zapnite prístroj tlačidlom ON/OFF.
4. Spustite kalibráciu pomocou tlačidla CAL.
5. Zvoľte požadovaný režim (pH) stlačením MODE. Na displeji sa okamžite zobrazí nameraná hodnota podľa predchádzajúcej kalibrácie. Ak chcete prekalibrovať, stlačte CAL.
6. Prístroj umožňuje výber medzi vyrovnávacími pamäťami v pamäti (1.68, 2.00, 4.00, 4.01, 6.87, 7.00, 9.18, 9.21, 10.01, 12.00, 12.45). Vyberte správne hodnoty a stlačte CAL. Nepoužívané vyrovnávacie pamäte by mali byť vypnuté.

7. Elektrody opláchnite destilovanou vodou a ponorte ich do prvého tlmivého roztoku. Zvoľte [CALIBRATE], stlačte CAL a postupujte podľa pokynov na obrazovke, kým sa kalibrácia nedokončí.
8. Zariadenie je pripravené na meranie.
9. Opláchnite elektródu destilovanou vodou a ponorte do skúmavky s roztokom kyseliny askorbovej. Odčítajte hodnotu pH na displeji.
10. Elektrody po použití vždy opláchnite destilovanou vodou a uskladnite ich v 4 M roztoku KCl.
11. Porovnajete hodnoty pH.

Pozorovanie (doplňte podľa vlastného experimentu a pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. Kyselina askorbová pri fyziologickom pH disociuje za vzniku askorbylového aniónu. Napíšte jeho vzorec.
2. Naštudujte si tri iné indikátory na stanovenie pH a zdefinujte ich farebné prechody.
3. V jednoduchom školskom experimente by sme mohli použiť na stanovenie pH ako indikátory rastlinné výluhy. Navrhnite dva rastlinné výluhy a popíšte ich farebné prechody pri zmene pH.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

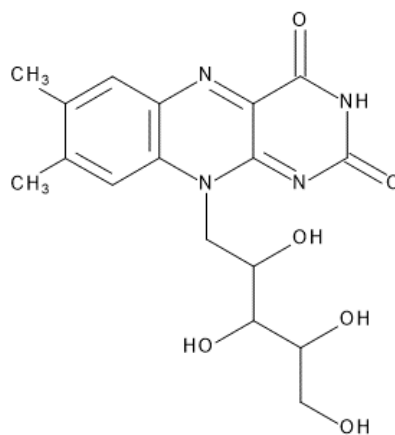
.....

.....

.....

5.3 Vitamín B2 – dôkazová reakcia

Vitamín B2 (riboflavín) je citlivý na svetlo. Vplyvom UV svetla sa rozkladá, preto by potraviny s obsahom vitamínu B mali byť skladované mimo priameho slnečného žiarenia. Vitamín B2 po vystavení ultrafialovému žiareniu fluoreskuje a preto je možné jednoduchým testom s využitím UV lampy zistiť prítomnosť vitamínu D.



Riboflavín

Chemikálie a pomôcky: filtračná aparátúra, skúmavky, UV lampa

Analyzované vzorky: vanilkový puding v prášku, riboflavín

Pracovný postup:

1. 1 lyžičku vanilkového pudingového prášku rozpustíme v 100 cm³ destilovanej vody, premiešame a prefiltrujeme.
2. V 50 cm³ destilovanej vody rozpustíme 1 tabletu riboflavínu.
3. Do skúmaviek odoberieme 5 cm³ z každej vzorky
4. V tme filtrát vystavíme UV žiareniu.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. Ktoré koenzýmy obsahujú vo svojej molekule riboflavín?
2. Zdôvodnite, prečo vykazuje riboflavín fluorescenciu?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

6 NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny sú biopolyméry, ktorých základný monomér je nukleotid (nukleozid monofosfát). Každý nukleotid obsahuje sacharidovú zložku, kyseliny fosforečnú a heterocyklickú dusíkatú bázu purín a pyrimidín. Na základe sacharidovej zložky sú rozlišované dva typy nukleových kyselín. **Deoxyribonukleová kyselina** (DNA), ktorá obsahuje sacharid 2-deoxyribózu a **ribonukleová kyselina** (RNA) obsahujúca ribózu. DNA obsahuje štyri bázy (adenín, guanín, cytozín a tymín), molekula RNA má miesto tymínu uracyl. Dusíkatá báza je viazaná na sacharid **N-glykozidovou** väzbou a nukleotidy sú vzájomne viazané **fosfodiesterovou** väzbou.

Poradie nukleotidov reprezentuje primárnu štruktúru DNA a RNA. Molekula DNA vytvára sekundárnu štruktúru z dvoch antiparalelných reťazcov. Štruktúra je stabilizovaná interakciami medzi π elektrónmi dusíkatých báz (stacking) a k stabilite prispievajú aj vodíkové väzby. Dvojzávitnica DNA je obtáčaná okolo histónových bielkovín vďaka elektrostatickým interakciám medzi záporne nabitými fosfátovými skupinami v DNA a kladne nabitými skupinami bočných reťazcov aminokyselín v molekulách histónov.

V živočíšnych eukaryotických bunkách je DNA lokalizovaná v jadre a v mitochondriách, rastlinné bunky majú DNA aj v chloroplastoch. Prokaryotické bunky obsahujú kruhovú chromozomálnu DNA v cytoplazme (nie je ohraničená membránou) a kruhovú dvojvláknovú plazmidovú DNA, ktorá prokaryotom dáva špecifické vlastnosti.

Molekula RNA je jednovláknová a vytvára rôzne štruktúry. Existuje viacero typov RNA so špecifickými biologickými funkciami, ako mediátorová (mRNA), transferová (tRNA) a ribozómová (rRNA), malá jadrová (snRNA) a vírusová RNA.

V súčasnosti je vyvinutých viacero postupov na izoláciu nukleových kyselín z rôznych zdrojov. V každej metóde je potrebné **narušiť bunkový obal** (bunkové steny a membrány). Tento krok sa nazýva **lýza buniek** a proces sa líši podľa typu bunky. Po lýze je obsah buniek uvoľnený do tlmivého roztoku a vznikne zmes obsahujúca všetky súčasti bunky. Aby sa zachovala kvalita DNA, je potrebné **prečistenie** (purifikácia) nukleovej kyseliny.

Lýza buniek je dosiahnutá veľmi často pridaním detergentu SDS (dodecylsírán sodný alebo TritonX-100). Pri rastlinných a živočíšnych bunkách sa vzorka v prvom kroku homogenizuje alebo sa bunková hmota rozruší zmrazením v tekutom dusíku. Pri lýze buniek,

ako aj celom izolačom postupe, treba dodržiavať postup a odporúčania, aby nedošlo ku degradácii nukleovej kyseliny.

Zložkou tlmivého roztoku je chelatačná zlúčenina EDTA (kyselina etyléndiaminotetraoctová), ktorá viaže vápenaté a horečnaté ióny potrebné pre aktivitu nukleáz. Sú to enzýmy degradujúce nukleovú kyselinu, ktoré by počas izolačného postupu mohli štiepiť nukleové kyseliny a ich aktivita sa tým oslabí. Niekedy sa v izolačnom postupe odstraňujú nukleázy spoločne s ďalšími proteínmi (enzýmami, histónovými proteínmi) prídavkom enzýmu proteináza K (proteáza).

Ak chceme izolovať DNA, je potrebné odstrániť prímies RNA. Na odstránenie RNA je do vzorky pridávaná pankreatická RNáza.

Na odstránenie proteínov sa používa veľmi často fenol-chloroformová extrakcia. Po pridaní zmesi fenol:chloroform k bunkovému extraktu sa do chloroformu dostanú tuky, proteíny a časť polysacharidov sa vyzráža a nukleové kyseliny zostane vo vodnej fáze. Po odstredení vzniknú dve fázy a na ich rozhraní sa vytvorí prstenec zrazeniny. Následne je potrebné opatrne odobrať vodnú fázu, v ktorej je rozpustená DNA. Po pridaní absolútneho etanolu sa DNA vyzráža. Vyzrážaná DNA sa nazýva precipitát a oddelí sa odstredením pri vysokých otáčkach. Zrazenina DNA je následne premývaná 70% etanolom (odstránia sa zvyšky solí v zrazenine) a po vysušení je DNA rozpustená vo vode alebo v tlmivom roztoku, s ktorým chceme ďalej pracovať.

Roztoky nukleových kyselín je potrebné uchovávať pri teplote 4 °C, na dlhodobjšie skladovanie pri teplote 20 °C.

V súčasnosti sú na izoláciu nukleových kyselín využívané komerčne dostupné kity, ktoré prácu veľmi uľahčujú. V každom prípade proces izolácie nukleových kyselín vyžaduje laboratórne vybavenie, ktoré nie je súčasťou školských laboratórií. Sú však vypracované jednoduché postupy izolácie nukleových kyselín realizovateľné v podmienkach domáceho prostredia.

6.1 Izolácia DNA z ovocia

Pre úspešnú izoláciu DNA z rastlinných buniek je potrebné dostatočné rozrušenie bunkovej steny, ktorá je pevná, tvorí ochranný obal rastlinnej bunky. Narušenie bunkovej steny môžeme docieľiť homogenizáciou rastlinného materiálu, alebo jeho zamrazením. Na lýzu buniek môžeme použiť ako detergent domáci saponát. Na odstránenie histónových proteínov, ktoré viažu DNA do chromozómov, je potrebný enzým proteáza. Náhradou komerčne zakúpeného enzýmu môže byť napríklad čerstvá ananásová šťava obsahujúca bromelaín.



Chemikálie a pomôcky: saponát na umývanie riadu, NaCl, ananásový džús, denaturovaný alkohol, voda

Analyzované vzorky: ľubovoľný biologický materiál (ideálne ovocie)

Pracovný postup:

1. V trecej miske rozdrvíme biologický materiál spolu s 5 cm³ saponátu.
2. Do kadičky prenesieme rozdrvené jahody a pridáme približne 100 cm³ ananásovej šťavy.
3. Necháme stáť pri izbovej teplote aspoň 30 minút.
4. Získanú hmotu následne precedíme cez jemné sitko, resp. gázu.
5. Získanú ovocnú šťavu opatrne prevrstvite 50 cm³ ľadovo vychladeného vysoko percentného alkoholu.
6. Po pár minútach namotáme biele chumáče izolovanej hmoty – DNA na drevenú špajdľu.

Pozorovanie (doplňte podľa vlastného experimentu a pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Kontrolné otázky:

1. Bromelaín je definovaný ako zmes cysteínových proteáz (tiol-endorpeptidáz) nachádzajúcich sa v tkanive rastlinnej čeľade *Bromeliaceae* získanej z ananásu. Popíšte aktivitu endopeptidáz.
2. Naštudujte si zdraviu prospešné účinky pripisované bromelaínu.
3. Na odstránenie RNA so zmesi s DNA sa používa enzým RNáza. Navrhnite enzým vhodný na odstránenie DNA zo zmesi s RNA.

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

6.2 Izolácia RNA z droždia

Molekulu RNA možno izolovať z pekárenských kvasníc pomocou hydroxidu sodného a etanolu. Obsah RNA v týchto eukaryotických bunkách je približne 4%.



Chemikálie a pomôcky: 5% a 50% roztok kyseliny octovej, 0,5% roztok NaOH, dietyléter, vychladený etanol, trečia miska, kadičky, odmerné banky, indikátorové papieriky, váhy, centrifugačné skúmavky, centrifúga

Analyzované vzorky: pekárenské droždie

Pracovný postup:

1. V trecej miske s použitím morského piesku rozotrieme 20 g kvasníc, 2 cm³ destilovanej vody a 2 cm³ dietyléteru.
2. Do homogenátu postupne pridávame 25 cm³ 0,5% roztoku NaOH a ďalej rozotierame ďalších 15 minút.
3. Pomocou 5% kyseliny octovej upravíme pH na hodnotu 6 (pH kontrolujeme pomocou indikátorových papierikov).
4. Zmes centrifugujeme 10 minút pri rýchlosti 3000 otáčok/min.
5. Supernatant zlejeme do kadičky.
6. Pomocou 50% kyseliny octovej upravíme pH na hodnotu 3,5 (pH kontrolujeme pomocou indikátorových papierikov).
7. Postupne pridávame vychladený etanol (rovnaký objem ako je objem supernatantu), necháme stáť 5 minút.
8. Zmes centrifugujeme 10 – 20 minút pri rýchlosti 3000 otáčok/min.
9. Supernatant zlejeme a získame zrazeninu RNA.

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Vypočítajte návažok NaOH potrebný na prípravu 25 cm³ 0,5% roztoku NaOH.
2. Prečo je droždie vhodné na izoláciu RNA?

Poznámky:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

6.3 Dôkaz zložiek DNA a RNA

Pentózy a 2-deoxy-pentózy, podobne ako väčšina ostatných monosacharidov, poskytujú zahrievaním v kyslom prostredí deriváty furalu a niektoré ďalšie chromogénne látky. Tieto látky sa pri reakcii s aromatickými amínmi charakteristicky farbja.



Chemikálie a pomôcky: 0,4% roztok NaOH, difenylamín (1g v 100 cm³ ľadovej kyseliny octovej a 2,75 cm³ koncentrovanej kyseliny sírovej)

Analyzované vzorky: vzorka DNA, vzorka RNA

Pracovný postup:

1. Do jednej skúmavky vložíme malé množstvo vyzrážanej DNA, do druhej RNA.
2. Pridáme po 1 cm³ 0,4% roztoku NaOH.
3. Pridáme po 1 cm³ difenylamínu.
4. Skúmavky zahrievame 10 - 20 min vo vriacom vodnom kúpeli.

Pozorovanie (doplňte podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....


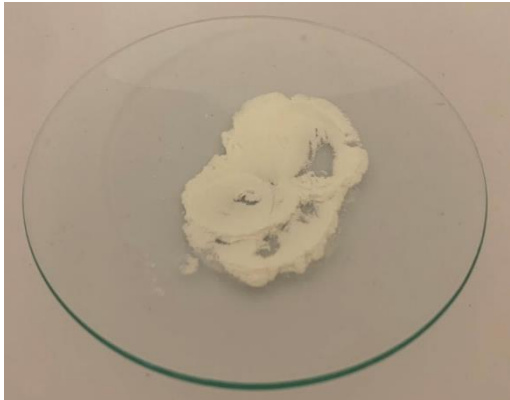
.....

.....

II RIEŠENIA

R1 SACHARIDY

R1.1 Príprava vzorky z rastlinného materiálu

R1.1.1 Extrakcia sacharidov z ovocia	R1.1.2 Extrakcia škrobu zo zemiakov
	
<p>Ukážka extraktu z mandarínky po zriedení s destilovanou vodou v pomere 1:1. V extrakte sú prítomné sacharidy rozpustné vo vode. Ak je extrakt pripravený z ovocia, môžeme predpokladať prítomnosť väčšieho množstva ovocného cukru - fruktózy.</p>	<p>Biely prášok zemiakového škrobu bez vône a chuti získaný extrakciou zo zemiakovej hľuzy po premytí a vysušení. Na extrakciu škrobu sú vhodné zásobné orgány rastlín (hľuzy zemiakov, semená ryže, kukurice, obilia), kde je škrob prítomný vo forme škrobových zŕn.</p>

Kontrolné otázky:

1. Rastlinné bunky sú z chemického hľadiska tvorené predovšetkým sacharidmi, kým živočíšne bunky majú vyšší obsah proteínov. Sacharidy rastlín sa líšia štruktúrou, funkciou, rozpustnosťou a zastúpením.
2. Nízkomolekulové sacharidy prítomné v ovocí a zelenine sú najmä fruktóza, glukóza a sacharóza. Sú zodpovedné za sladkú chuť. Mnohé druhy ovocia sú bohaté na fruktózu, preto je fruktóza označovaná ako *ovocný cukor*, hoci je fruktóza prítomná aj v iných častiach rastlín a v zelenine. Monosacharidy a oligosacharidy sú rozpustné vo vode a (na rozdiel od polysacharidov) aj v alkoholových roztokoch.

3. Na izoláciu je najvhodnejšie použiť časti rastlín, u ktorých predpokladáme vyšší obsah sacharidov, ktoré chceme získať a zároveň ich extrakcia nie je náročná. Napríklad zo zrelých ovocných plodov získame vyšší obsah rozpustných sacharidov. Ak je použité ovocie so šupkou (jablko), do vody sa dostanú aj pektíny (nerozpustné v alkoholoch). Zo zásobných častí rastlín, ako zemiaková hľuza, batát, kukurica, semená ryže a pod. je možné získať vyšší obsah škrobu. Kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie sacharidov závisí od druhu a časti rastliny, vývojového štádia a podmienok prostredia.

4. Škrob je zložený z monosacharidových jednotiek α -D-glukopyranózy. Vytvára dve odlišné formy, amylózu (~ 20%) a amylopektín (~ 80%). Amylóza vytvára lineárny reťazec glukóz pospájaných $\alpha(1\rightarrow4)$ glykozidovými väzbami, amylopektín je podobný amylóze, avšak každú 20-30 monosacharidovú jednotku sa reťazec rozvetvuje pripojením ďalšej molekuly glukózy $\alpha(1\rightarrow6)$ glykozidovou väzbou. Škrob je zásobná energetická látka rastlín.
V štruktúre celulózy sú molekuly glukózy viazané $\beta(1\rightarrow4)$ glykozidovou väzbou do dlhých lineárnych reťazcov. Paralelné reťazce celulóзовých vlákien sú spájané vodíkovými väzbami do mikrofibríl zodpovedných za mechanickú silu a chemickú stabilitu celulózy. Preto má celulóza v rastlinách stavebnú funkciu.

5. Polysacharidy sa líšia rozpustnosťou vo vode. Napríklad celulóza je vo vode nerozpustná, škrob sa nerozpúšťa v studenej vode, ale rozpúšťa sa v horúcej vode. Iné polysacharidy, napríklad na báze fruktózy (fruktany), ktoré predstavujú zásobné sacharidy v približne 15 % druhov kvitnúcich rastlín, sú vo vode rozpustné.

R1.2 Molischova reakcia – dôkaz prítomnosti sacharidov

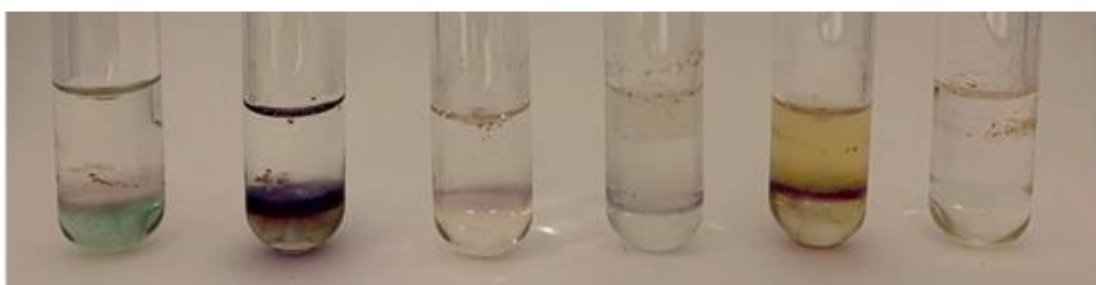
Pozorovanie:

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+	fialový prstenec
fruktóza	+	fialový prstenec
sacharóza	+	fialový prstenec
škrob	+	fialový prstenec
rastlinný extrakt	+	fialový prstenec
voda	-	bez zmeny

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: glukóza, fruktóza, sacharóza, škrob, rastlinný extrakt, voda



Analyzované vzorky po pridaní Molischovho činidla a podvrstvené H₂SO₄

Diskusia:

Pozitívny výsledok bol pozorovaný pri všetkých vzorkách sacharidov, pretože vplyvom koncentrovanej kyseliny sírovej dochádza k hydrolýze oligosacharidov a polysacharidov na monosacharidy. 5-(hydroxymetyl)furfural a furfural, ktoré vznikajú dehydratáciou z monosacharidov v prítomnosti kyseliny sírovej, kondenzujú s α -naftolom a vytvárajú fialovo sfarbené kondenzačné produkty pozorované v skúmavkách ako fialový prstenec na rozhraní roztoku sacharidu a koncentrovanej kyseliny sírovej. V kontrolnej skúmavke

s destilovanou vodou nebola pozorovaná žiadna zmena sfarbenia, nie sú prítomné sacharidy, ani aldehy.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Hmotnosť α -naftolu potrebného na prípravu 50 cm³ jeho 10% roztoku, za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, vypočítame nasledovne:

$$m(\alpha\text{-naftolu}) = w(\alpha\text{-naftolu}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\alpha\text{-naftolu}) = 0,1 \cdot 50 \text{ g}$$

$$m(\alpha\text{-naftolu}) = 5 \text{ g}$$

Na prípravu jeho 10% roztoku α -naftolu odvážíme 5 g α -naftolu a v odmernej banke doplníme do objemu 50 cm³ destilovanou vodou.

2. Dehydratačné účinky na sacharidy majú aj HCl, HNO₃.

3. Kyselina sírová spôsobujú hydrolyzu oligosacharidov a polysacharidov na monosacharidy.

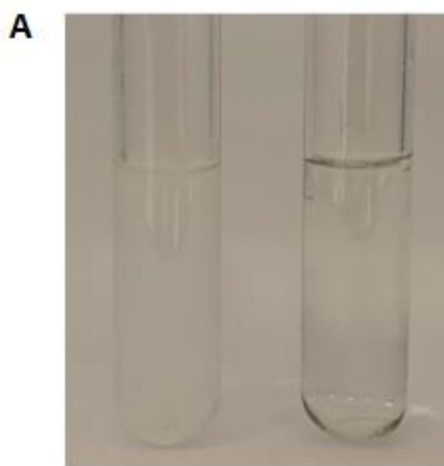
R1.3 Dôkaz škrobu jódovou skúškou a hydrolýza škrobu

Pozorovanie:

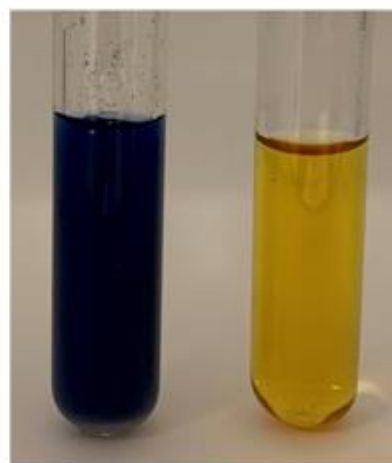
A

Obsah skúmavky	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena	Zohriatie na 60°C	Ochladenie na 25°C
sacharóza + Lugolov roztok	-	žlto-hnedé sfarbenie	žlto-hnedé sfarbenie	žlto-hnedé sfarbenie
škrob + Lugolov roztok	+	modro-fialové sfarbenie	bezfarebné	modro-fialové sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Škrob a sacharóza bez pridaného činidla



Analyzované vzorky po pridaní Lugolovho roztoku



Analyzované vzorky po zahriati na 60°



Analyzované vzorky po ochladení na 25°

B

Doba zahrievania skúmavky (škrobový roztok + HCl)	Sfarbenie vzorky po pridaní Lugolovho roztoku
0 min	modro-fialové sfarbenie
5 min	karmínovočervené sfarbenie
10 min	červené sfarbenie
15 min	oranžové sfarbenie
20 min	žlté sfarbenie
25 min	bezfarebné sfarbenie

B

Roztok škrobu s HCl a Lugolovým roztokom, dĺžka zahrievania v poradí (zľava): 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min

Diskusia (zdôvodnenie pozorovaní):

A. Reťazec amylózy sa stáča do alfa závitnice a pri reakcii s jódom dáva modro-fialové sfarbenie, pretože nepolárne molekuly jódu sa dostávajú do vnútornej dutiny závitnice, čím sa mení absorpčné spektrum. Pri zahriatí roztoku obsahujúceho škrob na teplotu 60°C dochádza k vyrovnaniu závitnice amylózy, uvoľneniu jódu a tým k odfarbeniu roztoku. Po opätovnom ochladení sa štruktúra závitnice obnoví a roztok sa opäť sfarbuje.

Skúmavka obsahujúca sacharózu nedáva pozitívnu reakciu, pretože je to dimér a pre pozitívnu jódovú reakciu je potrebný dlhší reťazec, ktorý bude viazať molekuly jódu.

B. Kyselina chlorovodíková spôsobuje hydrolýzu, teda postupné štiepenie molekuly škrobu. Jednotlivé hydrolyzáty (dextríny) sú Lugolovým roztokom charakteristicky sfarbované. Zafarbenie sa mení v závislosti od stupňa hydrolýzy z modro-fialovej (amylo-dextríny), červenej farby (erytro-dextríny), až sa roztok nakoniec odfarbuje (achroo-dextríny).

Kontrolné otázky:

1. Amylóza a amylopektín sa skladajú z rovnakej podjednotky, a to z α -D-glukopyranózy. V molekule amylózy dochádza k spájaniu monosacharidov $\alpha(1\rightarrow4)$ glykozidovými väzbami. V molekule amylopektínu sa lineárne reťazce vetvia vytvorením $\alpha(1\rightarrow6)$ glykozidovej väzby na približne každej 20-30 monosacharidovej jednotke.
2. Glykogén.
3. Inulín, obsahuje fruktózové jednotky viazané $\beta(2\rightarrow1)$ v lineárnom reťazci.
4. Škrob v kyslom prostredí hydrolyzuje, preto nebude dávať pozitívnu reakciu s Lugolovým roztokom.
5. Na dôkaz prítomnosti škrobu je možné použiť vzorky potravín (múka, pudíng, ryža, zemiak a pod.), na ktoré kvapneme Lugolov roztok.

R1.4 Stanovenie redukujúcich sacharidov

R1.4.1 Dôkaz redukujúcich sacharidov Fehlingovou reakciou

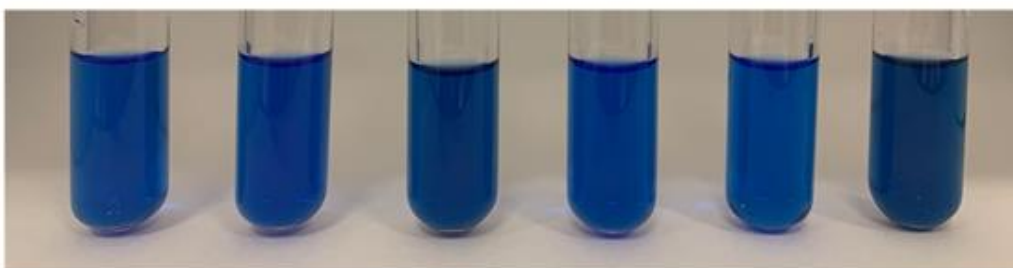
Pozorovanie:

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+	žlto-hnedá zrazenina
fruktóza	+	žlto-hnedá zrazenina
galaktóza	+	žlto-hnedá zrazenina
laktóza	+	žlto-hnedá zrazenina
sacharóza	-	bez zmeny
rastlinný extrakt	+	oranžová zrazenina

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



A analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradi zľava: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, rastlinný extrakt



A analyzované vzorky po pridaní Fehlingovho činidla



A analyzované vzorky po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

Glukóza, galaktóza a fruktóza sú redukujúce sacharidy, preto v ich prípade dochádza k oxidácii aldehydovej, resp. keto- skupiny a zároveň k redukcii Cu^{2+} na Cu^+ . Uvedené zmeny je možné v skúmavke pozorovať ako zmenu sfarbenia z modrej na oranžovú až tehlovočervenú. Sacharóza je disacharid tvorený glukózou a fruktózou. Ich poloacetálové hydroxyly, ktoré by mohli redukovať meďnatý kation, vytvárajú glykozidovú väzbu. Sacharóza teda patrí medzi neredukujúce disacharidy, a preto s Fehlinovým činidlom nereaguje. V tomto prípade môžeme vidieť iba modré sfarbenie Fehlingovho činidla. Laktóza patrí tak isto medzi disacharidy, avšak jeden poloacetátový hydroxyl má voľný, má preto redukčné vlastnosti.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 100 cm^3 7% roztoku síranu meďnatého je potrebné navážiť 7g CuSO_4 a doplniť do celkového objemu 100 cm^3 destilovanou vodou v odmernej banke. V laboratóriu je však dostupná hydratovaná forma síranu meďnatého, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$. Táto zlúčenina obsahuje 5 molekúl vody, čo treba zohľadniť vo výpočte. Na základe relatívnych molekulových hmotností vypočítame percentuálne zastúpenie CuSO_4 v molekule $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$.

$$w(\text{CuSO}_4) = \text{Mr}(\text{CuSO}_4) / \text{Mr}(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O})$$

$$w(\text{CuSO}_4) = 159,6 / 249,7 = 63,9 \%$$

Z predchádzajúceho výpočtu vieme, že na prípravu 100 g roztoku potrebujeme 7g CuSO_4 .

K tomuto množstvu síranu musíme prirátat' teda aj molekuly vody, použijeme preto vzťah priamej úmery:

$$7 \text{ g CuSO}_4 \dots\dots\dots 63,9\%$$

$$x \text{ g (CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O)} \dots\dots\dots 100\%$$

$$x = \mathbf{10,95 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}}$$

Takéto množstvo pentahydrátu síranu meďnatého rozpustíme v malom množstve vody, opatrne prelejeme do odmernej banky a doplníme destilovanou vodou do objemu 100 cm^3 .

2. Percentuálne zastúpenie vlnanu sodno-draselného v 100 cm^3 10% NaOH vypočítame podľa vzťahu pre výpočet hmotnostných percent za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková:

$$w(\text{vlnanu sodno-draselného}) = m(\text{vlnanu sodno-draselného}) / m(\text{roztoku})$$

$$w(\text{vínanu sodno-draselného}) = 35 \text{ g} / 100 \text{ g} = 35 \%$$

Percentuálne zastúpenie vínanu sodno-draselného v 100 cm^3 10% NaOH je **35 %**.

Pri výpočte hmotnostných percent NaOH použijeme rovnaký vzorec:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,1 \cdot 100 \text{ g} = 10 \text{ g}$$

Na prípravu 100 cm^3 10% NaOH je potrebné navážiť **10g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom množstve vody a do objemu 100 cm^3 doplníme destilovanou vodou v odmernej banke.

3. Vychádzame z relatívnych atómových hmotností (A_r) prvkov H (1,007), O (15,999), C (12,011) vyhládaných v tabuľkách. Na určenie relatívnej mólovej hmotnosti (M_r) daného sacharidu je potrebné sčítať atómové hmotnosti všetkých atómov v molekule sacharidu. Na výpočet použijeme sumárny vzorec sacharidu: glukóza - ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), fruktóza - ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), galaktóza - ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), sacharóza - ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), laktóza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$).

Molekuly glukózy, fruktózy a galaktózy majú rovnaký sumárny vzorec ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), ktorého relatívnu mólovú hmotnosť vypočítame nasledovne:

$$6 \times A_r(\text{C}) + 12 \times A_r(\text{H}) + 6 \times A_r(\text{O}) = 6 \times 12,011 + 12 \times 1,007 + 6 \times 15,999 = \mathbf{180,144}$$

Rovnako postupujeme pri disacharidoch.

Sacharid	Relatívna mólová hmotnosť
glukóza / fruktóza / galaktóza	180,144
laktóza / sacharóza	342,275

4. Pre výpočet návážku sacharidov použijeme nasledovný vzťah za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková:

$$m(\text{sacharidu}) = w(\text{sacharidu}) \cdot m(\text{roztoku})$$

V prípade glukózy teda bude platiť:

$$m(\text{glu}) = 0,01 \cdot 50 \text{ g}$$

$$m(\text{glu}) = 0,5 \text{ g}$$

Glukózu rozpustíme v malom množstve destilovanej vody a v odmernej banke objemom 50 cm^3 doplníme objem destilovanou vodou.

V prípade fruktózy, galaktózy a sacharózy ide tak isto o 1% roztoky, preto ich návážky a množstvo pridanej vody bude totožné s výpočtom pre glukózu.

R1.4.2 Dôkaz redukujúcich sacharidov Trommerovou reakciou

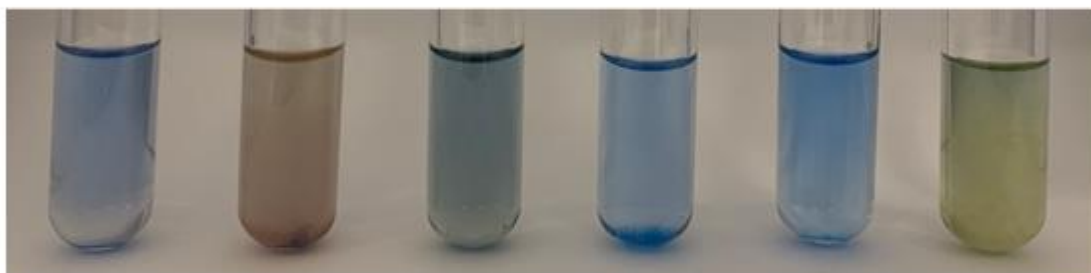
Pozorovanie:

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+	hnedo-červená zrazenina
fruktóza	+	hnedo-červená zrazenina
galaktóza	+	hnedo-červená zrazenina
laktóza	+	hnedo-červená zrazenina
sacharóza	-	bez zmeny
rastlinný extrakt	+	hnedá zrazenina

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradi zľava: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, rastlinný extrakt



Analyzované vzorky po pridaní roztoku NaOH a CuSO₄



Analyzované vzorky po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

V skúmavkách s obsahom glukózy, fruktózy a galaktózy boli redukované meďnaté ióny, čo sa prejavilo vznikom žlto-hnedej zrazeniny CuOH, ktorá sa postupne menila na červený Cu₂O. Tieto sacharidy majú voľné poloacetálové hydroxyly, ktoré sú zodpovedné za ich redukčné vlastnosti. Rovnaká reakcia je pozorovaná aj v prípade disacharidu laktózy, ktorá používa na vytvorenie O-glykozidovej väzby len jeden poloacetálový hydroxyl a druhý ostáva voľný. Sacharóza pozitívnu reakciu nedáva, keďže ide o neredukujúci disacharid. Aj v prípade rastlinného extraktu pozorujeme pozitívnu reakciu, ktorá dokazuje prítomnosť redukujúcich sacharidov. Hoci ovocná šťava môže obsahovať viacero typov sacharidov, vo vzorke predpokladáme najmä prítomnosť glukózy (hroznový cukor) a fruktózy.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Pri výpočte návažku NaOH potrebného na prípravu 50 cm³ 10% vodného roztoku NaOH za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzorec:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,1 \cdot 50 \text{ g} = 5 \text{ g}$$

Na prípravu 50 cm³ 10% NaOH je potrebné navážiť **5g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom množstve vody a do objemu 50 cm³ doplníme destilovanou vodou v odmernej banke.

2. Návažok CuSO₄·5H₂O potrebný na prípravu 50 cm³ 5% vodného roztoku CuSO₄ za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, vypočítame nasledovne:

$$w(\text{CuSO}_4) = m(\text{CuSO}_4) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{CuSO}_4) = w(\text{CuSO}_4) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{CuSO}_4) = 0,05 \cdot 50 \text{ g} = \mathbf{2,5 \text{ g}}$$

Pri príprave 50 cm³ 5% roztoku síranu meďnatého musíme navážiť a rozpustiť **2,5 g** CuSO₄, ktoré doplníme do celkového objemu roztoku 50 cm³. V laboratóriu je však dostupná hydratovaná forma síranu meďnatého CuSO₄·5 H₂O. Táto zlúčenina obsahuje 5 molekúl vody, čo treba zohľadniť vo výpočte. Na základe relatívnych mólových hmotností vypočítame percentuálne zastúpenie CuSO₄ v molekule CuSO₄·5 H₂O.

$$w(\text{CuSO}_4) = M_r(\text{CuSO}_4) / M_r(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O})$$

$$w(\text{CuSO}_4) = 159,6 / 249,7 = 0,639 \quad \Rightarrow \quad 63,9 \%$$

Z predchádzajúceho výpočtu vieme, že na prípravu 50 cm³ roztoku potrebujeme 2,5g CuSO₄. K tomuto množstvu síranu musíme pripočítať aj molekuly vody, použijeme preto vzťah priamej úmery:

2,5 g CuSO₄63,9%

x g (CuSO₄·5 H₂O).....100%

$$x = \mathbf{3,91 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}}$$

Takéto množstvo pentahydrátu síranu meďnatého rozpustíme v malom množstve vody, opatrne prelejeme do odmernej banky a doplníme destilovanou vodou do objemu 50 cm³.

3. Laktóza je disacharid zložený z β-D-galaktopyranózy a D-glukopyranózy viazaných β (1→4) glykozidovou väzbou. V sacharóze sa spája α-D-glukopyranóza s β-D-fruktofuranózou β (1→2) glykozidovou väzbou.
4. Laktóza je redukujúci disacharid, pretože má jednu poloacetálovú hydroxylovú skupinu voľnú (poloacetálový hydroxyl glukózy). Sacharóza je neredukujúci disacharid, pretože nemá voľný poloacetálový hydroxyl. Poloacetálové hydroxyly α-D-glukopyranózy a β-D-fruktofuranózy vytvárajú glykozidovú väzbu, preto sa nemôžu zapojiť do oxidačno-redukčnej reakcie.

R1.4.3 Dôkaz redukujúcich sacharidov Tollensovou reakciou

Pozorovanie:

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+	strieborný povlak
fruktóza	+	strieborný povlak
galaktóza	+	strieborný povlak
laktóza	+	strieborný povlak
sacharóza	-	bez zmeny
rastlinný extrakt	+	sýtočierna zrazenina

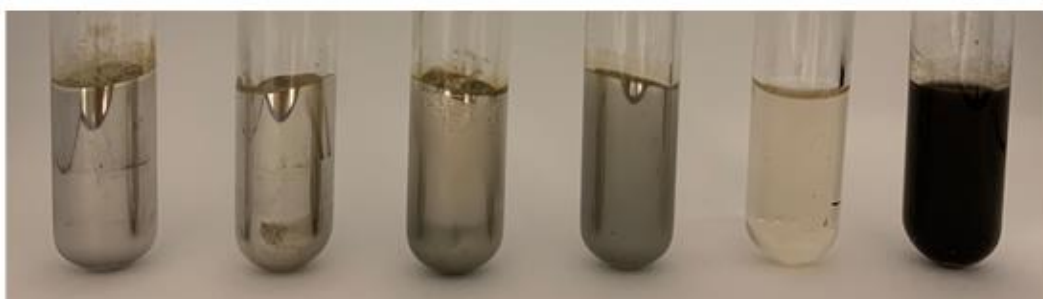
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, rastlinný extrakt



Analyzované vzorky po pridaní Tollensovho činidla



Analyzované vzorky po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

Ak je v sústave prítomný redukujúci sacharid, dochádza k oxidácii jeho aldehydovej, resp. ketoskupiny. Strieborný kation, ktorý je zložkou Tollensovho činidla, je pri reakcii s redukujúcou látkou oxidovaný na elementárne striebro Ag^0 , ktoré vytvorí strieborné zrkadlo na stenách skúmavky. Na základe výsledkov experimentu možno pozorovať vznik elementárneho striebra v skúmavkách všetkých monosacharidov a laktózy, čím boli potvrdené ich redukčné účinky vďaka prítomnosti voľného poloacetálového hydroxyly v každej analyzovanej molekule. Pozitívnu reakciu nedáva sacharóza, keďže ide o neredukujúci disacharid. Pozitívna reakcia v prípade rastlinného extraktu potvrdzuje prítomnosť redukujúcich sacharidov.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. 100 cm^3 2% vodného roztoku amoniaku pripravíme zriedením 25% roztoku destilovanou vodou. Pri výpočte použijeme zried'ovaciú rovnicu a vypočítame tak objem vody a 25% roztoku amoniaku:

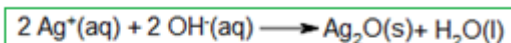
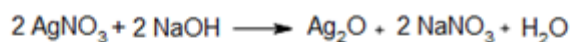
$$V(25\% \text{ roztoku amoniaku}) = 0,02 \cdot 100 \text{ cm}^3 / 0,25 = 8 \text{ cm}^3$$

$$\text{Množstvo vody, ktoré je potrebné na zriedenie} = 100 \text{ cm}^3 - 8 \text{ cm}^3 = 92 \text{ cm}^3$$

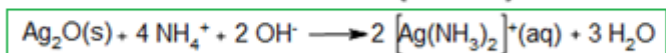
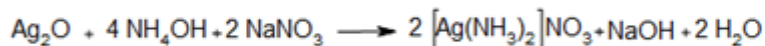
Na prípravu roztoku potrebujeme **8 cm^3 25% roztoku amoniaku a 92 cm^3 destilovanej vody.**

2. Oxidáciou glukózy vzniká kyseliny aldónová, resp. amónna soľ kyseliny glukónovej.

- 3.

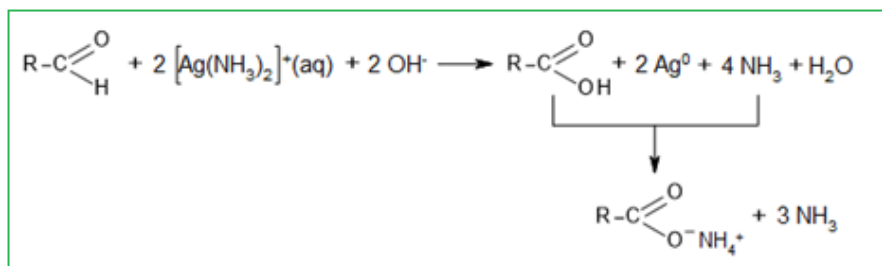
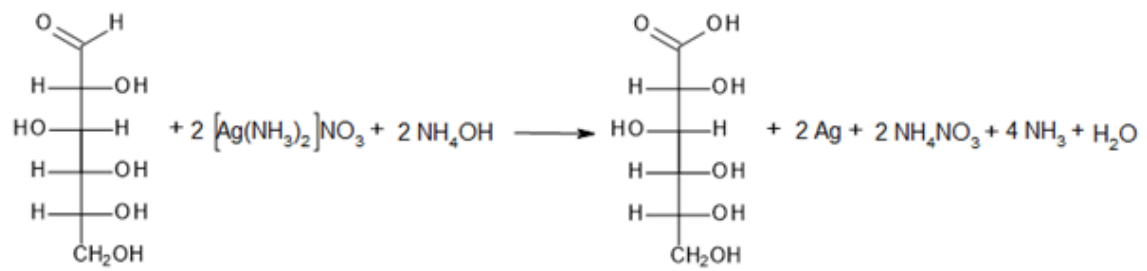


v iónovom tvare



v iónovom tvare

Príprava Tollensovho činidla



v iónovom tvare

Oxidácia glukózy a redukcia strieborného katiónu na elementárne striebro

R1.4.4 Dôkaz redukujúcich sacharidov Nylanderovou reakciou

Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+	hnedo-čierna zrazenina
fruktóza	+	hnedo-čierna zrazenina
galaktóza	+	hnedo-čierna zrazenina
laktóza	+	hnedo-čierna zrazenina
sacharóza	-	bez zmeny
rastlinný extrakt	+	hnedo-čierna zrazenina

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, rastlinný extrakt



Analyzované vzorky po pridaní Nylanderovho činidla



Analyzované vzorky po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

V piatich skúmavkách zo šiestich sa po pridaní Nylanderoho činidla a následnom ohrievaní vo vodnom kúpeli vylúčila hnedo-čierna zrazenina. Sfarbenie vzoriek nasvedčuje tomu, že v skúmavkách sa nachádzali sacharidy s redukčnými vlastnosťami. Všetky monosacharidy majú voľnú aldehydovú, resp. ketónovú skupinu, ktorá môže byť oxidovaná a spôsobovať redukciu inej molekuly. Preto v prvých troch vzorkách monosacharidov došlo k redukcii v Bi^{3+} katiónu na kovový bizmut. Z disacharidov bola pozorovaná pozitívna reakcia pri laktóze, pretože je redukujúci disacharid a pri sacharóze nebola pozorovaná žiadna zmena (neredukujúci disacharid). Vzorka rastlinného extraktu zmenila sfarbenie na hnedo-čierno. Vzorka teda obsahuje redukujúci sacharid(y). Keďže ide o extrakt z ovocia, možno predpokladať prítomnosť fruktózy.

Kontrolné otázky:

1. Na detekciu redukčných vlastností sa používajú ióny ťažkých kovov. Okrem Bi^{3+} katiónu použitého v Nylanderovej skúške môžeme redukujúce vlastnosti testovať aj pomocou iónov Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} alebo Ag^+ . V prípade týchto iónov kovov sú zmeny ich oxidačného stavu spojené s výraznou farebnou zmenou.
2. Samotné polysacharidy nemajú redukčné vlastnosti. Ak by sme však vhodne zvoleným hydrolytickým činidlom (napr. HCl , H_2SO_4 , atď.) dosiahli štiepenie chemickej väzby molekuly polysacharidu na menšie fragmenty, môže v tomto prípade dôjsť k redukcii bizmutitého katiónu a k vzniku charakteristického sfarbenia, ktorú bude poskytovať poloacetálový hydroxyl uvoľnený po hydrolýze.

R1.5 Selivanova reakcia na rozlíšenie aldóz a ketóz

Pozorovanie:

Sacharid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glukóza	+/-	sýte žltoružové sfarbenie
fruktóza	+	červené sfarbenie
galaktóza	+/-	sýte žltoružové sfarbenie
laktóza	+/-	slabé žltoružové sfarbenie
sacharóza	+	červené sfarbenie
rastlinný extrakt	+	červené sfarbenie

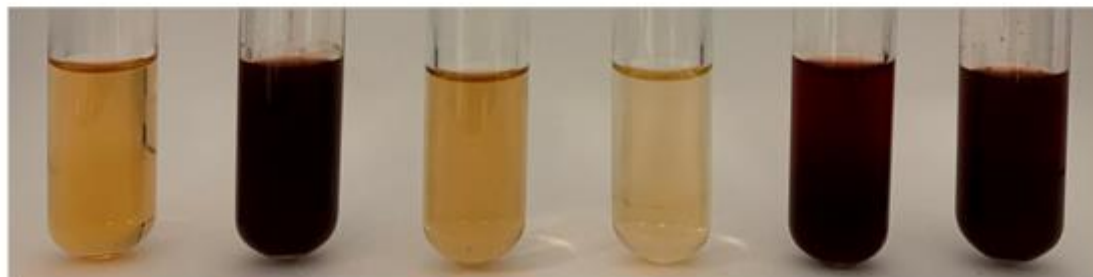
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: glukóza, fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, rastlinný extrakt



Analyzované vzorky po pridaní 25% HCl a rezorcinolu



Analyzované vzorky po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

V skúmavkách s roztokom fruktózy, sacharózy a rastlinného extraktu došlo k vzniku výrazného červeného zákalu. Znamená to, že v skúmavkách sa nachádzali sacharidy s ketónovou skupinou. Štruktúra sacharózy sa skladá z glukózy a fruktózy. Pri zahrievaní sacharózy s kyselinou chlorovodíkovou dochádza k hydrolytickému štiepeniu glykozidovej väzby a fruktóza, ktorá sa uvoľnila, spôsobila vznik charakteristického sfarbenia. V prípade sacharidového extraktu sa dá predpokladať, keďže ide o extrakt z mandarínky, že sa vo vzorke bude nachádzať väčšie množstvo fruktózy (ovocného cukru). Selivanova reakcia predpoklad potvrdila. Skúmavky s roztokom glukózy a galaktózy sa sfarbili na žlto-ružovo. Keďže ide o aldózy, najprv prebieha ich izomerizácia na ketózy, takže sfarbenie nie je také intenzívne a trvá dlhšie, kým sa prejaví. Skúmavka s roztokom laktózy vykazovala najslabšie zafarbenie. Laktóza je zložená z galaktózy a glukózy. Ide o dve aldózy, takže aj v tomto prípade po rozštiepení glykozidovej väzby musí najprv dôjsť k ich konverzii na ketózy.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. 10 cm^3 25% vodného roztoku HCl pripravíme zriedením jej 35% roztoku destilovanou vodou. Pri výpočte použijeme zried'ovaciu rovnicu a vypočítame tak objem vody a 35% HCl:

$$V(35\% \text{ HCl}) = 0,25 \cdot 10 \text{ cm}^3 / 0,35 = 7,1 \text{ cm}^3$$

$$\text{Množstvo vody, ktoré je potrebné na zriedenie} = 10 \text{ cm}^3 - 7,1 \text{ cm}^3 = 2,9 \text{ cm}^3$$

Na prípravu roztoku potrebujeme **$7,1 \text{ cm}^3$ 35% HCl** a **$2,9 \text{ cm}^3$ destilovanej vody**.

2. Polysacharidy by mohli vykazovať pozitívnu reakciu v prípade, že by pred samotným pridaním činidiel prebehla ich hydrolýza. Rozštiepenie väzieb by muselo prebehnúť až do takej miery, aby boli prítomné jednotlivé monosacharidy. Takúto hydrolýzu môžeme dosiahnuť pridaním koncentrovaných kyselín, enzýmov, či varom.

R2 LIPIDY

R2.1 Rozpustnosť a emulgácia lipidov

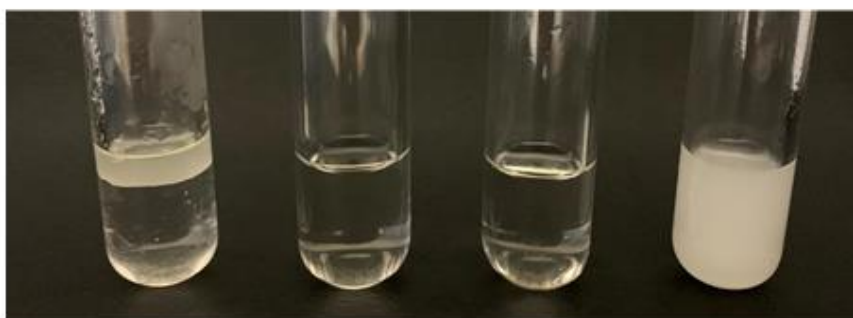
Pozorovanie:

A Rozpustnosť lipidov

Rozpúšťadlo	Pozorovaná zmena
destilovaná voda	oddelené fázy
dietyléter	úplné rozpustenie
chloroform	úplné rozpustenie
etanol	čiastočné rozpustenie



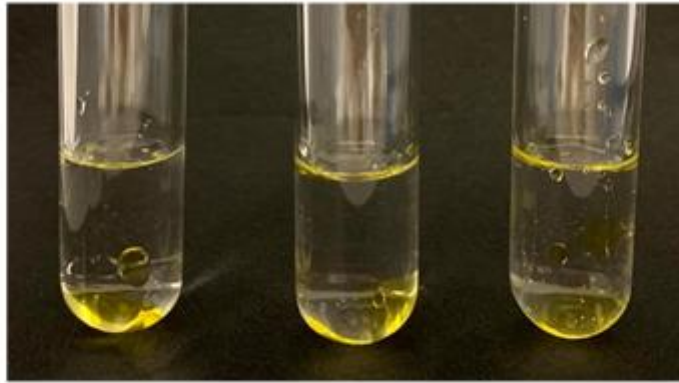
Bravčová masť bez pridaných rozpúšťadiel



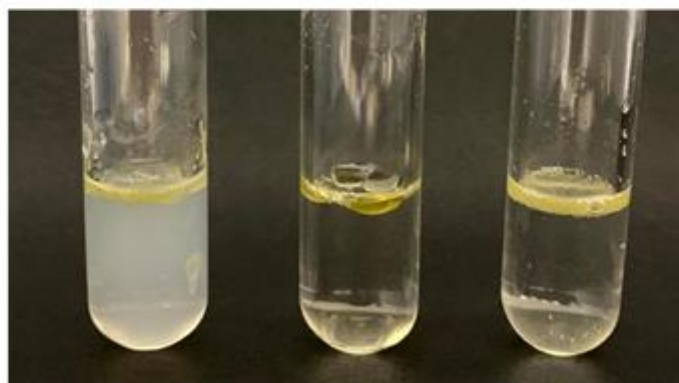
Bravčová masť s rozpúšťadlami v poradí zľava: destilovaná voda, dietyléter, chloroform, etanol

B Emulgácia lipidov

Emulgátor	Pozorovaná zmena
vajcový bielok	emulgácia olivového oleja
KOH	emulgácia olivového oleja
detergent	emulgácia olivového oleja



Olivový olej s destilovanou vodou



Olivový olej s destilovanou vodou a emulgátormi v poradi zľava: vajcový bielok, KOH, detergent

Diskusia:

A

Lipidy sú hydrofóbne látky, a preto sa vo vode nerozpúšťajú (skúmavka s vodou). Rovnako sa masť nerozpúšťa v etanole, ktorý je polárne rozpúšťadlo. V prípade, že by sme skúmavku zahriali, došlo by len k emulgácii lipidu a po ochladení by sa tuk opäť od tekutej fázy oddelil. Najlepšie sa lipidy rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách, preto v prípade dietyléteru a chloroformu došlo k úplnému rozpusteniu bravčovej masti.

B

V prípade všetkých troch pridaných emulgátorov bolo pozorované čiastočné rozptýlenie kvapiek olivového oleja vo vodnom roztoku. Tieto látky znížili povrchové napätie a tak umožnili lepšie rozptýlenie dispergovaných častíc vo vode. Treba však podotknúť, že vo vodnom roztoku nikdy nedôjde k úplnej emulgácii lipidov.

Kontrolné otázky:

1. Z výsledkov experimentu je zrejmé, že tuky sa dobre rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách. Okrem dietyléteru a chloroformu by sme na rozpúšťanie tukov mohli použiť benzín, benzén, toluén, dichlórmetán, hexán atď.
2. Lipidy sa v ľudskom organizme emulgujú pomocou žlčových kyselín, ktoré sú súčasťou žlče vznikajúcej v pečeni. Ide o steroidné látky, ktoré umožňujú emulgáciu lipidov prijatých potravou.
3. Existuje množstvo detergentov v domácnosti, ktoré by sme v tomto experimente mohli využiť, napr. tekuté mydlo, sprchový gél, prací prášok, saponát na riad a ďalšie.

R2.2 Akroleínová reakcia – dôkaz prítomnosti glycerolu

Pozorovanie:

Lipid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
glycerol	+	Štiplavý zápachajúci plyn
olivový olej	+	Štiplavý zápachajúci plyn
včelí vosk	-	Bez zmeny - došlo iba k roztopeniu vosku
bravčová masť	+	Štiplavý zápachajúci plyn

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia

Diskusia:

V skúmavkách s obsahom glycerolu, olivového oleja a bravčovej masti je pri zahrievaní s hydrogensíranom draselným pozorovaná pozitívna akroleínová reakcia s rozdielnou intenzitou. Je zrejmé, že štiplavý zápach typický pre akroleín je najintenzívnejší pri zahrievaní čistého glycerolu. V olivovom oleji a v bravčovej masti (živočišny tuk) je glycerol viazaný v štruktúre acylglycerolov, obsah glycerolu vo vzorke je menší, a preto je štiplavý zápach pochádzajúci z uvoľneného akroleínu menej intenzívny. Súčasťou štruktúry včelieho vosku nie je glycerol, ale jednosýtny voskový alkohol, preto vzorka s voskom neposkytuje pozitívnu reakciu.

Kontrolné otázky:

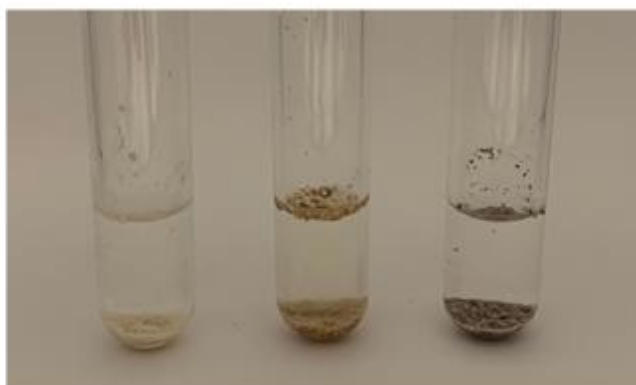
1. Pozitívnu akroleínovú skúšku poskytujú tripalmitoylglycerol a fosfatidyl inozitol.
2. Vo voskoch je možné nájsť jednosýtny alkoholy s dlhým reťazcom, napríklad cetylalkohol (C16), cerylalkohol (C26), mericylalkohol (C30).
3. V zložených lipidoch môže byť prítomný aj nenasýtený aminoalkohol sfingozínom (C₁₈). Jeho aminoskupina tvorí amidovú väzbu s masťou kyselinou (základná štruktúra ceramidu).

R2.3 Dôkaz lipidov v semenách rastlín

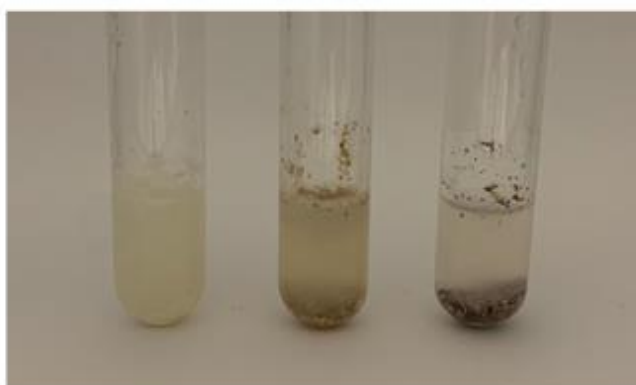
Pozorovanie (doplňte tabuľku podľa vlastného experimentu a pozorovania):

Rastlinná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
snečnica	+	ružovo-červené sfarbenie
ľan	+	červené sfarbenie
mak	+	ružovo-červené sfarbenie

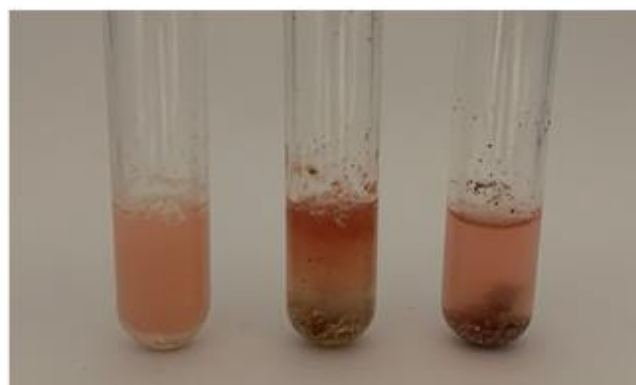
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky s destilovanou vodou v poradí zľava: snečnica, ľan, mak



Analyzované vzorky po zahrievaní bez pridaného farbiva



Analyzované vzorky po pridaní farbiva Sudan III

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

Vo všetkých troch testovaných vzorkách bol pozorovaný pozitívny výsledok. Farbivo Sudan III je dobre rozpustné v etanole, ale ešte lepšie rozpustné v lipidoch. Zahrievaním vzoriek sa uvoľnili lipidy z rozdrvených semien. Po pridaní farbiva k vzorkám došlo k vzniku ružového až červeného sfarbenia. Intenzita sfarbenia súvisí s množstvom prítomných olejov. Vo všetkých skúmavkách bolo rovnaké množstvo rastlinných semien, preto podľa intenzity sfarbenia môžeme predpokladať, že najviac lipidov sa nachádzalo práve v semenách ľanu.

Kontrolné otázky:

1. Zásobné lipidy sú uložené v semenách rastlín.
2. V triacylglyceroloch rastlín majú významné zastúpenie nenasýtené mastné kyseliny, ktoré sú zodpovedné za ich tekutý stav pri izbovej teplote (rastlinné oleje).
3. Samotné klíčenie semien a rast novej rastliny je energeticky veľmi náročný proces. Z biomolekúl sú lipidy najvhodnejším zásobným zdrojom energie, keďže poskytujú najväčšie množstvo energie v prepočte na 1 g.

R2.4 Dôkaz cholesterolu Salkowského reakciou

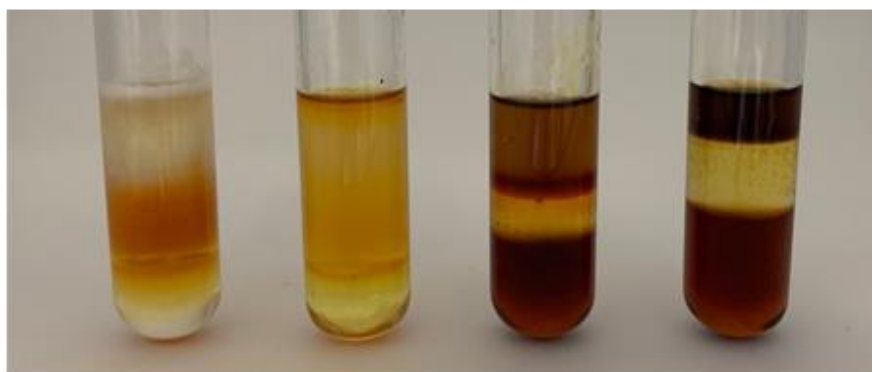
Pozorovanie:

Lipid	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
maslo	+	oranžovo-žlté sfarbenie
bravčová masť	+	oranžovo-žlté sfarbenie
slniečnicový olej	+	červené sfarbenie
olivový olej	+	karmínovo červené sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky v poradi zľava: maslo, bravčová masť, slnečnicový olej, olivový olej



Analyzované vzorky po pridaní chloroformu a konc. H₂SO₄

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

V prípade masla a bravčovej masti bola pozorovaná postupná zmena sfarbenia jednotlivých vrstiev. Horná chloroformová vrstva sa sfarbila na oranžovo, spodná kyselinová vrstva na žltu. Vznik sfarbenia potvrdilo prítomnosť cholesterolu v týchto živočíšnych tukoch. V prípade slnečnicového a olivového oleja pozorovali vznik červeného až karmínovočerveného sfarbenia oboch vrstiev. V týchto rastlinných lipidoch sa potvrdila

prítomnosť terpenoidov. Podľa intenzity sfarbenia môžeme predpokladať, že olivový olej je na tieto látky bohatší.

Kontrolné otázky:

1. Základná štruktúra cholesterolu je steran (cyklopentanoperhydro fenantrén). Látky so steroidnou štruktúrou sú klasifikované ako steroidy, do ktorej patrí aj cholesterol.
2. Zmydeliteľné lipidy obsahujú esterovo viazanú dlhoreťazcovú masťnú kyselinu a môžu byť v zásaditom prostredí hydrolyzované. Tento typ väzby nie je v cholesterolle.
3. Esterifikácia cholesterolu je univerzálny mechanizmus na ukladanie a transport veľkého množstva cholesterolu medzi orgánmi a tkanivami a na zabránenie toxicite nadbytku bunkového cholesterolu.
4. Cholesterol môže tvoriť 256 (2^8) rozdielnych stereoizomérov.
5. Niektoré funkcie cholesterolu: zložka biologických membrán (ovplyvňuje fluiditu a permeabilitu membrán; zložka myelínového obalu nervových buniek; prekursor biosyntézy steroidných hormónov, žlčových kyselín, hormónov nadobličiek a kalciferolov.

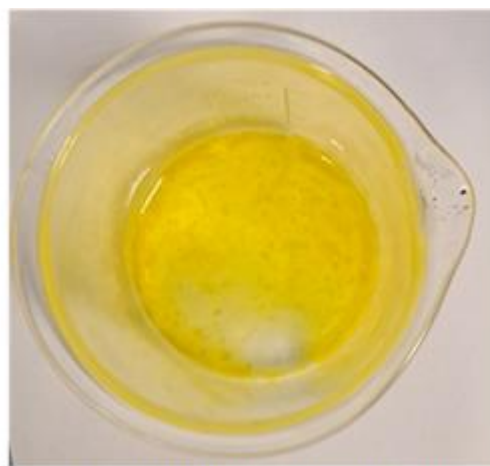
R2.5 Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu

Pozorovanie:

Pri dodržaní jednotlivých krokov pracovného postupu bola najprv získaná zrazenina fosfatidylcholínu (lecitínu). Kademnatá soľ lecitínu nie je rozpustná v dietyléri, preto sa dá ľahko zachytiť na filtračnom papieri. Naopak, kademnatá soľ fosfatidyletanolamínu (kefalínu) je v dietyléri rozpustná, preto na získanie čistého lipidu je potrebné dietyléter odpariť.



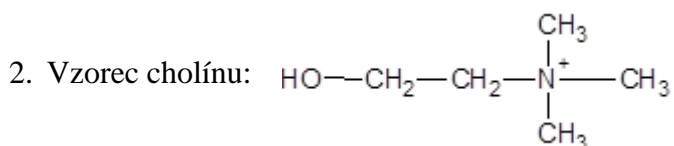
Zrazenina fosfatidylcholínu



Zrazenina fosfatidyletanolamínu

Kontrolné otázky:

1. Lecitín je zložený lipid, fosfolipid.



3. Niektoré funkcie lecitínu: je prírodný antioxidant; podieľa sa na tvorbe a obnovovaní bunkových membrán; významný hlavne pre činnosť nervovej sústavy, keďže hlavnou zložkou lecitínu je cholín, ktorých je metabolizovaný na neurotransmitter acetylcholín.

4. Zdroj lecitínu sú rastlinné oleje a živočíšne tkanivá. Lecitín má bohaté zastúpenie v pečeni, vaječnom žĺtku, sóji, v semenách slnečnice a orechov a v olejoch získaných z týchto semien. Lecitín je v súčasnosti komerčne dostupný vo forme výživových doplnkov.

R2.6 Stanovenie čísla zmydelnenia

Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Objem 0,5 mol.dm ⁻³ HCl použitý na titráciu (cm ⁻³)
olivový olej	11,3
slepá vzorka	24,9

Diskusia:

Na zmydelnenie bol vybraný olivový olej. Po zmydelnení bolo do titračnej banky pridaných pár kvapiek fenolftaleínu, ktorý spôsobil ružové zafarbenie roztoku. Ružové sfarbenie indikuje prítomnosť zásady, v našom prípade nadbytočného NaOH. Roztokom HCl bol nadbytok NaOH titrovaný až do odfarbenia roztoku. Paralelne s titráciou zmydelneného lipidu sme realizovali aj titráciu slepej vzorky (bez obsahu lipidu). Množstvo spotrebovanej HCl (0,5 mol. dm⁻³) bolo v oboch prípadoch použité na výpočet čísla zmydelnenia lipidu. Získaný číselný údaj sme porovnali s tabuľkovými hodnotami a overili sme si správnosť nášho postupu.

Čísla zmydelnenia vybraných tukov	
repkový olej	182 - 193
olivový olej	184 - 196
arašidový olej	187 - 196
slnečnicový olej	188 - 194
ľanový olej	188 - 196
bravčová masť	192 - 203
kravské maslo	210 - 232
kokosový olej	248 - 265

Sedlák a kol. (2020)

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na zistenie návažku NaOH použijeme nasledovný vzťah:

$$m(\text{NaOH}) = c(\text{roztoku NaOH}) \cdot V(\text{roztoku NaOH}) \cdot M(\text{NaOH})$$

$$m = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 0,03 \text{ dm}^{-3} \cdot 39,99 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$m = 0,599 \text{ g NaOH}$$

Na prípravu 30 cm^3 $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ etanolového roztoku NaOH je potrebné navážiť **0,6 g NaOH**. Toto množstvo NaOH rozpustíme v malom množstve destilovanej vody a doplníme do výsledného objemu v odmernej banke.

2. Pre výpočet objemu HCl potrebného na prípravu 30 cm^3 $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodného roztoku HCl je potrebné najprv vypočítať množstvo mólov HCl nachádzajúcich sa v takto pripravenom roztoku. Na výpočet použijeme nasledovný vzťah:

$$n = c \cdot V$$

$$n = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 0,03 \text{ dm}^{-3}$$

$$n = 0,015 \text{ mol HCl}$$

Takéto množstvo mólov je potrebné odobrať z 35% HCl dostupnej v laboratóriu. Jej hustota je $\rho(35\% \text{ HCl}) = 1,175 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Na výpočet objemu použijeme nasledovný vzťah:

$$V = \frac{M \cdot n}{\rho}$$

$$V = \frac{36,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 0,015 \text{ mol}}{1,175 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}}$$

$$V = 0,47 \text{ cm}^3 \text{ 35\% HCl}$$

Množstvo vody potrebnej na prípravu výsledného roztoku:

$$V(\text{dest. H}_2\text{O}) = 30 \text{ cm}^3 (0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}) - 0,47 \text{ cm}^3 (35\% \text{ HCl})$$

$$V(\text{dest. H}_2\text{O}) = 29,53 \text{ cm}^3$$

Na prípravu 30 cm^3 $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku HCl je potrebné odobrať $0,47 \text{ cm}^3$ 35% HCl do $29,53 \text{ cm}^3$ destilovanej vody.

3. Na výpočet čísla zmydelnenia olivového oleja použijeme vzťah:

$$\check{C}Z = \frac{(V(0) - V(vz)) \cdot 28,05}{m} \text{ mg KOH/g}$$

ČZ = číslo zmydelnenia

V(0) – objem roztoku HCl spotrebovaný pri titrácii slepého pokusu (cm³)

V(vz) – objem HCl spotrebovaný pri titrácii vzorky (cm³)

m – hmotnosť naváženej vzorky (g)

28,05 – faktor

V našom prípade sme pri titrovaní zmydelneného olivového oleja spotrebovali **11,3 cm³** 0,5 mol.dm⁻³ roztoku HCl (**V(vz)**). V prípade slepej vzorky použitím 25 cm³ roztoku NaOH s koncentráciou 0,5 mol.dm⁻³ sme spotrebovali **24,9 cm³** 0,5 mol.dm⁻³ roztoku HCl **V(0)**. Získané hodnoty sme použili do vzorca na výpočet čísla zmydelnia:

$$\check{C}Z = \frac{(24,9 - 11,3) \cdot 28,05}{2} \text{ mg KOH/g}$$

$$\check{C}Z = 190,7 \text{ mg KOH/g}$$

Číslo zmydelnenia olivového oleja v našom prípade je **190,7 mg KOH/g**.

R3 AMINOKYSELINY A PROTEÍNY

R3.1 Izolácia kazeínu a albumínov z mlieka

Pozorovanie:

Vzorka	Proces zrážania	Vyzrážaný proteín
Mlieko	prídavok kyseliny octovej	kazeín
Filtrát	zahrievanie	albumín



Zrazenina kazeínu
v kyslom prostredí



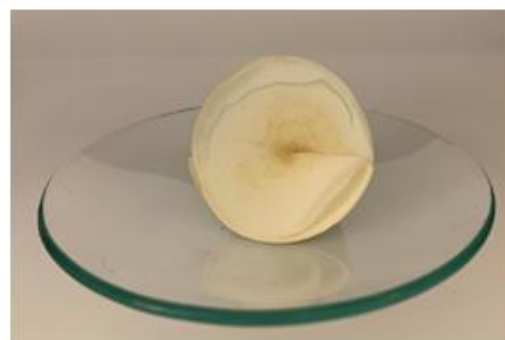
Zrazenina kazeínu zachytená po filtrácii



Filtrát s obsahom albumínu



Zrazenina albumínu
vo filtráte po zahriatí



Zrazenina albumínu zachytená po filtrácii

Diskusia:

Postupným pridávaním kyseliny octovej do mlieka došlo k vyvráženiu kazeínu (zrazenina 1), ktorý bol ľahko oddelený filtráciou. Mliečny albumín zostal rozpustený vo filtráte, z ktorého bola po zahriatí získaná biela zrazenina aj tejto bielkoviny. Albumín denaturuje zahrievaním nad 65°C. Zrazeninu albumínu sme tak isto zachytili na filtračnom papieri.

Kontrolné otázky:

1. Kazeín môže byť z mlieka vyvrážený použitím kyseliny citrónovej.
2. Proteíny denaturujú napríklad vplyvom chemických látok, žiarenia, zmenou pH prostredia, alebo teplom. V domácnosti sa veľmi často stretávame so zrážaním bielkovín vaječného bielka pri vysokej teplote (jednoduchý školský príklad).
3. Tepelná úprava potravín s obsahom bielkovín spôsobuje ich denaturáciu, čím sa stávajú pre človeka stráviteľnejšími.
4. Podstatou výroby tvarohu je zrážanie mlieka kyselinou mliečnou, ktorá vzniká z mliečneho cukru (laktózy) pôsobením kultúr kyslomliečnych baktérií, napr. *Streptococcus lactis*. Mlieko, ktoré je vystavené vplyvu acidofilných baktérií, stačí iba jemne zahriať (cca 28 – 32°C) a následne oddeliť tuhú zložku (tvaroh) od tekutej (srvátka).

R3.2 Ninhydrínová reakcia - dôkaz aminoskupiny

Pozorovanie:

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
alanín	+	fialové sfarbenie
histidín	+	fialové sfarbenie
vaječný bielok	+	fialové sfarbenie
voda	-	bez zmeny sfarbenia

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: alanín, histidín, vaječný bielok, voda



Analyzované vzorky po pridaní Ninhydrínového činidla



Analyzované vzorky po zahrievaní s Ninhydrínovým činidlom a etanolom

Diskusia:

Skúmavka s obsahom alanínu a histidínu sa po pridaní ninhydrínu zafarbila na fialovo. Tieto aminokyseliny obsahujú voľnú aminoskupinu, ktorá pri reakcii s ninhydrínom dáva vznik Ruhemanovej violeti. Vzorka vaječného bielka obsahuje predovšetkým peptidy a proteíny, v ktorých sú α -aminoskupiny viazané peptidovou väzbou. Za pozitívnu ninhydrínovú reakciu pozorovanú ako fialové sfarbenie zodpovedá ϵ -aminoskupina bočného reťazca lyzínu.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 100 cm^3 1%-ného roztoku alanínu (ala) za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$w(\text{ala}) = m(\text{ala}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{ala}) = w(\text{ala}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{ala}) = 0,01 \cdot 100 \text{ g} = 1 \text{ g}$$

Na prípravu 100 cm^3 1 % ala je potrebné navážiť **1 g ala**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 100 cm^3 doplníme destilovanou vodou v odmernej banke. Rovnako postupujeme aj v prípade aminokyseliny histidín.

2. Ak chceme pripraviť 10x zriedený roztok vaječného bielka v objeme 20 cm^3 , uvažujeme nasledovne:

$$V(\text{vaječného bielka}) = V(\text{roztoku } 10x \text{ zriedeného vaječného bielka}) / \text{riedenie}$$

$$V(\text{vaječného bielka}) = 20 \text{ cm}^3 / 10$$

$$V(\text{vaječného bielka}) = 2 \text{ cm}^3$$

Zvyšok (do 20 cm^3) doplníme destilovanou vodou.

Na prípravu 20 cm^3 10x zriedeného roztoku vaječného bielka potrebujeme **2 cm³ vaječného bielka a 18 cm³ destilovanej vody**.

3. V tomto prípade postupujeme rovnako ako pri riedení vaječného bielka, ale použijeme inú hodnotu riedenia (5x).

$$V(\text{mlieka}) = V(\text{roztoku zriedeného mlieka}) / \text{riedenie}$$

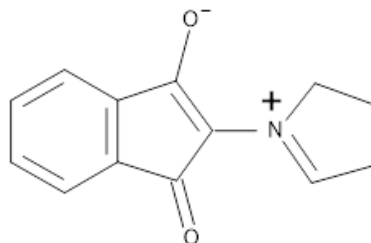
$$V(\text{mlieka}) = 20 \text{ cm}^3 / 5$$

$$V(\text{mlieka}) = 4 \text{ cm}^3$$

Zvyšok (do 20 cm^3) doplníme destilovanou vodou.

Na prípravu 20 cm³ 5x zriedeného roztoku mlieka potrebujeme **4 cm³ vaječného bielka** a **16 cm³ destilovanej vody**.

4. Pozitívna reakcia ninhydrínu s prolínom je dokumentovaná vznikom žltó sfarbeného produktu:



5. Približne 10% hmotnosti vaječného bielka je tvorené proteínmi (bielkovinami) a z toho takmer 54% tvorí ovalbumín.

R3.3 Xantoproteínová reakcia – dôkaz aromatických aminokyselín

Pozorovanie:

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
alanín	-	bez zmeny sfarbenia
tyrozín	+	žlto-oranžové sfarbenie
mlieko	+	žlto-oranžové sfarbenie
vaječný bielok	+	žlto-oranžové sfarbenie
voda	-	bez zmeny sfarbenia

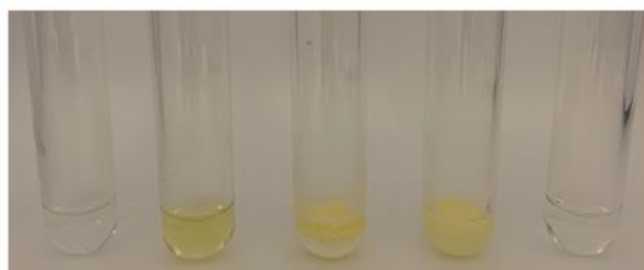
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



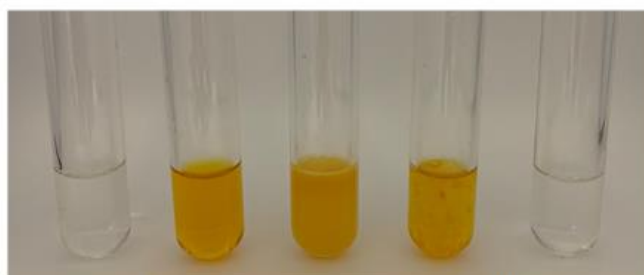
Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradi zľava: alanín, tyrozín, mlieko, vaječný bielok, voda



Analyzované vzorky po pridaní konc. HNO₃



Analyzované vzorky po pridaní zahriati a následnom ochladení



Analyzované vzorky po pridaní roztoku NaOH

Diskusia:

V prípade prvej analyzovanej vzorky obsahujúcej aminokyselinu alanín nedošlo k zmene sfarbenia. Reakcia nebola pozitívna, pretože alanín neobsahuje aromatické jadro. Skúmavka s obsahom tyrozínu poskytla viditeľne pozitívnu reakciu, keďže tyrozín vo svojej štruktúre obsahuje aromatický kruh. Pozitívna reakcia bola pozorovaná aj vo vzorkách s obsahom kravského mlieka a vaječného bielka. Tieto potraviny sú známe vysokým obsahom bielkovín a pozitívna xantoproteínová reakcia dokázala prítomnosť aromatických kyselín v týchto bielkovinách. Skúmavka s destilovanou vodou slúžila ako slepá vzorka bez prítomnosti aromatických aminokyselín (nebola pozorovaná žiadna zmena sfarbenia).

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 20 cm³ 20 %-ného vodného roztoku NaOH za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,2 \cdot 20 \text{ g} = 4 \text{ g}$$

Na prípravu 20 cm³ 2 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **4 g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 20 cm³ doplníme destilovanou vodou.

2. Nitrácia benzénu je elektrofilná substitúcia.
3. Hydroxylová skupina viazaná na aromatické jadro orientuje vstup ďalšieho substituenta do polôh *orto* a *para*. Ak je poloha *para* obsadená, nitroskupina vstupuje do polohy *orto*.

R3.4 Biuretova reakcia – dôkaz peptidovej väzby

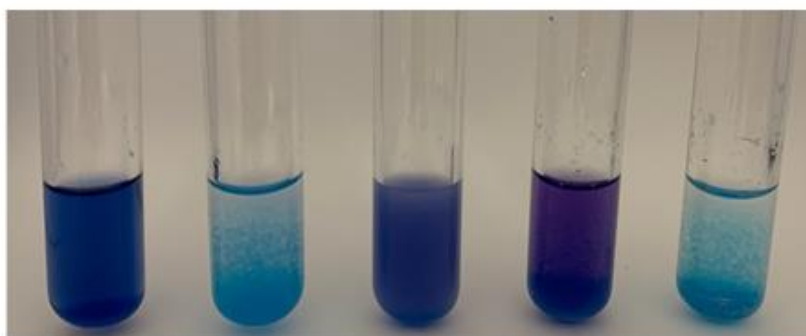
Pozorovanie:

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
histidín	+	modro-fialové sfarbenie
alanín	-	modré sfarbenie
mlieko	+	fialové sfarbenie
vaječný bielok	+	fialové sfarbenie
voda	-	modré sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: histidín, alanín, mlieko, vaječný bielok, voda



A nalyzované vzorky po pridaní NaOH a CuSO₄

Diskusia:

Pozitívnu Biuretovu reakciu poskytuje aminokyselina histidín obsahujúca atómy a atómové skupiny zodpovedné za vznik modro-fialového komplexu s meďnatými iónmi (prvá skúmavka). Aminokyselina alanín nedáva pozitívnu Biuretovu reakciu a modré sfarbenie roztoku v skúmavke je v dôsledku prítomnosti činidla, síranu meďnatého (druhá skúmavka). Intenzívne fialové sfarbenie pozorované vo vzorkách mlieka a vaječného bielka dokumentuje prítomnosť bielkovín (proteínov) v týchto potravinách. V kontrolnej skúmavke s vodou je modré sfarbenie spôsobené len prítomnosťou síranu meďnatého.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 20 cm³ 12 %-ného vodného roztoku NaOH za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,12 \cdot 20 \text{ g} = 2,4 \text{ g}$$

Na prípravu 20 cm³ 12 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **2,4 g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 20 cm³ doplníme destilovanou vodou.

2. Ak by sme použili bezvodý CuSO₄, na prípravu 20 cm³ 10% roztoku síranu meďnatého by sme potrebovali 2 g CuSO₄ za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková.

$$m(\text{CuSO}_4) = w(\text{CuSO}_4) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{CuSO}_4) = 0,10 \cdot 20 \text{ g} = 2 \text{ g}$$

V laboratóriu je dostupná hydratovaná forma síranu meďnatého CuSO₄·5 H₂O, preto musíme vo výpočte zohľadniť prítomnosť molekúl vody. Na základe relatívnych mólových hmotností vypočítame percentuálne zastúpenie CuSO₄ v molekule CuSO₄·5 H₂O.

$$w(\text{CuSO}_4) = M_r(\text{CuSO}_4) / M_r(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O})$$

$$w(\text{CuSO}_4) = 159,6 / 249,7 = 63,9 \%$$

Z predchádzajúceho výpočtu vieme, že na prípravu 20 cm³ roztoku potrebujeme 2 g CuSO₄. K tomuto množstvu síranu musíme prirátat' teda aj molekuly vody, použijeme preto vzťah priamej úmery:

$$2 \text{ g CuSO}_4 \dots\dots\dots 63,9\%$$

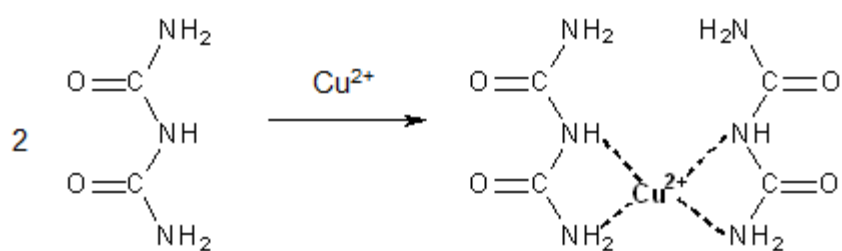
$$x \text{ g (CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}) \dots\dots\dots 100\%$$

$$x = \mathbf{3,13 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}}$$

Vypočítané množstvo pentahydrátu síranu meďnatého rozpustíme v malom množstve vody, opatrne prelejeme do odmernej banky a doplníme destilovanou vodou do objemu 20 cm³.

3. Meďnaté ióny sú redoxne aktívne a v neviazanej forme (voľnej) je potenciálne toxická, pretože môže katalyzovať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (hydroxylových radikálov) prostredníctvom Fentonovej reakcie vstupovať do oxidoredukčných reakcií, ktoré prebiehajú v živých systémoch.

4. Štruktúra komplexu meďnatých iónov s biuretom



R3.5 S-Pb reakcia

Pozorovanie:

Aminokyselina/bielkovina	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
vaječný bielok	+	hnedý zákal
mlieko	+	žlto-hnedý zákal
voda	-	bez zmeny sfarbenia

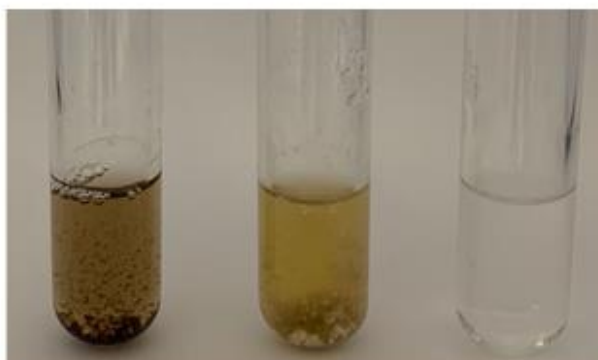
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: vaječný bielok, mlieko, voda



Analyzované vzorky po pridaní NaOH a octanu olovnatého



Analyzované vzorky po zahriatí

Diskusia:

V skúmavkách s obsahom vaječného bielka a mlieka dochádza ku vzniku hnedého a žltého hnedého zákalu, ktoré indikujú prítomnosť sulfidu olovnateho. Vo vzorke obsahujúcej vaječné bielko sa vo väčšej miere formovala typická čierno-hnedá zrazenina sulfidu olovnateho. Pozorované sfarbenie a vznik zrazeniny potvrdzuje prítomnosť sírnej aminokyseliny cysteínu.

Skúmavka s obsahom vody slúžila ako slepá vzorka, reakcia bola negatívna.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 10 cm³ 5 %-ného vodného roztoku octanu olovnateho za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:
$$m(\text{octanu olovnateho}) = w(\text{octanu olovnateho}) \cdot m(\text{roztoku})$$
$$m(\text{octanu olovnateho}) = 0,05 \cdot 10 \text{ g} = 0,5 \text{ g}$$

Na prípravu 10 cm³ 5 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **0,5 g octanu olovnateho**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 10 cm³ doplníme destilovanou vodou.

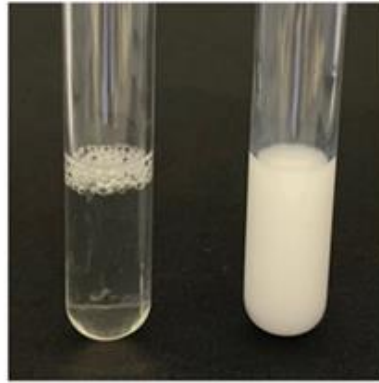
2. Pb-S test s aminokyselinou metionín je negatívny. Síra viazaná v metioníne nie je uvoľňovaná v prítomnosti hydroxidu.

R3.6 Zrážacie (precipitačné) reakcie bielkovín

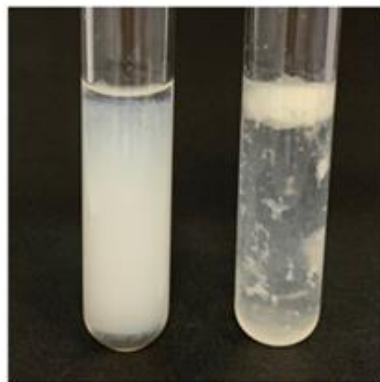
Pozorovanie:

Bielkovina	Zrážadlo		Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena po pridaní zrážadla
vaječný bielok	organické rozpúšťadlo	etanol	+	biela zrazenina
	soľ ťažkého kovu	octan olovnatý	+	biela zrazenina
		síran meďnatý	+	svetlomodrá zrazenina
	organická kyselina	kyselina sulfosalicylová	+	biela zrazenina
	minerálna kyselina	HCl	+	biela zrazenina na rozhraní kvapalín
		HNO ₃		bledožltá zrazenina na rozhraní kvapalín
mlieko	organické rozpúšťadlo	etanol	+	biela zrazenina
	soľ ťažkého kovu	octan olovnatý	+	biela zrazenina
		síran meďnatý	+	svetlomodrá zrazenina
	organická kyselina	kyselina sulfosalicylová	+	biela zrazenina
	minerálna kyselina	HCl	+	biela zrazenina na rozhraní kvapalín
		HNO ₃	+	bledožltá zrazenina na rozhraní kvapalín

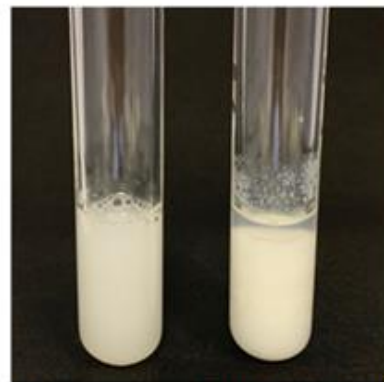
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



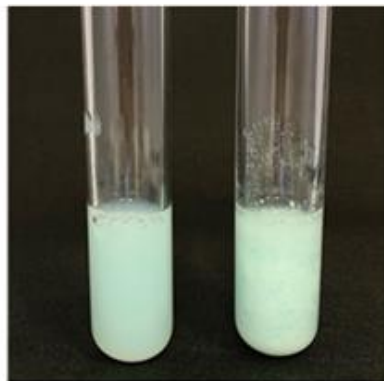
Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradi zľava: vaječný bielok, mlieko



Analyzované vzorky po pridaní etanolu



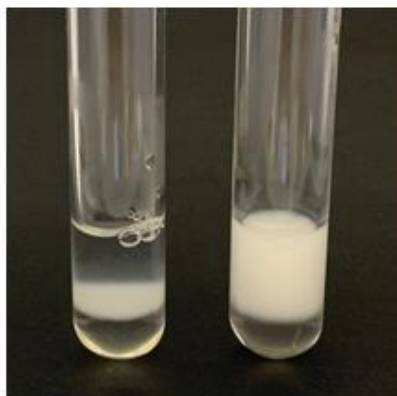
Analyzované vzorky po pridaní octanu olovnatého



Analyzované vzorky po pridaní CuSO_4



Analyzované vzorky po pridaní kys. sulfosalicylovej



Analyzované vzorky po pridaní HCl



Analyzované vzorky po pridaní HNO_3

Diskusia (zdôvodnite jednotlivé pozorovania):

Po pridaní zrážacích činidiel došlo k denaturácii bielkovín prítomných v roztoku mlieka a vaječného bielka. Vo vzorkách bol pozorovaný vznik zákalu alebo zrazeniny. Výsledné sfarbenie zrazeniny bolo ovplyvnené typom pridaného činidla.

Po prídavku kyseliny sa zníži hodnota pH roztoku, katióny vodíka sú zachytené amino skupinami bielkovín, ktoré získavajú kladný náboj. Naruší sa hydratačný obal vo vodnom prostredí, čo vedie k zrážaniu bielkovín.

Prídavok iónov solí tiež spôsobuje narušenie hydratačného obalu okolo molekuly bielkoviny tým, že ióny solí viažu molekuly vody. Molekuly bielkovín sú vzájomne priťahované silnejšie a dochádza k ich zrážaniu.

Organické rozpúšťadlá nahrádzajú molekuly vody hydratujúce bielkoviny a spôsobujú ich zrážanie.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 10 cm^3 0,5 %-ného vodného roztoku octanu olovnatého za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$m(\text{octanu olovnatého}) = w(\text{octanu olovnatého}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{octanu olovnatého}) = 0,005 \cdot 10 \text{ g} = 0,05 \text{ g}$$

Na prípravu 10 cm^3 5 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **0,05 g octanu olovnatého**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 10 cm^3 doplníme destilovanou vodou.

V prípade ostatných roztokov postupujeme rovnako, zohľadníme však odlišné požadované výsledné percentá daných roztokov. V prípade roztoku CuSO_4 berieme do úvahy, že na prípravu používame hydratovanú formu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (podobný výpočet môžete nájsť v kontrolných otázkach časti Biuretova reakcia).

2. Počas denaturácie bielkovín dochádza k porušeniu štruktúry a funkcie bielkoviny. Denaturáciou zanikajú vyššie štruktúry (II. – IV), pretože sú udržiavané slabými silami. Primárna štruktúra zostáva zachovaná, je tvorená kovalentnými väzbami.

R3.7 Dialýza

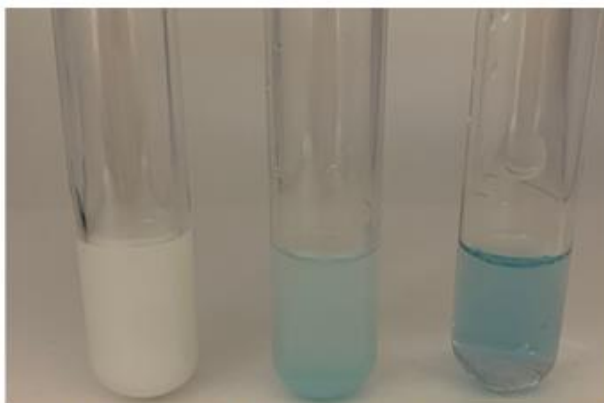
Pozorovanie:

Skúmavka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
vzorka + AgNO ₃	+	biela zrazenina
vzorka + reagensie Biuretovej reakcie	-	svetlomodrý zákal
vzorka + Fehlingovo činidlo	-	svetlomodrý zákal

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Vzorky destilovanej vody odobratej z Petriho misky



Analyzované vzorky po pridaní AgNO₃ reagensii Biuretovej reakcie a Fehlingovho roztoku

Diskusia:

Po 10 minútach státia boli z Petriho misky odobrané vzorky, ktoré boli následne podrobené reakcii na dôkaz prítomnosti chloridových aniónov a Biuretovej reakcii.

Dôkaz prítomnosti NaCl: Po pridaní roztoku AgNO_3 došlo k okamžitému vytvoreniu bielej zrazeniny AgCl medzi Ag^+ kationmi pochádzajúcimi z AgNO_3 a Cl^- aniónmi (z NaCl), ktoré prenikli cez celofánovú membránu (prvá skúmavka).

Po pridaní roztokov NaOH a CuSO_4 pri Biuretovej skúške sa roztok vzorky zafarbil na svetlomodro. Sfarbenie nedokazuje prítomnosť bielkovín, ale je spôsobené farbou roztoku CuSO_4 . V prípade pozitívnej reakcie by bol pozorovaný vznik fialového sfarbenia, ktoré dáva komplex bielkoviny s meďnatými iónmi.

Po pridaní Fehlingovho činidla na indentifikáciu prítomnosti glukózy bolo pozorované bledomodré sfarbenie, čo indikuje, že glukóza vo vzorke nie je prítomná. Prítomnosť glukózy by bola dokumentovaná vznikom červeno-oranžovej zrazeniny oxidu meďného.

Cez membránu celofánu prešli ióny soli, pre bielkoviny a glukózu je membrána nepriepustná. Výsledok experimentu potvrdil, že biomembrány selektívne prepúšťajú iba určitý druh častíc, sú teda semipermeabilné a je možné ich použiť na oddelenie vysokomolekulových od nízkomolekulových častíc.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 10 cm^3 10 %-ného vodného roztoku NaOH za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH}) / m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,1 \cdot 10 \text{ g} = 1 \text{ g}$$

Na prípravu 10 cm^3 10 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **1 g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 10 cm^3 doplníme destilovanou vodou.

2. Dialýza nahrádza funkciu obličiek, ktoré z rôznych príčin nedokážu čistiť krv od odpadových látok, alebo regulovať množstvo vody v tele. Ak nie je tento proces zabezpečený, dochádza k hromadeniu uvedených látok v tele, čo môže mať za následok vážne poškodenie, až zlyhanie organizmu.

V nemocničných zariadeniach sa využíva hemodialýza. Krv pacienta sa čistí mimotelovo pomocou dialyzátora alebo umelej obličky. Krv sa z tela pacienta odvádza do dialyzačného prístroja, kde sa zbaví odpadových látok a nadbytočných tekutín. Takto upravená krv sa dostáva späť do cievneho obehu pacienta.

R4 ENZÝMY

R4.1 Enzýmová aktivita slinnej amylázy

Pozorovanie:

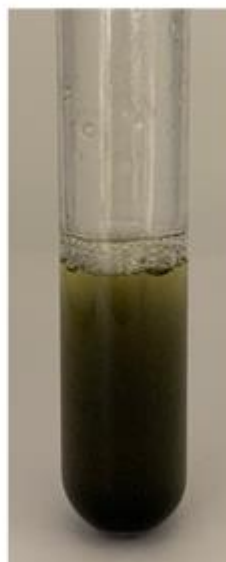
Vzorka	0. minúta	7. minúta	15. minúta
škrob + amyláza + Lugolov roztok	fialové sfarbenie	hnedo-zelené sfarbenie	žlté sfarbenie



Roztok škrobu
so slinnou amylázou



Analyzovaná vzorka
s Lugolovým roztokom
0. minúta



Analyzovaná vzorka
po 7 minútach inkubácie
pri 37 °C



Analyzovaná vzorka
po 15 minútach
inkubácie pri 37 °C

Diskusia:

Ihneď po zmiešaní roztoku zemiakového škrobu, slinnej amylázy a Lugolovho roztoku je pozorovaný vznik tmavomodrého sfarbenia (pozitívna reakcia). Sfarbenie potvrdzuje prítomnosť dlhších reťazcov α -závitnice škrobu, ktoré amylázou neboli ešte rozštiepené. Po zahrievaní obsahu skúmavky pri teplote 37 °C bola po 7 minútach pozorovaná zmena sfarbenia na hnedo-zelenú a po 15 minútach zostal žlté zafarbený roztok. Zmena sfarbenia indikuje, že väčšina molekúl škrobu bola rozštiepená na malé fragmenty.

Kontrolné otázky:

1. Slinná α -amyláza hydrolyticky štiepi $\alpha(1\rightarrow4)$ glykozidové väzby. V molekule celulózy sú reťazce viazané $\beta(1\rightarrow4)$ -glykozidovou väzbou.
2. Enzymová aktivita závisí od viacerých faktorov a jedným z nich je teplota. Každý enzým má teplotné optimum, kedy je jeho katalytická aktivita najvyššia. Teplotné optimum koreluje s telesnou teplotou organizmu.

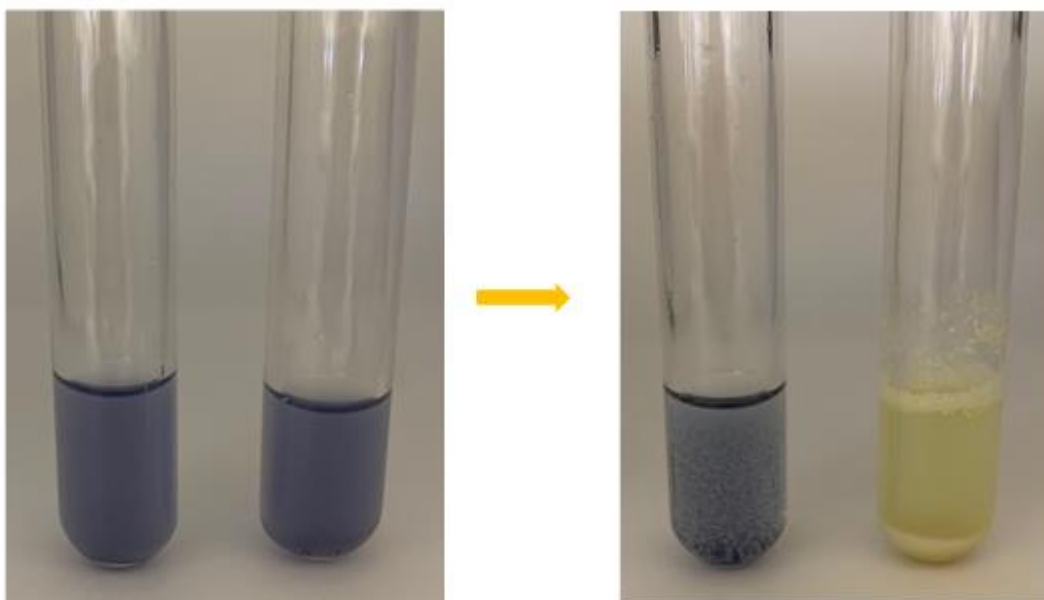
R4.2 Rozklad potravy pankreatickými enzýmami

Pozorovanie :

A. Trávenie potravy s obsahom sacharidov.

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
filtrát pečiva bez pridaného Pancreolanu	-	bez zmeny
filtrát pečiva s pridaným Pancreolanom	+	odfarbenie roztoku

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Filtrát z pečiva s Lugolovým roztokom

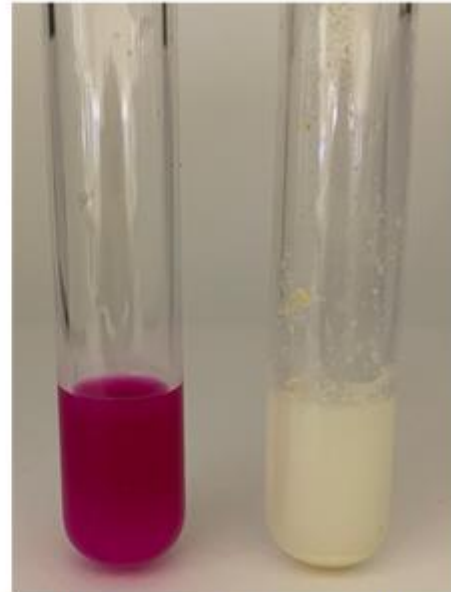
A analyzované vzorky bez pridaného Pancreolanu (vľavo) a s pridaným Pancreolanom (vpravo)

B. Trávenie potravy s obsahom lipidov a bielkovín.

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
mlieko bez pridaného Pankreolanu	-	bez zmeny
mlieko s pridaným Pankreolanom	+	odfarbenie roztoku



Mlieko s destilovanou vodou,
roztokom NaOH a fenolftaleínom



A analyzovaná vzorka bez pridaného
pankreolanu (vľavo) a s pridaným
pankreolanom (vpravo)

Diskusia:

A. Filtrát získaný z pečiva (dve skúmavky vľavo) obsahoval škrob, ktorý sa z pečiva uvoľnil do vody. Prítomnosť škrobu bola dokázaná pridaním Lugolovho roztoku, ktorý spôsobil sfarbenie obsahu skúmaviek na fialovo (intenzita sfarbenia koreluje s obsahom škrobu). Po pridaní Pancreolanu do jednej zo skúmaviek (skúmavka vpravo) bolo pozorované odfarbenie roztoku ako výsledok aktivity α -amylázy obsiahnutej v Pancreolane, ktorá štiepi molekuly škrobu na menšie fragmenty.

Pozn.: Modro-fialové sfarbenie pri Lugolovej reakcii je spôsobené prítomnosťou molekúl jódu interkalujúcich do závitnice lineárnych reťazcov molekúl škrobu. Farba roztoku je tým tmavšia, čím sú dlhšie reťazce molekúl škrobu.

B. Roztok mlieka s hydroxidom sodným sa po pridaní fenolftaleínu sfarbil na ružovo (farba fenolftaleínu v zásaditom prostredí). Po pridaní Pancreolanu sa obsah skúmavky odfarbil v dôsledku poklesu pH. Tuky prítomné v mlieku boli štiepené pankreatickými lipázami na mastné kyseliny a glycerol. Prítomnosť mastných kyselín vyvolala zmenu pH a následné odfarbenie vzorky ako dôsledok obnovenia molekulovej štruktúry fenolftaleínu.

Kontrolné otázky:

1. Enzým amyláza štiepi O-glykozidové väzby v oligo- a polysacharidoch, lipáza štiepi esterové väzby acylglycerolov (lipidy) a proteáza peptidové väzby medzi aminokyselinami v proteínoch.
2. Fenolftaleín je v kyslom prostredí bezfarebný (molekulové štruktúra) a v zásaditom prostredí je červený (iónová forma). Iné indikátory môžu mať v týchto prostrediach dve rôzne farby (lakmus je v kyslom prostredí červený, v zásaditom prostredí je modrý).

R4.3 Reakcia na dôkaz ureázy

Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
sójové mlieko	+	ružové sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Sójové mlieko s močovinou



Sójové mlieko s močovinou po pridaní fenolftaleínu

Diskusia:

Sójové mlieko obsahuje enzým ureázu, ktorá spôsobuje rozklad močoviny pridanej do reakcie ako substrát enzýmu. Pridaním fenolftaleínu vzniklo ružové sfarbenie, ktoré indikuje prítomnosť zásaditého prostredia vplyvom reakcie uvoľneného amoniaku s molekulami vody.

Kontrolné otázky:

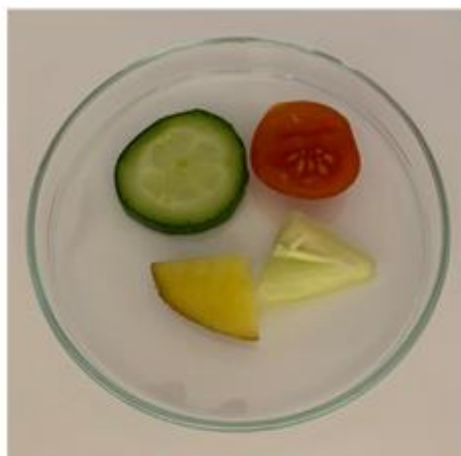
1. Na dôkaz aktivity ureázy nie je vhodné použiť ako indikátor metylovú žltú. Škála farebného prechodu pre tento indikátor je pH 2,9 – 4,0 (kyslá červená forma – zásaditá žltá forma), teda farebná zmena bude ešte v kyslom prostredí pri pH 4.
2. Arginín sa podieľa na syntéze oxidu dusnatého (NO), ktorý plní funkciu neuromodulátora.

R4.4 Kataláza v zelenine

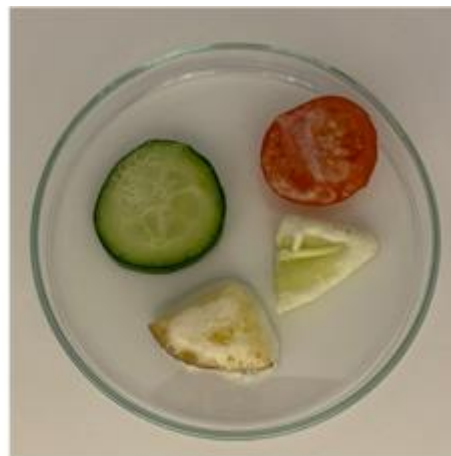
Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
zemiaková hľuza	+	biela pena
uhorka	+	biela pena
paradajka	+	biela pena
paprika	+	biela pena

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Vzorky zeleniny



Vzorky zeleniny po pridaní peroxidu vodíka

Diskusia:

Po prikvapnutí peroxidu vodíka na reznú plochu vzoriek zeleniny je pozorovaný vznik peny, ktorý dokumentuje prítomnosť katalázy. Intenzita tejto kvalitatívnej dôkazovej reakcie odráža množstvo prítomného enzýmu. Vo vybraných vzorkách zeleniny bola najintenzívnejšia pena pozorovaná na zemiakovej hľuze.

Výpočty a kontrolné otázky:

1. V bunkách s aeróbnym metabolizmom dochádza k prirodzenému vytváraniu peroxidu vodíka. Peroxid vodíka je reaktívna forma kyslíka, ktorý by v nadbytku mohol vstupovať do oxidačných reakcií spôsobujúcich poškodenie biomolekúl vedúce k rôznym chorobným stavom. Rozklad peroxidu vodíka katalyzovaný iónmi redoxne aktívnych kovov vedie k produkcii vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu s polčasom

života 10^{-9} s. Organizmus sa preto snaží udržiavať potrebnú fyziologickú koncentráciu peroxidu vodíka aktivitou enzýmu kataláza, ktorý rozkladá peroxid vodíka na vodu a kyslík.

2. 50 cm^3 3 % vodného roztoku H_2O_2 pripravíme zriedením jeho 35% (V/V) roztoku destilovanou vodou. Pri výpočte použijeme zried'ovaciú rovnicu a vypočítame tak objem vody a 35% H_2O_2 :

$$V(35\% \text{ H}_2\text{O}_2) = 0,03 \cdot 50 \text{ cm}^3 / 0,35 = 4,3 \text{ cm}^3$$

$$\text{Množstvo vody, ktoré je potrebné na zriedenie} = 50 \text{ cm}^3 - 4,3 \text{ cm}^3 = 45,7 \text{ cm}^3$$

Na prípravu roztoku potrebujeme **$4,3 \text{ cm}^3$ 35% H_2O_2** a **$45,7 \text{ cm}^3$ destilovanej vody**.

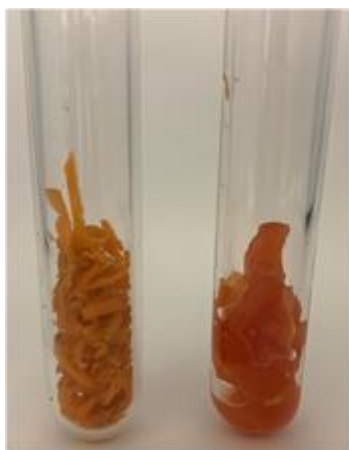
R5 VITAMÍNY

R5.1 Vitamín A – dôkazová reakcia

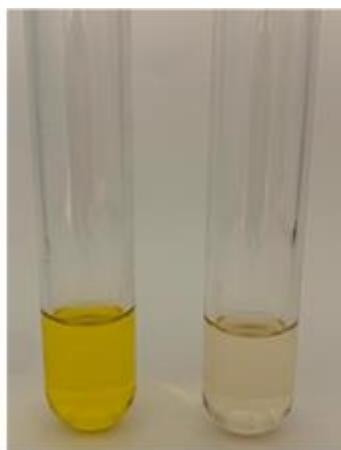
Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
mrkva	+	modrý prstenec
paradajka	+	slabomodrý prstenec

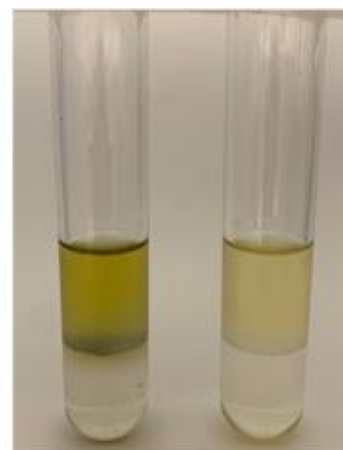
Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Mrkva a paradajka



Benzénový výluh mrkvy a paradajky



Výluh podvrstvený konc. H₂SO₄

Diskusia:

Na extrakciu provitamínu A z postrúhanej mrkvy a rozdrvenej paradajky bol použitý benzén. Po podvrstvení koncentrovanou kyselinou sírovou došlo na styčnej ploche oboch kvapalín k vzniku modrého prstenca. V našom experimente je výraznejší prstenec pozorovaný pri mrkve, slabší pri paradajke. Môžeme teda predpokladať, že väčšie množstvo tohto provitamínu sa nachádzalo v mrkve.

Kontrolné otázky:

1. Vitamín A sa nachádza v potravinách živočíšneho pôvodu, najmä v pečeni a v mliečnych výrobkoch. Prekursor vitamínu A, karotén, je prítomný v rôznych druhov ovocia a zeleniny (mrkva, marhule, špenát, paradajky a pod.).

2. Karotén tvorí 3 izoméry označované α , β , γ . Z hľadiska výživy je najvýznamnejší β -izomér.
3. Karotenoidy je názov pre dve skupiny farebných organických zlúčenín – pre karotény (červeno-oranžové farbivá) a kyslíkaté deriváty xantofyly (žlté farbivá). Sú to lipofilné látky so štruktúrou tetraterpenoidov.
4. Za farebnosť karotenoidov zodpovedajú konjugované dvojité väzby.

R5.2 Vitamín C

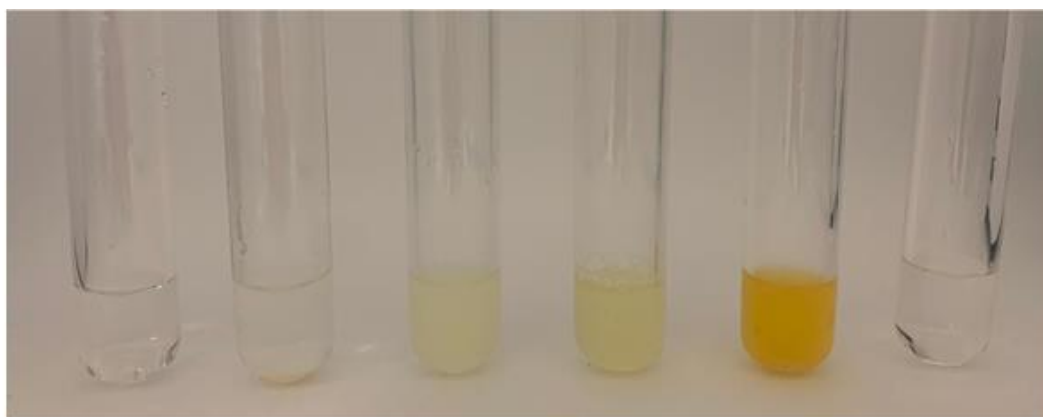
R5.2.1 Vitamín C – dôkazová reakcia

Pozorovanie:

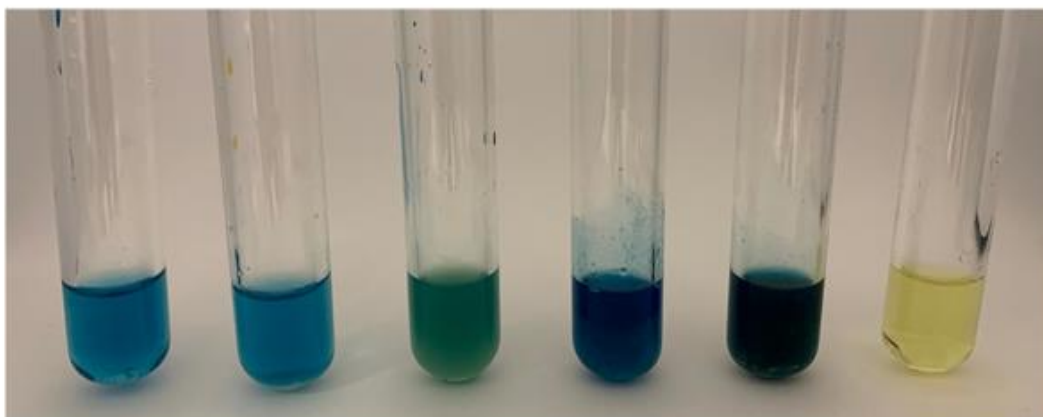
A. Dôkaz vitamínu C v tekutých vzorkách

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
kyselina askorbová	+	modré sfarbenie
celaskon	+	modré sfarbenie
citrónka	+	zeleno-modré sfarbenie
šťava z citróna	+	modré sfarbenie
šťava z mandarínky	+	modré sfarbenie
voda	-	žlté sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradi zľava: kyselina askorbová, celaskon, citrónka, šťava z citróna, šťava z mandarínky, voda



Analyzované vzorky po pridaní zmesi hexakvanoželezitanu draselného a chloridu železitého

B. Dôkaz vitamínu C v ovocí a zelenine

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
paradajka	+	hnede sfarbenie
uhorka	+	hnede sfarbenie
paprika	+	hnede sfarbenie
jablko	+	hnede sfarbenie
zeler	+	hnede sfarbenie



Vzorky bez pridaného činidla



Vzorky pokvapkané roztokom KMnO_4

Diskusia:

A. Vo vzorkách s obsahom kyseliny askorbovej, celaskonu, citrónu a šťavy z mandarínky bolo pozorované intenzívne modré sfarbenie indikujúce prítomnosť vitamínu C. Rozdielna intenzita sfarbenia je indikátorom rozdielneho množstva vitamínu C obsiahnutého vo vzorke. V prípade citrónky bolo pozorované modro-zelené sfarbenie, obsah vitamínu C je veľmi nízky. Slepá vzorka s obsahom destilovanej vody sa sfarbila na žltu vplyvom pridanej zmesi hexakvanoželeznatanu draselného a chloridu železitého.

B. V prípade všetkých vzoriek zeleniny a ovocia bola pozorovaná po prikvapnutí fialovo sfarbeného roztoku KMnO_4 zmena sfarbenia na hnedú. Manganistan draselný bol redukovaný vplyvom vitamínu C obsiahnutého vo vzorkách na oxid manganičitý.

Kontrolné otázky:

1. Kyselina askorbová (vitamín C) sa nerozpúšťa v chloroforme. Najlepšia rozpustnosť je vo vode.
2. Produkt oxidácie kyseliny askorbovej je kyselina dehydroaskorbová.

R5.2.2 Vitamín C – vplyv teploty na redukčné vlastnosti

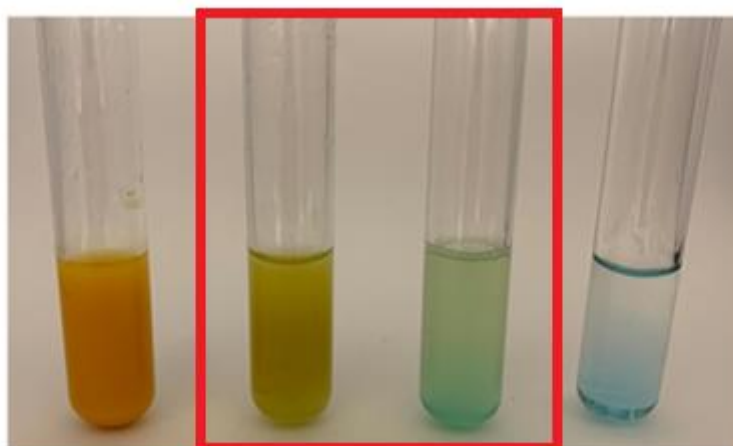
Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
kyselina askorbová	+	oranžové sfarbenie
šťava z citróna čerstvá	+	oranžovo – zelené sfarbenie
šťava z citróna prevarená	-	zelené sfarbenie
voda	-	modré sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Analyzované vzorky bez pridaného činidla v poradí zľava: kyselina askorbová, šťava z citróna čerstvá, šťava z citróna prevarená, voda



Analyzované vzorky po pridaní Fehlingovho činidla

Diskusia:

V skúmavke s roztokom kyseliny L-askorbovej je pozorovaný vznik oranžového zrátku. V tejto vzorke prítomná kyselina L-askorbová redukovala meď Cu^{2+} z Fehlingovho roztoku a vznikol oxid meďný zodpovedný za pozorované farebnú zmenu. Táto vzorka slúži ako

referenčná vzorka s kyselinou askorbovou, ukazuje, ako prebieha reakcia, ak je kyselina prítomná. Naopak, voda (posledná skúmavka) plní funkciu slepej vzorky. Je to ukážka sfarbenia, ak nie je prítomná kyselina L-askorbová. Modré sfarbenie slepej vzorky s destilovanou vodou je spôsobené prítomnosťou Fehlingovho činidla.

Pre sledovanie vplyvu teploty na obsah vitamínu C bola použitá citrónová šťava nezahrievaná (druhá skúmavka) a po zahriatí (tretia skúmavka). Po pridaní Fehlingovho činidla bolo pozorované oranžovo – zeleno/modré sfarbenie, ktoré indikuje prítomnosť vitamínu C. Pokým oranžová farba prislúcha produktu oxido-redukčnej reakcie (Cu_2O) a dokazuje prítomnosť vitamínu C, zeleno-modré sfarbenie je spôsobené prítomným Fehlingovým roztokom. Slabšia intenzita oranžového sfarbenia koreluje s nižším obsahom vitamínu C v porovnaní s pozitívnou kontrolou. Po zahriatí citrónovej šťavy (tretia skúmavka) je po pridaní Fehlingovho činidla pozorované žlto-zelené sfarbenie (kombinácia žltej citrónovej šťavy a Fehlingovho roztoku). Je zrejmé, že kyselina L-askorbová v citrónovej šťave po zahriatí stratila redukčné účinky.

Kontrolné otázky:

1. Vitamín C môže byť degradovaný kyslíkom a zásadami.
2. Vitamín C je syntetizovaný z glukózy a galaktózy cez dráhu kyseliny urónovej. Súčasťou tejto dráhy je aj enzým gulonolakton oxidáza [EC1.1.3.8], ktorý človeku a primátom chýba.
3. Vitamín C, kyselina L-askorbová, pri fyziologickom pH disociuje na askorbylový anión, ktorý vstupuje do reakcie s radikálmi za vzniku anión-radikálu.

R5.2.3 Vitamín C je kyselina - stanovenie pH

Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Sfarbenie pH papierika	Hodnota pH
kyselina askorbová	žlté	4



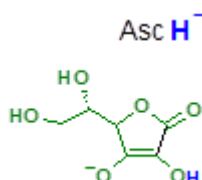
Stanovenie pH roztoku kyseliny askorbovej pH papierikom (vľavo) a digitálnym pH metrom Consort C1010 (vpravo)

Diskusia:

Indikátorový papierik bol ponorený do roztoku kyseliny askorbovej a farba papierika určená porovnaním so škálou na obale mala žlté sfarbenie, ktoré korelovalo s hodnotou pH približne 3. Meranie pH toho istého roztoku na digitálnom pH metri Consort C1010 ukázalo hodnotu pH = 2,97. Z uvedeného je zrejmé, že kým hodnota pH nameraná na digitálnom pH metri je s presnosťou v stotínach, stanovenie pH papierikom je orientačné, ale je to rýchle a jednoduché určenie pH roztoku, ktoré je v niektorých prípadoch postačujúce. Hodnoty pH potvrdzujú, že vitamín C je kyselina, $\text{pH} < 7$.

Kontrolné otázky:

1. Askorbylový anión.



2. Na stanovenie pH roztoku kyseliny L-askorbovej môžeme použiť rôzne typy indikátorov:

lakmus: kyslá červená forma – zásaditá modrá forma (oblasť pH 4,5 – 8,3)

metylová žltá: kyslá červená forma – zásaditá žltá forma (oblasť pH 2,9 – 4,0)

metylová červená: kyslá červená forma – zásaditá žltá forma (oblasť pH 4,4 – 6,3)

fenolftaleín: kyslá bezfarebná forma – zásaditá červená forma (oblasť pH 8,0 – 9,8)

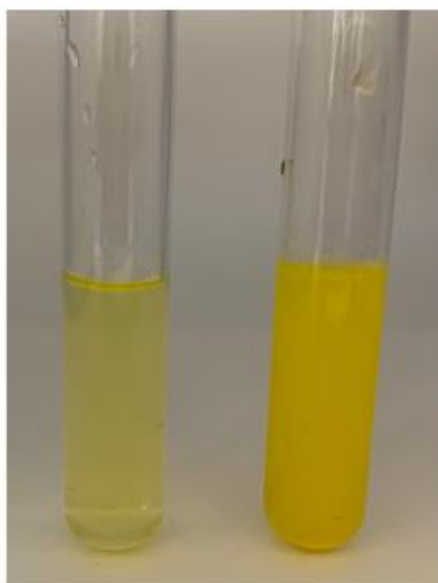
3. V domácom prostredí môžeme použiť aj indikátory pripravené z domácich surovín, napr. výluh z červenej kapusty (v kyslom prostredí sa farbí z fialova do červená), čierny čaj (z tmavohnedej farby prechádza na žltú) a pod.

R5.3 Vitamín B2 – dôkazová reakcia

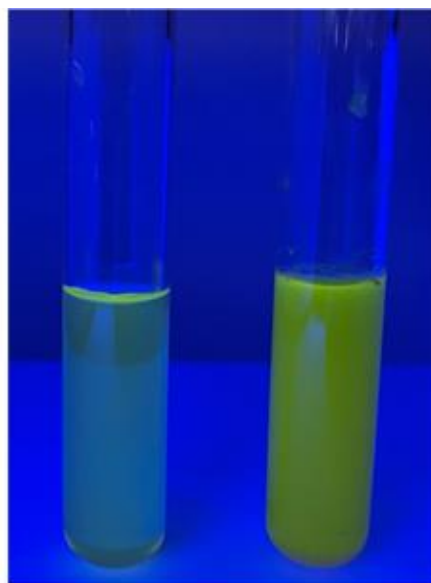
Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
vanilkový puding	+	fluoreskovanie
Riboflavín	+	fluoreskovanie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



Roztok vanilkového pudingu a riboflavínu



Roztok vanilkového pudingu a riboflavínu
vystavené UV svetlu

Diskusia:

Obe vzorky po vystavení UV žiareniu fluoreskovali, čím bola potvrdená prítomnosť riboflavínu v testovaných vzorkách. Riboflavín sa v potravinárstve využíva ako farbivo, preto je ho možné nájsť v mnohých produktoch, napríklad vo vanilkovom pudingu, ktorý bol použitý v experimente.

Kontrolné otázky:

1. Riboflavín je súčasťou koenzýmov FMN a FAD, ktoré sú súčasťou flavoproteínov.
2. Riboflavín vykazuje fluorescenciu v dôsledku π -konjugácie a rezonancie isoalloxazínu.

R6 NUKLEOVÉ KYSELINY

R6.1 Izolácia DNA z ovocia

Pozorovanie:

Po dodržaní všetkých krokov došlo k vyražaniu DNA vo forme veľmi dobre viditeľných bielych vatovitých chumáčov. Množstvo izolovanej nukleovej kyseliny bolo dostatočné, aby sa DNA dala ľahko namotať na drevenú špajdľu.

Mechanickým rozdrvením jahôd došlo k dostatočnému rozrušeniu bunkovej steny ovocia a v prítomnosti saponátu došlo k lýze buniek. Pridaná čerstvá ananásová šťava s obsahom bromelaínu umožnila uvoľnenie a degradáciu histónových proteínov, čím sa dosiahol určitý stupeň prečistenia DNA dostatočný pre účely tohto experimentu. Oddelením väčších (hustejších) častí sme získali ovocnú šťavu, vodnú fázu, v ktorej je prítomná DNA. Opatrným pridaním ľadovo vychladeného etanolu došlo k precipitácii molekúl DNA.



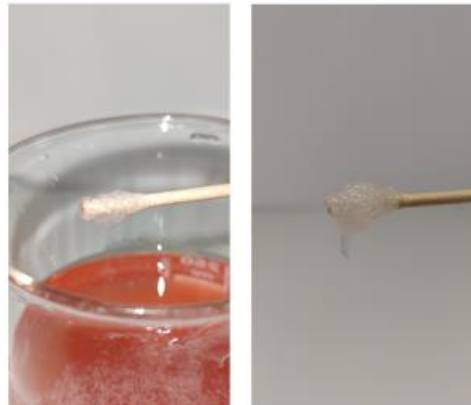
Rozdrvené jahody po pridaní ananásovej šťavy a státi



Ovocná šťava získaná precedením cez gázu



Ovocná šťava podvrstvená ľadovo vychladeným etanolom



Biele chumáče izolovanej DNA

Kontrolné otázky:

1. Endopeptidázy štiepia peptidové väzby vo vnútri polypeptidového reťazca (z lat. *endo* – vo vnútri).
2. Bromelaín je považovaný za cenný pre jeho neuveriteľné fytomedicínske účinky. Bromelaín vykazuje antibiotické, protizápalové, protirakovinové, antitrombotické, antikoagulačné a antiedematózne vlastnosti. Okrem toho je bromelaín sľubným pooperačným prostriedkom, ktorý znižuje pooperačné nepohodlie, opuchy a podporuje hojenie rán.
3. Na odstránenie DNA zo zmesi s RNA je vhodný enzým DNáza. Komerčne sa používa pankreatická DNáza.

R6.2 Izolácia RNA z droždia

Pozorovanie:

Po aplikácii jednotlivých krokov izolácie bola získaná zrazenina molekuly RNA. Jednotlivé reagensie umožnili uvoľnenie RNA z kvasinkových buniek a jej následné vyzrážanie.



Homogenát pekárenského droždia s pridaným dietyléterom a NaOH



Centrifugovaný homogenát



Izolovaná RNA (pellet)

Výpočty a kontrolné otázky:

1. Na prípravu 25 cm³ 0,5 %-ného vodného roztoku NaOH za predpokladu, že hustota roztoku bude jednotková, použijeme vzťah:

$$w(\text{NaOH}) = m(\text{NaOH})/m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = w(\text{NaOH}) \cdot m(\text{roztoku})$$

$$m(\text{NaOH}) = 0,005 \cdot 25 \text{ g} = 0,125 \text{ g}$$

Na prípravu 25 cm³ 0,5 % vodného roztoku NaOH je potrebné navážiť **0,125 g NaOH**. Toto množstvo rozpustíme v malom objeme vody a do výsledného objemu 25 cm³ doplníme destilovanou vodou.

2. Pekárske droždie je hmota zložená z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Sú to jednobunkové eukaryotické mikroorganizmy, ktoré sa vo vhodnom prostredí rýchle množia. Sú vhodné na izoláciu RNA, pretože pomer RNA/DNA je v týchto mikroorganizmoch najvyšší.

R6.3 Dôkaz zložiek DNA a RNA

Pozorovanie:

Analyzovaná vzorka	Reakcia (+/-)	Pozorovaná zmena
DNA	+	modré sfarbenie
RNA	+	zelené sfarbenie

Pozn.: (+) – pozitívna reakcia, (-) – negatívna reakcia



DNA s difenylaminom



DNA s difenylaminom po zahrievaní vo vodnom kúpeli



RNA s difenylaminom



RNA s difenylaminom po zahrievaní vo vodnom kúpeli

Diskusia:

Do skúmaviek s obsahom DNA a RNA bol pridaný roztok NaOH, ktorý slúžil na rozpustenie testovaných nukleových kyselín. Molekula DNA má vo svojej štruktúre sacharid 2-deoxyribózu. Z 2-deoxyribózy v kyslom prostredí dehydratáciou vzniká furfural, ktorý reakciou s difenylamínom poskytuje modro sfarbený produkt.

Molekula RNA obsahujúca ribózu reagovala v kyslom prostredí s difenylamínom za vzniku zeleného sfarbenia. Odlišné sfarbenie spôsobuje prítomný furfural, ktorý vzniká dehydratáciou ribózy.

Kontrolné otázky:

1. V DNA sú nukleotidy spájané 3' - 5' - fosfodiesterovou väzbou.
2. Donorom vodíka je malá ditiolová bielkovina tioredoxín.

III PODMIENKY PRÁCE V LABORATÓRIU

A Príprava študenta na laboratórne cvičenie

1. Študent je povinný **pripraviť sa na každé laboratórne cvičenie**. Pred cvičením si naštuduje teoretický úvod, návod k laboratórnemu cvičeniu a princípy realizovaných úloh.
2. Pred vstupom do laboratória je každý študent povinný poznať **laboratórny poriadok** a dôsledne ho dodržiavať. Študent ovláda bezpečnosť práce s chemikáliami, s ktorými bude pracovať a princípy prvej pomoci v prípade úrazu.
3. Základnou podmienkou pre udelenie hodnotenia je absolvovanie všetkých predpísaných laboratórnych cvičení.

Nepripravenosť študenta, neznalosť a nedodržiavanie laboratórneho poriadku oprávňuje učiteľa vylúčiť študenta z laboratórneho cvičenia.

B Bezpečnosť práce

Práca v chemickom laboratóriu má svoje špecifiká, preto každá osoba musí v laboratóriu dodržiavať bezpečnostné predpisy, aby chránila zdravie seba a ostatných prítomných.

1. **Vstup do laboratória** je povolený iba v prítomnosti vyučujúceho v zapnutom pracovnom plášti.
2. V laboratóriu je zakázané jesť, piť a fajčiť.
3. Každý študent má svoje **pracovné miesto**, zodpovedá za jeho poriadok a čistotu a za používané prístroje a pomôcky. Nesúlad zoznamu pomôcok v pracovnom stole s reálnym stavom hlási hneď na začiatku vyučujúcemu, ako aj prípadné poškodenie pomôcok vzniknuté pri vlastnej práci.
4. Pri práci v laboratóriu sa študent riadi **pokynmi vyučujúceho**, venuje sa len svojím úlohám a neruší ostatných. Bez vedomia vyučujúceho nemení pracovné postupy a používané chemikálie, nemanipuluje s inými prístrojmi, elektrickými a plynovými rozvodmi.
5. Pri práci s koncentrovanými kyselinami, zásadami a niektorými organickými rozpúšťadlami sa používajú **ochranné rukavice** a **ochranné štíty**.

6. Všetky práce s prchavými a dymiacimi látkami je potrebné uskutočňovať **v zapnutom digestore.**
7. Pipetovanie ústami je zakázané.
8. **Kahan** nesmie horieť bez dozoru. S kahanom a predmetmi po zahrievaní je potrebné pracovať opatrne.
9. **Horľaviny** je zakázané ohrievať kahanom alebo na variči.
10. V prípade, že dôjde k rozliatiu / rozsypaniu / úniku akejkoľvek chemikálie, alebo vzplanutiu materiálu, prípadne inej neočakávanej reakcii, je študent povinný urobiť opatrenia, aby zabránil škodám na zdraví, majetku a životnom prostredí a okamžite informuje vyučujúceho:
 - a) pri **rozliatí horľaviny** je nutné okamžite zhasnúť kahan, zabezpečiť dôkladné vetranie a odstrániť horľavinu vsiaknutím do vhodného materiálu,
 - b) **rozliate kyseliny a zásady** sa ihneď riedia vodou a spláchnu sa veľkým množstvom vody alebo sa odstránia vsiaknutím do vhodného materiálu,
 - c) ostatné rozliate alebo rozsypané chemikálie sa likvidujú podľa pokynov vyučujúceho, ak nie je určené inak,
 - d) **rozbité sklo** a odpad s ostrými hranami musí byť umiestnený do určených nádob.
11. V prípade **úrazu**, je potrebné okamžite poskytnúť prvú pomoc a informovať vyučujúceho.
12. Je nutné rešpektovať **bezpečnostné štítky a piktogramy** na prístrojoch, pomôckach a chemikáliách.
13. **Po ukončení práce** študent umyje sklo a používané pomôcky uloží na určené miesto.
14. **Opustiť pracovné miesto** môže študent iba so súhlasom vyučujúceho po kontrole pracovného miesta.

C Prvá pomoc v laboratóriu

Zasiahnutie očí chemikáliou

Ak vnikne do očí akákoľvek chemikália alebo biologický materiál, je nutné okamžite oko vypláchnuť pomocou očnej sprchy alebo prúdom vody. Ak má postihnutý nasadené kontaktné šošovky, treba ich čo najskôr vybrať. Ďalší postup určí vyučujúci. Pri prvej pomoci sa nepoužívajú žiadne neutralizačné roztoky, ani očné kvapky.

Poleptanie pokožky

Najskôr je potrebné odstrániť zasiahnutý odev. Poleptané miesta je ihneď nutné dlhodobo oplachovať prúdom vody. V prípade ťažšieho poleptania zaistí ďalšie ošetrovanie vyučujúci.

Popálenia

Postihnuté miesto je potrebné ihneď ochladiť studenou vodou. Na popálenú plochu sa neaplikujú žiadne masti, ani lieky. Ďalší ošetrovanie zaistí vyučujúci.

Otvorené poranenia

Najprv je potrebné zastaviť krvácanie. Drobné rany (porezanie sklom) umyjeme prúdom vody. Cudzie telesá, napr. úlomky skla sa z rany pri prvej pomoci nevyberajú. Ďalšie ošetrovanie vrátane dezinfekcie a sterilného krytia zabezpečí vyučujúci. Ďalší postup určuje vyučujúci.

Inhalácia škodlivých látok

Postihnutého je nutné premiestniť na čerstvý vzduch a uvoľniť odev. Ak postihnutý nedýcha, je potrebné zahájiť umelé dýchanie, prípadne resuscitáciu.

Požitie škodlivých látok

Je nutné okamžite informovať vyučujúceho, ktorý zaistí ošetrovanie.

D Nebezpečné látky v laboratóriu

Nebezpečné chemikálie v originálnych baleniach sú označované výstražnými symbolmi, tzv. signálnymi slovami a údajmi o nebezpečnosti podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemikálií (GHS). Pokiaľ to prevádzkové a technické podmienky umožňujú, môže byť rovnaké označenie, prípadne jeho zjednodušený variant použitý aj v študentskom laboratóriu.









Označenie chemikálie podľa GHS obsahuje:

1. Výstražný symbol (pozri nižšie),
2. Výstražné slovo „**nebezpečenstvo**“ (pri vyššom riziku) alebo „**varovanie**“ (pri nižšom riziku)
3. Výstražné upozornenia (tzv. **H-vety**), ktoré obsahujú viac podrobností o nebezpečenstve,
4. Pokyny pre bezpečné zaobchádzanie (bezpečnostné upozornenia), ktoré uvádzajú ako s látkou bezpečne manipulovať.

V praxi sa používa celkom deväť výstražných symbolov. V nasledujúcej tabuľke je uvedený ich zjednodušený opis pre potreby praktických cvičení:

	<p>GHS01 - Výbušné látky - samovoľne reagujúce látky organických peroxidov, ktoré môžu pri zahriatí spôsobiť výbuch</p>
	<p>GHS02 - Horľavé látky - sú to látky, ktoré možno ľahko zapáliť, môžu vzplanúť pri ohreve alebo pri samovoľnej reakcii. Taktiež látky a zmesi, ktoré sa môžu samovoľne zahrievať, môžu sa vznietiť pri styku so vzduchom, alebo uvoľňujú horľavé plyny pri reakcii s inými látkami</p>
	<p>GHS03 - Oxidujúce látky – samé o sebe nie sú horľavé, ale môžu reagovať predovšetkým s horľavými látkami a spôsobiť požiar, výbuch alebo môžu požiar zosilniť.</p>
	<p>GHS04 - Plyny pod tlakom - pri zahriatí môže vybuchnúť</p> <ul style="list-style-type: none"> - obsahuje schladený plyn, môže spôsobiť kryogénne popáleniny alebo poranenia - rozpustené plyny
	<p>GHS05 - Korozívne a žieravé látky - môžu spôsobiť vážne poleptanie pokožky, poškodenie očí</p>
	<p>GHS06 - Toxické látky - pri požití, vdýchnutí či styku s pokožkou môžu spôsobiť akútne poškodenie zdravia alebo smrť.</p>
	<p>GHS07 - Dráždivé látky - látky spôsobujúce podráždenie pokožky, očí, dýchacích ciest; omamné látky a látky, ktoré majú iné škodlivé účinky na zdravie. Rovnakým symbolom sa označujú tiež látky poškodzujúce ozónovú vrstvu.</p>
	<p>GHS08 - Látky nebezpečné pre zdravie - látky karcinogénne, poškodzujúce plod v tele matky alebo spôsobujúce mutácie. Taktiež látky, ktoré môžu poškodiť určitý orgán alebo vyvolávajú alergie, astmu alebo ochorenie dýchacích ciest.</p>
	<p>GHS09 - Látky nebezpečné pre životné prostredie - patria sem najmä látky poškodzujúce vodné ekosystémy a životné prostredie</p>

E Nebezpečné látky v laboratóriu pri vybraných experimentoch

LÁTKA	RIZIKOVÉ VETY	PIKTOGRAMY
<i>Acetón</i>	<p>Veľmi horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty</p>	
<i>Alfa-naftol</i>	<p>Škodlivý po požití Toxický pri kontakte s pokožkou Dráždi kožu Spôsobuje vážne poškodenie očí Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest</p>	
<i>Amoniak</i>	<p>Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Veľmi toxický pre vodné organizmy</p>	
<i>Benzén</i>	<p>Veľmi horľavá kvapalina a pary Môže byť smrteľný po požití a vniknutí do dýchacích ciest. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Môže spôsobovať genetické poškodenie. Môže spôsobiť rakovinu. Spôsobuje poškodenie orgánov pri dlhšej alebo opakovanej expozícii</p>	
<i>Dietyléter</i>	<p>Škodlivý po požití, môže spôsobiť ospalosť alebo závraty. Horľavina.</p>	
<i>Difenylamín</i>	<p>Toxický po požití. Toxický pri kontakte s pokožkou. Toxický pri vdýchnutí. Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhšej alebo opakovanej expozícii. Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.</p>	
<i>Dusičnan strieborný</i>	<p>Môže prispieť k rozvoju požiaru; oxidačné činidlo. Môže byť korozívna pre kovy. Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.</p>	
<i>Etanol</i>	<p>Veľmi horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne podráždenie očí.</p>	

Fenolftaleín	<p>Podozrenie, že spôsobuje genetické poškodenie. Môže spôsobiť rakovinu. Podozrenie, že spôsobuje poškodenie plodnosti alebo nenarodeného dieťaťa.</p>	
Hexakvanoželezitan draselný	<p>Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami</p>	
Hydrogensíran draselný	<p>Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest</p>	
Hydroxid draselný	<p>Môže byť korozívna pre kovy Škodlivý po požití Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí</p>	
Hydroxid sodný	<p>Spôsobuje vážne poleptania kože a poškodenie očí. Môže byť korozívna pre kovy.</p>	
Chlorid kademnatý	<p>Spôsobuje vážne podráždenie očí.</p>	
Chlorid železitý	<p>Môže byť korozívna pre kovy. Škodlivý po požití. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne poškodenie očí.</p>	
Chloroform	<p>Škodlivý po požití. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Toxický pri vdýchnutí. Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty. Podozrenie, že spôsobuje rakovinu. Podozrenie z poškodzovania nenarodeného dieťaťa. Spôsobuje poškodenie orgánov (Pečeň, Obličky) pri dlhšej alebo opakovanej expozícii. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.</p>	
Jód	<p>Škodlivý pri kontakte s pokožkou. Škodlivý pri vdýchnutí. Veľmi toxický pre vodné organizmy.</p>	
Kyselina dusičná	<p>Môže prispieť k rozvoju požiaru; oxidačné činidlo. Môže byť korozívna pre kovy. Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Toxický pri vdýchnutí.</p>	

<i>Kyselina chlorovodíková</i>	Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.	
<i>Kyselina octová</i>	Horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí.	
<i>Kyselina sírová</i>	Môže byť korozívna pre kovy. Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí.	
<i>Kyselina sulfosalicylová</i>	Škodlivý po požití. Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí.	
<i>Manganistan draselný</i>	Môže prispieť k rozvoju požiaru; oxidačné činidlo. Škodlivý po požití. Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.	
<i>Ninhydrín</i>	Škodlivý po požití. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.	
<i>Octan olovnatý</i>	Môže poškodiť nenarodené dieťa. Podozrenie z poškodzovania plodnosti. Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhšej alebo opakovanej expozícii. Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.	
<i>Peroxid vodíka</i>	Škodlivý po požití. Dráždi pokožku. Spôsobuje vážne poškodenie očí. Škodlivý pri vdýchnutí. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest	
<i>Rezorcinol</i>	Škodlivý po požití. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Veľmi toxický pre vodné organizmy.	
<i>Síran meďnatý pentahydrát</i>	Škodlivý po požití. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.	

LITERATÚRA

Bauerfeind, P. – Garner, R. – Dunn, B. E. – Mobley, H. L. 1997. *Synthesis and activity of Helicobacter pylori urease and catalase at low pH*. In *Gut*, vol. 40, no. 1, p. 25 – 30, doi: 0.1136/gut.40.1.25

Das, B. K. – Al-Amin, M. M. - Russel, S. M. - Kabir, S. - Bhattacharjee, R. – Hannan, J. M. A. 2014. *Phytochemical Screening and Evaluation of Analgesic Activity of Oroxyllum indicum*. In *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76, no. 6, p. 571 -575.

Fančovičová, J. 2017. *Návody na praktické cvičenia z biológie človeka pre učiteľské kombinácie s biológiou*. Trnava: Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Katedra biológie. 116 s. ISBN: 978-80-568-0048-5.

Gala, L. – Lawson, M. - Jomova, K. - Zelenicky, L. - Congradyova, A. - Mazur, M. – Valko, M. 2014. *EPR Spectroscopy of a Clinically Active (1:2) Copper(II)- Histidine Complex Used in the Treatment of Menkes Disease: A Fourier Transform Analysis of a Fluid CW-EPR Spectrum*. In *Molecules*, vol. 19, no. 1, p. 980 – 91, doi:10.3390/molecules180x0000x

Gonen, A. - Miller, Y. I. 2020. *From Inert Storage to Biological Activity - In Search of Identity for Oxidized Cholesteryl Esters*. In *Frontiers in Endocrinology*, vol.11, doi: 10.3389/fendo.2020.602252

Havrlentová, M. – Gregusová, V. – Chmelová, D. 2021. *Laboratórne cvičenia z biológie II*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, Katedra biotechnológií, 117 s. ISBN 978-80-572-0186-1.

Hegedüsová, A. - Jomová, K. - Hegedüs, O. 1995. *Cvičenia z vybraných kapitol biochémie*. Nitra: Vysoká škola pedagogická. 67s. ISBN 80-88738-50-4.

Hegedüsová, A. - Musilová, J. - Jomová, K. - Hegedüs, O. – Bystrická, J. 2007. *Laboratórne experimenty z organickej chémie a biochémie pre špecializáciu Chémia životného prostredia. 1. vyd.* Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 103 s. ISBN 978-80-8094-211-3.

Hendry G. A. F. 1993. *Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal*. In *New Phytologist*. vol. 123, p. 3–14, DOI 10.1111/j.1469-8137.1993.tb04525.x

Kaushik, G.G. - Sharma, N. - Dabeer, S. - Jindal, R. 2020. *Practical manual of biochemistry*. New Delhi: CBS Publishers Distributors Pvt Ltd, 138 p. ISBN: 978-93-89396-30-0.

Kim, H. U. 2020. *Lipid Metabolism in Plants*. In *Plants* (Basel), vol. 9, no. 7, p. 871, doi: 10.3390/plants9070871

Lee, S. – Choi, Y. – Jeong, H. S. – Lee, J. – Sung, J. 2018. *Effect of different cooking methods on the content of vitamins and true retention in selected vegetables*. In *Food Science and Biotechnologies*, vol. 27, no. 2, p. 333 – 342, doi: 10.1007/s10068-017-0281-1

Mateer, J. G. - Marshall, E. K. 1916. *The Urease Content Of Certain Beans, With Special Reference To The Jack Bean*. In *Journal of Biological Chemistry*, vol. 25, no. 2., p. 297 – 305.

Pipíška, M. 2021. *Návody na laboratórne cvičenia z biochémie pre učiteľské kombinácie s chémiou*. Trnava: Trnavská univerzita v Trnave, Pedagogická fakulta, 70 s. ISBN 978-80-568-0229-8.

Rao, S. B. – Deshpande, V. 2005. *Experimental biochemistry. A student companion*. New Delhi: Department of Biochemistry, University College of Science, Osmania University, Hyderabad, 302 p. ISBN 81-88237-41-8.

Sedlák, E. - Varhač, R. – Danko, P. – Paulíková, H. – Podhradský, D. 2020. *Praktické cvičenia z biochémie*. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, 153 s. ISBN 978-80-8152-902-3 (e-publikácia).

Stupák, M. – Mašlanková, J. – Urban, P. - Bilecová-Rabajdová, M. - Guzy, J. – Mareková, M. 2012. *Lekárska chémia. Návody a protokoly na praktické cvičenia*. Košice: Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED, a. s., Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, 169 s. ISBN 978-80-7097-973-0.

Suhaj, M. – Kováč, M. 2001. *Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín 4. Jedlé tuky a oleje*. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 40, č. 4., s. 249–267.

Van den Ende, W. – Michiels, A. - De Roover, J. - Van Laere, A. 2002. *Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development*. In *Scientific World Journal*, vol. 2, p. 1273–1287, doi:10.1100/tsw.2002.288

Názov: LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOCHÉMIE
Podnázov: Protokoly a riešenia pre študentov rozširujúceho štúdia učiteľstva chémie

Autori: Lenka Hudecová, Marián Valko, Klaudia Jomová

Vydavateľ: Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre
Edícia: Prírodovedec č. 816
Návrh obálky: Klaudia Jomová, Mgr. Karin Koóšová
Technická spolupráca: Ing. Sylvia Kolenčíková, Mgr. et Mgr. art Zuzana Branišová, ArtD.
Formát: A4
Rok vydania: 2023
Miesto vydania: Nitra
Počet strán: 184
Počet kusov: 100

ISBN 978-80-558-2038-5

