

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraskiewicz i Elżbiety Gocek

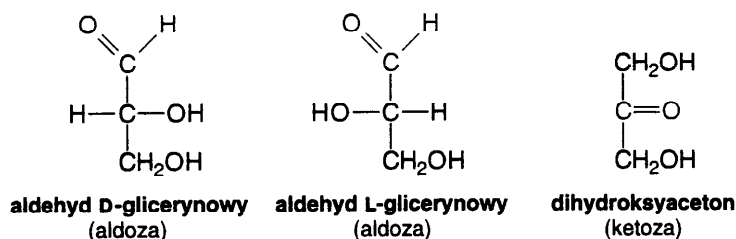
5. CUKRY

Autorzy: Teresa Olczak, Zdzisław Wróblewski (ed. Justyna Ciuraskiewicz)

5.1	Monosacharydy	2
5.1.1	Wpływ zasad na cukry	4
5.1.2	Wpływ stężonych kwasów na cukry	4
5.1.3	Odczyny wspólne dla wszystkich cukrów	5
5.1.3.1	Odczyn Molischa z α -naftolem	5
5.1.4	Wykrywanie ketoz – próba Seliwanowa z rezorcyną	6
5.1.5	Wykrywanie pentoz	7
5.1.5.1	Próba Biała na pentozy	7
5.1.5.2	Próba Dischego na deoksyrybozę	7
5.1.6	Właściwości redukujące cukrów	8
5.1.6.1	Próba Trommera	8
5.1.6.2	Próba Benedicta	8
5.2	Oligosacharydy	9
5.2.1	Wpływ rozcieńczonych kwasów na oligosacharydy	10
5.2.2	Odróżnianie monosacharydów od disacharydów	10
5.2.2.1	Próba Barfoeda	10
5.3	Polisacharydy	11
5.3.1	Próba jodowa	11
5.3.2	Kwaśna hydroliza polisacharydów	12
5.3.3	Enzymatyczna hydroliza polisacharydów	12
5.3.4	Oznaczanie cukrów redukujących metodą Bernfelda	13
5.4.	Ilościowe oznaczanie cukrów	14
5.4.1	Oznaczanie glukozy metodą enzymatyczną	14
5.4.2	Oznaczanie cukrów mikrometodą fenolową	15
5.4.3	Oznaczanie kwasu sjałowego zmodyfikowaną metodą rezorcynolową	17

5.1. MONOSACHARYDY

Cukry proste (monosacharydy) klasyfikuje się wg grup funkcyjnych (aldozy, ketozy) i ilości atomów węgla w cząsteczce (triozy, tetrozy, pentozy, heksozy, itd.). Najprostsze monosacharydy to trójwęglowe triozy: aldehyd glicerynowy (aldoza) i dihydroksyaceton (ketoza) (Rys. 5.1).



Rys.5.1. Przykłady prostych monosacharydów

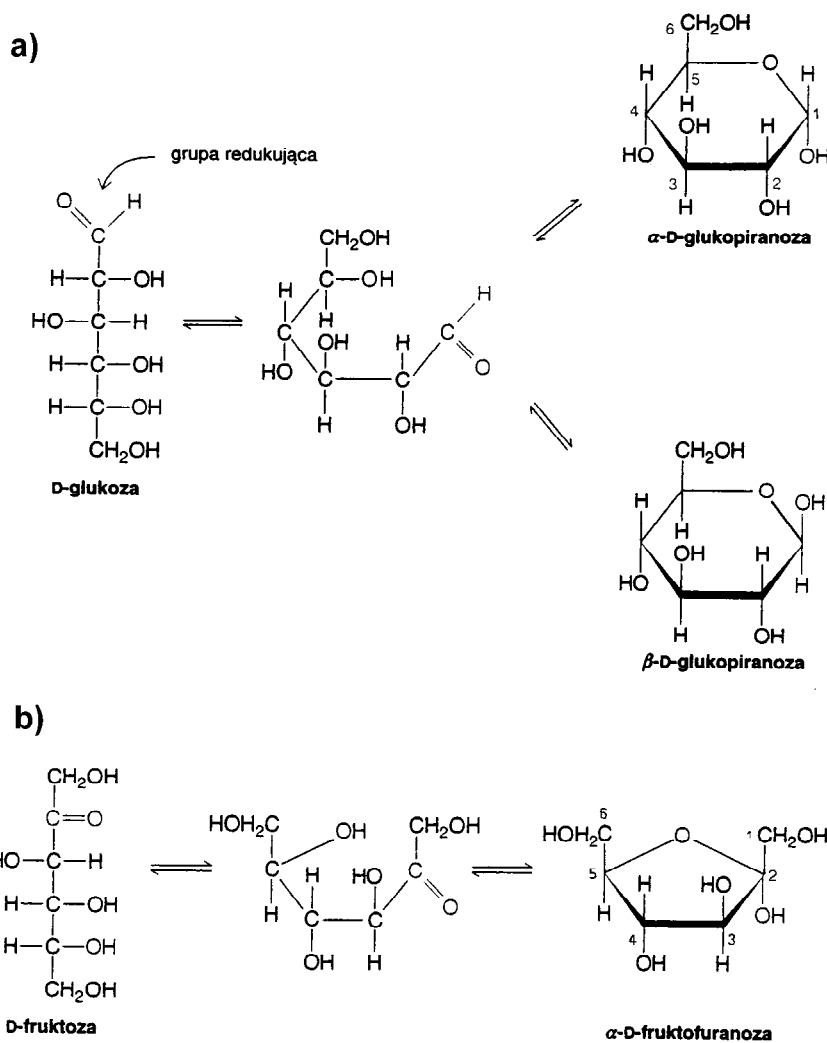
Aldehyd glicerynowy posiada jeden asymetryczny atom węgla i dlatego występuje w postaci dwóch izomerów przestrzennych: D i L. Do szeregu konfiguracyjnego D zalicza się te cukry, które w formie łańcuchowej (przedstawionej wzorami rzutowymi Fischera) przy węglu asymetrycznym o najwyższej numeracji (przy przedostatnim licząc od grupy aldehydowej lub ketonowej) mają po prawej stronie grupę hydroksylową. Jeśli grupa ta znajduje się po lewej stronie, związek taki należy do szeregu L. Trzy podstawowe aldoheksozy (glukoza, galaktoza i mannoza) posiadają cztery asymetryczne atomy węgla i dlatego całkowita ilość stereoizomerów wynosi 2^4 , czyli 16. Związki takie wykazują aktywność optyczną, która umożliwia skręcanie płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Monosacharydy zawierające cztery lub więcej atomów węgla w cząsteczce, występują w postaci pierścieniowych odmian tautomerycznych, tworzących się w wyniku powstawania wewnątrzcząsteczkowych wiązań półacetalowych (Rys. 5.2). Formy otwartego łańcucha w roztworach ulegają cyklizacji, tworząc struktury pierścieniowe i zarówno w stanie stałym jak i w roztworze, nie zawierają one wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej. Rotacja wokół wiązania między C-4 i C-5 D-glukozy przenosi grupę hydroksylową C-5 do grupy aldehydowej C-1, co powoduje utworzenie cyklicznego półacetalu. Forma otwartego łańcucha glukozy i innych aldoheksoz w roztworach wodnych istnieje tylko w bardzo małych ilościach (<1%). Reakcja grupy hydroksylowej C-5 z grupą karbonylową C-2 daje cykliczny półketal.

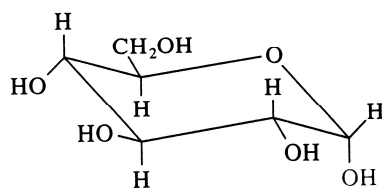
Niezależnie od konfiguracji przy pozostałych asymetrycznych atomach węgla, która w formie pierścieniowej jest taka sama jak w łańcuchowej, możliwe są dwie formy pierścieniowe każdego monosacharydu, różniące się położeniem grupy –OH przy półacetalowym atomie węgla (w formie łańcuchowej węgiel ten nie jest asymetryczny).

Zjawisko istnienia dwóch odmian tej samej cyklicznej postaci monosacharydu, różniących się tylko orientacją przestrzenną pierwszego atomu węgla w cząsteczce aldoz lub drugiego atomu węgla w cząsteczce ketoz, nosi nazwę **anomerii**. Takie odmiany związków nazywa się anomerami, a atomy węgla, warunkujące występowanie tej odmiany izomerii, atomami anomerycznymi. Formy α i β różnią się od siebie przede wszystkim skręcalnością optyczną. Każdy z dwóch trwałych w stanie krystalicznym anomerów w roztworze przechodzi w równowagową mieszaninę obu tych odmian. α -D-glukopiranoza o skręcalności właściwej $[\alpha]_D = +112^\circ$, a β -D-glukopiranoza o skręcalności właściwej $[\alpha]_D = +19^\circ$, w roztworze osiągają stan równowagi, aż do uzyskania skręcalności właściwej $[\alpha]_D = +52^\circ$.

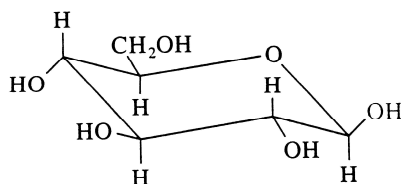
Zjawisko to nosi nazwę mutarotacji. W pH 7,0 wodny roztwór glukozy zawiera 36% α -D-glukopiranozy i 64% β -D-glukopiranozy. Takie odmiany anomeryczne przedstawiane są za pomocą wzorów Haworth'a (Rys. 5.3). α i β określają położenie grupy $-\text{OH}$ przy pierwszym półacetalowym atomie węgla (α - grupa $-\text{OH}$ poniżej płaszczyzny, β - grupa $-\text{OH}$ powyżej płaszczyzny). W pełni przestrzenny kształt cząsteczki cukru oddaje konformacja krzesłkowa (wg niej podstawniki umieszczone są aksjalnie i ekwatorialnie).



Rys.5.2. Formy występowania: a) glukozy i b) fruktozy



α -D-glukopiranoza



β -D-glukopiranoza

Rys. 5.3. Formy pierścieniowe glukozy

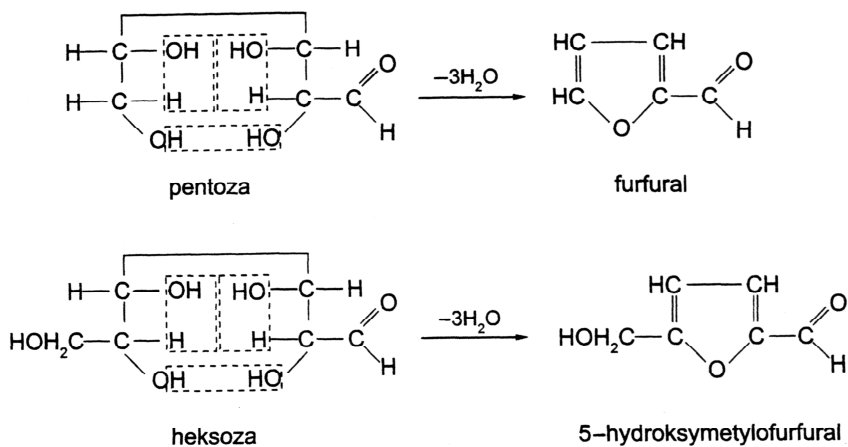
5.1.1. Wpływ zasad na cukry

Cząsteczki cukrów występujące w środowisku obojętnym w formie pierścieniowej, przekształcają się w środowisku zasadowym w formy łańcuchowe. W obecności słabych zasad (0,05 M) formy łańcuchowe ulegają enolizacji. Zostają zniesione różnice konfiguracji między C-1 i C-2. Glukoza przekształca się w mannozę i fruktozę i te trzy cukry epimeryczne są w stanie równowagi. Epimery różnią się tylko konfiguracją wokół jednego atomu węgla (np. D-glukoza i D-mannoza przy C-2, D-glukoza i D-galaktoza przy C-4). Stężone zasady (>0,5 M) powodują przemieszczanie wiązania enolowego w inne pozycje łańcucha węglowego, a podczas ogrzewania ze stężonymi zasadami dochodzi do rozerwania łańcucha i utworzenia dwuwęglowych oraz trójwęglowych fragmentów o silnych właściwościach redukujących (m.in. erytrozy, aldehydu glikolowego).

5.1.2. Wpływ stężonych kwasów na cukry

Ogrzewanie cukrów z silnymi kwasami (stężony kwas siarkowy (VI) lub solny) powoduje dehydratację, a nawet rozpad łańcucha węglowego. Z pentoz w środowisku silnie kwaśnym powstaje furfural, a z heksoz 5-hydroksymetylofurfural (Rys. 5.4).

Najszybciej reagują monosacharydy, natomiast disacharydy i polisacharydy wcześniej ulegają hydrolizie. Furfural i 5-hydroksymetylofurfural kondensując z jednowodorotlenowymi fenolami (np. z α -naftolem) tworzą połączenia triarylometanowe, w których układ chinoidowy stanowi grupę chromoforową, decydującą o barwie powstałego kompleksu. Wielowodorotlenowe fenole (np. rezorcyna, orcyna, floroglucyna) tworzą połączenia ksantenowe. W reakcje kondensacji z pochodnymi furfuralu mogą też wchodzić inne związki aromatyczne, np. antron, benzydyna, difenyloamina. Wszystkie cukry reagują z α -naftolem. Wolne pentozy, ich estry fosforanowe oraz ryboza związana w nukleozydach i nukleotydach purynowych dają reakcję dodatnią z orcyną i jonami żelaza (Fe^{3+}). Ryboza i deoksyryboza związane z zasadami pirymidynowymi, dają bardzo słaby odczyn. Deoksyryboza ogrzewana w środowisku silnie kwaśnym tworzy niebieski kompleks z difenyloaminą. Ryboza i inne pentozy nie dają tego odczynu. Ketozy natomiast reagują z rezorcyną.



Rys. 5.4. Reakcja odwodnienia pentoz i heksoz

5.1.3. Odczyny wspólne dla wszystkich cukrów

5.1.3.1. Próba Molischa z α -naftolem

Zasada metody

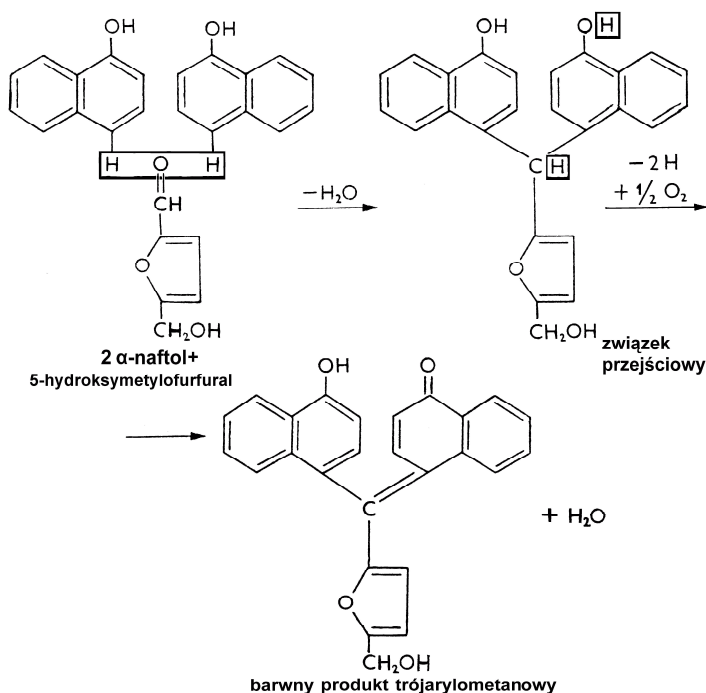
Dodatnią próbę Molischa wykazują wszystkie cukry, a także aldehydy, aceton i kwasy organiczne. W obecności stężonego kwasu siarkowego dochodzi do odwodnienia cukrów i powstaje furfural lub 5-hydroksymetylofurfural, które z α -naftolem tworzą barwne kompleksy (Rys. 5.5). Ujemna próba Molischa wyklucza obecność cukru.

Postępowanie

1. Do 2 ml badanego roztworu dodać dwie krople odczynnika Molischa zawierającego α -naftol, zmieszać i ostrożnie podwarstwić 1 ml stężonego kwasu siarkowego.
2. Na granicy faz powstaje czerwono-fioletowy krążek.

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór glukozy, fruktozy, sacharozy
- 0,1% roztwór skrobi i glikogenu
- odczynnik Molischa: 10% α -naftol
- stężony kwas siarkowy (VI)

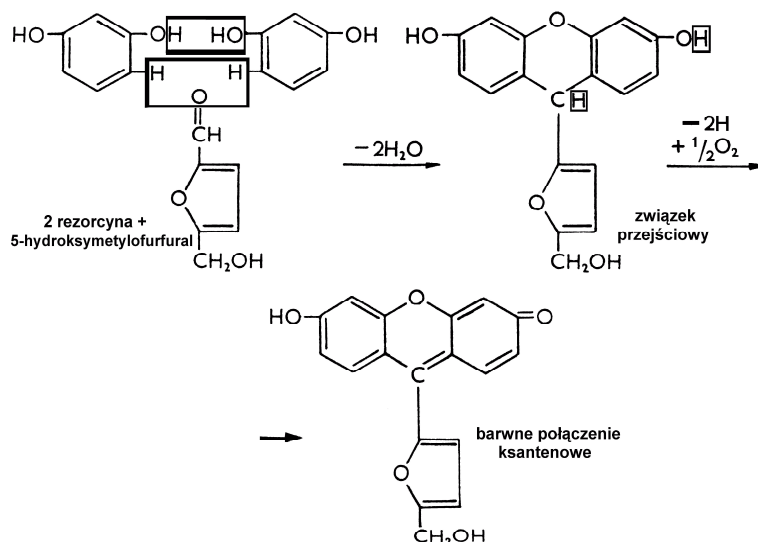


Rys. 5.5. Reakcja Molischa

5.1.4. Wykrywanie ketoz - próba Seliwanowa z rezorcyną

Zasada metody

Dodatni odczyn Seliwanowa wykazują ketozy. Po odwodnieniu tych cukrów w obecności stężonego kwasu solnego powstaje furfural lub 5-hydroksymetylofurfural, które z rezorcyną tworzą barwne kompleksy (Rys. 5.6).



Rys.5.6. Reakcja Seliwanowa.

Postępowanie

1. Do 1 ml odczynnika Seliwanowa dodać kroplę roztworu fruktozy. Zmieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej dokładnie na 30 sek.
2. Wyjąć i oziębować. Próba przyjmuje czerwone zabarwienie.
3. Próbę powtórzyć na innych cukrach. Inne cukry dają dodatni odczyn Seliwanowa po dłuższym ogrzewaniu.

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór glukozy, fruktozy i sacharozy
- 0,1% roztwór skrobi, glikogenu
- odczynnik Seliwanowa: stężony kwas solny rozcieńczyć dwa razy wodą i rozpuścić w nim rezorcynę do uzyskania roztworu o stężeniu 0,05%

5.1.5. Wykrywanie pentoz

5.1.5.1. Próba Biała na pentozy

Zasada metody

Wolne pentozy, ich estry fosforanowe oraz ryboza związana w nukleozydach i nukleotydach purynowych ogrzewane ze stężonym kwasem solnym odwadniają się do furfuralu, który z orcyną i jonami Fe^{3+} daje zielono zabarwiony kompleks. Deoksyryboza oraz ryboza związana z zasadami pirymidynowymi dają bardzo słaby odczyn.

Postępowanie

1. Do probówki dodać 1 ml roztworu rybozy oraz 1 ml odczynnika Biała, zamieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na okres 20 minut.
2. Próbę powtórzyć na roztworach RNA i DNA.
3. Opisać wynik.

Materiały i odczynniki

- 0,01% roztwór rybozy
- 0,05% roztwory RNA i DNA
- odczynnik Biała: w 100 ml stężonego kwasu solnego rozpuścić 0,5 g orcyny i dodać kilka kropel 10% roztworu chlorku żelaza (III)

5.1.5.2. Próba Dischego na deoksyrybozę

Zasada metody

Deoksyryboza ogrzewana w środowisku silnie kwaśnym odwadnia się do furfuralu, który tworzy niebieski kompleks z difenyloaminą. Ryboza i inne pentozy nie dają tego odczynu.

Postępowanie

1. Do probówki dodać 1 ml DNA oraz 1 ml odczynnika Dischego, zamieszać i wstawić na okres 10 minut do wrzącej łaźni wodnej.
2. Próbę powtórzyć na roztworze RNA. Porównać uzyskane wyniki.

Materiały i odczynniki

- 0,05% roztwory RNA i DNA
- odczynnik Dische'go: 1 g difenyloaminy rozpuścić w 2,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) i uzupełnić do 100 ml kwasem octowym lodowatym

5.1.6. Właściwości redukujące cukrów

Zasada metody

Za właściwości redukujące cukrów odpowiedzialna jest wolna grupa aldehydowa lub ketonowa. W środowisku zasadowym formy pierścieniowe cukrów przechodzą w łańcuchowe i grupa aldehydowa odtwarza się przy C-1 w glukopiranozie, a grupa ketonowa przy C-2 we fruktofuranozie. Cukry redukujące zawierają zawsze wolne grupy aldehydowe lub ketonowe i należą do nich wszystkie cukry proste oraz oligosacharydy, które posiadają wolną grupę aldehydową lub ketonową. Cukry takie podczas ogrzewania w środowisku zasadowym tworzą silnie redukujące produkty. W większości prób redukcyjnych wykorzystuje się redukcję jonów miedzi (II) do jonów miedzi (I). W środowisku zasadowym cukry ulegają także izomeryzacji i degradacji.

5.1.6.1. Próba Trommera

Postępowanie

1. Do 2 ml roztworu cukru dodać równą objętość 2 M wodorotlenku sodu i kroplami, wstrząsając probówkę po dodaniu każdej kropli, 0,25 M roztwór siarczynu (VI) miedzi (II). Dodawanie siarczynu przerwać po kropli, która się już nie rozpuszcza.
2. Górną warstwę klarownego płynu ogrzać w płomieniu palnika. Próby wykonać na roztworach glukozy, fruktozy i sacharozy.

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór glukozy, fruktozy i sacharozy
- 0,25 M roztwór siarczynu (VI) miedzi (II)
- 2 M wodorotlenek sodu

5.1.6.2. Próba Benedicta

Zasada metody

Próba ta stanowi jeden z najczulszych odczynów redukcyjnych na cukry. Barwa powstającego osadu tlenku miedziawego zależy od wielkości cząsteczek wypadających z roztworu. Cząstki najdrobniejsze dają barwę zieloną, a największe czerwoną. Próba ta może służyć do przybliżonego określania stężenia cukru w badanym roztworze (Tab. 5.1).

Postępowanie

1. Do 5 ml odczynnika Benedicta dodać 8 kropli badanego roztworu cukru, zmieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 5 min.
2. Po oziębieniu w strumieniu bieżącej wody, roztwór zmienia barwę i mętnieje.

Tab. 5.1. Zależność odczynu Benedicta od zawartości cukru

barwa	ocena redukcji	przybliżona zawartość cukru (g/100 ml)
bez zmian	–	0
zielona, brak osadu	+/-	0,1–0,3
zielona, osad	+	0,5
żółto-zielona, osad	++	1,0
pomarańczowa, osad	+++	1,5
czerwona, osad	++++	2,0 i powyżej

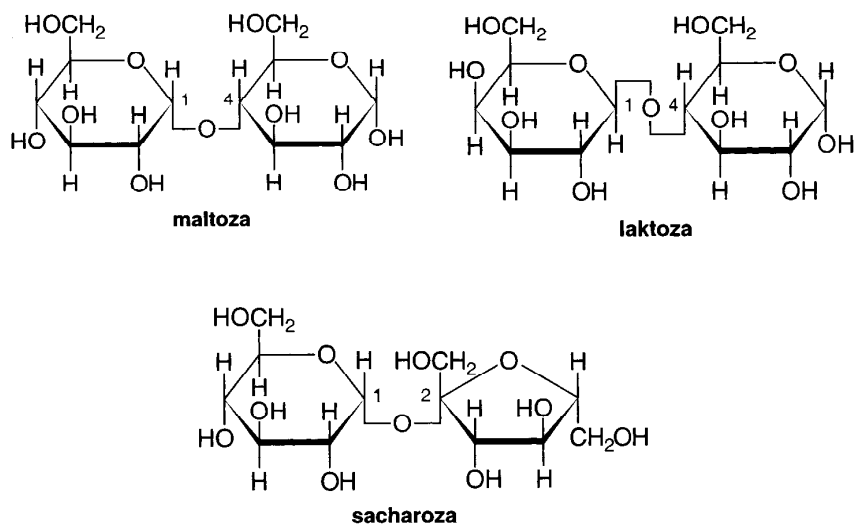
Materiały i odczynniki

- 0,1, 0,5, 1,5% roztwory glukozy
- odczynnik Benedicta: 173 g krystalicznego cytrynianu sodu i 100 g bezwodnego węglanu sodu rozpuścić na gorąco w 600 ml wody; przesączyć, a do przesączu dodawać wolno, stale mieszając, 100 ml 17,3% roztworu siarczanu (VI) miedzi (II); uzupełnić do 1 l wodą.

5.2. OLIGOSACHARYDY

Oligosacharydy to związki, które powstają przez połączenie od dwóch do dziewięciu reszt monosacharydów. Najczęściej występują disacharydy, czyli dwa cukry połączone wiązaniem glikozydowym (Rys. 5.7), w którym uczestniczy półacetalowy atom węgla jednej cząsteczki cukru oraz dowolny atom węgla drugiej cząsteczki. Jeśli w jednym z cukrów znajduje się wolna grupa $-OH$ przy półacetalowym atomie węgla, to disacharyd zachowuje się pod wieloma względami jak monosacharyd. Wykazuje m.in. właściwości redukujące. Do takich cukrów należy laktoza i maltoza.

Cukry nieredukujące to disacharydy, w których grupy $-OH$ przy półacetalowym atomie węgla obu monosacharydów biorą udział w wiązaniu glikozydowym (np. sacharoza).



Rys. 5.7. Przykłady disacharydów

5.2.1. Wpływ rozcieńczonych kwasów na oligosacharydy

Zasada metody

Wszystkie disacharydy łatwo ulegają kwaśnej hydrolizie, co świadczy o obecności w nich wiązań glikozydowych. Hydroliza wiązań glikozydowych (włączanie cząsteczki wody) przebiega w środowisku kwaśnym. Oligosacharydy hydrolizują już w obecności słabych kwasów (0,5–1 M). Pękają wówczas wiązania glikozydowe z uwolnieniem monosacharydów. Sacharoza hydrolizuje bardzo łatwo już w temp. pokojowej w obecności 0,1 M kwasu solnego. W przypadku sacharozy zachodzi specyficzne zjawisko zwane inwersją. Po rozpuszczeniu i hydrolizie sacharozy wykazującej skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{+67}$, otrzymuje się lewoskrętną mieszaninę D-glukozy i D-fruktozy.

Postępowanie

1. Do 5 ml 1% roztworu sacharozy dodać równą objętość 0,1 M kwasu solnego i wstawić na 15 minut do wrzącej łaźni wodnej.
2. Wykonać próbę redukcyjną przed i po hydrolizie.

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór sacharozy
- 0,1 M kwas solny
- 2 M wodorotlenek sodu
- 0,25 M siarczan (VI) miedzi (II)

5.2.2. Odróżnianie monosacharydów od disacharydów

5.2.2.1. Próba Barfoeda

Zasada metody

Próba ta pozwala na odróżnienie monosacharydów od disacharydów redukujących na podstawie reakcji redukcji w środowisku lekko kwaśnym. Monosacharydy łatwo wykazują właściwości redukujące natomiast disacharydy dopiero po dłuższym ogrzewaniu, gdy zostanie rozerwane wiązanie glikozydowe.

Postępowanie

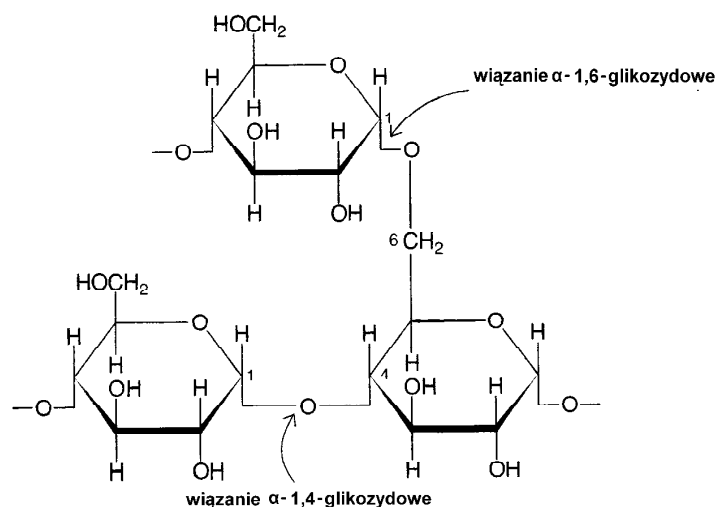
1. Do 1 ml odczynnika Barfoeda dodać 1 ml roztworu cukru i po wymieszaniu wstawić do łaźni wodnej na 3 min.
2. Pojawia się czerwony osad tlenku miedziawego (Cu_2O) w probówce z monosacharydem, a w probówkach z disacharydami dopiero po ogrzewaniu kilkunastominutowym.

Materiały i odczynniki

- odczynnik Barfoeda: 13,3 g octanu miedzi rozpuścić w 200 ml wody, przesączyć i dodać 1,8 ml kwasu octowego lodowatego

5.3. POLISACHARYDY

Polisacharydy, inaczej cukry złożone, to liniowe lub rozgałęzione polimery o dużej masie cząsteczkowej, zbudowane z podjednostek – monosacharydów. Strukturę liniową wykazuje amyloza wchodząca w skład skrobi (wiązania α -1,4-glikozydowe) i celuloza (wiązania β -1,4-glikozydowe), a strukturę rozgałęzioną amylopektyna, wchodząca w skład skrobi i glikogen (wiązania α -1,4 i α -1,6-glikozydowe). W glikogenie wiązania α -1,6-glikozydowe występują co 6-10 reszt glukozowych, a w skrobi co 25 reszt glukozowych, powodując, że glikogen jest polisacharydem o strukturze bardziej rozgałęzionej w porównaniu ze skrobią (Rys. 5.8). Polisacharydy dają pozytywny odczyn w reakcji z jodem (rozdział 5.3.1).



Rys. 5.8. Podstawowe wiązania glikozydowe łączące monomery cukrów w polisacharydach

5.3.1. Próba jodowa

Zasada metody

Zabarwienie skrobi pod wpływem jodu spowodowane jest adsorpcją jodu na cząsteczce polisacharydu. Adsorpcja ma charakter kanałowy, tzn. cząsteczki jodu wchodzą do kanału utworzonego przez spiralnie skręcone łańcuchy skrobi. Cząsteczki jodu w obrębie spirali skrobi tworzą prosty łańcuch, wzdłuż którego mogą przemieszczać się elektrony, co powoduje pochłanianie światła przez cały kompleks. Barwa zależy od długości łańcucha. Amyloza daje zabarwienie niebieskie, amylopektyna fioletowo-czerwone. W obecności zasad zabarwienie nie powstaje, gdyż jod reaguje z jonem wodorotlenowym.

Postępowanie

1. Do 2 ml słabo kwaśnego roztworu skrobi dodać 1 kroplę 0,01 M roztworu jodu w 1% jodku potasu. Próbę powtórzyć na roztworze glikogenu.
2. Probówki, w których powstała niebieska barwa z jodem, ogrzać we wrzącej łaźni wodnej, a następnie oziębić pod bieżącą wodą.
3. Próbę powtórzyć używając zasadowego roztworu skrobi oraz skrobi, do której uprzednio dodano etanol i NaOH.

Materiały i odczynniki

- 0,1% roztwór skrobi, glikogenu
- 0,01 M jod w 1% jodku potasu
- 2 M chlorek sodu
- etanol
- 1 M wodorotlenek sodu

5.3.2. Kwaśna hydroliza polisacharydów

Zasada metody

Stopniowa hydroliza skrobi zachodzi pod wpływem rozcieńczonych kwasów. Pękają wówczas wiązania glikozydowe z przyłączeniem cząsteczki wody. Początkowo powstają dekstryny, następnie maltoza i ostatecznie glukoza. Rozrywanie wiązań glikozydowych powoduje wzrost właściwości redukujących hydrolizatu, gdyż uwalnia się grupa aldehydowa. Powoduje to zanik reakcji z jodem. Całkowita hydroliza polisacharydów wymaga dłuższego ogrzewania w obecności silnych kwasów (1–2 M kwas solny lub siarkowy (VI)) w temp. wrzenia.

Postępowanie

1. Do probówki odmierzyć 5 ml roztworu skrobi i dodać 2 ml 2 M kwasu solnego. Zmieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej. Co 3 minuty pobierać kroplę roztworu i na płytce porcelanowej wykonywać reakcję z jodem. Zakończyć hydrolizę, gdy barwa jodu nie ulega zmianie. Barwę jodu porównywać z barwą próby kontrolnej (kropla wody i kropla roztworu jodu) oraz z barwą próby zerowej (przed hydrolizą). Po oziębieniu próbę zobojętnić i wykonać próbę na cukry redukujące.
2. Powtórzyć doświadczenie stosując roztwór glikogenu.
3. Skrawki bibuły umieścić w probówce, dodać 10 ml wody i 1 ml stężonego kwasu siarkowego. Wstawić na 20 minut do wrzącej łaźni wodnej. Po zobojętnieniu wykonać próbę redukcyjną na cukry (doświadczenie 5.1.6).

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór skrobi, glikogenu
- bibuła
- 2 M kwas solny
- 2 M wodorotlenek sodu
- stężony kwas siarkowy (VI)
- 0,01 M jod w 1% jodku potasu
- odczynniki potrzebne w próbach redukujących cukrów

5.3.3. Enzymatyczna hydroliza polisacharydów

Zasada metody

Hydroliza enzymatyczna skrobi i glikogenu zachodzi pod wpływem enzymów amylaz. α -amylazy (E.C.3.2.1) są endoglikozydazami hydrolizującymi wiązania α -1,4-glikozydowe położone wewnątrz cząsteczki polisacharydu. Pierwszym produktem tej reakcji są erytrodekstryny dające z jodem zabarwienie czerwono-fioletowe. Następnie powstają niskie

dekstryny (6–7 cząsteczek glukozy), a produktem końcowym jest maltoza. α -amylazy występują w ślinie, trzustce i słodzie.

Postępowanie

1. W probówce wirówkowej zebrać ok. 2 ml śliny i odwirować 5 minut przy 5 000 obr./min.
2. Klarowną ślinę rozcieńczyć 50–100-krotnie wodą destylowaną.
3. W zagłębieniach płytek porcelanowych umieścić po 3 krople jodu w jodku potasu i kroplę kwasu solnego.
4. Do probówki odmierzyć 5 ml skrobi, 2 ml chlorku sodu i 2 ml buforu o pH 6,6. Zmieszać i wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C.
5. Po kilku minutach dodać 1 ml rozcieńczonej śliny, zmieszać i zanotować czas.
6. Dokładnie w odstępach jednocminutowych pobierać po dwie krople mieszaniny inkubacyjnej i umieszczać w zagłębieniach płytki.
7. Zanotować czas, po którym pobrana próbka nie zmienia barwy jodu.
8. Podać aktywność amylazy w ślinie w jednostkach/ml. W tym doświadczeniu za 1 jednostkę amylazy przyjmuje się taką aktywność enzymu, która hydrolizuje 50 mg skrobi w czasie 10 minut w temp. 37°C, w pH 6,6, w obecności jonów chlorkowych, do produktów nie dających barwy z jodem (punkt achromowy).

Przykład obliczenia

Do oznaczenia pobrano 1 ml 100-krotnie rozcieńczonej śliny, a punkt achromowy osiągnięto po 8 min. Aktywność amylazy w ślinie wynosi $10/8 \times 100 = 125$ jednostek/ml.

Materiały i odczynniki

- 1 M kwas solny
- 1 M wodorotlenek sodu
- 0,01 M jod w 1% jodku potasu
- 1% roztwór skrobi
- 1% chlorek sodu
- 0,1 M bufor cytrynianowo-fosforanowy, pH 6,6

5.3.4. Oznaczanie cukrów redukujących metodą Bernfelda

Summer J.B., Howell S.F. (1955) *Methods in Enzymology* 1, 145.

Zasada metody

Grupy redukujące cukrów uwolnione podczas hydrolizy skrobi przez amylazy ulegają utlenieniu pod wpływem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS). Intensywność zabarwienia powstających związków jest proporcjonalna do zawartości cukrów w próbce.

Postępowanie

1. Do 2 ml roztworu zawierającego 10–120 μg cukru dodać następujące odczynniki i dokładnie wymieszać:

składnik	próba badana	próba wzorcowa	próba odczynnikowa
materiał badany	2 ml	–	–
wzorzec	–	2 ml	–
woda destylowana	–	–	2 ml
DNS	2 ml	2 ml	2 ml

2. Próby inkubować 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu dodać 6 ml wody destylowanej i odczytać absorbancję prób badanych i wzorcowych wobec próby odczynnikowej przy długości fali 530 nm, w kuwecie o grubości 1 cm.

Obliczanie wyników

1. Krzywą wzorcową sporządzić w zakresie 10–100 μg glukozy.
2. Z krzywej wzorcowej wykreślonej przez połączenie linią prostą punktów odpowiadających absorbancji wzorców, odczytać stężenie cukru w próbce badanej.

Materiały i odczynniki

- wzorzec: roztwór glukozy o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$
- odczynnik dinitrosalicylowy (DNS): 1 g kwasu dinitrosalicylowego, 20 ml 2 M NaOH, 3 g winianu sodowo-potasowego; uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml

5.4. Ilościowe oznaczanie cukrów

Oznaczanie glukozy stanowi jedno z najważniejszych i najczęściej wykonywanych badań w laboratoriach analitycznych. Obecnie zarzucono już stosowane dawniej pracochłonne i nieswoiste metody, oparte na właściwościach redukujących cukrów. Także metoda Hultmana, polegająca na kondensacji o-toluidyny z aldozami, a więc we krwi z glukozą i galaktozą, jest wycofywana ze względu na rakotwórcze działanie o-toluidyny. Do najczulszych i najbardziej swoistych metod oznaczania glukozy należą metody enzymatyczne. Wyniki otrzymywane tymi metodami są około 20–25% niższe od wyników otrzymywanych metodami redukcyjnymi. W reakcjach bowiem w zasadzie nie biorą udziału inne związki niecukrowe, a także inne niż glukoza cukry. Do stosowanych obecnie rutynowo należy metoda oksydazowa.

5.4.1. Oznaczanie glukozy metodą enzymatyczną

Zasada metody

Glukoza zawarta w próbce utlenia się pod wpływem oksydazy glukozowej (GOD) do kwasu glukonowego z wytworzeniem nadtlenu wodoru. Reakcja może być uwidoczniła w obecności odpowiedniego wskaźnika (np. ABTS – sól sodowa kwasu 2,2'-azyno-di(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonowego), który utlenia się nadtlaniem wodoru przy udziale

peroksydazy (POD). Natężenie powstałego zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia glukozy w badanej próbce.

Metoda ta jest swoista dla glukozy w pierwszym etapie. Drugi etap stwarza możliwość wielorakich interakcji. Wszystkie substancje podlegające łatwo reakcjom red-oks, występujące we krwi (glutation, kwas askorbinowy, kwas moczowy, bilirubina) lub wprowadzone do organizmu (niektóre leki – kwas acetylosalicylowy, penicyliny, tetracykliny) oraz składniki patologiczne (kwas acetooctowy), łatwo reagują z nadtlenkiem wodoru i zmniejszają wynik reakcji w sposób nieswoisty. Ponadto krew, nawet po odbiałczeniu, może zawierać czynniki (porfiryne, jony żelaza) działające podobnie do peroksydazy.

Utrzymanie stałego stężenia glukozy we krwi jest wynikiem działania mechanizmów regulujących i równowagi pomiędzy katabolizmem i anabolizmem glukozy, a nadrzędną rolę pełnią czynniki hormonalne.

Hyperglikemia – wzrost stężenia glukozy we krwi – występuje fizjologicznie w 30–60 minucie po posiłku. W stanach patologicznych może być spowodowana:

- a) zmniejszonym zużyciem glukozy w tkankach (cukrzyca),
- b) zwiększonym rozpadem glikogenu w wątrobie (nadczynność tarczycy),
- c) zwiększoną glukoneogenezą.

Zwiększenie stężenia glukozy we krwi powyżej 160 mg/dl (8,88 mmol/l) prowadzi do przekroczenia progu nerkowego, co powoduje glukozurię, czyli utratę glukozy z moczem.

Hypoglikemia – zmniejszenie stężenia glukozy we krwi – może być spowodowana:

- a) wyczerpaniem rezerw glikogenu w wątrobie (niewydolność wątroby) lub utratą zdolności do rozkładu glikogenu (choroba spichrzeniowa – brak fosfatazy G-6-P),
- b) zwiększonym zużyciem glukozy w tkankach (nadmiar insuliny),
- c) zużyciem glukozy do syntezy laktozy w okresie laktacji.

Wartości prawidłowe:

- krew: 60 – 100 mg/dl (3,36 – 5,6 mmol/l)
- osocze: 70 – 110 mg/dl (3,92 – 6,16 mmol/l)
- płyn mózgowo-rdzeniowy: 45 – 70 mg/dl (2,52 – 3,92 mmol/l)

Postępowanie

Wykonanie doświadczenia zgodnie z protokołem.

5.4.2. Oznaczanie cukrów mikrometodą fenolową

Dubois M., Gilles K.H., Hamilton J.K., Rebers P.H., Smith F. (1956) Anal. Chem. 28, 350–356.

Zasada metody

Cukry proste, oligosacharydy oraz polisacharydy ulegają odwodnieniu pod wpływem stężonego kwasu siarkowego. Z pentoz powstaje furfural, a z heksoz oksymetylenofurfural. Związki te w obecności fenolu i stężonego kwasu siarkowego tworzą kompleks o zabarwieniu pomarańczowym. Reakcja jest czuła, a barwa trwała. Mikrometoda ta jest szczególnie dobra do oznaczania małych ilości cukrów, rozdzielonych metodą chromatograficzną z użyciem układu fenol : woda oraz układów lotnych (np. etanol : woda).

Postępowanie

1. Przy oznaczaniu cukrów związanych w glikoproteinach, przed przeprowadzeniem reakcji barwnej najpierw należy przeprowadzić hydrolizę białek w celu uwolnienia reszt cukrowych. W tym celu należy zmieszać 0,1 ml roztworu zawierającego glikoproteinę z 0,1 ml 0,1 M kwasu siarkowego (VI) i ogrzewać przez 60 minut w temp. 80°C. Po zakończeniu inkubacji próbkę zawierającą próbę badaną ochłodzić.
2. Do oznakowanych probówek dodać podane w tabeli niżej odczynniki i dokładnie wymieszać (**Uwaga!** stężony kwas pipetować pod wyciągiem używając szklanej pipety zaopatrzonej w specjalną nasadkę). Roztwór badany i wzorcowy powinny zawierać 4–16 µg cukru w 0,2 ml.

składnik	próba badana	próba wzorcowa	próba odczynnikowa
materiał badany	0,2 ml	–	–
wzorzec	–	0,2 ml	–
woda destylowana	–	–	0,2 ml
5% fenol	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
stężony kwas siarkowy (VI)	1 ml	1 ml	1 ml

3. Próby pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej.
4. Odczytać absorbancję prób badanych i wzorcowych wobec próby odczynnikowej przy długości fali 490 nm, w kuwecie o grubości 1 cm.
5. Stężenie cukru obliczyć z poniższego wzoru:

$$C_b = \frac{C_{wz} \times A_b}{A_{wz}}$$

gdzie:

C_b – stężenie próby badanej,
 A_b – absorbancja próby badanej,
 C_{wz} – stężenie wzorca,
 A_{wz} – absorbancja wzorca.

Materiały i odczynniki

- wzorzec – stabilizowany 0,05% lub 0,001% roztwór glukozy: 2,5 g kwasu benzoowego rozpuścić w 1 l wrzącej wody i ochłodzić; odważyć 0,05 g lub 0,001 g glukozy i rozpuścić w 100 ml nasyconego roztworu kwasu benzoowego
- 5% roztwór fenolu
- stężony kwas siarkowy (VI)
- 0,1 M kwas siarkowy (VI)

5.4.3. Oznaczanie kwasu sjałowego zmodyfikowaną metodą rezorcynolową

Jourdian G.W., Dean L., Roseman S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 430-435.

Zasada metody

Metoda ta polega na tworzeniu barwnych związków z rezorcynolem przez pochodne kwasu sjałowego powstające po odwodnieniu przez stężone kwasy. Modyfikacja polegająca na utlenianiu kwasu sjałowego kwasem jodowym (VII) (nadjodowy) powoduje, że jest to metoda czuła i specyficzna, gdyż w reakcji tej nie biorą udziału inne związki, takie jak lipidy, aminokwasy i pozostałe cukry. Dodatkowo, metodą tą można oznaczać kwas sjałowy związany glikozydowo bez uprzedniej hydrolizy glikoprotein. Kwas sjałowy związany glikozydowo tworzy barwny kompleks trwały w temp. 37°C, podczas gdy barwny kompleks powstający z wolnego kwasu sjałowego jest rozkładany w tej temp., ale trwały w temp. 0°C. W ten sposób można oznaczyć kwas sjałowy całkowity, wolny i związany glikozydowo.

Postępowanie

1. Do roztworu badanego lub wzorcowego (zawierającego nie więcej niż 0,2 μ mole kwasu sjałowego w całkowitej objętości 250 μ l) dodać 50 μ l 0,04 M kwasu nadjodowego.
2. Wymieszać ostrożnie i w zależności od rodzaju badanego kwasu sjałowego inkubować:
 - na lodzie przez 35 minut (całkowity kwas sjałowy)
 - na lodzie 20 minut (wolny kwas sjałowy)
 - w temp. 37°C przez 60 minut (kwas sjałowy związany glikozydowo)
3. Dodać 625 μ l odczynnika rezorcynolowego, wymieszać i pozostawić na lodzie przez 5 minut, a następnie ogrzewać przez 15 minut w temp. 100°C.
4. Ochłodzić pod bieżącą wodą i dodać 625 μ l alkoholu tert-butyłowego i dobrze wymieszać.
5. Wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C w celu stabilizacji barwy, a następnie ochłodzić do temp. pokojowej.
6. Odczytać absorbancję przy długości fali 630 nm (barwa jest trwała w temp. pokojowej – po 24 godz. wartość absorbancji obniża się o 10-20%). Wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia kwasu sjałowego w zakresie 0,012-0,2 μ mole kwasu sjałowego.
7. Zawartość kwasu sjałowego obliczyć ze wzoru lub sporządzić krzywą standardową w zakresie od 0,012-0,2 μ mole kwasu sjałowego w próbie o objętości 250 μ l.

Materiały i odczynniki

- 0,04 M kwas jodowy (VII) (nadjodowy): odważyć 0,45 g kwasu nadjodowego i rozpuścić w 100 ml wody destylowanej
- odczynnik rezorcynolowy: 0,6 g rezorcynolu rozpuścić w roztworze zawierającym 60 ml 28% HCl, 1 ml 25 mM CuSO_4 (0,4 g bezwodnego CuSO_4 rozpuścić w 100 ml wody destylowanej) i 39 ml wody destylowanej
- 95% alkohol tert-butyłowy
- roztwór wzorcowy kwasu sjałowego o stężeniu 20 μ moli/10 ml: odważyć 6,2 mg kwasu sjałowego i rozpuścić w 10 ml wody destylowanej

W opracowaniu rozdziału Cukry korzystano z następujących źródeł:

Kłyszewko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii*. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Ćwiczenia z biochemii dla biologów*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.

Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.