

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou jako námět pro badatelsky
orientovanou výuku

Reaction of proteins with nitric acid as a topic for research-oriented teaching

Barbora Hanušová

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Kolář, CSc.

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor: B BI-CH

Rok odevzdání 2024

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou jako námět pro badatelsky orientovanou výuku potvrzují, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzují, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha 14.04.2024

Chtěla bych velmi poděkovat všem, kteří mi pomohli při psaní této bakalářské práce. Děkuji mému vedoucímu práce prof. Ing. Karlu Kolářovi, CSc, za vlídné vedení, trpělivost, podporu a odborné připomínky při sepisování této práce. Dále paní laborantce Janě Fířtové, která mi byla velkou pomocnou rukou při praktické části této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala mé rodině, která mě po celou dobu psaní bakalářské práce podporovala.

ABSTRAKT

Ve výuce má svoji nezastupitelnou roli experiment. Objektem zkoumání této práce je interakce kyseliny dusičné s bílkovinami. Vlastní reakce je pro žáky a studenty motivující a inspirující díky pozorovatelným změnám, ke kterým dochází. Průběh reakce je spojený s kladením si několika otázek. Aby na ně student dokázal odpovědět, musí objasnit podstatu reakcí. K tomu postačí bioorganický model založený na jednoduchých reakcích prováděných na tečkovací destičce. Hlavní motivací pro tuto činnost byla snaha obohatit stávající spektrum jednoduchých výukových experimentů z organické chemie a biochemie o experiment využívající badatelské metody v souvislosti s bioorganickými modely.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina dusičná, bílkoviny, xantoproteinová reakce, školní pokus

ABSTRACT

The teaching experiment has an indispensable role in teaching. The object of investigation of this thesis is to study the interaction of nitric acid with proteins. The course of the reaction is motivating and inspiring for pupils and students due to the observable changes that occur. The course of the reaction involves asking several questions. In order to answer them, the student must explain the nature of the reactions. A bioorganic model based on simple reactions carried out on a dot-plate is sufficient to explain the reaction process. The main motivation for this activity was to enrich the existing range of simple teaching experiments in organic chemistry and biochemistry with an experiment using exploratory methods in the context of bioorganic models.

KEYWORDS

nitric acid, proteins, xanthoprotein reaction, school experiment

Obsah

Úvod	9
1. Teoretická část	11
1.1 Badatelsky orientovaná výuka a její charakteristika	11
1.2 Alternativy badatelsky orientované výuky v chemii	13
1.2.1 Problémově orientovaná výuka	14
1.2.2 Volnočasové aktivity	14
1.2.3 Kooperativní vyučování	15
1.2.4 Projektová výuka	15
1.3 Bioorganické modely a možnosti jejich využití ve výuce	16
1.4 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou jako námět pro chemické výukové experimenty	17
1.5 Interakce bílkovin s kyselinou dusičnou a jednoduché bioorganické modely	18
1.5.1 Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny	19
1.5.2 Chemické reakce aminokyselin, peptidů a bílkovin	23
1.5.3 Denaturace bílkovin	26
1.5.4 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou	27
1.6 Aplikace poznatků v různých oblastech (analytická chemie, bezpečnost práce atd.)	30
1.6.1 Analytická chemie	30
1.6.2 Bezpečnost práce	31
1.7 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou v učivu chemie na středních školách všeobecně vzdělávacího charakteru a vysokých školách vzdělávajících budoucí učitele	32
1.7.1 Xantoproteinová reakce v publikacích určených pro budoucí učitele chemie	33

1.7.2	Xantoproteinová reakce v učebnicích pro střední školy všeobecně vzdělávacího charakteru	34
1.7.3	Xantoproteinová reakce v časopisech.....	37
2	Cíl práce.....	38
3	Praktická část.....	39
3.1	Použité chemikálie.....	39
3.2	Použitá laboratorní technika	40
3.3	Ideový záměr realizace experimentu.	40
3.4	Metodika realizace experimentů.....	43
	Cíle experimentu:	43
	Teoretická část:.....	43
	Pomůcky a chemikálie:.....	46
	Instrukce před zahájením experimentu:.....	46
3.5	Metodika hodnocení experimentu	47
4	Výsledky a diskuse.	48
	Závěr.....	55
	Seznam použitých informačních zdrojů	56
	Seznam příloh	60

Úvod

Ve výuce chemie na základních a středních školách všeobecně vzdělávacího charakteru hraje nezastupitelnou roli výukový experiment. Tento je zaměřen na různé cíle. Některé z těchto experimentů mají motivační charakter, jiné jsou orientovány na zpřístupnění reálných chemických reakcí, některé sledují i další cíle. Mezi takové experimenty náleží i ty, ve kterých se uplatňuje badatelská metoda. Tato metoda, mimo jiné ve výuce zpřístupňuje specifickým způsobem žákům způsob práce, který je obvyklý ve vědecko-výzkumné laboratoři.

V našem případě se jedná o uplatnění badatelské metody v oblasti organické chemie a biochemie. Objektem činnosti je zkoumání podstaty známé zkumavkové reakce, vztahující se k interakci kyseliny dusičné s bílkovinami, která našla své uplatnění také ve výuce chemie. Jedná se o reakci, která se objevila v učebnicích chemie pro gymnázia již ve 30. letech minulého století. Průběh reakce je pro žáky a studenty motivující a inspirující. Do zkumavky s roztokem bílkoviny (nejčastěji vaječného albuminu), se přidá kapka koncentrované kyseliny dusičné, obsah zkumavky se zbarví světle žlutě. Jestliže se do zkumavky přidá ještě několik kapek zředěného roztoku hydroxidu sodného, obsah zkumavky se stane tmavě žlutým. Průběh reakce je spojený s kladením si otázek:

- 1) Co je příčinou vzniku onoho zbarvení?
- 2) Z jakého důvodu dochází ke změně světle žlutého zbarvení na tmavě žluté po přidání roztoku hydroxidu sodného?

Aby žák nebo student byl schopen zodpovědět tyto dvě otázky, je zapotřebí rozpracovat soubor modelových experimentů, prostřednictvím kterých je možné objasnit podstatu reakcí, které ve zkumavce probíhají. Na první pohled by se mohlo zdát, že k objasnění této reakce je zapotřebí využít kvalifikované přístrojové techniky. Opak je však pravdou, k objasnění průběhu reakcí postačí bioorganický model založený na jednoduchých reakcích prováděných na kapkovací destičce. Uplatnění badatelské metody v této souvislosti prakticky jednoznačně umožňuje odhalit podstatu problému.

Hlavní motivací pro tuto činnost byla snaha obohatit stávající spektrum jednoduchých výukových experimentů z organické chemie a biochemie o experiment využívající badatelské metody v souvislosti s bioorganickými modely.

1. Teoretická část

1.1 Badatelsky orientovaná výuka a její charakteristika

Bádání žáka nebo studenta představuje aktivní proces, který je zaměřený na samostatné a přímé poznávání okolní skutečnosti. Tento koncept se řadí mezi klíčové vzdělávací strategie, které se snaží odlišit od pasivního přístupu, charakteristického pro tradiční, transmisivní nebo instruktivistické metody výuky. Badatelsky orientovaná výuka podporuje nejen samostatné poznávání skutečností, které si studenti nebo žáci mají osvojit, ale zahrnuje také aktivní proces poznávání. Tento proces je spojen s osvojováním badatelských postupů, rozvojem vnímání, schopností zvládat emoce a v neposlední řadě i badatelským myšlením.

Existuje několik přístupů k bádání ve výuce:

- 1) Potvrzující bádání – v tomto bádání jsou studentům poskytnuty otázky a postupy, taktéž jsou jim známy výsledky a úkolem je ověřit tyto výsledky praxí.
- 2) Strukturované bádání – učitel sděluje otázky i možný postup, na základě toho studenti formulují vysvětlení daného jevu.
- 3) Nasměrované bádání – učitel formuluje výzkumnou otázku a studenti jsou pověřeni vytvořit metodický postup a uskutečnit jeho realizaci.
- 4) Otevřené bádání – tento typ bádání dává studentům nejvyšší úroveň autonomie, protože studenti sami formulují otázky, aktivně přemýšlejí nad postupem, provádějí výzkum a formulují výsledky.

Lze říct, že bádání v tomto pojetí zahrnuje několik klíčových dílčích kroků, což vytváří víceméně strukturu vědeckého bádání, které je typické zejména pro exaktní vědy. Skládá se z pozorování a popisu skutečnosti, které student vytváří pomocí smyslů a poznatků, dále formuluje problém a navrhuje možné hypotézy, kterými se snaží logicky vysvětlit danou problematiku. Student ověří soulad předpovědi se skutečností například experimentální cestou. Tímto si i ověří logické posloupnosti předchozích kroků (Dostál, J. 2015)

Badatelsky orientovaná výuka zahrnuje několik klíčových kroků (fází):

Fáze 1: Zaujetí a motivace žáka (studenta)

V této fázi je žák nebo student zaujat a následně motivován, správné provedení tohoto kroku by mělo vést ke zvýšení zájmu o nové informace.

Fáze 2: Formulace problému

V této fázi je zapotřebí stanovit konkrétní problém, který bude předmětem zkoumání.

Fáze 3: Plánování postupu

V této fázi je klíčovým úkonem naplánovat postup, který by měl žáka (studenta) dovést k dosažení správného výsledku.

Fáze 4: Realizace postupu (experimentu)

Tento krok představuje nejdůležitější okamžik, celého cyklu, kdy žák (student) aktivně provádí pokus podle předem naplánovaného postupu.

Fáze 5: Porovnání výsledku s realitou

Fáze 6: Vyvození závěru

Fáze 7: Použití vědeckého závěru jako důkazu k rozhodování

Badatelské vyučování je tvořeno jakousi pomyslnou cestou, je to proces, kterým projde učitel i žák (student) v rámci badatelské činnosti. Tento proces je možné rozdělit na čtyři části.

První část se věnuje otázce „Co chci řešit“. Obsahuje několik složek jako je motivace, sběr informací, kladení si otázek a vytváření výzkumných otázek. V této etapě se student učí kriticky přemýšlet o tématu, sbírat a třídit informace z relevantních zdrojů. Důležité v tomto kroku je naučit se třídit zdroje podle věrohodnosti a nepřebírat důvěru ve všechny zdroje. Jeho otázky jsou podrobeny vlastní analýze a porovnává své poznatky s kolegy. Je nezbytné studenty k práci motivovat vhodným materiálem, pokud materiál nebude úměrný věku, mohl by se dostavit efekt zklamání.

Druhá fáze badaletského cyklu, označovaná jako „přicházení s domněnkou“ se věnuje formulaci vlastní hypotézy. Tato hypotéza musí splňovat několik kritérií jako je jednoznačnost, ověřitelnost, specifická, měřitelnost a zobecnitelnost.

Třetí část badatelského cyklu se zaměřuje na ověření hypotézy prostřednictvím konkrétního experimentu. Tato fáze zahrnuje plánování a přípravu na experiment, jeho provedení, řádné zaznamenání relevantních dat a vyhodnocení výsledků. Student zdokonaluje své postupy, jak pracovat s vlastní hypotézou, její popření nebo vyvrácení, navrhuje průběhy experimentů. Student se učí pracovat ve větším kolektivu, zlepšuje své analytické dovednosti a systematicky třídí získaná data, která následně umí prezentovat nebo graficky zobrazit.

Poslední, čtvrtá část badatelského cyklu, směřuje k formulaci závěrů a návratu k původní hypotéze, s důrazem na její vyvrácení nebo potvrzení. V této fázi je také zahrnuto hledání vzájemných vztahů mezi daty získanými v průběhu experimentu a původní hypotézou. Student rozvíjí schopnost prezentovat svoje výsledky, popřípadě formulovat další související relevantní otázky a vyvozovat závěry z dat. Učí se efektivně stanovit výsledky, aktivně o nich diskutovat a prezentovat je vhodným způsobem. Důležitým aspektem je také osvojení si dovednosti citace důvěryhodných zdrojů a diskuze s ostatními kolegy nad jejich relevantností a použitelností. Neméně důležité je, že se žák učí dovednosti diskutovat a odpovídat na otázky ostatních, které se týkají jeho experimentální práce. (Špidlenová, 2019)

1.2 Alternativy badatelsky orientované výuky v chemii

V nedávné době se nemalý počet studií zaměřil na znepokojivý úbytek zájmu mladých lidí o přírodovědné obory a matematiku. I přes mnohé projekty, které se snaží tuto nepopiratelnou tendenci obrátit k lepšímu, snaží se tedy zvýšit zájem o exaktní vědy, jsou výsledky tohoto úsilí stále velmi omezené. Bez zavedení efektivnějších opatření, která mohou vyvrátit tento trend, bude docházet k dlouhodobému snižování inovační schopnosti Evropy a poklesu kvality jejího výzkumu.

Nový přístup v oblasti přírodovědného vzdělávání, kterým je přesun od převážně deduktivních metod k metodám založeným na vlastním objevování, pravděpodobně poskytuje klíčový nástroj pro zvýšení zájmu studentů o přírodní vědy. (Rocard et. al, 2007)

Tato změna v pedagogickém přístupu umožňuje studentům více interaktivně a samostatně zkoumat exaktní vědy a podněcuje to u studentů jejich přirozenou touhu po získávání nových informací. To by mohlo být klíčem k obnovení jejich zájmů a motivace.

Celkově je potřebné se zaměřit na vytváření podnětného a inspirativního vzdělávacího prostředí, které bude vést k rozvoji zájmu mládeže o přírodní vědy a matematiku.

1.2.1 Problémově orientovaná výuka

Problémově orientovaná úloha, se od běžné učební úlohy odlišuje tím, že obsahuje problém, který je neúplně strukturovaný. Tento typ úloh často neobsahuje jasně definovaný počáteční ani cílový stav a není zřejmé, pomocí kterých kognitivních operací je lze vyřešit. Často není možné aplikovat pouze algoritmus, protože problém může obsahovat skrytá omezení, dostupné informace jsou méně instruktivní, není jasné kdy, jak a zda je možné dané údaje použít, řešení bývají často divergentní.

Problémově orientované učební úlohy jsou považovány za základní prvky výukových situací zaměřených na řešení problémů. Podle teoretických prací je možné stanovit ideální průběh těchto výukových situací a identifikovat fáze, které mají největší didaktickou hodnotu. Za didakticky hodnotný je zvláště cenný proces učení utvářený během dialogu mezi jednotlivci, kteří řeší společně problémovou úlohu. Čím více se průběh výukové situace blíží ideálu, tím lépe tato situace naplňuje požadavek na rozvoj schopnosti řešit problémy. (Češková, 2016)

1.2.2 Volnočasové aktivity

Alternativou k badatelské výuce může být volnočasová aktivita, která se ubírá badatelským směrem (Dostál, J. 2015). Tato alternativa určitě není dostupná všem studentům. Mezi studenty se vyskytují velké sociální rozdíly, které jim zabraňují navštěvovat tuto volnočasovou aktivitu, patří sem jednoznačně finanční prostředky, ale i například špatné povědomí sociální sféry, ve které se nachází. Úskalím této alternativy také může být poloha, volnočasový program, který se zabývá těmito problémy a snaží se je řešit badatelskou cestou, určitě není dostupný v každém městě. K badatelsky orientované výuce je potřeba mít i určité materiální didaktické prostředky, na které se velmi těžko ve volnočasových klubech získávají finanční prostředky. Velkým plusem této alternativy ale může být omezený počet

žáků, protože instituce, která realizuje tuto činnost může omezit počet účastníků. Bohužel většinou počet dětí jde ruku v ruce s počtem financí na realizaci tohoto projektu.

Tato alternativa je určitě také pro lektory velmi sympatická, protože není třeba dodržovat RVP ani ŠVP a lektor nemusí striktně brát ohled na probrané učivo. Může se tedy plně zaměřit na rozvoj myšlení žáků bez toho, aniž by se dostal do časové tísně. Může tedy nad jedním problémem strávit tolik času, kolik je třeba.

1.2.3 Kooperativní vyučování

Kooperativní vyučování je pedagogický přístup, který klade důraz na spolupráci mezi studenty při řešení úkolů. Tato metoda je spojena s aktivní účastí všech studentů, kteří spolupracují na dosažení společného cíle. Zahrnuje různé strategie a techniky, které podporují interakci, sdílení znalostí a vzájemnou podporu.

Průcha, Walterová, Mareš (2001, s.107) v pedagogickém slovníku uvádějí, že kooperativní učení je učení, které se liší od individuální výuky tím, že je postaveno na spolupráci osob při řešení složitějších úloh. Řešitelé jsou vedeni k tomu, aby si dokázali rozdělit sociální role, naplánovat si celou činnost, rozdělit si dílčí úkoly, naučit se radit si, pomáhat, sladovat úsilí, kontrolovat jeden druhého, řešit dílčí spory, spojovat dílčí výsledky do většího celku a hodnotit přínos jednotlivých členů. Za základní pojmy kooperativního vyučování tedy považujeme sdílení, spolupráci, pomoc a podporu. Tyto pojmy jsou klíčovými kategoriemi úspěšného učení ve školních podmínkách a také zárukou plnohodnotného osobního života. (Sommerová, 2009)

1.2.4 Projektová výuka

Projektová výuka je moderní pedagogický přístup, který klade důraz na praktickou a týmovou aktivitu studentů, při řešení reálných problémů nebo projektů. Tento přístup podporuje aktivní angažovanost žáků, kteří spolupracují na projektech, které jsou často spojeny s reálnými situacemi, a tak získávají dovednosti nejen v rámci daného předmětu, ale i v oblasti řešení problémů, komunikace a týmové spolupráce. Projektová výuka obvykle začíná definováním konkrétního problému nebo úkolu, který studenti mají za cíl vyřešit. Během procesu řešení, studenti procházejí různými fázemi procesu, během kterého se učí plánování, sběru informací, analýze a prezentaci výsledků. Projektová výuka také podporuje

kreativitu, iniciativu a samostatnost studentů. Projektová výuka se může aplikovat napříč různými předměty.

Projektová výuka je založena na projektové metodě. Projektová metoda je vyučovací metoda, v níž jsou žáci vedeni k samostatnému zpracování určitých projektů a získávají zkušenosti praktickou činností a experimentováním. Projekty mohou mít formu integrovaných témat, praktických problémů ze životní reality nebo praktické činnosti vedoucí k vytvoření nějakého výrobku, výtvarného či slovesného produktu. (Burgerová, 2020).

1.3 Bioorganické modely a možnosti jejich využití ve výuce

V živých organismech se uplatňují různé druhy biochemických reakcí, které představují složité chemické procesy, probíhající za účasti katalyzátorů - enzymů. Bližšímu poznávání těchto procesů, vycházejících z chemických přeměn především organických sloučenin mohou napomoci postupy, využívající poznatků bioorganické chemie. (Vodrážka, 1991) Jedním z nejdůležitějších úkolů bioorganické chemie, která je jakýmsi spojovacím mostem mezi organickou chemií a biochemií, je odhalovat podstatu biochemických procesů s využitím strukturně jednodušších látek. Splnění těchto cílů mohou napomoci bioorganické modely, simulující složité procesy, probíhající v živých organismech na straně jedné, ale i procesy související se studiem fyzikálních vlastností přírodních látek, jejich analýzou apod. Konkrétním příkladem může být studium podstaty biuretové reakce, sloužící k důkazu bílkovin. Jedná se o reakci, založenou na tvorbě modrofialového komplexu, který tvoří molekula bílkoviny např. albuminu s měďnatou solí. Vznik tohoto barevného komplexu je možné simulovat pomocí interakce měďnaté soli s biuretem, který je strukturně podstatně jednodušší látkou než albumin. (Aidu, 1963, Basnet, 2020, Zdražil 2012) Jiným příkladem může být simulace působení aktivního centra enzymu pomocí makrocyclů, např. cyklodextrinů, které představují model aktivního místa enzymu. Jako konkrétní příklad může sloužit interakce fenolftaleinu, představujícího molekulu substrátu s β -cyklodextrinem. (Lhoták, 1997, Taguchi, 1986, Karásková, 2015) Uplatnění modelů a vlastní modelování biochemických procesů je účinnou metodou vysvětlení či přiblížení způsobu, jakým tyto složité chemické děje a procesy probíhají. Při vytváření modelů a jejich aplikací je třeba brát na zřetel několik zásad, abychom pochopili mechanismy

biochemických reakcí, principy působení molekul, které působí jako biokatalyzátory, vliv prostorového uspořádání látek na vznik produktů a rychlost jejich vzniku. Je proto zapotřebí, aby se modely svou chemickou podstatou co nejvíce blížily látkám modelovaným. Mezi nejjednodušší způsoby poznávání struktury a vlastností látek bez aplikace složité přístrojové techniky a s využitím adekvátních nástrojů pak náleží např. fragmentace původní molekuly a zkoumání jednotlivých strukturních elementů pomocí jednoduchých testů (např. barevné reakce).

Stejně jako v každém jiném biologickém nebo chemickém oboru má modelování biochemických systémů v procesu výuky na základní a obzvláště střední škole význam pro pochopení či přiblížení dané problematiky žákům a studentům. Z biochemických procesů je i v rámci mezipředmětových vztahů s biologií řešena pouze na základní úrovni fotosyntéza, dále pak získávají žáci informace o existenci přírodních látek, jako jsou bílkoviny, cukry a tuky a o jejich základní stavbě a funkci. Zcela jiná situace je na vyšším gymnáziu, kde studenti absolvovali již organickou chemii a chemii polymerů, podrobněji jsou seznamováni s kapitolami z biochemie. Výukový model musí splňovat několik pravidel, kromě vystižení podstaty problému nebo co největšího možného přiblížení se způsobu řešení musí být jeho prezentace natolik jednoduchá, aby odpovídala úrovni středoškolské chemie. Student při vysvětlení těchto složitých procesů musí pracovat s pojmy, které ovládá a kterým rozumí. Vysvětlení podstaty jevu musí být natolik jednoduché, aby bylo názorným prostředkem, zároveň musí odpovídat reálnému stavu (Zdražil, J. 2013).

1.4 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou jako námět pro chemické výukové experimenty

Pro aminokyseliny je typická přítomnost karboxylové skupiny $-\text{COOH}$ a aminoskupiny $-\text{NH}_2$ v molekule. Některé aminokyseliny obsahují v molekule pouze uhlovodíkové zbytky (alkyly, aryly), jiné pak další charakteristické skupiny jako např. $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, ale i zbytek guanidinu, případně heterocyklický skelet (indol, histidin). Přítomnost těchto struktur podmiňuje různé barevné nebo srážecí reakce, které lze použít k orientačnímu důkazu aminokyselin. Existují skupinové reakce, sloužící k důkazu bílkovin, např. biuretová reakce, xantoproteinová reakce, ale i specifické reakce, použitelné k důkazu jednotlivých typů aminokyselin (důkaz histidinu Paulyho reakcí, důkaz argininu Sakaguchiho reakcí, důkaz

prolinu reakcí s ninhydrinem apod.) (Zima,1989, Doubrava, 1984). Fragmenty 4-hydroxyfenyl- v molekule tyrosinu, nebo indol 3-yl- v molekule tryptofanu jsou příčinou průběhu xantoproteinové reakce u bílkovin (Vejražka, 2021/2022). Posledně jmenované reakce jsou nepochybně vhodné jako námět pro jednoduché výukové experimenty založené na zkumavkových testech, týkajících se důkazu bílkovin v různých přírodních zdrojích nebo bezprostředně k důkazu tyrosinu a tryptofanu.

1.5 Interakce bílkovin s kyselinou dusičnou a jednoduché bioorganické modely

Vzájemné vztahy atomů a jejich vazby v molekulách mají vliv na specifické vlastnosti organických sloučenin. Jednou z alternativ bádání v organické chemii je určování chemické struktury organických sloučenin a s tím spojené zkoumání jejich chemických vlastností. Klasický způsob určení struktury tkví ve využití čistě chemických metod, které ovšem bývají velmi zdoluhavé a pracné, proto je mnohem rychlejší řešit problémy kombinací různých fyzikálně-chemických metod (např. NMR spektroskopie) s chemickými postupy studia struktury a reaktivity. Vzhledem k tomu, že využití fyzikálně-chemických metod při zkoumání struktury a reaktivity sloučenin je na základních a středních školách z řady důvodů obtížně realizovatelné, je vhodné se zaměřit na školním podmínkách adekvátní postupy. Takovou cestu představuje formální fragmentace zkoumané molekuly látky složité struktury a náhrada fragmentů reálně existujícími sloučeninami, které mají jednodušší strukturu než zkoumaná molekula. Následně je třeba porovnávat průběh reakce původní sloučeniny s vybraným činidlem a průběh reakce sloučenin, odvozených od jednotlivých fragmentů s tímž činidlem. Tyto reakce mohou být doprovázeny barevnými změnami, změnami skupenství látek (vznikem sraženin), vznikem produktů specifické vůně nebo zápachu apod. Jedním z významných testů, které slouží k důkazu bílkovin je xantoproteinová reakce. Jedná se o reakci bílkovin s konc. kyselinou dusičnou za vzniku produktu světle žlutého zbarvení, po přidání vodného roztoku hydroxidu sodného se zbarvení změní na tmavě žluté. (Doubrava, 1984, Zima, 1989, Basnet, 2020, Wahdania, 2021) Analýza průběhu reakce aminokyselin, peptidů a bílkovin s kyselinou dusičnou jako východisko tvorby bioorganických modelů

1.5.1 Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny

Molekula aminokyseliny, jak již se dá odvodit z názvu, bude obsahovat dvě charakteristické skupiny a to aminoskupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu $-COOH$. Ve volných aminokyselinách, které se vyskytují v živých organizmech, ale i těch, které jsou součástí bílkovin a peptidů se nachází aminoskupina převážně v poloze α - ke skupině karboxylové. Aminokyseliny mají často triviální názvy, které se zkracují třemi písmeny (např. valin – Val, histidin – His, tryptofan – Try). Některé aminokyseliny mají na α -uhlíku kromě aminoskupiny ještě uhlíkatý alifatický nebo aromatický zbytek R, na kterém mohou být vázány ještě další charakteristické skupiny, např. $-OH$, $-SH$ ale i strukturně složitější skupiny, např. guanidinový zbytek. Některé aminokyseliny obsahují v molekule heterocyklický skelet, např. aminokyselina histidin obsahuje v molekule imidazol. V bílkovinách se vyskytuje pravidelně 20 různých aminokyselin.

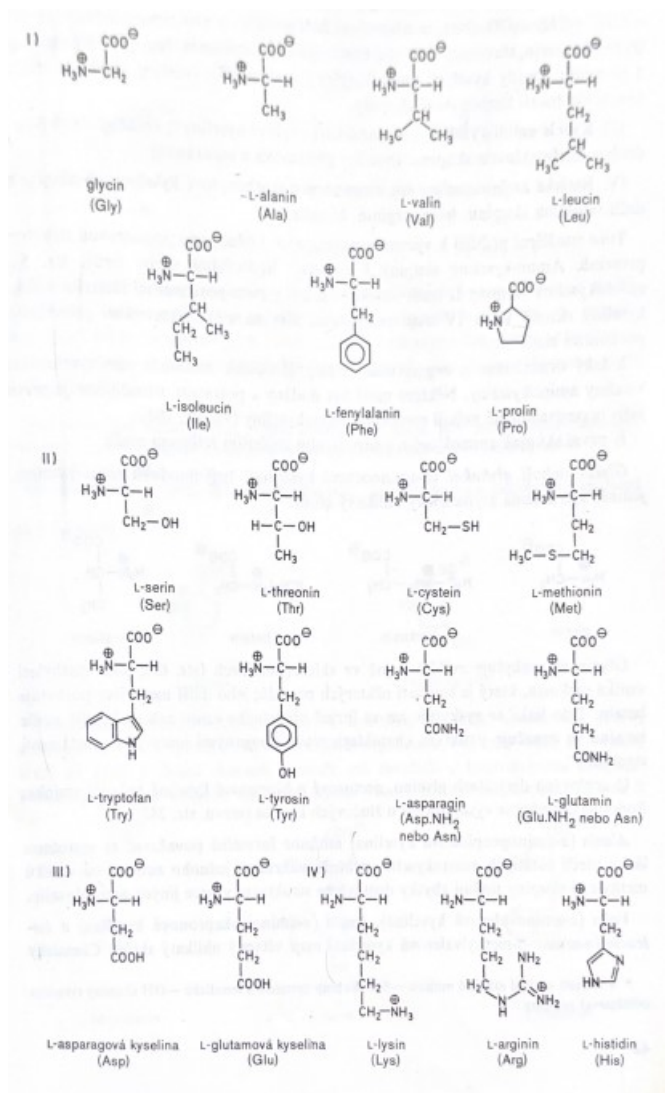
Aminokyseliny z pohledu významu postranních řetězců pro uspořádání proteinů v prostoru se dělí do čtyř skupin:

Aminokyseliny, které obsahují nepolární zbytek R, tedy mají uhlovodíkový postranní řetězec (glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, fenylalanin).

Aminokyseliny s neionizovanými, ale polárními skupinami v postranním řetězci (tyrosin, tryptofan, serin, threonin, cystein, cystin, methionin, asparagin, glutamin).

Kyselé aminokyseliny obsahují na uhlovodíkovém zbytku navázanou druhou karboxylovou skupinu (glutamová kyselina a asparagová kyselina).

Basické aminokyseliny obsahují ještě další bazickou skupinu (lysin aminoskupinu, arginin guanidinový zbytek, v histidinu je to imidazol).



Obrázek 1-20 základních aminokyselin (Karlson, 1981)

Organismus většiny živočichů nedokáže sám syntetizovat všech 20 aminokyselin, některé musí být dodávány potravou a označují se proto jako esenciální aminokyseliny.

Glycin – nejjednodušší aminokyselina, která jako jediná nemá asymetrický uhlíkový atom.

Alanin – dá se považovat za matečnou látku ostatních aminokyselin, pokud se nahradí jeden nebo dva atomy vodíku methylové skupiny jinými zbytky.

Valin, leucin a izoleucin – jsou to chemicky si velmi podobné sloučeniny, které mají v molekule větvený uhlíkový skelet.

Prolin – má specifickou strukturu, obsahuje pětičlenný dusíkatý heterocyklus pyrrolidin, aminokyselina je zajímavá tím, že neobsahuje volnou aminoskupinu, tato je součástí heterocyklického skeletu.

Fenylalanin a tyrosin – tyto aminokyseliny jsou zařazovány do podskupiny aromatických aminokyselin. Fenylalanin obsahuje aromatický benzenový skelet a má úzký vztah k tyrosinu, který na rozdíl od fenylalaninu obsahuje na benzenovém skeletu hydroxylovou skupinu. Fenolový zbytek tyrosinu vykazuje vlastnosti slabé kyseliny.

Serin – obsahuje hydroxylovou skupinu, která se může účastnit běžných reakcí, typických pro alkoholy, např. tvorby esterů.

Threonin – byl první aminokyselinou, o které bylo dokázáno, že je nezbytná. Obsahuje dvě stereogenní centra, může tedy tvořit čtyři stereoisomery.

Cystein – tato aminokyselina obsahuje síru, skupina -SH je poměrně reaktivní.

Cystin – při dehydrogenaci (oxidaci) cysteinu se jeho dvě molekuly spojí za vzniku cystinu, může být vázán ve dvou peptidických řetězcích současně.

Methionin – obsahuje skupinu -SCH₃ a je to nejen stavební jednotka bílkovin, ale také donor aktivních methylových skupin.

Asparagin a glutamin – amidická skupina jim uděluje hydrofilní vlastnosti. Při alkalické hydrolýze bílkovin se amidové skupiny štěpí, přitom vzniká asparagová, nebo glutamová kyselina a amoniak.

Kyselina asparagová a glutamová – ve svém postranním řetězci obsahují další karboxylovou skupinu, která snadno odštěpuje proton, a vytváří tak prostor pro vznik fragmentů se záporným nábojem, které jsou důležité pro elektrochemické vlastnosti bílkovin.

Lysin – má v alifatickém řetězci jednu karboxylovou skupinu a dvě aminoskupiny, vykazuje tedy bazické vlastnosti.

Histidin a tryptofan – histidin obsahuje slabě bazický imidazolový heterocyklický skelet, u mnohých enzymů se uplatňuje jako donor i akceptor elektronů. Tryptofan obsahuje indolový skelet s jedním dusíkovým atomem.

Aminokyseliny lysin, arginin a histidin se označují také jako hexonové báze, protože všechny mají šest uhlíkových atomů.

Dělení aminokyselin:

Aminokyseliny jsou základní stavební jednotky bílkovin a uvolňují se z nich při hydrolyze. Protože jsou si aminokyseliny velmi podobné z hlediska struktury, všechny obsahují stejné základní charakteristické skupiny, je dělení směsi aminokyselin někdy obtížnou záležitostí.

Bílkoviny (proteiny) náleží mezi biopolymery, jejichž stavebními jednotkami jsou aminokyseliny navzájem spojené amidovými (peptidovými) vazbami -CO-NH-.

Peptidy jsou amidy kyselin. Jsou tvořeny molekulami aminokyselin, propojenými peptidovými vazbami. Dvě aminokyseliny tvoří dipeptid, tři tripeptid atd. Pokud je ve vzájemné vazbě spojeno méně, než deset aminokyselin jedná se o oligopeptidy, je-li počet aminokyselin v řetězci vyšší, jedná se o polypeptidy. Pokud se bude počet aminokyselin v řetězci dále zvětšovat, bude se jednat o bílkoviny, které se skládají z několika set až tisíc aminokyselinových zbytků. Hranice mezi polypeptidy a bílkovinami není přesně určena. (Karlson, 1981)

Bílkoviny se běžně rozdělují na dvě hlavní kategorie podle struktury: fibrilární neboli vláknité, které jsou také často označovány jako skleroproteiny a globulární neboli kulovité bílkoviny jsou též nazývány jako sféroproteiny. Fibrilární bílkoviny jsou odolné a nerozpustné ve vodě, proto slouží v přírodě jako podpůrný materiál. V tělních tkáních se nachází například kolagen ve šlachách, nebo myosin ve svalových vláknech. Naopak molekuly globulárních bílkovin jsou zpravidla rozpustné ve vodě a jsou uspořádány do kompaktních, přibližně kulovitých tvarů, které se pohybují uvnitř buněk. Do této kategorie patří většina z asi 3 000 známých enzymů.

Molekuly bílkovin jsou tak velké, že pojem struktura je zde nutno chápat mnohem širěji, než je obvyklé u ostatních jednodušších organických sloučenin. Ve skutečnosti při popisu bílkovin chemici uvažují o čtyřech různých úrovních struktury:

Primární struktura představuje posloupnost jednotlivých aminokyselin v řetězci molekuly bílkovin.

Sekundární struktura vyjadřuje prostorové uspořádání konkrétních částí bílkovinného řetězce. Dvě nejčastější sekundární struktury jsou α -helix (α -šroubovice) a β -struktura (skládáný list). Pokud jde o α -helix, ten představuje uspořádání bílkovinného řetězce v podobě pravotočivé šroubovice připomínající točité schody. Tato struktura je stabilizována vodíkovými můstky mezi amidovými skupinami. Zatím co α -helix je běžným typem sekundární struktury a téměř všechny globulární bílkoviny obsahují mnoho úseků tohoto typu, β -struktura (skládáný list) se liší od α -helixu v tom, že peptidový řetězec není stočený, ale je lineární. Vodíkové vazby vznikají mezi jednotlivými zbytky v sousedních řetězcích. Tyto řetězce mohou být uspořádány buď ve stejném směru (paralelně) nebo opačně (antiparalelně), přičemž antiparalelní uspořádání je častější a energeticky výhodnější.

Terciární struktura ukazuje, jak je celá struktura molekuly bílkoviny uspořádána do trojrozměrné formy. Síly ovlivňující terciární strukturu bílkovin jsou stejné jako síly působící na všechny molekuly bez ohledu na jejich velikost za účelem dosažení maximální stability systému. Významné jsou zejména interakce hydrofilních postranních řetězců v bazických nebo kyselých aminokyselinách a hydrofobní interakce nepolárních řetězců. Pro fixaci terciární struktury proteinů hrají klíčovou roli disulfidové můstky mezi cysteinovými zbytky, vodíkové vazby mezi prostorově blízkými aminokyselinami a přítomnost iontových přitažlivých sil (nazývaných též solné můstky) mezi pozitivně a negativně nabitými skupinami v postranních řetězcích aminokyselinových zbytků.

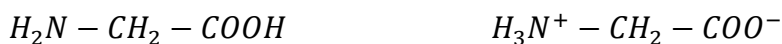
Kvartérní struktura představuje způsob, kterým molekula bílkoviny, skládající se z identických nebo rozdílných polypeptidových řetězců, vytváří komplexní strukturu. Tato struktura zohledňuje nebílkovinnou složku. (McMurry, 2015)

1.5.2 Chemické reakce aminokyselin, peptidů a bílkovin

Aminokyseliny náleží mezi substituční deriváty karboxylových kyselin. Pokud jde o jejich reakce, probíhají především na hlavních charakteristických skupinách, to znamená aminoskupině a karboxylové skupině. Kromě toho mohou probíhat i na dalších charakteristických skupinách (hydroxylová skupina, sulfanylová skupina) nebo na aromatických případně heterocyklických skeletech, které jsou v molekulách aminokyselin přítomny. (Kováč, 1977, Červinka, 1980, Červinka, 1987)

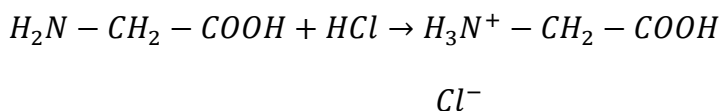
V molekule aminokyselin se nacházejí dvě základní charakteristické skupiny, a to aminoskupina, která vykazuje zásaditý charakter a karboxylová skupina, která se vyznačuje kyselým charakterem. Aminokyseliny se tedy nacházejí ve formě tak zvaných vnitřních solí. tato skutečnost se pak promítá do jejich fyzikálních a chemických vlastností.

Obecný vzorec aminokyseliny a její vnitřní soli.

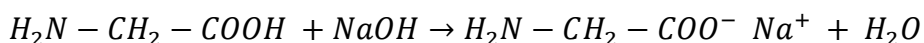


Aminokyseliny reagují s kyselinami za vzniku amoniových solí. Se zásadami pak za vzniku karboxylátů.

Reakce glycinu s kyselinou chlorovodíkovou:



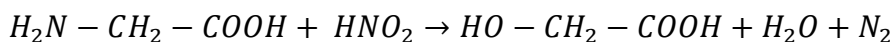
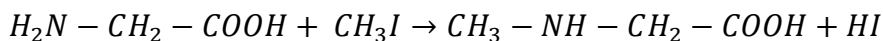
Reakce glycinu s hydroxidem sodným:



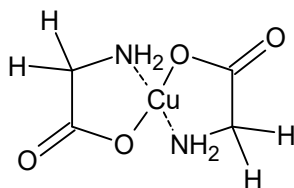
Na karboxylové skupině aminokyselin mohou probíhat esterifikační reakce za vzniku odpovídajících funkčních derivátů.



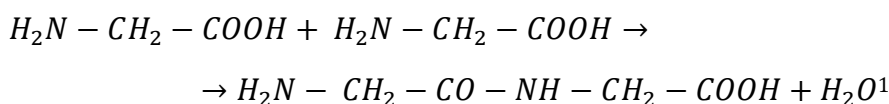
Na aminoskupině mohou probíhat např. alkylační reakce, za vzniku N-alkylovaných produktů, reakce s kyselinou dusitou vede k hydroxykyselinám. (Kováč, 1977)



Aminokyseliny mohou tvořit s měďnatými solemi komplexní sloučeniny.



Aminokyseliny mohou reagovat vzájemně za vzniku peptidů, vzájemnou reakcí dvou molekul glycinu vzniká dipeptid, ve kterém jsou dvě molekuly glycinu spojeny prostřednictvím peptidové (amidové) vazby.

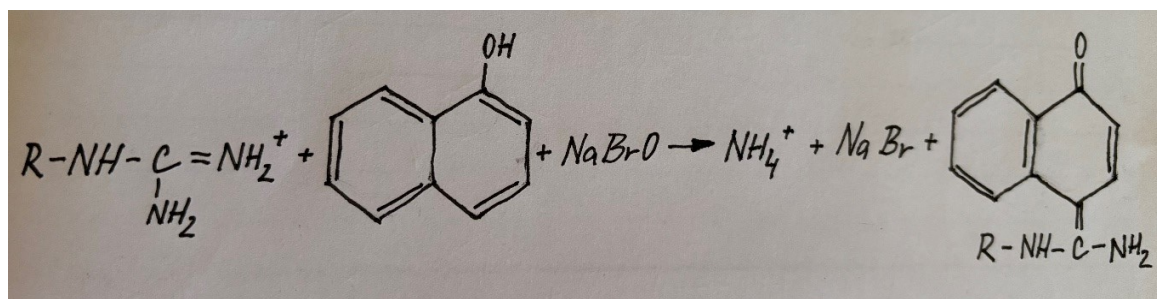


Reakce mohou probíhat i na dalších částech molekuly (aromatický nebo heterocyklický skelet) nebo jiných charakteristických skupinách (hydroxylová skupina, sulfanylová skupina). Na aromatickém skeletu může probíhat elektrofilní aromatická substituce, na sulfanylové skupině např. oxidace.

Z našeho hlediska jsou zajímavé obzvláště reakce, sloužící k důkazu nebo identifikaci určité aminokyseliny, která se nachází v bílkovině nebo peptidu. Jedná se především o reakce, založené na vzniku barevných produktů, kterými lze jednotlivé aminokyseliny dokázat jako chemická individua, ale i součásti molekul peptidů a bílkovin. V řadě případů se jedná o reakce, které jsou v tomto směru úspěšné, ale nelze jednoznačně odhalit jejich chemickou podstatu. K reakcím, jejichž průběh je znám náleží např. reakce Sakaguchiho, pomocí které lze identifikovat arginin. Její podstatou je interakce guanidinového zbytku argininu s 1-naftolem v přítomnosti bromnanu sodného za vzniku červeného produktu. Reakce probíhá s

¹ Reakce probíhá v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu

aminokyselinou argininem i bílkovinou, která arginin obsahuje. (Doubrava, 1984, Zima, 1989)



Obrázek 2 Sakaguchiho reakce (Doubrava, 1984)

Barevné reakce aminokyselin a bílkovin mohou významným způsobem přispět při demonstraci studia struktury bílkovin s využitím jednoduchých prostředků a v důsledku toho se stát jedním z nástrojů aplikace badatelské metody ve výuce chemie na středních školách všeobecně vzdělávacího charakteru, ale i na školách základních a podkladem pro tvorbu adekvátních bioorganických modelů. (Kováč, 1977)

1.5.3 Denaturace bílkovin

S reakcemi aminokyselin, peptidů a bílkovin souvisí do jisté míry i tak zvaná denaturace bílkovin. Pojmem denaturace se rozumí strukturní změny v molekule bílkoviny, při kterých dochází ke ztrátě biologických vlastností, dochází k výraznému snížení rozpustnosti a lze pozorovat další změny chemických a fyzikálních vlastností. Je to přechod ze stavu vysoce uspořádaného do stavu neuspořádaného tzv. náhodného klubka. Za určitých podmínek může být denaturace reverzibilní, ale většinou bývá nevratná. (Karlson, 1981)

Proces denaturace je proces, při němž molekula bílkoviny ztrácí nativní prostorovou strukturu, aniž by byly přerušeny kovalentní vazby v molekule; molekula tak přechází z nativního stavu do denaturovaného stavu. Tyto pojmy, ač zdánlivě jasné, je nutno pro každý jednotlivý případ podrobně zkoumat. Podstata denaturace může mít fyzikální nebo chemickou povahu. V prvním případě může docházet k denaturaci např. zahříváním. Z roztoku bílkoviny se zahříváním vyloučí pevná látka (např. bílá sraženina). V druhém případě přidáním chemické látky, například ve vodě rozpustné soli těžkého kovu (rtuti, olova aj.), opět se vyloučí pevná látka, v tomto případě jde o produkt reakce bílkoviny s ionty

těžkého kovu. Tyto procesy souvisejí se změnami především na úrovni terciárních struktur bílkovin.

Denaturace bílkovin tak souvisí do jisté míry s vytvářením představ o jejich struktuře a vlastnostech a může být námětem pro zkoumání vztahu mezi strukturou bílkovin a jejich vlastnostmi ve školních podmínkách.

1.5.4 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou

Jedná se o reakci, která je základem již zmíněné xantoproteinové reakce. Tato je založena na reakci koncentrované kyseliny dusičné s bílkovinami za vzniku žlutě zbarvených produktů. Po přidání roztoku hydroxidu sodného k reakční směsi se žluté zbarvení ještě prohloubí. Reakce patří mezi univerzální testy, určené k důkazu bílkovin. Otázkou je, jaká je podstata této reakce, které části bílkovinné molekuly s kyselinou dusičnou reagují. Obecně platí, že kyselina dusičná může působit jako:

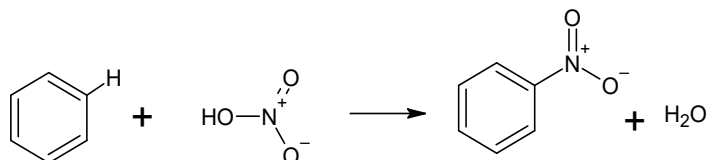
- 1) silná kyselina (acidobazické reakce)
- 2) oxidační činidlo (oxidačně redukční reakce)
- 3) nitrační činidlo (elektrofilní aromatická substituce)

V prvním případě může jít o působení kyseliny dusičné obzvláště na bazické aminokyseliny, v druhém případě např. na aminokyseliny obsahující -OH nebo -SH skupinu a třetím případě na aminokyseliny obsahující v molekule aromatický nebo heterocyklický skelet. Je tedy důležité posoudit, která z těchto reakcí je spojena se vznikem barevného produktu v závislosti na struktuře aminokyselin, které jsou obsaženy v bílkovinách.

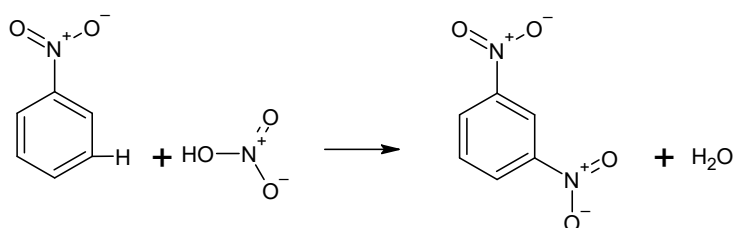
Na základě studia literatury k tématu, byly a priori vyloučeny první dvě alternativy a s následným zaměřením na třetí alternativu, která operuje s nitrací tyrosinu, jako nejdůležitější reakci, způsobující vznik produktů charakteristického zbarvení. Bude představen komplexní pohled na jmenovanou reakci.

Nejjednodušším příkladem elektrofilní aromatické substituce je nitrace benzenu s tím, že benzenový skelet je součástí některých aminokyselin, obsažených v bílkovinách (fenylalanin, tyrosin). Protože benzen je stabilní aren, k nitraci se používá směs kyseliny dusičné a sírové (nitrační směs), která usnadňuje tvorbu elektrofilní částice - nitroniového

kationtu NO^+ . Při reakci dochází k náhradě jednoho vodíkového atomu v molekule benzenu nitroskupinou $-\text{NO}_2$ a vzniká nitrobenzen (Pacák, 1990, Červinka 1980, Červinka, 1981).



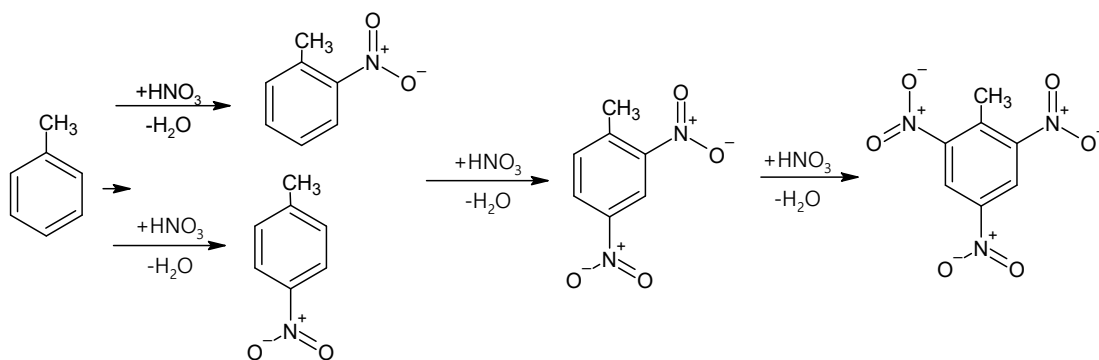
První substituent určuje i polohu další vstupující nitroskupiny. V tomto případě je to vždy poloha 1,3 (*meta*-):



Pravidla, podle kterých se nahrazují atomy vodíku na benzenovém jádře, je možné zveřejnit. Některé substituenty (substituenty 1. řádu) orientují náhradu atomů vodíku na benzenovém jádře v poloze *orto*- a *para*- a usnadňují průběh reakce. Patří mezi ně skupiny jako alkyl ($-\text{R}$) $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$ aj., které náleží mezi donory elektronů.

Substituenty 2. řádu orientují náhradu atomů vodíku na benzenovém skeletu do polohy *meta*-. Mezi tyto substituenty patří skupiny náležící mezi akceptory elektronů např. $-\text{CHO}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ a průběh reakce znesnadňují.

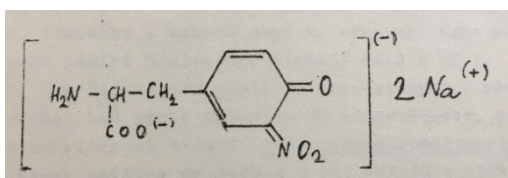
Podle těchto pravidel nitrace toluenu probíhá snáze než nitrace benzenu a vzniká nejdříve 2-nitrotoluen a 4-nitrotoluen, následně pak 2,4-dinitrotoluen, finálním produktem je 2,4,6-trinitrotoluen.



Nitrace fenolu probíhá mnohem snadněji než nitrace toluenu. Hydroxylová skupina se vyznačuje mnohem silnějším elektrondonorovým efektem, než methylová skupina. Nejdříve vzniká 2-nitrofenol a 4-nitrofenol, pak 2,4-dinitrofenol a 2,6-dinitrofenol, finální produkt je 2,4,6-trinitrofenol. V obou jmenovaných případech probíhá nitrace do třetího stupně obtížně a používá se speciálních postupů.

Aminokyseliny s aromatickým a heterocyklickým (a také aromatickým) skeletem (tyrosin, tryptofan) poskytují reakci s kyselinou dusičnou. Proto se také bílkoviny při reakci s kyselinou dusičnou zbarví žlutě (odtud název reakce xanthoproteinová-řecky xanthos = žlutý). Takovéto žluté zbarvení se objeví i při působení kyseliny dusičné na kůži, nehty, vlasy atd. Působením alkálií vzniká oranžově zbarvená sůl aci-formy nitrosloučeniny:

(Macholán, 1967, Zima, 1989)



Obrázek 3 Vzorec žlutě zbarvené soli aci-formy nitrosloučeniny (Zima, 1989)

Při zaměření se na strukturu aminokyselin, se dá odhadnout, které konkrétní aminokyseliny budou reagovat s kyselinou dusičnou a které reagovat nebudou. Jelikož nitrace probíhá na aromatickém nebo heterocyklickém (ale též aromatickém) skeletu, lze předpokládat, že budou s kyselinou dusičnou reagovat aminokyseliny: fenylalanin, tyrosin, tryptofan a histidin. (Karki, 2018), (Basnet, 2020) Důležité je při reakci aminokyselin s kyselinou dusičnou dbát na podmínky, za kterých bude reakce probíhat. Je velmi pravděpodobné, že reakce budou probíhat jinak za standardních laboratorních podmínek a jinak za zvýšené teploty apod. Na konečné zbarvení má též vliv změna pH prostředí. Toto je zapotřebí vzít v úvahu při finálním hodnocení experimentu.

1.6 Aplikace poznatků v různých oblastech (analytická chemie, bezpečnost práce atd.)

1.6.1 Analytická chemie

Chemická analýza má za cíl zkoumat různé látky za účelem zjišťování jejich složení. K tomuto účelu používá celé řady různých postupů a metod, často založených na rozkladu těchto látek na látky jednodušší a jejich následné určování. Vědní obor, zabývající se rozborem látek se pak nazývá analytická chemie. S postupným vývojem oboru je spojeno zdokonalování metod analýzy, které nevyžadují rozklad látek a separaci produktů. Analytická chemie se s vývojem specializuje na různé oblasti zkoumání látek, existuje např. anorganická analýza, organická analýza, ale i analýza potravin, analýza léčiv, jiný přístup představuje kvantitativní nebo kvalitativní analýza atd. Úkolem kvalitativní analýzy je určení, které chemické složky jsou v analyzovaném materiálu přítomny, kvantitativní analýza směřuje ke zjišťování jejich množství. Metody analytické chemie se dělí na chemické (klasické) a instrumentální (fyzikálně-chemické). Chemické metody jsou založeny na průběhu chemických reakcí. Instrumentální metody jsou založeny na skutečnosti, že řada fyzikálních veličin je závislá na chemickém složení analyzovaného materiálu či na obsahu stanovované složky. (Křížek, 2015)

K důkazům ale i stanovení je žádoucí zvolit takové reakce, jejichž průběh je doprovázen změnou zbarvení produktu (barevné reakce) nebo jeho skupenství (srážecí reakce). Při větším objemu vzorku, ve kterém probíhají reakce je možné mluvit o zkumavkových reakcích. Pokud je vzorku omezené množství, je vhodné pracovat s technikou, která umožňuje provést experiment na kapkovací destičce nebo na filtračním papíře. Pokud činidlo reaguje s určitou skupinou látek označuje se jako skupinové činidlo a pokud reaguje pouze s určitými látkami, označuje se jako selektivní. Specifické činidlo pak reaguje specificky pouze s jedinou látkou, i když je tato součástí směsi, která obsahuje různé další látky. Pokud se podmínky experimentu vhodně upraví, je možné mnohá selektivní činidla využít jako činidla specifická. Pro využití chemické reakce v kvalitativní analýze je důležitá tzv. citlivost reakce, která záleží na její výrazné vlastnosti, způsobu provedení a na složení reakční směsi. (Renger, 1998).

Konkrétním objektem kvalitativní analýzy v našem případě jsou bílkoviny. K důkazu bílkovin se užívá často denaturace varem, zvláště ve slabě kyselém prostředí; bílkoviny se srážejí ve formě shluků. Lze je srážet rovněž přidáním solí těžkých kovů (Hg, Cu, Ag), ale i kyseliny pikrové, wolframové, fosfowolframové, fosfomolybdenové, trichloroctové a mnohých dalších, tzv. bílkovinných srážedel. K důkazu bílkovin se využívá i barevných reakcí. Biuretová reakce slouží k důkazu peptidových vazeb v bílkovinách, kdy dojde ke změně barvy roztoku bílkovin na modrofialovou, ale i kvantitativnímu stanovení. Millonova zkouška nebo xantoproteinová reakce, založené převážně na interakci s tyrosinem, se používají k důkazu bílkovin a některých aminokyselin v bílkovinách. (Doubava, 1984). Xantoproteinová reakce pak náleží mezi univerzální metody důkazu přítomnosti bílkovin v analyzovaném vzorku. (Šubert, 1905)

1.6.2 Bezpečnost práce

Pracoviště chemické laboratoře nese poměrně vysoké riziko pro zdraví. Nedodržování bezpečnostních pravidel může vést k újmě na zdraví viníka, tak i dalších přítomných osob mimo poškození zdraví také může dojít i k materiálním škodám. Každý pracovník v chemické laboratoři by měl jednat tak, aby minimalizoval vznik nebezpečných situací. Pokud už k takové situaci dojde, podle možností je třeba co nejúčinněji zabránit jak poškození zdraví lidí, tak poškození majetku.

Při pracích s chemikáliemi je třeba používat ochranné rukavice, brýle, případně štít a dbát, aby nedošlo k potřísnění nejen pokožky, ale i dalších částí lidského těla nejen žíraviny. Pokud k tomu dojde, je nutné potřísněné místo co nejdříve ošetřit. (Kotek, 2012)

V případě nedodržení bezpečnosti práce s chemickými látkami, může dojít ke vstupu některých cizorodých látek do těla, kde začnou reagovat se sloučeninami, které jsou přirozenou součástí organismu. Tyto reakce můžeme pozorovat v některých případech i okem popřípadě jinými smysly jako jsou hmat a čich.

Podle Horáka (2004):

Neporušená lidská kůže tvoří určitou bariéru pro vstup cizorodých látek do těla. Na jejím povrchu je tenká vrstva keratinizovaných buněk, škára (stratum corneum), pod ní se nachází vrstvy živých buněk, epidermis a dermis. Kůže netvoří kompaktní celek, je protkána kanálky

potních a mazových žláz. Spodní vrstva, dermis, je prokrvena krevními vlasečnicemi. Po absorpci kůže se látka dostane do krevního oběhu a s krví pak do celého těla. Účinek látky aplikované na kůži může být buď lokální (řada látek kůži dráždí, některé leptají) anebo systémový, pokud se látka vstřebá (s. 41).

Na základě předchozích kapitol je známo, že vybrané aminokyseliny, peptidy a bílkoviny dávají s kyselinou dusičnou žluté zbarvení. Lidská kůže obsahuje tyto látky, a proto po potřísnění kyselinou dusičnou dojde taktéž k chemické reakci a ke změně barvy kůže (žluté zbarvení). Tím bude také dokázáno, že lidská kůže obsahuje tyto specifické substance. První krok při nedodržení bezpečnostních pravidel práce v laboratoři spočívá v omývání místa, zasaženého kyselinou dusičnou proudem tekoucí studené vody. Ve snaze neutralizovat účinky kyseliny dusičné alkalickým hydroxidem by se zbarvení kůže prohloubilo, ale kůže by následně mohla být zmíněným hydroxidem také poleptána.

1.7 Reakce bílkovin s kyselinou dusičnou v učivu chemie na středních školách všeobecně vzdělávacího charakteru a vysokých školách vzdělávajících budoucí učitele

Xantoproteinová reakce je uvedena v řadě učebnic a monografií jak pro vysoké, tak střední školy. V těchto publikacích se nacházejí informace o xantoproteinové reakci, její podstatě a praktickém využití. Velmi často je tato informace doplněna návodem pro realizaci experimentu, který slouží k důkazu bílkovin ve zkoumaném vzorku.

Analýza učebnic chemie pro střední školy všeobecně vzdělávacího zaměření, ale i vybrané učebnice používané ve vysokoškolské přípravě učitelů na pedagogických a přírodovědeckých fakultách by měly být důležitými zdroji informací pro uplatnění badatelské metody ve výuce chemie na gymnáziích. Z těchto důvodů byl realizován průzkum, vycházející obzvláště z vybraných učebnic chemie pro gymnázia (řada učebnic učivo o xantoproteinové reakci neobsahuje), který byl následně doplněn informacemi, získanými z některých učebnic a příruček pro pedagogické fakulty. Informační zdroje představují soubor učebnic a příruček od první poloviny minulého století po současnost.

1.7.1 Xantoproteinová reakce v publikacích určených pro budoucí učitele chemie

Buchar, E., Halbych, J., Borovička, J., *Praktická cvičení z organické chemie* (1970)

Rozbor úkolu: většina bílkovin, v nichž jsou obsaženy aminokyseliny s aromatickou složkou, zahříváním s koncentrovanou kyselinou dusičnou žloutnou – aromatická jádra aminokyselin se nitrují.

Pracovní postup:

Roztok bílku povařte ve zkumavce s koncentrovanou kyselinou dusičnou. Vločky sražené bílkoviny mají charakteristické žluté zbarvení. Kyselinu dusičnou odlijte a vločky zahřejte s přebytkem hydroxidu sodného. (Pozor na utajený var!) Pozorujte změnu zbarvení na oranžové až červené.

Poznámka. Zbarvení pokožky kyselinou dusičnou ve styku s mýdlem tmavne a přechází do oranžových odstínů.

Lipthay, T., *Praktikum z organickej chémie* (1975)

Xantoproteinová reakcia bielkovin

Do skúmavky dajte 2ml roztoku bielkoviny, napr. roztoku vajcového bielka a asi 2 ml konc. kyseliny dusičnej. Pôsobením kyseliny sa bielkovina z roztoku vylúči a opatrným zahriatím zožltne. Keď obsah skúmavky ochladíme a pridáme roztok amoniaku alebo hydroxidu sodného, jeho farba sa zmení na oranžovočervenú.

Doubrava, J., Košťiř, J., Pospíšil, J. *Základy biochemie* (1984)

Xantoproteinovou reakci poskytují aminokyseliny s aromatickým jádrem, které se nitruje, a zalkalizováním vzniká příslušná barevná sůl nitrofenolu. Tuto reakci ale nedává fenylalanin.

Reagencie² A – koncentrovaná kyselina dusičná,

B – 40% roztok hydroxidu sodného

Postup:

²Obecně chemické látky a činidla, které se používají v laboratořích pro spouštění chemických reakce

3 cm³ roztoku vzorku se smísí s 1 cm³ činidla A a vaří se tak dlouho, dokud se sraženina nebo pevný vzorek nerozpustí. K roztoku se pak přidává opatrně po kapkách činidlo B, dokud není trvale alkalický. V kladném případě se žlutý roztok zbarví sytě oranžově.

Xantoproteinová reakce na aromatické uhlovodíky se používá k důkazu bílkovin a některých aminokyselin v bílkovinách.

Zima, M., Hellberg, J.: Biochemie a praxe (1989)

Aromatické aminokyseliny (tyrosin, tryptofan) dávají výraznou reakci s kyselinou dusičnou. Jejich benzenová jádra se oxidují a nitrují za vzniku žlutých sloučenin i kyseliny pikrové. Také většina bílkovin se při zahřátí s kyselinou dusičnou barví žlutě) název odvozen od řeckého slova *xanthos* (= žlutý). Působením alkalií vzniká oranžově zbarvená sůl aci-formy nitrosloučeniny, např.:

vzorec aci-formy (viz str. 30)

Reagencie a materiál: roztok bílkoviny, konc. HNO₃, 10% roztok NaOH, roztok želatiny, zkumavka.

Provedení:

Zahřejeme 2 ml roztoku bílkoviny s 1 ml konc. HNO₃ - vznik žlutého zbarvení nebo až sraženiny. Po ochlazení roztok ve zkumavce zalkalizujeme 10% NaOH do změny barvy ze žluté na oranžovou.

Xantoproteinová reakce na aromatické uhlovodíky se používá k důkazu bílkovin a některých aminokyselin v bílkovinách.

1.7.2 Xantoproteinová reakce v učebnicích pro střední školy všeobecně vzdělávacího charakteru

Mašek, F., Němeček, H. & Křehlík, F. Chemie pro střední školy díl třetí organická chemie pro šestou třídu (1930)

Bílkoviny jsou složeny jen z pěti prvků; obsahují uhlík, vodík, kyslík, dusík a síru a pouze některé (nukleiny) i fosfor. Aby bylo možno si učiniti jakousi představu o struktuře bílkovin, byly podrobeny hydrolytickému rozkladu za katalytického účinku kyselin, zásad nebo jiných enzymů. Při tom byly získány jako konečné produkty štěpení bílkovin aminokyseliny, kteréž

nutno mít z té příčiny za stavební jednotky bílkovin. V tomto ohledu směrodatné práce vykonal Emil Fischer, který vycházel od různých aminokyselin synteticky připravil sloučeniny, které jsou blízké nejjednodušším bílkovinám a nazval je polypeptidy. Pro bílkoviny jsou význačné některé barevné reakce, z nichž důležitější je reakce xanthoproteinová a reakce biuretová.

Roztok bílkoviny se připraví, rozmíchá-li se vaječný bílek se 4 – 5 násobným množstvím vody.

Roztok bílku se zahřívá s konc. HNO_3 ; sraženina se zbarví žlutě (reakce xanthoproteinová).

Některé bílkoviny ze svých roztoků se srážejí již teplem; pravíme, že koagulují. Vaří-li se roztok bílku, sráží se (vaření vajec na tvrdo).

Koagulací mění bílkoviny svoje přirozené vlastnosti, přecházejíce ve vid nerozpustný; pravíme, že z bílkovin nativních vznikají bílkoviny denaturované.

Kout, R. Chemie organická pro VI. třídu středních škol (1935)

Bílkoviny vyznačují se taktéž některými zvláštními reakcemi, podle kterých se snadno poznávají. Tak např. se roztok bílku sráží kyselinou HNO_3 , při čemž vzniklá sraženina zvláště horkem nabývá žlutého zbarvení (*reakce xanthoproteinová*).

Kout, R., Filip, B. Chemie pro IV. třídu středních škol (1947)

Všechny látky na světě se neustále mění. Změny, kterým látky podléhají, jsou dvojího druhu:

Při jedněch mění se jen nějaká nepodstatná vlastnost látky (na př. tvar, velikost, skupenství, teplota), takže látka zůstane touž látkou i nadále. Změny tohoto druhu se nazývají změnami fyzikálními a zabývá se jimi fyzika. Změnou fyzikální jest na př. tání olova, vypařování vody, rozměňování cukru, zmagnetování železa a j.

Při druhých mění se celá podstata látek tak, že původní látky mizejí a místo nich se objevují látky nové. Změnám tohoto druhu říkáme změny chemické a věda jimi se zabýváající, je chemie (neboli lučba).

Co víte o kyselině dusičné z předešlého? Napište rovnici o její přípravě z ledku kyselinou sírovou! Pozorujte, jakou barvu má kyselina dusičná, která je již delší dobu na světle! Namočte do ní na chvíli čisté husí peří, nebo kousek vlny, hedvábí apod. a potom tyto látky vypereme vodou! Jakou mají barvu? Jaké skvrny působí kyselina dusičná na kůži? Přidejme

trochu kyseliny dusičné ke zředěnému roztoku indigokarmínu a mírně zahřejeme! Roztok se obarví nebo, není-li dostatečně zředěn, zežloutne. Toho používáme k poznávání kyseliny dusičné.

Šorm, F., ORGANICKÁ CHEMIE učebnice pro III. a IV. třídu gymnasií (1950)

Bílkoviny dávají některé typické reakce, jimiž je lze poznávat na příklad v moči. Roztok proteinu se sráží kyselinou dusičnou, při čemž se vzniklá sraženina za tepla barví žlutě.

Šorm, F., & Hellberg, J., Organická chémie pre 2. a 3. ročník stredných všeobecnovzdelávacích škôl (1966)

Bílkoviny jsou citlivé na teplo a chemická činidla. Zahříváme ve zkumavce roztok bílkoviny. Vzniká hustá sraženina. Při zahřátí vodných roztoků bílkovin v nich většinou nastávají chemické změny, které se projevují tím, že se stávají ve vodě nerozpustnými – denaturují se.

Do zkumavky nalejeme 3 ml koncentrované kyseliny dusičné a z pipety opatrně přidáme roztok bílku. Na rozhraní dvou kapalin se vytvoří žlutý prstenec.

Reakce je velmi citlivá a používá se na důkaz bílkovin například v moči.

Šorm, F., & Hellberg, J., Organická chemie pro II. a III. ročník středních všeobecně vzdělávacích škol (1967)

Chemicky mají bílkoviny amfoterní povahu podobně jako aminokyseliny. Jsou současně kyselinami i zásadami, neboť obsahují volné aminoskupiny i karboxylové skupiny. Jsou citlivé k teplu i chemickým činidlům.

Zahříváme ve zkumavce roztok bílkoviny. Vzniká hustá sraženina.

Při zahřátí vodných roztoků bílkovin se bílkoviny většinou chemicky mění, což se projevuje tím, že se stávají nerozpustnými ve vodě. Říkáme, že denaturují.

Do zkumavky nalijme 3 ml koncentrované kyseliny dusičné a přidejme opatrně z pipety roztok bílku. Na rozhraní obou kapalin se vytvoří žlutý prstenec.

Reakce je velmi citlivá a užívá se jí k důkazu bílkoviny, např. v moči. Ke změnám bílkovin dochází také účinkem koncentrovaných minerálních kyselin nebo zásad.

Čársky, J., Chemie pro 3. ročník gymnázií: učebnice (1986)

Pracovní postup:

Ve zkumavce zahříváte roztok vaječného bílku (2 cm³) s kyselinou dusičnou (1 cm³). Pozorujte vznik žlutého zbarvení. Do reakční směsi opatrně přidejte roztok amoniaku (asi 2 cm³), výsledná reakce musí být alkalická. Jak se změní zbarvení reakční směsi?

Otázky a úkoly

Vysvětlete reakci, která probíhá při působení kyseliny dusičné na bílkoviny.

Jakou strukturu mají aminokyseliny, které se zúčastňují xantoproteinové reakce?

1.7.3 Xantoproteinová reakce v časopisech

Při průzkumu literatury, která se věnuje biochemii ve vztahu k nebyly opomenuty také přírodovědné časopisy zaměřené na přírodovědné vzdělávání, které se orientují převážně na čtenáře z řad pedagogů. Jedním z objektů našeho zájmu byl časopis „Přírodní vědy ve škole“, který vycházel mezi lety 1950–1990. Přes detailní průzkum jednotlivých ročníků časopisu nebyl nalezen žádný článek, který by se zabýval xantoproteinovou reakcí. Mezi další publikace, kterým bylo třeba věnovat pozornost patří časopis „Biologie-Chemie-Zeměpis“. I přes pečlivý průzkum čísel vydaných v letech 1992–2012 nebyl nalezen žádný článek odkazující na xantoproteinovou reakci. Tento průzkum ukázal, že téma xantoproteinové reakce není běžným tématem řešeným v časopisech zaměřených na výuku chemie a přírodních věd, proto byly též shlednuty vybrané zahraniční časopisy, které by se touto problematikou mohly zabývat. S vyhledáním potřebných článků pomohla internetová platforma Web of Science, kde byly vyhledány zahraniční publikace, které by mohly poskytnout informace k této problematice. Byly zvoleny časopisy „Journal of Education“ a „Journal of Chemical Education“. V těchto časopisech nebyly nenalezeny informace, vztahující se k problematice xantoproteinové reakce ve vztahu k výuce.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je podnítit zájem studentů středních škol o bádání v oblasti chemie, přiblížit jim proces vědecké práce v laboratoři a naučit studenty přiměřeným způsobem aktivně využívat osvojené znalosti. Práce se snaží propojit teoretické znalosti s praktickými experimenty, zejména se zaměřením na biochemii. Tato bakalářská práce má na základě jednoduchých pokusů studentům poskytnout příležitost aktivně se podílet na procesu vědeckého zkoumání a rozvinout tak jejich kritické myšlení a analytické schopnosti. Žáci a studenti budou zkoumat průběh reakce kyseliny dusičné s bílkovinami prostřednictvím reakce kyseliny dusičné se základními stavebními elementy bílkovin-aminokyselinami a následně i dalšími jednoduchými sloučeninami, které souvisejí s fragmentací molekul příslušných aminokyselin. Z těchto poznatků by měli určit, která část molekuly aminokyseliny je zodpovědná za barevný průběh reakce, náležející k univerzálním testům na přítomnost bílkovin v různých typech vzorků biologických materiálů. Experiment je založen na již osvojených teoretických znalostech o typech reakcí organických sloučenin a poskytne studentům příležitost aplikovat tyto teoretické znalosti v praxi. Analýza výsledků experimentu umožní studentům identifikovat sloučeninu, u které proběhla nitrace, jejíž produkt je příčinou změny zbarvení zkoumaného vzorku. Součástí této bakalářské práce je i pracovní list pro učitele, který nabízí možnost efektivně zařadit tento experiment do výuky. V práci je kladen důraz na interaktivní přístup k výuce, který podporuje zapojení studentů prostřednictvím pracovního listu a diskusí o výsledcích experimentu s přihlédnutím k jeho cílům. Tato bakalářská práce je příspěvkem k pokusu o vytvoření inspirativního modelu výuky organické chemie a biochemie obzvláště na středních školách všeobecně vzdělávacích.

3 Praktická část

Praktická část se věnuje experimentu zaměřenému na reakci koncentrované kyseliny dusičné s vybranými bílkovinami, peptidy, aminokyselinami a produkty fragmentace aminokyselin. Pro objasnění charakteristického zbarvení produktu jsme do experimentu zařadili i modelovou řadu aminokyselin, ale i peptidů, bílkovin a dalších sloučenin, které umožňují poznávat podstatu barevné reakce.

3.1 Použité chemikálie

<i>Název chemikálie</i>	<i>Výrobce</i>	<i>Stát</i>	<i>Čistota</i>
albumin, chicken egg	Sigma-Aldrich	DE	96%
cystein	Sigma -Aldrich	DE	97%
L-serin	Millipore	USA	-
L-glutathion	Fluka	USA	97%
L-tyrosin	Glentham	UK	-
D,L-tryptofan	Glentham	UK	-
L-alanin	Millipore	USA	-
glutamová kyselina	Millipore	USA	-
fenylalanin	Millipore	USA	-
leucin	Millipore	USA	-
glycin	Millipore	USA	-
L-valin	Millipore	USA	-
L-histidin	Millipore	USA	-
kyselina dusičná	Penta	ČR	65%
hydroxid sodný	Lach-ner	ČR	97%
toluen	Penta	ČR	-
<i>p</i> -kresol	Merck	DE	-
fenol	Penta	ČR	-
benzen	Penta	ČR	-

3.2 Použitá laboratorní technika

- zkumavky
- stojan na zkumavky
- kapkovací destička porcelánová
- kapkovací destička skleněná
- hodinová sklička
- pipetka
- kádinky 100 cm³, 500 cm³
- špachtle
- tyčinka
- nálevka
- stojan
- analytické váhy
- navažovací lodička
- vodní lázeň
- elektrický vaříč

3.3 Ideový záměr realizace experimentu.

Záměrem bakalářské práce je ukázat na jednu z řady možností aplikace badatelské metody ve výuce chemie. Badatelská metoda je orientována převážně na zpřístupnění metod vědecké práce žákům a studentům základních škol a gymnázií. Tito by měli být obeznámeni s obecnými principy vědecké práce, ale zároveň s její metodikou v souvislosti s příslušnými vědními obory (humanitními, přírodovědnými apod.). V našem případě se jedná o uplatnění badatelské metody v chemii, což je spojeno např. s badatelskou činností v laboratoři s využitím příslušné laboratorní a přístrojové techniky. V této souvislosti musí být proto zohledněna skutečnost, že ve školní laboratoři většinou není možné pracovat s přístrojovou technikou z řady důvodů (např. vysoké pořizovací náklady, náročná teoretická interpretace výsledků měření aj.). Je proto nezbytné volit adekvátní prostředky, úměrné zaměření práce a dalším okolnostem.

Objektem našeho zájmu se stala známá reakce, která je používána k důkazu bílkovin, tak zvaná xantoproteinová reakce. Jak již bylo zmíněno dříve, jedná se o reakci bílkovin s konc. kyselinou dusičnou za vzniku produktu žlutého zbarvení, které následně, po přidání vodného roztoku hydroxidu sodného přechází na tmavě žluté. Reakce je do současné doby používána jako jednoduchý zkumavkový test, sloužící k důkazu přítomnosti bílkovin v analyzovaném vzorku. S touto reakcí je možné setkat se v chemické laboratoři i v jiné souvislosti-jedná se

o pořísnění pokožky konc. kyselinou dusičnou, ke kterému může dojít vzhledem k nedodržení zásad bezpečné práce v chemické laboratoři (použití osobních ochranných prostředků, např. rukavic, štítu atd.). Zasažené místo postupně nabývá žlutého zbarvení. Xantoproteinová reakce tedy souvisí s oblastí analytické chemie, ale i bezpečnosti práce v chemii.

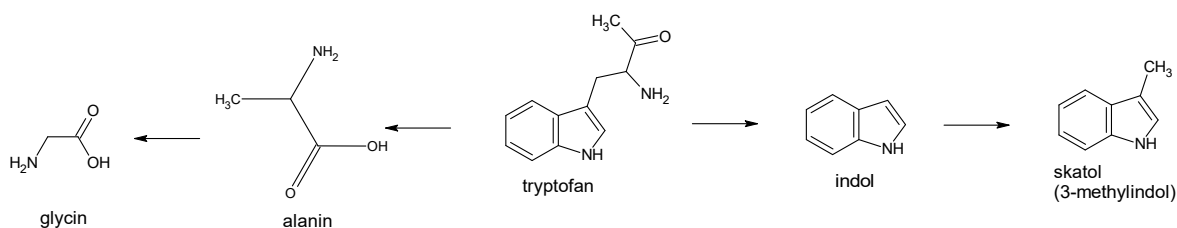
Vzhledem k výše uvedeným okolnostem byla badatelská metoda založena na formální fragmentaci molekul proteinů a aminokyselin s cílem určit:

-které aminokyseliny jsou příčinou vzniku charakteristického zbarvení při reakci bílkovin s konc. kyselinou dusičnou,

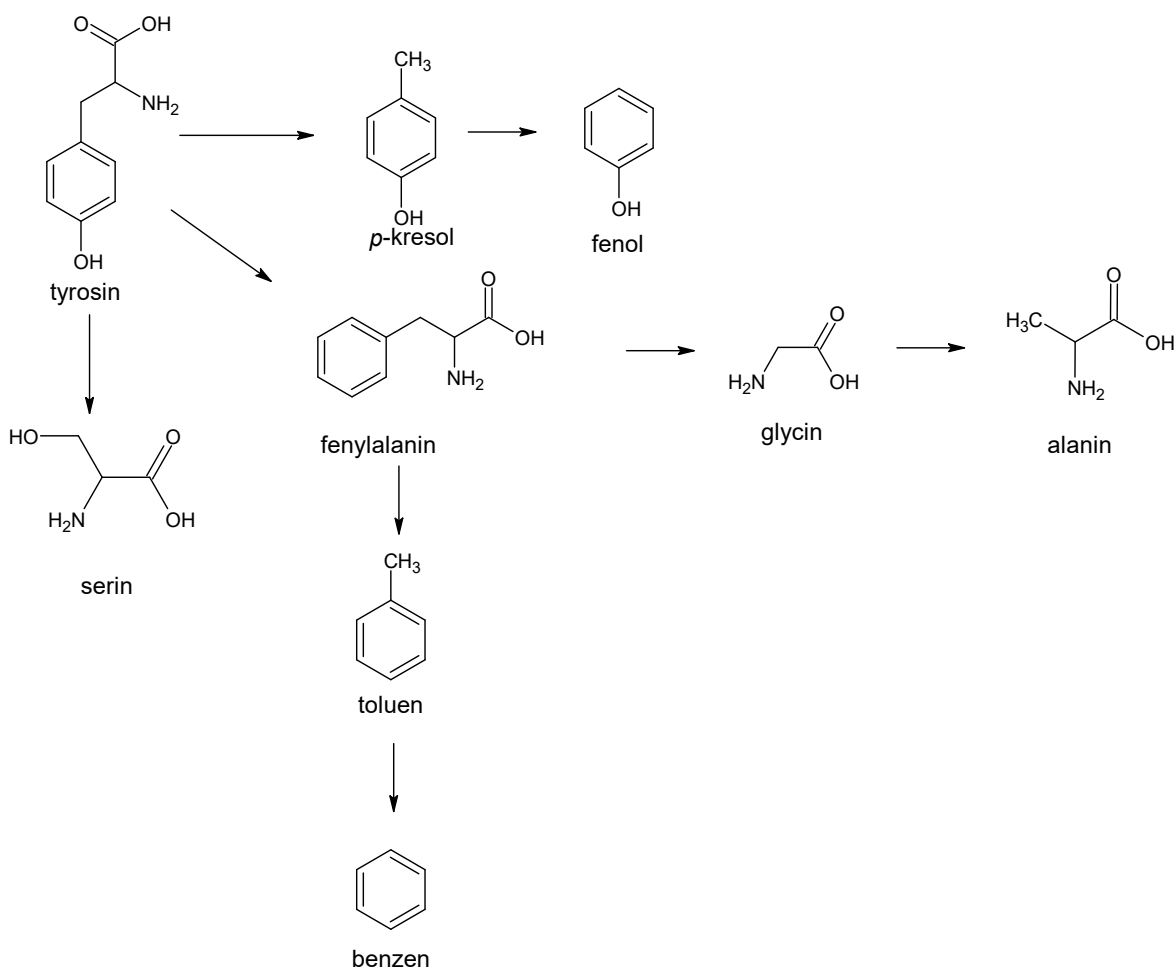
-které části molekuly aminokyselin jsou zodpovědné za barevný průběh reakce.

K uvedenému záměru bylo třeba získat co nejvíce aminokyselin, jako základních stavebních elementů bílkovin. U jednotlivých aminokyselin, které poskytovaly při reakci s koncentrovanou kyselinou dusičnou barevné produkty, byla provedena formální fragmentace molekul a k jednotlivým fragmentům byly přiřazeny reálně existující sloučeniny, které byly dále použity pro testování průběhu reakce s konc. kyselinou dusičnou.

Na základě poznatků z organické chemie byly jako nejvýznamnější standardy vytypovány aminokyseliny, obsahující aromatický a heterocyklický aromatický skelet (tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan), k nim pak byla přiřazena řada standardů, vycházejících z formální fragmentace molekul aminokyselin, jak ukazují následující schémata:



Obrázek 4 fragmentace molekuly tryptofanu



Obrázek 5 fragmentace molekuly tyrosinu

Vlastní výzkum je možné provádět ve zkumavkách nebo na skleněných, případně keramických destičkách, na kterých jsou naneseny vzorky vodných roztoků standardů, ke kterým je přidáno malé množství konc. kyseliny dusičné, následně je třeba sledovat průběh reakce a provést vyhodnocení výsledků. Výchozím vzorkem může být albumin ze slepičího vejce, jako standardů lze použít albuminu, glutathionu, glutamové kyseliny, leucinu, valinu a celé řady dalších aminokyselin. Na příkladě tyrosinu je možné ukázat na využití formální fragmentace - testování následujících sloučenin: tyrosin, 4-methylfenol (*p*-kresol), fenol, serin, fenylalanin, toluen, benzen, glycin, α -alanin (viz obr. 5). Na základě těchto pokusů je možné zjistit, která aminokyselina a která část její molekuly je zodpovědná za vznik žlutého zbarvení produktu reakce s konc. kyselinou dusičnou. Získané poznatky se mohou stát podkladem pro vytvoření pracovního listu s perspektivou jeho využití pro praktická cvičení na gymnáziu nebo ve workshopu pro zájemce z řad studentů nebo pedagogů.

3.4 Metodika realizace experimentů

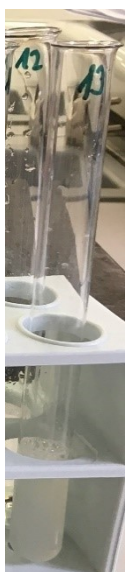
Metodika realizace experimentů byla vytvořena s ohledem na efektivní získávání nových poznatků v souladu s dodržováním zásad bezpečnosti práce při provádění pokusu. Pokud bude experiment prováděn v celém rozsahu, je třeba přihlídnout k časové i finanční náročnosti z hlediska použitých pomůcek a chemikálií. Pokus lze ve výuce realizovat jako demonstrační nebo frontální. Jako demonstrační pokus je vhodný pro střední školy, po úpravě i školy základní, frontální pokus je vhodný pro střední školy. Experiment byl zkoumán především se záměrem jeho využití na gymnáziu, protože studenti středních škol mají potřebné teoretické znalosti o stavbě aminokyselin a mohou tak lépe porozumět zkoumané problematice.

Cíle experimentu:

- 1) Seznámení žáků a studentů s xantoproteinovou reakcí ve vztahu k analýze bílkovin
- 2) Vlastní provedení experimentu
- 3) Analýza průběhu experimentu
- 4) Diskuse výsledků experimentu
- 5) Hodnocení přínosu experimentu pro žáky a studenty

Teoretická část:

Xantoproteinová reakce představuje jeden z testů pro důkaz přítomnosti bílkovin ve vzorku. Je založena na reakci konc. kyseliny dusičné se vzorky bílkovin. Tato reakce je doprovázena vznikem žlutého zbarvení, které se dále prohlubuje přidáním roztoku hydroxidu sodného. Reakce se většinou provádí ve zkumavce s malým množstvím analyzovaného vzorku. Vznik žlutého zbarvení je vnímán jako důkaz přítomnosti bílkovin.



Obrázek 6 Vaječný albumin

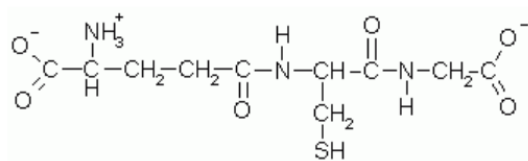


Obrázek 7 Vaječný albumin s konc. kyselinou dusičnou



Obrázek 8 Vaječný albumin s konc. kyselinou dusičnou a hydroxidem sodným

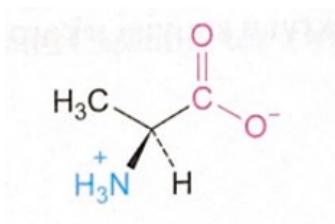
Jedná se o postup obvyklý v kvalitativní analýze, vznik barevného produktu je pro důkaz přítomnosti dané látky postačující. Otázkou však zůstává, jaká je podstata reakce, která způsobuje barevné změny reakční směsi. V této souvislosti je třeba vycházet ze struktury analyzované látky. O bílkovinách je známo, že náleží mezi biopolymery, skládající se z aminokyselin, vzájemně spojených v řetězci peptidickou vazbou (-CO-NH-). Příkladem bílkoviny může být albumin, příkladem peptidu může být glutathion, který je řazen mezi tripeptidy a skládá se z aminokyselin cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu, tyto aminokyseliny jsou spojeny mezi sebou peptidickou vazbou.



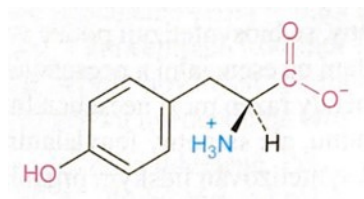
Obrázek 9 Glutathion (Kodíček, 2007)

Bílkoviny je proto možné považovat za přírodní polyamidy.

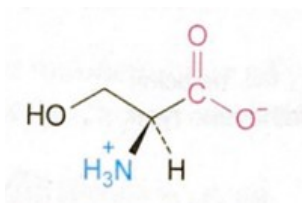
Z toho vyplývá, že zbarvení je dáno reakcí konc. kyseliny dusičné s některými aminokyselinami, obsaženými v bílkovinách a peptidech.



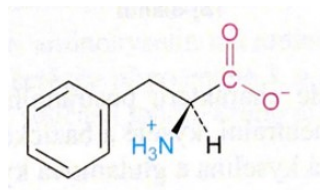
Obrázek 10 Alanin (McMurry, 2015)



Obrázek 11 Tyrosin (McMurry, 2015)



Obrázek 12 Serin (McMurry, 2015)



Obrázek 13 Fenylalanin (McMurry, 2015)

Odpověď na otázku: o které aminokyseliny se jedná, které části molekuly aminokyselin jsou za barevné reakce zodpovědné je cílem tohoto experimentu.

Experiment se provádí s přírodními vzorky bílkovin (zdroje - např. slepičí vejce, kuřecí kůže), bílkoviny (albumin aj.), peptidy (glutathion aj.) a aminokyselinami (glycin aj.). Pokud jde o bílek ze syrového slepičího vejce, je vhodné separovat vaječný albumin, jinou alternativu představuje přímé použití bílku z vařeného vejce.

Pomůcky a chemikálie:

- kapkovací destička (keramická)
- skleněná pipetka
- špachtle
- skleněná tyčinka
- univerzální pH papírky
- konc. kyselina dusičná (65%)
- 5% hydroxid sodný
- veškeré použité bílkoviny a aminokyseliny (albumin, cystein, serin, glutathion, tyrosin, tryptofan, alanin, glutamová kyselina, fenylalanin, leucin, glycin, valin, histidin)
- další možné vzorky - kůže (vepřová, kuřecí), vařené vejce

Instrukce před zahájením experimentu:

Na začátku je zapotřebí žákům a studentům vysvětlit co je xantoproteinová reakce a které látky spolu budou reagovat. Jako frontální pokus je vhodný pro studenty, kteří již absolvovali výuku tématu - bílkoviny, které je součástí učiva organické chemie.

Studentům bude předán vzorek bílkoviny (vaječného albuminu) a minimálně tři různé aminokyseliny, jejichž prostřednictvím budou pozorovat strukturní změny, v některých případech doprovázené barevnými změnami. Je zapotřebí, aby alespoň jedna aminokyselina podléhala reakci s konc. kyselinou dusičnou, která je doprovázena barevnou změnou.

Při provádění frontálního pokusu je zapotřebí používat předepsané ochranné pomůcky a dodržovat základní pravidla bezpečné práce v laboratoři, protože se v rámci experimentu pracuje s koncentrovanou kyselinou dusičnou, která může způsobit vážné zdravotní komplikace.

Pracovní postup:

- 1) Fixem popíšte kapkovací destičku a označte místo pro nanesení konkrétního vzorku.
- 2) Špachtlí naneste do označené jamky malé množství aminokyselin, peptidů a bílkovin (postačí nabrat látku na špičku špachtle).
- 3) Ke každému vzorku přidejte pipetkou 1 – 2 kapky vody a směs opatrně promíchejte skleněnou tyčinkou.
- 4) Ke každému vzorku přidejte pipetkou 1- 2 kapky konc. kyseliny dusičné a směs opět opatrně promíchejte.
- 5) Směs ponechte stát, po určité době začnou některé vzorky měnit barvu do žlutého až světle hnědého odstínu.
- 6) Následně ke vzorkům pipetkou přidejte po kapkách 5% vodný roztok hydroxidu sodného.
- 7) pH papírkem můžete kontrolovat změnu prostředí z kyselého na zásadité, v některých případech dochází k dalším změnám zbarvení vzorku.
- 8) Pokus proveďte též s využitím přírodních materiálů, konc.kyselinu dusičnou naneste např. na vzorek kuřecí kůže nebo vzorek bílku uvařeného slepičího vejce.

3.5 Metodika hodnocení experimentu

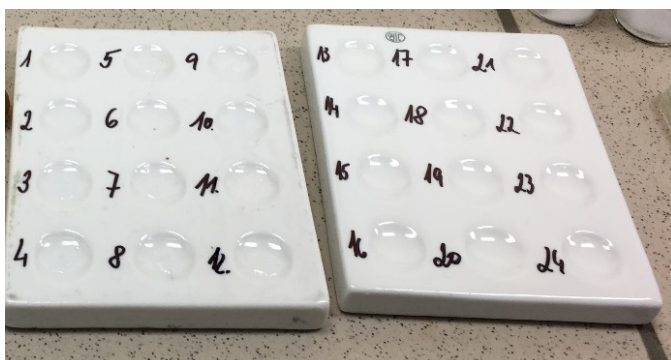
- 1) Žáci nejprve vyhodnotí, k jakým změnám ve vzorcích došlo oproti původnímu stavu, popíší změnu barvy ve vztahu k možné změně struktury látek u každého vzorku.
- 2) V případě experimentu s biologickým materiálem, mohou žáci posoudit způsobilost testu pro kvalitativní analýzu různých typů vzorků přírodních materiálů.
- 3) Pokud se jedná o testy provedené na kuřecí či vepřové kůži, tyto mohou ukázat na podstatu změny zbarvení lidské kůže při potřísnění konc. kyselinou dusičnou.
- 4) Výsledky všech testů ukazují na význam této reakce ke vztahu ke kvalitativní analýze přírodních látek nebo k problematice bezpečnosti práce v chemické laboratoři.
- 5) Na základě získaných znalostí o podstatě xantoproteinové reakce by měli být studenti schopni vypracovat závěr pracovního listu (Příloha č. 1)

4 Výsledky a diskuse.

Pro zkoumání podstaty xantoproteinové reakce, jak bylo předesláno již dříve, byla adekvátně možností navržena metoda postupné fragmentace molekuly proteinu. V první etapě se jednalo o štěpení bílkovinné molekuly na jednotlivé aminokyseliny. V druhé fázi pak následovala fragmentace molekul jednotlivých aminokyselin. Dílčím fragmentům pak byly přiřazeny reálně existující sloučeniny. Jednotlivé aminokyseliny a sloučeniny, odpovídající fragmentům byly následně podrobeny testu s konc. kyselinou dusičnou. Veškeré testy byly prováděny na kapkovací destičce, na hodinových sklíčkách, případně formou zkumavkových reakcí. Modelovou řadu aminokyselin, peptidů a bílkovin tvořily následující sloučeniny:

- 1) glycin
- 2) alanin
- 3) valin
- 4) leucin
- 5) glutamová kyselina
- 6) serin
- 7) cystein
- 8) fenylalanin
- 9) tyrosin
- 10) histidin
- 11) tryptofan
- 12) glutathion
- 13) albumin

Nejdříve byly provedeny orientační zkoušky na kapkovací destičce ohledně reaktivity vybraných aminokyselin, včetně optimalizace množství použité aminokyseliny a konc. kyseliny dusičné (obr.14, obr. 15, obr. 16).



Obrázek 14 Kapkovací destička se vzorky vodných roztoků aminokyselin



Obrázek 15 Vzorky vodných roztoků aminokyselin po přidání konc. kyseliny dusičné v poměru 1 : 1 roztok aminokyseliny : konc. kyselina dusičná



Obrázek 16 Reakce aminokyselin s konc. kyselinou dusičnou v poměru 1 : 2 aminokyselina : konc. kyselina dusičná

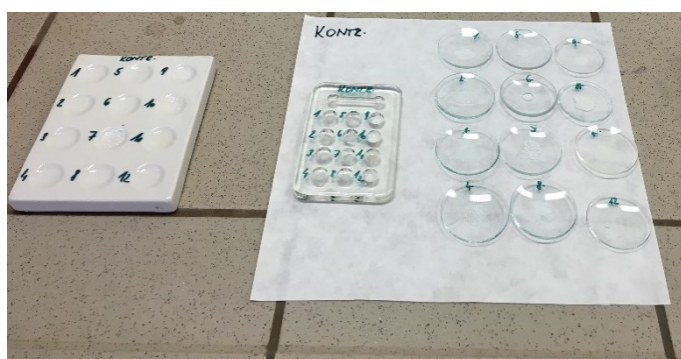
Zvýšením koncentrace kyseliny dusičné se zbarvení stalo intenzivnějším (obr. 3). Žlutým zbarvením se vyznačovaly vzorky č. 9 (tyrosin), č.11(tryptofan) a č. 13 (albumin).

Dalším činidlem, které bylo použito k testování vzorků byl 5% roztok hydroxidu sodného, jehož použití bylo spojeno s dalším prohloubením intenzity zbarvení vzorku, obzvláště č. 9. (tyrosin) (obr. 4).



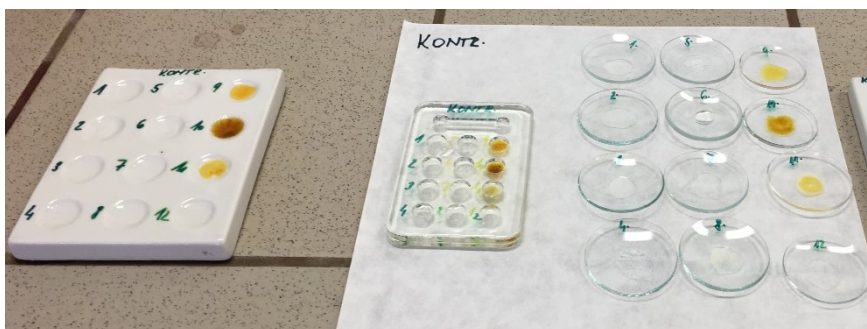
Obrázek 17 Vzorky aminokyselin po přidání 5% roztoku hydroxidu sodného

Reakce byly dále testovány na skleněné kapkovací destičce a hodinovém sklíčku za účelem další optimalizace experimentu



Obrázek 18 Podklady pro provádění experimentu - volba způsobu realizace pokusu

Pokud jde o jednotlivé postupy, optimální bylo použití bílé keramické kapkovací destičky, následovala práce se skleněnými hodinovými sklíčky, jako nejméně vhodná z hlediska posouzení barevného odstínu se ukázala být skleněná kapkovací destička, což názorně dokládá obr. 9 (vzorky č. 9, 10 a 11 - tyrosin, tryptofan a albumin). Pokud ale není k dispozici keramická destička, testy je možné uskutečnit i na výše popsaných alternativách, je nutné však reakce pozorovat na bílém podkladu, jako vhodný se jeví filtrační papír.



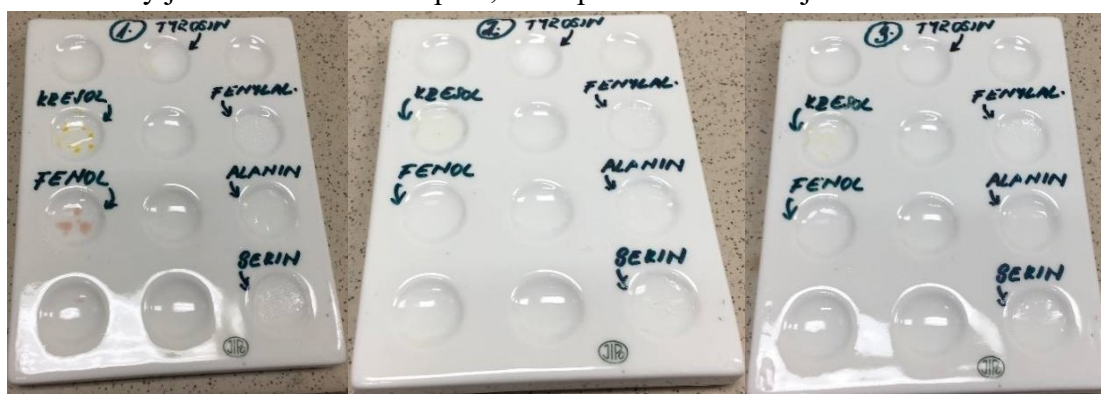
Obrázek 19 Výsledky jednotlivých alternativ provedení experimentu

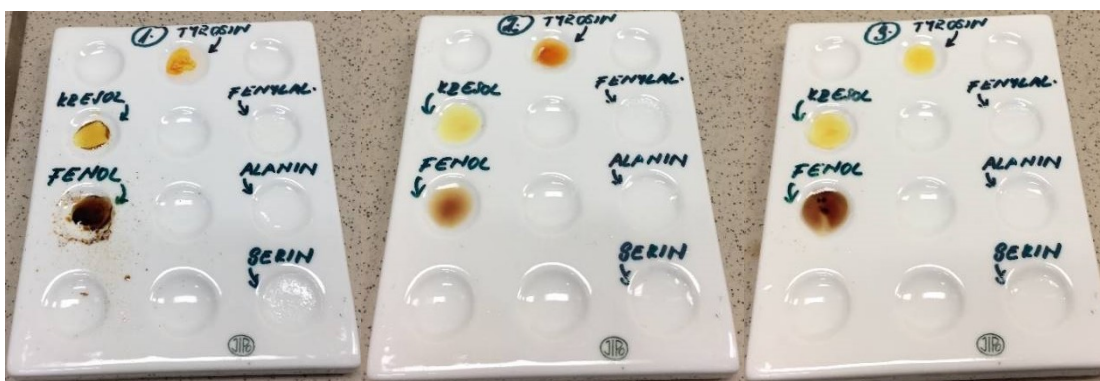
V experimentech se pokračovalo s mírně upraveným pořadím aminokyselin, oproti původní sestavě neobsahovala modelová řada aminokyselinu cystein.

Jednotlivé pokusy byly třikrát zopakovány, tímto byla potvrzena dobrá reprodukovatelnost experimentu.

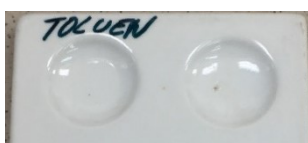
Barevné produkty vznikají za daných podmínek u tyrosinu, tryptofanu a albuminu. Zbarvení albuminu je způsobeno přítomností tyrosinu a tryptofanu v molekule. U tyrosinu dochází k nitraci do polohy *ortho*- vůči hydroxylové skupině, což souvisí s reakcí konc. kyseliny dusičné s fenolem do polohy *ortho*- a *para*- a *p*-kresolem do polohy *ortho*- vůči hydroxylové skupině.

Aby se pomocí pokusů podařilo objasnit, se kterou složkou struktury aminokyseliny kyselina dusičná reaguje, byly vytvořeny různé modelové řady, založené na fragmentaci výchozí molekuly. Tyto modelové řady byly následně testovány s koncentrovanou kyselinou dusičnou a byla sledována reaktivita jednotlivých látek. S koncentrovanou kyselinou dusičnou reagovali sloučeniny *p*-kresol a fenol. Fenol reagoval velmi intenzivně. Zbarvení produktů nitrace fenolu, které jsou žluté je poněkud ovlivněno pryskyřicemi, vznikajícími za těchto podmínek (hnědé skvrny). Sloučeniny *p*-kresol a fenol obsahují aromatický skelet na který je navázána -OH skupina, která pozitivně ovlivňuje reaktivitu těchto sloučenin.





Obrázek 20 fragmentace molekuly tyrosinu



Obrázek 21 vzorek toluenu

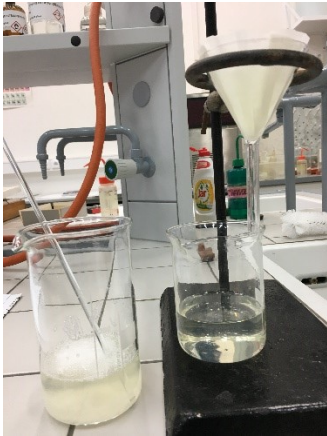


Obrázek 22 vzorek toluenu po přidání konc. kyseliny dusičné

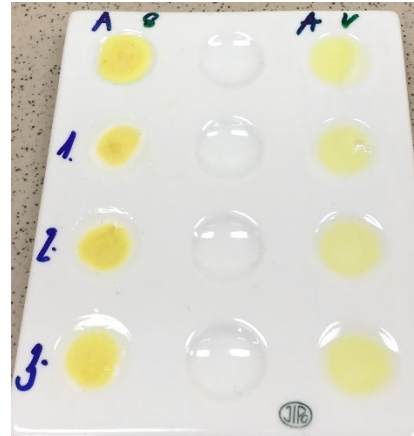
Naopak s koncentrovanou kyselinou dusičnou za daných podmínek nereagovali sloučeniny fenylalanin, alanin, serin a toluen.

Na závěr série pokusů bylo provedeno několik experimentů s biologickými vzorky. Mezi biologické vzorky byly zařazeny slepičí vejce a vepřová kůže, která souvisí s původní myšlenkou zežloutnutí kůže při potřísnění kyselinou dusičnou. Se slepičím vejcem byly vyzkoušeny dvě varianty tohoto experimentu. Byl oddělen žloutek od bílku. K bílku bylo přidáno 200 cm³ destilované vody.

Vaječný bílek se skládá z globulinu, který je ve vodě nerozpustný a albuminu, který je ve vodě rozpustný. Zředěním bílku destilovanou vodou a mícháním došlo k oddělení vaječného albuminu a globulinu v roztoku. Následné oddělení těchto dvou složek je možné pomocí filtrace. Na kapkovací destičce byly nanесeny dva vzorky albuminu. Standard, (na kapkovací destičce označeno AS = Albumin standard) je průmyslově získaný albumin, který má vyšší koncentraci. To vede k tomu, že zbarvení je výraznější než zbarvení námi připraveného vzorku AV (Albumin vzorek). AS byl špachtlí přenesen do jamek v prvním sloupečku a do každé jamky byly přidány 1-2 kapky destilované vody. AV je námi připravený vodný roztok, proto není potřeba jej dále ředit, stačí pouze pipetkou přenést do jamek.

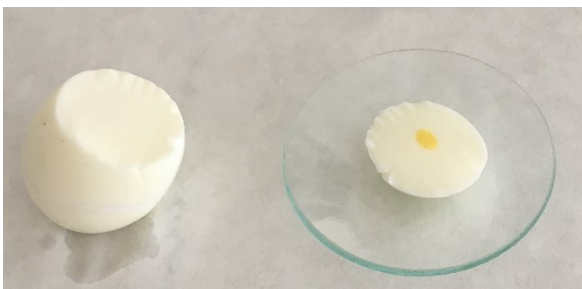


Obrázek 23 filtrace vaječného bílku



Obrázek 24 reakce AS a AV s koncentrovanou kyselinou dusičnou

Druhá varianta experimentu byla provedena s vařeným vejcem. Vejce bylo rozříznuto a na bílek byla nanесena koncentrovaná kyselina dusičná a byl pozorován průběh reakce. Vaječný bílek reagoval i ve formě denaturované varem. Tímto pokusem bylo dokázáno, že nezáleží na struktuře bílkovin pro pozitivní průběh xantoproteinové reakce.



Obrázek 25 reakce vařeného bílku s koncentrovanou kyselinou dusičnou

Poslední verze pokusu koncentrované kyseliny dusičné s bílkovinami byl proveden na syrové vepřové kůži. Na syrovou vepřovou kůži byla pipetkou nanесena koncentrovaná kyselina dusičná a byla sledována změna zbarvení. Reakce proběhla úspěšně a byla tak potvrzena přítomnost molekul tyrosinu nebo tryptofanu ve vepřové kůži.



Obrázek 26 Vepřová kůže po nanesení koncentrované kyseliny dusičné

Pozitivní test s konc. kyselinou dusičnou byl zaznamenán také u tryptofanu. Na základě fragmentace bylo třeba provést testy s koncentrovanou kyselinou dusičnou u indolu, skatolu, glycinu a alaninu. Pokusy s glycinem a alaninem byly negativní. Indol a skatol jako standardy nebyly k dispozici. Skatol je nepříjemně zapáchající látkou a tedy nepříliš vhodnou pro zamýšlené testy. Z experimentů je patrné, že heterocyklický skelet je tou částí molekuly, která je příčinou vzniku barevného produktu působením konc. kyseliny dusičné v důsledku nitrace do různých poloh v molekule indolu. (Bregere, 2008, Uriel, 2011)

Závěr

V rámci bakalářské práce byla aplikována badatelská metoda k objasnění průběhu reakce kyseliny dusičné s bílkovinami na základě reakce kyseliny dusičné s konkrétními aminokyselinami a sloučeninami, které byly odvozeny od produktů fragmentace jednotlivých aminokyselin a poskytují reakcí s konc. kyselinou dusičnou barevné produkty. Bakalářská práce byla motivována tvorbou návrhu školního výukového experimentu, prostřednictvím kterého je možné pomocí jednoduchých reakcí objasnit chemickou podstatu testu na přítomnost bílkovin. Díky sledu těchto reakcí se podařilo prokázat podstatu barevných reakcí jako tvorbu produktů nitrace benzenového skeletu v tyrosinu a indolového skeletu v tryptofanu. V rámci této bakalářské práce byla zpracována metodika pro pedagogy středních škol, kteří mají možnost tento pokus zařadit do výuky tím spíše, že do mnoha učebnic pro střední školy všeobecně vzdělávacího charakteru je xantoproteinová reakce zařazena. V budoucnu by bylo vhodné tuto problematiku rozšířit o testování aplikace badatelské metody na středních všeobecně vzdělávacích školách. Závěrem lze konstatovat, že experiment je možné ve školních podmínkách upravit do různých podob v rámci standardní výuky, workshopu pro zájemce z řad studentů nebo pedagogů.

Seznam použitých informačních zdrojů

Aida, K., Musya, Y., & Kinumaki, S. Infrared Spectra and the Structure of Copper Biuret Complexes. *Inorganic Chemistry*, 1963, 1268-1269.

Basnet, A.: Biuret test: Principle, Reaction, Reagents, Procedure and Result, Interpretation, Online Biochemistry Notes, 2020, <https://biocheminfo.com/2020/04/01/biuret-test/>.

Basnet, A.: Xantoproteic test: Principle, Reaction, Reagents, Procedure and Result, Interpretation, Online Biochemistry Notes, 2020, <https://biocheminfo.com/2020/04/04/xanthoproteic-test-principle-reaction-reagents-procedure-and-results-interpretation/>.

Bregere, C., Rebrin, I., Sohal, R., S.: Detection and Characterisation of *In Vivo* Nitration and Oxidation of Tryptophan Residues in Proteins, *Methods in Enzymology*, 441, 339-349 (2008).

Buchar, E., Halbych, J., & Borovička, J. (1970). *Praktická cvičení z organické chemie* (2. přeprac. a dopl. vydání). Státní pedagogické nakladatelství.

Burgerová, J. (2020). *Projektová výuka a didaktické hry v hodinách přírodopisu na druhém stupni základní školy* [Závěrečná práce]. Univerzita Pardubice, Filozofická fakulta.

Čársky, J. (1986). *Chemie pro 3. ročník gymnázií: učebnice* (2., čes. vyd). Státní pedagogické nakladatelství.

Češková, T., & Knecht, P. (2016). Analýza problémově orientovaných výukových situací ve výuce přírodovědy. *Orbis scholae*, 2016(10), 93 - 115.

Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M. (1980). *Organická chemie*, SNTL/ALFA, Praha/Bratislava.

Červinka, O. a kol. (1987). *Chemie organických sloučenin* (2), SNTL/ALFA, Praha/Bratislava.

Červinka, O. a kol. (1981). *Mechanismy organických reakcí*, SNTL/ALFA, Praha/Bratislava

Dostál, J. (2015). *Badatelsky orientovaná výuka: pojetí, podstata, význam a přínosy*. Univerzita Palackého v Olomouci.

- Doubrava, J., Košťiř, J., & Pospíšil, J. (1984). *Základy biochemie*. Státní pedagogické nakladatelství.
- Horák, J., Linhart, I., & Klusoň, P. (2004). *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Karásková, N., Myška, K., & Kolář, K. (2015). Jednoduché experimenty s makrocyclickými sloučeninami (2). *Biologie-Chemie-Zeměpis*, 24, 236 – 238.
- Karki, G. Xantoproteic test: Objective, Principle, Reagents, Procedure and Result, Online Biology Notes 2018, <https://www.onlinebiologynotes.com/xanthoproteic.com/xanthoproteic-test-objective-principle-reagents-procedure-and-result/>.
- Karlson, P. (1981). *Základy biochemie*, Academia, Praha.
- Kodíček, M. (2007). *Biochemické pojmy: výkladový slovník : elektronická interaktivní verze* (Verze 2.0, 2007). Vydavatelství VŠCHT.
- Kotek, J. (2012) *Laboratorní technika, učební texty*. Univerzita Karlova v Praze.
- Kout, R. (1935). *Chemie pro IV. třídu* (4. vyd., přepracované).
- Kout, R., Filip, B. (Ed.). (1947). *Chemie pro IV. třídu středních škol* (5., přeprac.). R. Promberger.
- Kováč, J., Kováč, Š. (1977). *Organická chémie*, Alfa, Bratislava.
- Křížek, M., & Šíma, J. (2015). *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Lhoták, P., Stibor, I. (1997). *Molekulární design*, VŠCHT, Praha, ISBN 80-7080-295-2.
- Lipthay, T. (1975). *Praktikum z organické chémie*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo Bratislava.
- Macholán, L., Dadák, V., & Pechan, Z. (1967). *Laboratorní cvičení z biochemie*. Universita J. E. Purkyně v Brně.
- Mašek, Němeček, & Křehlík. (1930). *Chemie pro střední školy díl třetí organická chemie pro šestou třídu* (4., přeprac.). Česká grafická unie.

- McMurry, J. (2015). *Organická chemie*. VUT/VŠCHT, Brno/Praha.
- Nuriel, T., Hansler, A., & Gross, S., S.: Protein Nitrotryptophan: Formation, Significance and Identification, *Journal of Proteomics*, 74 (11) 2300 - 2312 (2011).
- Pacák, J. (1990). *Chemie pro 2. ročník gymnázií: učebnice* (2. vyd). Státní pedagogické nakladatelství.
- Průcha, J., Walterová, E., & Mareš, J. (2001). *Pedagogický slovník* (3. vyd.). Portál, s.r.o.
- Renger, F., & Kalous, J. (1998). *Analytická chemie I* (Vyd. 3. nezm). Univerzita Pardubice.
- Rocard, M., Cesrmley, P., Jorde, D., Lenzen, D., Walberg-Herniksson, H., & Hemmo, V. (2007). *Science education NOW: A Renewed Pedagogy for the Future of Europe..*
- Sommerová, M. (2009). *Kooperativní vyučování a jeho využití na I. stupni ZŠ* [Diplomová práce]. Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra pedagogiky.
- Šorm, F. (1950). *Organická chemie pro III. a IV. třídu gymnasií*. Státní pedagogické nakladatelství.
- Šorm, F., & Hellberg, J. (1966). *Organická chémie pre 2. a 3. ročník stredných všeobecnovzdelávacích škôl* (2.nd ed.). Státní pedagogické nakladatelství.
- Šorm, F., & Hellberg, J (1967). *Organická chemie pro II. a III. ročník středních všeobecně vzdělávacích škol*. Státní pedagogické nakladatelství.
- Špidlenová, V. (2019). *Badatelsky orientované experimentální činnosti ve výuce chemie na gymnáziu* [Bakalářská práce]. Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie.
- Šubert, F.A. (1905) *Malý Ottův slovník naučný*. J.Otto, spol. s.r.o. v Praze.
- Taguchi, K. Transient binding of phenolphthalein-.beta-cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion. *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 2705–2709.
- Vejražka, M., Pláteník, J., & Fialová, L., (2021/2022). *Bílkoviny, Praktická cvičení z lékařské biochemie*. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice.

Vodrážka, Z., & Krechl, J. (1991). *Bioorganická chemie*. SNTL.

Wahdania, A., Porodjia, F., & Nurkamiden, S.: Protein Test with Chemical Solution in Identifying Nutrien Content in Food Material, *Journal of Health, Technology and Science*, Vol.2, No. 4, 22-30 (2021).

Zdražil, J. (2013). *Výukové aplikace modelů složitých biochemických procesů* [Disertační práce]. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

Zdražil, J., Myška, K., & Kolář, K. (2012). Modely biuretové reakce. *Biologie-Chemie-Zeměpis. Biologie-Chemie-Zeměpis*, 21, 80 - 82.

Zima, M. (1989). *Biochemie a praxe: Úvod do praktické biochemie : Pro posluchače pedagog.fak.* Pedagogická fakulta.

Seznam příloh

Příloha 1

Přílohy

Příloha 1– Ukázka metodického listu

Téma: Xantoproteinová reakce a její podstata

Úkol:

Navrhněte způsob zkoumání podstaty xantoproteinové reakce na základě fragmentace molekuly proteinu.

Teoretická část:

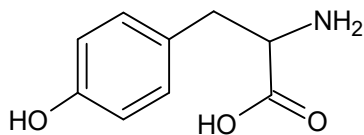
Xantoproteinová reakce je reakce proteinů – bílkovin s konc. kyselinou dusičnou. Při reakci vzniká žlutý produkt, který po následném přidání roztoku hydroxidu sodného přechází na tmavě žlutý. Tato reakce náleží v biochemii k jednoduchým zkumavkovým testům na přítomnost bílkovin v analyzovaném vzorku. Jaká je podstata této reakce, to může být zodpovězeno na základě zkoumání struktury molekuly proteinů. Bílkoviny jsou přírodní látky, které náleží mezi biopolymery. Bílkovinný řetězec je tvořen různými aminokyselinami, které jsou vzájemně spojeny peptidickou (amidovou) vazbou, jedná se tedy o přírodní polyamidy. K objasnění xantoproteinové reakce je použito fragmentace molekuly proteinu na aminokyseliny a následné fragmentace molekuly aminokyseliny a přiřazení konkrétních sloučenin jednotlivým fragmentům.

Základem výzkumu je pak testování aminokyselin a sloučenin odvozených od fragmentů aminokyselin. Je tedy provedena reakce

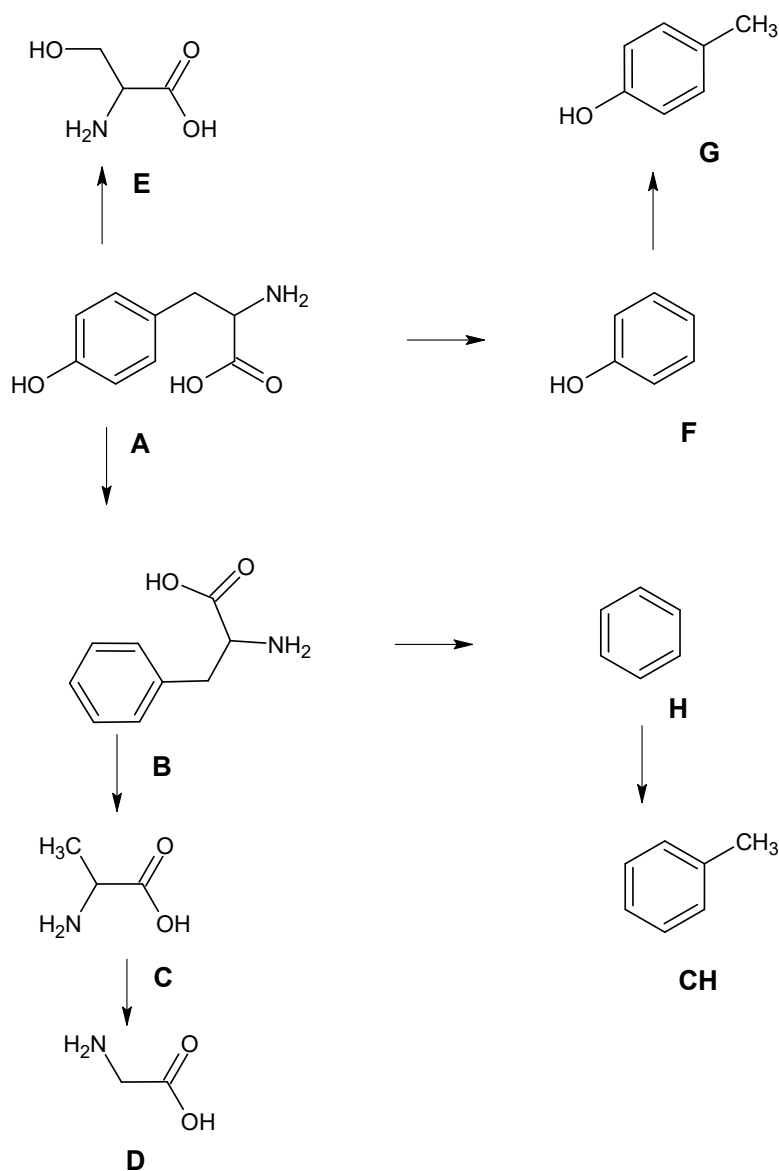
- 1) Bílkoviny s konc. kyselinou dusičnou
- 2) Aminokyseliny s konc. kyselinou dusičnou
- 3) Sloučenin odvozených od fragmentů aminokyselin s konc. kyselinou dusičnou

Je nezbytné provést fragmentaci molekuly tyrosinu a přiřadit jednotlivým fragmentům příslušné sloučeniny. Na závěr se provede reakce těchto sloučenin s konc. kyselinou dusičnou

Tyrosin



Fragmentace molekuly tyrosinu a přiřazení sloučenin jednotlivým fragmentům



Pomůcky a chemikálie:

Porcelánová kapkovací destička, koncentrovaná kyselina dusičná, 5% roztok hydroxidu sodného, tyrosin, glycin, alanin, serin, fenylalanin, 4-metylfenol, fenol, toluen, benzen, peptidy (glutathion) a bílkoviny (albumin), univerzální pH papírek, špachtle, skleněná pipetka, skleněná tyčinka

Postup:

- 1) Do jamek kapkovací destičky připravte vodné roztoky albuminu, glutathionu, tyrosnu, glycinu, alaninu, serinu, fenylalaninu, fenolu a 4-metylfenolu špachtlí naneste do označené jamky malé množství aminokyselin, peptidů a bílkovin (postačí

množství na špičku špachtle), ke každému vzorku přidejte pipetkou 1 – 2 kapky vody a směs opatrně promíchejte tyčinkou.

- 2) Do druhé keramické destičky předložte několik kapek toluenu a benzenu (test s toluenem a benzenem se z důvodu bezpečnosti práce provádí za účasti vyučujícího)
- 3) Ke vzorkům postupně přidávejte 1-2 kapky konc. kyseliny dusičné, obsah jamek promíchejte, pozorujte vznik zbarvení.
- 4) Do jamek s barevným produktem přidejte několik kapek 5% vodného roztoku hydroxidu sodného a pozorujte změnu zbarvení (pH papírkem sledujte, zda reakční směs je alkalická).

Závěr:

Vyhodnoťte průběh dílčích testů, provedených v rámci experimentu a určete, které části molekuly tyrosinu jsou odpovědné za barevný průběh reakce s konc. kyselinou dusičnou.

Sloučenina	Vznik barevného produktu	
A – tyrosin	ANO	NE
B – fenylalanin	ANO	NE
C – alanin	ANO	NE
D – glycin	ANO	NE
E – serin	ANO	NE
F – feol	ANO	NE
G – 4-metylfenol	ANO	NE
H – benzen	ANO	NE
CH – toluen	ANO	NE
glutathion	ANO	NE
albumin	ANO	NE

- 1) Pokuste se objasnit chemickou podstatu pozitivního i negativního průběhu testu u jednotlivých sloučenin.
- 2) Určete, které části molekuly tyrosinu mohou být zodpovědné za barevný průběh reakce s konc. kyselinou dusičnou a své tvrzení se pokuste zdůvodnit.
- 3) Jaká je dle vašeho názoru příčina zintenzivnění žlutého zbarvení vzorků po přidání roztoku hydroxidu sodného.
- 4) Popište a zdůvodněte výsledky testu s albuminem a glutathionem .
- 5) Vysvětlete, proč za definovaných podmínek s konc. kyselinou dusičnou reaguje tyrosin a u fenylalaninu barevná reakce neprobíhá.