J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a



BIOCHEMIE
(Cvičení)

Ing. Jiří ŠPIČKA, CSc.

České Budějovice

1996

JIHOČESKÁ UNIVERZITA ČESKÉ BUDĚJOVICE

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

BIOCHEMIE

(Cvičení)

Ing. Jiří Špička, CSc.

1996

Recenzent: Ing. Ludmila STAZSKOVÁ, CSc.
Česká zemědělská univerzita
Praha

© Jiří Špička, 1996

ISBN 80-7040-181-8

Obsah

I. Úvod **3**

II. Zásady bezpečné práce v laboratoři **4**
1. Laboratorní pracovní řád 4
2. Základní pravidla první pomoci 5
3. Pokyny pro hašení požáru 5

III.Chemie přírodních látek **6**
1. Sacharidy 6
1.1 Chemické reakce sacharidů 6
1.1.1 Fehlingova reakce 6
1.1.2 Tollensova reakce 6
1.1.3 Barfoedova reakce 7
1.1.4 Reakce Selivanovova a Weehuizenova 7
1.1.5 Reakce s močovinou 8
1.1.6 Molischova reakce 8
1.1.7 Hydrolýza sacharosy 9
1.1.8 Hydrolýza škrobu 9
1.2 Stanovení sacharidů 10
1.2.1 Vážkové stanovení redukujících sacharidů 10
1.2.2 Fotometrické stanovení sacharidů podle Nelsona 11
1.2.3 Fotometrické stanovení fruktosy resorcinolem 12
1.2.4 Stanovení redukujících cukrů podle Luffa-Schoorla 13
1.2.5 Stanovení sacharidů plynovou chromatografií 14
2. Aminokyseliny a bílkoviny 17
2.1 Chemické reakce aminokyselin a bílkovin 17
2.1.1 Xanthoproteinová reakce 17
2.1.2 Biuretová reakce 17
2.1.3 Ninhydrinová reakce 17
2.1.4 Dělení a identifikace aminokyselin papírovou chromatografií 18
2.1.5 Srážecí reakce bílkovin 19
2.1.6 Stanovení isoelektrického bodu bílkovin 20
2.2 Stanovení bílkovin 20
2.2.1 Fotometrické stanovení bílkovin biuretovou reakcí 20
2.2.2 Stanovení bílkovin formolovou titrací 21
3. Lipidy 22
3.1 Chemické reakce lipidů 22
3.1.1 Příprava sodného mýdla a jeho hydrolýza vodou 22
3.1.2 Stanovení čísla kyselosti 23
3.1.3. Stanovení čísla zmýdelnění 24
3.1.4 Stanovení jodového čísla podle Hanuše 25
3.1.5 Stanovení peroxidového čísla 26

3.1.6 Dělení lipidů adsorpční chromatografií na tenké vrstvě 27
3.2 Stanovení lipidů 28
3.2.1 Stanovení tuků přímou extrakcí 28
3.2.2 Stanovení vyšších mastných kyselin plynovou chromatografií 29
3.2.3 Fotometrické stanovení celkových lipidů 31
3.2.4 Fotometrické stanovení cholesterolu 32
4. Další přírodní látky 33
4.1 Důkaz a izolace některých přírodních látek 33
4.1.1 Chromatografické dělení rostlinných barviv na tenké vrstvě 33
4.1.2 Důkaz solaninu 33
4.1.3 Izolace nikotinu z tabáku 34
4.1.4 Identifikace přírodních látek 35
4.2 Stanovení některých přírodních látek 35
4.2.1 Stanovení β–karotenu v rostlinném materiálu. 35
4.2.2 Stanovení kyseliny pyrohroznové. 37

IV. Enzymy **38**
5. Stanovení aktivity enzymů 38
5.1 Stanovení aktivity askorbátoxidásy v rostlinném materiálu 38
5.2 Stanovení aktivity katalasy v rostlinném materiálu 39
5.3 Stanovení aktivity lipasy v semenech olejnin 40
5.4 Stanovení aktivity ATPasy 42
6. Vliv některých parametrů na rychlost enzymových reakcí. 43
6.1 Vliv koncentrace α– amylasy na rychlost štěpení škrobu. 43
6.2 Stanovení optimálního pH α– amylasy. 44
6.3 Stanovení teplotního optoma α– amylasy. 45
6.4 Štěpení bílkovin trypsinem. 46
6.5 Stanovení K_m konstanty ureasy. 47

V. Příprava činidel. **50**

I. Úvod

Učební text „Cvičení z biochemie“ je určen posluchačům několika studijních oborů zemědělské a pedagogické fakulty. Výběr laboratorních prací je zásadně ovlivněn zejména značnými rozdíly v pojetí předmětu i hodinovou dotací pro jednotlivé obory. Významnou roli sehrávají i rozdíly v obsahu chemických předmětů, zejména organické chemie, na které biochemie navazuje.

Pracovní návody jsou rozděleny na dvě základní oblasti. První tvoří chemie přírodních látek nebo, podle staršího označení, tzv. statická biochemie. Většina prací z této oblasti je určena pro posluchače pedagogické fakulty. Posluchači zemědělské fakulty zde naleznou řadu návodů, se kterými se setkali již ve cvičeních z organické chemie. Této částečné duplicitě se však nelze z praktických důvodů vyhnout.

Do druhé oblasti jsou zahrnuty práce z enzymologie, která je opět podle staršího označení součástí dynamické biochemie. Tato část je již určena pro posluchače obou fakult.

Výběr jednotlivých návodů byl jednoznačně určen jednak časem, který je pro cvičení vyhražen, a dále i dostupným technickým vybavením laboratoří.

Za technickou pomoc při přípravě textu děkuji Ing. T. Pelikánové, J. Pudivítrové a O. Dobré a v neposlední řadě recenzentovi Ing. Ludmile Stazskové, CSc. za cenné připomínky a náměty.

V Č. Budějovicích 1996

Autor

II. Zásady bezpečné práce v laboratoři

1. Laboratorní pracovní řád

Laboratorní pracovní řád, který se řadou svých ustanovení dotýká i bezpečnosti práce, je vyvěšen v každé laboratoři. Je závazný pro výuku na katedře chemie. Z tohoto pracovního řádu se k bezpečnosti práce vztahují především tato ustanovení:

- V laboratořích se nesmí kouřit, jíst a pít. Zásadně nesmíte používat chemické nádobí k pití.
- Během cvičení musí zůstat volné únikové cesty, proto odkládejte svrchní oděv a tašky na vyhražená místa. Skříně na chodbách nenechávejte odemknuté.
- Do cvičení se musíte dostavit včas. Do laboratoří smíte až na pokyn vyučujícího či technika.
- V laboratoři je nutné pracovat v pracovním plášti.
- Práci nesmíte zahájit dříve, dokud vám není zcela jasný postup. V případě nejasnosti se poraďte s vyučujícím.
- V laboratořích smíte provádět pouze práce uložené vyučujícím. Z laboratoří nesmíte nic odnášet.
- Všímejte si kahanů, zda správně hoří. Nenechávejte je hořet zbytečně a bez dozoru.
- Je zakázáno pipetovat koncentrované kyseliny, louhy a jedy. Při přelévání větších množství používejte gumové rukavice.
- Látky, při jejichž rozpouštění se uvolňuje teplo, rozpouštějte po částech a za stálého míchání a chlazení. Podle této zásady zřeďujte zejména minerální kyseliny.
- Práce s plyny a operace, při nichž vznikají obtížné nebo škodlivé páry, provádějte vždy v digestoři.
- Při práci, kdy by mohl být ohrožen zrak, použijte ochranného štítu.
- S hořlavinami nepracujte v blízkosti ohně. Používejte jen nezbytná množství. Zásobní lahve ihned zavřete.
- Při zahřívání organických kapalin k varu používejte varných kamínků, abyste zabránili utajenému varu. Obsah zkumavek zahřívejte rovnoměrně. Hrdlo zkumavky držte směrem od sebe i spolupracovníků.
- Při rozlití většího množství minerálních kyselin je posypte směsí písku se sodou, teprve po neutralizaci je možné je odstranit.
- Při práci s elektrospotřebiči respektujte návod k obsluze a pokyny vyučujícího.
- Pro práci se stlačenými plyny a tlakovými lahvemi platí zvláštní předpisy, s nimiž vás v případě potřeby seznámí vyučující.
- Před odchodem z laboratoře vždy zkontrolujte, zda neuniká plyn, neteče voda a není zapnutý některý elektrický přístroj.

2. Základní pravidla první pomoci

- Popáleniny ohněm či horkými předměty co nejrychleji ochlaďte proudem vody. Neošetřujte je mastmi.
- Při zasažení pokožky silnými kyselinami ji ihned opláchněte velkým množstvím vody, postříkejte 1 % roztokem hydrogenuhličitanu sodného a po asi půl minutě znovu opláchněte vodou.
- Při zasažení pokožky louhy je postup obdobný jako u kyselin, jako neutralizační roztok se používá 1 % kyselina octová.
- Při zasažení očí žíravinami je rychle vypláchněte proudem vody (pod vodovodem či střičkou), příp. Ophtalem. Nesmíte použít neutralizační roztoky! Ihned vyhledejte lékařskou pomoc.
- Při požití kyselin či louhů ihned vyplachujte ústa vodou. Při polknutí žíraviny co nejdříve vypijte asi půl litru vody nebo mléka. Při požití louhu je výhodnější asi 1 % roztok kyseliny octové. Zvracení je třeba vyvolat drážděním hrdla co nejdříve po požití, po uplynutí 10 minut již však není vhodné.
- Každé zranění hlašte vedoucímu cvičení.

3. Pokyny pro hašení požáru

- Malý plamen se snažte sfouknout či uhasit mokrým hadrem. V blízkosti vypněte kahany.
- Vodou lze hasit ethanol a kapaliny s teplotou vzplanutí nad 65°C. Nehodí se pro hašení sodíku, draslíku, hliníku a karbidu vápníku, s nimiž reaguje za vzniku hořlavých látek a rovněž ne k hašení kapalin lehčích než voda a kapalin zahřátých nad 120°C.
- Při vzplanutí oděvu se pokuste oheň uhasit kapesníkem či asbestovou hasící rouškou.
- V případě většího požáru musí všichni, kteří se nepodílejí na hašení, opustit laboratoř.
- Pro likvidaci nebezpečí vzniku požáru v samém zárodku slouží ruční hasící přístroje. Vzhledem k nevelkému množství hasiva mají však jen omezenou dobu činnosti. Rozdělují se podle druhů náplně, která také určuje možnost a způsob použití. V laboratoři je k dispozici sněhový hasicí přístroj, plněný oxidem uhličitým.

III. Chemie přírodních látek

1. Sacharidy

1.1 Chemické reakce sacharidů

1.1.1 Fehlingova reakce

Princip:

Monosacharidy (aldosy i ketosy, nikoli však alkoholické cukry) a ty oligosacharidy, které obsahují alespoň jeden volný poloacetalový hydroxyl, mají redukční účinky, protože jsou oxidovány na aldonové kyseliny působením oxidačních činidel obsahujících kovy. Činidlo oxiduje aldehydickou skupinu aldos a vzniká aldonová kyselina. Ketosy by vlastně redukční vlastnosti mít neměly. Zřejmě však za podmínek reakce isomerizují na příslušné aldosy.

K důkazu redukčních účinků se nejčastěji používá Fehlingova činidla, jehož modré měďnaté ionty ve vinanovém komplexu jsou redukovány na červenou sraženinu oxidu měďného.

Potřeby:

- Fehlingovo činidlo
- 3 % roztoky běžných monosacharidů
- 3 - 5 % roztoky sacharosy, laktosy a maltosy

Postup:

- připravte vodní lázeň zahřátou k varu pro ohřev sady zkumavek,
- do sady zkumavek odměřte po 2 ml Fehlingova činidla,
- do jednotlivých zkumavek přidejte 2 - 3 ml zkoušených vzorků sacharidů a zkumavky vložte do lázně,
- pozorujte barevné změny a usazování oxidu měďného, rozlište použité sacharidy na redukující a neredukující.

1.1.2 Tollensova reakce

Princip:

Reakce je, podobně jako reakce Fehlingova, založena na redukčních účincích sacharidů. Ty redukují amoniakální roztok hydroxidu stříbrného (Tollensovo činidlo) na kovové stříbro. Za přítomnosti redukujících sacharidů kapalina ztmavne vyloučeným kovovým stříbrem, popř. se vyloučí stříbrné zrcátko na stěnách zkumavky.

Potřeby:

- Tollensovo činidlo
- 3 % roztoky běžných monosacharidů
- 3 - 5 % roztoky sacharosy, laktosy a maltosy

Postup:

- připravte vodní lázeň zahřátou k varu pro ohřev sady zkumavek,
- do sady zkumavek odměřte po 2 ml Tollensova činidla,
- do jednotlivých zkumavek přidejte 2 - 3 ml zkoušených vzorků sacharidů a zkumavky vložte do lázně,
- pozorujte barevné změny a vylučování stříbrného zrcátka.

1.1.3 Barfoedova reakce

Princip:

Octan měďnatý se v prostředí kyseliny octové redukuje na oxid měďný. Za podmínek reakce reagují přednostně monosacharidy, redukující disacharidy teprve po delším zahřívání. Citlivost reakce lze zvýšit, redukuje-li se vzniklým oxidem měďným arsenomolybdenová kyselina (Nelsonovo činidlo) na molybdenovou modř.

Potřeby:

- Barfoedovo činidlo
- Nelsonovo činidlo
- 3 % roztoky běžných monosacharidů
- 3 - 5 % roztoky sacharosy, laktosy a maltosy

Postup:

- připravte vodní lázeň zahřátou k varu pro ohřev sady zkumavek,
- do zkumavek odměřte po 1 ml Barfoedova činidla,
- do jednotlivých zkumavek přidejte 1 ml zkoušených vzorků sacharidů, zkumavky vložte do lázně a zahřívejte 30 min,
- ochlaďte zkumavky ponořením do studené vody a přidejte 1 ml Nelsonova činidla,
- pozorujte barevné změny (monosacharidy dávají modré zbarvení, disacharidy žlutozelené).

1.1.4 Reakce Selivanovova a Weehuizenova

Princip:

Reakce je založena na vzniku červeného zbarvení, které dává 5–hydroxymethylfural s resorcinolem a kyselinou chlorovodíkovou. Deriváty furalu vznikají dehydratací sacharidů působením minerálních kyselin. Provádí-li se reakce za daných podmínek, rozkládají se ketosy mnohem snadněji než aldosy, takže reakce se stává specifickou pro ketosy.

Potřeby:

- 30 % kyselina chlorovodíková
- resorcinol
- 3 % roztoky běžných monosacharidů
- 3 - 5 % roztoky sacharosy, laktosy a maltosy

Postup:

- připravte vodní lázeň zahřátou k varu pro ohřev sady zkumavek,
- do zkumavek odměřte po 2 ml HCl, přidejte 1 ml zkoušených vzorků sacharidů a několik krystalků resorcinolu,
- zkumavky vložte do lázně a zahřívejte. Za přítomnosti ketos vznikne třešňově červené zbarvení.

1.1.5 Reakce s močovinou

Princip:

Reakce je založena na vzniku barevných produktů, které vznikají kondenzací močoviny s deriváty furalu vznikajícími dehydratací sacharidů působením minerálních kyselin.

Potřeby:

- močovina
- koncentrovaná HCl
- 1 % roztoky glukosy, fruktosy a ribosy

Postup:

- připravte vodní lázeň zahřátou k varu pro ohřev sady zkumavek,
- do zkumavek odvažte 0,5 g močoviny, přidejte 5 - 6 kapek koncentrované HCl a 2 - 3 kapky roztoku sacharidů,
- směs opatrně promíchejte, až se močovina rozpustí,
- zkumavky zahřívejte na vroucí vodní lázni,
- po asi 15 minutách dává fruktosa zelenomodré zbarvení. Aldohexosy poskytují zbarvení červené nebo purpurové, aldopentosy zbarvení žluté. Modrý reakční produkt ketohexos je rozpustný v ethanolu a zalkalizováním se jeho zbarvení mění na červené.

1.1.6 Molischova reakce

Princip:

Sacharidy, polysacharidy a glykosidy dávájí s konc. kyselinou sírovou a α–naftolem intenzivní fialové zbarvení, které je pravděpodobně způsobeno vznikem di–α–naftohydroxyfurylmethanu, který se oxiduje na příslušné trifenylmethanové barvivo.

Potřeby:

- 10 % roztok α–naftolu v ethanolu
- koncentrovaná kyselina sírová
- 1 % roztoky mono– di– a polysacharidů

Postup:

- do zkumavek odměřte po 2 ml roztoku sacharidu, přidejte 5 kapek roztoku α– naftolu a promíchejte,
- roztoky ve zkumavkách opatrně po skle podvrstvěte 1 ml kyseliny sírové.
- za přítomnosti sacharidu vznikne na rozhraní obou vrstev ihned (nebo u polysacharidů po chvíli) červenofialový až modrofialový prstenec. Zamícháním se zbarví kapalina tmavofialově, zředěním vodou se vyloučí modrofialová sraženina rozpustná v etheru na žlutý roztok.

Poznámka:

Reakci dává fural i jeho deriváty a proto také všechny látky, z nichž fural za podmínek reakce vzniká. Není tudíž specifická pro sacharidy, ale negativní výsledek svědčí o jejich nepřítomnosti.

1.1.7 Hydrolýza sacharosy

Princip:

Působením minerálních kyselin dochází k hydrolýze oligosacharidů na jednotlivé monosacharidy. Neredukující sacharosa se štěpí na ekvimolekulární směs D–glukosy a D–fruktosy. Roztok má proto po hydrolýze redukční účinky. Hydrolýzou dojde zároveň ke změně směru optické otáčivosti (inverzi). Pochodu se proto říká inverze sacharosy a vznikající směsi invertní cukr či invert.

Potřeby:

- 1 % roztok sacharosy
- Fehlingovo činidlo
- 10 % roztok HCl
- 5 % roztok NaOH

Postup:

- do dvou zkumavek odměřte po 2 ml roztoku sacharosy. Do jedné zkumavky přidejte 1 ml 10 % HCl,
- obě zkumavky zahřívejte k varu na vodní lázni po dobu 5 - 7 minut,
- obsah zkumavky s přídavkem HCl zneutralizujte roztokem hydroxidu sodného (nesmíte však vytvořit příliš zásadité prostředí),
- u obou zkumavek proveďte důkaz redukčních účinků Fehlingovou zkouškou podle práce 1.1.1.

1.1.8 Hydrolýza škrobu

Princip:

Kyselou hydrolýzou působením kyseliny chlorovodíkové (při pH 2,0 - 2,5) se škrob postupně štěpí na dextriny (vyšší maltosacharidy), maltosu až glukosu. Dextriny o různé velikosti molekul lze rozlišit podle barevných reakcí s jodem. Maltosu a glukosu, jejichž obsah v hydrolyzátu postupně vzrůstá, je možné dokázat na základě jejich redukčních účinků.

Potřeby:

- 1 % škrobový maz
- 10 % roztok HCl
- 10 % roztok Na_2CO_3
- Lugolův roztok
- Fehlingovo činidlo

Postup:

- v Erlenmeyerově baňce objemu 100 ml smíchejte 15 ml škrobového mazu a 2 ml 10 % HCl a zahřívejte na vodní lázni,
- z horkého roztoku odpipetujte opatrně každých 5 minut 1 ml do zkumavky, přidejte 5 ml vody a přikápněte takové množství roztoku Na_2CO_3, dokud se vyvíjí oxid uhličitý. Pak přikápněte 2 - 3 kapky Lugolova roztoku a pozorujte zbarvení,

- současně si připravte jako srovnávací roztok (slepý pokus) 6 ml vody se 2 - 3 kapkami Lugolova roztoku a přídavkem takového množství roztoku Na_2CO_3, jaké jste použili pro neutralizaci vzorku,
- hydrolýza trvá 30 - 40 minut a je ukončena, když přidávaný Lugolův roztok vyvolá zbarvení stejné jako u srovnávacího roztoku. Po této době převažují v hydrolyzátu glukosa a maltosa, které dokažte Fehlingovou zkouškou (podle práce 1.1.1.).

Poznámka:

Pokud přidáte nadměrné množství Na_2CO_3, dojde v zásaditém prostředí k disproporcionaci jodu na jodid a jodnan, které jsou bezbarvé. Tím se ztratí značná část jodu pro reakci s dextriny. Škála barevných změn je pak zkreslena.

1.2 Stanovení sacharidů

1.2.1 Vážkové stanovení redukujících sacharidů

Princip:

Redukující sacharidy se oxidují působením Fehlingova činidla a redukují přitom měďnaté ionty na oxid měďný. Při této reakci je přímá úměrnost mezi obsahem redukujících sacharidů a množstvím vyloučeného oxidu měďného. Stanovení je však typicky usanční metodou (výsledek je ovlivněn řadou faktorů) a je proto nutné dodržet předepsaný pracovní postup.

Potřeby:

- maximálně 0,5 % roztoky redukujících sacharidů
- Fehlingovo činidlo
- ethanol 96 % denatur.
- konc. HNO_3

Postup:

- do Erlenmeyerovy baňky objemu 250 - 300 ml odpipetujte podle tabulky předepsaná množství Fehlingova roztoku, promíchejte, přikryjte přiměřeně velkou nálevkou a uveďte do varu,
- pipetou pak přidejte předepsané množství čirého roztoku sacharidu a povařte určenou dobu. Po ukončení varu zřeďte obsah baňky stejným objemem studené destilované vody,
- obsah zfiltrujte přes skleněný filtr P3 (S4) zvážený s analytickou přesností. Během filtrace musí být vrstva oxidu měďného stále pod hladinou tekutiny. Zbytky oxidu ulpělé na stěnách baňky kvantitativně splachujte vroucí vodou do filtru. Oxid měďný ještě promyjte ethanolem,
- skleněný filtr usušte v sušárně při 105°C. Po vychladnutí jej zvažte s analytickou přesností.

Poznámka:

Při čistění skleněného filtru se mechanicky odstraní většina oxidu měďného a zbytek se odstraní promytím konc. kyselinou dusičnou a poté horkou vodou na odsávačce.

Vyhodnocení:

Výsledek se zjišťuje z rozsáhlých přepočítávacích tabulek, které není možné z prostorových důvodů uvést. Pro výpočet koncentrace sacharidů použijte následujícího zjednodušeného vzorce:

$$redukující\ sacharidy = \frac{k \cdot a \cdot 100}{V}\ g/100\ ml$$

kde:

a .... množství vyredukovaného oxidu měďného /g/
V .... objem použitého vzorku /ml/
k .... přepočítávací faktor: pro glukosu a invert = 0,5
pro maltosu = 0,8
pro laktosu = 0,65

Tabulka: Podmínky pro stanovení redukujících sacharidů

Druh sacharidu	Množství Fehl.rozt. /ml/	Množství roztoku sacharidu /ml/	Doba varu (po uvedení do varu) /min/
Glukosa	60	25 (= max. 250 mg)	2
Invert	50	50 (= max. 245 mg)	2
Maltosa	50	25 (= max. 250 mg)	4
Laktosa	50	50 (= max. 250 mg)	6

1.2.2 Fotometrické stanovení sacharidů podle Nelsona

Princip:

Glukosa redukuje alkalický roztok měďnaté soli na oxid měďný. K roztoku se přidá kyselina arsenomolybdenová, kterou oxid měďný redukuje za vzniku modře zabarvené sloučeniny pětimocného molybdenu. Intenzita modrého zabarvení je úměrná koncentraci glukosy a stanoví se fotometricky.

Potřeby:

- Somogyiho činidlo
- Nelsonovo činidlo (kyselina arsenomolybdenová)
- glukosa
- mořský písek

Postup:

- odvažte 0,5 g čerstvého rostlinného materiálu (hlávkové zelí nebo jiný vhodný materiál) a rozetřete v třecí misce s malou lžičkou mořského písku,
- homogenizovaný materiál kvantitativně převeďte do 250 ml varné baňky (k převedení použijte postupně maximálně 50 ml vody),
- směs v baňce povařte 2 min. a pak 20 min. zahřívejte na vroucí vodní lázni,
- obsah baňky zfiltrujte přes buničinu do 500 ml odměrné baňky a zbytek na filtru promyjte 2x 50 ml horké vody,
- obsah odměrné baňky ochlaďte a doplňte po rysku. Tento roztok použijete jako extrakt sacharidů,
- připravte zásobní roztok glukosy rozpuštěním 110 mg monohydrátu glukosy ve 100 ml odměrné baňce (koncentrace glukosy v tomto roztoku je 1 mg/ml),
- připravte kalibrační roztoky glukosy o koncentracích 1, 3, 5, 8 a 10 mg/100 ml (do 100 ml odměrných baněk pipetujte 1, 3, 5, 8 a 10 ml zásobního roztoku, doplňte po rysku a promíchejte),
- připravte si celkem 8 kalibrovaných zkumavek na 25 ml,

- do jednotlivých očíslovaných zkumavek pipetujte postupně:

  č.1 - 1 ml vody (slepý pokus)

  č.2 až 6 - 1 ml kalibračních roztoků 1 až 10 mg/100ml

  č.7 a 8 - 1 ml extraktu sacharidů,
- do všech zkumavek přidejte po 1 ml Somogyiho činidla, promíchejte a zahřívejte 20 minut na vroucí vodní lázni,
- zkumavky ochlaďte, přidejte po 1 ml kyseliny arsenomolybdenové, promíchejte, doplňte na 20 ml destilovanou vodou a znovu promíchejte,
- změřte absorbanci jednotlivých roztoků proti slepému pokusu při 660 nm.

Vyhodnocení:

- sestrojte kalibrační graf vynesením změřených absorbancí kalibračních roztoků proti jejich koncentraci,
- z grafu odečtěte koncentraci sacharidů (vyjádřených jako glukosa) v extraktu,
- ze dvou opakování (zkumavky č.7 a 8) vypočítejte průměr,
- vypočítejte obsah sacharidů v původním rostlinném materiálu podle vzorce

$$w = \frac{x \cdot 5}{n} \quad [mg/g]$$

kde:

x....koncentrace sacharidů v extraktu (mg/100ml)

n....navážka vzorku (g)

1.2.3 Fotometrické stanovení fruktosy resorcinolem

Princip:

Reakce je založena na vzniku červeného zbarvení, které dává 5-hydroxymethylfural s resorcinolem a kyselinou chlorovodíkovou. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci fruktosy. Deriváty furalu vznikají dehydratací sacharidů působením minerálních kyselin. Provádí-li se reakce za daných podmínek, rozkládají se ketosy mnohem snadněji než aldosy, takže reakce se stává specifickou pro ketosy.

Potřeby:

- akoholický roztok resorcinolu (1 g resorcinolu se rozpustí v 1 l 0,5 % etanolu)
- 30 % HCl
- fruktosa

Postup:

- připravte zásobní roztok fruktosy rozpuštěním 100 mg fruktosy ve 100 ml odměrné baňce (koncentrace fruktosy v tomto roztoku je 1 mg/ml),
- připravte kalibrační roztoky fruktosy o koncentracích 1, 3, 5, 8 a 10 mg/100ml (do 100 ml odměrných baněk pipetujte 1, 3, 5, 8 a 10 ml zásobního roztoku, doplňte po rysku a promíchejte),
- připravte si celkem 8 kalibrovaných zkumavek na 25 ml,

- do jednotlivých očíslovaných zkumavek pipetujte postupně:

  č.1 - 1 ml vody (slepý pokus)

  č.2 až 6 - 1 ml kalibračních roztoků 1 až 10 mg/100ml

  č.7 a 8 - 1 ml extraktu sacharidů,

- do všech zkumavek přidejte po 5 ml roztoku rezorcinolu a 10 ml 30 % HCl, promíchejte a zahřívejte 20 minut na vodní lázni při 80°C,
- zkumavky ochlaďte a změřte absorbanci jednotlivých roztoků proti slepému pokusu při 520 nm.

Vyhodnocení:

- sestrojte kalibrační graf vynesením změřených absorbancí kalibračních roztoků proti jejich koncentraci,
- z grafu odečtěte koncentraci fruktosy ve vzorku,
- ze dvou opakování (zkumavky č.7 a 8) vypočítejte průměr.

1.2.4 Stanovení redukujících cukrů podle Luffa-Schoorla

Princip:

Redukujícími cukry se zredukuje dvojmocná měď Fehlingova činidla na oxid měďný. Okyselením kyselinou sírovou se z komplexu uvolní nadbytek měďnaté soli, která se redukuje jodidovými ionty na sůl měďnou. Reakcí této soli s nadbytečným jodidem draselným vzniká ihned těžce rozpustný jodid měďný. Elementární jod, který se při reakci uvolní, se stanoví roztokem thiosíranu sodného.

Potřeby:

- Fehlingovo činidlo
- 0,1 M roztok $Na_2S_2O_3$
- KI
- 10 % H_2SO_4
- 1 % roztok škrobu
- vzorek sacharidu (max.90mg/25ml)

Postup:

- do Erlenmayerovy baňky obsahu 250 ml pipetujte 20 ml Fehlingova roztoku,
- do titrační baňky pipetujte 25 ml vzorku sacharidů,
- obsah baňky zahřejte na azbestové síťce k varu a vařte 2 minuty,
- baňku ochlaďte pod tekoucí vodou, k ochlazené kapalině přidejte roztok 3 g jodidu draselného v 10 ml vody a 10 ml zředěné kyseliny sírové,
- titrujte 0,1 M roztokem thiosíranu sodného do slabě hnědožlutého zbarvení,
- pak přidejte několik kapek roztoku škrobu a pomalu dotitrujte, až zmizí modré zbarvení a zbývá nažloutle bílá barva jodidu měďného, která se několik minut nemění,
- za stejných podmínek se provede slepý pokus (místo vzorku sacharidů použijte 25 ml vody).

Vyhodnocení:

- z rozdílu obou titrací odečtěte z tabulky množství sacharidu (množství pro desetiny ml se odvodí interpolací mezi dvěma sousedními hodnotami).

Tabulka: Stanovení sacharidů podle Luffa-Schoorla.

Spotřeba thiosíranu (ml)	Glukosa (mg)	Laktosa (mg)	Maltosa (mg)
1	2,4	3,6	3,9
2	4,8	7,3	7,8
3	7,2	11,0	11,7
4	9,7	14,7	15,6
5	12,2	18,4	19,6
6	14,7	22,1	23,5
7	17,2	25,8	27,5
8	19,8	29,5	31,5
9	22,4	33,2	35,5
10	25,0	37,0	39,5
11	27,6	40,8	43,5
12	30,3	44,6	47,5
13	33,0	48,2	51,6
14	35,7	52,2	55,7
15	38,5	56,0	59,8
16	41,3	59,9	63,9
17	44,2	63,8	68,0
18	47,1	67,7	72,2
19	50,0	71,7	75,5
20	53,0	75,7	80,9
21	56,0	79,8	85,4
22	59,1	83,9	90,0
23	62,2	88,0	94,6

1.2.5 Stanovení sacharidů plynovou chromatografií

Princip:

Hlavní podíl mono– a disacharidů v rostlinném materiálu tvoří glukosa, fruktosa a sacharosa. Tyto sacharidy se po extrakci převedou na těkavé trimetylsilyletery a stanoví plynovou chromatografií.

Potřeby:

–mořský písek
– ethanol
– roztok fenyl–β–D–glukopyranosidu (2,5 mg/ml v dimethylformamidu)
– hexamethyldisilazan
– kyselina trifluoroctová
– n–heptan

Postup:

A) Příprava extraktu a kalibračních roztoků

- 5 g vzorku čerstvého rostlinného materiálu rozetřete v třecí misce s malou lžičkou písku a 5 ml ethanolu,

- homogenizovaný vzorek kvantitativně převeďte pomocí 80 ml ethanolu do 250 ml varné baňky a vařte jednu hodinu na vodní lázni pod zpětným chladičem,
- extrakt zfiltrujte do 100 ml odměrné baňky a zbytek na filtru promyjte ethanolem tak, aby byla baňka právě doplněna na 100ml,
- - připravte směsné kalibrační roztoky sacharidů v ethanolu o koncentraci 20, 40, 60 a 80 mg každého sacharidu (fruktosa, glukosa a sacharosa) na 100 ml.

B) Derivatizace sacharidů

- 10 ml roztoku sacharidů (extrakt nebo kalibrační roztoky) pipetujte do 50 ml zábrusové baňky a odpařte při 60°C na rotačním vakuovém odpařovači do sucha,
- odparek rozpusťte v 1ml dimetylformamidu, který obsahuje 2,5 mg fenyl–β–D–glukopyranosidu (vnitřní standard),
- ke vzorku v baňce přidejte 2 ml hexametyldisilazanu, 0,2 ml kyseliny trifluoroctové, uzavřete skleněnou zátkou, intenzivně protřepte a nechte 15 min. při laboratorní teplotě,
- do baňky přidejte 2 ml n–heptanu, uzavřete a intenzivně třepejte 1 min. **(zátku je nutno přidržovat!)**,
- po protřepání a rozdělení fází použijte horní heptanovou vrstvu (extrakt silylderivátů sacharidů) k nástřiku do chromatografu.

C) Chromatografické stanovení

- nastavení plynového chromatografu:

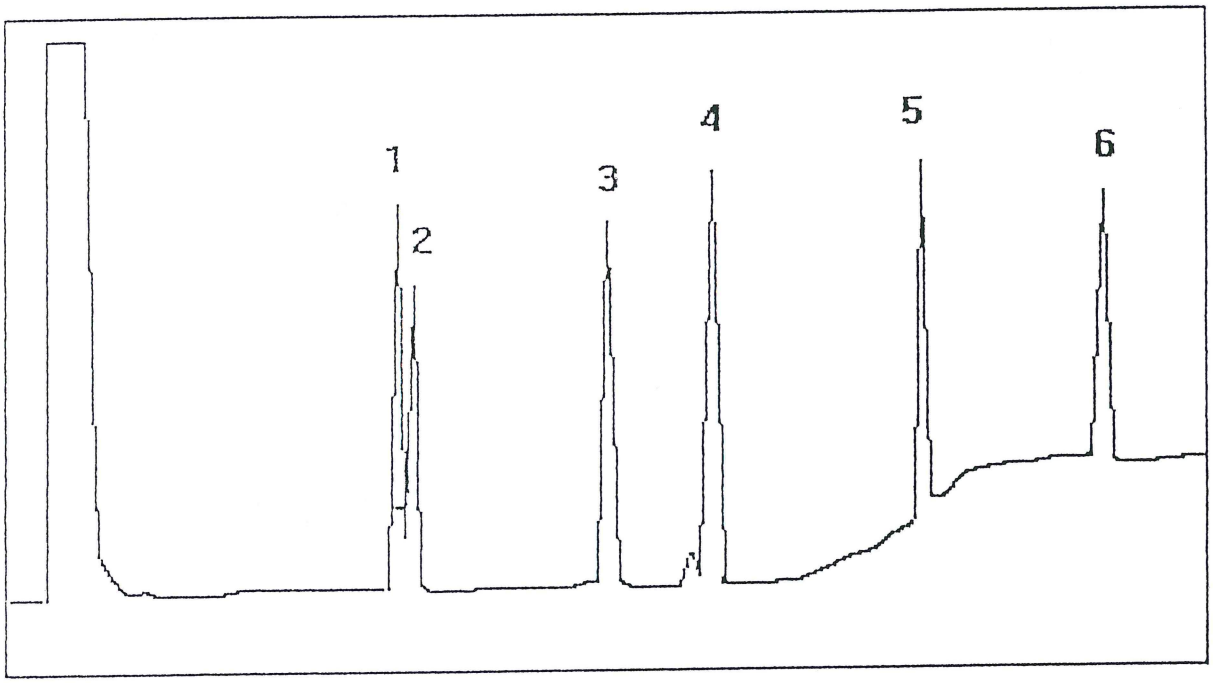
kolona:	skleněná 2500 mm/3 mm
náplň kolony:	3 % OV 210 Chromaton N-Super 0,16-0,20 mm
detektor:	FID
vodík:	30 ml/min.
vzduch:	500 ml/min.
nosný plyn:	dusík, 30 ml/min.
teploty:	
nástřik:	220°C
detektor:	250°C
kolona:	teplotní gradient
	150 - 195°C / 5°C/min.
	195 - 240°C / 20°C/min
	240°C / 4min.
nástřik:	3μl

- na chromatografu analyzujte postupně standardní roztoky a extrakt sacharidů. Příklad chromatogramu je na obrázku.

Vyhodnocení chromatogramů:

- změřte výšky píků 1 - 6,
- sečtěte výšky píků 1 + 2 (fruktosa) a 3 + 4 (glukosa), pík 5 je vnitřní standard a 6 sacharosa,
- získané hodnoty pro jednotlivé sacharidy (1 + 2, 3 + 4, 6) podělte výškou píku 5. Tím získáte relativní výšky píků pro jednotlivé sacharidy,
- sestrojte kalibrační graf vynesením relativních výšek píků proti koncentraci v kalibračních roztocích,
- z grafu odečtěte koncentraci sacharidů v extraktu a přepočítejte na navážku rostlinného materiálu.

Obr. Chromatogram sacharidů



2. Aminokyseliny a bílkoviny

2.1 Chemické reakce aminokyselin a bílkovin

2.1.1 Xanthoproteinová reakce

Princip:

Působením koncentrované kyseliny dusičné za tepla dojde k nitraci benzenového jádra aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a indolové skupiny tryptofanu. Vznikající nitrosloučeniny jsou žlutě až oranžově zbarvené. Aromatické aminokyseliny jsou v bílkovinách běžně zastoupeny, takže touto reakcí je možné dokázat většinu bílkovin.

Potřeby:

- vzorky bílkovin
- konc. HNO_3
- 20 % roztok NaOH

Postup:

- ke 2 ml zkoušeného roztoku bílkoviny přidejte ve zkumavce několik kapek koncentrované kyseliny dusičné. Obsah zkumavky promíchejte a zahřejte,
- po ochlazení směs zalkalizujte přebytkem 20 % roztoku NaOH. Pozorujte změny zbarvení.

2.1.2 Biuretová reakce

Princip:

Peptidová vazba ($-CO-NH-$) bílkovin a peptidů, ale rovněž biuret ($H_2N-CO-NH-CO-NH_2$) vznikající tavením močoviny, vytvářejí s měďnatými ionty v alkalickém prostředí fialově zbarvené komplexní sloučeniny. Této tzv. biuretové reakce lze využít jak k důkazu, tak ke stanovení bílkovin (viz práci 2.2.1).

Potřeby:

-vzorky bílkovin
- 0,1 % roztok $CuSO_4$
- 10 % roztok NaOH

Postup:

- do zkumavky odměřte 2 ml roztoku bílkoviny, přidejte 2 ml 10 % roztoku NaOH a jednu či dvě kapky roztoku modré skalice a protřepejte. Zaznamenejte zbarvení.

2.1.3 Ninhydrinová reakce

Princip:

Reakci dávají aminokyseliny, případně i peptidy a bílkoviny s volnou aminoskupinou a volným karboxylem. Reakce probíhá ve třech stupních. Ninhydrin dehydrogenuje nejprve aminokyselinu na iminokyselinu a sám se přitom redukuje na příslušný alkohol. Iminokyselina se pak rozkládá za vzniku oxidu uhličitého, amoniaku a příslušného aldehydu. Ve třetím stupni se kondenzuje nadbytečný ninhydrin se svojí redukovanou formou a s amoniakem zpravidla za vzniku modré či fialové sloučeniny.

Prolin a hydroxyprolin reagují s ninhydrinem za vzniku žlutého až oranžového kondenzačního produktu, v němž je jedna molekula aminokyseliny vázána se dvěma molekulami ninhydrinu.

Potřeby:

- 0,1 % roztok ninhydrinu v n–butanolu
- 1 % roztoky aminokyselin

Postup:

- na filtrační papír naneste kapku roztoku aminokyseliny a vysušte,
- pomocí rozprašovače postříkejte filtrační papír roztokem ninhydrinu a vložte do sušárny vyhřáté na 105°C. Po chvíli vznikne modrá až fialová skvrna.

2.1.4 Dělení a identifikace aminokyselin papírovou chromatografií

Princip:

Aminokyseliny lze dělit podle jejich rozpustnosti ve vodě a v organickém rozpouštědle. Jako nosiče zakotvené fáze se používá filtračního papíru specifických vlastností. Ten je ponořen do rozpouštědla (mobilní fáze), které se kapilárními silami nasává a jednotlivé aminokyseliny s sebou částečně odnáší. Dochází k rozdělení aminokyselin mezi fází zakotvenou a fází mobilní. V mobilní fázi dobře rozpustné aminokyseliny jsou odnášeny daleko, méně rozpustné do kratší vzdálenosti. Polohu, kterou zaujímá po rozdělení každá aminokyselina, charakterizuje rozdělovací koeficient R_f:

$$R_f = \frac{dráha\ středu\ skvrny}{dráha\ čela\ rozpouštědla}$$

Hodnota $R_f$je za naprosto stejných podmínek pro každou aminokyselinu konstantní. Protože dodržení stejných podmínek je dosti nesnadné, chromatografují se nejčastěji s neznámou směsí souběžně i směsi známé - tzv. standardy. Porovnáním rozdělovacích koeficientů standardů a rozdělovacích koeficientů neznámých látek můžeme pak určit složení směsi.

Potřeby:

- směs n–butanol, kyselina octová, voda (4:1:1)
- 1 % roztoky aminokyselin (standardy)
- 0,1 % roztok ninhydrinu v butanolu

Postup:

- připravte pruh chromatografického papíru asi 8 cm široký a dlouhý tak, aby po zavěšení do chromatografické vany dosahoval druhým koncem na dno vany,
- asi 3 cm od dolního okraje udělejte obyčejou tužkou čáru, která označuje tzv. start. Na startovní čáře si označte ve stejné vzdálenosti tužkou body, kam budete nanášet standardy aminokyselin a vzorek,
- do předem označených bodů naneste mikropipetou směs standardů aminokyselin a neznámý vzorek. Nanášení standardů i vzorku proveďte 2 - 3krát za sebou vždy do stejného místa a po každém nanesení nechte papír vyschnout, aby vzniklé skvrny byly co nejmenší,
- do chromatografické vany nalijte směs rozpouštědel asi do výše 2 cm,
- do vany zavěste připravený suchý chromatografický papír a to tak, aby čára startu byla asi 1 cm nad hladinou rozpouštědla,
- vanu uzavřete a nechte v klidu,
- po nasátí rozpouštědla do výše asi 10 - 15 cm nad startovní čáru vyjměte papír, tužkou označte čelo rozpouštědla a papír sušte v sušárně při teplotě 105°C asi 10 - 15 minut,

- pomocí rozprašovače postříkejte část papíru mezi startem a čelem roztokem ninhydrinu a papír pak opět vložte do sušárny na 5 minut. V této době proběhne reakce mezi aminokyselinami a ninhydrinem a na papíře se objeví fialové skvrny.

Vyhodnocení:

- změřte vzdálenost středu skvrn od startu a čela od startu a vypočtěte rozdělovací koeficient R_f. Porovnáním R_f standardních aminokyselin s R_f vzorku aminokyselin určete výskyt aminokyselin ve vzorku.

2.1.5 Srážecí reakce bílkovin

Princip:

Bílkoviny jako velké molekuly vytvářejí nepravé, tedy koloidní roztoky - soli. Vlivem řady faktorů se srážejí a přecházejí v gely. Srážení může být buď reverzibilní (vratné), či ireverzibilní (nevratné).

Při vratném srážení nenastávají v uspořádání molekuly bílkoviny podstatnější změny. Nejde o srážení v pravém slova smyslu, protože vysráženou bílkovinu lze znovu rozpustit v původním rozpouštědle, aniž by ztratila nativní (přirozený) charakter. Do této skupiny patří vysolování bílkovin některými solemi, nebo převedení v gel ethanolem či acetonem za šetrných podmínek.

Při srážení nevratném jde již o tak hluboký zásah do struktury bílkoviny, že se po vysráží nemůže rozpouštět v původním rozpouštědle. Bílkoviny ztrácejí nativní charakter, jsou denaturovány. Sem patří zejména srážení teplem, kyselinami, solemi těžkých kovů, třísloviny a některými specifickými činidly.

Potřeby:

- vzorky rozpuštěných bílkovin
- 10 % roztok octanu olovnatého
- nasycený roztok $(NH_4)_2SO_4$
- 20 % roztok octové kyseliny
- ethanol 96 % denatur.
- taninový roztok (7 g taninu, 5 ml konc. octové kyseliny a 10 g NaCl se rozpustí ve 100 ml vody)

Postup:

- do sady sedmi zkumavek odměřte po 2 ml zkoušeného roztoku bílkoviny a do jednotlivých zkumavek přidejte:

  a) 2 ml octanu olovnatého,
  b) 2 ml nasyceného roztoku síranu amonného. Vysrážejí se pouze globuliny, ostatní bílkoviny zůstanou v roztoku,
  c) octovou kyselinu po kapkách až do dosažení isoelektrického bodu bílkoviny a jejího vysrážení,
  d) 2 ml ethanolu a promíchejte,
  e) okyselte vzorek několika kapkami octové kyseliny, pak přidejte 2 ml ethanolu a promíchejte,
  f) 1 ml taninového roztoku,
  g) zahřejte roztok bílkoviny k varu.

  Výsledky pro několik vzorků bílkovin uspořádejte do tabulky. Rychlost a intenzitu srážení vyjádřete jednoduchou stupnicí (např. 0 až 3, nebo počtem křížků).

2.1.6 Stanovení isoelektrického bodu bílkovin

Princip:

Bílkoviny mají amfoterní charakter. Pro každou bílkovinu je charakteristická určitá hodnota pH, při níž je její molekula elektroneutrální - tzv. isoelektrický bod (IB). Pro většinu bílkovin se IB pohybuje v intervalu pH 4 až 7. V IB je bílkovina nejméně stabilní v roztoku, nejméně rozpustná a často se vysráží.

Potřeby:

- 0,1 M roztok octanu sodného
- roztoky octové kyseliny:
  a) 0,1 M
  b) 1,0 M
- 1 % roztok potravinářské želatiny
- ethanol denatur.

Postup:

- označte si sadu zkumavek 1 až 6 a pipetujte do nich podle rozpisu:

Číslo zkumavky	Roztok CH_3COONa (ml)	Roztok CH_3COOH 0,1 M (ml)	Roztok CH_3COOH 1,0 M (ml)	Destil. voda (ml)	pH roztoku
1	2	0,25	0	3,75	5,6
2	2	0,50	0	3,50	5,3
3	2	1,0	0	3,0	5,0
4	2	2,0	0	2,0	4,7
5	2	4,0	0	0	4,4
6	2	0	0,8	3,2	4,1

- do každé zkumavky přidejte po 2 ml 1 % roztoku želatiny a obsah dobře protřepejte,
- za protřepávání přidejte do každé ze zkumavek po 7 ml ethanolu, porovnávejte vznikající zákal,
- zkumavky ponechte stát 30 minut a intenzitu zákalu zaznamenejte (např. 0 = žádný až +++ = maximální). Ve zkumavce s největším zákalem je želatina ve svém IB.

2.2 Stanovení bílkovin

2.2.1 Fotometrické stanovení bílkovin biuretovou reakcí

Princip:

Intenzita zbarvení vznikajícího biuretovou reakcí (viz práce 2.1.2.) je úměrná koncentraci bílkoviny a změří se fotometricky.

Potřeby:

- vzorky bílkovin (např. želatina, hovězí albumin či vaječný bílek)
- biuretové činidlo
- standardní roztoky bílkovin (10 mg/ml)

Postup:

- do kalibrované zkumavky objemu 20 ml odpipetujte 1 ml vzorku roztoku bílkoviny. Vzorek má obsahovat asi 2 - 6 mg bílkoviny, při vyšším obsahu je třeba jej vhodně zředit,
- současně připravte sérii zředěných standardních roztoků bílkoviny stejného druhu jako je vzorek pro sestrojení kalibrační křivky. Do sady pěti kalibrovaných zkumavek pipetujte postupně 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 a 0,8 ml standardního roztoku bílkovin a doplňte vodou na celkový objem 1 ml,
- do všech zkumavek přidejte po 5 ml biuretového činidla, dobře promíchejte a ponechte 30 minut stát,
- pak zkumavky doplňte vodou na objem 10 ml a promíchejte,
- změřte absorbanci vzorku a zředěných standardních roztoků při 546 nm proti roztoku ze zkumavky, do níž jste nepipetovali žádnou bílkovinu (slepý pokus).

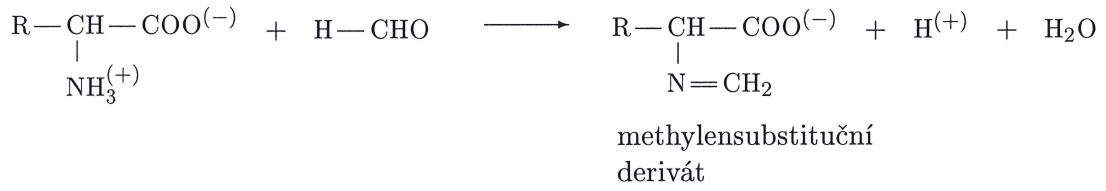
Vyhodnocení:

- naměřených absorbancí standardních roztoků, obsahujících 2 - 4 - 6 a 8 mg bílkoviny v ml, sestrojte kalibrační křivku. Z ní odečtěte koncentraci bílkoviny ve vzorku.

2.2.2 Stanovení bílkovin formolovou titrací

Princip:

Volné aminoskupiny bílkovin (tzn. ty, které nejsou vázány v peptidových vazbách) reagují s formaldehydem za vzniku methylensubstitučních derivátů. Tím jsou v bílkovině zablokovány zásadité aminoskupiny, z nichž se uvolní vodíkové kationty, které lze ztitrovat louhem:



Za určitých podmínek je spotřeba louhu ekvivalentní obsahu volných aminoskupin. Ten je pro každou konkrétní bílkovinu stálý, takže z výsledků titrace lze vypočítat obsah bílkovin. Tento analytický postup se označuje jako formolová titrace (formol je jedno z označení pro roztok formaldehydu).

Stanovení má vždy dva kroky. V prvém se při titraci zneutralizují volné karboxyly v bílkovinách a zároveň další kyseliny přítomné ve vzorku, jde tedy o stanovení kyselosti. Ve druhém kroku se po přidání formaldehydu a jeho reakci s volnými aminoskupinami stanovují nepřímo bílkoviny.

Potřeby:

- vzorky mléka
- 0,25 M roztok NaOH o známém titru
- 1 % ethanolový roztok fenolftaleinu
- 30 % roztok formaldehydu (zneutralizovaný na fenolftalein do slabě růžového zbarvení)

Postup:

- do titrační baňky odpipetujte 50 ml mléka, přidejte asi 5 kapek roztoku fenolftaleinu a titrujte proti bílému podkladu odměrným roztokem NaOH do trvalého slabě růžového zbarvení (spotřeba s1),

- pak přidejte válečkem 5 ml 30 % zneutralizovaného roztoku formaldehydu, promíchejte a ponechte dvě minuty stát. Titrujte opět do slabě růžového zbarvení (spotřeba s2).

Vyhodnocení:

- podle vzorce vypočítejte obsah bílkovin (jeden ml odměrného roztoku NaOH odpovídá 0,0758 g dusíku bílkovin. Celkový obsah bílkovin se získá násobením celkového obsahu dusíku přepočítávacím faktorem 6,38 (v mléčné bílkovině je 15,67 % dusíku, odtud 100 : 15,67 = 6,38)).

$$obsah\ bílkovin\ = \frac{s2 \cdot x \cdot 0,0758 \cdot 6,38 \cdot 400}{V}\ \ g/100\ ml$$

kde:

s2 .... spotřeba roztoku NaOH při druhé titraci /ml/

x .... titr odměrného roztoku NaOH

V .... objem titrovaného mléka /ml/

Poznámka:

Spotřeba s1 slouží k výpočtu kyselosti. V našem případě není využita.

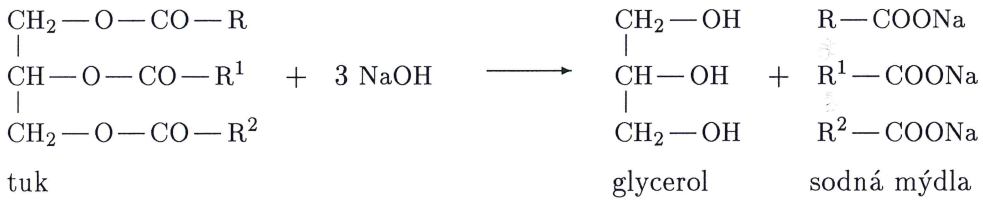
3. Lipidy

3.1 Chemické reakce lipidů

3.1.1 Příprava sodného mýdla a jeho hydrolýza vodou

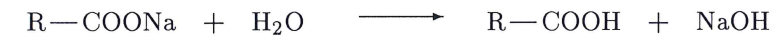
Princip:

Vařením tuků s hydroxidy vzniká glycerol a soli vyšších mastných kyselin, které se nazývají mýdla. Proto se tato zásaditá hydrolýza nazývá zmýdelňování (saponifikace). Jádrová sodná a mazlavá draselná mýdla patří mezi nejstarší prací prostředky.



tuk glycerol sodná mýdla

Působením vody mýdlo hydrolyzuje na slabé vyšší mastné kyseliny a silnou zásadu. Vzniklý roztok proto reaguje zásaditě:



Potřeby:

- 10 % roztok NaOH
- nasycený (asi 30 %) roztok NaCl
- 96 % ethanol denatur.
- Fenolftalein - 1 % alkoholový roztok

Postup:

- do kádinky odvažte na předvážkách 20 g škvařeného vepřového sádla či jiného tuku a přidejte 30 ml 10 % roztoku NaOH,
- kádinku přikryjte hodinovým sklíčkem, obsah zahřívejte k varu a klidný var udržujte po celou dobu zmýdelňování. Průběh zmýdelňování kontrolujte tak, že tyčinkou odeberte z povrchu kapaliny kapku a naneste ji na chladné sklo či na papír. Tuková skvrna svědčí o přítomnosti nezmýdelněného podílu,
- jakmile je zkouška negativní, přidejte do kádinky 20 - 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Vysolené mýdlo se oddělí v kašovité podobě na povrchu kapaliny,
- spodní část, tzv. „spodní" či „matečný louh", který obsahuje glycerol, hydroxid sodný a chlorid sodný, odlijte. Mýdlo nechte ztuhnout.

Hydrolýzu mýdla proveďte takto:

- asi polovinu lžičky získaného mýdla rozpusťte ve zkumavce v 5 ml ethanolu a přikápněte několik kapek fenolftaleinu. Roztok se nezbarvuje,
- zřeďujte alkoholický roztok destilovanou vodou. Dochází k hydrolýze mýdla, vytváří se zásadité prostředí a fenolftalein mění barvu.

3.1.2 Stanovení čísla kyselosti

Princip:

Číslo kyselosti tuku udává počet mg KOH, potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin v 1 g tuku. Stanovuje se titrací těchto kyselin odměrným roztokem hydroxidu draselného na fenolftalein.

Volné mastné kyseliny se v čerstvých a dobře ošetřených tucích vyskytují jen velmi málo. Vznikají jako produkty oxidace nenasycených vyšších mastných kyselin (žluknutí), nebo hydrolýzou tuků při jejich špatném ošetření a aktivaci enzymů lipas (např. při rozdrcení olejnatých semen, při potřísnění živočišných tuků při porážce zvířete obsahem střev). Jejich zvýšený obsah proto svědčí o zhoršení jakosti tuků. Číslo kyselosti potravních tuků se pohybuje v desetinách až jednotkách, tuků krmných až v desítkách mg KOH/g.

Někdy se též uvádí stupeň kyselosti, vyjadřovaný v ml KOH o koncentraci c(KOH) = 1 mol/l, potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin ve 100 g tuku. Vzájemný vztah udává přepočet:

$$\text{stupeň kyselosti} = 1{,}7825 \times \text{číslo kyselosti.}$$

Potřeby:

- směs 96 % ethanolu a toluenu (1:2)
- 0,1 M alkoholový roztok KOH o známém titru
- 1 % alkoholový roztok fenolftaleinu
- vzorky potravních tuků

Postup:

- zahřejte k teplotě varu vodní lázeň takové velikosti, ve které lze zahřívat titrační baňku. Poté kahan vypněte,
- na malý kousek filtračního papíru diferenčně odvažte 3 - 4 g tuku s přesností 0,1 g a navážku včetně papírku vhoďte do titrační baňky,
- válečkem přilejte 50 ml směsi ethanol-toluen a obsah rozpusťte zahřátím na vodní lázni,
- přidejte asi 5 kapek fenolftaleinu a titrujte za horka odměrným roztokem KOH do slabě červeného zbarvení, které vydrží 30 sekund. Pro zlepšení kontrastu titrujte s bílým podkladem,

– stejným postupem proveďte slepý pokus bez vzorku. Tím korigujete případný obsah kyselin v rozpouštědle, příp. v roztoku indikátoru.

Vyhodnocení:

$$\text{číslo kyselosti (ČK)} = \frac{56,1 \cdot (a-b) \cdot x}{n} \quad mg\ KOH/g\ tuku$$

kde:

a .... spotřeba roztoku KOH při vlastní titraci /ml/
b .... spotřeba roztoku KOH při slepém pokusu /ml/
x .... titr odměrného roztoku KOH
n .... navážka tuku /g/
Výsledek se udává na jedno desetinné místo.

3.1.3. Stanovení čísla zmýdelnění

Princip:

Číslo zmýdelnění (ČZ) udává počet mg KOH potřebných na zmýdelnění 1 g tuku (tedy číslo esterové ČE) a současně na neutralizaci volných mastných kyselin (tedy číslo kyselosti ČK): ČZ = ČE + ČK. Číslo zmýdelnění bude tím vyšší, čím více bude v tuku karboxylových skupin, tedy čím kratší bude průměrný řetězec mastných kyselin. Charakterizuje tedy průměrnou délku mastných kyselin vázaných v tuku. Pro většinu běžných tuků je jeho hodnota 190 - 200 mg KOH/g. Pro kravské máslo, v němž se vyskytují i mastné kyseliny s nižším počtem uhlíků než C10, je hodnota ČZ 210 - 235 mg KOH/g.

Při stanovení ČZ se esterově vázané i volné mastné kyseliny zmýdelní (srovnej práci 3.1.1.) vařením tuku pod zpětným chladičem s přebytkem alkoholového roztoku hydroxidu draselného. Nezreagovaný KOH se stanoví titrací odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Obdobnou titrací se stanoví rovněž spotřeba HCl na celé množství roztoku KOH, použité ke zmýdelnění. Z rozdílu spotřeb, odpovídajícímu zreagovanému KOH, se vypočte ČZ.

Potřeby:

– 0,5 M alkoholový roztok KOH
– 0,5 M roztok HCl o známém titru
– 1 % alkoholový roztok fenolftaleinu
– směs 96 % ethanolu a toluenu (1:2)
– vzorky tuhých tuků

Postup:

- připravte dvě aparatury pro zahřívání pod zpětným chladičem z vodní lázně s varnými baňkami objemu 250 ml,
- na malém kousku filtračního papíru diferenčně navažte 1 - 2 g tuku s přesností na 0,01 g a celé vhoďte do varné baňky. Válečkem přilejte 40 ml směsi ethanol-toluen a vhoďte několik varných kamínků. Pak přidejte byretou přesně 25 ml alkoholového roztoku KOH a promíchejte. Jako slepý pokus totéž proveďte s druhou varnou baňkou, avšak bez vzorku tuku,
- baňky zahřívejte ve vodní lázni tak dlouho, aby obsah vřel 30 minut. Obsah baňky se vzorkem tuku musí být po ukončení varu bez tukových kapének,
- k horkému obsahu baňky přidejte několik kapek fenolftaleinu a přebytek KOH ztitrujte odměrným roztokem HCl do odbarvení červeného zbarvení. Stejným postupem ztitrujte i baňku se slepým pokusem.

Vyhodnocení:

$$\text{číslo zmýdelnění (ČZ)} = \frac{56,1 \cdot (a-b) \cdot x}{n} \quad mg\ KOH/g$$

kde:

a .... spotřeba roztoku HCl na slepý pokus /ml/
b .... spotřeba roztoku HCl na vzorek tuku /ml/
x .... titr odměrného roztoku HCl
n .... navážka vzorku /g/

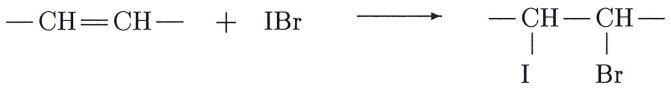
Výsledek se udává na jedno desetinné místo.

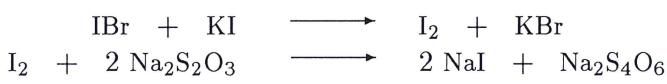
3.1.4 Stanovení jodového čísla podle Hanuše

Princip:

Jodové číslo udává procento halogenu (počítáno jako jod), který se může za určitých podmínek adovat na dvojné vazby. Hodnota jodového čísla je tedy mírou obsahu nenasycených mastných kyselin v tuku.

Vlastním reakčním činidlem je bromid jodný IBr, který se přidává v přebytku. Nezreagovaný IBr se po reakci s tukem převede jodidem draselným na jod, který se titruje thiosíranem sodným.







tetrathionan sodný

Jodová čísla běžných druhů tuků jsou uvedena v tabulce.

Tabulka: Jodová čísla běžných druhů tuků

Tuk	Jodové číslo(%)
Kravské máslo	26 - 40
Hovězí tavený lůj	40 - 48
Škvařené vepřové sádlo	53 - 77
Podzemnicový olej	84 - 100
Sojový olej	115 - 140
Slunečnicový olej	122 - 136
Lněný olej	170 - 203

Podle hodnoty jodového čísla se dělí oleje na nevysýchavé (JČ do 60 %), polovysýchavé (JČ 60 - 120 %) a vysýchavé (JČ nad 120 %).

Navážku tuku je nutné volit tak, aby adovaný halogen byl ve stanoveném přebytku. Používají se tato množství:

asi 0,6 g tuku pro očekávané jodové číslo 30 - 50 %
0,3 g tuku pro očekávané jodové číslo 50 - 100 %
0,2 g tuku pro očekávané jodové číslo 100 - 150 %

Potřeby:

- vzorky potravních tuků
- roztok bromidu jodného (Hanušův)
- 0,1 M roztok thiosíranu sodného
- chloroform
- 1 % roztok škrobu
- 10 % roztok KI (připravuje se čerstvý)

Postup:

- do suché zábrusové Erlenmeyerovy baňky objemu 200 - 300 ml odvažte diferenčně s analytickou přesností navážku tuku podle očekávaného jodového čísla. Tuk rozpusťte v 10 ml chloroformu. Do druhé Erlenmeyerovy baňky vlijte pouze 10 ml chloroformu (slepý pokus),
- do každé z baněk přidejte v digestoři byretou přesně 25 ml Hanušova roztoku. Obsah důkladně promíchejte a zazátkovanou baňku nechte hodinu stát v temnu (ve stole) za občasného promíchání kroužívým pohybem,
- pak zátku opláchněte destilovanou vodou, přidejte válečkem 20 ml 10 % roztoku KI, 100 ml vody a titrujte odměrným roztokem thiosíranu sodného do žlutého zbarvení. Pak přidejte asi 1 ml roztoku škrobu a dotitrujte až do ztráty špinavě modrého zbarvení horní vodné fáze.

Vyhodnocení:

$$\textit{jodové číslo } (J\check{C}) = \frac{12,69 \cdot (a-b) \cdot x}{n} \quad \%$$

kde:

a .... spotřeba odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$ při slepém pokusu /ml/
b .... spotřeba odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$ na vzorek tuku /ml/
x .... titr odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$
n .... navážka tuku /g/
Výsledek se udává na jedno desetinné místo.

Modifikace pro rychlé stanovení jodového čísla:
Postup je stejný jako u Hanušovy metody, ale po přidání Hanušova roztoku se přidá ještě 10 ml 2,5 % roztoku octanu rtuťnatého v octové kyselině. Reakční doba se tím zkrátí z hodiny na 10 minut.

3.1.5 Stanovení peroxidového čísla

Princip:

Při žluknutí (autooxidaci) tuků dochází k oxidaci dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin. Jedná se o radikálovou řetězovou reakci, iniciovanou zářením (zejména jeho ultrafialovou složkou), teplotou a později i peroxidy vznikajícími jako meziprodukty. Z nenasycené mastné kyseliny vznikají peroxidy —O—O— a hydroperoxidy —O—O—H. Obsah peroxidů je proto ukazatelem nežádoucích přeměn tuků, neboli jejich čerstvosti.

V dalších fázích oxidačních přeměn se peroxidy rozkládají za vzniku alkoholů, aldehydů a ketonů a nakonec karboxylových kyselin. Proto je třeba míru žluklosti tuků posuzovat dvěma ukazateli - peroxidovým číslem a číslem kyselosti (srovnej práci 3.1.2.).

Při stanovení peroxidů se využívá jejich schopnosti oxidovat jodid draselný na jod, který se stanoví titračně thiosíranem sodným. Množství peroxidicky vázaného kyslíku se vesměs vyjadřuje jako počet ml 1 M roztoku thiosíranu sodného na 1000 g tuku. Peroxidové číslo potravních tuků se pohybuje v desetinách až jednotkách.

Potřeby:

- vzorky čerstvých a žluklých tuhých tuků
- směs ledové octové kyseliny a chloroformu (3:2)
- 0,02 M roztok thiosíranu sodného o známém titru
- 0,002 M roztok thiosíranu sodného o známém titru
- 1 % roztok škrobu
- čerstvý nasycený roztok KI (asi 15 g KI rozpusťte v 10 ml vody a nevystavujte přímému světlu, protože dochází k oxidaci KI na I_2, který by výsledek stanovení zatěžoval chybou)

Postup:

- do suché zábrusové Erlenmeyerovy baňky objemu 200 - 300 ml odvažte diferenčně s přesností na jednotky mg kolem 5 g čerstvého či 3 g žluklého tuku. Válečkem přidejte 50 ml směsi octové kyseliny s chloroformem a tuk rozpusťte. Je-li třeba, urychlete rozpouštění ponořením do horké vodní lázně. Do druhé Erlenmeyerovy baňky vlejte pouze 50 ml směsi rozpouštědel (slepý pokus),
- do každé baňky přidejte 1 ml čerstvého roztoku jodidu draselného, opatrně promíchejte a ponechte stát 10 minut zazátkované baňky ve tmě (ve stole),
- pak přidejte 100 ml vody, asi 1 ml roztoku škrobu a titrujte uvolněný jod thiosíranem sodným:

  - roztokem 0,02 mol/l pro tuky žluklé,

  - nebo roztokem 0,002 mol/l pro tuky čerstvé.

  Titrujte až do ztráty špinavě modrého zbarvení horní vodné fáze. Může se stát, že ve slepém pokusu peroxidy nejsou a po přidání roztoku škrobu modré zbarvení nevznikne,
- vymyté baňky dejte vysušit do sušárny.

Vyhodnocení:

$$\textit{peroxidové číslo } (P\check{C}) = \frac{(a-b)\cdot x \cdot 1000}{n} \quad ml\ 1M\ roztoku\ Na_2S_2O_3$$

kde:

a .... spotřeba roztoku $Na_2S_2O_3$ při stanovení vzorku tuku /ml/
b .... spotřeba roztoku $Na_2S_2O_3$ při slepém pokusu /ml/
x .... titr použitého roztoku $Na_2S_2O_3$ **(nezaměňte!)**
n .... navážka tuku /g/

Výsledek se udává na jedno desetinné místo.

3.1.6 Dělení lipidů adsorpční chromatografií na tenké vrstvě

Princip:

Lipidy se extrahují z rostlinných pletiv či živočišných tkání směsí chloroformu a methanolu. Vhodnou soustavou rozpouštědel se na tenké vrstvě oxidu křemičitého oddělí jednotlivé typy lipidů. Chromatogram se vyvolá působením par jodu.

Potřeby:

- vzorky pevných tuků a olejů
- směs chloroformu a methanolu (2:1) (10 ml na jeden vzorek)
- vyvíjecí soustava n–hexan - diethylether - mravenčí kyselina (80:20:2)
- jod krystalický
- desky Silufol bez předběžné úpravy a aktivace

Postup:

- vyvíjecí komoru naplňte do výšky asi 1 cm vyvíjecí soustavou rozpouštědel, komoru zakryjte a směsí pohybujte tak, aby její páry naplnily celou komoru,
- asi 0,1 g vzorku tuku rozpusťte ve zkumavce v 10 ml směsi chloroformu a methanolu,
- na proužek desky Silufol naneste asi 2 cm od spodního okraje (start) mikropipetou rozpuštěný vzorek tuku několikrát tak, aby vznikla skvrna o průměru asi 0.8 cm,
- rozpouštědlo nechte vytékat, proužek postavte do vyvíjecí komory a zakryjte ji. Rozpouštědlo nechte vzlínat ještě 15 minut poté, co dosáhlo konce proužku (tzv. metoda na přetečení). Chromatogram nechte na vzduchu oschnout,
- mezitím do další vyvíjecí komory vhoďte trochu jodu a nechte komoru nasytit jeho parami,
- chromatogram vložte na chvíli do komory. Objeví se jednotlivé žlutohnědé skvrny, jejichž obrys obkreslete tužkou.

Vyhodnocení:

Pro použitou soustavu rozpouštědel se mohou vytvářet skvrny od startu k cíli v tomto pořadí: fosfolipidy - monoacylglyceroly - 1,2–diacylglyceroly - 1,3–diacylglyceroly - cholesterol - volné mastné kyseliny - triacylglyceroly - estery cholesterolu.

Z velikosti skvrn lze přibližně určit zastoupení jednotlivých skupin lipidů ve zkoumaném vzorku. V potravních tucích se obvykle dají zjistit jen tri– a diacylglyceroly.

3.2 Stanovení lipidů

3.2.1 Stanovení tuků přímou extrakcí

Princip:

Jako tuk se označuje souhrn netěkavých látek extrahovatelných určitým nepolárním rozpouštědlem (petrolether, benzin, jednotlivé alkany, diethylether) za podmínek metody. Vzorek se rozmělní, zbaví přebytečné vlhkosti (nad 8 - 10 %) a kontinuálně se extrahuje poměrně dlouhou dobu. Extrakt se pak zbaví rozpouštědla a tuk se zváží.

Potřeby:

- vzorky rozmělněných olejnin, strouhanky apod.
- petrolether
- vata extrahovaná petroletherem
- mořský písek
- elektrická vodní lázeň či topné hnízdo
- Soxhletův extraktor menšího typu

Postup:

Extrakční aparatura se instaluje v digestoři, protože se pracuje s hořlavinou I. třídy.

- sestavte aparaturu z varné baňky objemu 250 ml a Soxhletova extraktoru včetně příslušného zpětného chladiče. Baňka se zahřívá z elektrické vodní lázně (zábrusy nemažte, nebo jen velmi jemně),
- varnou baňku včetně několika varných kamínků zvažte s analytickou přesností a naplňte ji takovým množstvím rozpouštědla, které by 1,5x až 2x naplnilo těleso extraktoru (odpovídá max. dvěma třetinám objemu baňky, tedy asi 160 ml), umístěte ji do lázně a nasaďte na ni extraktor. Rozpouštědlo se již nesmí doplňovat během extrakce,

- do extrakční patrony, která by velikostně měla zaplnit většinu prostoru tělesa extraktoru, odvažte s přesností na jednotky miligramů 10 - 15 g vzorku a patronu utěsněte vatou,
- baňku zahřívejte tak, aby rozpouštědlo klidně vřelo a přeteklo z extraktoru do baňky asi každých 5 minut. Extrahujte 4 - 6 hodin - pokud se očekává obsah tuku vyšší než 20 %, je třeba patronu vyjmout, nechat rozpouštědlo v digestoři odpařit. Vzorek se pak ve třecí misce rozetře s mořským pískem a kvantitativně převede zpět do patrony. Extrahuje se dalších 4 - 6 hodin,
- po ukončení extrakce baňku s vyextrahovaným tukem připojte na elektrické vodní lázni k sestupnému chladiči a rozpouštědlo oddestilujte,
- zbytky rozpouštědla odpařte v sušárně při 95 - 98°C, přičemž se baňka vkládá položená. Dveře sušárny musí zůstat pootevřené, aby mohly páry rozpouštědla unikat. Suší se asi 30 minut,
- baňku pak ponechte vychladnout v exsikátoru a s analytickou přesností ji zvažte,
- odtučněný materiál z extrakční patrony vysypte a ponechte ji vyschnout pro další použití. **Nesmíte ji vyplachovat vodou!**

Vyhodnocení:

Výsledek vyjádřete v hmotnostních procentech vzorku. Označuje se jako "extrakt (příp. výtažek) v použitém rozpouštědle". Udává se s přesností na jedno, max. dvě desetinná místa.

3.2.2 Stanovení vyšších mastných kyselin plynovou chromatografií

Princip:

Vyextrahovaný tuk se izoluje, zmýdelňuje a reesterifikuje methanolickým roztokem hydroxidu draselného a po zředění petroletherem se metylestery kyselin stanovují plynovou chromatografií.

Potřeby:

- plynový chromatograf s detektorem FID
- skleněná kolona 2500 mm 10 % SP 2330
- 2 M roztok hydroxidu draselného v methanolu
- petrolether p.a.
- methanol p.a.
- síran sodný bezvodý p.a.
- 1 M roztok kyseliny chlorovodíkové v methanolu

Postup:

- do malé zkumavky nakápněte 4 až 5 kapek vyextrahovaného oleje o celkové hmotnosti 40 až 50 mg,
- přidejte 1,0 ml petroletheru a vzorek důkladně promíchejte třepáním po dobu 2 až 5 sekund,
- přidejte 0,2 ml methanolického roztoku hydroxidu draselného a opět třepejte 10 sekund,
- vzorek vložte do vytemperované vodní lázně na 50°C na dobu 30 sekund,
- po vyjmutí 10 sekund protřepejte a přidejte 0,4 ml methanolického roztoku kyseliny chlorovodíkové a 5 až 10 sekund třepejte,
- ke vzorku přidejte 1,5 ml petroletheru, na špičku lžičky bezvodého síranu sodného a 10 sekund třepejte,
- vzorek nechte v klidu do dokonalého rozdělení fází.

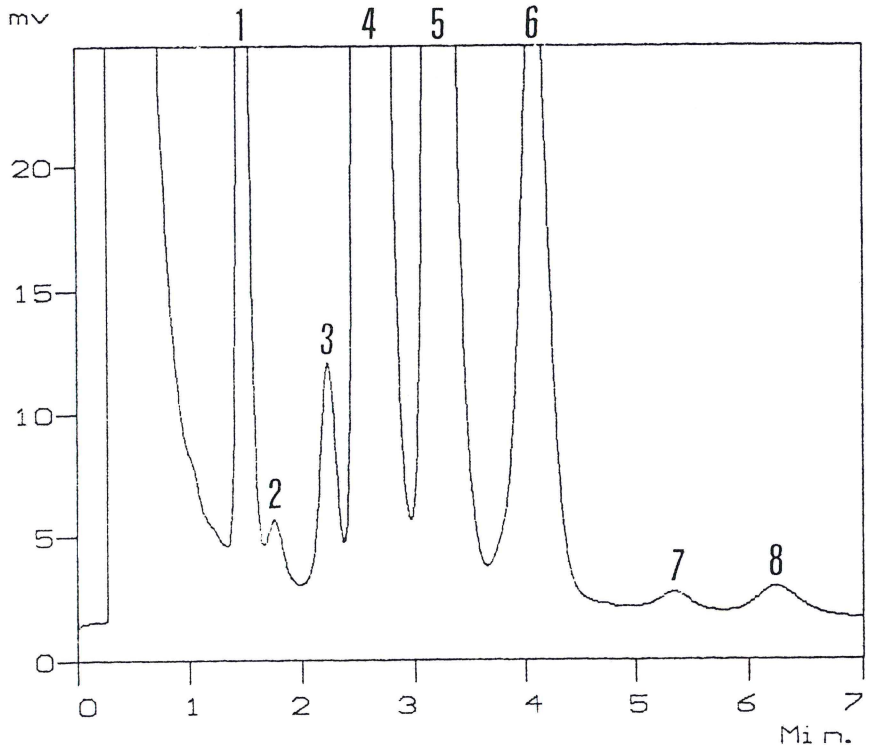
Petroletherová vrstva se přímo použije pro analýzu. Do plynového chromatografu se vstřikuje 1μl nezředěného extraktu methylesterů.

Parametry chromatografu:

- teplota kolony	200°C
- teplota injektoru	250°C
- teplota detektoru	250°C
- průtok nosného plynu	25 ml/min

Vyhodnocení:

V chromatogramu vzorku se identifikují jednotlivé methylestery kyselin podle modelového chromatogramu (viz obr.).



1 - kyselina palmitová (C16:0)
2 - kyselina palmitoolejová (C16:1)
3 - Kyselina stearová (C18:0)
4 - kyselina olejová (C18:1)
5 - kyselina linolová (C18:2)
6 - kyselina linolenová (C18:3)
7 - kyselina behenová (C22:0)
8 - kyselina eruková (C22:1)

Obsah jednotlivých kyselin se vypočítá podle vzorce

$$\%VMK_x = \frac{S_x}{S} \cdot 100$$

kde:

S_x.... plocha píku kyseliny
S .... celková plocha píků všech kyselin

Poznámka:

Vzhledem k velikosti molekul jsou v tomto případě odezvové faktory kyselin považovány za stejné.

3.2.3 Fotometrické stanovení celkových lipidů

Princip:

Nenasycené lipidy, fosfolipidy, vyšší mastné kyseliny a cholesterol reagují po hydrolýze kyselinou sírovou s fosfovanilinovým činidlem za vzniku červeného zbarvení, které je vhodné pro fotometrické stanovení.

Všechny potřebné chemikálie jsou obsaženy v soupravách komerčně dodávaných ke stanovení celkových lipidů v krevním séru pro potřeby zdravotnictví (Bio-La-Test). Soupravu lze ovšem využít i pro jiné účely. V našem případě provedeme stanovení celkových lipidů ve vaječném žloutku.

Potřeby:

- fosfovanilinové činidlo (vanilin 10 mmol/l, kyselina fosforečné 11,5 mol/l)
- kyselina sírová konc.
- NaCl
- standardní roztok lipidů (8 mg/ml)
- skleněný homogenizátor

Postup:

- připravte asi 50 ml 0,9 % roztok NaCl (fyziologický roztok),
- odvažte asi 2 g vaječného žloutku a přesností na 0,1 g a navážku kvantitativně převeďte do homogenizátoru,
- do homogenizátoru napipetujte 10 ml fyziologického roztoku a směs opatrně zhomogenizujte (nesmí dojít ke vzniku pěny),
- ke směsi znovu přidejte pipetou 10 ml fyziologického roztoku a homogenizujte. Homogenizát bude sloužit pro vlastní stanovení,
- připravte si vroucí vodní lázeň a tři zkumavky,
- do první zkumavky pipetujte 0,02 ml homogenizátu žloutku (vzorek), do druhé 0,02 ml standardního roztoku lipidů (standard) a do třetí 0,02 ml fyziologického roztoku (slepý pokus),
- do všech zkumavek pipetujte po 1,5 ml konc. kyseliny sírové, promíchejte a zahřívejte 15 min.na vroucí vodní lázni. Vzniklý hydrolyzát pak použijete k další reakci,
- zkumavky ochlaďte a do dalších tří suchých zkumavek pipetujte po 0,1 ml hydrolyzátu,
- do těchto zkumavek přidejte pipetou po 1,5 ml fosfovanilinového činidla, promíchejte a nechte 40 - 60 min. stát,
- změřte absorbanci vzorku a standardu proti slepému pokusu při 530 nm.

Vyhodnocení:

- vypočítejte koncentraci celkových lipidů v homogenizátu podle vzorce

$$c = \frac{absorbance\ vzorku}{absorbance\ standardu} \cdot 8\ (mg/ml)$$

- ze získané hodnoty vypočítejte koncentraci celkových lipidů ve žloutku v mg/g.

3.2.4 Fotometrické stanovení cholesterolu

Princip:

Fotometrické stanovení cholesterolu je založeno na vzniku modrozeleného zbarvení, které vzniká reakcí cholesterolu s kyselinou 2,5–dimethylbenzensulfonovou.

Všechny potřebné chemikálie jsou obsaženy v soupravách komerčně dodávaných ke stanovení cholesterolu v krevním séru pro potřeby zdravotnictví (Bio-La-Test). Soupravu lze ovšem využít i pro jiné účely. V našem případě provedeme stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku.

Potřeby:

- činidlo (kyselina 2,5–dimethylbenzensulfonová)
- konc. kyselina sírová
- standard cholesterolu (5,17 mmol/l)
- NaCl
- skleněný homogenizátor
- led

Postup:

- připravte asi 50 ml 0,9 % roztok NaCl (fyziologický roztok),
- odvažte asi 2 g vaječného žloutku a přesností na 0,1 g a navážku kvantitativně převeďte do homogenizátoru,
- do homogenizátoru napipetujte 10 ml fyziologického roztoku a směs opatrně zhomogenizujte (nesmí dojít ke vzniku pěny),
- ke směsi znovu přidejte pipetou 10 ml fyziologického roztoku a homogenizujte. Homogenizát bude sloužit pro vlastní stanovení,
- připravte si chladnou vodní lázeň (15°C) a tři suché zkumavky,
- do první zkumavky pipetujte 0,1 ml homogenizátu žloutku (vzorek), do druhé 0,1 ml standardního roztoku cholesterolu (standard) a do třetí 0,1 ml fyziologického roztoku (slepý pokus),
- do všech zkumavek pipetujte po 3 ml činidla, promíchejte a vložte na 10 min. do chladné vodní lázně,
- do všech zkumavek přidejte pipetou 0,6 ml konc. kyseliny sírové, promíchejte a nechte 10 min. v chladné vodní lázni,
- změřte absorbanci vzorku a standardu proti slepému pokusu při 580 nm.

Vyhodnocení:

- vypočítejte koncentraci cholesterolu v homogenizátu podle vzorce

$$c = \frac{absorbance\ vzorku}{absorbance\ standardu} \cdot 5,17\ (mol/l)$$

- ze získané hodnoty vypočítejte koncentraci cholesterolu ve žloutku v mg/g (M_r cholesterolu = 386)

4. Další přírodní látky

4.1 Důkaz a izolace některých přírodních látek

4.1.1 Chromatografické dělení rostlinných barviv na tenké vrstvě

Princip:

Zelené části rostlin obsahují různá množství pyrrolových a karotenoidních barviv. Ta se dají rozdělit adsorpční chromatografií na tenké vrstvě a izolovat.

Barviva se z rostlinných materiálů extrahují směsí polárního acetonu a nepolárního petroletheru. Převedou se do petroletheru rozpuštěním acetonu ve vodě a poté se dělí na tenké vrstvě silikagelu (oxidu křemičitého). Vhodnou vyvíjecí soustavou se podaří oddělit jednotlivé karotenoidy od pyrrolových barviv. Jednotlivá barviva lze identifikovat vystříháním skvrn z chromatogramu, elucí do ethanolu a proměřením absorpčních spekter.

Potřeby:

- aceton p.a.
- petrolether p.a.
- vyvíjecí soustava petrolether - benzin - 1–propanol (10:10:1)
- mořský písek
- chromatografické desky Silufol bez předběžné úpravy a aktivace

Postup:

- 5 g čerstvých listů rozřezaných nerezovým nožem promíchejte v třecí misce s mořským pískem a přelijte acetonem. Pak listy dobře rozetřete,
- homogenát převeďte do zábrusové Erlenmeyerovy baňky objemu 300 ml, přidejte 25 ml petroletheru a po uzavření zátkou obsah míchejte na elektromagnetické míchačce po dobu asi 10 minut,
- pak baňku dolijte destilovanou vodou tak, aby hladina dosahovala asi 1 cm pod zátku a uložte ji v chladničce (nejlépe do druhého dne). Aceton se rozpustí ve vodě a horní vrstvu tvoří petroletherový extrakt rostlinných barviv,
- do vyvíjecí chromatografické komory nalejte asi 1 cm vysoký sloupec vyvíjecí soustavy rozpouštědel petrolether - benzin - 1–propanol, komoru zakryjte a krouživým pohybem dosáhněte toho, že ji naplní páry rozpouštědel,
- na proužek Silufol naneste asi 2 cm od dolního okraje (start) mikropipetou dvakrát 3 - 5 kapek petroletherového extraktu barviv. Proužek vložte do vyvíjecí komory, zakryjte ji a nechte rozpouštědla vzlínat. Komoru uložte do tmy (do stolu) a kontrolujte ji jen chvílemi,
- vyvíjení ukončete, když se prvá žlutá skvrna přiblíží k hornímu okraji proužku (jde o tzv. metodu "na přetečení", protože čelo rozpouštědla postupovalo rychleji). Proužek vyjměte a tužkou zakreslete obrysy jednotlivých barevných skvrn,
- významněji zastoupená barviva se směrem od startu k cíli obvykle rozdělí v tomto pořadí v závislosti na polaritě: neoxantin - violaxantin - lutein - chlorofyl b - chlorofyl a - β–karoten.

4.1.2 Důkaz solaninu

Princip:

Solanin je souhrnné označení pro skupinu příbuzných glykosidů, jejichž aglykonem je solanidin, patřící do skupiny steroidních alkaloidů. Je obsažen v celé rostlině brambor, nejvíce v bobulích a klíčcích. Požívání či zkrmování naklíčených či nazelenalých hlíz může být proto škodlivé.

Solanin se dokazuje tzv. Albertiho reakcí.

Potřeby:

- konc. kyselina sírová
- konc. octová kyselina
- 1 % roztok formaldehydu
- 0,5 % roztok peroxidu vodíku
- naklíčené brambory

Postup:

- na hodinové sklíčko či Petriho misku rozložte velmi tenké řezy normální slupky, zelené slupky, slupky s očkem a klíčků,
- na řezy kápněte tyčinkami postupně kapku koncentrované octové kyseliny, 1 - 2 kapky koncentrované kyseliny sírové, kapku roztoku formaldehydu a kapku roztoku peroxidu vodíku.

  Přítomnost solaninu se projeví trvalým načervenalým až třešňově červeným zbarvením. Porovnejte výskyt a intenzitu zbarvení na jednotlivých řezech.

4.1.3 Izolace nikotinu z tabáku

Princip:

Nikotin patří mezi alkaloidy odvozené od pyridinu. Je obsažen v listech i kořenech tabáku. V malých dávkách působí dráždivě na nervovou soustavu, zvyšuje sekreci žláz a zvyšuje krevní tlak. Ve větších dávkách je prudce jedovatý, způsobuje ochrnutí dýchacího ústrojí a srdeční činnosti. Používá se ho jako kontaktního insekticidu proti savému hmyzu, zejména proti mšicím.

Nikotin je stejně jako ostatní alkaloidy zásaditý, takže v tabáku je vázán na kyseliny. Z této vazby se vytěsňuje silnou zásadou a poté se oddělí destilací.

Potřeby:

- několik druhů tabákových výrobků
- 5 % roztok NaOH
- Lugolův roztok
- nasycený vodný roztok pikrové kyseliny

Postup:

- sestavte destilační aparaturu pro destilaci ze síťky z varné baňky objemu 100 ml, Liebigova sestupného chladiče a Erlenmeyerovy baňky jako jímadla,
- do baňky vsypte asi 3 g jemně rozmělněného tabáku, přilejte 25 ml 5 % roztoku NaOH a šetrně zahřívejte tak, aby se tabák nepřipálil na stěny baňky,
- oddestilujte 6 - 8 ml destilátu, který je vodným roztokem nikotinu.

Důkazy nikotinu:

ZÍSKANÝ VODNÝ ROZTOK NIKOTINU NEPIPETUJTE!

a) Ke 2 ml destilátu přidejte několik kapek Lugolova roztoku. Vzniká červenohnědá sraženina, která se postupně rozpouští.

b) K 1 ml destilátu přidejte 2 ml nasyceného roztoku pikrové kyseliny. Vzniká jasně žlutá sraženina pikrátu nikotinu. Při přebytku nikotinu se sraženina rozpouští.

4.1.4 Identifikace přírodních látek

Princip:

Charakteristické reakce jednotlivých typů přírodních látek, se kterými jste se setkali v předchozích pracích, mohou dobře posloužit pro jejich základní identifikaci v neznámých vzorcích.

Potřeby:

- Fehlingovo činidlo
- 30 % HCl
- resorcinol
- Lugolův roztok
- biuretové činidlo
- ninhydrinové činidlo
- 10 % uhličitan sodný
- 1 % roztoky glukosy, fruktosy, sacharosy, škrobu, želatiny, alaninu a jejich binárních směsí

Postup:

- u jednotlivých vzorků proveďte důkazové reakce pro jednotlivé látky a na základě výsledků identifikujte látky přítomné ve vzorcích,
- využijte následující reakce:
  - Fehlingova - redukující sacharidy
  - Selivanovova - ketosy
  - s Lugolovým roztokem - škrob
  - s ninhydrinem - aminokyseliny
  - s biuretovým činidlem - bílkoviny,
- reakce provádějte podle postupů, které jsou uvedeny v předchozích pracích u jednotlivých druhů látek.

4.2 Stanovení některých přírodních látek

4.2.1 Stanovení β–karotenu v rostlinném materiálu.

Princip:

Petroletherový extrakt rostlinných barviv se připraví obdobně jako v práci 4.1.1. Extrakt se dělí sloupcovou adsorpční chromatografií na aktivovaném oxidu hlinitém. Jako prvý prochází sloupcem β–karoten, který se zachycuje a stanovuje spektrofotometricky. Pro sestrojení kalibrační křivky se vesměs místo drahého standardu β–karotenu používá azobenzenu či dichromanu sodného. Kontrolu čistoty izolovaného β–karotenu je možné provést stanovením absorpčního spektra a jeho porovnáním se spektrem standardním.

Potřeby:

- aceton p.a.
- petrolether p.a.
- ethanol 96 % denatur.
- mořský písek
- oxid hlinitý pro chromatografii aktivovaný na stupeň II
- standardní roztok azobenzenu v ethanolu (0,145 mg azobenzenu p.a. se rozpustí v 96 % ethanolu a doplní do 1000 ml. Jeden ml tohoto roztoku odpovídá 2,35 μg β–karotenu)

– chromatografické trubice o průměru 10 mm prostrčené gumovými zátkami
– odsávací zkumavky

Postup:

Odběr reprezentativního vzorku zelených částí rostlin a konzervovaných objemných krmiv je obtížný, protože listy obsahují několikanásobně více β–karotenu než stonky. Proto je třeba stanovení souběžně provádět alespoň třikrát (triplikáty). Pro ověření postupu ve cvičeních však stanovte β–karoten bez opakování. Při celé analýze zkraťte na minimum manipulaci se vzorkem na světle, protože β–karoten je fotolabilní.

- navažte s přesností na 0,01 g kolem 3 g čerstvých rostlin, nebo kolem 5 g siláže či sena. Další postup je stejný jako v prvých třech krocích práce 4.1.1. Celkový objem extraktu ze vzorku (V2) je 25 ml,
- do chromatografické trubice vsuňte tyčinkou chomáček vaty a na něj nasypte do výšky 5 - 6 cm aktivovaný oxid hlinitý a několikrát trubicí poklepejte o stůl, aby se vrstva usadila,
- trubici vložte do odsávací zkumavky připojené na vývěvu. Zkumavku postavte do úzké kádinky s vatou na dně. Sloupec propláchněte malým množstvím petroletheru. Pak napipetujte na sloupec alikvotní podíl extraktu barviv (V3): 5 ml pro čerstvý či silážovaný materiál, 10 ml pro seno. Rychlost dělení zvyšte vytvořením podtlaku v odsávací zkumavce. Sloupec propláchněte třemi dávkami po asi 5 ml petroletheru,
- obsah zkumavky rychle kvantitativně převeďte do odměrné baňky objemu 50 ml, doplňte ji po značku (objem V1) a uložte ji v temnu,
- sadu zředěných standardů azobenzenu připravte do pěti kalibrovaných zkumavek: postupně do nich pipetujte 1 - 2 - 3 - 4ml a doplňte je ethanolem do 5 ml,
- žluté zbarvení petroletherového extraktu β–karotenu a standardů azobenzenu proměřte na spektrofotometru v kyvetách tloušťky 1 cm při vlnové délce 451 nm. Vzorek se měří proti petroletheru, standardy proti ethanolu,
- z naměřených absorbancí standardů sestrojte kalibrační křivku (na ose x odpovídá největší zředění 23,5 μg β–karotenu, neředěná varianta 117,5 μg) a z ní odečtěte koncentraci β–karotenu pro absorbanci naměřenou u vzorku.

Vyhodnocení:

$$\beta - karoten = \frac{c \cdot V1 \cdot V2}{V3 \cdot n \cdot 10} \quad mg/100g$$

kde:

c .... koncentrace *beta*–karotenu odečtená z kalibrační křivky (mg/ml)

V1 .... celkový objem roztoku *beta*–karotenu po chromatografickém dělení (ml)

V2 .... celkový objem extraktu barviv ze vzorku (ml)

V3 .... objem alikvotního podílu extraktu použitého pro chromatografické dělení (ml)

n .... navážka vzorku (g)

4.2.2.Stanovení kyseliny pyrohroznové.

Princip:

Kyselina pyrohroznová reaguje se siřičitanem sodným v kyselém prostředí za vzniku tzv. bisulfitu. Tuto reakci lze využít pro stanovení kyseliny pyrohroznové.

Bisulfit, který vznikne reakcí siřičitanu a kyseliny se rozloží hydrogenuhličitanem sodným a uvolněný siřičitan se stanový jodometrickou titrací. Množství siřičitanu je úměrné množství kyseliny pyrohroznové.

Potřeby:

- 1 % roztok siřičitanu sodného nebo draselného
- pevný hydrogenuhličitan sodný
- 0,01 M roztok I_2
- 10 % roztok kyseliny fosfowolframové
- 1 % roztok škrobu

Postup:

- 5 g čerstvých listů rostlin rozetřete v třecí misce s malým množstvím mořského písku a postupně pomocí 50 ml vody kvantitativně převeďte do kuželové baňky,
- obsah baňky 10 min povařte a filtrujte přes buničinu do 100 ml odměrné baňky. Zbytek na filtru promyjte několikrát vroucí vodou. Baňku pak ochlaďte a doplňte vodou po rysku. Roztok použijte jako extrakt rostlinného materiálu,
- do malé kádinky pipetujte 25 ml extraktu, přidejte několik kapek kyseliny fosfowolframové a vysrážené bílkoviny odfiltrujte. Filtrát pak použijete pro vlastní stanovení kyseliny pyrohroznové,
- do titrační baňky pipetujte 10 ml filtrátu, přidejte 3 ml 1 % roztoku siřičitanu, promíchejte a nechte 20 min. stát,
- do titrační baňky přidejte 2 ml roztoku škrobu a titrujte roztokem jodu do slabě modrého zbarvení (odstranění nezreagovaného siřičitanu),
- do baňky přidejte 1 g pevného hydrogenuhličitanu sodného (rozložení bisulfitu) a opět titrujte do slabě modrého zbarvení. Tuto druhou spotřebu zaznamenejte, titraci vzorku proveďte alespoň dvakrát.

Vyhodnocení:

- vypočítejte průměrnou spotřebu roztoku jodu ze všech stanovení,
- vypočítejte množství kyseliny pyrohroznové v titrovaném vzorku za předpokladu, že 1 ml 0,01 M roztoku I_2 odpovídá 0,88 mg kyseliny pyrohroznové,
- získanou hodnotu přepočítejte na koncentraci kyseliny pyrohroznové v původním rostlinném materiálu.

IV. Enzymy

5. Stanovení aktivity enzymů

5.1 Stanovení aktivity askorbátoxidásy v rostlinném materiálu

Princip:

Askorbátoxidása je enzym obsahující v aktivním centru Cu^{2+}. Je v rostlinách velmi rozšířena. V aerobním prostředí se kyselina askorbová oxiduje askorbátoxidásou na kyselinu dehydrogenaskorbovou. Aktivita enzymu se může stanovit inkubací s kyselinou L–askorbovou, jejíž nespotřebovaný zbytek lze zjistit jodometrickou titrací.

Potřeby:

- vodný roztok kyseliny L-askorbové, čerstvý (1 mg/ml)
- 0,1 M fosfátový tlumič pH = 7,0
- 10 % roztok HCl
- 10 % roztok kyseliny sírové
- 0,0016 M jodičnanu draselného
- 10 % roztok KI
- 0,005 M thiosíran sodný
- 1 % roztok škrobu (s jodem se musí barvit intenzivně modře)
- toluen p.a.
- silonové struhadlo

Postup:

Příprava enzymového preparátu:

- hlízy brambor pečlivě omyjte, osušte filtračním papírem a rozmělněte na silonovém struhadle,
- kaši promíchejte a do 50 ml válečku navážte 20 g rozmělněné drti,
- přidejte fosfátový tlumič do objemu asi 48 ml, 2 - 3 kapky toluenu, směs tyčinkou dobře promíchejte a doplňte tlumičem na objem 50 ml. Za občasného zamíchání tyčinkou nechte stát 30 minut,
- směs po této době centrifugujte (1500 g, 10 minut) nebo filtrujte přes gázu nebo vatu a supernatant nebo filtrát použijte jako preparát askorbátoxidasy.

Stanovení aktivity:

- do dvou odměrných baněk (50 ml) pipetujte po 10 ml preparátu enzymu. Jednu baňku označte jako kontrolní, druhou jako pokusnou,
- kontrolní variantu povařte na vodní lázni 3 minuty a ochlaďte,
- do obou baněk přidejte po 10 ml kyseliny askorbové, po 1 kapce toluenu a obsah inkubujte 30 - 60 minut v termostatu při teplotě 37°C,
- po skončené inkubaci inaktivujte enzym v pokusné baňce varem 3 minuty na vodní lázni a ochlaďte,
- obsah obou baněk doplňte po značku destilovanou vodou, promíchejte a vysrážené bílkoviny odstraňte centrifugací nebo filtrací,
- z čirého supernatantu nebo filtrátu pipetujte po 20 ml do titračních baněk, přidejte 5 ml roztoku KI, 10 ml 10 % HCl, 5 ml roztoku jodičnanu draselného a 1 ml škrobu,
- po 5 minutách stání opatrně titrujte thiosíranem sodným až zmizí modré zabarvení.

Vyhodnocení:

1 ml 0,005 M thiosíranu sodného odpovídá 0,088 mg kyseliny L–askorbové. Aktivitu askorbátoxidasy (x) vyjádříme v mg kyseliny L–askorbové zoxidované enzymem z 1 g rostlinného materiálu za podmínek pokusu, což lze vyjádřit vzorcem:

$$x = \frac{(A - B) \cdot 0,088}{C}$$

kde:

A.... je počet ml roztoku 0,005 M thiosíranu spotřebovaného na titraci kontrolní varianty

B.... je spotřeba 0,005 M thiosíranu sodného na titraci pokusné varianty

C.... je podíl navážky v g na 20 ml enzymového extraktu vzatého k titraci (1,6 g).

5.2 Stanovení aktivity katalasy v rostlinném materiálu

Princip:

Katalasa je dvousložkový enzym s absolutní substrátovou specifitou, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Je aktivní jak v rostlinách, tak i v živočišných organismech. V kyselém prostředí je nestálý, pod pH = 3 ztrácí aktivitu. Katalasa se stanovuje celou řadou metod založených buď na měření přírůstku kyslíku (metody manometrické) nebo úbytku substrátu (peroxid vodíku - odměrnou analýzou nebo spektrofotometricky). Ke stanovení v organismech rostlin je nejvhodnější metodou jodometrické titrace. Protože katalasa je v různých organelách a částech rostlinných buněk, je výhodná její preparace jak z čerstvého materiálu, tak i z tzv. acetonových prášků.

Potřeby:

- 0.1 M roztok peroxidu vodíku p.a. v 0,05 M fosfátovém tlumiči pH = 6,8
- 1 M roztok kyseliny sírové
- 5 % roztok KI
- 0,005 M roztok thiosíranu sodného
- 1 % roztok škrobu (musí barvit modře)

Postup:

Příprava enzymového preparátu:

- hlízy brambor pečlivě omyjte, osušte filtračním papírem a rozmělněte na silonovém struhadle,
- kaši promíchejte a do 50 ml válečku navážte 10 g rozmělněné drti,
- přidejte 2 - 3 kapky toluenu, doplňte vodou na objem 50 ml a promíchejte,
- vzorek nechte stát v lázni s ledem a vodou 30 minut za občasného promíchání,
- směs filtrujte přes vatu nebo gázu a filtrát použijte jako enzymový preparát.

Stanovení aktivity:

- do 4 kuželových baněk (1000 ml) pipetujte po 20 ml roztoku peroxidu vodíku,
- do dvou z těchto 4 baněk (kontrolní varianty) přidejte za míchání 5 ml roztoku kyseliny sírové (inaktivace enzymů),
- do všech baněk pipetujte po 10 ml enzymového preparátu a inkubujte při 30°C přesně 10 minut,
- do pokusných variant přidejte také po 5 ml roztoku kyseliny sírové k zastavení reakce,
- do všech baněk pipetujte 5 ml 5 % roztoku KI, 1 ml 1 % roztoku škrobu a titrujte za stálého míchání 0,005 M roztokem thiosíranu sodného, až zmizí modré zabarvení Spotřebu thiosíranu sodného si zaznamenejte a ze dvou opakování u každé varianty vypočítejte průměr.

Vyhodnocení:

1 ml 0,005 M thiosíranu sodného odpovídá 0,17 mg peroxidu vodíku. Aktivitu katalasy (x) vyjádříme v mg peroxidu vodíku, rozloženého katalasou z 1 g rostlinného materiálu za podmínek pokusu. Vypočítáme ji podle vzorce:

$$x = \frac{(A - B) \cdot 0,17}{C}$$

kde:

A...spotřeba 0,005 M roztoku thiosíranu sodného spotřebovaného na titraci kontroly,

B...spotřeba 0,005 M roztoku thiosíranu sodného spotřebovaného na titraci pokusu a

C...podíl navážky materiálu odpovídající objemu enzymového preparátu, vzatého k titraci (tj. 1/5 navážky)

5.3 Stanovení aktivity lipasy v semenech olejnin

Princip:

Lipasa je hydrolasa, která postupně hydrolyzuje tuky na glycerol a mastné kyseliny. Uvolněné mastné kyseliny se stanoví titrací alkalickým hydroxidem.

Potřeby:

- acetátový tlumič pH = 4,7 (250 ml 1 M kyseliny octové a 25 ml 1 M octanu sodného se smísí a doplní na objem 1000 ml destilovanou vodou)
- 0,05 M NaOH
- 0,1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu
- ethanol 96 %
- ether
- směs ethanolu a etheru v poměru 4:1
- olivový olej
- 1,5 % roztok NaCl
- 10 % arabská guma
- toluen p.a.
- mák

Postup:

Příprava preparátu lipasy:

- navážte 8 g mletého máku, přidejte 100 ml 1,5 % HCl a směs třepejte na třepačce 45 minut,
- směs zfiltrujte přes vatu nebo gázu, popřípadě centrifugujte (3000 g, 10 minut), a filtrát (supernatant) použijte jako enzymový preparát lipasy.

  Příprava olejové emulze
- 165 ml 10 % roztoku arabské gumy se 150 g ledu a 20 ml olivového oleje mixujte 20 minut (emulze se připravuje každý den čerstvá a uchovává se v chladničce).

Stanovení aktivity

- do jedné titrační baňky (kontrola) odměřte 30 ml směsi ethanol- ether v poměru 4:1,
- do kontrolní a do další (pokusné) baňky pipetujte po 5 ml acetátového tlumiče pH = 4,7, dále 20 ml olejové emulze (substrát) a 20 ml preparátu lipasy a důkladně promíchejte,
- pokusnou variantu inkubujte 1 hodinu při 30°C a po inkubační době přidejte 30 ml směsi ethanol-ether (k zastavení reakce) a promíchejte,
- do obou baněk přidejte po 3 kapkách fenolftaleinu a titrujte 0,05 M NaOH za intenzivního míchání do světle růžového zabarvení. Spotřebu kontrolní a pokusné titrace zaznamnejte.

Vyhodnocení:

Při výpočtu vycházíme z toho, že 1 ml 0,05 M NaOH odpovídá 50 μmol uvolněné kyseliny. Aktivitu lipasy můžeme vyjádřit počtem jednotek aktivity v μkatalech na 1 g semene. (1 μkat = 1 μmol.sec^{-1}). Aktivitu vypočítáme podle vzorce

$$x = \frac{(A - B) \cdot 50}{3600 \cdot C}(\mu kat/g)$$

kde:

A...počet ml NaOH spotřebovaného na titraci kontroly,

B...počet ml NaOH spotřebovaného na titraci pokusu

C...podíl navážky materiálu odpovídající objemu enzymového preparátu vzatého k titraci (tj. 1/5 navážky)

5.4 Stanovení aktivity ATPasy

Princip:

ATPasa je enzym, který katalyzuje štěpení ATP podle rovnice:

$$ATP = ADP + \mathbf{P}$$

Uvolněné fosforečnany lze stanovit fotometricky po převedení na fosfomolybdenovou modř.

Potřeby:

- 0,1 M roztok sodné soli ATP
- borátový tlumič pH=7
- 0,5 M $MnCl_2$
- 10 % roztok kyseliny trichloroctové
- 1 % roztok kyseliny askorbové
- kyselina molybdensírová (10 g molybdenanu sodného se rozpustí ve 100 ml vody a přidá se 300 ml 50 % kys. sírové
- hydrogenfosforečnan sodný
- enzymový preparát ATPasy (ve 2 ml 0,5 M KCl se rozetře 0,3 g čerstvých listů a roztok se zfiltruje)

Postup:

- připravte zásobní roztok fosforečnanů o koncentraci 1 mg $(PO_4)^{3-}$/ml (0,377 g Na_2HPO_4. 12 H_2O se kvantitativně převede do odměrné baňky, rozpustí a doplní vodou na 100 ml),
- do kalibrovaných zkumavek na 25 ml pitetujte postupně 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 ml zásobního roztoku a doplňte vodou na 20 ml. Vytvoříte tak kalibrační roztoky, které obsahují 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 mg fosforečnanů,
- do další kalibrované zkumavky postupně pipetujte 0,3 ml borátového tlumiče, 0,1 ml roztoku $MnCl_2$, 0,3 ml roztoku ATP a promíchejte. Zkumavku vložte do termostatu vyhřátého na 37°C a nechte asi 5 min. temperovat,
- do zkumavky pipetujte 0,3 ml enzymového preparátu, promíchejte a nechte v termostatu přesně 10 min. inkubovat,
- po této době ihned přidejte 1 ml kyseliny trichloroctové a povařte 5 min. na vodní lázni (vysrážení bílkovin),
- obsah zkumavky přefiltrujte do další kalibrované zkumavky a zbytek na filtru promyjte asi 10 ml vody. Zkumavku pak doplňte vodou na celkový objem 20 ml (vzorek),

- do stojánku si připravte kalibrovanou zkumavku s 20 ml vody (slepý pokus), 4 zkumavky s kalibračními roztoky a zkumavku se vzorkem,
- do všech zkumavek přidejte vždy 1 ml kyseliny molybdensírové a 1 ml kyseliny askorbové, promíchejte a nechte 15 min. stát,
- na fotometru při 650 nm změřte absorbanci kalibračních roztoků a vzorku proti slepému pokusu.

Vyhodnocení:

- sestrojte kalibrační graf vynesením absorbancí kalibračních roztoků proti obsahům fosforečnanů a z grafu odečtěte množství uvolněných fosforečnanů ve vzorku,
- vypočítejte specifickou aktivitu enzymového preparátu.

6. Vliv některých parametrů na rychlost enzymových reakcí.

6.1 Vliv koncentrace α– amylasy na rychlost štěpení škrobu.

Princip:

α– amylasa je enzym, štěpící škrob na dextriny a dále až na maltosu. O probíhajícím štěpení svědčí změna barvy produktu, poskytovaného škrobem s roztokem jodu. Během enzymové reakce přechází modré zabarvení škrobu s jodem přes hnědé (dextriny) až do slabě žlutého (maltosa), což je barva samotného jodového reagens.

Při dostatečně vysoké koncentraci substrátu je rychlost enzymové reakce přímo úměrná celkové koncentraci enzymu. Tento vztah platí i pro enzymy obsažené v hrubých extraktech tkání nebo tělních tekutinách.

Potřeby:

- citrát-fosfátový tlumič pH = 6,8
- 1 % roztok škrobu, dávající s roztokem jodu sytě modré zabarvení
- Lugolův roztok
- vhodně zředěná α-amylasa

Postup:

- do sady malých zkumavek odměřte po 1 ml vody a přidejte 1 - 2 kapky roztoku jodu. Tyto testovací roztoky podle potřeby v průběhu práce doplňujte,
- 1 ml vzorku slin pipetujte do 50 ml odměrné baňky a doplňte vodou po rysku. Roztok použijte jako preparát amylasy,
- označte 5 zkumavek čísly. Do zkumavek číslo 2 až 5 pipetujte po 1 ml destilované vody. Do zkumavek číslo 1 a 2 pipetujte po 1 ml preparátu amylasy,
- obsah zkumavky č. 2 promíchejte a převeďte z ní 1 ml do zkumavky č. 3. Roztok v této zkumavce opět promíchejte a převeďte z ní 1 ml do zkumavky č. 4. Z té opět po promíchání odpipetujte 1 ml do zkumavky č. 5., ze které odebraný 1 ml vylejte,
- tímto postupem obdržíte roztoky amylasy klesajícího zředění (50x až 800x),
- do všech zkumavek přidejte 4 ml citrát-fosfátového tlumiče a vložte mikropipety. Zkumavky umístěte do termostatu při 37°C a nechte asi 10 min. temperovat,

- pokud možno rychle přidejte do všech zkumavek po 1 ml roztoku škrobu a foukáním do pipetek krátce promíchejte,
- ihned, tj. v nulovém čase, odeberte mikropipetou vzorky roztoků ze zkumavek a kápněte je do testovacích roztoků jodu. Po jedné minutě odeberte další vzorky a po vhodných časových intervalech (podle aktivity enzymu) další,
- po určité době již nedochází k modrému zabarvení testovacích roztoků. Tuto dobu u jednotlivých koncentrací amylasy zaznamenejte do tabulky.

Vyhodnocení:

- převrácenou hodnotu času potřebného na ztrátu modrého zbarvení (je úměrná rychlosti enzymové reakce) vyneste do grafu proti převrácené hodnotě ředění vzorku slin (je úměrná koncentraci enzymu).

6.2 Stanovení optimálního pH α– amylasy.

Princip:

α– amylasa je enzym, štěpící škrob na dextriny a dále až na maltosu. O probíhajícím štěpení svědčí změna barvy produktu, poskytovaného škrobem s roztokem jodu. Během enzymové reakce přechází modré zabarvení škrobu s jodem přes hnědé (dextriny) až do slabě žlutého (maltosa), což je barva samotného jodového reagens.

Protože enzymy jsou v podstatě proteiny, jsou jejich vlastnosti výrazně ovlivňovány pH. Většina enzymů působí katalyticky pouze v určité oblasti pH. Tato hodnota pH, při které je rychlost enzymové reakce největší, se nazývá optimální pH daného enzymu. Mimo tuto oblast aktivita enzymu velmi rychle klesá. Při extrémních výchylkách pH směrem do kyselé nebo alkalické oblasti je tento pokles aktivity ireverzibilní.

Potřeby:

- 0,1 M citrát-fosfátový tlumič pH 5,0 až 8,0

Příprava tlumivého roztoku:

- zásobní roztok fosforečnanu : 14,7 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ rozpustit a doplnit v odměrné baňce na 100 ml
- zásobní roztok kyseliny citronové: 8,84 g kyseliny rozpustit a doplnit v odměrné baňce na 100 ml
- zásobní roztok KCl: 17,7 g KCl rozpustit a doplnit v odměrné baňce na 100 ml

pH	fosforečnan (ml zásobních roztoků)	k.citronová	KCl
5,0	25,1	11,6	12,8
6,0	30,7	8,7	9,0
6,6	35,4	6,5	7,3
7,0	40,1	4,2	5,6
7,4	44,2	2,1	3,0
8,0	47,3	0,7	0
celk. potřeba zás. roztoků	251,0	43,7	47,7

- 1 % roztok škrobu
- Lugolův roztok
- vhodně zředěná α– amylasa

Postup:

- do sady malých zkumavek odměřte po 1 ml vody a přidejte 1 - 2 kapky roztoku jodu. Tyto testovací roztoky podle potřeby v průběhu práce doplňujte,
- 1 ml vzorku slin pipetujte do 50 ml odměrné baňky a doplňte vodou po rysku. Roztok použijte jako preparát amylasy,
- preparát amylasy dále zřeďte tak, aby při pH=6,6 byla doba reakce asi 3-4 min. (vhodné ředění je asi 2-4x),
- do 6 zkumavek pipetujte po 1 ml naředěného preparátu amylásy a dále do jednotlivých zkumavek po 4 ml tlumivých roztoků podle tabulky.

Zkumavka č.	1	2	3	4	5	6
pH	5,0	6,0	6,6	7,0	7,4	8,0

- do všech zkumavek vložte mikropipety, zkumavky umístěte do termostatu při 37°C a nechte asi 10 min. temperovat,
- pokud možno rychle přidejte do všech zkumavek po 1 ml roztoku škrobu a foukáním do pipetek krátce promíchejte,
- ihned, tj. v nulovém čase, odeberte mikropipetou vzorky roztoků ze zkumavek a kápněte je do testovacích roztoků jodu. Po jedné minutě odeberte další vzorky a po vhodných časových intervalech (podle aktivity enzymu) další,
- po určité době již nedochází k modrému zabarvení testovacích roztoků. Tuto dobu u jednotlivých pH zaznamenejte do tabulky.

Vyhodnocení:

- převrácenou hodnotu času potřebného na ztrátu modrého zbarvení (je úměrná rychlosti enzymové reakce) vyneste do grafu proti pH.

6.3 Stanovení teplotního optoma α– amylasy.

Princip:

α– amylasa je enzym, štěpící škrob na dextriny a dále až na maltosu. O probíhajícím štěpení svědčí změna barvy produktu, poskytovaného škrobem s roztokem jodu. Během enzymové reakce přechází modré zabarvení škrobu s jodem přes hnědé (dextriny) až do slabě žlutého (maltosa), což je barva samotného jodového reagens.

V určitém rozsahu teplot se enzymové reakce chovají jako obyčejné chemické reakce, tj. jejich rychlost vzrůstá s rostoucí teplotou, jak to odpovídá růstu kinetické energie reagujících molekul. Pro enzymové reakce je však charakteristický pokles rychlosti reakce při vyšších teplotách. Teplota, při které je reakční rychlost největší, se nazývá optimální teplotou nebo teplotním optimem dané reakce. Směrem k nižším teplotám od zmíněného optima klesá reakční rychlost relativně pomalu. Tento proces lze charakterizovat jako proces reverzibilní, zatímco rychlejší

pokles aktivity enzymu při zvyšující se teplotě reakčního prostředí je procesem ireverzibilním. Je to důsledek tepelné denaturace enzymů, charakterizované rozvolňováním vodíkových můstků a s tím spojeného "tavení" proteinových spirál (porušení prostorového uspořádání proteinů).

Potřeby:

- citrát-fosfátový tlumič pH = 6,8
- 1 % roztok škrobu,
- Lugolův roztok
- vhodně zředěná α– amylasa

Postup:

- do sady malých zkumavek odměřte po 1 ml vody a přidejte 1 - 2 kapky roztoku jodu. Tyto testovací roztoky podle potřeby v průběhu práce doplňujte,
- 1 ml vzorku slin pipetujte do 50 ml odměrné baňky a doplňte vodou po rysku. Roztok použijte jako preparát amylasy,
- připravte pět vodních lázní z kádinek 400 - 600 ml: první se směsí ledu a vody (0°C), druhou s vodou 20°C, třetí s vodou 40°C, čtvrtou s vodou 60°C a pátou s vodou 80°C,
- do pěti zkumavek dejte po 5 ml 1 % roztoku škrobu, po 5 ml cirát–fosfátového tlumiče optimálního pH, vložte do nich mikropipety, umístěte je do jednotlivých lázní a nechte asi 10 min. temperovat,
- pokud možno rychle přidejte do všech zkumavek po 1 ml roztoku škrobu a foukáním do pipetek krátce promíchejte,
- ihned, tj. v nulovém čase, odeberte mikropipetou vzorky roztoků ze zkumavek a kápněte je do testovacích roztoků jodu. Po jedné minutě odeberte další vzorky a po vhodných časových intervalech (podle aktivity enzymu) další,
- po určité době již nedochází k modrému zabarvení testovacích roztoků. Tuto dobu pro jednotlivé teploty zaznamenejte do tabulky.

Vyhodnocení:

- převrácenou hodnotu času potřebného na ztrátu modrého zbarvení (je úměrná rychlosti enzymové reakce) vyneste do grafu proti teplotě.
- jednotlivé body proložte plynulou křivkou a odečtěte teplotu pro maximální rychlost reakce.

6.4 Štěpení bílkovin trypsinem.

Princip:

Rychlost enzymové reakce je silně závislá na koncentraci substrátu. V průběhu reakce koncentrace substrátu klesá a reakce se zpomaluje. Při stanovení aktivity enzymu je proto nutno používat tak vysoké koncentrace substrátu, aby jeho úbytek nemohl rychlost reakce významě ovlivnit. Pokles reakční rychlosti lze sledovat např. podle poklesu rychlosti tvorby produktů.

Trypsin je enzym třídy hydrolas, který katalyzuje štěpení peptidových vazeb především v místech karboxylových skupin argininu a lyzinu. Množství uvolněných aminoskupin je úměrné rychlosti enzymové reakce. Volné aminoskupiny lze stanovit formolovou titrací (viz práce 2.2.2.).

Potřeby:

- 5 % roztok želatiny
- preparát trypsinu
- 0,02 M roztok NaOH
- neutralizovaný formaldehyd
- fenolftalein

Postup:

- do kuželové baňky odměřte 100 ml roztoku želatiny, vložte do termostatu a nechte asi 10 min. temperovat při 37°C,
- přidejte 5 ml preparátu trypsinu, promíchejte a ihned odeberte 10 ml do titrační baňky (čas = 0),
- do titrační baňky přidejte 10 ml formaldehydu, 5 kapek fenolftaleinu a titrujte roztokem NaOH do růžového zbarvení,
- po 10 min. odebírejte po 10 ml vzorku a titrujte jako v prvním případě (10 ml formaldehydu + fenolftalein),
- vzorky odebírejte tak dlouho až se ve dvou po sobě následujících titracích spotřeba NaOH již memění.

Vyhodnocení:

- od spotřeby NaOH u každého vzorku odečtěte spotřebu NaOH v čase = 0
- vypočítejte množství rozštěpené bílkoviny u každého vzorku (1 ml 0,02 M NaOH odpovídá 0,02 mmol rozštěpené bílkoviny),
- vypočítané hodnoty vyneste do grafu proti času,
- z tečny k získané křivce v čase = 0 vypočítejte aktivitu enzymového preparátu.

6.5 Stanovení K_m konstanty ureasy.

Závislost rychlosti jednoduché enzymové reakce na koncentraci substrátu lze popsat tzv. M-M rovnicí (Michaelis a Mentenová). V linearizované podobě má tato rovnice tvar

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

kde:

v.....okamžitá rychlost reakce

V.....maximální rychlost reakce

[S]...okamžitá koncentrace substrátu

K_m....Michaelis-Mentenové konstanta

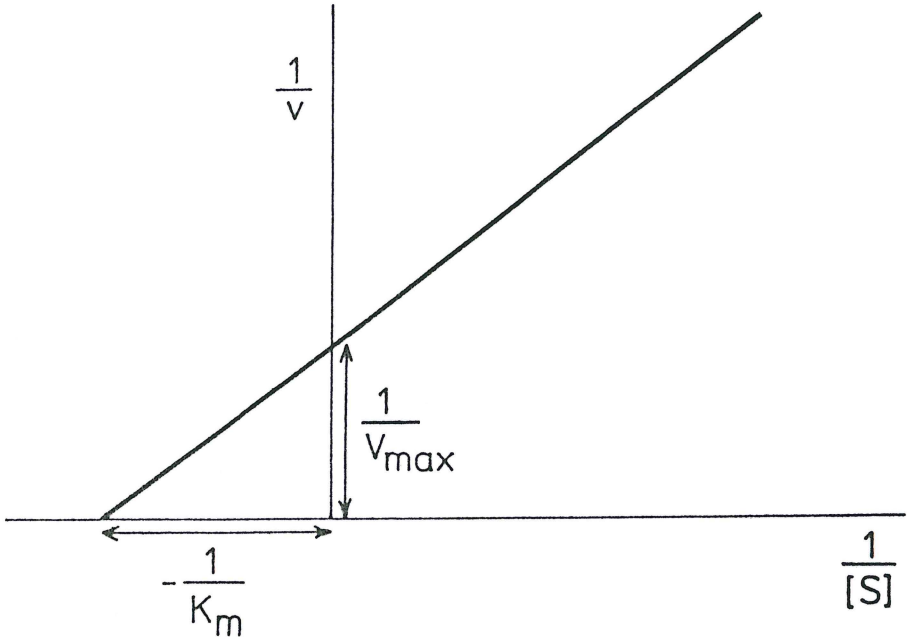
Vyjdeme-li z konstantního množství enzymu a budeme-li postupně zvyšovat koncentraci substrátu, bude se převádět stále větší množství enzymu do komplexu enzym-substrát. Tím bude stoupat reakční rychlost až do okamžiku, kdy bude veškerý enzym přítomen jako komplex

enzym-substrát (enzym bude substrátem nasycen) a reakční rychlost dosáhne maximální hodnoty (V).

Koncentrace substrátu, odpovídající polovině maximální reakční rychlosti, resp. polovičnímu nasycení enzymu substrátem, se označuje K_m.

Hodnota této konstanty vyjadřuje afinitu enzymu k příslušnému substrátu. Čím bude vyšší, tím menší bude afinita enzymu k uvažovanému substrátu a naopak.

Jednou z metod grafického stanovení Michaelisovy konstanty je vynesení reciprokých hodnot reakční rychlosti (1/v) proti koncentraci substrátu (1/[S]). Výsledkem je přímka, procházející prvním a druhým kvadrantem a vytínající úsek na ose y a x. Úsek na ose y je převrácenou hodnotou maximální reakční rychlosti, úsek na ose x záporně vzatou převrácenou hodnotou Michaelisovy konstanty.



Ureasa je enzym třídy hydrolas, který specificky štěpí močovinu na oxid uhličitý a amoniak podle rovnice:

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2\,NH_3$$

Nachází se především v mikroorganismech a semenech některých druhů vyšších rostlin.

Amoniak, vzniklý štěpením močoviny ureasou lze stanovit titračně. Množství uvolněného amoniaku je mírou rychlosti uvedené enzymové reakce.

Potřeby:

- 0,02 M roztok NaOH
- 0,01 M roztok kyseliny sírové
- roztok methylčerveně (indikátor)
- roztok močoviny v 0,2 M fosfátovém tlumiči o koncentracích 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2 mol/l

- 0,1 % roztok chloridu rtuťnatého
- toluen
- preparát ureasy

Postup:

- do 10 kuželových baněk objemu 100 ml napipetujete po 5 ml roztoku močoviny (do prvních dvou baněk 5 ml 0,2 M roztoku močoviny,do druhých dvou po 5 ml 0,1 M roztoku močoviny, do dalších dvou 5 ml 0,05 M roztoku močoviny atd.),
- do všech baněk přidejte jednu kapku toluenu k zamezení bakteriální kontaminace a z každé dvojice označte jednu baňku jako pokusnou a druhou jako kontrolní,
- do kontrolních baněk napipetujte ihned po 1 ml 0,1 % chloridu rtuťnatého (inhibitor) a promíchejte,
- do všech deseti baněk přidejte 3 ml destilované vody a 2 ml enzymového preparátu. (Poměr mezi přidávanou vodou a enzymovým preparátem volte podle aktivity enzymu),
- obsah všech baněk promícháme a baňky vložíme do termostatu k 20 minutové inkubaci při 30°C,
- po skončené inkubaci inhibujte enzym i v pokusných baňkách přídavkem 1 ml 0,1 % chloridu rtuťnatého,
- do všech baněk (včetně kontrolních) přidejte 2 kapky methylčerveně, do kontrolních napipetujte 40 ml 0,01 M roztoku kyseliny sírové a do pokusných 80 ml kyseliny sírové téže koncentrace,
- přebytek kyseliny ztitrujte 0,02 M roztokem NaOH na methylčerveň.

Vyhodnocení:

Všechny potřebné údaje sestavte do následující tabulky:

Počáteční koncentrace močoviny (c_o)	Počet molů rozštěpené močoviny (m)	Koncová koncentrace močoviny (c)	1/c	1/m
0,20 0,10 0,05 0,03 0,02				

Hodnoty m a c vypočítejte podle následujících vzorců:

$$m = 0,01 * (40 + y - x)/1000$$

$$c = (5 * c_o - m)/10$$

kde:

y...spotřeba roztoku NaOH v ml na kontrolní varianty
x...spotřeba roztoku NaOH v ml na pokusné varianty

Na souřadné osy vyneste reciproké hodnoty koncových koncentrací močoviny a rozštěpené močoviny (poslední dva sloupce tabulky). Získáte tím 5 bodů přímky, která prochází 1. a 2. kvadrantem, vytíná úsek na ose y a v záporné hodnotě na ose x.

Podle obrázku odečtěte příslušnou hodnotu z grafu a vypočítejte K_m v mol/l.

V. Příprava činidel.

Barfoedovo činidlo

13,3 g neutrálního krystalického octanu měďnatého se rozpustí ve 200 ml vody, zfiltruje se a přidá se 1,8 ml ledové kyseliny octové.

Biuretové činidlo

3 g vinanu draselno-sodného se rozpustí ve 400 ml 0,2 M roztoku NaOH, přidají se 3 g $CuSO_4.5\ H_2O$ a po rozpuštění ještě 5 g KI a doplní se 0,2 M roztokem NaOH do 1000 ml.

Fehlingovo činidlo

roztok I - 6,928 g pentahydrátu síranu měďnatého ve 100 ml.

roztok II - 36,4 g tetrahydrátu vinanu draselno-sodného a 10 g hydroxidu sodného ve 100 ml.

Před upotřebením se smísí oba roztoky v poměru 1 : 1.

Hanušův roztok

V porcelánove misce se rozetře 6,35 g jodu s 50 - 100 ml ledové kyseliny octové a za stálého roztírání se přikapou 4 g bromu. roztok se převede do odměrné baňky a doplní kyselinou octovou do 500 ml.

Lugolův roztok

40 g KI se rozpustí v 60 ml vody a přidá se 20 g jodu. Roztok se doplní do 1000 ml.

Nelsonovo činidlo (kyselina arsenomolybdenová)

12,5 g molybdenanu amonného se rozpustí ve 225 ml vody a přidá se 10,5 ml koncentrované kyseliny sírové, po promíchání se přidá roztok 1,5 g arseničnanu sodného ve 12,5 ml vody a inkubuje se 48 hodin při 37°C.

Somogyiho činidlo

roztok I - 25 g uhličitanu sodného (bezvodého), 25 g vinanu draselno-sodného a 200 g bezvodého síranu sodného se rozpustí za horka ve vodě a objem se doplní na 1000 ml

roztok II -15 g pentahydrátu síranu měďnatého se rozpustí ve vodě, okyselí kapkou konc. kyseliny sírové a doplní se na 100 ml

Činidlo vznikne smísením roztoku I a II v poměru 25 : 1 (připraví se vždy čerstvé)

Tollensovo činidlo

Smísí se stejné objemy 10 % roztoku dusičnanu stříbrného a 2 M roztoku NaOH a přidává se po kapkách amoniak, až se sraženina oxidu stříbrného právě rozpustí.

Poznámka: Činidlo se musí připravovat vždy čerstvé a po provedené reakci se ihned vyleje, neboť ve směsi stříbrných solí s amoniakem vzniká prudce výbušné třaskavé stříbro.

Název:	**Biochemie (Cvičení)**
Autor:	**Ing. Jiří Špička, CSc.**
Vydavatel:	**Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta České Budějovice**
Nakladatel:	**JU ZF České Budějovice**
Vydání:	**1. vydání, 1996**
Počet stran:	**50**
AA:	**7,6**
Náklad:	**100 výtisků**

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou v redakci nakladatelství.

Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají autoři.

ISBN 80-7040-181-8

