

Datum Jméno Kroužek

Návod z praktického cvičení z biochemie

Téma: Sacharidy

1. Reakce sacharidů

Zkoumané vzorky:

Glukóza	10 g/l
Fruktóza	10 g/l
Xylóza	10 g/l
Maltóza	10 g/l
Sacharóza	10 g/l
Škrob	10 g/l

Molischova reakce


Reagencie:

a) Molischovo činidlo:

roztok α -naftolu 100 g/l v 96 % ethanolu

α -naftol  

ethanol 

b) Koncentrovaná kyselina sírová 

Pracovní postup:

Do zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	Zkumavka 1 FRUKTÓZA	Zkumavka 2 MALTÓZA	Zkumavka 3 NEZNÁMÝ VZOREK	Zkumavka 4 SLEPÁ ZKOUŠKA
Fruktóza	cca 1 ml	–	–	–
Sacharóza	–	cca 1 ml	–	–
Neznámý vzorek	–	–	cca 1 ml	–
Destilovaná voda	–	–	–	cca 1 ml
Molischovo činidlo	cca 2 kapky	cca 2 kapky	cca 2 kapky	cca 2 kapky

Obsah ve zkumavkách promíchejte. Poté opatrně podvrstvěte koncentrovanou kyselinou sírovou.
V přítomnosti sacharidu se na styčné ploše vytvoří fialový prstenec.

Bialova reakce

Reagencie:

Bialovo činidlo:

0,3 g orcinolu ve 100 ml 30 % HCl a 5 kapek FeCl₃ 100 g/l 

Pracovní postup:

	Zkumavka 1 XYLÓZA	Zkumavka 2 GLUKÓZA	Zkumavka 3 NEZNÁMÝ VZOREK	Zkumavka 4 SLEPÁ ZKOUŠKA
Xylóza	cca 5 kapek	–	–	–
Glukóza	–	cca 5 kapek	–	–
Neznámý vzorek	–	–	cca 5 kapek	–
Destilovaná voda	–	–	–	cca 5 kapek
Bialovo činidlo	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml

Zkumavky vložte do horké vodní lázně a sledujte změnu zbarvení.
Po 2 – 3 minutách odečtěte výsledky.

Selivanova reakce

Reagencie:

Selivanovo činidlo:

roztok resorcinolu 5 g/l v kyselině chlorovodíkové 200 g/l

resorcinol 

kyselina chlorovodíková 

Pracovní postup:

Do zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi.

	Zkumavka 1 GLUKÓZA	Zkumavka 2 FRUKTÓZA	Zkumavka 3 SACHARÓZA	Zkumavka 4 NEZNÁMÝ VZOREK	Zkumavka 5 SLEPÁ ZKOUŠKA
Glukóza	cca 0,5 ml	–	–	–	–
Fruktóza	–	cca 0,5 ml	–	–	–
Sacharóza	–	–	cca 0,5 ml	–	–
Neznámý vzorek	–	–	–	cca 0,5 ml	–
Destilovaná voda	–	–	–	–	cca 0,5 ml
Selivanovo činidlo	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml	cca 1,5 ml

Zkumavky vložte do vroucí vodní lázně a sledujte změnu zbarvení.
Po 1 – 2 minutách odečtěte výsledek.

Benedictova reakce

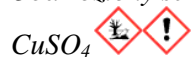
Reagencie:

Benedictovo činidlo:

$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ 17,3 g se rozpustí asi ve 100 ml destilované vody.

Na_2CO_3 100 g a citronan sodný 173 g se rozpustí asi v 700 ml destilované vody.

Oba roztoky se smísí a objem se doplní destilovanou vodou do 1 l



Pracovní postup:

	Zkumavka 1 GLUKÓZA	Zkumavka 2 MALTÓZA	Zkumavka 3 SACHARÓZA	Zkumavka 4 Kyselina ASKORBOVÁ	Zkumavka 5 NEZNÁMÝ VZOREK	Zkumavka 6 SLEPÁ ZKOUŠKA
Benedictovo činidlo	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml
Glukóza	cca 4 kapky	–	–	–	–	–
Maltóza	–	cca 4 kapky	–	–	–	–
Sacharóza	–	–	cca 4 kapky	–	–	–
Kyselina askorbová	–	–	–	cca 4 kapky	–	–
Neznámý vzorek	–	–	–	–	cca 4 kapky	–
Destilovaná voda	–	–	–	–	–	cca 4 kapky

Obsah ve zkumavkách promíchejte a vložte do vroucí vodní lázně.
Po 3 – 4 minutách odečtěte výsledek. Hodnotíme změnu zbarvení a vznik sraženiny.

Barfoedova reakce

Reagencie:

Barfoedovo činidlo:

13,3 g neutrálního krystalického octanu měďnatého rozpustíme v 200 ml destilované vody, přefiltrujeme a přidáme 1,8 ml ledové kyseliny octové,

ledová kyselina octová , octan měďnatý 

Pracovní postup:

	Zkumavka 1 GLUKÓZA	Zkumavka 2 MALTÓZA	Zkumavka 3 SACHARÓZA	Zkumavka 5 NEZNÁMÝ VZOREK	Zkumavka 4 SLEPÁ ZKOUŠKA
Glukóza	cca 0,5 ml	–	–	–	–
Maltóza	–	cca 0,5 ml	–	–	–
Sacharóza	–	–	cca 0,5 ml	–	–
Neznámý vzorek	–	–	–	cca 0,5 ml	–
Destilovaná voda	–	–	–	–	cca 0,5 ml
Barfoedovo činidlo	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml	cca 1 ml

Zkumavky vložte do vroucí vodní lázně.
Po 2 – 3 minutách odečtěte výsledek.

Reakce s Schiffovým činidlem

- a) Formaldehyd 5 g/l 
- b) Schiffovo činidlo (fuchsin odbarvený hydrogensířičitanem sodným) 

Pracovní postup:

	Zkumavka 1 GLUKÓZA	Zkumavka 2 FORMALDEHYD	Zkumavka 3 SLEPÁ ZKOUŠKA
Glukóza	cca 1 ml	–	–
Formaldehyd	–	cca 1 ml	–
Destilovaná voda	–	–	cca 1 ml
Schiffovo činidlo	cca 2 kapky	cca 2 kapky	cca 2 kapky
Obsah ve zkumavkách promíchejte a odečtěte výsledek.			

Reakce na průkaz škrobu

Reagencie:

Lugolův roztok:

roztok jódu 3 g/l v roztoku jodidu draselného 50 g/l

jód 

Pracovní postup:







	Zkumavka 1 GLUKÓZA	Zkumavka 2 ŠKROB	Zkumavka 3 SLEPÁ ZKOUŠKA
Glukóza	cca 1 ml	–	–
Škrob	–	cca 1 ml	–
Destilovaná voda	–	–	cca 1 ml
Lugolův roztok	cca 2 kapky	cca 2 kapky	cca 2 kapky
Obsah ve zkumavkách promíchejte a odečtěte výsledek.			

2. Analýza neznámého vzorku

Do schématu v protokolu doplňte výsledky analýz neznámého vzorku z úlohy 1. Na základě provedené analýzy blíže charakterizujte neznámý vzorek, např. zda se jedná o redukující sacharid či neredukující, hexózu nebo pentózu apod.

3. Tenkovrstevná chromatografie sacharidů

Reagencie:

- a) Vzorky:
Standardy – vodné roztoky galaktózy, maltózy a laktózy 10 g/l
Neznámý vzorek
- b) Ethylacetát 
- c) Isopropanol 
- d) Difenylamin 
- e) Anilin 
- f) Kyselina fosforečná 85 % 
- g) Aceton 

Detekční činidlo:

4 g difenylaminu, 4 ml anilinu a 20 ml 85 % kyseliny fosforečné se rozpustí ve 200 ml acetonu.

Pracovní postup:

1. Příprava vyvíjecí směsi

Do chromatografické komory odměříme 15 ml ethylacetátu, 12 ml isopropanolu a 3 ml destilované vody, uzavřeme a promícháme. Komoru necháme asi 15 minut sytit. Pracujeme v zapnuté digestoři.

2. Příprava desky a nanášení vzorků

Na desku Silufolu o šířce 7,5 cm vyznačíme tužkou asi 1,5 cm od dolního okraje 4 body nanášek (starty). Vzdálenost mezi nimi je asi 1,5 cm. Na horním okraji desky nad příslušnými starty označíme kódy nanášených látek. Do 3 označených startů nanášíme asi 5 μ l standardních roztoků galaktózy, maltózy a laktózy, do 4. startu neznámý vzorek. Velikost nanášek by neměla překročit 0,5 cm. Starty necháme dobře oschnout.

3. Vyvíjení

Desku opatrně vložíme do chromatografické komory s připravenou vyvíjecí soustavou a ihned uzavřeme. Starty nesmějí být ponořeny. Chromatogramy necháme vyvíjet cca 1,5 hodiny. Poté desku vyjmeme a vysušíme v sušárně vyhřáté na 85 °C.




4. Detekce

Vysušenou desku postříkáme detekčním činidlem a pak vložíme opět na 2 – 3 minuty do vyhřáté sušárny. Po zahřátí vystoupí barevné skvrny cukrů. Detekci provádíme v zapnuté digestoři.

V laboratoři nesmí hořet otevřený plamen!

4. Inverze sacharózy

Reagencie:

- a) Roztok sacharózy o neznámé koncentraci
- b) Koncentrovaná HCl 
- c) Benedictovo činidlo  

Pracovní postup:

1. Změření optické otáčivosti roztoku sacharózy

Polarimetrickou trubici naplníme roztokem sacharózy a změříme optickou otáčivost.

Po změření optické otáčivosti polarimetrickou trubici vyprázdníme a vypláchneme ji destilovanou vodou.

2. Hydrolýza sacharózy

Do kádinky odměříme 30 ml roztoku sacharózy a přidáme 5 kapek koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Na kádince označíme výšku hladiny. Okyselený roztok sacharózy zahříváme cca 10 minut, poté necháme roztok vychladnout. Odpařenou tekutinu doplníme destilovanou vodou ke značce a promícháme.

3. Změření optické otáčivosti v hydrolyzátu sacharózy

Polarimetrickou trubici naplníme ochlazeným roztokem hydrolyzátu sacharózy a změříme optickou otáčivost. Poté roztok přelijeme zpět do kádinky a trubici vypláchneme destilovanou vodou.

4. Průkaz redukujících monosacharidů v hydrolyzátu sacharózy

V roztoku sacharózy před hydrolýzou a v hydrolyzátu sacharózy provedeme Benedictovu zkoušku.

Vyhodnocení:

1. Vypočítejte výchozí koncentraci roztoku sacharózy

K výpočtu koncentrace sacharózy použijte vzorec:

$$w(g/l) = \frac{\alpha \times 100}{[\alpha]_D^{20^\circ C} \times l}$$

Délka polarimetrické trubice je 0,2 m.

Hodnoty specifické otáčivosti:

Pro sacharózu: $[\alpha]_D^{20^\circ C} = +66,5^\circ$

2. Ověřte, zda proběhla kompletní hydrolýza sacharózy

Vypočítejte optickou otáčivost, která odpovídá kompletní hydrolýze sacharózy, a srovnejte ji.

Vypočítejte optickou otáčivost, která odpovídá kompletní hydrolýze sacharózy, a srovnejte ji s naměřenou hodnotou.