

Instrukcja do ćwiczenia 4

Węglowodany : BADANIE SKŁADU POLISACHARYDÓW

ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- Budowa, podział, występowanie i własności: monosacharydów, pochodnych monocukrów: estry fosforanowe i siarczanowe, aminocukry, kwasy uronowe, alditole (sorbitol, mannitol, galaktitol), disacharydów, polisacharydów z glikoaminoglikanami
- Różnice w składzie między homoglikanami i heteroglikanami.

1. Porównanie własności fizykochemicznych monosacharydów i polisacharydów

Polisacharydy są polimerami monosacharydów połączonych ze sobą wiązaniami glikozydowymi, których masa cząsteczkowa waha się w granicach od kilku tysięcy do kilku milionów. Właściwości polisacharydów zależą nie tylko od rodzaju monocukrów je budujących, ale również od rodzaju wiązań glikozydowych wiążących monosacharydy, zarówno pod względem pozycji i anomerii. Ze względu na budowę chemiczną polisacharydy różnicuje się na homoglikany (jednoskładnikowe) i heteroglikany (wieloskładnikowe). Homoglikanami są: glikogen, skrobia i celuloza, mają one odmienne właściwości fiz-chem od monosacharydów je tworzących, czyli glukozy.

1.1. Rozpuszczalność glukozy i skrobi

Zasada: Glukoza i inne heksozy oraz disacharydy, jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, ma właściwości osmotycznie czynne, proporcjonalne do jej stężenia w roztworze. Glukoza jest najważniejszym cukrem krwi, tą drogą dostarczana jest do komórek różnych tkanek, gdzie jest głównym lub jedynym źródłem energii. W organizmie człowieka glukoza jest bezpośrednio wykorzystywana w metabolizmie, dlatego ma zastosowanie w leczeniu jako środek wzmacniający, w odróżnieniu od fruktozy lub sacharozy, której glukoza jest składnikiem. Skrobia zazwyczaj jest trudno rozpuszczalna w wodzie, z wyjątkiem rozpuszczalnej i w wodzie tworzy roztwory koloidalne. W zimnej wodzie ziarnista struktura skrobi pęcznieje, cząsteczki wody wiążą się z wolnymi grupami -OH reszt glukozy za pomocą wiązań wodorowych, a w wyższej temp. (55-68°C) skrobia traci strukturę ziarnistą, tworząc lepki kleik. Skrobia stanowi ponad połowę węglowodanów spożywanych przez człowieka, głównie znajduje się w produktach mącznych, kaszach, nasionach grochu, fasoli i bulwach ziemniaków. Celuloza znajduje się w błonniku – składniku żywności roślinnej, nie jest trawiona przez enzymy przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt wyższych, dlatego nie jest wykorzystywana jako źródło energii. Celuloza jest jednak niezbędnym składnikiem pokarmowym, ponieważ pełni rolę wypełniacza jelit, który nasila perystaltykę jelit i ułatwia wypróżnianie. Błonnik pokarmowy wiąże kwasy żółciowe zwiększając ich wydalanie z kałem. W badaniach epidemiologicznych wykazano odwrotną korelację wysokiego spożycia błonnika z występowaniem raka jelita grubego i chorób sercowo-naczyniowych.

Wykonanie:

2 probówki w statywie opisz nr od 1 do 2 i wprowadź do nich kolejno składniki wg instrukcji w tabeli 1:

Numer probówki	1	2
Glukoza <i>in subst</i>	300 mg	-
Skrobia <i>in subst</i>	-	300 mg
H ₂ O zimna	3 ml	3 ml
Próby wymieszać, obejrzyć, ocenić i porównać rozpuszczalność. Zinterpretuj wyniki		
Dalsze postępowanie z próbami	Pozostaw do ćw. 1.2. i 1.3	We wrzącej łaźni ogrzewaj do opalizującego, jednolitego, roztworu. Zostaw do ćw. 1.2 i 1.3

1.2. Własności redukcyjne glukozy i skrobi – Odczyn Benedicta

Zasada: W roztworach zasadowych lub silnie kwaśnych cukry są obecne przede wszystkim w formach łańcuchowych, dzięki temu mają wolne grupy aldehydowe lub ketonowe i mogą zachowywać się jak typowe aldehydy i ketony, wykazując własności redukujące. Własności redukujące są wykorzystywane do wykrywania oraz ilościowego oznaczania cukrów redukujących. Skrobia praktycznie nie wykazuje własności redukcyjnych z powodu niewielkiej ilości grup redukujących w porównaniu z liczbą monosacharydów wchodzących w skład tego homoglikanu. Odczyn Benedicta należy do najbardziej swoistych i czułych prób redukcyjnych na cukry. Odczynnik Benedicta zawiera CuSO₄, Na₂CO₃ i cytrynian trisodowy. Węglan sodu alkalizuje środowisko, cytrynian zapobiega wytrącaniu się osadu Cu(OH)₂ a kationy Cu²⁺ pochodzące z CuSO₄ ulegają redukcji do Cu⁺ pod wpływem cukru redukującego, który jest w roztworze.

Wykonanie:

3 probówki w statywie opisz nr od 1 do 3 i wprowadź do nich kolejno składniki wg instrukcji w tabeli 2:

Numer probówki	1	2
Odczynnik Benedicta	1ml	1ml
Roztwór glukozy z ćw. 1.1	150µl	-
Kleik skrobiowy z ćw. 1.1	-	150µl
Przesącz - z ćw.1.1	-	-
Próby wymieszaj i wstaw do wrzącej łaźni wodnej na 3 min, po czym schłodź pod bieżącą wodą. Obejrzyj i porównaj próby. W próbach zawierających cukry redukujące następuje zmiana barwy roztworu z niebieskiej na zieloną i wytrąca się pomarańczowo-czerwony osad Cu₂O, zależnie od ilości cukru redukującego w roztworze. Zinterpretuj wyniki.		

1.3. Reakcja skrobi z jodem

Zasada: Strukturę skrobi tworzą dwie odmiany glukanów: amyloza i amylopektyna różniące się strukturą, rozpuszczalnością i ilością w ziarnach skrobi pochodzących z różnych źródeł, ale zawsze amylopektyna jest głównym składnikiem skrobi. Amyloza rozpuszcza się w wodzie i tworzy kompleks z jodem o barwie niebieskiej. Zabarwienie nie jest wynikiem reakcji chemicznej, lecz skutkiem uwięzienia jodu wewnątrz helisy, gdzie jod znajduje się w odmiennym otoczeniu niż w roztworze i ma inną barwę. Częsteczką amylopektyny ma kształt sferyczny, przypominający nieuporządkowany kłębek, w którym jedynie krótkie liniowe, zewnętrzne łańcuchy mogą związać się w lewoskrętne heliksy, jak w amylozie. Amylopektyna ma strukturę podobną do glikogenu. Amylopektyna z jodem daje barwę fioletowoczerwoną a skrobia daje z jodem zabarwienie fioletowoniebieskie.

Wykonanie: 2 próbki w statywie opisz nr od 1 do 2 i wprowadź do nich kolejno składniki wg instrukcji w tabeli 3:

Numer próbki	1	2
0,002% plyn Lugola (J ₂ w KJ)	150 µl	150 µl
Kleik skrobiowy z ćw. 1.1	1 ml	-
Przesącz - z ćw.1.1	-	1 ml
Roztwór glukozy z ćw. 1.1	-	-

Próby wymieszaj. Próbę z dodatnią reakcją na obecność skrobi wstaw do wrzącej łaźni wodnej do odbarwienia, po czym zaraz schłodź próbę pod bieżącą wodą i obserwuj, czy zabarwienie powraca. Zinterpretuj wyniki.

2. Analiza składu skrobi - podczas hydrolizy kwasowej skrobi

Zasada: Skład polisacharydów można określić po ich hydrolizie kwasowej do składników prostych, które można zidentyfikować. W skrobi, ogrzewanej w środowisku rozcieńczonych kwasów, są zrywane wiązania glikozydowe, początkowo α -1,4-glikozydowe, następnie α -1,6-glikozydowe, z towarzyszącym przyłączeniem jednej cząsteczki wody na każde hydrolizowane wiązanie. Najłatwiej hydrolizowana jest amyloza i zewnętrzne helikalne łańcuchy amylopektyny. Dlatego podczas hydrolizy można zaobserwować pojawianie się produktów częściowej hydrolizy skrobi, którymi są różne dekstryny, kolejno dekstryny wielkocząsteczkowe – tzw. amylodekstryny, barwiące się z jodem na kolor niebieskofioletowy, następnie dekstryny średnicząsteczkowe – tzw. erytrodekstryny, barwiące się z jodem na kolor brunatnoczerwony, po czym dekstryny małowcząsteczkowe – tzw. achrodekstryny, które nie dają zabarwienia z jodem i maltoza i izomaltoza po czym ostatecznie glukoza. W podobny sposób można otrzymać różne frakcje dekstranu z polisacharydów wytwarzanych przez niektóre bakterie, paciorkowce *Leuconostoc mesenteroides*. Dekstran jest wielkocząsteczkowym rozgałęzionym polisacharydem zbudowanym z reszt α -glukozowych połączonych wiązaniami α -1,6-glikozydowymi, który ma zastosowanie w leczeniu jako płyn krwiozastępczy w zapobieganiu i leczeniu wstrząsów pourazowych, pokrwotocznych, oparzeniowych i w stanach znacznego odwodnienia. Dekstrany małowcząsteczkowy i średnicząsteczkowy poprawiają przepływ krwi w naczyniach włosowatych, zwiększają przepływ w zakresie krążenia obocznego i zmniejszają lepkość krwi.

Wykonanie: przygotuj dwa szeregi próbek wg tab.4, i hydrolizat skrobi, który ogrzewać i pobierać co 5 min kolejne próby

Numer próbki pierwszego szeregu	1	2	3	4	5	6
0,002% plyn Lugola (J ₂ w KJ) - dodać (µl)	300	300	300	300	300	300
Po 1 ml hydrolizatu skrobi po różnym czasie (min) od rozpoczęcia ogrzewania	0 min	po 5 min	co 3 min	co 3 min	co 3 min	co 3 min
Numer próbki drugiego szeregu	7	8	9	10	11	12
2M roztwór NaOH - dodać (ml)	1	1	1	1	1	1
Odczynnik Benedicta - dodać (ml)	1	1	1	1	1	1
Po 1 ml hydrolizatu skrobi po różnym czasie (min) od rozpoczęcia ogrzewania	0 min	po 5 min	co 3 min	co 3 min	co 3 min	co 3 min

Po dodaniu 1 ml hydrolizatu do odczynnika Benedicta tę próbkę zaraz wstaw do wrzącej łaźni wodnej na 3 min

Przygotowanie hydrolizatu : do zlewki odmierzyć : 30 ml 0,5% kleiku skrobiowego i 12 ml 1M roztworu H₂SO₄, wymieszaj i natychmiast przenieść po 1 ml do próbki 1 i 7 - czas 0 przed ogrzewaniem
Hydrolizat ogrzewać na płytce elektrycznej – zanotować czas rozpoczęcia hydrolizy, po 5 min przenieść po 1 ml Płytkę elektryczną na „4” hydrolizatu do próbki 2 i 8, postępować jak wyżej, dalej co 3 min pobierać po 1ml hydrolizatu do kolejnych próbek obu szeregów

Wyróżnij kolejne produkty hydrolizy skrobi na podstawie różnych barw uzyskanych w reakcji z jodem, oraz określ na którym etapie pojawiają się cukry redukujące. Zinterpretuj wyniki

Polecana literatura:

1. Chemia medyczna pod redakcją Iwony Żak, ŚAM Katowice 2001, Rozdział 10.
2. Praktikum z chemii medycznej pod redakcją Iwony Żak, ŚAM Katowice 2001, Rozdział 7 i 8
3. Biochemia Harpera, Murray RR i wsp. PZWL Rozdział: Węglowodany o znaczeniu fizjologicznym, str.161-172