

Biserka Knežević

VJEŽBE IZ BIOKEMIJE

**priručnik za učenike
kemijskih tehničkih škola**

kemijski tehničar i ekološki tehničar
(za internu uporabu)

Prirodoslovna i grafička škola,
Rijeka, 2011.

PREDGOVOR

Biokemija se u nekoliko posljednjih desetljeća ubrzano razvija i bez sumnje je postala veoma važna znanost u rješavanju mnogih pitanja života. Njezine spoznaje od velikog su značaja u dijagnostici i medicini, poljoprivredi i zaštiti okoliša, farmaceutici i dijetetici, psihologiji i vojnoj strategiji.

Biokemija je znanost kod koje je eksperimentalni rad od izuzetne važnosti. Laboratorijska nastava bitno doprinosi ukupnosti prirodnoznanstvenog obrazovanja jer je eksperiment temelj, potvrda i poticaj znanosti.

Ovaj biokemijski priručnik obuhvaća osnovne metode ispitivanja, prepoznavanja i određivanja najvažnijih biokemijskih molekula a namijenjen je učenicima srednjih škola u kojima se izvode vježbe iz biokemije. Sadržaj priručnika nastao je preuzimanjem teksta i vježbi iz ranije literature (popis autora na kraju priručnika) te je oblikovan i prilagođen nastavnom planu i programu Biokemije s vježbama. Priručnik nas upoznaje s osnovnim metodama kvalitativnog i kvantitativnog ispitivanja biokemijskih spojeva a podijeljen je u sedam cjelina koje se odnose na ispitivanje vitamina, alkaloida, lipida, ugljikohidrata, proteina, enzima i nukleinskih kiselina.

Zbog slabe opremljenosti većine školskih laboratorija, navedene su najjednostavnije metode ispitivanja ali koje istovremeno omogućuju da se shvati upravo bit samog ispitivanja (na čemu se temelje određena dokazivanja), iz čega učenik lako može sam donositi valjane zaključke utemeljene na stečenom znanju i na vlastitom promatranju.

Osim ovladavanja opisanim radnim tehnikama od učenika se očekuje da izoštri sposobnost zapažanja i shvati da su biološke molekule izuzetno osjetljive na promjene u okolini. Zbog toga će razumjeti važnost pridržavanja svih pojedinosti navedenih u propisima i razvijati vještinu preciznog izvođenja svih mjerenja. Učenici će naučiti bilježiti svoja zapažanja tokom rada te prikazati i obrazložiti svoje rezultate rada.

U priručniku je navedena 21 vježba. Uz svaku vježbu, nakon uvodnog dijela, istaknut je zadatak rada, naveden je pribor i potrebne kemikalije te detaljan opis same vježbe. Kod kvantitativnih određivanja naveden je primjer izračunavanja rezultata. Tamo gdje je potrebno ucrtane su tablice (ukupno 14) za tabelarni prikaz rezultata. Kod većine vježbi prikazane su i odgovarajuće aparature te zajedno s dijagramima ima ukupno 13 slika.

SADRŽAJ

1.	VITAMINI	4
	1. vježba: Dokazivanje vitamina (C, A, D)	5
2.	ALKALOIDI	8
	2. vježba: Izolacija kofeina iz čaja	9
3.	MASTI I ULJA	10
	3.1. SAPONIFIKACIJA	11
	3. vježba: Saponifikacija ulja	13
	3.2. JODNI BROJ	15
	4. vježba: Određivanje jodnog broja	17
	3.3. MASTI U ŽIVEŽNIM NAMIRNICAMA	19
	3.3.1. ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASTI	19
	5. vježba: Ekstrakcija slobodnih masti metodom po Grossfeld-u	20
	3.3.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH MASTI	22
	6. vježba: Određivanje ukupnih masti metodom po Weibull-Stoldt-u	24
	3.3.3. ODREĐIVANJE MASTI U MLIJEKU	26
	7. vježba: Određivanje masti u mlijeku metodom po Gerberu	26
4.	UGLJIKOHIDRATI	28
	4.1. KVALITATIVNO DOKAZIVANJE UGLJIKOHIDRATA	29
	8. vježba: Kvalitativno dokazivanje jednostavnih ugljikohidrata	29
	4.2. GRAVIMETRIJSKO ODREĐIVANJE MONOSAHARIDA	34
	9. vježba: Gravimetrijsko određivanje monosaharida metodom po Grossfeld-u	35
	4.3. VOLUMETRIJSKO ODREĐIVANJE MONO- I DISAHARIDA	38
	10. vježba: Volumetrijsko određivanje monosaharida i disaharida	39
	4.4. DOKAZIVANJE ŠKROBA	42
	11. vježba: Dokazivanje i hidroliza škroba	42
	4.5. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE CELULOZE	44
	12. vježba: Određivanje celuloze metodom po Scharrer-Kurschner-u	45
5.	AMINOKISELINE I PROTEINI	47
	5.1. KVALITATIVNO DOKAZIVANJE PROTEINA	48
	13. vježba: Dokazivanje aminokiselina i proteina	48
	5.2. KROMATOGRAFIJA AMINOKISELINA	52
	14. vježba: Tankoslojna kromatografija aminokiselina	53
	5.3. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEINA	55
	15. vježba: Određivanje bjelančevina metodom po Kjeldahl-u	55
	5.4. POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA AMINOKISELINA	59
	16. vježba: Potenciometrijska titracija aminokiselina	61
6.	ENZIMI	63
	17. vježba: Specifičnost djelovanja enzima	64
	18. vježba: Utjecaj aktivatora i inhibitora na aktivnost enzima	65
	19. vježba: Utjecaj temperature na aktivnost enzima	67
	20. vježba: Utjecaj pH na aktivnost enzima	68
7.	NUKLEINSKE KISELINE	70
	21. vježba: Izolacija nukleinskih kiselina	71
8.	PRIPREMA NEKIH VAŽNIJIH REAGENSA	72
9.	LITERATURA	74

1. VITAMINI

Vitamini su organski spojevi koji su u malim količinama nužni za normalan rad i razvoj ljudskog i životinjskog organizma. Sudjeluju u mnogim važnim metaboličkim procesima kao što su razgradnja hrane koju unosimo u organizam, sinteza enzima i staničnih tkiva, održavanje zaštitnih svojstava organizma prema bolestima, alergijama, infekcijama i dr.

Prvi vitamin otkriven je 1911. godine. Kazimir Funk je iz ljuske riže izolirao kristalnu tvar i nazvao je vitamin (latinski vita = život, amin = amino spoj) zato što je pokazivala visoki fiziološki efekat u liječenju bolesti beri-beri a sadržavala je aminoskupinu. I vitamini koji su otkriveni kasnije, iako nisu sadržavali aminoskupinu, zadržali su stari naziv.

Kemijska priroda vitamina je različita i većina vitamina ima relativno složenu strukturu. Dije se prema topljivosti:

- a) vitamini topljivi u mastima i uljima (A, D, E i K)
- b) vitamini topljivi u vodi (C i vitamini B-skupine, pantotenska kiselina, folna kiselina)

Većinu vitamina organizam ne može sam sintetizirati nego ih mora unositi putem hrane u obliku gotovog vitamina ili u obliku provitamina iz kojeg, u organizmu, nekom jednostavnom reakcijom nastaje odgovarajući vitamin. (Organizam može sam sintetizirati određenu količinu K vitamina i neke vitamine iz B-serije).

Dnevne potrebe ljudi prema vitaminima su vrlo različite (od 3 μg za vitamin B₁₂ do 100 mg dnevno za vitamin C).

Stanja koja se javljaju zbog potpunog nedostatka pojedinih vitamina u organizmu nazivaju se avitaminozama, a kada ih je nedovoljno hipovitaminozama. Hipervitaminoza se javlja kada se u organizam unese količina vitamina veća od potrebne. To nije toliko opasno ako se radi o vitaminima topljivim u vodi jer se oni lako izlučuju iz organizma putem bubrega. Međutim, kod vitamina topljivih u mastima, količine koje se ne utroše u metaboličkim procesima, u organizmu se odlažu u tkivima, najviše u jetri, i mogu izazvati toksične reakcije.

1. vježba

Dokazivanje vitamina (C, A i D)

Zadatak vježbe: Predviđenim reakcijama dokazati vitamine C, A i D u zadanim uzorcima

Pribor: epruvete, drveni stalak, kapaljke, laboratorijska čaša od 250 cm³, drvena štipaljka

Kemikalije:

otopina FeCl₃

otopina K₃[Fe(CN)₆]

otopina J₂/KJ

otopina KmnO₄

otopine Fehling I i II

otopina AgNO₃,

otopina NH₄OH

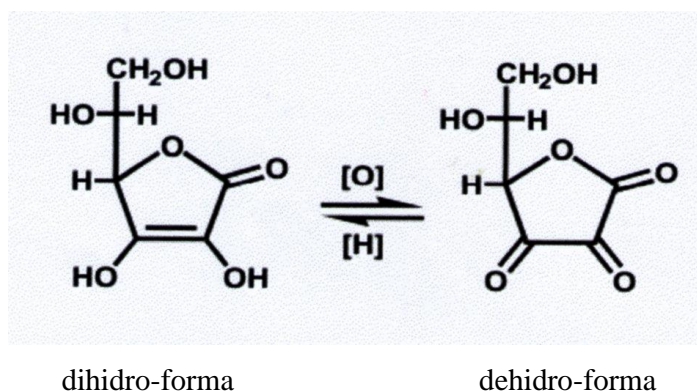
otopina NaOH

(sve otopine su 1 %-tne)

C – vitamin ili L (+) askorbinska kiselina

C vitamin je lakton 2,3-diketogulonske kiseline. Javlja se kao tipični redoks-sistem živih organizama i dolazi u dihidro- i dehidro-formi. Dehidro-askorbinska kiselina također pokazuje vitaminsko djelovanje, ali mnogo manje.

(Laktone su ciklički esteri nastali reakcijom karboksilne skupine sa OH-skupinom γ C-atoma.



L (+) askorbinska kiselina

Čisti C-vitamin je bijela kristalinična tvar, vrlo kisela okusa, dobro topljiv u vodi. Vodena otopina je nepostojana.

Po kemijskoj strukturi C-vitamin nalikuje na šećer, ali je daleko jači reducens od šećera.

1. Dokazivanje vitamina C

Dokazivanje se zasniva na kiselim ili reducirajućim svojstvima spoja.

Postupak:

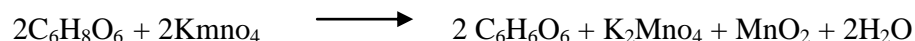
b) Dokazivanje sa otopinama FeCl_3 ili $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Otopini C-vitamina (u epruveti) dodajte 1-2 kapi razrijeđene otopine FeCl_3 ili $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Boja reagensa se odmah gubi. C-vitamin reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} , a sam se pri tome oksidira iz dihidro- u dehidro-formu.



b) Dokazivanje s otopinom I_2 ili otopinom KMnO_4

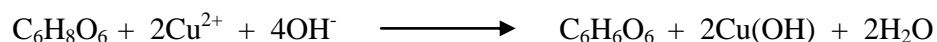
Reakcija teče na isti način kao i prethodna tj. dolazi do obezbojenja dodanih otopina.



b) Dokazivanje s Fehlingovim otopinama

Vodena otopina C-vitamina već u hladnom reducira Fehlingov reagens pri čemu se odmah izluči žuti talog $\text{Cu}(\text{OH})$. Ako se nastali talog zagrije, stvara se crveni talog Cu_2O .

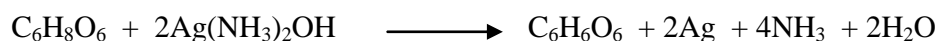
Vježba se izvodi isto kao kod određivanja ugljikohidrata.



b) Dokazivanje s Tolensovim reagensom

Otopina C-vitamina reducira ione srebra iz vodene otopine AgNO_3 do elementarnog srebra koje se izlučuje na stijenkama epruvete.

Vježba se izvodi isto kao kod određivanja ugljikohidrata.



2. Dokazivanje vitamina A

Vitamin A spada u vitamine topljive u ulju. Potreban je za održavanje niza funkcija u organizmu. Djeluje na funkciju vida i regulira rast i razvoj organa. Obnavlja epitel sluznice i kože.

a) Djelovanje koncentrirane H_2SO_4 na vitamin A

Na suho satno staklo stavite 5 kapi otopine ribljeg ulja u kloroformu (1 : 5). Dodajte kap konc. H_2SO_4 . Stvara se crveno-ljubičasta boja.

b) Djelovanje antimonovog(III)-klorida na vitamin A

Na suho satno staklo stavite jednu kap ribljeg ulja i dvije kapi otopine antimonovog(III)-klorida u kloroformu. Sadržaj promiješajte staklenim štapićem. Pojavljuje se plava boja koja ukazuje na prisutnost vitamina A u ribljem ulju.

3. Dokazivanje vitamina D

D-vitamin također spada u vitamine topljive u uljima. To nije jedinstven vitamin već postoji nekoliko varijanti slične građe i svi obavljaju iste funkcije. Unosi se hranom ili nastaje u koži djelovanjem ultraljubičastih sunčevih zraka. Osnovna mu je funkcija regulacija okoštavanja tkiva i odnosa kalcij – fosfor u organizmu, pravilnog razvoja kostiju i zubi i utječe na rast djece.

a) Djelovanje broma na vitamin D

Na suho satno staklo stavite 1 kap ribljeg ulja i 2 kapi otopine broma u kloroformu i promiješajte štapićem. Nakon nekog vremena pojavljuje se zeleno-plava boja.

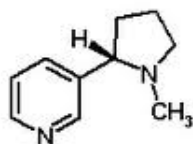
b) Djelovanje anilina na vitamin D

U suhu epruvetu stavite 4-5 kapi ribljeg ulja i 5-6 kapi kloroforma. Promiješajte staklenim štapićem pa dodajte 1-2 kapi anilina i lagano zagrijavajte. Za vrijeme zagrijavanja žuta emulzija prelazi u crvenu.

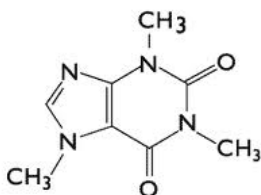
2. A LKALOIDI

Alkaloidi su heterociklički organski spojevi koji u prstenu sadrže jedan ili više atoma dušika i zbog toga imaju bazična svojstva. Vrlo su rašireni u biljnom svijetu gdje uglavnom nastaju iz aminokiselina. Za ljudski organizam većina alkaloida je otrovna jer izazivaju značajne fiziološke efekte. U malim količinama koriste u medicinske svrhe ali se na žalost vrlo često i zlorabljavaju. Alkaloidi koji djeluju na živčani sustav nazivaju se droge a prema načinu djelovanja dijele se u nekoliko skupina: (M. Sikirica, 1996.)

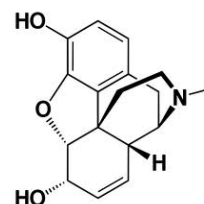
- stimulansi** – povećavaju osjetljivost živčanog sustava, ubrzavaju reakcije i stvaraju osjećaj snage (primjeri su nikotin iz duhana, kofein kojeg ima u kavi, čaju i kakau a dodaje se i u coca-colu, kinin koji se dodaje različitim bezalkoholnim pićima kao što je tonik, te kokain)
- hipnotici** – smirujuće droge koje smanjuju osjetljivost živčanog sustava i usporavaju reakcije na podražaje iz okoline. U tu se kategoriju svrstavaju mnogobrojne sintetičke droge, koje se koriste kao tablete za spavanje ili za umirenje (npr. diazepam i klorazepam)
- narkotici** – ublažavaju bolove za što se primjenjuju u medicinske svrhe ali se i zlorabljavaju (najpoznatiji su alkaloidi dobiveni iz opijuma: morfin, kodein, heroin)
- psihodelične droge** – niti stimuliraju niti usporavaju reakcije živčanog sustava već izazivaju halucinacije i psihoze. Osobe pod utjecajem tih droga vide, čuju i osjećaju nepostojeće. U tu kategoriju pripadaju npr. LSD, PCP, marihuana i dr.



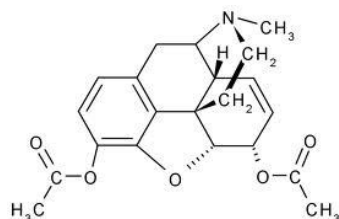
Nikotin



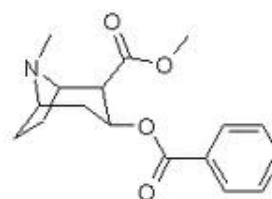
Kofein



Morfin



Heroin



Kokain

Strukturne formule nekih poznatijih alkaloida

2. vježba

Izolacija kofeina iz čaja

Zadatak: Izolirati kofein iz čaja i odrediti maseni udio.

Kemikalije:

2 vrećice čaja	kloroform
kalcijev ili natrijev karbonat	etanol ($\varphi=96\%$)

Pribor: Erlenmayerova tikvica od 300 cm^3 , Liebigovo hladilo, metalni stalak, hvataljke, plamenik, mrežica, vodena kupelj, lijevak za odjeljivanje, stakleni lijevak, menzura od 25 cm^3 , tikvica za destilaciju, lula, čaša od 400 cm^3 , Erlenmayerova tikvica od 100 cm^3 .

Postupak: Izvažite 6 g čaja i prenesite u Erlenmayerovu tikvicu od 300 cm^3 . Dodajte 6 g kalcijevog karbonata (ili 4,5 g natrijevog karbonata) i 60 cm^3 vode. Smjesu plamenikom zagrijavajte uz povratno hladilo oko 20 minuta. Vruću otopinu filtrirajte preko naboranog filter papira, filtrat ohladite na sobnu temperaturu, prebacite u lijevak za odjeljivanje i ekstrahirajte tri puta sa po 15 cm^3 kloroforma. Ekstrakcija se mora provoditi vrlo blago jer bi se snažnim izmućkivanjem stvorila emulzija koja se ne bi mogla odijeliti.

Sva tri ekstrakta (slojevi sa kloroformom) skupljajte u suhu i prethodno izvaganu tikvicu za destilaciju od 100 cm^3 . Kloroform uklonite destilacijom preko vodene kupelji. Ostatak u destilirki sušite u sušioniku na temperaturi od 50°C kroz pola sata, ohladite i izvažite.

Prekristalizacija se može provesti pomoću etanola. **(Zagrijavanje i ekstrakciju raditi u digestoru. Kod ekstrakcije obavezna je upotreba zaštitnih rukavica)**

Proračun:

masa čaja:	$m(\text{čaj}) =$
masa prazne destilirke:	$m(\text{destilirka}) =$
masa destilirke i kofeina:	$m(\text{destilirka} + \text{kofein}) =$
masa kofeina:	$m(\text{kofein}) =$

maseni udio kofeina: $w(\text{kofein, čaj}) = \frac{m(\text{kofein})}{m(\text{čaj})} * 100$

3. MASTI I ULJA

Masti i ulja spadaju u jednostavne lipide. Mogu biti biljnog i životinjskog podrijetla a važan su prehrambeni artikl čovjeka. Ulja nastaju u raznim dijelovima biljaka, najviše u sjemenkama i plodovima, a masti u masnom tkivu životinja. Biljke iz kojih se dobivaju ulja nazivaju se uljarice a najvažnije su suncokret, soja, uljana repica, maslina, kokosova palma, lan, konoplja, kukuruzne klice.

Kemijski sastav

Po kemijskom sastavu ulja i masti su esteri trovalentnog alkohola glicerola i masnih kiselina. Na osnovu tog sastava često ih nazivamo triacilgliceridima.

U mastima su pretežno zastupljene zasićene masne kiseline (od kojih su najvažnije palmitinska $C_{15}H_{31}COOH$ i stearinska $C_{17}H_{35}COOH$) a u uljima prevladavaju nezasićene masne kiseline (npr. oleinska $C_{17}H_{33}COOH$ i linoleinska $C_{17}H_{31}COOH$). Kod prirodnih masti i ulja u jednoj molekuli najčešće su različite masne kiseline i uvijek sadrže paran broj C atoma. Osim triacilglicerida prirodne masti sadrže i neke druge biološki važne spojeve kao što su vitamini (A,D,E,K), ili su vezani u obliku glikolipida i lipoproteina.

Fizikalna svojstva

Fizikalna svojstva ulja i masti (kao što su gustoća, talište, vrelište, indeks loma) ovise o svojstvima onih masnih kiselina koje su najviše zastupljene. Jedno od važnijih svojstava masti i ulja je njihova topljivost. Topljive su u nepolarnim organskim otapalima a najbolja otapala su eter, petroleter, benzen, ksilen, kloroform, tetraklorugljik, trikloretilen i dr.

Kemijska svojstva

Kod masti i ulja moguće su određene kemijske reakcije a najveći značaj imaju reakcije hidrolize, adicije i oksidacije. Adicija i oksidacija uglavnom se odvijaju kod spojeva sa nezasićenim masnim kiselinama a hidroliza je moguća i kod jednih i kod drugih.

1. Reakcije hidrolize

Ovim reakcijama masti i ulja se razgrađuju na glicerol i masne kiseline. Mogu se provesti u kiseloj sredini (pomoću kiselina), lužnatoj sredini (pomoću baza) te uz pomoć enzima kao što je hidroliza masti u živim organizmima. U reakciji s bazama, razgradnjom masti i ulja nastaju sapuni pa se takva hidroliza naziva saponifikacija.

2. Reakcije adicije moguće su ako su u sastavu masnoća zastupljene nezasićene masne kiseline. Mogu se adirati molekule halogenih elemenata, vodika, H_2O_2 , H_2SO_4 itd. Ove reakcije imaju i važnu praktičnu primjenu. Koriste se u

- a) analitičkoj kemiji za identifikaciju masti (npr. određivanje jednog broja)
- b) kod tehnoloških procesa prerade ulja i masti (npr. hidrogeniranje u proizvodnji margarina)

3. Reakcije oksidacije sa kisikom iz zraka na mjestima dvostruke veze. Moguća su dva slučaja.

a) ukoliko molekule masti sadrže mali broj dvostrukih veza, na tim mjestima dolazi do razgradnje pa nastaju aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline s manjim brojem C atoma a takve molekule imaju jak i neugodan miris. Ta pojava naziva se ranjetljivost ili užeglost.

b) Kod molekula ulja koje sadrže velik broj dvostrukih veza, djelovanjem kisika iz zraka javljaju se reakcije polimerizacije što ulju daje svojstvo sušivosti. Ako se ulje nanese u tankom sloju na neku podlogu i izloži utjecaju sunčevih zraka, stvrdnut će se u čvrstu kožicu ili film. Na ovom svojstvu temelji se upotreba sušivih ulja za izradu uljnih veziva – firnisa, koji se primjenjuju u industriji boja i lakova.

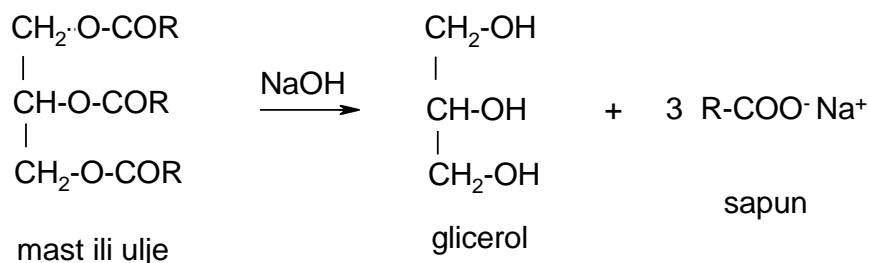
3.1. SAPONIFIKACIJA

Saponifikacija je postupak razgradnje masti i ulja pomoću lužina. Ovakvom reakcijom iz masti i ulja nastaju glicerol i soli masnih kiselina koje se zovu sapuni pa je cijeli postupak po tome nazvan saponifikacija.

Osim saponifikacije postoje i drugi načini razgradnje masti i ulja i to:

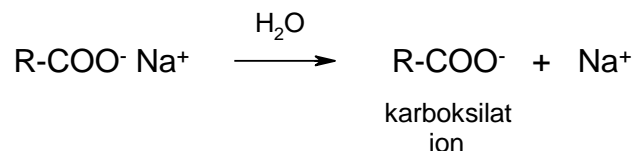
- a) katalitička razgradnja - primjenjuje se u industriji a izvodi se pomoću oksida nekih metala
- b) enzimska razgradnja – odvija se u živom organizmu pod utjecajem enzima lipaze

Alkalna hidroliza, tj. saponifikacija, uglavnom se izvodi pomoću NaOH ili KOH. Tom reakcijom nastaju odgovarajuće soli masnih kiselina, sapuni. Budući da su samo alkalne soli masnih kiselina topljive u vodi, ti su spojevi od velikog komercijalnog značaja.



Sapuni su smjesa soli masnih kiselina. Komercijalnu važnost imaju uglavnom natrijevi i kalijevi sapuni koji su ujedno i jedini topljivi u vodi. Natrijevi sapuni su tvrdi i služe za pranje a kalijevi su mekani i uglavnom se koriste kao tekući sapuni ili u industriji kod proizvodnje raznih šampona i drugih sredstava za pranje.

U vodi sapun disocira na sljedeći način :



U karboksilat ionu se razlikuje hidrofilni dio (-COO⁻ skupina) i hidrofobni dio (ugljkovodični dio). Hidrofilni dio, prilikom pranja, se kvasi vodom a sa masnoćama se ne miješa. Hidrofobni dio se ponaša obrnuto, tj. ne miješa se sa vodom a miješa se sa masnoćama. Zbog suprotnih djelovanja pojedinih dijelova u molekuli sapuna, sapun omogućuje da se masne nakupine nečistoća rasprše u sitne čestice i odvoje od podloge na kojoj su se nakupile.

Sapuni imaju i neke loše strane kao npr. :

- a) lužnatog su karaktera
- b) teško peru u tvrdim vodama i prekomjerno se troše jer se stvaraju netopljivi Ca-sapuni
- c) u kiselim vodama ne mogu prati jer se izlučuju slobodne masne kiseline

3. vježba

Saponifikacija ulja

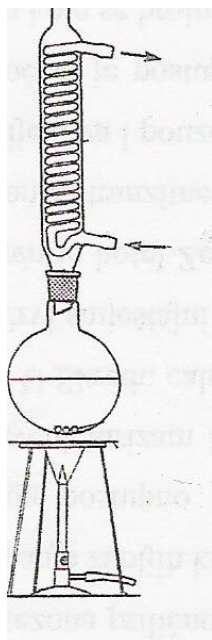
Zadatak vježbe: Provesti postupak saponifikacije masti ili ulja i ispitati svojstva nastalih produkata. Napisati jednadžbe reakcija i obrazložiti rezultate ispitivanja.

Pribor: okrugla tikvica od 250 cm³, menzura od 50 cm³, Liebigovo hladilo, plamenik, mrežica, stakleni lijevak, tikvica za destilaciju, termometar, lula za destilaciju, Erlenmeyerova tikvica od 100 cm³, laboratorijska čaša od 150 cm³, stakleni štapić, Büchnerov lijevak, satno staklo, metalni pribor

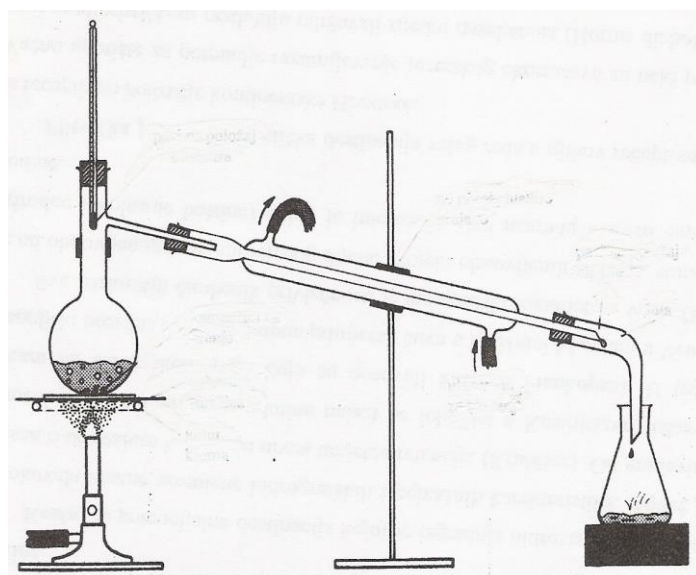
Kemikalije:

mast ili ulje, (m = 5 g)
KOH kruti, (m = 3 g)
etanol, (V = 40 cm³)
NaCl (zasićena otopina),

H₂SO₄ (w = 10 %)
otopina NaOH (w = 10 %),
CCl₄, 4 %-tna otopina
Br₂ u tetraklormetanu (w = 5 %)



Sl. 1. Aparatura za refruksiranje



Sl. 2. Aparatura za destilaciju

Postupak: U tikvicu od 250 cm³ s okruglim dnom stavite 5 g masti (ili ulja), 3 g kalijevog hidroksida i 40 cm³ etanola te dobro promiješajte. Na tikvicu postavite Liebigovo hladilo i zatim

zagrijavajte oko pola sata na temperaturi ključanja otapala (78°C). Reakcija je završena kada u reakcijskoj smjesi više nema kapljica ulja, tj. onda kada se nekoliko kapi reakcijske smjese može ravnomjerno pomiješati sa nekoliko kapi vode (ispitajte u epruveti). Tada sadžaj tikvice preko lijevka prenesite u tikvicu za destilaciju, te destilacijom uz Liebigovo hladilo iz reakcijske smjese uklonite etanol. Ostatku u destilirki dodajte 75 cm³ vruće destilirane vode da se otopi. Sa ovom sapunskom otopinom izvršite sljedeće pokuse.

1. Ispitivanje svojstava sapuna

a) 25 cm³ sapunske otopine stavite u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 cm³ i dodajte lagano, uz miješanje, zasićenu otopinu natrijevog klorida. Sapun koji se na ovaj način formira kao talog, filtrirajte preko Büchnerovog lijevka, talog isperite sa malo zasićene otopine NaCl, pa ga ostavite da se osuši na satnom staklu. (Dok se sapun suši izvedite druga ispitivanja). Nakon sušenja uzmite jedan dio suhog taloga i u epruveti isprobajte da li se otapa u vodi. Ispitajte koliko se sapun pjeni i to tako da uzmete drugi dio taloga u šake i protrljate između dlanova sa malo vode.

b) Pomiješajte 10 cm³ sapunske otopine sa jednakom količinom vodovodne vode, dobro promućkajte u Erlenmeyerovoj tikvici i zabilježite rezultate. Da li se smjesa pjeni?

2. Izoliranje masnih kiselina i ispitivanje njihovih svojstava

20 cm³ sapunske otopine zakiselite s razrijeđenom H₂SO₄. Neotopljeni organski spoj koji se pri tome izdvoji kao talog, odvojite od otopine filtriranjem, talog isperite vodom i sa tim talogom izvedite nekoliko sljedećih pokusa:

a) U epruveti isprobajte topljivost ovog taloga u vodovodnoj vodi i usporedite je sa topljivošću koju ste ispitali u pokusu 1.a. Zaključak potkrijepite jednadžbom reakcije.

b) Dio taloga snažno promućkajte sa malom količinom otopine NaOH. Da li otopina koja se pri tom dobije ima svojstvo pjenjenja? Zašto? Što je dobiveno? Napišite odgovarajuću reakciju.

c) Otopite malu količinu taloga u 2-3 cm³ tetraklormetana, pa tome dodajte nekoliko kapi 4 %-tne otopine broma u tetraklormetanu. **(Koristiti zaštitne rukavice i raditi u digestoru jer je tetraklormetan otrovan.)**

Da li se brom obezbojio? Zašto? Napišite jednadžbu.

3.2. JODNI BROJ

Jodni broj (I.B.) je masa joda izražena u gramima koju može adirati 100 g ulja ili masti.³ To je karakterističan pokazatelj (kemijska konstanta) za stupanj nezasićenosti masnih kiselina koje izgrađuju određeno ulje ili mast. Jodni broj služi također za identifikaciju ulja ili masti i za ocjenjivanje sušivih ulja. Vrijednosti jodnog broja za neke poznatije masnoće prikazane su u tablici 1.

Tab. 1.: Jodni broj nekih važnih masnoća

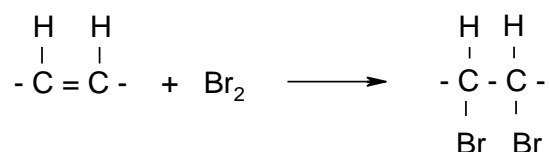
Naziv masnoća	Jodni broj
Kokosova mast	7 – 10
Svinjska mast	46 – 66
Goveđi loj	31 – 47
Maslac	26 – 45
Maslinovo ulje	76 – 90
Suncokretovo ulje	120 – 135
Sojino ulje	124 – 138
Arašidovo ulje	84 – 102
Repičino ulje	79 – 85
Ricinusovo ulje	82 – 90
Laneno ulje	168 – 204
Tungovo ulje	147 - 211

Izvor: Šušterčić, N.: *Ispitivanje materijala, Kemijsko-tehnološki obrazovni centar, Zagreb, 1979*

Neka odstupanja u veličini jodnog broja mogu nastati:

- a) kod životinjskih masnoća zavisno od hrane i
- b) kod biljnih masnoća zavisno od klime i zemljišta

Bit određivanja. Određivanje se zasniva na svojstvima nezasićenih masnih kiselina da uz određene uvjete mogu na mjestima dvostrukih veza adirati halogene elemente:



Za određivanje jodnog broja ima više metoda, no kod svih je princip isti: na ulje ili mast otoplenu u pogodnom otapalu djeluje se suviškom halogena, a neadirani dio odredi se jodometrijski, titracijom pomoću otopine natrijevog tiosulfata.

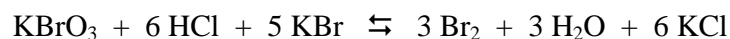
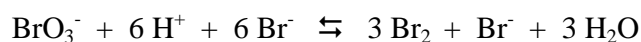
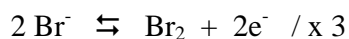
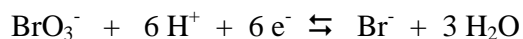
Ovdje će biti opisana Winklerova metoda kao jedna od jednostavnijih. Kao otapalo primjenjuje se tetraklorugljik ili kloroform, a kao sredstvo za halogeniranje smjesa otopina kalijevog bromata i kalijevog bromida.

Najčešći izvori pogrešaka kod svih su postupaka sljedeći činioci:

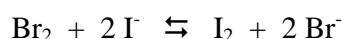
- količina halogena
- vrijeme trajanja reakcije
- utjecaj svjetlosti
- prisutnost zraka

Tako npr. prevelike količine halogena, predugo trajanje reakcije i utjecaj svjetlosti mogu uzrokovati i reakcije supstitucije, što dovodi do povećanja rezultata. Ako se reakcija izvodi u prisutnosti zraka, tj. u otvorenoj reakcijskoj posudi, dolazi zbog isparavanja do gubitka halogena, što također povećava rezultat. Iz navedenih razloga potrebno je strogo poštovati propisane uvjete rada.

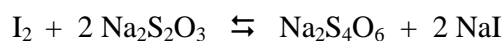
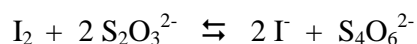
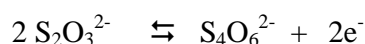
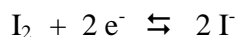
Kao što je već rečeno, kao sredstvo za halogeniranje služi smjesa otopine kalijevog bromata i kalijevog bromida. Elementarni brom potreban za reakciju adicije nastaje oksidacijom bromidnog iona pomoću bromatnog iona u kiseljoj sredini:



Dio izlučenog broma adira se na dvostruke veze, a kada se adiranje završi, suvišak broma reagira s dodanim kalijevim jodidom prema jednadžbi:



Tako izlučeni jod titrira se sa titracijskom otopinom uz škrob kao indikator:



4. vježba

Određivanje jodnog broja

Zadatak vježbe: Odrediti jodni broj zadanog uzorka i na osnovu rezultata i podataka u tablici 1. odrediti vrstu uzorka.

Pribor: Erlenmeyerova tikvica od 250 cm³ za određivanje jodnog broja (2 komada), bireta od 50 cm³ (2 kom.), menzura od 25 cm³, menzura od 10 cm³ (2 kom.), menzura od 5 cm³, metalni pribor

Kemikalije:

tetraklorugljik ili kloroform, (V = 10 cm³)

otopina kalijevog bromata, c(KBrO₃) = 0,1 mol/L, (V = 50 cm³)

10%-tna otopina kalijevog bromida, w(KBr) = 0,10, (V = 10 cm³)

10%-tna otopina HCl, w(HCl) = 0,10, (V = 15 cm³)

10%-tna otopina kalijevog jodida, w(KI) = 0,10, (V = 15 cm³)

otopina natrijevog tiosulfata, c(Na₂S₂O₃) = 0,1 mol/L x f,
svježa otopina škroba

Postupak: U tikvicu za određivanje jednog broja odvagajte 0,2 – 0,3 g ± 0,0001 g ulja ili masti, dodajte 10 cm³ tetraklorugljika ili kloroforma i promiješajte da se ulje odnosno mast otopi. Nakon toga dodajte biretom 50 cm³ otopine KBrO₃ i menzurom 10 cm³ otopine KBr i 15 cm³ otopine HCl. Tikvicu odmah zatvorite i promiješajte sadržaj. Potom tikvicu ostavite u mraku jedan sat pri sobnoj temperaturi. Nakon isteka jednog sata, dodajte menzurom 15 cm³ otopine KI, oprezno promiješajte, isperite stijenke tikvice sa 50 cm³ destilirane vode i odmah titrirajte s otopinom Na₂S₂O₃ poznatog faktora, do svijetlo žute boje joda, a zatim uz dodatak 2 cm³ svježe otopine škroba titrirajte dalje dok nestane modra boja jod-škrob kompleksa.

Na isti način izvedite slijepu probu, tj. posve jednak postupak samo bez uzorka.

Izračunavanje:

masa uzorka za analizu: $m(\text{uzorka})$

titracijska otopina Na₂S₂O₃: $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times f$

utrošak otopine Na₂S₂O₃ za slijepu probu: $V_1(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$

utrošak otopine Na₂S₂O₃ za uzorak ulja: $V_2(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$

utrošak otopine Na₂S₂O₃ za adiciju: $V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = V_1 - V_2$

$M_r(I_2) = 126,9$

Osnova izračunavanja je: $n(I) = n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$

$$m(I) / M(I) = c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times f \times V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$$

$$m(I) = c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times f \times V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times M(I)$$

$$\text{I.B.} = \frac{m(I) / g}{m(\text{uzorka}) / 100 \text{ g}} = \frac{m(I) / g}{m(\text{uzorka}) / g} \times 100$$

$$\text{I.B.} = \frac{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times f \times V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times M(I)}{m(\text{uzorka})} \times 100$$

3.3. MASTI U ŽIVEŽNIM NAMIRNICAMA

U praktičnoj kontroli živežnih namirnica pod pojmom masti podrazumijevaju se one tvari, koje se iz neke namirnice mogu potpuno ekstrahirati pomoću bezvodnog etera i koje nakon sušenja u sušioniku ne isparavaju s vodenom parom .

Masti izdvojene iz živežne namirnice neposrednom ekstrakcijom nazivaju se često “slobodne masti”. Pod pojmom “ukupne masti” podrazumijeva se sve što se može ekstrahirati iz neke namirnice nakon njenog, prethodnog, razaranja sa kloridnom ili sumpornom kiselinom.

Dobiveni ekstrakt nije u kemijskom pogledu nikada čista mast, jer se pored triglicerida masnih kiselina u eteru i ostalim otapalima (petroleter, trikloretilen i dr.) otapaju i druge tvari. Kod većine namirnica prisustvo stranih tvari je neznatno, pa razlike u stvarnoj i izmjerenoj vrijednosti nisu velike.

3.3.1. ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASTI

Bit određivanja. Određena količina namirnice ekstrahira se s određenom količinom otapala (trikloretilen) i onda se iz alikvotnog dijela ekstraktne otopine određuje sadržaj masti otparavanjem otapala.

Slobodne masti su one koje se mogu iz namirnice izdvojiti neposrednom ekstrakcijom s odgovarajućim otapalom. Takve masti nisu kemijski vezane s drugim sastojcima niti su uklopljene u stanicama tvari.

Ekstrakcija se može provoditi kao hladna i topla ekstrakcija.

Kod namirnica u kojima je mast “slobodna” tj. Nije uklopljena u stanice (kao npr. U maslacu, margarinu, finom brašnu, kakau), ekstrakcija se provodi u hladnom.

Ekstrakcija u toplom tj. Kuhanjem s otapalom primjenjuje se za namirnice u kojima mast nije “slobodna”. Ovdje će biti prikazan najjednostavniji način određivanja, tj. Ekstrakcija u hladnom.

5. vježba

Ekstrakcija “slobodnih masti” metodom po Grossfeld-u

Zadatak vježbe: Primjenom hladne ekstrakcije odrediti sadržaj “slobodnih masti” u zadanoj namirnici.

Pribor: Erlenmeyerova tikvica od 300 cm³ s ubrušenim čepom, menzura od 100 cm³ i od 25 cm³, stakleni lijevak, satno stakalce, laboratorijska čaša od 50, 150 i 250 cm³, papir za filtriranje naborani, metalni pribor

Kemikalije:

trikloretilen ($V = 50 \text{ cm}^3$)

Postupak: U Erlenmeyerovoj tikvici odvagajte 5 do 10 g ($\pm 0,01 \text{ g}$) namirnice npr. Finog brašna i tome menzurom dodajte 50 cm³ trikloretilena. Tikvicu zatvorite ubrušenim čepom i nekoliko minuta dobro miješajte a zatim filtrirajte preko naboranog filter papira. Za vrijeme filtracije lijevak poklopite satnim stakalcem da se spriječi gubitak otapala isparavanjem. (**raditi u digestoru uz obaveznu upotrebu zaštitnih rukavica**)

Od filtrata odvojite 12,5 cm³ u osušenu i odvaganu čašicu. Otapalo otparite do suha na vodenoj kupelji, (**u digestoru**) a potom sušite 1 sat u sušioniku kod 105°C. Nakon ohlađenja izvažite. (Preostalu trikloretilensku otopinu predestilirajte, u digestoru, kako bi regenerirali otapalo).

Izračunavanje:

masa uzorka za analizu: $m(\text{uzorka})$ u g

masa isparnog ostatka: $m(\text{isp. Ost.})$ u g

gustoća masti: $\rho = 0,92 \text{ g/cm}^3$

faktor preračunavanja: 23

Radi složenosti i dužine izvoda, prikazana je konačna jednadžba izračunavanja

$$\% \text{ masti} = 100 \frac{m \text{ (isp. ost.)}}{m \text{ (uzorka)}} \times \frac{92}{23 - m \text{ (isp. ost.)}}$$

Veličina 23 je konačan rezultat preračunavanja upotrebljenog volumena u cm³ otopine trikloretilena i ekstrahirane masti u masu (g) uzevši u obzir alikvot volumena ekstrakta koji odgovara masi isparnog ostatka u gramima.

Postoje tablice koje olakšavaju cjelokupno računanje. U tim tablicama se pročita samo masa isparnog ostatka, a u odgovarajućoj koloni se nađe postotak masti.

Tab. 2.: Sadržaj slobodnih masti u odnosu na isparni ostatak

Isparni ostatak od 25 cm ³ ekstrakta	Sadržaj masti u %									
	0,000	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009*
0,90 g	37,47	37,51	37,55	37,60	37,64	37,68	37,73	37,77	37,81	37,86
0,91 g	37,90	37,94	37,99	38,03	38,03	38,12	38,16	38,20	38,25	38,29
0,92 g	38,24	38,38	38,42	38,46	38,51	38,55	38,59	38,64	38,68	38,72
0,93 g	38,77	38,81	38,86	38,90	38,94	38,99	39,03	39,07	39,12	39,16
0,94 g	39,20	39,25	39,29	39,33	39,33	39,42	39,46	39,51	39,55	39,59
0,95 g	39,64	39,68	39,72	39,77	39,81	39,85	39,90	39,94	39,98	40,03
0,96 g	40,08	40,12	40,16	40,20	40,25	40,29	40,33	40,38	40,42	40,47
0,97 g	40,51	40,55	40,60	40,64	40,68	40,73	40,77	40,81	40,86	40,90
0,98 g	40,95	40,99	41,03	41,08	41,12	41,16	41,23	41,25	41,29	41,34
0,99 g	41,39	41,43	41,47	41,51	41,56	41,60	41,64	41,69	41,73	41,78

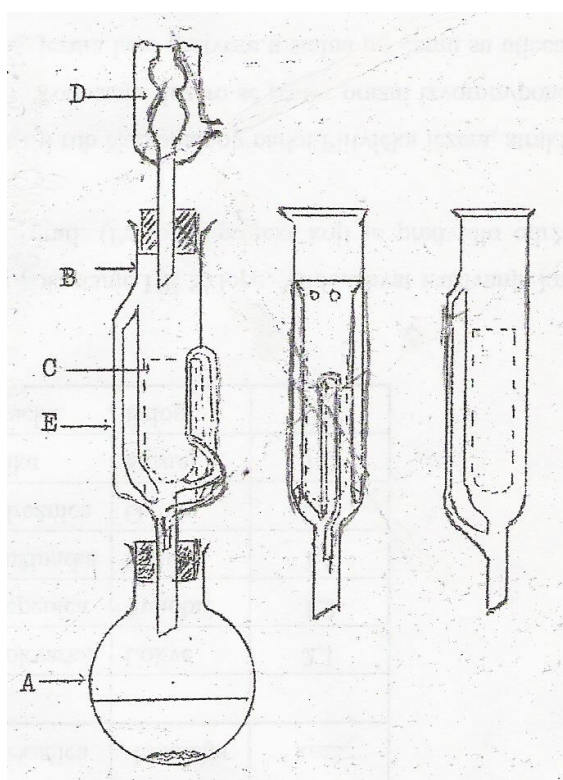
* treća decimala mase isparnog ostatka

Izvor: Šušterčić, N.: Ispitivanje materijala, Kemijsko-tehnološki obrazovni centar, Zagreb, 1979.

3.3.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH MASTI

Bit određivanja jest da se određena količina namirnice, ekstrahira s neodređenom količinom otapala i nakon završene ekstrakcije, otapalo se otpari iz cjelokupnog ekstrakta i nakon sušenja ekstrakt važe.

Ekstrakcija «ukupnih masti» se izvodi u Soxhlet-ovoj aparaturi koja se sastoji od tri dijela: od tikvice u kojoj se vrši zagrijavanje otapala, od ekstraktora (središnji dio) u kojem se vrši ekstrakcija namirnice i od hladila koje se postavlja okomito na ekstraktor a služi za kondenzaciju otapala (refluksiranje). Takva aparatura služi za ekstrakciju krutih tvari.



a)

b)

c)

- a) Soxhletova aparatura za ekstrakciju:
A – tikvica s otapalom
B – srednji dio aparature
C – tuljac s talogom
D – povratno hladilo
E – odvojak za odlijevanje otapala
- b) i c) modifikacije srednjeg dijela aparature

Sl. 3.: Aparatura za ekstrakciju masti po Soxhletu

Priprema namirnice za ekstrakciju i izbor otapala

Namirnica koja se ekstrahira eterom mora biti usitnjena i potpuno suha, jer eter zajedno s masti otapa dijelom i vodu te tako povlači i druge u vodi topljive tvari. Osim toga eter lakše prodire u suho tkivo nego u vlažno.

Osim etera, za ekstrakciju po Soxhlet-u često se upotrebljava i petroleter s vrelištem 35 do 45°C. Od ova dva otapala eter bolje otapa masti, ali mu je negativna strana što je jako higroskopan pa ga treba čuvati i od vanjske atmosfere, a prije ekstrakcije po potrebi i sušiti s bezvodnim natrijevim sulfatom ili kalcijevim kloridom.

Petroleter ima pak tu prednost što je jeftiniji i ne zahtijeva posebne postupke čišćenja. Ipak prije upotrebe treba ispitati da ne sadrži nehlapive sastojke. Prednost mu je i to što ne otapa vodu koja se nalazi u namirnici pa ju stoga ne treba sušiti prije ekstrakcije.

Za određivanje ukupnih masti koristi se nekoliko metoda a međusobno se razlikuju samo po odvagi namirnice, količini kiseline, dužini kuhanja i trajanja ekstrakcije, što je navedeno u tablici 3. Među najtočnije metode za određivanje ukupnih masti spada metoda po Weibull-Stoldt-u, te se može koristiti za najrazličitije vrste namirnica.

Tab. 3.: Masa uzorka, trajanje hidrolize i ekstrakcije za pojedine namirnice

Namirnica	Masa uzorka u g	Dužina kuhanja u minutama	Sati ekstrakcije
brašno i pecivo	20	20	3
jaja u prahu	10	30	1
mlijeko u prahu	20	20	3
mlijeko	100	30	1
sir	5	30	1
svježi sir	20	30	1
meso i mesni proizvodi	10	30	1
maslac, margarin	5	20	1
kakao zrna	5	15	4

Izvor: Šušterčić, N.: *Ispitivanje materijala, Kemijsko-tehnološki obrazovni centar, Zagreb, 1979.*

6. vježba

Određivanje ukupnih masti metodom po Weibull-Stoldt-u

Zadatak vježbe: Odrediti udio «ukupnih masti» u zadanoj namirnici, ekstrakcijom u aparaturi po Soxhlet-u, metodom po Weibull-Stoldt-u.

Pribor: laboratorijska čaša od 400 i 600 cm³, stakleni štapić, satno staklo, menzura od 100 cm³, stakleni lijevak, filter papir, Erlenmeyerova tikvica od 300 cm³, okrugla tikvica od 350 cm³, tuljac za ekstrakciju, kuglice za vrenje, aparat po Soxhlet-u, metalni pribor

Kemikalije:

koncentrirana klorovodična kiselina, ($V = 60 \text{ cm}^3$)
petroleter,
otopina srebrovog nitrata $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$.

Postupak: Izvažite određenu masu namirnice (prema tablici 3) i prenesite u čašu od 600 cm³. Uz miješanje staklenim štapićem postupno dodajte najprije 100 cm³ hladne destilirane vode i potom 60 cm³ koncentrirane klorovodične kiseline. Čašu pokrijte satnim stakalcem i polako, u digestoru, zagrijte do vrenja i ostavite da dalje polako vrije još 15-20 minuta (odnosno prema tablici). Vruću suspenziju filtrirajte preko naboranog filter papira i talog isperite vrućom vodom sve dotle dok filtrat ne daje više reakciju na kloride. Papir s ostatkom prenesite na satno staklo i u sušioniku sušite kod 105°C oko 1 sat.

Nakon sušenja filter papir s ostatkom stavite u tuljac i sve zajedno u ekstraktor Soxhlet-ovog aparata. Satno staklo isperite otapalom te otapalo ulijte u ekstraktor.

U okruglu tikvicu Soxhlet-ovog aparata stavite nekoliko staklenih kuglica i zajedno sušite u sušioniku kod 105°C. Nakon ohlađenja izvažite tikvicu i na kraju sastavite aparaturu.

Potrebnu količinu otapala dodajte na sljedeći način: kroz hladilo lijevajte toliko otapala da se ekstraktor napuni do visine teglice odnosno da se preko teglice prelije u tikvicu. Nakon što se ekstraktor na taj način ispraznio, dolijte još toliko otapala da se napuni približno još do polovice ekstraktora – vodeći pri tom računa o veličini tikvice. Naime, cjelokupna količina otapala ne smije biti veća od $\frac{3}{4}$ volumena tikvice.. Na kraju pustite kroz hladilo dosta jaku struju vode.

Grijanje izvodite ili na električnoj vodenoj kupelji ili na električnom grijaču (daleko od otvorene vatre). Temperaturu zagrijavanja podesite tako da kondenzirane kapljice otapala padaju takvom brzinom da se jedva mogu brojiti, no ipak da ne teku u neprekidnom mlazu.

Nakon završene ekstrakcije, destilaciju prekinite u trenutku kad se otapalo upravo prelilo iz ekstraktora u tikvicu. Trenutak prije toga skinite aparat sa grijalice. Potom otvorite aparat, iz ekstraktora izvadite tuljac, aparat ponovo sastavite i otapalo predestilirajte u ekstraktor. Kad je ekstraktor pun, odlijte otapalo i po potrebi nastavite destilaciju dok se iz tikvice ne odstrani sav višak otapala. Nakon toga tikvicu s ekstraktom zagrijavajte na vodenoj kupelji dok otapalo potpuno ispari. Zatim tikvicu u ležećem položaju sušite jedan sat u sušioniku kod 105°C odnosno koliko konkretan propis traži. Nakon hlađenja tikvicu izvažite i izračunajte udio masti u uzorku.

Rezultati određivanja:

masa namirnice: $m(\text{namirnice}) =$

masa prazne tikvice: $m(\text{prazne tikvice}) =$

masa tikvice i masti: $m(\text{tikvica} + \text{masti}) =$

masa ekstrahirane masti: $m(\text{masti}) =$

maseni udio masti: $w(\text{masti}) =$

NAPOMENA:

Potpunost ekstrakcije zavisi od više čimbenika:

- od prirode te od veličine čestica same tvari koja se ekstrahira
- od prirode otapala tj. njegove sposobnosti otapanja i prodiranja u namirnicu
- od brzine kružnog toka otapala u aparaturi za ekstrakciju
- od relativnog odnosa količine otapala i tvari koja se ekstrahira

3.3.3. ODREĐIVANJE MASTI U MLIJEKU

Sadržaj masti u mlijeku je najvažniji podatak za ocjenjivanje kvalitete mlijeka. To je ujedno i najpromjenljiviji sastojak mlijeka čiji sadržaj ovisi o individualnim osobinama životinje i načinu ishrane. Prosječni sadržaj masti u kravljem mlijeku iznosi 2,5 – 5,5 % a u mlijeku koje dolazi na tržište najviše do 3,6%.

Za određivanje masti u mlijeku u laboratorijima se skoro isključivo upotrebljava acidobutirometrijska metoda po Gerber-u jer je brza, jednostavna i jeftina.

Bit određivanja. Metoda se zasniva na razgradnji svih sastojaka mlijeka pomoću koncentrirane sulfatne kiseline, osim masti, koja se izlučuje na površini tekućine. Izlučivanje masti pospješuje i olakšava dodatak amilnog alkohola koji sa sumpornom kiselinom stvara topljive estere i nema nikakav utjecaj na sadržaj masti. Loša strana metode je upotreba koncentrirane sumporne kiseline pa zahtijeva pažljivo rukovanje pri radu.

Za određivanje masti potreban je butirometar po Gerber-u i odgovarajuća specijalna centrifuga, također po Gerber-u. Butirometar je staklena cijev, s jedne strane zatvorenog konusnog oblika a drugi (otvoreni) kraj je proširen, tzv. grlo butirometra. Srednji dio je plosnatog oblika (slično kao medicinski termometar) sa urezanom skalom koja je baždarena tako da sadržaj masti pokazuje direktno u %. Za punomasno mlijeko upotrebljava se butirometar sa skalom od 0 – 7, 0 – 9 ili 0 – 12 %, a za obrano od 0 – 1 %.

7. vježba

Određivanje masti u mlijeku metodom po Gerberu

Zadatak vježbe: Odrediti sadržaj masti u odgovarajućem uzorku mlijeka.

Pribor: butirometar po Gerber-u, centrifuga po Gerber-u, pipeta od 11 cm³, pipeta od 10 cm³,
graduirana pipeta od 5 cm³, vodena kupelj

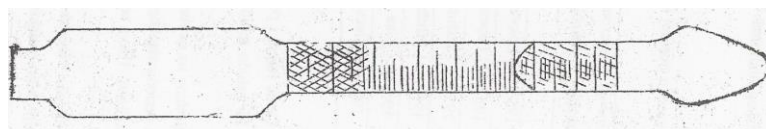
Kemikalije:

sumporna kiselina $\rho = 1,820 \text{ g/cm}^3$, ($V = 10 \text{ cm}^3$)

amilni alkohol (1-pentanol) ($V = 1 \text{ cm}^3$)

Postupak: Pipetom odmjerite 10 cm^3 sumporne kiseline i pažljivo prenesite u butirometar. Nakon toga, pažljivo da se slojevi ne izmiješaju, na sumpornu kiselinu dodajte 11 cm^3 mlijeka i 1 cm^3 amilnog alkohola. Butirometar dobro zatvorite gumenim čepom i nekoliko puta dobro promiješajte da se sav kazein rastvori, odnosno da se sumporna kiselina dobro pomiješa s ostalom smjesom. Prilikom mućkanja čep treba čvrsto pritisnuti palcem da pri miješanju ne izleti. Smjesa se pri miješanju jako ugrije pa je potrebno butirometar držati umotan u krpu. Dok je smjesa još topla stavite butirometar u centrifugu i centrifugirajte 5 – 10 minuta (1000 – 1200 okretaja u minuti). Nakon centrifugiranja butirometar držite u vodenoj kupelji 5 – 10 minuta na temperaturi 65°C i zatim odmah očitajte postotak masti.

Donji meniskus, tj. granični sloj masti ima oblik ravne linije i oštro je odijeljen od donje kisele tekućine dok gornji meniskus ima oblik luka. Očitava se donji rub meniskusa. Pri očitavanju treba paziti da je čitav sloj masti unutar skale butirometra. Pri očitavanju butirometar se drži okomito sa čepom okrenutim prema dolje. Izlučena mast mora biti potpuno bistra. Pažljivim radom sadržaj masti može se odrediti s točnošću $\pm 0,05 \%$.



Sl. 4.: Butirometar

Primjer očitavanja:

donji granični sloj: = 1,80

gornji očitani sloj: = 5,55

sadržaj masti: $5,55 - 1,80 = 3,75 \%$ (vol. %)

4. UGLJIKOHIDRATI

Ugljikohidrati su jedna od najvažnijih skupina biomolekula u prirodi. Podjednako su važni za sva živa bića bilo kao hrana, odnosno izvor energije, ili kao važan strukturni materijal (celuloza kod biljaka). Biljke ih proizvode složenim procesom fotosinteze koji se odvija preko niza pojedinačnih reakcija dok ih ljudi i životinje dobivaju posredno iz biljaka

Kemijski sastav

Prema kemijskom sastavu ugljikohidrati su građeni od ugljika, vodika i kisika, čiji omjer kod većine ugljikohidrata odgovara općoj formuli $C_n(H_2O)_n$. U strukturi sadrže jednu karbonilnu skupinu (aldehidnu ili ketonsku) i određeni broj hidroksilnih skupina.

Prema složenosti ugljikohidrati se dijele u 3 velike skupine:

1. Monosaharidi - to su ugljikohidrati koji se ne mogu hidrolizom razgraditi na jednostavnije ugljikohidrate. Oni se dalje dijele prema položaju karbonilne skupine na aldoze i ketoze ili prema broju C atoma na trioze, tetraze, pentoze, heksoze i heptoze. Najvažniji monosaharidi su glukoza i fruktoza.

2. Oligosaharidi - su ugljikohidrati građeni od 2-10 molekula monosaharida (Bregovec, Deljac, Sunko, 1986.) i hidrolizom se mogu razgraditi na jednostavnije ugljikohidrate. Ako sadrže samo dvije molekule monosaharida nazivaju se disaharidima, sa tri molekule su trisaharidi itd. Najvažniji disaharidi su saharoza, maltoza, laktoza i celobioza.

3. Polisaharidi - su najsloženiji ugljikohidrati koji mogu sadržavati nekoliko stotina ili tisuća molekula monosaharida te se hidrolizom mogu razgraditi na jednostavnije ugljikohidrate. S obzirom da su uglavnom građeni od istovrsnih molekula monosaharida, predstavljaju prirodne biopolimere. Najvažniji polisaharidi su škrob, glikogen i celuloza.

Kod oligosaharida i polisaharida molekule monosaharida su međusobno povezane glikozidnom vezom koja nastaje spajanjem dviju hidroksilnih skupina pojedinih monosaharida, uz izlučivanje molekule vode.

Jednostavniji ugljikohidrati često se zajedničkim imenom nazivaju šećeri ili saharidi. Iako se šećerima mogu odrediti sustavni nazivi prema IUPAC-ovoj nomenklaturi, ipak su se u uporabi zadržali trivijalni nazivi koji se tvore uz pomoć nastavka -oza (glukoza, fruktoza, saharoza itd.).

4.1. KVALITATIVNO DOKAZIVANJE UGLJIKOHIDRATA

Za kvalitativno dokazivanje jednostavnih ugljikohidrata ne postoji jedinstveni reagens kojim bi se direktno moglo dokazati o kojem šećeru se radi. Zbog toga je potrebno svaki šećer ispitati pomoću nekoliko reagensa kojim se utvrđuje određeno svojstvo a dokazivanje se temelji na reakcijama karakterističnih skupina šećera - to su aldehidna ili ketonska i hidroksilne skupine. Uglavnom su to reagensi pomoću kojih se može utvrditi da li se radi o monosaharidu ili disaharidu, da li šećer spada u skupinu aldoza ili ketoza i da li je šećer reducirajući ili nereducirajući. Za utvrđivanje ovih triju karakteristika, mogu se koristiti različite metode koje se međusobno razlikuju po samom reagensu za dokazivanje.

8. vježba

Kvalitativno dokazivanje jednostavnih ugljikohidrata

Zadatak: Nizom reakcija sa zadanim reagensima odrediti: a) koji su šećeri aldoze a koji ketoze b) koji su monosaharidi a koji disaharidi, c) koji su reducirajući šećeri a koji nereducirajući. Rezultate prikazati tabelarno i obrazložiti čime se objašnjavaju takvi rezultati.

Pribor: 4 epruvete, drveni stalak za epruvete, drvena štipaljka, kapaljke, čaša od 250 cm³

Kemikalije:

konc. H ₂ SO ₄	Fehling I i Fehling II
α-naftol u etanolu (w = 5 %)	Benediktov reagens
konc. HCl	Barfoedov reagens
rezorcinol	AgNO ₃ (w = 5 %)
zasićena otopina NaOH	NH ₄ OH (w = 25 %)
NaOH (w = 10 %)	Foulgerov reagens

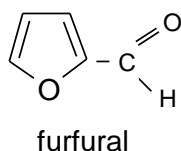
I. Dehidracija s mineralnim kiselinama

Dokazivanje se temelji na dehidraciji ugljikohidrata sa jakim mineralnim kiselinama i naknadnoj reakciji s nekim fenolom pri čemu nastaje obojeni produkt.

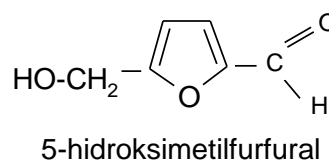
Sa koncentriranom H_2SO_4 čisti ugljikohidrati pocrne jer ih H_2SO_4 potpuno dehidrira (oduzima im svu vodu) i ostaje samo ugljik.

U vodenim otopinama šećeri se djelomično dehidriraju (kiselina im oduzima samo 3 molekule vode) pa nastaju spojevi:

iz pentoza



ili iz heksoza



Sa raznim fenolima kao npr. α -naftol, rezorcinol i sl., ovi spojevi daju obojene produkte reakcije.

1) Reakcija po Moliš-Udranskome

Ova reakcija predstavlja opći dokaz za sve ugljikohidrate u biološkom materijalu. Služi samo za utvrđivanje da li neki prirodni materijal (sok, med, sirup mlijeko i sl.) uopće sadrži ugljikohidrate ali ne daje nikakav uvid u to o kojem se šećeru radi.

Postupak:

U dobro očišćene epruvete redom stavite oko 1 cm^3 (20 kapi) 1-postotnih otopina različitih uzoraka (namirnica ili drugih prirodnih materijala). U svaku epruvetu zatim dodajte 2 kapi 5 %-tne otopine α -naftola u etanolu i smjesu promućkajte. Tada oprezno uz stijenku epruvete dodajte 10 kapi konc. H_2SO_4 . Nakon kraćeg vremena na graničnom sloju pojavljuje se prsten crvenoljubičaste boje što dokazuje da uzorak sadrži neki šećer.

2) Reakcija po Selivanovu

Ova reakcija služi za dokazivanje šećera-**ketoza**.

Postupak:

U čiste epruvete ponovo stavite po 1 cm³ otopina poznatih šećera i dodajte nekoliko zrnaca rezorcinola te nekoliko kapi konc. HCl. Epruvete stavite u vodenu kupelj i zagrijavajte oko dvije minute. U epruvetama gdje se nalaze šećeri ketoze pojavit će se crvena boja.

Važno je da sve četiri epruvete istovremeno stavite u vodenu kupelj. Isto vrijedi i kod svih narednih metoda gdje se koristi vodena kupelj.

3) Dokazivanje ketoza Fulgerovim reagensom

I ovim postupkom dokazuje se da li su šećeri aldoze ili ketoze.

U epruvete odmjerite po 2 cm³ otopina poznatih šećera i dodajte po 1 cm³ koncentrirane klorovodične kiseline i Fulgerova reagensa. Smjesu zagrijavajte preko vodene kupelji do nastanka plavozelene boje što je dokaz za ketoze.

II Dokazivanje s jakim lužinama:

Ako se otopine šećera kuhaju s koncentriranim otopinama jakih lužina npr. s NaOH doći će do polimerizacije. Otopina postaje smeđa i javlja se ugodan miris po karamelu. Naime, jake lužine na temperaturi vrenja razgrađuju monosaharide na manje molekule kao što su mravlja kiselina, mliječna kiselina i dr. kiseline, a takva smjesa razgradnih produkata zove se karamel. Nakon toga male molekule se polimeriziraju. Tokom zagrijavanja dolazi i do reakcija epimerizacije tj. do premještanja atoma na prvom i drugom ugljikovom atomu pa monosaharidi prelaze iz jednog u drugi oblik (iz aldehidne forme u keto-formu). Jedna od metoda koja se zasniva na ovom principu je Mohrova metoda.

Reakcija po Mohru:

Postupak:

U epruvete stavite po 1 cm³ otopina šećera i isto toliko zasićene otopine NaOH i zagrijavajte istovremeno na laganom plamenu ili u vodenoj kupelji. Otopine će poprimiti smeđu boju i osjetit će se miris po karamelu. Monosaharidi će reagirati brže pa se ovom metodom može dokazati koji šećeri su monosaharidi a koji disaharidi (iako nije dovoljno pouzdano). Kod disaharida najprije treba doći do hidrolize na monosaharide, zatim do cijepanja na manje molekule pa tek tada dolazi do polimerizacije.

III Reakcije na aldehidnu i ketonsku skupinu s blagim oksidansima

Ove reakcije zasnivaju se na oksidaciji slobodnih poluacetalnih grupa ugljikohidrata sa slabim oksidansima kao što su ioni Cu^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} i Hg^{2+} . U njihovoj prisutnosti šećer se oksidira a ioni Cu^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} i Hg^{2+} se reduciraju.

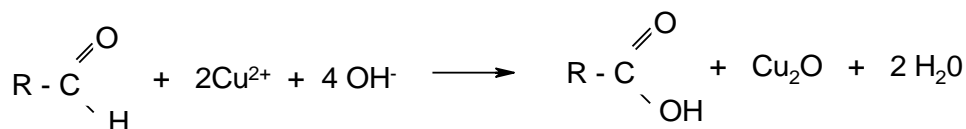
Ukoliko u toku određivanja nastane bakrenasto-crveni talog, znači da se radi o reducirajućem šećeru.

1. Reakcije sa Cu^{2+} ionima primjenjuju se kod:

Fehlingovog testa – to je otopina Cu^{2+} iona u jako alkalnoj sredini,
služi za dokazivanje svih reducirajućih šećera

Benediktovog testa – otopina Cu^{2+} iona u slabo alkalnoj sredini,
služi za dokazivanje svih reducirajućih šećera

Barfoedovog testa – otopina Cu^{2+} iona u slabo kiselj sredini, služi za dokazivanje reducirajućih monosaharida pa se može koristiti za utvrđivanje razlike između monosaharida i disaharida. (Disaharidi reagiraju puno sporije.)



Postupak:

a) Reakcija s Fehlingovim otopinama

U epruvete redom stavite po 1 cm^3 otopina ispitivanih šećera pa u svaku epruvetu dodajte po 1 cm^3 otopina Fehling I i Fehling II. Epruvete oprezno zagrijavajte do vrenja direktno na plamenu ili preko vodene kupelji. Reducirajući šećeri dat će pozitivnu reakciju tj. u epruveti će nastati bakrenasto-crveni talog. (Zagrijavati treba istovremeno sve epruvete radi lakše usporedbe.)

b) Reakcija s Benediktovim reagensom

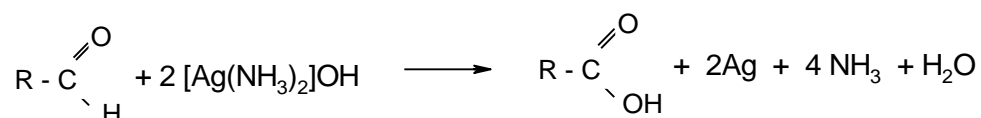
Ova metoda također služi za dokazivanje reducirajućih šećera. Na 1 cm^3 Benediktovog reagensa dodajte 1 cm^3 otopine ugljikohidrata i epruvete držite u vrućoj vodenoj kupelji 5 minuta. Ako su prisutni reducirajući šećeri pojavit će se talog koji postepeno mijenja boju od zelene, preko žute i narančaste do crvene (u početku nastaje CuOH a na kraju bakrenasto crveni talog Cu_2O).

c) Reakcija s Barfoedovim reagensom

U epruvete stavite po 1 cm³ Barfoedova reagensa i po deset kapi otopina ispitivanih šećera. Smjesu zagrijavajte u vrućoj vodenoj kupelji 4-5 minute. U slučaju reducirajućih šećera nastat će crveni talog Cu₂O. Ova reakcija ima i selektivnu karakteristiku jer monosaharidi reagiraju brže (unutar 5 minuta), dok velike molekule reagiraju tromije i sporije (više od 10 minuta). Zbog toga se ovom metodom može utvrditi razlika između monosaharida i disaharida.

2. Reakcija sa ionima Ag⁺ (Tolensov reagens)

Poluacetalna skupina ugljikohidrata može reducirati ione srebra do elementarnog srebra koji se izlučuje i taloži na stijenkama epruveta. Tolensov reagens je amonijakalna otopina srebrovog nitrata.



U dobro očišćene epruvete stavite 0,5 cm³ 5 %-tne otopine srebrovog nitrata i 1 cm³ vode. Tome oprezno dodajte 1 kap 10 %-tne vodene otopine NaOH. Stvorit će se smeđi talog srebrovog oksida kojeg dalje otopite opreznim dokapavanjem 25 % vodene otopine amonijaka da se stvoreni talog, uz snažno potresanje epruvete, potpuno otopi i otopina postane prozirna. Doda li se previše amonijaka reakcija neće uspjeti. U tako pripremljenu otopinu Tolensovog reagensa dodajte 1 cm³ otopine ispitivanog šećera i zagrijavajte u vodenoj kupelji. Ukoliko se izluči sloj elementarnog srebra dokazani su reducirajući šećeri.

Sve dobivene rezultate prikažite tabelarno.

Tab. 4.: Kvalitativno dokazivanje monosaharida i disaharida

	Reagens poSeliva.	Foulgerov reagens	Mohrova reakcija	Fehlingov test	Benedikt. test	Barfoed. test	Tohlens. reagens
Glukoza							
Fruktoza							
Saharoza							
Laktoza							

Na osnovu prethodnih rezultata definiiraj vrstu pojedinog šećera.

Tab. 5: Vrste monosaharida i disaharida prema svojstvima

	monosaharid ili disaharid	aldoza ili ketoza	reducirajući ili nereducirajući
Glukoza			
Fruktoza			
Saharoza			
Laktoza			

4.2. GRAVIMETRIJSKO ODREĐIVANJE MONOSAHARIDA

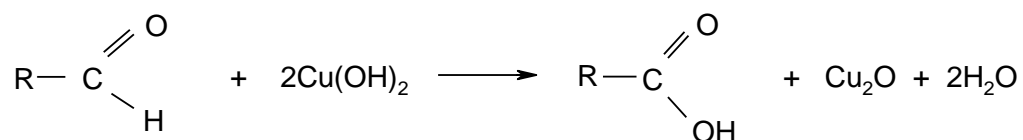
Gravimetrijsko određivanje monosaharida spada u metode kvantitativnog određivanja gdje se do konačnog rezultata dolazi vaganjem mase izlučenog teško topivog taloga.

Bit određivanja: Određivanje monosaharida zasniva se na redukcijskoj sposobnosti aldehidne i ketonske skupine monosaharida.

Kao oksidans služe bakrovi(II) ioni.

Reakcija teče kvantitativno u lužnatoj otopini kompleksne soli bakrovog(II) tartarata (Fehlingove otopine), pri čemu nastaje crveni talog bakrovog(I) oksida tj. Cu_2O .

Za oksidaciju jednog mola aldehida u jedan mol karboksilne skupine stehiometrijski su potrebna dva mola bakrove soli:



U stvarnosti, jedan mol glukoze reducira pet molova soli bakra, što zavisi od uvjeta reakcije. Naime, djelovanjem baza na aldoze i ketoze nastaju dijelom spojevi koji također imaju reduktivna

svojstva, no usprkos složenosti reakcije, oksidacija aldoza i ketoza može se provesti kvantitativno – uz strogo pridržavanje određenih uvjeta rada.

Nakon provedenog postupka važe se dobiveni talog bakrovog(I) oksida i izračuna sadržaj šećera.

Izračunavanje se vrši uporabom tablica koje predstavljaju empirijski utvrđeni maseni odnos taloga Cu_2O ekvivalentan masi monosaharida odnosno nekih disaharida.

Kod disaharida koji nisu reducirajući (kao npr. saharoza) potrebno je prije određivanja provesti hidrolizu, tj. razložiti disaharide na monosaharide. Monosaharidi dobiveni hidrolizom disaharida nazivaju se – invert.

9. vježba

Gravimetrijsko određivanje monosaharida metodom po Grossfeld-u

Zadatak vježbe: Gravimetrijskom metodom odrediti sadržaj monosaharida u prirodnom uzorku (med, voćni sirup i sl.)

Pribor: laboratorijske čaše od 100, 250, 400 i 600 cm^3 , odmjerna tikvica od 250 cm^3 , stakleni štapić, stakleni lijevak, filter papir, graduirana pipeta od 10 cm^3 , trbušasta pipeta od 25 cm^3 , stakleni lončić za filtriranje, crveni lakmus papir, satno staklo, kapaljke, metalni pribor

Kemikalije:

otopina NaOH ($c = 1 \text{ mol/dm}^3$)

otopina BaCl_2 ($w = 0,05$)

Carez I i II ($V = 10 + 10 \text{ cm}^3$)

etanol + eter (1 : 1)

Fehling I i II ($V = 25 + 25 \text{ cm}^3$)

Postupak:

a) Pripremanje uzorka: U čašici od 100 cm^3 odvagnite oko 2g (+/- 0,01) g uzorka, otopite u malo vruće, destilirane vode i uz pomoć staklenog lijevka prenesite kvantitativno u odmjernu tikvicu od 250 cm^3 . Tikvicu napunite do pola volumena (usput treba ispirati čašicu). Otopinu oprezno neutralizirajte otopinom NaOH ($c = 1 \text{ mol/dm}^3$) pomoću birete, graduirane pipete ili kapaljke uz pH indikator papir. Potom dodajte po 10 cm^3 otopine Carezz I i Carezz II kako bi

istaložili bjelančevine i druge reduktivne tvari koje mogu smetati pri redukciji Cu^{2+} iona. Tikvicu dopunite do oznake, začepite, dobro promiješajte i filtrirajte preko naboranog filter papira tako da prvih 20 cm^3 filtrata bacite. Filtrat mora biti bistar.

- b) Oksidacija šećera pomoću Cu^{2+} iona: U čašu od 400 cm^3 pipetom odmjerite po 25 cm^3 otopine Fehling I i Fehling II, zagrijte na plameniku do vrenja i u vrelu otopinu (nakon što ste uklonili plamenik) pipetirajte 10 cm^3 filtrata uzorka, zagrijte ponovo do vrenja i pustite da umjereno kuha još točno 2 minute. Uklonite plamenik i naglo ohladite dodatkom oko 100 cm^3 hladne, prokuhane vode (bez O_2) i pustite da se talog Cu_2O slegne. Filtrirajte preko sušenog i izvaganog lončića za filtriranje. Talog isperite nekoliko puta hladnom prokuhanom vodom, tako da je uvijek prekriven slojem tekućine. Vodom ispirite dotle dok filtrat ne prestane davati reakciju na sulfate.

Na kraju isperite talog Cu_2O smjesom alkohola i etera i lončić s talogom sušite u sušioniku pola sata na 105°C . Nakon ohlađenja u eksikatoru, izvažite na analitičkoj vagi do $\pm 0,001 \text{ g}$. Iz dobivene količine taloga Cu_2O u mg, pročitajte iz tablica po Grossfeld-u (tab. 5) odgovarajuću količinu glukoze.

Primjer za izračunavanje:

masa uzorka: $m_1(\text{uz.}) = 2,22 \text{ g}$

masa uzorka za analizu $2,22 \text{ g} \times 10 \text{ cm}^3$
 nakon razrijeđivanja: $m_2(\text{uz.}) = \frac{\text{-----}}{250\text{cm}^3} = 0,088 \text{ g}$

$m_2(\text{uz.}) = 88 \text{ mg}$

masa praznog lončića: $m_3 = 12,572 \text{ g}$

masa lončića + Cu_2O : $m_4 = 12,672 \text{ g}$

masa Cu_2O : $m_5 = m_4 - m_3 = 0,100 \text{ g} = 100 \text{ mg}$

Prema tabeli po Grossfeld-u , masi od 100 mg Cu_2O ekvivalentna je masa od $45,2 \text{ mg}$ glukoze.

$$\text{maseni udio glukoze: } w(\text{glukoze}) = \frac{m(\text{glukoze}) / \text{mg}}{m_2(\text{uzorka}) / \text{mg}} = \frac{45,2 \text{ mg}}{88 \text{ mg}}$$

$$w(\text{glukoze}) = 0,514 \text{ ili } 51,4 \%$$

Tab. 6.: Izvod iz tabele prema Grossfeldu za gravimetrijsko određivanje glukoze i inverta na bazi nađene mase Cu_2O .

Cu_2O mg	glukoza mg	invert mg	Cu_2O mg	glukoza mg	invert mg	Cu_2O mg	glukoza mg	invert mg
88	39,8	40,6	111	50,2	51,4	139	62,8	64,6
89	40,3	41,1	112	50,6	51,8	140	63,3	65,1
90	40,7	41,6	113	51,1	52,3	141	63,7	65,6
91	41,2	42,0	114	51,5	52,8	142	64,2	66,0
92	41,6	42,5	115	52,0	53,2	143	64,6	66,5
93	42,1	43,0	116	52,4	53,7	144	65,0	67,0
94	42,6	43,5	117	52,9	54,2	145	65,5	67,5
95	43,0	43,9	118	53,3	54,7	146	66,0	67,9
96	43,4	44,4	119	53,8	55,2	147	66,4	68,4
97	43,9	44,8	120	54,2	55,7	148	66,9	68,9
98	44,3	45,3	121	54,7	56,1	149	67,4	69,3
99	44,8	45,8	122	55,1	56,5	150	67,8	69,8
100	45,2	46,3	123	55,6	57,0	151	68,2	70,3
101	45,7	46,7	124	56,0	57,5	152	68,7	70,8
102	46,1	47,2	125	56,5	58,0	153	69,2	71,2
103	46,6	47,6	126	56,9	58,5	154	69,9	71,7
104	47,0	48,0	127	57,4	59,0	155	70,0	72,2
105	47,5	48,5	128	57,8	59,4	156	70,5	72,7
106	47,9	49,0	129	58,3	59,9	157	71,0	73,2
107	48,4	49,5	130	58,7	60,3	158	71,4	73,6
108	48,8	49,9	131	59,2	60,8	159	71,9	74,1
109	49,3	50,4	132	59,6	61,3	160	72,3	74,6
110	49,7	50,9	133	60,1	61,6			
			134	60,5	62,3			
			135	61,0	62,7			
			136	61,5	63,2			
			137	61,9	63,7			
			138	62,4	64,1			

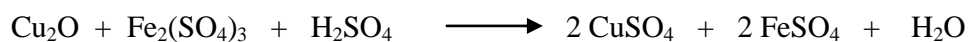
Izvor: Šušterčić, N.: Ispitivanje materijala, Kemijsko-tehnološki obrazovni centar, Zagreb, 1979.

4.3. VOLUMETRIJSKO ODREĐIVANJE MONOSAHARIDA I DISAHARIDA

Princip određivanja sastoji se u tome da se prisutni disaharidi (prvenstveno saharoza) hidrolizom prevedu u monosaharide a zatim se određuju kao monosaharidi.

Nakon hidrolize otopina se neutralizira, istalože se bjelančevine i odfiltriraju. Monosaharidi u filtratu se oksidiraju pomoću Fehlingovih otopina odnosno Cu^{2+} -iona a nastali talog Cu_2O se otopi pomoću željezovog(III)-amonijevog sulfata ili otopine i željezovog(III) sulfata u koncentriranoj sumpornoj kiselini. Nakon toga otopina se titrira s otopinom kalijevog permanganata poznate koncentracije. Iz utroška KMnO_4 izračuna se masa bakra te se na osnovu toga iz tablica očita sadržaj šećera u uzorku.

Reakcije:



Sl. 5.: Pribor za titraciju

10. vježba

Volumetrijsko određivanje monosaharida i disaharida metodom po Bertrand-u

Zadatak vježbe: Volumetrijskom metodom odrediti sadržaj invertnog šećera u prirodnom uzorku (med, voćni sirup i sl.).

Pribor: laboratorijske čaše od 100, 250 i 400 cm³, odmjerna tikvica od 250 cm³, graduirana pipeta od 10 cm³, trbušasta pipeta od 25 cm³, stakleni lijevak, stakleni štapić, Erlenmeyerova tikvica od 300 cm³, menzura od 50 cm³, bireta od 50 cm³, kapaljka, crveni lakmus papir, satno staklo, metalni pribor

Kemikalije:

konc. HCl (V = 0,5 cm ³)	otopina NaOH (c = 1 mol/dm ³)
Carez I i II (V = 10 + 10 cm ³)	otopina KMnO ₄ (c = 0,02 mol/dm ³)
Fehling I i II (V = 25 + 25 cm ³)	otopina BaCl ₂ (w = 0,05)
otopina željezovog (III)-amonijevog sulfata (V = 50 cm ³)	

Postupak:

I Pripremanje uzorka: U čašicu od 100 cm³ odvagnite oko 2 g uzorka, otopite u 50 cm³ tople, prokuhane vode i kvantitativno prenesite u odmjernu tikvicu od 250 cm³ ispirući čašu destiliranom vodom. Nakon toga pristupite hidrolizi. Otopini dodajte pipetom 0,5 cm³ koncentrirane HCl i tikvicu držite na vodenoj kupelji oko pola sata.

Nakon ohlađenja otopinu oprezno neutralizirajte s otopinom NaOH (1 mol/dm³) uz indikator papir ili metiloranž. Potom otopini dodajte po 10 ml otopina Cares I i Cares II kako bi se istaložile bjelančevine i druge reduktivne tvari koje bi ometale redukciju bakrenih iona. Tikvicu nadopunite destiliranom vodom do oznake, dobro promiješajte i sadržaj filtrirajte kroz naborani filter papir tako da prvih 20 cm³ filtrata bacite.

II Redukcija Cu²⁺ iona: U Erlenmeyerovu tikvicu od 300 cm³ pipetom odmjerite po 25 cm³ otopina Fehling I i Fehling II i zagrijavajte na plameniku do vrenja. Uklonite plamenik i u tikvicu pipetom dodajte 10 cm³ prethodno pripremljenog uzorka te ponovo zagrijavajte još 2 minute. Nakon toga naglo dodajte 100 cm³ prokuhane i ohlađene destilirane vode i ostavite da se slegne stvoreni talog bakrovog(I) oksida. Bistru otopina iznad taloga oddekanirajte preko filter papira. Talog koji je ostao u Erlenmeyerovoj tikvici isperite sa toplom vodom do negativne reakcije na

sulfate (odnosno do nestanka plave boje) i vodu opet dekantirajte preko istog filter papira. Nakon toga, talog na filter papiru prelijte sa 50 cm³ otopine željezovog(III) amonijevog sulfata ili željezovog(III) sulfata u sumpornoj kiselinu. Filtrat sada hvatajte u istu tikvicu u kojoj je glavni dio taloga. Sav talog će se otopiti i dobiti bistra otopina plavo-zelene boje. Dobivenu otopinu titrirajte s otopinom KMnO₄ koncentracije 0,02 mol/dm³ i poznatog faktora koncentracije do smeđe-zelenog obojenja.

Na osnovu dobivenih rezultata i uz pomoć tablice po Bertrand-u (tab. 6) odredite udio monosaharida i disaharida u zadanom uzorku.

Primjer izračunavanja:

masa uzorka $m_1 = 2 \text{ g}$

masa uzorka nakon razrjeđivanja $m_2 = \frac{2 \text{ g} \times 10 \text{ cm}^3}{250 \text{ cm}^3} = 0,08 \text{ g}$

prema jednačbama:

$$n(\text{Cu}) \approx 5 n(\text{KMnO}_4)$$

$$m(\text{Cu}) = 5 \times V(\text{KMnO}_4) \times c(\text{KMnO}_4) \times f(\text{KMnO}_4) \times M(\text{Cu})$$

$m(\text{Cu})$ izraziti u mg

iz tablica se očitava ekvivalentna količina invertnog šećera

maseni udio šećera: $w = \frac{\text{masa šećera u mg}}{\text{masa uzorka } m_2 \text{ u mg}} \times 100 \%$

Tab. 7.: Izvod iz tablice po Bertrand-u (za izračunavanje invertnog šećera, glukoze i laktoze)

šećer u mg	Količina bakra u mg			šećer u mg	Količina bakra u mg		
	invert	glukoza	laktoza		invert	glukoza	laktoza
10	20,6	20,4	14,4	56	105,7	105,8	76,2
11	22,6	22,4	15,8	57	107,4	107,6	77,5
12	24,6	24,3	17,2	58	109,2	109,3	78,8
13	26,5	26,3	18,6	59	110,9	111,1	80,1
14	28,5	28,3	20,0	60	112,6	112,8	81,4
15	30,5	30,2	21,4	61	114,3	114,5	82,7
16	32,3	32,2	22,8	62	115,9	116,2	83,9
17	34,5	34,2	24,2	63	117,6	117,9	85,2
18	36,4	36,2	25,6	64	119,2	119,6	86,5
19	38,4	38,1	27,0	65	120,9	121,3	87,7
20	40,4	40,1	28,4	66	122,6	123,0	89,9
21	42,3	42,0	29,8	67	124,2	124,7	90,3
22	44,2	43,9	31,1	68	125,9	126,4	91,6
23	46,1	45,8	32,5	69	127,5	128,1	92,8
24	48,0	47,7	33,9	70	129,2	129,8	94,1
25	49,8	49,6	35,2	71	130,8	131,4	95,4
26	51,7	51,5	36,6	72	132,4	133,1	96,9
27	53,6	53,4	38,0	73	134,0	134,7	98,0
28	55,5	55,3	39,4	74	135,6	136,3	99,1
29	57,4	57,2	40,7	75	137,2	137,9	100,4
30	59,3	59,1	42,1	76	138,9	139,6	101,7
31	61,1	60,9	43,4	77	140,5	141,2	102,9
32	63,0	62,8	44,8	78	142,1	142,8	104,2
33	64,8	64,6	46,1	79	143,7	144,5	105,4
34	66,7	66,5	47,4	80	145,3	146,1	106,7
35	68,5	68,3	48,7	81	146,9	147,7	107,9
36	70,3	70,1	50,1	82	148,5	149,3	109,2
37	72,2	72,0	51,4	83	150,0	150,9	110,4
38	74,0	73,8	52,7	84	151,6	152,5	111,7
39	75,9	75,7	54,1	85	153,2	154,0	112,9
40	77,7	77,5	55,4	86	154,8	155,6	114,1
41	79,5	79,5	56,7	87	156,4	157,2	115,4
42	81,2	81,1	58,0	88	157,9	158,8	116,6
43	83,0	82,9	59,3	89	159,5	160,4	117,9
44	84,8	84,7	60,6	90	161,1	162,0	119,1
45	86,5	86,4	61,9	91	162,6	163,6	120,3
46	88,3	88,2	63,3	92	164,2	165,2	121,6
47	90,1	90,0	64,6	93	165,7	166,7	122,8
48	91,9	91,8	65,9	94	167,3	168,3	124,0
49	93,6	93,6	67,2	95	168,8	169,9	125,2
50	95,4	95,4	68,5	96	170,3	171,5	126,5
51	97,1	97,1	69,8	97	171,9	173,1	127,7
52	98,8	98,9	71,1	98	173,4	174,6	128,9
53	100,6	100,6	72,4	99	175,0	176,2	130,2
54	102,2	102,3	73,7	100	176,5	177,8	131,4
55	104,0	104,1	74,9				

Izvor: Vajić, B.: Živežne nemirnice, određivanje osnovnih sastojaka, Sveučilište u Zagrebu, 1968.

4.4. DOKAZIVANJE ŠKROBA

Škrob je polisaharid građen od molekula glukoze povezanih $\alpha(1-4)$ glikozidnom vezom. Unutar molekule škroba razlikuju se dvije frakcije: amiloza i amilopektin. Amiloza je unutarnji dio molekule škroba građen od spiralno savijenih lanaca i topljiva je u vodi. Amilopektin je vanjski dio molekule škroba, građen od razgranatih lanaca i netopljiv je u vodi. Pored $\alpha(1-4)$ glikozidne veze kod amilopektina javlja se i $\alpha(1-6)$ veza.

Sa otopinom joda škrob daje karakteristično modro-ljubičasto obojenje, ne zbog kemijske reakcije nego zato što se ioni joda (I_3^-) ugrađuju u zavijutke unutar strukture škroba.

11. vježba

Dokazivanje i hidroliza škroba

Zadatak vježbe. Ispitati reakciju škroba s otopinom joda i Fehlingovim otopinama. Provesti hidrolizu škroba te ponovo izvesti dokazivanje s otopinom joda i Fehlingovim reagensom. Obrazložiti dobivene rezultate.

Pribor: epruvete, drveni stalak, kapaljke, menzura od 5 i 25 cm³, dvije laboratorijske čaše od 400 cm³, Erlenmeyerova tikvica od 100 cm³, drvena štipaljka, stakleni štapić, satno stakalce, crveni lakmus papir

Kemikalije:

otopina škroba (w = 1 %)	konc. HCl
Lugolova otopina	bezvodni Na ₂ CO ₃
Fehling I i II	

Postupak:

1. Ispitivanje s otopinom joda

Pripremite svježu otopinu škroba. U epruvetu stavite 1-2 cm³ ove otopine i dodajte nekoliko kapi Lugolove otopine (otopina joda u otopini KJ). Pojavljuje se ljubičasto-plava boja. Zatim tu otopinu zagrijavajte do vrenja pa ohladite. Zabilježite i objasnite promjene.

2. Ispitivanje s Fehlingovim reagensom

U epruvetu stavite po 1 cm³ otopina Fehling I i Fehling II reagensa i isto toliko otopine škroba. Lagano zagrijavajte na plameniku ili preko vodene kupelji. Zabilježite i objasnite zapažanja. Da li je škrob reducirajuća tvar?

3. Hidroliza škroba

U čaši od 400 cm³ zagrijte 200 cm³ vode do vrenja (to je topla kupelj), a u drugu čašu uzmite isti volumen hladne vode (hladna kupelj).

U Erlenmajerovu tikvicu od 100 cm³ stavite 25 cm³ 1 %-tne otopine škroba, dodajte 1 cm³ konc. HCl i dobro izmiješajte. Podijelite ovu otopinu na 5 jednakih dijelova tj. u 5 epruveta i sve epruvete stavite u toplu kupelj. U određenim intervalima (prema tablici) vadite po jednu epruvetu, ohladite u hladnoj kupelji i pretresite u Erlenmajerovu tikvicu od 100 cm³. Zatim u tikvicu treba dodavati bezvodni Na₂CO₃ sve dok ne prestane oslobađanje CO₂ (na kraju provjerite sa lakmus papirom da li je neutralizirano do kraja). Tu otopinu podijelite u dvije epruvete pa u jednoj izvršite ispitivanje s jodom (Lugolova otopina) a u drugoj izvedite Fehlingov test.

Rezultate unosite u tablicu.

Tab. 8.: Rezultati hidrolize škroba

Vrijeme hidrolize	Test sa jodom	Fehlingov test
1. epruveta – nakon 2'		
2. epruveta – nakon 6'		
3. epruveta – nakon 10'		
4. epruveta – nakon 15'		
5. epruveta – nakon 20'		

Mogući odgovori:

- negativno
- u tragovima
- pozitivno
- izrazito pozitivno
(upisati i obojenja)

4.5. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE CELULOZE

Celuloza je polisaharid opće formule $(C_6H_{10}O_5)_x$. Građena je od molekula glukoze povezanih $\beta(1-4)$ glikozidnom vezom. Celuloza je glavni sastojak staničnih stijenki biljaka, a uz nju u biljkama nalazimo i druge ugljikohidrate kao hemicelulozu, pektinske tvari i lignin (necelulozne tvari). Prema sadržaju celuloze varira i mehanička čvrstoća mnogobrojnih biljaka.

Celuloza je potpuno netopiva u vodi i skoro potpuno otporna prema djelovanju razrijeđenih kiselina i razrijeđenih lužina. Fehlingova otopina ju ne oksidira. Tek tretiranje s jakim koncentriranim kiselinama ili pak razrijeđene kiseline kod vrlo visoke temperature, razgrađuju molekulu celuloze do disaharida celobioze odnosno dalje do monosaharida glukoze.

Onaj dio nekog biljnog materijala ili namirnice koji zaostaje u neotopljenom stanju nakon polusatnog kuhanja s razrijeđenom kiselinom (1,25%-tnom sumpornom kiselinom) i polusatnog kuhanja s razrijeđenom lužinom (1,25%-tnom kalijevom lužinom) predstavlja sirovu celulozu.

Određivanje sirove celuloze odnosno sirovih vlakana u živežnim namirnicama od velikog je značaja jer su to tvari koje ljudski organizam ne može probaviti i koje, ako su prisutne u velikim količinama, ometaju probavu namirnica i resorpciju hrane. Prema tome, po sadržaju celuloze ocjenjuje se kvaliteta namirnica u pogledu njihove hranjive vrijednosti.

Ipak određeni, mali sadržaj celuloze u namirnicama pozitivno djeluje na probavne organe jer regulira peristaltiku crijeva i potiče ih na rad.

Za određivanje sirove celuloze izrađeno je nekoliko tipova metoda koje se baziraju na osobinama celuloze i njezinom odnosu prema drugim sastojcima, koji zajedno s celulozom dolaze u biljnim namirnicama. Osnovni cilj svih metoda je da se pomoću odgovarajućih reagensa uklone sve strane tvari te sa većom ili manjom točnošću odredi sadržaj čiste celuloze.

12. vježba

Određivanje celuloze metodom po Scharrer–Kurschner-u

Ovo je gravimetrijska metoda s obzirom da se traženi spoj izdvaja i određuje u obliku taloga. Postupak se sastoji iz dva dijela. U prvom dijelu se određuje sirova celuloza koja uključuje prisutnost i drugih netopivih tvari, prije svega mineralnih (anorganskih) tvari. Ako se želi odrediti sadržaj čiste celuloze onda, u drugom dijelu vježbe treba odrediti sadržaj mineralnih tvari na način kako se određuje pepeo.

Zadatak vježbe: Metodom Scharrer-Kurschner-a odrediti sadržaj čiste i sirove celuloze te sadržaj pepela u zadanom uzorku. Rezultate prikazati kao masu i kao maseni udio.

Pribor: okrugla tikvica od 250 cm³, Liebigovo hladilo, stakleni lončić za filtriranje, stakleni štapić, laboratorijska čaša od 250 cm³, porculanski lončić za žarenje, metalna kliješta

Kemikalije:

octena kiselina (w = 70 %) (V = 75 cm ³)	etanol
konc. HNO ₃ (V = 5 cm ³)	eter
trikloroctena kiselina (m = 2 g)	

Postupak:

1 g tvari (živežne namirnice) kuhajte pola sata u tikvici s povratnim hladilom s 25 cm³ prethodno pripremljene smjese za otapanje neceluloznih tvari. Smjesa se dobije miješanjem 75 cm³ 70 %-tne octene kiseline, 5 cm³ koncentrirane dušične kiseline, i 2 g trikloroctene kiseline.

Ako se pojedini djelići namirnice uhvate za stijenke tikvice, za vrijeme kuhanja treba koji put protresti cijelu aparaturu. Nakon kuhanja otopinu još vruću filtrirajte kroz stakleni lončić za filtriranje uz ne baš jaki vakuum kako se ne bi začepile pore filtera. Talog najprije isperite s nešto vrućeg, naprijed navedenog reagensa, nakon toga vrućom destiliranom vodom i konačno etanolom i eterom (tri puta etanolom i dva puta eterom). Talog prenesite u prethodno izžareni i izvagani porculanski lončić i sušite u sušioniku jedan sat kod 110-120⁰C. Nakon hlađenja u eksikatoru lončić sa sadržajem izvažite i iz razlike izračunajte sadržaj sirove celuloze.

Da bi odredili sadržaj čiste celuloze talog prenesite u izvagani lončić za žarenje, najprije spalite na nižoj temperaturi a zatim žarite na visokoj, ohladite i izvažite. Dobivenu masu pepela, koji je zaostao nakon žarenja, odbijte od mase sirove celuloze da dobijete masu čiste celuloze. Sa tim podatkom izračunajte i maseni udio celuloze u namirnici.

Podaci za izračunavanje:

masa uzorka $m_1 =$

masa praznog lončića $m_2 =$

masa lončića i sirove celuloze $m_3 =$

masa sirove celuloze $m_4 =$

maseni udio sirove celuloze $w_1 =$

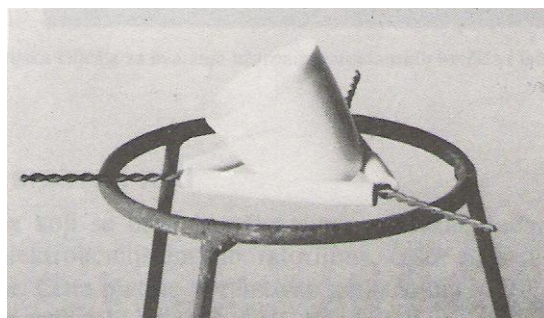
masa lončića i pepela $m_5 =$

masa pepela $m_6 =$

maseni udio pepela $w_2 =$

masa čiste celuloze $m_7 =$

maseni udio čiste celuloze $w_3 =$



Sl. 6.: Pribor za žarenje

5. AMINOKISELINE I PROTENI

Proteini ili bjelančevine su visokomolekularni organski spojevi sa dušikom koji hidrolizom daju aminokiseline. Aminokiseline, osim što su osnovne strukturne jedinice proteina, u živim tkivima i organima nalaze se također i u slobodnom stanju ili vezane sa raznim drugim organskim spojevima.

Djelovanje proteina

Proteini, kao i amino kiseline, osim što predstavljaju gradivni materijal, uključeni su i u sve kritične funkcije žive tvari: regulacija metabolizma, transport (npr. kisika), funkcioniranje živčanog sustava, katalitičko djelovanje i dr.

Grada proteina

Aminokiseline u proteinima povezane su preko svojih funkcionalnih skupina i to tako da iz jedne aminokiseline reagira karboksilna skupina a iz druge aminoskupina pri čemu se izdvaja molekula vode. Veza koja nastaje zove se peptidna ili amidna veza.

U izgradnji proteina našeg organizma sudjeluje dvadeset aminokiselina. Deset ih organizam sam stvara a deset ih unosima sa hranom i te aminokiseline nazivaju se esencijalne ili bitne.

Prema strukturi proteini se dijele na globularne ili kuglaste i fibrilarne ili nitaste. Prostorni izgled odnosno konfiguracija molekula uvjetovana je djelovanjem veznih i neveznih interakcija između pojedinih dijelova polipeptidnog lanca što se objašnjava proučavanjem primarne, sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture proteina.

Svojstva proteina

S obzirom na strukturu proteini se razlikuju i po svojstvima. Dok su fibrilarni netopljivi u vodi (otapaju ih samo jake kiseline i lužine), globularni proteini su topljivi u vodi i otopinama soli ali su osjetljivi na povišenu temperaturu. Proteini su amfoternog karaktera, imaju karakterističan izoelektrični pH (ili izoelektrična točka) i optički su aktivne tvari. Pod utjecajem raznih faktora (visoka temperatura, promjena pH sredine, prisustvo iona teških metala ili organskih otapala) mijenja se sekundarna i tercijarna struktura proteina uslijed čega se mijenjaju i njihova prirodna svojstva. Kidaju se nekovalentne veze među molekulama i dolazi do koagulacije proteina. Ta pojava naziva se denaturacija.

5.1. KVALITATIVNO DOKAZIVANJE PROTEINA

Kvalitativno dokazivanje proteina temelji se na reakcijama aminokiselina od kojih su građeni proteini. U toku dokazivanja može doći do promjene boje otopine ili do stvaranja taloga pa se te reakcije dijele na obojene i taložne reakcije za dokazivanje proteina.

13. vježba

Dokazivanje aminokiselina i proteina

Za dokazivanje proteina može se kao uzorak uzeti 5 %-tna otopina kupovnog albumina ili se pripremi otopina bjelanjka na sljedeći način:

bjelanjak jednog jajeta se dobro promućka sa 100 cm³ vode i filtrira preko vate.

Zadatak vježbe: Obojenim i taložnim reakcijama ispitati prisutnost aminokiselina u zadanom uzorku.

Pribor: epruvete, drveni stalak, drvena štipaljka, kapaljke

Kemikalije:

HNO₃ (w = 10 %)

NaOH (w = 40 %)

NaOH (w = 10 %)

PbAc₂ (w = 10 %)

CuSO₄ (w = 1 %)

HCl (w = 10 %)

KOH (w = 10 %)

etanol

(NH₄)₂SO_{4(s)}

otopina albumina (w = 1 %)

otopina ninhidrina u etanolu (w=1%)

1. Obojene reakcije proteina

a) Ksantoproteinska reakcija

Pozitivnu ksantoproteinsku reakciju daju one bjelančevine u čijem sastavu se nalaze aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan). Dokazivanje se temelji na reakciji sa dušičnom

kiselinom kod čega dolazi do nitriranja benzenske jezgre aromatskih aminokiselina i nastaju nitrosojevi karakteristične žute boje. Dodatkom natrijeve lužine boja se mijenja u narančasto-smeđu.

Postupak:

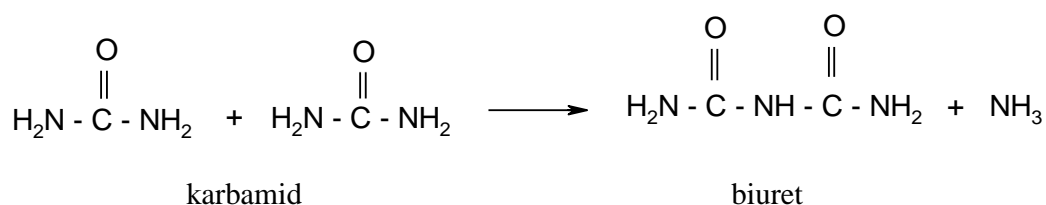
U 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka dodajte otprilike 2 cm³ 10 %-tne dušične kiseline. Kod toga nastaje bijeli talog zgrušane bjelančevine. Ako sadržaj epruvete zagrijete, talog će požutjeti (xanthos /grč./ = žut).

Sadržaj epruvete ohladite na sobnu temperaturu, pustite da se talog slegne i zatim odlijte glavninu tekućinu. Ostatku u epruveti dodajte 10 %-tne otopine NaOH do alkalne reakcije. Žuti talog se otopi i prelazi u narančasto-smeđu otopinu.

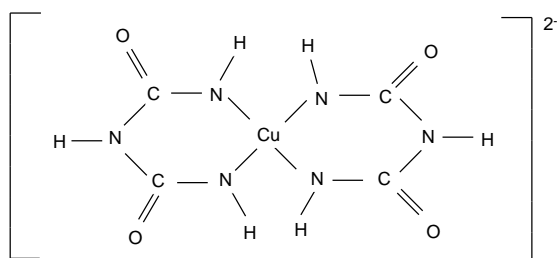
Ksantoproteinska reakcija odvija se i na našoj koži kad npr. prsti dođu u dodir s dušičnom kiselinom. Koža požuti a nakon pranja sapunom žuta boja kože, uslijed alkalne reakcije sapunice, prelazi u narančasto-smeđu.

b) Biuret reakcija

Biuret je spoj koji nastaje pri zagrijavanju karbamida ili uree. Pri tome se dvije molekule uree povezuju ketoimidnom vezom (- CO – NH -) uz oslobađanje jedne molekule amonijaka.



Biuret je bezbojna kristalna tvar topljiva u vodi. Sa otopinom bakrovog (II) sulfata, u prisustvu baze, daje ljubičasto obojenje jer sa ionom bakra nastaje kompleksni ion.



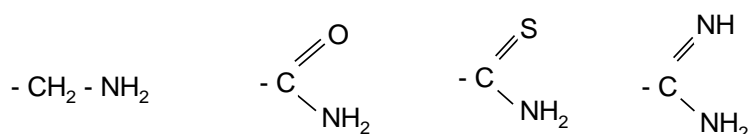
Kompleks molekule biureta s ionom bakra

Pozitivnu biuret reakciju daju svi spojevi koji u svom sastavu sadrže ketoimidnu vezu.

Postupak:

U epruvetu stavite oko 2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka i 4-5 kapi vrlo razrijeđene (1 %) otopine bakrovog sulfata. Otopina će poprimiti zelenkastu boju. Tome polako dokapavajte 10 %-tnu otopinu KOH dok talog ne pređe u ljubičastu otopinu (kompleksni spoj s bakrom).

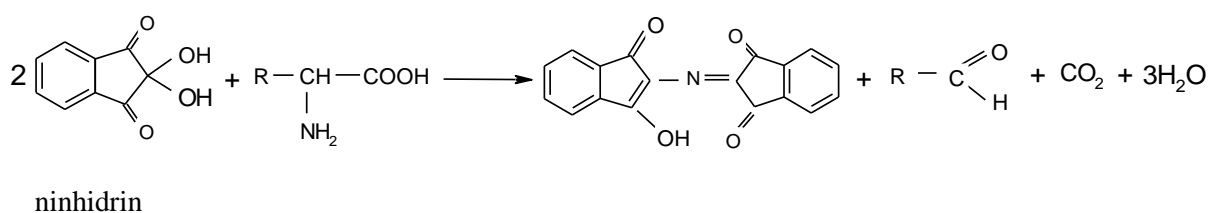
Biuret reakcija bit će pozitivna ako uzorak sadrži barem dvije od sljedećih skupina:



c) Ninhidrinska reakcija

Ninhidrin je karakteristični reagens za dokazivanje aminokiselina. Sve aminokiseline s ninhidrinom daju plavo do ljubičasto obojenje, osim prolina koji daje žuto obojenje.

U epruvetu odmjeri oko 2 cm³ otopine albumina i dodaj 0,5 cm³ otopine ninhidrina u etanolu. Sadržaj epruvete zagrijavaj na vodenoj kupelji i nakon toga ohladi. Nakon kraćeg stajanja zabilježi obojenje.



2. Taložne reakcije proteina

Taložne reakcije proteina temelje se na pojavi denaturiranja proteina tj. promjeni njihove prirodne građe. Pod utjecajem raznih faktora bjelančevine se talože u obliku koloidnog taloga a ta promjena može biti reverzibilna i ireverzibilna.

c) Reakcije reverzibilnog taloženja:

Kod ovih reakcija ne dolazi do trajne promjene prirodne strukture bjelančevina pa se istaloženi proteini lako vraćaju u otopinu već dodatkom vode. U ovakve reakcije spada većina reakcija isoljavanja bjelančevina iz njihovih vodenih otopina solima lakih metala i amonijevih soli (npr. NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ ...)

Pokus 1. Taloženje pomoću amonijevog sulfata

U epruvetu stavite oko 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka i dodajte kristale amonijevog sulfata. Smjesu promućkajte pri čemu nastaje bijeli talog. Nakon toga u epruvetu dodajte destilirane vode i promućkajte. Talog će se otopiti.

b) Reakcije ireverzibilnog taloženja:

U ovim reakcijama bjelančevine se nepovratno talože tj. zgrušavaju (denaturiraju) jer se pri tom bitno mijenja njihova prirodna struktura. Do ovakvog taloženja može doći djelovanjem soli teških metala (Hg, Pb, Cu i dr.), jakih kiselina, organskih otapala ili djelovanjem visoke temperature.

Pokus 2. Taloženje pomoću soli teških metala

U epruvetu stavite 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka, dodajte nekoliko kapi 40 %-tne otopine NaOH i pažljivo zagrijavajte nekoliko minuta. Lužnatoj otopini dodajte par kapi otopine olovnog acetata . Nastati će tamni talog ili smeđe obojenje od izlučenog olovnog sulfida.

Pozitivnu reakciju daju proteini u čijem sastavu se nalaze aminokiseline koje sadrže sumpor (cistin, cistein, metionin).

Pokus 3. Taloženje pomoću jake kiseline

U epruvetu stavite 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka, i dokapavajte koncentriranu kloridnu kiselinu. Dodatkom HCl mijenja se pH otopine uslijed čega se bjelančevine koaguliraju pa se pojavljuje bijeli pahuljasti talog. Dodatkom vode provjerite da li je promjena trajna.

Pokus 4. Taloženje pomoću alkohola (organsko otapalo)

U epruvetu stavite 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka i tome dodajte isto toliko 96 %-tnog etanola. Bjelančevine će se koagulirati i ispadati iz otopine u obliku bijelog taloga.

Pokus 5. Taloženje zagrijavanjem

U epruvetu stavite 1-2 cm³ otopine albumina ili bjelanjka, i zakuhajte. Zamućenje ili talog od zgrušanih bjelančevina dokaz su promjene u strukturi bjelančevina. Provjerite da li je promjena trajna.

5.2. KROMATOGRAFIJA AMINOKISELINA

Kromatografija je tehnika za razdvajanje raznih molekula na temelju njihovih fizikalnih svojstava, kao što su topivost, adsorpcijska svojstva, veličina molekule, naboj molekule ili biološke specifičnosti (Flögel i Lauc, 1998.). Ovisno o tome koja fizikalna svojstva koristimo za razdvajanje molekula kromatografija može biti:

- a) adsorpcijska
- b) tekućinsko-tekućinska
- c) ionsko izmjenjivačka
- d) plinsko-tekućinska
- e) gel-filtracijska

Kromatografske se tehnike koriste u preparativne (pročišćavanje i izolacija) i analitičke svrhe (detekcija ili mjerenje).

Sustav za kromatografiju sastoji se od nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Nepokretnu fazu predstavlja nosač (čvrsta tvar ili tekućina na nekoj podlozi). Pokretnu fazu predstavljaju različita otapala, smjesa otapala ili plin. Kromatografsko razdvajanje temelji se na raspodjeli molekula između nepokretne i pokretne faze ovisno o koeficijentu raspodjele (K_d), koji predstavlja omjer koncentracije u nepokretnoj i pokretnoj fazi.

Prema načinu izvedbe kromatografije razlikujemo:

- a) kromatografiju na stupcu (koloni) – ako se nepokretna faza nalazi u cijevima
- b) tankoslojnu kromatografiju – ako je nepokretna faza u obliku tankog sloja nanosena na staklenu, aluminijsku ili plastičnu ploču
- c) papirnu kromatografiju – ako papir služi kao kromatografski nosač.

Kod tankoslojne i papirne kromatografije odgovarajuća količina uzorka nanosi se na određenoj udaljenosti od jednog kraja nosača (predstavlja start). Tvari prisutne u uzorku kroz nosač nosi otapalo pri čemu dolazi do njihovog razdvajanja ovisno o koeficijentu raspodjele svake tvari između nosača i otapala. Nakon određenog vremena u kojem je otapalo prošlo neku duljinu puta po tankom sloju ili papiru, istovrsne molekule će se nakupljati u obliku vrpce. Udaljenost vrpce od starta ovisi o vrsti tvari odnosno njezinom afinitetu prema nepokretnoj fazi. Što je taj afinitet veći tvar će preći kraći put i ranije formirati vrpcu.

Nakon završenog kromatografskog razdvajanja, tvari dokazujemo kvalitativno (bojanjem ili kemijskom reakcijom pri kojoj nastaje obojeni produkt) te kvantitativno (ispiranjem sa nosača i određivanjem koncentracije tvari).

Sliku raspodjele zovemo kromatogram, a mjesto određene tvari na kromatogramu izražavamo omjerom udaljenosti tvari i otapala od starta što predstavlja R_f vrijednost.

Vrijednost R_f je omjer duljine puta d_1 koji je prešla ispitivana tvar i duljine puta d koji je u isto vrijeme prešlo čisto otapalo. To je konstanta karakteristična za tvar uz uvjet da se određivanje izvodi pod istim uvjetima (nepokretna faza, temperatura, otapalo) te može služiti za identifikaciju tvari.

$$R_f = \frac{d_1}{d}$$

Danas je gotovo nemoguće zamisliti analitički laboratorij u kojem se ne izvodi bar jedan oblik kromatografskog ispitivanja. Prednosti ove metode su velike jer zahtijevaju jednostavnu aparaturu (osim plinske kromatografije), razdvajati se mogu tvari sličnih svojstava i građe a za samu analizu dovoljne su izuzetno male količine uzoraka.

14. vježba

T a n k o s l o j n a k r o m a t o g r a f i j a a m i n o k i s e l i n a

Zadatak vježbe: Primjenom tankoslojne kromatografije odrediti R_f vrijednost zadanih aminokiselina i identificirati ih.

Kemikalije: n-butanol (za kromatografiju ili *p.a.*), aceton (za kromatografiju ili *p.a.*), 96% etanol, octena kiselina, destilirana voda, n-propanol, ninhidrin, L-aminokiseline

Pribor: kadica za kromatografiju, staklena ploča 10x10 cm prekrivena 0,1 mm debelim slojem celuloze (Merck), kapilare, laboratorijska čaša od 100 cm³, menzure, električno sušilo sa stalkom, prskalice

Otopine:

Standardne otopine aminokiselina:

1 g aminokiseline u 10 cm³ destilirane vode

Smjesa za razdvajanje (priprema se neposredno prije upotrebe):

35 cm³ n-butanola

35 cm³ acetona

10 cm³ octene kiseline

20 cm³ destilirane vode

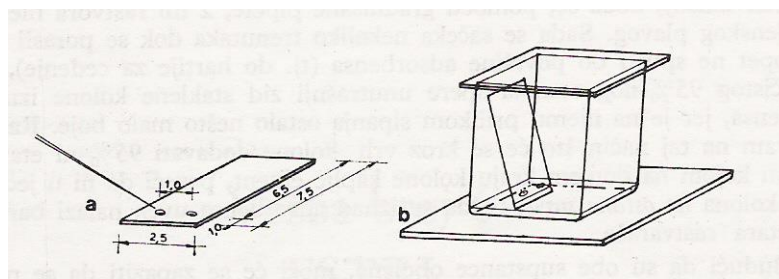
Otopina za bojenje:

0,5 g ninhidrina u 100 cm³ smjese acetona i n-propanola 1:1

Postupak:

Pripremite smjesu za razdvajanje, ulijte ju u kadicu za kromatografiju i dobro poklopite. Pričekajte 30 min da se atmosfera u kadici zasiti parama otapala. Za to vrijeme pripremite pločicu za kromatografiju na slijedeći način: običnom olovkom lagano, da se ne ošteti tanki sloj na pločici, ucrtajte jednu crtu 1,5 cm od kraja pločice i još jednu 8 cm dalje tj. 0,5 cm od drugog ruba pločice. Na početnoj crti (startna linija) označite mjesta za nanošenje uzoraka na razmaku od 1 cm. Uzorke nanosite kapilarom, malo po malo uz sušenje toplim zrakom kako bi tragovi bili što uži. Nakon sušenja pločicu postavite okomito u kadicu (uzorke okrenite prema dolje) pazeći da ne uronite dio pločice na koji ste nanijeli uzorke. Dobro poklopite kadicu i čekajte dok fronta otapala ne dođe do gornje crte na pločici. Izvadite pločicu iz kadice i osušite je toplim zrakom. Pločica je suha kada više ne osjetite miris otapala (octene kiseline). Radi prepoznavanja aminokiselina pločicu poprskajte otopinom ninhidrina. Nakon nekog vremena pojavit će se obojeni tragovi uzoraka (proces se može ubrzati grijanjem).

Za svaki uzorak izračunajte R_f vrijednost i usporedbom sa standardnim R_f vrijednostima zaključite o kojim se aminokiselinama radi.



Sl. 7.: Tankoslojna kromatografija

- a) nanošenje uzorka na pločicu kapilarom
- b) pločica u kromatografskoj kadici

5.3. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEINA

Bit metode sastoji se u tome da se uzorak kuha s koncentriranom sumpornom kiselinom, pri čemu se organski dio razori u CO_2 i H_2O (tzv. mokro spaljivanje), a dušik iz amino-skupine prelazi u amonijak koji s prisutnom kiselinom daje amonijev sulfat. Amonijak se iz amonijevog sulfata oslobađa kuhanjem s koncentriranom natrijevom lužinom, destilira, hvata u zasićenoj otopini borne kiseline i titrira otopinom HCl .

15. vježba

Određivanje bjelančevina metodom po Kjeldahl-u

Zadatak: Metodom po Kjeldahl-u odrediti sadržaj proteina u zadanoj namirnici.

Pribor: Kjeldahlova tikvica od 50 cm^3 , menzura od 10 i 20 cm^3 , stakleni lijevak, tikvica za destilaciju, termometar, lula za destilaciju, Erlenmeyerova tikvica od 100 cm^3 , Liebigovo hladilo, bireta od 50 cm^3 , laboratorijska čaša od 250 cm^3 , stakleni štapić, metalni pribor

Kemikalije:

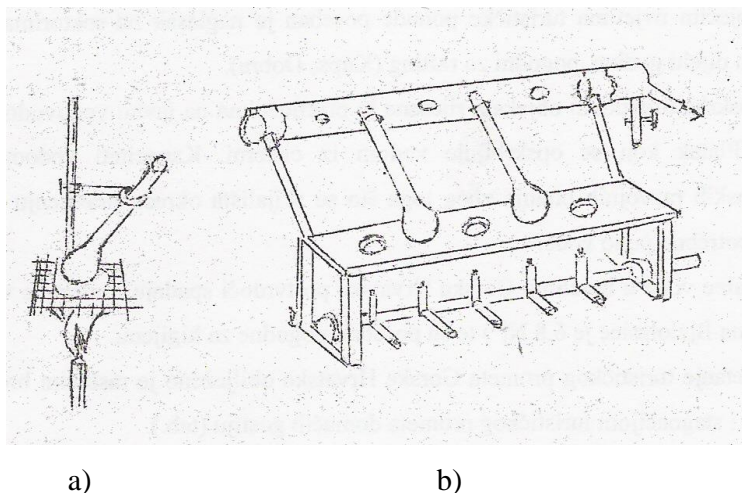
konc. H_2SO_4	($V = 5 \text{ cm}^3$)	H_3BO_3 (zasić. otop.)	($V = 10 \text{ cm}^3$)
H_2O_2 (w = 30 %)	($V = 2 \text{ cm}^3$)	metil-crveno + metil-plavo	
NaOH (w = 30 %)	($V = 20 \text{ cm}^3$)	HCl (c = $0,05 \text{ mol/dm}^3$)	
fenolftalein			

Postupak:

a) Spaljivanje uzorka:

Na analitičkoj vagi odvagajte otprilike 0,1-0,3 g uzorka i kvantitativno prenesite u suhu Kjeldahlovu tikvicu od 50 cm^3 pa prelijte sa 5 cm^3 koncentrirane sumporne kiseline. Kiselinu lijevajte polako niz grlo i nakon toga dobro promiješajte. Cijeli sadržaj mora biti ovlažen kiselinom jer u protivnom mogu nastati gubici (dušik bi izlazio u elementarnom obliku). Tikvicu zatim položite na mrežicu i učvrstite za stalak u kosom položaju, kao što je prikazano na slici 7. U početku zagrijavajte na malom, slabom plamenu približno 5 minuta, a zatim pojačajte plamen

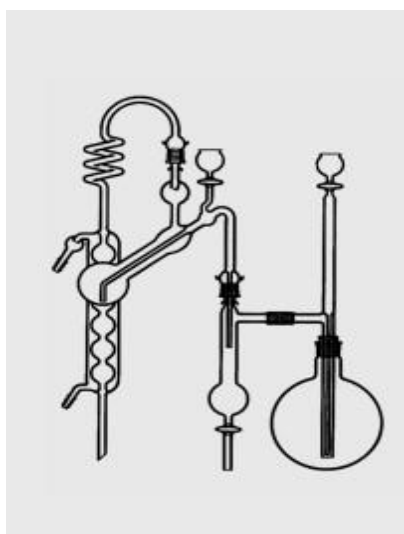
da otopina dobro vrije. Nakon pola sata uklonite plamenik, ostavite da se tikvica ohladi na zraku i u ohlađenu otopinu dodajte 1-2 cm³ 30 %-tne otopine vodikovog peroksida. Lagano promiješajte tikvicu pazeći da sadržaj ne izađe iz tikvice zbog pjenjenja koje se javlja uslijed razvijanja kisika. Sad tikvicu ponovo zagrijavajte dok otopina ne postane bezbojna i bistra i dok ne prestane razvijanje mjehurića kisika. Po potrebi dodajte još malo vodikovog peroksida.



Sl. 8.: Spaljivanje uzorka u Kjeldahlovim tikvicama: a) pojedinačno; b) u nizu

b) Destilacija amonijaka:

Amonijak se destilira u Parnas-Wagnerovoj aparaturi. Pogodna je za serijska određivanja jer je ne treba sastavljati i rastavljati a poslije svake destilacije automatski se prazni i može se započeti nova destilacija. U nedostatku Parnas-Wagnerove aparature može se upotrijebiti obična aparatura za destilaciju s vodenim hladilom što je predviđeno i kod ove vježbe.



Sl. 9.: Parnas-Wagnerova aparatura za destilaciju amonijaka

Razloženom i ohlađenom uzorku u Kjeldahlovoj tikvici dodajte 10 cm³ destilirane vode i kvantitativno, preko lijevka, prenesite u tikvicu za destilaciju. To ćete postići tako da Kjeldahlovu tikvicu isperete osam puta malom količinom destilirane vode. Pri tom treba imati na umu da volumen tekućine u tikvici za destilaciju ne prijeđe polovicu volumena posude ni nakon dodatka lužine i završenog ispiranja. Zatim kroz lijevak ulijte postupno 20 cm³ 30 %-tne otopine natrijeve lužine, odnosno toliko da natrijeve lužine bude 20 % više nego sumporne kiseline. Na kraju dodajte 2-3 kapi fenolftaleina (da biste provjerili lužnatost otopine) i zatvorite tikvicu čepom kroz koji je provučen termometar.

U predložak (Erlenmajerova tikvica od 100 cm³) stavite 10 cm³ zasićene otopine borne kiseline i kap indikatora (smjesa metil-crvenila i metil-plavila) pri čemu se smjesa oboji ljubičastom bojom. Predložak namjestite tako da vrh lule bude uronjen u otopinu otprilike 1 mm. Destilaciju izvodite direktnim zagrijavanjem preko mrežice. Kad je sve pravilno namješteno počnite sa destilacijom. Nakon što ljubičasta boja otopine u predlošku prijeđe u zelenu nastavite sa destilacijom još 5 minuta i prekinite. Potom predložak spustite toliko da otvor lule bude 3 mm iznad površine tekućine i destilaciju nastavite još dvije minute. Nakon toga lulu isperite malom količinom destilirane vode koju hvatate u predložak. Za čitavo vrijeme destilacije tekućina u predlošku mora biti hladna (tikvicu držati u zdjelici s ledom).

c) Titracija amonijaka:

Sadržaj u predlošku promiješajte i titrirajte s otopinom HCl koncentracije 0,05 mol/dm³ dok zelena boja otopine ne prijeđe u ljubičastu. Iz utroška kiseline izračunajte sadržaj dušika u uzorku odnosno sadržaj bjelančevina.

Jednadžbe reakcija:



Račun:

Na osnovu gornjih jednažbi reakcija proizlazi sljedeći omjer bitan za daljnji proračun:

$$n(\text{NH}_3) = n(\text{N}) = n(\text{HCl})$$

$$\frac{m(\text{N})}{M(\text{N})} = c(\text{HCl}) * f(\text{HCl}) * V(\text{HCl})$$

Svrha određivanja bila je da se odredi maseni udio bjelancevina u uzorku.

Iz rezultata titracije izračunajte masu dušika prema gornjem izrazu a masu bjelancevina dobit ćete tako da masu dušika pomnožite s faktorom f_b koji je dobiven empirijski i iznosi 6,25. Na kraju još izračunajte maseni udio bjelancevina u uzorku.

$$m(\text{bjelancevine}) = m(\text{N}) * f_b$$

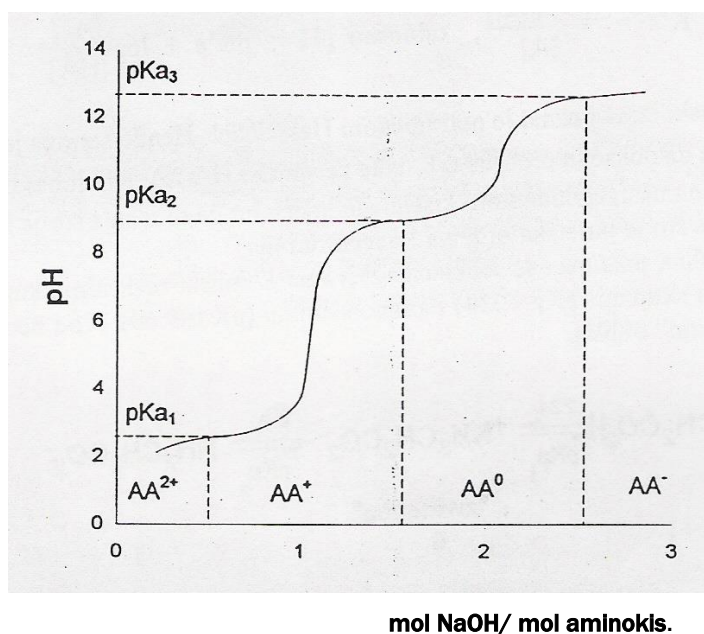
$$w(\text{bjelancevine}) = \frac{m(\text{bjelancevine})}{m(\text{uzorak})}$$

Rezultati određivanja:

masa uzorka:	$m(\text{uzorka}) =$
utrošak HCl:	$V(\text{HCl}) =$
koncentracija (HCl):	$c(\text{HCl}) =$
faktor koncentracije:	$f(\text{HCl}) =$
masa dušika:	$m(\text{N}) =$
masa bjelancevina:	$m(\text{bjelancevine}) =$
maseni udio bjelancevina:	$w(\text{bjelancevine}) =$

5.4. POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA AMINOKISELINA

Aminokiseline su, kao i većina bioloških molekula (proteini, nukleinske kiseline) poliprotone kiseline. Ako takvim spojevima postupno dodajemo lužinu, doći će do niza protonskih disocijacija a svaki disocijacijski korak stvorit će svoje pufersko područje. pKa vrijednosti dovoljno se razlikuju da se na prikazu titracijske krivulje lako mogu raspoznati pojedini disocijacijski koraci odnosno puferska područja (kao na slici 9).



Sl. 10.: Titracijska krivulja aminokiseline arginin

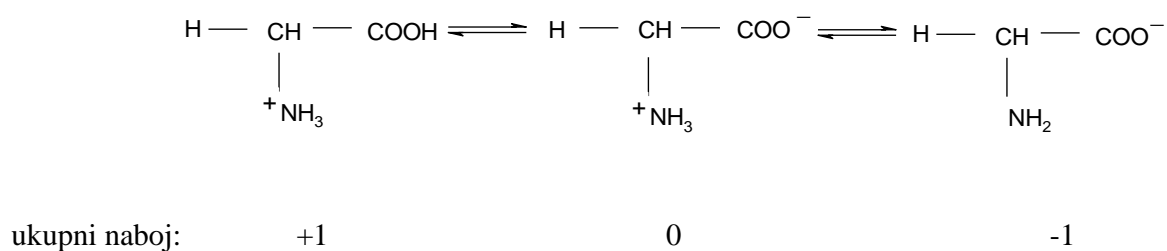
Otopina koja se opire promjeni pH poznata je kao puferska otopina (otopina slabe kiseline i njezine konjugirane baze odnosno otopina slabe baze i njezine konjugirane kiseline). Djelovanje pufera objasniti ćemo na najjednostavnijem primjeru:



Dodatkom kiseline u pufersku otopinu anion A⁻ preuzima dodani H⁺ i stvara HA i tako smanjuje pH promjenu. Dodatkom OH⁻ iona, oni preuzimaju protone od HA stvarajući H₂O + A⁻ Time se također onemogućava ili barem smanjuje pH promjena. Maksimalni puferski kapacitet otopine

slabe kiseline HA i njezine konjugirane baze A⁻ je u času kada je [A⁻] = [HA], tj. kada je pH otopine jednak pKa.

Kod aminokiselina postupna se ionizacija odvija na kemijski različitim skupinama. Tako glicin ima karboksilnu skupinu i amino skupinu koje ioniziraju. Kod neutralnog pH glicin je u “zwitterionskom” obliku.



Titriranjem glicina doći će do disocijacije protona u dva koraka. Glicin je amfoterni elektrolit jer do disocijacije protona dolazi i u kiselom i u bazičnom području pH. Očekujemo da će kod određenog pH koncentracija pozitivnih i negativnih naboja biti jednaka. Taj pH poznat je pod imenom **izoelektrična točka**. Može se izračunati ako su poznate vrijednosti pKa₁ i pKa₂.

$$\text{pH} = \frac{(\text{pKa}_1 + \text{pKa}_2)}{2} = \text{pI}$$

pH izoelektrične točke obično označavamo simbolom pI.

Ako molekula ima više od dvije ionizacijske skupine, disocijacija protona teče u više koraka. Izoelektrična točka nalazit će se u onom području pH, u kojem je zwitterionski oblik molekule dominantna vrsta. pI će kao i kod glicina biti jednak onom pH kod kojeg je koncentracija molekularnog oblika s jednim pozitivnim nabojem jednaka koncentraciji molekularne vrste s jednim negativnim nabojem. Općenito možemo reći da je pI jednak aritmetičkoj sredini pKa vrijednosti onih disocijacijskih reakcija u kojima izravno sudjeluje zwitterionski oblik.

16. vježba

Potenciometrijska titracija aminokiselina

Zadatak: Na osnovu podataka dobivenih potenciometrijskom titracijom zadane aminokiseline nacrtaj titracijsku krivulju pa iz nje odredi broj disocijacijskih koraka i pH puferskih područja te uz pomoć tablice 10 izračunaj pI zadane aminokiseline.

Kemikalije:

otopina aminokiseline (120 mg / 40 cm³ destilirane vode)

NaOH (0,2 mol/dm³)

HCl (0,2 mol/dm³)

Pribor: pH-metar, bireta za NaOH, bireta za HCl, pipete, čaša od 100 cm³, milimetarski papir

Postupak: U čaši od 100 cm³ pripremite otopinu aminokiseline, uronite kombiniranu elektrodu spojenu na prethodno uključeni i baždareni pH-metar i titrirajte sadržaj u čaši 0,2 M otopinom NaOH. Lužinu dodavajte u malim obrocima (0,5 cm³) kako bi grafički prikaz titracije sadržavao što više eksperimentalnih točaka. Nakon svakog dodatka lužine uzorak dobro promiješajte, očitajte pH i zabilježite ga u tablicu. Na isti način titrirajte otopinu aminokiseline otopinom 0,2 M HCl.

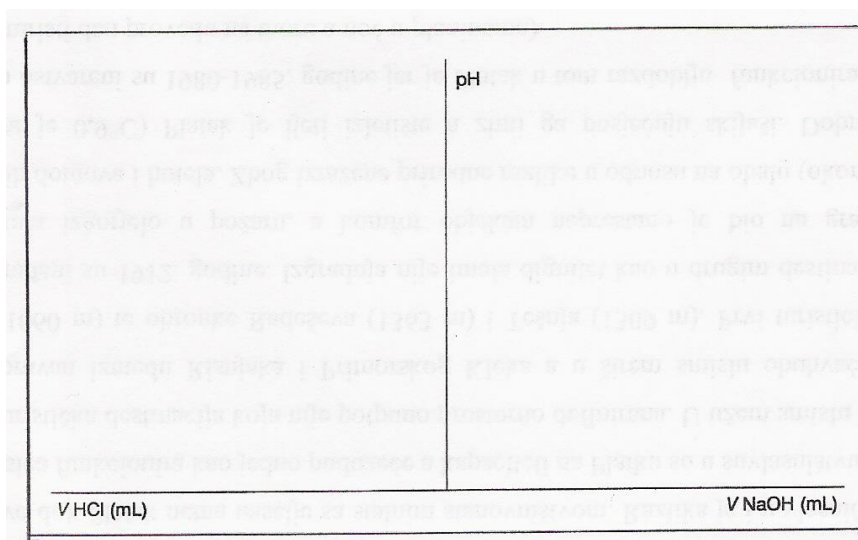
V	pH	V	pH	V	pH

Tab. 9.: Titracija lužinom

V	pH	V	pH	V	pH

Tab. 10.: Titracija kiselinom

Prema dobivenim podacima izradite grafički prikaz tako da na os apscise nanesete dodani volumen HCl (s lijeve strane) i NaOH (s desne strane) u cm^3 , a na ordinatu očitani pH.



Sl. 11.:Ucrtavanje titracijske krivulje zadane aminokiseline

Tablica 11.: Ionizacijske konstante funkcionalnih skupina nekih aminokiselina kod 20°C

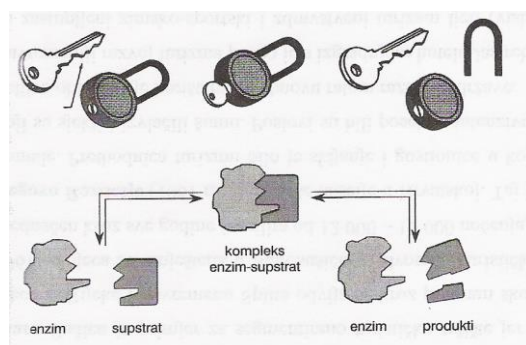
Aminokiselina	M_r	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Alanin	89,1	2,35	9,69	
Arginin	174,2	2,17	9,0	12,48
Asparagin	132,1	2,02	8,8	
Asparaginska kis.	133,1	2,09	3,86	9,82
Cistein	121,2	1,71	8,33	10,78
Glutaminska kis.	147,1	2,19	4,25	9,67
Glutamin	146,1	2,17	9,13	
Glicin	75,1	2,34	9,6	
Histidin	155,2	1,82	6,0	9,17
Lizin	146,2	2,18	8,95	10,53
Prolin	115,2	1,99	10,60	
Serin	105,1	2,21	9,15	
Tirozin	181,2	2,2	9,11	10,07

Izvor: M. Flögel i suradnici, Biokemija, Odjel za Biomedicinske znanosti, Zagreb, 1995.

6. ENZIMI

Enzimi su tvari proteinske prirode koje nastaju u životinjskim ili biljnim tkivima. Uloga im je ubrzavanje kemijskih reakcija u živim stanicama pa ih nazivamo i biološkim katalizatorima. Njihovi aminokiselinski ogranci imaju funkcionalne skupine koje mogu katalizirati određene reakcije. Samo mali dio molekule enzima predstavlja njegovo aktivno mjesto, na koje se veže tvar iz reakcije (supstrat). Enzimi mogu djelovati samo na točno određene molekule pa kažemo da imaju selektivno djelovanje. Njihova visoka specifičnost djelovanja objašnjava se oblikom pukotine ili žlijeba što je u strukturi enzima izgrađuju aminokiselinski ogranci.

Glavna funkcija enzima je ubrzavanje kemijskih reakcija u živom organizmu. Enzimi imaju veliku katalitičku moć (reakciju ubrzavaju milijun do milijardu puta) ali ne mogu pomaknuti kemijsku ravnotežu. U enzimskim reakcijama nema sporednih niti neželjenih reakcija. Da bi enzim djelovao kao katalizator mora doći u kontakt sa supstratom koji ima oblik komplementaran aktivnom mjestu enzima (po sistemu ključa i brave). U toku reakcije enzim sa supstratom stvara enzim-supstrat kompleks koji zahtijeva manju energiju aktivacije i upravo zbog toga se reakcija može brže odvijati. To možemo prikazati na sljedeći način:



Sl. 12. *Mehanizam djelovanja enzima (stvaranje kompleksa enzim-supstrat)*

Katalitička aktivnost mnogih enzima regulira se raznim tvarima. Jedne aktiviraju djelovanje enzima (aktivatori) a druge usporavaju ili sprečavaju rad enzima (inhibitori). Ioni nekih metala djeluju kao aktivatori i sastavni su dio koenzima dok mnogi otrovi i lijekovi djeluju kao inhibitori. Na enzimsku aktivnost također utječu: pH, temperatura, te koncentracija supstrata i koncentracija enzima i koenzima.

17. vježba

Specifičnost djelovanja enzima

Karakteristična osobinu enzima je specifičnost njihovog djelovanja. Pod tim pojmom podrazumijeva se svojstvo da svaki enzim djeluje samo na jedan supstrat ili skupinu srodnih supstrata, odnosno na određeni tip kemijske veze u različitim supstratima. Također je značajna i stereokemijska specifičnost tj. u prisutnosti nekoliko stereoizomera enzimi djeluju samo na jedan od njih.

Raspon specifičnosti enzima dosta je širok. Naime, neki enzimi raspolažu vrlo širokim stupnjem specifičnosti (npr. ureaza ubrzava hidrolizu peptidne veze), dok su drugi usko specifični (npr. maltaza ubrzava hidrolizu disaharida maltoze, a nema nikakav učinak na hidrolizu disaharida saharoze). Isti je slučaj sa amilazom (enzim iz pljuvačke) koja ubrzava hidrolizu polisaharida a nema nikakav efekt na disaharide.

Zadatak vježbe: Ispitati specifičnost djelovanja enzima amilaze i ureaze te obrazložiti dobivene rezultate.

Pribor: epruvete, drveni stalak, laboratorijska čaša od 250 cm³, drvena štipaljka, kapaljke, crveni lakmus papir

Kemikalije:

otopina amilaze ($\gamma = 1,0$ g/L)

otopina uree ($= 50$ g/L),

otopina škroba ($\gamma = 10$ g/L)

otopina acetamida ($\gamma = 50$ g/L)

otopina saharoze ($\gamma = 10$ g/L)

sojino brašno

otopine Fehling I i II

1) Specifičnost djelovanja amilaze

Amilaza je enzim iz grupe hidrolaza što znači da ubrzava reakcije hidrolize kod određenih molekula. Kao i svi ostali enzimi, specifična je samo za određene reakcije odnosno supstrate a ta specifičnost može se okarakterizirati kao uska specifičnost i široka specifičnost.

Postupak:

U dvije epruvete stavite po 5 kapi otopine amilaze i razrijedite je 10 puta. U jednu epruvetu dodajte 10 kapi otopine škroba a u drugu 10 kapi otopine saharoze. Pričekajte 10 minuta, a zatim provjerite aktivnost obje epruvete na Fehlingov reagens. Objasnite dobivene rezultate.

2) Specifičnost djelovanja ureaze

Ureaza je enzim iz grupe hidrolaza, podgrupa amidaza.

U jednu epruvetu stavite oko 2 cm³ otopine uree a u drugu isto toliko otopine acetamida (etanamid). U obje epruvete dodajte po 1 g sojinog brašna. Na otvor obje epruvete stavite navlaženi crveni lakmus papir i držatite ga do promjene boje. Objasnite dobivene rezultate te napišite reakcije koje se zbivaju.

18. vježba

Utjecaj aktivatora i inhibitora na aktivnost enzima

Za normalno funkcioniranje nekih enzima često je neophodno prisustvo određenih iona tokom reakcije. Ti ioni su najčešće kationi mada mogu biti i anioni (npr. klorid ion). Aktivnost drugih enzima ne mora se bitno mijenjati u prisustvu tih iona. Na aktivnost enzima mogu imati utjecaj, osim iona, i neke druge tvari različite kemijske prirode. Tvari koje pojačavaju aktivnost enzima nazivaju se aktivatori.

S druge strane ima kationa (Ag, Pb, Hg) koji su naročito toksični za skoro sve enzime. Takve tvari zovemo inhibitorima. Osim spomenutih kationa i druge kemijske tvari mogu biti inhibitori. Pored općih postoje i specifični inhibitori.

Zadatak vježbe: Ispitati utjecaj NaCl i CuSO₄ na aktivnost amilaze.

Pribor: epruvete, drveni stalak, laboratorijska čaša od 250 cm³, drvena štipaljka, kapaljke, menzura od 5 cm³

Kemikalije:

otopina amilaze ($\gamma = 1,0$ g/L)

otopina škroba ($\gamma = 10$ g/L)

otopina NaCl ($\gamma = 10$ g/L)

otopina joda (Lugolova otopina)

otopina CuSO₄ ($\gamma = 10$ g/L)

Postupak: U tri epruvete stavite po 10 kapi otopine amilaze razblažene sa 30 kapi vode. U prvu epruvetu dodajte 1-2 kapi otopine NaCl, u drugu 1-2 kapi otopine CuSO₄ a u treću 1-2 kapi destilirane vode. U sve tri epruvete dodajte po 5 kapi otopine škroba i ostavite ih 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sve tri probe ispitajte s otopinom joda. Rezultate prikažite tabelarno i obrazložite ih.

Tab. 12.: Utjecaj aktivatora i inhibitora na enzime

	Reakcija s J ₂ (obojenje)	Aktivator ili inhibitor
I epruveta (NaCl)		
II epruveta (CuSO ₄)		
III epruveta (destilirana voda)		

19. vježba

Utjecaj temperature na aktivnost enzima

Enzimi su jako osjetljivi na promjenu temperature. Osjetljivost prema temperaturi je u tijesnoj vezi sa njihovom proteinskom strukturom. Svaki enzim ima svoju optimalnu temperaturu kada iskazuje maksimum svoje katalitičke moći. Optimalne temperature za najveći broj enzima kreću se između 38 i 40 °C. Iznad te temperature enzimi postepeno gube svojstva bioloških katalizatora. Ovo svojstvo potpuno gube na temperaturi između 60 i 80 °C, zbog denaturacije. Stupanj inaktivacije ne ovisi samo o visini temperature nego i o dužini toplinskog djelovanja. Temperature niže od optimalne također smanjuju brzinu enzimske katalize. Na temperaturi od 0°C brzina katalize je vrlo mala. Međutim, efekt niskih temperatura je reverzibilan i može se koristiti za konzerviranje enzima.

Zadatak vježbe: Ispitati utjecaj temperature na aktivnost amilaze.

Pribor: epruvete, drveni stalak, laboratorijske čaše od 100 i 250 cm³, kapaljke, drvena štipaljka, stakleni štapić, satno staklo, menzura od 5 cm³

Kemikalije:

otopina amilaze ($\gamma = 1,0 \text{ g/L}$)

otopina škroba ($\gamma = 10 \text{ g/L}$)

otopina joda (Lugolova otopina)

Postupak: U tri epruvete stavite po 2 cm³ razrijeđene otopine amilaze. Prvu epruvetu stavite u ledenu kupelj a drugu epruvetu ostavite na sobnoj temperaturi. Sadržaj treće epruvete zagrijte do vrenja i kuhajte još 2-3 minute a nakon toga ostavite da se ohladi na sobnu temperaturu. U sve tri epruvete dodajte po 2 cm³ otopine škroba. U prvu epruvetu stavite škrob ohlađen na ledu. Drugu i treću epruvetu ostavite na sobnoj temperaturi, a prvu epruvetu cijelo vrijeme držite na ledu. U svaku epruvetu stavite stakleni štapić. Iz svake epruvete štapićem na satno staklo stavite po 2-3 kapi smjese. Tome dodajte isto toliko otopine joda. Zapišite promjenu svakog od tri uzorka. Isti postupak ponavljajte svake tri minute sljedećih pola sata (ili dok ne dobijete četiri uzastopno ista rezultata) a rezultate prikažite tabelarno. Nakon toga prvu epruvetu izvadite iz leda da poprimi sobnu temperaturu i tada provjerite djelovanje Lugolove otopine na uzorak. Zapišite i objasnite promjene.

Tab. 13.: Utjecaj temperature na aktivnost enzima

	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min	30 min
I epru. 0°C											
II epr 23°C											
III epr 100°C											

20.. vježba

Utjecaj pH na aktivnost enzima

Aktivnost enzima ovisna je o pH otopine u kojoj se enzimski reakcija odvija. Svaki enzim posjeduje optimalni pH pri kojem je najaktivniji, odnosno postiže maksimalnu aktivnost, koja se sniženjem ili povišenjem pH značajno smanjuje. Zona djelovanja je dosta uska. I s jedne i s druge strane od pH optimuma aktivnost enzima se smanjuje. Utjecaj pH na aktivnost enzima dovodi se u vezu sa njihovom proteinskom prirodom. Naime, stupanj ionizacije enzima ovisi o pH sredine, kao i kod drugih proteina i amino kiselina. Pretpostavlja se da je maksimum katalitičkog svojstva enzima vezan za jedan od ionskih oblika koji enzim može imati pod određenim pH uvjetima.

Zadatak vježbe: Odrediti optimalni pH za aktivnost amilaze.

Pribor: epruvete, drveni stalak, mikropipete, kapaljke, laboratorijska čaša od 250 cm³, drvena štipaljka, termometar od 100°C

Kemikalije:

otopina Na₂HPO₄ (c = 0,2 mol/dm³)

otopina škroba (γ = 5 g/L)

otopina limunske kiseline ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$)

otopina amilaze ($\gamma = 1,0 \text{ g/L}$)

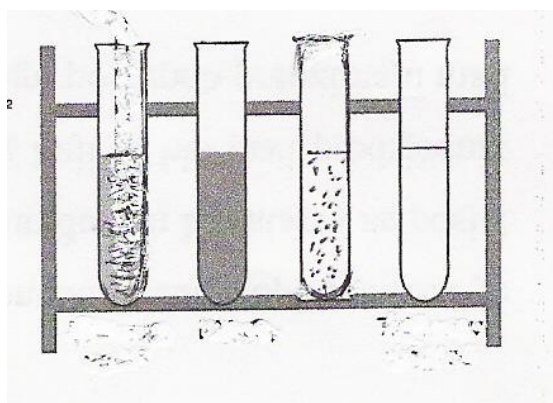
otopina NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/L}$)

otopina joda (Lugolova otopina)

Postupak: U četiri epruvete mikropipetom stavite otopine Na_2HPO_4 prema priloženoj tablici. Zatim u svaku dodajte označenu količinu otopine limunske kiseline. Pod tim uvjetima pH smjese kreće se od 5,6 do 8,0. U svaku epruvetu dodajte po 10 kapi otopine NaCl i isto toliko otopine škroba. Na kraju dodajte po 10 kapi otopine amilaze razrijeđene 50 puta. Sadržaj epruveta promiješajte i stavite ih u vodenu kupelj 5-10 minuta na temperaturi od 38°C . Epruvete nakon toga ohladite i u svaku dodajte po 2 kapi otopine joda i promiješajte. Promatrajte dobivena obojenja i odredite pH pri kojem amilaza djeluje najaktivnije.

Tab. 14.: Utjecaj pH na aktivnost enzima

Br. epruvete	V (Na_2HPO_4) u mL	V (lim. kis.) u mL	pH	Obojenje
1	0,58	0,42	5,6	
2	0,77	0,23	6,8	
3	0,87	0,13	7,2	
4	0,97	0,03	8,0	



Sl. 13.: Utjecaj pH na aktivnost enzima

6. NUKLEINSKE KISELINE

Nukleinske kiseline su visokomolekularni biokemijski spojevi koje možemo smatrati ključnim molekulama života. Nalazimo ih u svim organizmima kao genetski materijal. Otkrivene su još 1869. godine ali je njihovo biološko značenje bilo nepoznato sve do 1944. kada je dokazana njihova genetska funkcija. Model tih složenih molekula izrađen je 1953. godine (J. Watson, F. Crick i M. Wilkins) kada je objašnjen i način prijenosa informacija kod diobe stanica.

Prema kemijskoj strukturi nukleinske kiseline su linearne makromolekule sastavljene od velikog broja stepenasto povezanih nukleotida. U svakom nukleotidu nalaze se šećer i fosfat međusobno povezani esterskom vezom u dugačke lance i baza koja je bočno vezana na šećer N-glikozidnom vezom. Prema vrsti šećera nukleinske kiseline dijele se na deoksiribonukleinske (šećer 2-deoksi-D-riboza) i ribonukleinske (šećer D-riboza). Baze su adenin i gvanin (purinske baze) te citozin, timin i uracil (pirimidinske baze). Deoksiribonukleinska kiselina DNA sastoji se od dva lanca savijenih oko iste osi, povezanih preko komplementarnih baza, dok se ribonukleinska kiselina sastoji samo od jednog lanca i puno manjeg broja nukleotida. DNA molekule nalaze se u jezgri stanice a RNA u citoplazmi.

Za DNA molekule je osnovno da su u njima pohranjene (kodirane) sve informacije o nasljednim osobinama koje se prenose s generacije na generaciju tijekom diobe stanica a koje se temelje na redosljedu baza u samom lancu (genom).

RNA molekule imaju zadatak prenositi te informacije i sudjelovati kod sinteze proteina. Postoje tri vrste RNA molekula:

- a) informacijska – koja prepisuje informacije sa DNA molekula (prepisuju se komplementarne baze) i prenose do ribosoma
- b) transportna – koja prenosi aminokiseline potrebne za sintezu proteina
- c) ribosomska – koja sudjeluje kod samog procesa sinteze proteina

Za izolaciju nukleinskih kiselina iz biljnih stanica koriste se različite metode. Svima je ipak zajedničko da se najprije moraju razoriti čvrste celulozne stanične stijenke i stanične membrane kako bi sadržaj stanice izašao u otopinu. Nakon toga nukleinske kiseline se odvajaju od proteina s kojima su čvrsto vezane i na kraju se istalože s odgovarajućim sredstvom, najčešće etanolom. Ukoliko se želi razdvojiti molekule DNA od RNA to se postiže odgovarajućim enzimom (Rnaza ili Dnaza) ovisno koju kiselinu je potrebno izolirati.

21. vježba

Izolacija nukleinskih kiselina

Zadatak vježbe: Iz uzorka (rajčice, kivija ili banane) izolirati nukleinske kiseline.

Kemikalije:

NaCl (m = 3g)	otopina detergenta (V = 10 cm ³)
proteaze (V = 80 μL)	etanol na -20°C (V = 20 cm ³)

Pribor: laboratorijske čaše od 100 i 250 cm³, stakleni štapić, električna miješalica, stakleni lijevak, filter papir, kivete sa čepom, menzura od 25 cm³.

Postupak:

Stavite 3g NaCl i 10 cm³ otopine bioaktivnog detergenta u laboratorijsku čašu od 250 cm³ te nadopunite vodom do ukupnog volumena od 100 cm³. Snažno miješajte otopinu dok se sol ne otopi. Usitnite namirnicu na komadiće veličine 1 x 1 cm i stavite u čašu s otopinom. Detergent otapa lipide i razara stanični zid i nuklearne membrane a NaCl pomaže u tom procesu kao aktivator.

Čašu sa otopinom držite 15 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi 60°C. Visoka temperatura ubrzava oslobađanje DNA iz jezgre i deaktivira enzime koji bi mogli uzrokovati razgradnju DNA (enzimi DN-aze). Nakon toga smjesu naglo ohladite na sobnu temperaturu (čašu držite na ledu oko 10 minuta uz blago potresivanje). Miješanjem pomoću električne mješalice u trajanju od 5 sekundi razorite stanice odnosno njihove membrane. Dužim miješanjem uništile bi se i same molekule DNA.

Nastalu suspenziju filtrirajte preko filter papira i sakupite oko 20 cm³ ekstrakta. Na filter papiru ostat će odvojeni dijelovi staničnog zida a u filtratu su otopljene molekule DNA i proteina. Filtrat prenesite u kivetu, dodajte 80 μL otopine proteaze, zatvorite kivetu čepom i sadržaj promiješajte prevrćući kivetu. Proteaze razgrađuju proteine i sprečavaju njihovo taloženje.

Da bi se iz otopine istaložile molekule DNA, u ekstrakt dodajte 20 cm³ hladnog etanola, rashlađenog na temperaturu od -20°C. Niska temperatura osigurava da DNA ostane u obliku taloga, odnosno u otopini se izdvaja u obliku tankih niti. Omotavanjem tih niti oko štapića ili špatule izvucite DNA iz otopine i promatrajte pod mikroskopom.

8. PRIPREMA NEKIH VAŽNIJIH REAGENSA

1. Barfoed-ov reagens:

6,6 g bakrenog(II)-acetata otopite u 1 cm³ ledene octene kiseline i otopinu razrijedite destiliranom vodom na 100 cm³.

2. Benedict-ov reagens:

7,3 g natrijevog citrata i 10 g Na₂CO₃ otopite u malo destilirane vode i otopinu razrijedite na približno 80 cm³. 1,73 g CuSO₄ x 5H₂O otopite u približno 10 cm³ destilirane vode i tu otopinu dodajte uz miješanje u citrat-karbonatnu otopinu. Dobivenu smjesu razrijedite na 100 cm³.

3. Carezz I:

15 g K₄[Fe(CN₆)] otopite u destiliranoj vodi u odmjernej tikvici od 100 cm³ i dopunite vodom do oznake.

4. Carezz II:

50 g ZnSO₄ otopite u destiliranoj vodi u odmjernj tikvici od 100 cm³ i dopunite vodom do oznake.

5. Fehling I:

3,5 g CuSO₄ x 5H₂O otopite u 100 cm³ destilirane vode.

6. Fehling II:

17 g K-Na-tartarata (KNaC₄H₄O₆ x 4H₂O) i 6 g NaOH otopite u 100 cm³ destilirane vode.

7. Foulgerov reagens:

40 g uree otopite u razrijeđenoj sumpornoj kiselini ($w = 20\%$). U otopinu dodajte 2 g SnCl_2 i zagrijavajte dok se smjesa ne razbistr. Nadopunite do 100 cm^3 sumpornom kiselinom.

8. Lugolova otopina:

Otopite 4 g KI u 100 cm^3 destilirane vode pa dodajte 2 g joda i otopite.

9. Škrob (1 %-tna otopina):

U čaši od 250 cm^3 zakuhajte 100 cm^3 destilirane vode. Odvagnite 1 g škroba, razmutite u čistoj čašici sa malo hladne vode i uz miješanje izlijte u prokuhanu vodu. Pustite još 1-2 minute da kuha i zatim ohladite.

10. Tolensov reagens:

U dobro očišćenu epruvetu stavite 1 cm^3 10 %-tne otopine srebrovog nitrata i 1 cm^3 destilirane vode. Tome oprezno dodajte nekoliko kapi 10 %-tne vodene otopine NaOH. Nastat će smeđi talog srebrovog oksida kojeg dalje otopite dokapavanjem 10 %-tne vodene otopine NH_4OH i to taman toliko da se stvoreni talog potpuno otopi pri čemu nastaje kompleksni diaminosrebrov kation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Reagens uvijek treba biti svježije pripremljen.

11. Željezov(III) amonijev sulfat:

Izvažite 16,00 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$ ili 11,04 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, prenesite u odmjernu tikvicu od 100 cm^3 , otopite i nadopunite destiliranom vodom do oznake. 3 volumena ove otopine pomiješajte sa 2 volumena 10 %-tne H_2SO_4 .

Reagens se može pripremiti i na sljedeći način: U odmjernu tikvicu od 100 cm^3 stavite 10 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times n\text{H}_2\text{O}$ i dodajte 5 cm^3 koncentrirane sumporne kiseline te oprezno nadopunite destiliranom vodom do oznake.

9. LITERATURA

1. Borčić, S., Kronja, O.: Praktikum preparativne organske kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
2. Bregovec, I., Deljac, A., Sunko, D.: Organska kemija (kemija II), Školska knjiga, Zagreb, 1986.
3. Flögel, M. i Lauc, G.: Biokemijski praktikum, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
4. Flögel, M. i suradnici: Biokemija Temelj znanosti o životu, Odsjek za Biomedicinske znanosti Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1995.
5. Grupa autora: Praktikum iz biokemije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 1998.
6. Halaši, R. i Kesler, M.: Metodika nastave hemije i demonstracioni ogledi, Naučna knjiga, Beograd, 1976.
7. Jankov, R.: Praktikum iz organske hemije, Naučna knjiga, Beograd, 1990.
8. Karlson, P.: Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1988.
9. Kučak, A.: Vježbe iz biokemije, Profil, Zagreb, 2003.
10. Sikirica, M.: Organska kemija, udžbenik kemije za IV razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 1996.
11. Sikirica, M., Korpar-Čolig, B.: Vježbe iz kemije, Osnove laboratorijske tehnike, Zagreb, 1991.
12. Stryer, L.: Biokemija, Školska knjiga, Zagreb 1991.
13. Stričević, D., Sever, B., Čičak, H.: Organska kemija, udžbenik za zdravstvene i strukovne škole, Profil, Zagreb, 2008.
14. Šušterčić, N.: Ispitivanje materijala, Kemijsko-tehnološki obrazovni centar, Zagreb, 1979.
15. Vajić, B.: Živežne nemirnice, određivanje osnovnih sastojaka, Sveučilište u Zagrebu, 1968.