

AMINOKWASY

Ćwiczenie 1. Rozdział i identyfikacja aminokwasów metodą chromatografii cienkowarstwowej

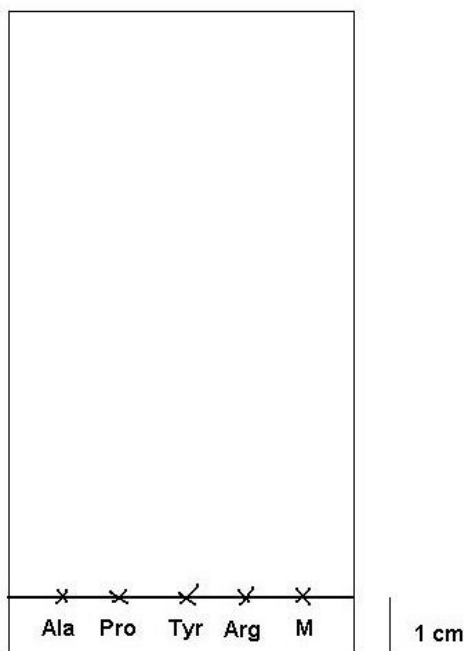
Odczynniki i materiały:

- Eluent o składzie: n-butanol: kwas octowy: woda destylowana, w proporcjach objętościowych 60:10:12
- 0,01M roztwory alaniny, proliny, tyrozyny, argininy w 0,1M HCl oraz mieszanina tychże aminokwasów
- odczynnik ninhydrynowy (1% ninhydryna w etanolu)
- płytki chromatograficzne powleczone żelom krzemionkowym
- komory do chromatografii cienkowarstwowej
- suszarka
- ołówek i linijka
- kapilary do nanoszenia aminokwasów na płytki chromatograficzne, wykonane z dwu końcówek do pipet automatycznych

Wykonanie:

Uwaga! Płytke chromatograficzną chwyta się jedynie za jej krawędzie, unikając dotykania żelu krzemionkowego palcami !!!

Na płytce powleczonej żelom krzemionkowym zaznaczyć punkty nanoszenia aminokwasów poprzez delikatne narysowanie ołówkiem (!) poziomej linii w odległości 1 cm od dolnego brzegu płytki i pięciu równoodalonych krzyżyków (patrz rysunek poniżej).



Następnie nanieść po 1-2 μl każdego z roztworów aminokwasów za pomocą kapilar, poprzez delikatne dotknięcie ujścia kapilary do powierzchni żelu krzemionkowego. Średnica widocznych, wilgotnych plamek nanoszonych roztworów nie powinna przekraczać 2 mm. Miejsca startu wysuszyć suszarką.

Do komory chromatograficznej wlać eluent w takiej ilości, która nie spowoduje zakrycia linii startu po umieszczeniu w komorze płytki chromatograficznej (ok. 20ml). Przygotowaną płytkę chromatograficzną umieścić ostrożnie w komorze, zanurzając równo dolną krawędź płytki w eluencie. Komorę szczelnie zamknąć i nie poruszać jej aż do zakończenia procesu chromatograficznego.

Po upływie ok. 40 min wydobyć płytkę chromatograficzną z komory i po położeniu jej na stole natychmiast delikatnie narysować ołówkiem (!) linię odzwierciedlającą miejsce, do którego zawędrowało czoło eluentu (granica pomiędzy wilgotną a suchą powierzchnią żelu krzemionkowego na płytce).

Płytkę wysuszyć suszarką, spryskać odczynnikiem ninhydrynowym a następnie umieścić w cieplarni w temp. 60°C na ok. 10 min. w celu szybkiego wywołania barwnej reakcji aminokwasów z ninhydryną. Po wywołaniu chromatogramu wybarwione pasma aminokwasów obrysować i zaznaczyć punktami środek geometryczny pasm. Liniijką zmierzyć (z dokładnością do milimetra):

- 1) odległości na jakie zawędrowały chromatografowane aminokwasy od linii startu
- 2) odległość na jaką zawędrowało czoło eluentu w trakcie chromatografii

Wyznaczyć współczynniki retencji R_f (ang. *retention factor*) dla wszystkich czterech aminokwasów według wzoru:

$$R_f = \frac{\text{odległość substancji badanej od startu}}{\text{odległość czoła rozpuszczalnika od startu}}$$

Ćwiczenie 2. Reakcja grupy aminowej z ninhydryną.

Odczynniki:

- 1% r-r glicyny
- 1% r-r proliny
- 0,1 % r-r ninhydryny w 50% etanolu

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glicyny
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r proliny

Do każdej probówki dodać 2-3 krople 0,1% r-ru ninhydryny. Następnie wymieszać i ogrzać. Zaobserwować pojawienie się zabarwienia w probówkach. Porównać wynik w obu probówkach.

Ćwiczenie 3. Reakcja grupy aminowej z kwasem azotowym (III) – reakcja Van Slyke’a

Odczynniki:

- 0,5% r-r glicyny
- 10% r-r NaNO_2
- 2M r-r CH_3COOH

Wykonanie:

Do probówki zawierającej 1 ml 10% r-ru azotynu sodu dodać 2 ml 2M r-ru kwasu octowego i 0,5 ml r-
ru glicyny. Wydzielają się pęcherzyki gazu.

r-

Ćwiczenie 4. Reakcja ksantoproteinowa z aminokwasami aromatycznymi

Odczynniki:

- 1% r-r tyrozyny
- 3% r-r białka jaja kurzego
- stęż. HNO_3
- 30% r-r NaOH

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru tyrozyny
- b. do drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 0,5 ml stęż. kwasu azotowego i ogrzewać przez 30 sekund. Wytrąca się żółty osad. Próbę oziębić i dodać 2 ml 30% r-r NaOH (**uwaga: reakcja silnie egzotermiczna**). Następuje zmiana barwy na pomarańczową.

Ćwiczenie 5. Wykrywanie pierścienia indolowego w tryptofanie – r. Adamkiewicza - Hopkinsa

Odczynniki:

- 1% r-r tryptofanu
- 3% r-r białka jaja kurzego
- kwas glioksalowy ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3$)
- stęż. H_2SO_4

Wykonanie

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru tryptofanu
- b. drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 4-5 kropli kwasu glioksalowego. Po wymieszaniu ostrożnie (po ściankach probówki) dodać 1 ml stęż. H_2SO_4 . Pojawia się fioletowy pierścień na pograniczu obu warstw.

Ćwiczenie 6. Reakcja cystynowa (cystyna i cysteina)

Odczynniki:

- 1% r-r metioniny
- 3% r-r białka
- 1% r-r octanu ołowiowego ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)
- 30% NaOH

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru metioniny
- b. do drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 0,5 ml octanu ołowiowego i 2 ml 30% NaOH. Wstawić do łaźni wrzącej. Zaobserwować pojawienie się ciemno zabarwionego osadu. Porównać wynik w obu probówkach.

Ćwiczenie 7. Wykrywanie argininy – reakcja Sakaguchi

Odczynniki:

- 1% r-r argininy (lub wodny roztwór białka jaja kurzego)
- 30% NaOH
- 1% r-r α -naftolu w etanolu
- 5% r-r chloranu (I) sodu [NaClO]

Wykonanie:

Do 1 ml 1% roztworu argininy (lub roztworu białka jaja kurzego) dodać 0,2 ml 30% NaOH, 2 krople 1% etanolowego roztworu α -naftolu. Całość wymieszać, a następnie dodać 4-5 kropli 5% chloranu (I) sodu. Zaobserwować pojawienie się zabarwienia w probówce.

Ćwiczenie 8. Rozpuszczalność aminokwasów w wodzie

Odczynniki:

- glicyna *in subst.*
- tyrozyna *in subst.*
- 30% NaOH
- stęż. HCl

Wykonanie:

1/ Rozpuszczalność glicyny w wodzie:

Do probówki wsypać szczyptę glicyny i dodać 2-3 ml wody. Zawartość probówki dobrze wymieszać.

2/ Rozpuszczalność tyrozyny w wodzie:

Do dwóch probówek wsypać szczyptę tyrozyny i dodać 2-3 ml wody. Wymieszać.

Do jednej z probówek dodać po kropli stęż. HCl, do drugiej - po kropli 30% NaOH.

B I A Ł K A **(część I)**

Ćwiczenie 1. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny

Odczynniki:

- 0,5% r-r kazeiny w 0,1 M octanie sodu
- 1 M r-r CH_3COOH

Wykonanie:

Przygotować 9 suchych probówek o poj. 15 ml. Do pierwszej odmierzyć 3,2 ml kwasu octowego i 6,8 ml wody dest., zawartość dobrze wymieszać. Do następnych 8 probówek odmierzyć 5 ml wody dest. Po dokładnym wymieszaniu zawartości w probówce 1 przenieść z niej 5 ml r-ru do drugiej probówki, a z tej po wymieszaniu, 5 ml przenieść do 3-ej itd., aż do 9-tej, z której po wymieszaniu 5 ml r-ru należy wylać, (aby po wykonaniu wszystkich rozcieńczeń objętość roztworów była jednakowa).

Wykonanie pomiaru

Do wszystkich probówek z przygotowanymi roztworami kwasu octowego dodać po 1 ml r-ru kazeiny, dobrze wymieszać i odstawić na 30 min.

Po upływie 30 min. odnotować:

- a. stopień zmętnienia r-ru w każdej probówce (-, +, ++, +++ - różne stopnie zmętnienia),
- b. wartość pH poszczególnych r-rów - pobrać r-r z probówki i nakropić na papierek wskaźnikowy,
- c. wartość pH_i kazeiny.

Ćwiczenie 2. Wykrywanie białek – reakcja biuretowa

Odczynniki:

- 10% r-r NaOH
- 1% r-r CuSO_4
- mocznik krystaliczny *in subst.* ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)
- 0,5% r-r glicyny
- 0,5% r-r glicylo-glicyny
- 3% r-r białka jaja kurzego

Wykonanie:

1/ Reakcja biuretowa Piotrowskiego (na wiązania peptydowe)

Do probówki odmierzyć 1 ml r-ru glicyny, dodać 1 ml 10% r-ru NaOH i 4-5 kropli 1% r-ru CuSO_4 (unikać nadmiaru r-ru CuSO_4). Reakcja jest dodatnia, gdy pojawi się czerwono-fioletowe zabarwienie.

2/ Reakcja biuretowa peptydu i białka

Do osobnych probówek odmierzyć po 1 ml roztworów: glicylo-glicyny i białka jaja kurzego, dodać po 1 ml 10% r-ru NaOH i 4-5 kropli 1% r-ru CuSO_4 . Zaobserwować wynik w obu probówkach.

3/ Odczyn biuretowy mocznika

Nad małym płomieniem gazowym stopić w suchej probówce kilka kryształków mocznika. Stopiony mocznik po pewnym czasie krzepnie. Po ostudzeniu probówki otrzymany biuret rozpuścić w 1 ml 10% r-ru NaOH i dodać 4-5 kropli 1% r-ru CuSO_4 .

Ćwiczenie 3. Denaturacja białek

Odczynniki:

- 1% r-r białka
- stęż. HNO_3
- stęż. HCl
- stęż. H_2SO_4
- 96% etanol
- 1% r-r (wodny) FeCl_3
- 1% r-r CuSO_4
- 10% r-r TCA
- 5% r-r CH_3COOH
- nasycony r-r kwasu pikrynowego ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$)
- 0,1 M r-r AgNO_3

Wykonanie:

1/ Denaturacja cieplna białek

2 ml r-ru białka ogrzać w probówce do wrzenia, tworzy się biały osad wytrąconego białka.

2/ Denaturacja białka stężonymi kwasami nieorganicznymi

a. Stężonym HNO_3 (próba Hellera)

Do probówki odmierzyć 2 ml stęż. HNO_3 i ostrożnie po ściance probówki dodawać kroplami r-r białka jaja kurzego. Białko powinno nawarstwiać się na roztwór kwasu. Na granicy zetknięcia się obu cieczy powstaje pierścień zdenaturowanego białka.

b. Stężonym HCl i H_2SO_4

Do 2 probówek dodać po 1 ml r-ru białka jaja kurzego. Następnie wlewać po ściance:

- do pierwszej 1 ml stęż. HCl
- do drugiej 1 ml stęż. H_2SO_4

Na podstawie przeprowadzonych prób porównać, w której probówce następuje wytrącanie osadu.

3/ Denaturacja białka etanolem

Do 2 probówek zawierających po 2 ml etanolu dodać po 0,5 ml roztworu białka. Zawartość pierwszej probówki rozcieńczyć wodą dest. do 10 ml i wytrząsnąć. Zaobserwować różnice w obu probówkach.

4/ Strącanie białka za pomocą anionów

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. 2 ml r-ru białka jaja kurzego i 2 ml 10% r-r TCA,
- b. 2 ml r-ru białka jaja kurzego i 0,5 ml 5% r-ru CH_3COOH oraz 2 ml nasyconego r-ru kwasu pikrynowego.

Wymieszać. Zaobserwować wynik. Dodatni wynik reakcji to: wytrącenie się osadu, zmętnienie lub powstanie białego pierścienia.

5/ Strącanie białka za pomocą kationów

Do 2 probówek zawierających po 1 ml roztworu białka i 4-5 kropli 1M NaOH :

- a. do 1 ml roztworu białka dodać 4-5 kropli 0,1 M r-ru AgNO_3
- b. do 1 ml r-ru białka dodać 4-5 kropli 1% FeCl_3

Wymieszać. Zaobserwować wynik. Dodatni wynik reakcji to: wytrącenie się osadu, zmętnienie lub powstanie białego pierścienia.

Ćwiczenie 4. Wykazanie amfoterycznego charakteru białek

Odczynniki:

- 1% r-r albuminy
- woda dest.
- r-r błękitu tymolowego (wskaźnik)
- 0,1 M r-r NaOH
- 0,1 M r-r HCl

Wykonanie:

Do dwóch probówek wlać po 5 ml wody dest. i 1 kroplę błękitu tymolowego. Następnie:

- a. do pierwszej probówki dodać kroplami 0,1 M r-ru NaOH, aż do uzyskania zabarwienia lekko niebieskiego (pH 9,6),
- b. do drugiej probówki dodać 0,1 M r-r HCl, aż do uzyskania zabarwienia lekko czerwonego (pH 1,3).
Unikać nadmiaru odczynników !

Do obu probówek wkraplać ostrożnie roztwór albuminy, aż płyn stanie się lekko żółty (pH 2,8-8,0).

B I A Ł K A (część II)

Ćwiczenie 1. Filtracja żelowa

Odczynniki:

- Sephadex G-50
- Roztwór badany (błękit dekstrynowy 2000, mioglobina, chromian potasu) w 0,9% NaCl.
- Roztwór eluujący (0,9% NaCl).

Wykonanie:

Nanoszenie próby na kolumnę: na powierzchnię żelu nanieść 1 ml próby badanej i pozwolić wsiąknąć próbce pod ciśnieniem grawitacyjnym w górną warstwę żelu.

Po naniesieniu próby badanej na kolumnę połączyć kolumnę ze zbiornikiem zawierającym eluent (0,9% NaCl) i prowadzić elucję z szybkością ok. 2 ml/min., zbierając do kolejnych probówek frakcje po 4 ml. Kontynuować zbieranie frakcji aż do pełnego wyeluowania ostatniego składnika r-ru badanego.

Regeneracja kolumny: po ukończeniu frakcjonowania kolumnę przygotować do następnych rozdziałów, przepuszczając przez nią eluent w ilości odpowiadającej 2-3 krotnej objętości całkowitej kolumny.

Ćwiczenie 2. Oznaczanie ilościowe białka metodą biuretową

Odczynniki:

- wzorcowy roztwór albuminy w 0,9% NaCl (10 mg/ml)
- odczynnik biuretowy

Wykonanie:

Do suchych probówek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości wzorcowego roztworu albuminy, wody i odczynnika biuretowego.

Nr próby	I	II	III	IV	V	VI – próba ślepa	VII – próba badana
Roztwór wzorowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0
Woda destylowana (ml)	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0,5	0
Odczynnik biuretowy (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Próba badana (ml)	0	0	0	0	0	0	0,5

Po upływie 30 min. zmierzyć absorbancję przy $\lambda=540$ nm względem próby ślepej (VI). Wykreślić krzywą wzorcową – zależność absorbancji od stężenia (próby I-V). Oznaczyć zawartość białka w próbce badanej (VII).

Ćwiczenie 3. Wysalanie białek siarczanem amonu**Odczynniki:**

- 1% r-r żelatyny
- 1% r-r albuminy
- 1% r-r globuliny
- 1% r-r jaja kurzego
- nasyc. r-r siarczanu amonu
- woda dest.

Wykonanie:

Do 12 probówek oznaczonych numerami od I-XII odmierzyć odpowiednie odczynniki zgodnie z tabelą:

Numer próbówki	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Odczynnik (w ml)												
Żelatyna	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Albumina	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Globulina	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-
Białko jaja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Woda	4	1,5	-	4	1,5	-	4	1,5	-	4	1,5	-
Nasycony siarczan amonu	-	2,5	4	-	2,5	4	-	2,5	4	-	2,5	4

Następnie odnotować obecność lub brak zmętnienia r-ru w każdej probówce. Zmętnienie świadczy o wysalaniu się białka.

„+” - występuje osad wysolonego białka,

„-” - brak osadu.

CUKRY

CUKRY PROSTE

Ćwiczenie 1. Fermentacja alkoholowa

Odczynniki:

- 1% r-ry cukrów: glukozy, fruktozy, laktozy, sacharozy
- drożdże piekarskie

Wykonanie:

Kawałek drożdży rozetrzeć w zlewce z 30 ml r-ru cukru. Zawiesiną napełnić naczynko fermentacyjne w taki sposób, aby ramię zamknięte nie zawierało pęcherzyków powietrza. Następnie naczynko fermentacyjne umieścić w cieplarni na okres 2 godz. w temp. 37°C. Równocześnie nastawić próbę kontrolną, zawierającą kawałek drożdży rozartych z wodą dest. Obserwować wydzielanie się pęcherzyków CO₂.

Ćwiczenie 2. Otrzymywanie osazonów

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- 1% r-r fruktozy
- 2,5% r-r laktozy
- 5% r-r maltozy
- r-r fenylohydrazyny

Wykonanie:

Do 4 probówek odmierzyć po 1 ml świeżo sporządzonego r-ru fenylohydrazyny, a następnie dodać kolejno roztwory poszczególnych cukrów (po 2,5 ml). Zawartość probówek dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni na około 60 min. Po wyjęciu z łaźni ostudzić. Osad kryształków osazonów przenieść na szkiełko podstawowe, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzyć pod mikroskopem.

Ćwiczenie 3. Reakcja z odbarwioną fuksyną (próba Schiffa)

Odczynniki:

- 0,01% r-r fuksyny
- formalina
- 1% r-r glukozy
- r-r kwaśnego siarczynu sodu (NaHSO₃)

Wykonanie:

Do 2 ml r-ru fuksyny dodawać NaHSO₃ aż do odbarwienia. Odbarwiony roztwór podzielić na 2 części: do jednej z nich dodać 4-5 kropli formaliny, a do drugiej – 4-5 kropli r-ru glukozy.

Ćwiczenie 4. Próby redukcyjne cukrów

a. Próba Fehlinga

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru glukozy dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II i zagotować. Wytrąca się czerwony osad.

b. Próba Benedicta

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Benedicta

Wykonanie:

Do 1,5 ml odczynnika Benedicta dodać 3 krople r-ru glukozy, probówkę wstawić na 5 min. do łaźni wrzącej. W zależności od stężenia cukru roztwór może przyjmować zabarwienie zielone lub wytrąca się osad w kolorze od żółtego aż do czerwono-brązowego.

c. Próba z odczynnikiem Nylandera

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Nylandera

Wykonanie:

Do 2 ml r-ru glukozy dodać kilka kropli odczynnika Nylandera, wstawić do wrzącej łaźni na 10 min. Roztwór żółknie, brunatnieje i w końcu staje się czarny od wydzielającego się metalicznego bizmutu.

d. Próba z kwasem pikrynowym

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- nasycony r-r kwasu pikrynowego
- 10% r-r NaOH

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru glukozy dodać 2 ml r-ru kwasu pikrynowego i 0,5 ml 10% NaOH. Podgrzewać przez 5 min. Roztwór przyjmuje zabarwienie ciemno czerwone.

e. Próba Tollensa

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- amoniakalny r-r wodorotlenku srebra - $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$

Wykonanie:

Do 2 ml amoniakalnego r-ru wodorotlenku srebra dodać 2 ml r-ru glukozy. Po zmieszaniu wstawić do wrzącej łaźni wodnej. Po kilku min. na ściankach probówki wydziela się metaliczne srebro.

Ćwiczenie 5. Reakcje barwne cukrów odwodnionych pod działaniem kwasów z pochodnymi fenolowymi.

a. Próba Molischa z α -naftolem

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Molischa
- stęż. H_2SO_4

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru glukozy dodać 1-2 krople odczynnika Molischa, wymieszać. Ostrożnie po ściance probówki wprowadzić 1 ml stęż. H_2SO_4 tak, aby była widoczna granica między cieczami. W miejscu zetknięcia się obu cieczy powstaje czerwono-fioletowy pierścień. Powstały poniżej zielony pierścień pochodzi od zanieczyszczeń α -naftolu.

b. Próba Seliwanowa z rezorcyną (odróżnianie ketoz od aldoz)

Odczynniki:

- 1% r-r fruktozy
- 1% r-r glukozy
- r-r HCl (rozcieńczonego wodą dest. w stosunku 1:1)
- rezorcyna in subst.

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r fruktozy

Do każdej probówki dodać 2 ml r-ru HCl oraz kryształek rezorcyny. Po zmieszaniu wstawić do wrzącej łaźni na 30 sek. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

c. Próba Tollensa z floroglucyną (odróżnianie pentoz od heksoz)

Odczynniki:

- 1% r-r rybozy
- 1% r-r glukozy
- stęż. HCl
- floroglucyna in subst.

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r rybozy

Do każdej dodać 2 ml stęż. HCl i kryształek floroglucyny. Ogrzać do wrzenia. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

d. Próba Biala z orcyngą (odróżnianie pentoz od heksoz)

Odczynniki:

- 1% r-r rybozy
- 1% r-r glukozy
- stęż. HCl
- orcyna *in subst.*
- 1% r-r FeCl₃

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r rybozy

Do każdej dodać 1 ml stęż. HCl, szczyptę orcyny i kroplę FeCl₃. Ogrzać do wrzenia. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

DWUCUKRY

Ćwiczenie 1. Próba Fehlinga

Odczynniki:

- 1% r-r laktozy
- 1% r-r sacharozy
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

- a. Do 1 ml r-ru laktozy dodać po 1 ml r-rów odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Wytrąca się ceglasty osad Cu₂O.
- b. Do probówki wprowadzić 1 ml r-ru sacharozy, a następnie po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Płyn nie zmienia barwy.

Ćwiczenie 2. Próba z kwasem pikrynowym

Odczynniki:

- 1% r-r laktozy
- nasycony r-r kwasu pikrynowego
- 10% r-r NaOH

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru laktozy dodać 2 ml r-ru kwasu pikrynowego i 0,5 ml 10% NaOH. Podgrzewać przez 5 min. Roztwór przyjmuje zabarwienie ciemno czerwone.

Ćwiczenie 3. Wykazanie własności redukujących sacharozy po hydrolizie kwaśnej

Odczynniki:

- 1% r-r sacharozy
- 2M r-r HCl
- 2M r-r NaOH
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

Do 2 ml sacharozy dodać 0,5 ml 2M HCl, a następnie ogrzać do wrzenia i gotować przez kilka minut. Próbę ostudzić i w celu neutralizacji dodać 0,5 ml 2M NaOH. Z próby pobrać 1 ml zawartości do innej probówki i dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Wytrąca się osad Cu_2O .

Ćwiczenie 4. Próba Barfoeda - odróżnianie jednocukrów od dwucukrów redukujących

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- 5% r-r laktozy
- odczynnik Barfoeda

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 5% r-r laktozy

Do każdej probówki dodać 1 ml odczynnika Barfoeda. Po wymieszaniu wstawić na 3 min. do wrzącej łaźni. Po oziębieniu i odczytaniu wyniku wstawić probówkę z ujemną próbą na dalsze 15 min. do wrzącej łaźni.

Glukoza łatwo wykazuje własności redukujące, natomiast laktoza po dłuższym ogrzewaniu - gdy zostanie rozerwane wiązanie glikozydowe.

Ćwiczenie 5. Hydroliza celulozy

Odczynniki:

- wata
- stęż. H_2SO_4
- 10% NaOH
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

W probówce wymieszać 5 ml wody dest. i 1 ml stęż. H_2SO_4 , a następnie umieścić w niej niewielki kawałek waty i całość wymieszać przy użyciu pipety pasteurowskiej. Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 30 min. Pobrać 1 ml z tego roztworu, zubożyć 1,5 ml 10% r-ru NaOH, a następnie dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Zagotować.

Ćwiczenie 6. Próba z jodem

Odczynniki:

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- odczynnik Lugola (J_2 w KJ)

Wykonanie:

Do 1 ml kleiku skrobiowego dodać 1 kroplę odczynnika Lugola. Roztwór przybiera ciemno niebieskie zabarwienie. Ogrzewać do odbarwienia się r-ru, a następnie oziębic. Po oziębieniu - zabarwienie powraca.

Ćwiczenie 7. Wysalanie skrobi

Odczynniki:

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- nasycony r-r siarczanu amonu

Wykonanie:

Do 2ml r-ru kleiku dodać 2 ml siarczanu amonu. Po wymieszaniu pozostawić na 30 min. Po 10 min. pojawia się zmętnienie, a w dalszym etapie z roztworu wytrąca się osad skrobi.

Ćwiczenie 8. Własności redukcyjne skrobi przed i po hydrolizie

Odczynniki:

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- odczynnik Fehlinga I i II
- stęż. HCl
- 2M r-r NaOH

Wykonanie:

Do dwóch probówek odmierzyć po 1 ml kleiku skrobiowego.

- a. do pierwszej probówki dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia.
- b. do drugiej probówki dodać 0,5 ml stęż. HCl gotować przez 1 min. Po ochłodzeniu próbę zalkalizować 1 ml 2M NaOH i dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Zagotować.

Porównać próby.

- I probówka - brak zmiany barwy.
- II probówka - wytrąca się ceglasty osad Cu_2O .

Ćwiczenie 9. Enzymatyczna hydroliza skrobi

Odczynniki:

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- ślina jako źródło amylazy
- odczynnik Fehlinga I i II
- odczynnik Lugola

Wykonanie:

Do 3 ml kleiku skrobiowego dodać 1 ml śliny. Wymieszać. Probówkę odstawić na 5 min. Po upływie tego czasu zawartość probówki rozdzielić na dwie części.

- a. w pierwszej probówce wykonać reakcję z odczynnikami Fehlinga I i II,
- b. w drugiej - reakcję z odczynnikami Lugola.

I probówka - reakcja słabo dodatnia - wytrąca się osad Cu_2O

II probówka - zabarwienie brązowo-czerwone od obecności dekstryn.

Ćwiczenie 10. Rozpuszczalność celulozy

Odczynniki:

- bibuła filtracyjna
- odczynnik Cross-Bewana

Wykonanie:

Niewielki kawałek bibuły filtracyjnej zalać 1-2 ml odczynnika Cross-Bewana. Ponownie wytrącić przez dodanie równej objętości wody dest.

Ćwiczenie 11. Odróżnianie bibuły od papieru gazetowego

Odczynniki:

- bibuła
- papier gazetowy
- 2% etanolowy r-r floroglucyny
- stęż. HCl

Wykonanie:

Kawałek papieru gazetowego (zawierającego polimery pentoz) i kawałek bibuły zwilżyć kroplą 2% etanolowego r-r floroglucyny i kroplą stęż. HCl. Papier zabarwia się na wiśniowo, reakcja z bibułą daje wynik ujemny.

E N Z Y M Y (Część I)

Ćwiczenie 1. Wykreślanie krzywej wzorcowej

Odczynniki:

- 5 mM r-r wzorcowy glukoza-fruktoza (5 μ mol cukru/ml)
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- r-r DNS (kwas 3,5-dinitrosalicylowy)

Wykonanie:

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

Do 7 suchych probówek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości:

Nr próby	I	II	III	IV	V	VI	VII – próba ślepa
Roztwór wzorcowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0
Bufor octanowy (ml)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	1,0
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Stężenie r-ru wzorcowego (μ mol cukru/ml)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	0

1. Próby dokładnie wymieszać i ogrzewać wszystkie równocześnie przez 10 min. we wrzącej łaźni wodnej.
2. Ochłodzić pod bieżącą wodą do temperatury pokojowej i dokonać odczytu wartości absorbancji przy długości fali 540 nm, wobec próby ślepej.
3. Wykreślić na papierze milimetrowym krzywą zależności absorbancji od stężenia cukrów (glukoza-fruktoza).

Ćwiczenie 2. Badanie wpływu różnych stężeń inwertazy na szybkość hydrolizy sacharozy

Odczynniki:

- podstawowy roztwór enzymu,
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- r-r DNS
- 0,2 M r-r sacharozy w buforze octan. o pH 4,7

Wykonanie:

Wyznaczanie optymalnego stężenia enzymu (takie stężenie enzymu, przy którym wydajność reakcji będzie największa).

1. Podstawowy roztwór enzymu rozcieńczyć buforem odpowiednio w oddzielnych probówkach (rozcieńczenie zależne od aktywności roztworu podstawowego enzymu), tak aby końcowa objętość wynosiła 3 ml.
2. Przygotować po 6 probówek dla każdego rozcieńczenia, w celu oznaczenia szybkości reakcji katalizowanej przez różne stężenia enzymu.
3. Do 5-ciu probówek napipetować po 2 ml odczynnika DNS.
4. W probówce nr 6 przygotować mieszaninę inkubacyjną, w której będzie przebiegać reakcja enzymatyczna, poprzez połączenie 3 ml odpowiednio rozcieńczonego enzymu z 3 ml 0,2 M sacharozy (dla każdego rozcieńczenia zgodnie z tabelką). **Po połączeniu dokładnie wymieszać aby reakcja enzymatyczna zachodziła w całej objętości r-ru!**

Skład mieszaniny inkubacyjnej	3 ml odpowiednio rozcieńczonego enzymu + 3 ml 0,2 M sacharozy
--------------------------------------	---

5. Reakcję enzymatyczną (inkubację sacharozy z różnymi stężeniami enzymu) przeprowadzić w temperaturze pokojowej.
6. Po 5-tej minucie od rozpoczęcia reakcji enzymatycznej pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej (probówka nr 6) do probówki zawierającej 2 ml DNS, wymieszać.
7. Następnie po upływie odpowiednio: 10, 15 i 20 min. pobierać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do uprzednio przygotowanych probówek z odczynnikiem, wymieszać.
8. Po wykonaniu oznaczeń w probówkach I – IV, wykonać **próbę ślepą (probówka nr 5) oddzielnie**: do probówki z 2 ml DNS dodać 0,5 ml 0,2 M sacharozy i 0,5 ml buforu octanowego.

Nr probówki	1	2	3	4	5
Czas inkubacji (min.)	5	10	15	20	ślepa
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mieszanina inkubacyjna (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	-
0,2 M sacharoza (ml)	-	-	-	-	0,5
Bufor octanowy (ml)	-	-	-	-	0,5

9. Probówki (I-V) dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 min.
10. Ochłodzić próby pod bieżącą wodą i dokonać odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda=540$ nm wobec próby ślepej.
11. Z krzywej wzorcowej odczytać ilość mg cukrów powstających w poszczególnych czasach hydrolizy.

(Część II)

Ćwiczenie 1. Wyznaczanie stałej Michaelisa

Odczynniki:

- r-r enzymu o optymalnym stężeniu,
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- r-r DNS
- 0,2 M r-r sacharozy w buforze octan. o pH 4,7

Wykonanie:

1. Wykonać cztery rozcieńczenia sacharozy buforem octanowym o stężeniach: 0,2; 0,1; 0,05 i 0,025 M
2. Dla każdej serii oznaczeń przygotować po 4 probówki.
3. Do 3 probówek napipetować po 2 ml odczynnika DNS.
4. W probówce nr 4 przygotować **mieszaninę inkubacyjną** – 2 ml odpowiednio rozcieńczonej sacharozy z 2 ml enzymu o optymalnym stężeniu (wyznaczonym w ćwiczeniu nr 2). Dokładnie wymieszać.
Po dodaniu 1-szego ml enzymu rozpoczyna się reakcja enzymatyczna.

Skład mieszaniny inkubacyjnej	2 ml enzymu + 2 ml 0,2 M sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml 0,1 M sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml 0,05 M sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml 0,025 M sacharozy
Ostateczne stężenie substratu w mieszaninie	0,1 M	0,05 M	0,025 M	0,0125 M

5. Reakcję enzymatyczną (inkubację różnych stężeń sacharozy z odpowiednio rozcieńczonym enzymem przeprowadzić) w temperaturze pokojowej.
6. Po 5-tej minucie od rozpoczęcia reakcji enzymatycznej pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do probówki zawierającej 2 ml DNS, wymieszać.
7. Następnie po upływie 10 min. ponownie pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do probówki zawierającej 2 ml DNS, wymieszać.
8. Po wykonaniu oznaczeń w probówkach I – II wykonać **próbę ślepą (probówka nr III) oddzielnie**: do probówki z 2 ml DNS dodać 0,5 ml odpowiednio rozcieńczonej sacharozy i 0,5 ml buforu octanowego.

Nr probówki	I	II	III
Czas inkubacji (min.)	5	10	ślepa
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0
Mieszanina inkubacyjna (ml)	1,0	1,0	-
Rozcieńczona sacharoza (ml)	-	-	0,5
Bufor octanowy (ml)			0,5

9. Wszystkie próbówki (I-III) dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 min.
10. Ochłodzić próby pod bieżącą wodą i dokonać odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda=540$ nm wobec próby ślepej.
11. Z krzywej wzorcowej (wykonanej na wcześniejszych ćwiczeniach) odczytać ilość μ mol cukru powstających w poszczególnych czasach hydrolizy.

Obliczenia:

1. Dla każdego stężenia sacharozy wykreślić zależności ilości powstałych heksoz (w μ molach/ml od czasu inkubacji).
2. Wyznaczyć szybkości początkowe reakcji (V_0). Miarą szybkości początkowej jest tangens kąta utworzonego między styczną do początkowych części krzywej, a osią odciętych (optymalny czas dla wyznaczania szybkości początk. - 5 min.). Szybkość początk. wyrazić w μ M/min.
3. Wyznaczyć zależności szybkości początkowych od stężenia substratu:
 - oznaczyć V_{max}
 - odczytać wartość stałej Michaelisa.
4. Sporządzić wykres Lineweavera-Burka. Na osi rzędnych odłożyć wartości $1/V_0$, a na osi odciętych wartość $1/s$. Powstała prosta przecina oś X w punkcie $-1/K_m$.

K W A S Y N U K L E I N O W E

(Część I)

Ćwiczenie 1. Izolowanie RNA z drożdży

Odczynniki:

- drożdże
- 20% r-r kwasu TCA (CCl_3COOH)
- aceton
- eter
- 96% etanol
- 1,4M r-r NaCl

Wykonanie:

1. Odważyć 2g drożdży piekarskich do próbówki wirowniczej o poj. około 12 ml, dodać 3 ml wody dest. i wymieszać bagietką w celu otrzymania zawiesiny. Probówkę wstawić do łaźni lodowej.
2. Po upływie kilku minut dodać 6 ml 20% TCA oziębionego do około $0^\circ C$. Zawartość próbówki starannie wymieszać bagietką i po upływie 10 min. wirować przy 3000 ob/min. przez 5 min. Płyn nad osadu (supernatant) zawierający kwasorozpuszczalne związki odrzucić (zlać), a probówkę z osadem ponownie umieścić w łaźni lodowej.
3. Celem odmycia CCl_3COOH oraz związków lipidowych do osadu dodać 8 ml acetonu (uprzednio oziębionego), wymieszać bagietką i po upływie 5 min. odwirować przy 2000 ob/min. przez ok. 5 min. Supernatant odrzucić, a osad ponownie przemyć 8 ml mieszaniny acetonu i eteru (1:1) i odstawić na 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie odwirować przez 10 min. przy 3000 ob/min.

4. Supernatant odrzucić a osad osuszyć w strumieniu ciepłego powietrza. Do wysuszonego osadu dodać 3 ml 1,4M NaCl i wymieszać starannie bagietką. Probówkę zamknąć korkiem z chłodniczką powietrzną i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na ok. 40 min.
5. Po zakończonej ekstrakcji probówkę ochłodzić, a następnie odwirować przy 3000 ob/min przez 5 min.
6. Supernatant, zawierający kwasy nukleinowe, przelać do plastikowej probówki z korkiem i wstawić do zlewki z lodem na 5 min. Następnie dodać 7 ml oziębionego etanolu w celu wytrącenia RNA. Zawartość probówki dokładnie wymieszać i pozostawić na 15 min. w temp. ok. 0°C. Po tym czasie odwirować przy 3000 ob/min. przez 10 min.
7. Supernatant odrzucić, a osad rozpuścić w 10 ml wody dest. i przechować w lodówce do następnego ćwiczenia.

(Część II)

Ćwiczenie 1. Kwaśna hydroliza RNA

Odczynniki:

- r-r RNA
- 72% HClO₄
- stęż. HCl
- stęż. HNO₃
- amoniak
- 5% r-r molibdenianu amonu
- amoniakalny r-r AgOH
- 1% r-r CuSO₄
- r-r kwaśnego siarczynu sodu
- 1% r-r FeCl₃
- floroglucyna *in subst.*

Wykonanie:

2 ml r-ru RNA ogrzewać z 2 ml HClO₄ we wrzącej łaźni wodnej przez 45 min. Uzyskany hydrolizat służy do dalszych prób.

a/ wykrywanie pentozy (Biala)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać 1 ml stęż. HCl, szczyptę orcyny i kroplę FeCl₃. Ogrzać do wrzenia.

b/ wykrywanie kwasu fosforowego

0,5 ml hydrolizatu RNA zobojętnić 10-15 kroplami r-ru amoniaku, następnie dodać 0,5 ml stęż. HNO₃ i 2 ml 5% r-ru molibdenianu amonu. Zawartość probówki ogrzać do wrzenia. Wytrąca się żółty osad fosforomolibdenianu.

c1/ wykrywanie zasad azotowych (puryn)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać 4-5 kropeł r-ru amoniaku (do słabo alkalicznego odczynu). Następnie dodać 3 ml amoniakalnego r-ru AgOH. Wytrąca się osad nierozpuszczalnych w amoniaku soli srebrowych puryn.

c2/ wykrywanie zasad azotowych (puryn)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać 4-5 kropli 1M NaOH (do słabo kwasowego odczynu). R-r zagotować a następnie dodać 4-6 kropli 1% r-ru CuSO₄ i kroplami r-r kwaśnego siarczynu sodu. Wytrąca się osad nierozpuszczalnych soli miedziawych puryn.

Ćwiczenie 2. Oznaczanie RNA z drożdży na podstawie zawartości rybozy.

Odczynniki:

- wzorcowy r-r RNA (300 µg/ml)
- 6% alkoholowy r-r orcyny
- 10% r-r FeCl₃ w stęż. HCl

Wykonanie:

Próby przygotować wg tabeli:

Nr probówki	I	II	III (próba ślepa)
FeCl ₃ (ml)	1	1	1
R-r orcyny (ml)	0,4	0,4	0,4
Woda (ml)	0	0	1
R-r wzorcowy (ml)	1	0	0
R-r badany (ml)	0	1	0

Po dodaniu wszystkich reagentów i wymieszaniu, probówki wstawić do łaźni wrzącej na 20 min., następnie schłodzić i do każdej z nich dodać po 5 ml wody dest. Absorbancję prób mierzyć przy dł. fali $\lambda=610$ nm, wobec próby ślepej (nr 3):

a. Wyliczyć zawartość RNA w próbce badanej (nr 2) ze wzoru:

$$\frac{A_{wz}}{C_{wz}} = \frac{A_x}{C_x}$$

$$C_x = \frac{A_x}{A} \times C_{wz}$$

A_{wz} - absorbancja r-ru wzorcowego
 C_{wz} - stężenie r-ru wzorcowego w µg/ml
 A_x - absorbancja r-ru badanego
 C_x - stężenie r-ru badanego w µg/ml

b. Wyliczyć ilość RNA (X) znajdująca się w objętości r-ru (V) na podstawie oznaczenia rybozy (pamiętać o pomnożeniu wyniku przez rozcieńczenie!).

Ćwiczenie 3. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych.

Odczynniki:

- r-r RNA
- 1M r-r HCl
- 1M r-r NaOH
- 96% etanol (silnie schłodzony)!

Wykonanie:

- a. do 1 ml r-ru RNA dodać kroplami 1M HCl aż do wytrącenia się osadu kwasu nukleinowego. Po dodaniu r-ru NaOH osad ulega rozpuszczeniu.
- b. do 1 ml r-ru RNA dodać 2 ml etanolu. Wytrąca się osad.

Ćwiczenie 4. Tworzenie kompleksów z barwnikami

Odczynniki:

- r-r RNA
- 0,1M r-r CH₃COOH
- 0,1% r-r błękitu metyl.

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru RNA dodać 0,5 ml 0,1M CH₃COOH, aż do wystąpienia lekkiego zmętnienia. Następnie dodać kroplę błękitu metylowego. Wytrząsać energicznie przez kilka minut. Na ściankach probówki wytrąca się niebieski osad.

Ćwiczenie 5. Odróżnianie DNA od RNA

Odczynniki:

- 0,1% r-ry RNA i DNA
- 10% r-r FeCl₃ w stęż. HCl
- 6% r-r orcyny w etanolu
- r-r dwufenyloaminy w kwasie octowym

Wykonanie:

a/ wykrywanie RNA

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 0,1% r-ru RNA
- b. do drugiej 1 ml 0,1% r-ru DNA

Do obu probówek dodać po 1 ml r-ru FeCl₃ i 0,4 ml r-ru 6% orcyny. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 20 min.

W probówce zawierającej RNA powstaje zielone zabarwienie. DNA daje ok. 10-krotnie słabszy odczyn.

b/ wykrywanie DNA

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 0,1% r-ru RNA
- b. do drugiej 1 ml 0,1% r-ru DNA

Następnie do obu probówek dodać 2 ml r-ru dwufenyloaminy. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 10 min.

W probówce zawierającej DNA powstaje niebieskie zabarwienie. Barwny kompleks z dwufenyloaminą daje dezoksyryboza.

Ćwiczenie 6. Spektrometria kwasów nukleinowych - widma absorpcyjne. Oznaczanie czystości preparatów RNA

Odczynniki:

- preparaty otrzymane podczas izolacji
- zasady: adenina, guanina, cytozyna, uracyl, 0,1% r-ry DNA i RNA

T Ł U S Z C Z O W C E

Ćwiczenie 1. Zmydlanie tłuszczów – otrzymywanie mydła

Odczynniki:

- olej
- 30% NaOH
- 96% etanol

Wykonanie:

Do parowniczkii porcelanowej dodać 1,5 ml oleju, 2,5 ml 30% NaOH i 1,5 ml etanolu. Podgrzewając łagodnie mieszać przez kilka minut, aż wytworzy się mydło. Następnie dodać ok. 50 ml wody i mieszać tak długo (cały czas podgrzewając), aż otrzymane mydło rozpuści się zupełnie. Uzyskane mydło ostudzić i zachować do dalszych doświadczeń.

Ćwiczenie 2. Wysalanie mydła

Odczynniki:

- r-r mydła
- NaCl *in subst.*

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru mydła dodać kilka kryształków NaCl, aż do nasycenia roztworu. Wytrąca się osad mydła solonego. Do osadu dodać wody dest., aż do rozpuszczenia się osadu.

Ćwiczenie 3. Otrzymywanie mydła nierozpuszczalnego

Odczynniki:

- r-r mydła
- 1% r-r BaCl₂
- 1% r-r CaCl₂
- 1% r-r Pb(CH₃COO)₂

Wykonanie:

Do trzech probówek zawierających po 1 ml r-ru mydła dodać odpowiednio: 1 ml BaCl₂, CaCl₂ i Pb(CH₃COO)₂. Wytrącają się osady. Do osadów dodać wody dest. Zaobserwować, czy osady rozpuszczają się.

Ćwiczenie 4. Wydzielanie wolnych kwasów tłuszczowych

Odczynniki:

- r-r mydła
- stęż. H_2SO_4
- papierki wskaźnikowe

Wykonanie: Do 5 ml r-ru mydła dodać 0,5 ml stęż. H_2SO_4 , wymieszać. Roztwór mętnieje z powodu wydzielania się wolnych kwasów tłuszczowych nierozpuszczalnych w wodzie. Mieszaninę ogrzać do wrzenia. Kwasy tłuszczowe zbierają się na powierzchni płynu, a po oziębieniu zastygają tworząc na niej ciekłą warstwę.

Ćwiczenie 5. Wykrywanie glicerolu – próba akroleinowa

Odczynniki:

- olej
- glicerol
- kwaśny siarczan potasu *in subst.*- KHSO_4
- skrawek bibuły
- amoniakalny r-r AgOH

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki:

- a. do pierwszej dodać 5 kropli oleju
- b. do drugiej - 5 kropli glicerolu (kontrola)

Do obu probówek dodać szczyptę kryst. KHSO_4 . U wylotu probówek umieścić zwilżony amoniakalnym r-rem AgOH skrawek bibuły. Obie probówki kolejno ogrzewać nad palnikiem.

Ćwiczenie 6. Rozpuszczalność tłuszczowców

Odczynniki:

- woda dest.
- 96% etanol
- chloroform
- aceton
- olej

Wykonanie:

Do poszczególnych probówek zawierających po kilka kropli oleju dodać odpowiednio po 1 ml odpowiednich rozpuszczalników i wymieszać.

Ćwiczenie 7. Próba Kreisa na jełczenie aldehydowe

Odczynniki:

- olej świeży
- olej zjełczały
- stęż. HCl
- 0,1% r-r rezorcyny w toluenie

Wykonanie:

Przygotować 2 plastikowe probówki z korkiem, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 2 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 2 ml oleju zjełczałego.

Do obu probówek dodać po 2 ml stęż. HCl i wytrząsać w ciągu minuty. Następnie dodać 2 ml r-ru rezorcyny w toluenie, wstrząsnąć i pozostawić do rozdzielenia się warstw. Różowe zabarwienie warstwy kwasowej wskazuje na obecność aldehydów.

Ćwiczenie 8. Wykrywanie glicerolu – reakcja z wodorotlenkiem miedziowym

Odczynniki:

- glicerol
- woda dest.
- 10% NaOH
- 7% r-r CuSO₄

Wykonanie:

Przygotować dwie probówki. Do każdej z nich odmierzyć po 1 ml 7% roztworu CuSO₄ i 1 ml 10% r-ru NaOH. Wytrąci się osad Cu(OH)₂. Następnie do pierwszej probówki dodać 1 ml glicerolu a do drugiej 1 ml wody destylowanej. Zaobserwować intensywne niebieskie zabarwienie w probówce z glicerolem.

Ćwiczenie 9. Utlenianie wiązania podwójnego

Odczynniki:

- olej
- woda dest.
- 1M Na₂CO₃
- 0,01M KMnO₄

Wykonanie:

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej probówki odmierzyć 0,5 ml oleju, do drugiej 0,5 ml wody destylowanej, a następnie do każdej dodać 3 ml 1M Na₂CO₃ w celu zalkalizowania środowiska. Probówki ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez ok. 1 min. Do każdej dodać 1 kroplę 0,01 M KMnO₄. Zamieszać. Zaobserwować zmianę zabarwienia (r-r początkowo odbarwia się a następnie zaczyna wydzielać się brunatny osad MnO₂).

Ćwiczenie 10. Wykrywanie cholesterolu – próba Salkowskiego

Odczynniki:

- 0,2% chloroformowy r-r cholesterolu
- olej świeży
- stęż. H_2SO_4

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 0,5 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 0,5 ml 0,2% chloroformowego r-r cholesterolu

Obie podwarstwić 0,5 ml stęż. H_2SO_4 . Czerwona barwa świadczy o obecności cholesterolu.

Ćwiczenie 11. Wykrywanie cholesterolu – próba Liebermanna - Burcharda

Odczynniki:

- 0,2% chloroformowy r-r cholesterolu
- olej świeży
- bezwodnik kwasu octowego
- stęż. H_2SO_4

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 0,5 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 0,5 ml 0,2% chloroformowego r-r cholesterolu

Do obu probówek dodać 0,5 ml bezwodnika kwasu octowego i po ściankach probówek 2 krople stęż. H_2SO_4 . Wymieszać. Pojawiająca się czerwona barwa przechodzi w niebieską a następnie w zieloną.