

2. Podział węglowodanów

Ze względu na zróżnicowaną budowę, węglowodany można podzielić na dwie grupy:

- 1) **cukry proste**, tak zwane **monosacharydy** (jednocukry) – występują samodzielnie lub są częścią składową innych cukrów (jako tzw. monomery lub jednostki cukrowe); monosacharydy można podzielić:
 - w zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce – na: triozy (3 C), tetrazy (4 C), pentozy (5 C), heksozy (6 C), heptozy (7 C),
 - w zależności od posiadanej grupy funkcyjnej (karbonylowej) – na aldozy (posiadające grupę aldehydową) i ketozy (posiadające grupę ketonową);
- 2) **cukry złożone** – związki powstające w wyniku kondensacji różnej liczby cząsteczek cukrów prostych, które łączą się ze sobą wiązaniami glikozydowymi (-C-O-C-); ze względu na stopień polimeryzacji cząsteczek dzieli się je na dwie podgrupy:
 - **oligosacharydy** – zbudowane z dwóch do dziesięciu cząsteczek cukrów prostych; w zależności od liczby tworzących je monomerów wyróżniamy **disacharydy** (dwucukry), **trisacharydy** (trójcukry) itd.,
 - **polisacharydy** (wielocukry) – mają cząsteczki składające się z bardzo dużej liczby jednostek cukrowych i w wyniku ich hydrolitycznego rozkładu uwalnia się powyżej dziesięciu cząsteczek cukrów prostych, aż do kilku czy kilkudziesięciu tysięcy; mogą być zbudowane z cząsteczek tego samego cukru prostego (**homoglikany**) bądź powstawać w wyniku połączenia dwóch lub więcej rodzajów monosacharydów – wówczas są określane mianem **heteroglikanów**.

3. Funkcje węglowodanów i ich występowanie

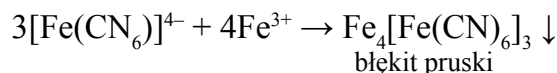
Węglowodany w organizmach żywych pełnią wielorakie funkcje. Przede wszystkim takie sacharydy złożone, jak: skrobia, glikogen, sacharoza czy inulina, stanowią materiał zapasowy i pełnią funkcję rezerwy energetycznej, czyli biorą czynny udział w magazynowaniu i uruchamianiu energii w zależności od potrzeb organizmu. Różne cukry proste, a zwłaszcza glukoza i fruktoza oraz ich pochodne fosforanowe, są ważnymi metabolitami w procesach biochemicznych, takich jak oddychanie czy fotosynteza. Wiele spośród polisacharydów oraz pochodnych cukrów odgrywa rolę strukturalną i stanowi składniki budulcowe ścian komórkowych roślin, grzybów oraz bakterii. Celuloza, hemicelulozy i lignina to podstawowe elementy strukturalne ścian komórek roślinnych. W komórkach grzybów oraz w pancerzykach owadów i skorupiaków znajduje

się chityna. U bakterii głównym składnikiem ściany komórkowej jest peptydoglikan, zawierający długie łańcuchy N-acetyloglukozoaminy. Substancje pektynowe odgrywają rolę tak zwanego „lepiszcza” łączącego komórki roślinne oraz utrzymują tkankę w stanie uwodnienia. Różne inne polisacharydy kwaśne, występujące głównie w algach morskich, pełnią funkcję regulatorów stopnia nawodnienia tkanek. Ponadto węglowodany wchodzi w skład wielu związków biologicznie czynnych. Pentozy D-ryboza i 2-deoksy-D-ryboza są składnikami kwasów nukleinowych oraz nukleotydów. Pochodne aminowe cukrów stanowią składniki substancji odpornościowych krwi. W połączeniu z białkami jako glikoproteiny wchodzi w skład niektórych białek enzymatycznych oraz białek membranowych. W połączeniu z białkami, zwanymi lektynami, pełnią funkcję pośredników w oddziaływaniach pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórką a środowiskiem zewnętrznym. Cukry mogą również tworzyć połączenia z tłuszczami (tzw. lipopolisacharydy) lub stanowić element składowy lipidów złożonych nazywanych glikolipidami. Związki takie występują w ścianie komórkowej bakterii, jak również znajdują się w błonach cytoplazmatycznych komórek. Ważnymi pochodnymi cukrów są także glikozydy o przeróżnych właściwościach, na przykład barwniki antocyjanowe, powierzchniowo czynne saponiny, toksyczne glikoalkaloidy, takie jak solanina, czy też związki pobudzające pracę serca, a więc o charakterze leczniczym.

W przyrodzie najbardziej rozpowszechniona jest glukoza, gdyż to ona powstaje jako bezpośredni produkt fotosyntezy, ponadto jest składnikiem wielu oligosacharydów (m.in. sacharozy, maltozy, laktozy) i polisacharydów (m.in. skrobi, celulozy). Naturalnymi źródłami glukozy, jak również fruktozy i dwucukru sacharozy, są owoce oraz warzywa. W większych ilościach związki te występują w miódach. Źródłami szczególnie zasobnymi w sacharozę, wykorzystywanymi na skalę przemysłową, są buraki cukrowe i trzcina cukrowa. Wiele warzyw bulwiastych, zbożowych, strączkowych oraz kłączy różnych roślin dostarcza przyswajalnych przez organizm ludzki polisacharydów, takich jak skrobia (bulwy ziemniaka, ziarno zbóż, groch, fasola) oraz inulina (kłącza topinamburu, dalii, irysa, cykorii). Produkty pochodzenia roślinnego są również źródłem węglowodanów częściowo przyswajalnych (rafinozy, stachiozy, pektyn, hemicelulozy) oraz nieprzyswajalnych (celulozy, ligniny), stanowiących składnik tak zwanego błonnika pokarmowego, który odgrywa niebagatelną rolę w procesie prawidłowego trawienia. Ważnym źródłem polisacharydów kwaśnych (jak agar-agar, karagen, kwas alginowy) są glony i wodorosty morskie. W świecie roślinnym bardzo rozpowszechnionymi substancjami są też różnego rodzaju glikozydy. Występują one w takich organach roślin, jak: kwiaty, liście, nasiona i korzenie, a ze względu na dobrą rozpuszczalność są zawarte głównie w soku roślinnym.

Spośród produktów pochodzenia zwierzęcego jedynym znaczącym źródłem węglowodanów jest mleko ssaków, które zawiera laktozę.

następnie tworzy z jonami żelaza (Fe^{3+}) związek zwany błękitem pruskim. Reakcję tę można przedstawić w następujący sposób:



Błękit pruski jest związkiem barwnym, którego powstanie świadczy o obecności aldoz. Intensywność zabarwienia tego związku zależy od ilości zredukowanego heksacyjanożelazianu (III), a tym samym od ilości cukru, który uczestniczył w tej reakcji.

Cukry mogą także redukować niektóre barwniki stosowane jako wskaźniki redoks, na przykład błękit metylenowy. Związki takie, działając jako przenośniki atomów wodoru pobranych z cukrów, w wyniku redukcji przechodzą w leukozwiązki (formy bezbarwne) i dlatego można je również wykorzystywać do wykrywania obecności cukrów redukujących.

Na właściwościach redukujących cukrów, a w szczególności na redukcji soli miedzi (II), opartych jest też kilka metod ich ilościowego oznaczania. Jedną z nich jest metoda Fehlinga, która polega na miareczkowym oznaczaniu ilości cukru redukującego w roztworze, potrzebnej do całkowitej redukcji miedzi zawartej w roztworze odczynników Fehlinga I i II, zawierających siarczan (VI) miedzi (II) i winian sodowo-potasowy oraz NaOH, o znanym mianie. Znajdujący się w roztworze winian sodowo-potasowy tworzy z jonami Cu^{2+} kompleks o niebieskim zabarwieniu. Koniec miareczkowania wyznacza moment zaniku barwy niebieskiej. Następnie oblicza się miano odczynników Fehlinga na podstawie objętości roztworu cukru o znanym stężeniu, która jest potrzebna do całkowitej redukcji 20 cm³ odczynników Fehlinga I i II. Zmodyfikowaną wersją tej metody jest powszechnie stosowana metoda Lane–Eynona.

Istnieje także wiele metod pośrednich, w których redukcja jonów miedzi (II) jest tylko pierwszym etapem oznaczenia. Do takich metod zaliczamy na przykład metodę Luffa–Schoorla czy metodę Bertranda.

7.2.2. Metody analityczne opierające się na reakcjach barwnych cukrów zachodzących w środowisku kwaśnym

Do wykrywania cukrów i ich wstępnej identyfikacji wykorzystywane są również reakcje barwne, którym cukry ulegają w środowisku kwaśnym. Podstawą tych reakcji jest przekształcenie cukrów w ich pochodne furfuralowe w wyniku odwodnienia pod wpływem silnych kwasów i podwyższonej temperatury, a następnie przeprowadzenie reakcji kondensacji z odpowiednimi związkami fenolowymi. Jak wiadomo, rodzaj tych pochodnych zależy od warunków reakcji i stąd istnieje możliwość odróżnienia pentoz od heksoz czy aldoz od ketoz. Na tych reakcjach oparte są takie próby, jak: Biała, Seliwanowa oraz Molischa.

Próba Molischa jest próbą ogólną na wykrywanie obecności cukrów, czyli charakterystyczną dla wszystkich sacharydów. Stosuje się ją do wykrywania cukrów zarówno prostych, jak i złożonych. Metoda ta polega na reakcji powstałych pochodnych furfuralowych z α -naftolem, w wyniku czego tworzy się niebiesko lub czerwono-fioletowo zabarwiony produkt kondensacji. Pamiętać jednak należy, że reakcja ta nie jest specyficzna tylko dla cukrów. Dodatni wynik dają również aldehydy, aceton, niektóre kwasy organiczne (np. mrówkowy, mlekowy) i dlatego wynik należy potwierdzić, przeprowadzając dodatkowe próby jakościowe.

Próba Biała jest stosowana do wykrywania obecności pentoz – zarówno wolnych, jak i związanych w estrach fosforanowych lub ich pochodnych metylowych (służy na przykład do wykrywania rybozy związanej w nukleotydach i kwasach nukleinowych). Odpowiednio dobrane warunki reakcji sprawiają, że powstający z pentoz furfural reaguje z orcyną i daje zielono lub niebieskozielono zabarwiony produkt końcowy. Próba ta jest również wykorzystywana do ilościowego oznaczenia pentoz. Intensywność zabarwienia zależy od ilości powstałego produktu kondensacji, a tym samym od ilości reagującego cukru. Mierząc spektrofotometrycznie (przy długości fali $\lambda = 665$ nm) ilość zaabsorbowanego światła, można oznaczyć zawartość badanych pentoz. Zasada pomiarów spektrofotometrycznych została omówiona w rozdziale „Wybrane metody...”, p. 2.

Próba Seliwanowa jest stosowana do odróżniania ketoz od aldoz oraz do ilościowego oznaczania fruktozy. Pozytywny wynik próby daje fruktoza zarówno wolna, jak i związana w sacharozie oraz inulinie. W wyniku odwodnienia cukrów, pod wpływem kwasów i wysokiej temperatury, powstaje 5-hydroksymetylofurfural (5-HMF). Tworzy się on zarówno z aldoz, jak i z ketoz, ale w określonych warunkach z ketoz tworzy się z o wiele większą wydajnością. Jeżeli cukier rozpuści się w 3-krotnie rozcieńczonym kwasie solnym i ogrzewa krótko (30 sekund) w temperaturze 100°C , to 5-HMF powstaje przede wszystkim z fruktozy. Glukoza mająca bardziej stabilną strukturę pierścieniową trudniej ulega odwodnieniu. Przedłużenie czasu ogrzewania i podwyższenie stężenia kwasu prowadzi także do powstania 5-HMF z glukozy. Powstały 5-HMF w reakcji kondensacji z rezorcyną daje produkt o wiśniowoczerwonym zabarwieniu. Ten kompleks barwny absorbuje światło z maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 520$ nm, co pozwala na spektrofotometryczne oznaczenie fruktozy.

Do oznaczeń ilościowych cukrów w laboratoriach analitycznych stosowana jest także metoda antronowa. Pozwala ona na łączne oznaczenie większości cukrów występujących w badanej próbce. Polega na przeprowadzeniu wszystkich cukrów w pochodne furfuralowe przez ogrzewanie ze stężonymi kwasami (octowym, siarkowym, solnym). Najłatwiej odwodnieniu ulegają pentozy, nieco wolniej heksozy. Oligo- i polisacharydy reagują znacznie wolniej, gdyż reakcja odwodnienia poprzedzona jest procesem hydrolizy wiązań glikozydowych. Powstałe pochodne (furfural i 5-hydroksymetylofurfural) kondensują następnie

z antronem, tworząc barwne roztwory. Oznaczanie cukrów przeprowadza się metodami spektrofotometrycznymi przy długości fali $\lambda = 620$ nm. Metoda antronowa daje dokładne wyniki, pod warunkiem że zachowane zostają identyczne parametry pomiarowe analizowanych roztworów (temperatura, czas wywoływania reakcji, ilość odczynnika).

7.3. Metody enzymatyczne

W analizie węglowodanów wykorzystuje się również metody enzymatyczne. Odznaczają się one wysoką specyficznością, czułością i dokładnością. Szczególnie duże zastosowanie znalazły metody enzymatycznego oznaczania glukozy w mieszaninach różnych cukrów. Są one wykorzystywane do oznaczeń zarówno identyfikacyjnych, jak i ilościowych. Między innymi stosuje się je do oznaczania zawartości glukozy we krwi, moczu i innych płynach ustrojowych oraz w niektórych produktach spożywczych (np. w miodach). Do oznaczania glukozy wykorzystywane mogą być takie enzymy, jak: oksydaza glukozowa, dehydrogenaza glukozowa lub zespół enzymów heksokinaza i dehydrogenaza glukozo-6-fosforanu w obecności ATP oraz NADP.

Enzym oksydaza glukozowa (oksydoreduktaza β -D-glukoza: O_2), należący do klasy oksydoreduktaz, katalizuje reakcję utleniania β -D-glukozy w obecności tlenu do D-glukono- δ -laktonu będącego bezwodnikiem kwasu glukonowego. Koenzymem uczestniczącym w reakcji katalizowanej przez oksydazę glukozową jest FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy), który w procesie utleniania glukozy przejmuje atomy wodoru od cukru i redukuje się do $FADH_2$. Następnym etapem jest utlenienie zredukowanego koenzymu ponownie do postaci FAD przez przeniesienie pobranych atomów wodoru na tlen cząsteczkowy. W wyniku tej reakcji jako drugi produkt końcowy powstaje nadtlenuk wodoru (H_2O_2). Powstający H_2O_2 może być następnie rozłożony przez kolejny enzym, peroksydazę, w obecności związku będącego donorem (dawcą) atomów wodoru. Jako donor atomów wodoru stosowany jest bezbarwny związek (tzw. chromogen), który po odwodorowaniu staje się produktem barwnym. Intensywność zabarwienia tego związku zależy od ilości wytworzonego H_2O_2 , a tym samym od ilości utlenionej glukozy. Jako związki chromogenowe wykorzystywane mogą być di-*o*-anizydyna, *o*-toluidyna, 2',2'-azyno-di-(3-etylo-benzotiazolinosulfonian-6)-diamonowy i wiele innych związków.

Do szybkich orientacyjnych, ale także ilościowych oznaczeń glukozy we krwi oraz moczu stosuje się gotowe, łatwe w użyciu testy w postaci papierowych paszków nasyconych roztworami enzymów i chromogenu. Odcień barwy powstałej po zanurzeniu testu w badanej cieczy porównuje się ze skalą barw określającą poziom glukozy. Testy takie dostępne w handlu są szczególnie przydatne diabetykom w celu kontroli poziomu cukru we krwi.

Oprócz glukozy, metodami enzymatycznymi można oznaczać inne monosacharydy oraz ich pochodne (np. L-arabinozę, D-ksylozę, D-fruktozę, D-galaktozę, kwas D-galakturonowy) i niektóre oligosacharydy (np. laktozę, maltozę, sacharozę, stachiozę).

Niektóre firmy (np. Sigma, Boehringer, Megazym) oferują gotowe zestawy odczynników do enzymatycznego oznaczania cukrów. Wśród gotowych testów są też takie, które umożliwiają oznaczanie kilku cukrów jednocześnie. Na przykład test firmy Boehringer o nazwie UV-test D-Glucose/D-Fructose pozwala na oznaczenie ilościowe glukozy i fruktozy. Oznaczenie to polega na przeprowadzeniu kilku reakcji enzymatycznych. W pierwszej kolejności glukozę i fruktozę poddaje się fosforylacji przy pH 7,6 katalizowanej przez enzym heksokinazę w obecności ATP, w wyniku czego przekształcają się one w pochodne 6-fosforanowe (glukoza-6-fosforan i fruktoza-6-fosforan). W obecności dehydrogenazy glukoza-6-fosforanowej pochodna glukozy utleniana jest do 6-fosforanowej pochodnej kwasu glukonowego z równoczesną redukcją koenzymu NADP^+ do $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Ilość wytworzonego zredukowanego koenzymu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ odpowiada ilości D-glukozy i oznaczana jest spektrofotometrycznie na podstawie absorbancji mierzonej przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$. Kolejnym etapem jest przekształcenie fruktoza-6-fosforanu do glukoza-6-fosforanu pod wpływem działania izomerazy glukoza-6-fosforanowej. Nowo powstały glukoza-6-fosforan ponownie jest utleniany w obecności NADP^+ do glukoniano-6-fosforanu. Ilość wytworzonego $\text{NADPH} + \text{H}^+$ w tej reakcji odpowiada ilości D-fruktozy. Metoda ta znalazła zastosowanie, między innymi do oznaczania fruktozy i glukozy, głównych monosacharydów występujących w miodach.

7.4. Metody chromatograficzne

Metody chromatograficzne wykorzystywane są do identyfikacji węglowodanów, badania składu mieszanin oraz do oznaczeń ilościowych. Najczęściej stosowane są: chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia gazowa (GC) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Do wykrywania i identyfikacji cukrów najczęściej wykorzystywana jest **metoda chromatografii cienkowarstwowej** (TLC) omówiona w rozdziale „Wybrane metody...”, p. 3.1.1. Rozdział cukrów prowadzi się najczęściej na polarnych nośnikach z żelu krzemionkowego lub celulozy. O możliwości rozdzielenia cukrów na tego rodzaju adsorbentach decyduje zatem hydrofilowy charakter tych związków (duża liczba grup $-\text{OH}$). W przypadku żelu krzemionkowego mamy do czynienia z chromatografią adsorpcyjną, a w przypadku celulozy – z klasyczną chromatografią podziałową.

Rozdział cukrów na żelu krzemionkowym jest uzależniony od zdolności adsorbowania się ich cząsteczek na powierzchni nośnika, a to jest związane z ich

polarnością. Wielkość adsorpcji rośnie wraz ze wzrostem liczby polarnych grup funkcyjnych. Im tych grup jest więcej, tym bardziej zwiększa się powinowactwo adsorpcyjne. Dlatego o szybkości migracji cząsteczek cukrów w fazie ruchomej decyduje wielkość cząsteczki i zawartość grup –OH, ale pewien wpływ mają także rodzaje formy izomerycznej, cyklicznej i konformacyjnej. Ogólnie można jednak przyjąć, że prędkość migracji maleje w następujący sposób: pentozy → heksozy → disacharydy → trisacharydy itd.

O rozdziale cukrów na złożach celulozowych decyduje współczynnik podziału (k), a zatem stopień powinowactwa składników rozdzielanych do fazy stacjonarnej lub ruchomej (eluentu). Cząsteczki cukrów wykazujące większe powinowactwo do fazy stacjonarnej (o większych współczynnikach podziału k) poruszają się wolniej niż te, które mają większe powinowactwo do fazy ruchomej (o mniejszych współczynnikach podziału k). Fazę stacjonarną stanowi najczęściej woda. Jako fazy ruchomej używa się dwu- lub wieloskładnikowych mieszanin polarnych rozpuszczalników organicznych. W skład tych mieszanin mogą wchodzić między innymi: propanol-2, aceton, butanol-1 i butanol-2, keton metylo-etylowy, octan etylu, pirydyna, metanol, kwas octowy.

O zdolności rozdzielczej przygotowanej wieloskładnikowej fazy ruchomej decyduje stosunek głównego rozpuszczalnika do wody. W literaturze można znaleźć wiele propozycji dotyczących składu różnych faz ruchomych. O wyborze fazy ruchomej decyduje w pewnym stopniu rodzaj stosowanego adsorbentu. Można powiedzieć, że przy odpowiednim doborze fazy ruchomej możliwe jest rozdzielanie mono-, di- i wyższych oligosacharydów oraz pentoz, heksoz, aminocukrów, kwasów uronowych i alkoholowych pochodnych cukrów.

W celu rozdzielania cukrów, przygotowany do badania roztwór oraz roztwór cukrów wzorcowych nanosi się mikropipetą na zaznaczoną na płytce linię startu w postaci małych kropli (średnica plamki do 2 mm), w objętości 5 μ l. Następnie płytkę umieszcza się w komorze chromatograficznej. Mogą być stosowane komory pionowe lub poziome. Użycie tych drugich skraca czas elucji oraz pozwala na wykorzystanie mniejszych objętości fazy ruchomej. Chromatogramy cienkowarstwowe rozwija się jedno- lub dwukierunkowo, a dokładność rozdziału zależy od ilości poszczególnych cukrów nanoszonych na płytkę. W zasadzie nie powinna ona przekraczać 5 μ g (przy większych stężeniach plamy niektórych cukrów mogą się zlewać).

Po rozwinięciu chromatogramu suszy się go w strumieniu ciepłego powietrza, a następnie wywołuje. W tym celu wykorzystuje się najczęściej właściwości redukujące cukrów i reakcje barwne pochodnych furfuralowych w środowisku kwaśnym. Do wywoływania, czyli wizualizacji chromatogramów stosuje się różne mieszaniny, których skład można znaleźć w literaturze (np. naftorezorcyna – kwas siarkowy, w skrócie NR, difenyloamina – anilina – kwas fosforowy, w skrócie DAP). Barwa plam zależy od warunków wywoływania, a zwłaszcza od

8.1.2. Wykrywanie produktów reakcji zmydlania

8.1.2.1. Wytrącanie mydeł nierozpuszczalnych w wodzie

Zasada oznaczenia

Dodanie roztworu CaCl_2 lub $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ do roztworu mydła powoduje wytrącanie mydeł nierozpuszczalnych w wodzie.

Wykonanie

Do probówki ze zmydlonym tłuszczem dodać kilka kropli roztworu CaCl_2 lub $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Odczynniki

- 5% roztwór CaCl_2
- lub $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Interpretacja wyniku

Po dodaniu roztworu CaCl_2 lub $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ wytrąca się osad.

8.1.2.2. Wysalanie mydeł

Zasada oznaczenia

Dodanie w nadmiarze silnych elektrolitów (np. NaCl) do roztworu mydła powoduje jego koagulację i wytrącenie z roztworu. Jest to proces fizyczny, który polega na odciągnięciu wody z powierzchni miceli mydła przez elektrolit, tak jak przy wysalaniu białek. Wytrącone mydło ponownie rozpuszcza się w wodzie.

Wykonanie

Do probówki ze zmydlonym tłuszczem dodać kryształiczny NaCl aż do wysycenia roztworu.

Odczynnik

- kryształiczny NaCl .

Interpretacja wyniku

Po dodaniu kryształicznego NaCl wytrąca się kłaczkowaty osad. Płyn usunąć i rozpuścić wytrącone mydło w kilku centymetrach sześciennych wody destylowanej.

8.1.2.3. Wytrącanie kwasów tłuszczowych z mydeł

Zasada oznaczenia

W wyniku działania na mydła silnych kwasów mineralnych powstają niezdysoncjowane wolne kwasy tłuszczowe. Kwas mineralny wypiera słabszy kwas organiczny z jego soli i wytrącają się kwasy tłuszczowe nierozpuszczalne w wodzie.

Identyfikację osadu można przeprowadzić na podstawie reakcji z mocznikiem. Kwasy tłuszczowe zawierające powyżej 5 atomów węgla w cząsteczce tworzą z mocznikiem krystaliczne połączenia kompleksowe. Kryształy różnią się kształtem w zależności od rodzaju kwasu.

Wykonanie

Do probówki ze zmydlonym tłuszczem dodać kilka centymetrów sześciennych 10% roztworu kwasu siarkowego.

Odczynnik

- 10% roztwór kwasu siarkowego.

Interpretacja wyniku

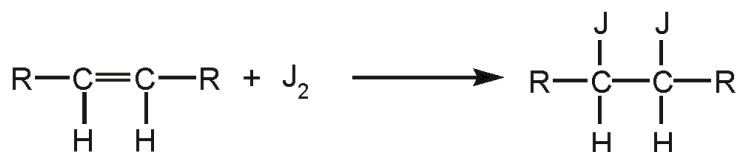
W obecności soli kwasów tłuszczowych (mydeł) wytrącają się wyższe kwasy tłuszczowe.

8.1.3. Wykrywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych

Zasada oznaczenia

Nienasycone kwasy tłuszczowe, w postaci zarówno wolnej, jak i związanej, łatwo przyłączają wodór i chlorowce (chlor, brom i jod) w miejscach wiązań podwójnych. Uwodornienie powoduje zmianę liczby i położenia wiązań podwójnych, co pociąga za sobą zmiany właściwości fizycznych i chemicznych tłuszczów. Reakcję uwodornienia wykorzystuje się w przemyśle w celu przekształcenia olejów w tłuszcze plastyczne, przydatne do wyrobu margaryn i innych tłuszczów spożywczych. W analizie tłuszczów stosuje się najczęściej reakcję jodowania, na której opiera się wyznaczanie tzw. liczby jodowej.

W omawianej reakcji wykrywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych następuje w wyniku addycji jodu w miejscu wiązań podwójnych (rys. 30). Roztwór jodu ma barwę żółtobrunatną, natomiast po addycji do wiązań podwójnych następuje odbarwienie roztworu. W reakcji uczestniczy chlorek rtęci HgCl_2 (katalizator reakcji addycji jodu).



Rys. 30. Reakcja jodowania

Wykonanie

Do probówki przenieść 2 cm³ próby badanej i dodać kilka kropli roztworu jodu – do powstania żółtego zabarwienia. Następnie wkroplić roztwór HgCl_2 .

Odczynniki

- 5% roztwór jodu w alkoholu etylowym,
- 5% roztwór HgCl_2 ,
- 5% roztwory alkoholowe kwasu olejowego i kwasu stearynowego,
- próba badana.

Interpretacja wyniku

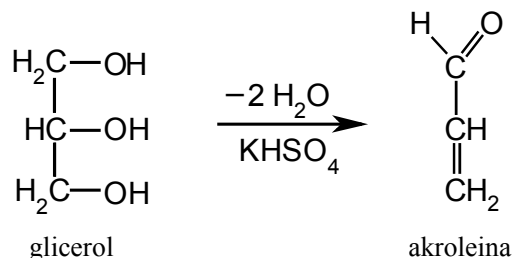
W obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych roztwór odbarwia się.

8.1.4. Wykrywanie glicerolu

Zasada oznaczenia

Wykrywanie glicerolu przeprowadza się na podstawie tzw. próby akroleinowej (rys. 31). Glicerol, będący głównym składnikiem glicerolipidów, w obecności substancji odwadniających przechodzi w akroleinę. Akroleina charakteryzuje się

przenikliwym ostrym zapachem i jako nienasycony aldehyd ma właściwości redukujące.



Rys. 31. Próba akroleinowa

Wykonanie

Do probówki wlać 2–3 krople próby badanej, a następnie dodać około 1 g KHSO_4 . Zawartość probówki ogrzewać, a następnie do jej wylotu przyłożyć pasek bibuły zanurzony w amoniakalnym roztworze AgNO_3 .

Odczynniki

- krystaliczny KHSO_4 ,
- amoniakalny roztwór AgNO_3 (kilka kropli 0,1 N roztworu AgNO_3 i 1–2 cm^3 stężonego roztworu amoniaku),
- próba badana.

Interpretacja wyniku

Pod wpływem akroleiny wydziela się metaliczne srebro, dlatego pasek ulega zbrunatnieniu.

8.2. Wykrywanie składników glicerofosfolipidów

Zawartość fosfolipidów w tłuszczach roślinnych i zwierzęcych jest zróżnicowana. W przypadku roślin można je znaleźć przede wszystkim w nasionach, a ich ilość zależy od gatunku i odmiany roślin. Zapaszowe tłuszcze zwierzęce są ubogie w fosfolipidy (np. smalec zawiera tylko 0,05% fosfolipidów), natomiast w żółtku jaja znajdują się one w ilości około 20%. Wśród fosfolipidów dominują fosfatydylocholina, czyli lecytyny, przy czym w niektórych tłuszczach stanowią one ponad połowę ogólnej zawartości fosfolipidów. Lecytyny wykrywa się na podstawie reakcji podobnych do przeprowadzonych dla tłuszczów właściwych, włączając w to wykrywanie choliny i fosforu. Inne fosfolipidy (kefaliny, fosfatydyloseryny) identyfikuje się przez wykrywanie grupy aminowej na podstawie reakcji z ninhydryną oraz obecności fosforu. Przeprowadza się w tym celu reakcje jakościowe, bezpośrednio lub po rozdzieleniu badanego tłuszczu na chromatogramie cienkowarstwowym.

8.2.1. Wykrywanie glicerolu

Badanie przeprowadza się w sposób opisany dla lipidów właściwych (p. 8.1.4).

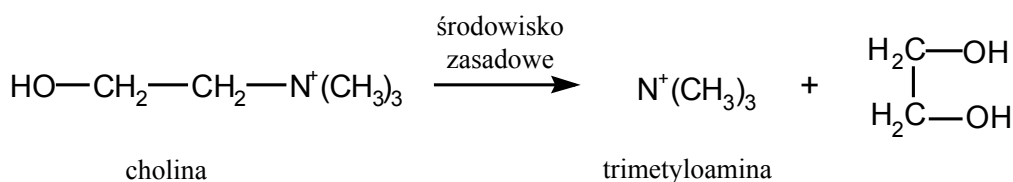
8.2.2. Zmydlanie glicerofosfolipidów

Niewielką ilość próby badanej ogrzewa się w probówce z kilkoma centymetrami sześciennymi 10% roztworu KOH aż do całkowitego rozpuszczenia. Zawartość probówki ochładza się, a następnie postępuje w sposób opisany dla tłuszczów właściwych (p. 8.1.1).

8.2.3. Wykrywanie choliny – metoda chemiczna

Zasada oznaczenia

Podczas hydrolizy zasadowej lecytyn uwalniają się zarówno kwasy tłuszczowe, jak i cholina (rys. 32). W podwyższonej temperaturze cholina rozkłada się do trimetyloaminy charakteryzującej się przykrym śledziowym zapachem.



Rys. 32. Wykrywanie choliny

Wykonanie

Niewielką ilość próby badanej przenieść do probówki, dodać kilka centymetrów sześciennych 10% roztworu KOH lub NaOH, a następnie ogrzewać w łaźni wodnej. Podczas ogrzewania zbadać zapach wydzielający się z probówki oraz odczyn par.

Odczynniki

- próba badana (roztwór w mieszaninie chloroform–metanol w stosunku 19:1),
- 10% roztwór KOH lub NaOH.

Interpretacja wyniku

W obecności trimetyloaminy papierek lakmusowy przyłożony do wylotu probówki wskazuje odczyn zasadowy.

8.2.4. Wykrywanie choliny – metoda chromatografii cienkowarstwowej

Zasada oznaczenia

Cholinę jako składnik lecytyn można wykryć na chromatogramie cienkowarstwowym przy użyciu odczynnika Dragendorffa. Tłuszcze zawierające cholinę pojawiają się jako pomarańczowe lub pomarańczowoczerwone plamy na żółtym tle.

Wykonanie

Na płytkę pokrytą warstwą celulozy nanieść kilka (2–5) kropli próby badanej w postaci okrągłej plamy lub pasma. Chromatogram wywołać bez

Odczynniki

- odczynnik Dragendorffa,
- próba badana (roztwór w mieszaninie chloroform–metanol w stosunku 19:1).

rozwijania. W tym celu odczynnik Dragendorffa wlać do małej kuwety i przeciągnąć w nim chromatogram. Następnie chromatogram wysuszyć w temperaturze pokojowej i ogrzewać w temperaturze 60°C przez około 2 minuty.

8.3. Rozdział lipidów metodą chromatografii cienkowarstwowej

Zasada oznaczenia

Do rozdziału lipidów stosuje się płytki pokryte żelalem krzemionkowym i mieszaniny rozwijające, w skład których wchodzi: eter etylowy, eter naftowy i kwas octowy. Technika ta pozwala rozdzielić i uwidocznić na chromatogramie frakcje wolnych kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, cholesterolu i jęgo estrów.

Wykonanie

Nanoszenie prób

Na płytkę z żelu krzemionkowego z gipsem, w odległości 1,5–2 cm od brzegu, nanieść za pomocą mikropipety po 30 μ l próby badanej i próby wzorcowej w postaci pasm. W tym celu około 5 kropli roztworu nanosić na linię startu jedną obok drugiej tak, aby utworzyło się pasmo o długości około 1 cm.

Rozwijanie chromatogramu

Na dno komory wlać mieszaninę rozwijającą na wysokość około 1 cm, aby miejsca z naniesioną na płytkę próbą badaną znajdowały się nad powierzchnią płynu. Chromatogram wstawić do komory i rozwijać techniką wstępującą do chwili, aż front rozpuszczalnika przesunie się w pobliże górnego brzegu płytki. Rozwiniętą płytkę wyjąć i wysuszyć pod wyciągiem.

Wywoływanie chromatogramu

Chromatogram spryskać mieszaniną wywołującą, a następnie ogrzewać w temperaturze 120–130°C do momentu pojawienia się plam o szaroniebieskim zabarwieniu.

Interpretacja wyniku

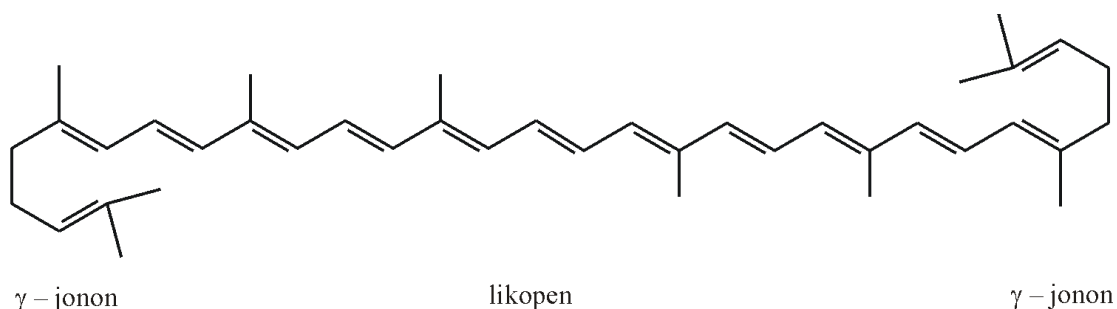
Po wywołaniu plam oblicza się wartości R_f (rozd. „Wybrane metody...”, p. 3.1.2).

Odczynniki

- próba badana (50 mg badanego tłuszczu rozpuszcza się w 5 cm^3 mieszaniny chloroform–metanol w stosunku 2:1),
- próba wzorcowa (po 30 mg kwasu stearynowego i trójpalmitynianu glicerolu oraz 1 mg cholesterolu rozpuszcza się w 1 cm^3 mieszaniny chloroform–metanol w stosunku 2:1),
- mieszanina rozwijająca: eter naftowy–eter etylowy–kwas octowy (90:10:1),
- mieszanina wywołująca: 1 g molibdenianu amonowego rozpuszcza się w 8 cm^3 wody, dodaje 3 cm^3 stężonego kwasu solnego, 2 cm^3 12 M kwasu nadchlorowego i 86 cm^3 acetonu.

niczy w procesie widzenia w przyćmionym świetle (objawem niedoboru witaminy A jest tzw. kurza ślepotą). Rodopsyna zawiera aldehydową pochodną retinolu, izomer 11-12-*cis*-retinal, który jest połączony z białkiem opsyną. Pod wpływem kwantów energii świetlnej *cis*-retinal przekształca się w *trans*-retinal, co powoduje przesłanie odpowiedniego bodźca biochemicznego do nerwu wzrokowego i wyzwolenie procesu widzenia. W ciemności następuje ponowne przekształcenie izomeru *trans* w *cis* i w ten sposób oko jest gotowe do odebrania kolejnych impulsów światła.

Spośród innych funkcji witaminy A należy wymienić jej właściwości przeciwutleniające. Wykazują je zarówno karotenoidy o właściwościach prowitaminowych, jak i te, które nie są prekursorami witaminy A. Zdolność inaktywacji wolnych rodników wynika z występowania licznych wiązań nienasyconych w strukturze karotenoidów, przy czym im większa ich liczba, tym dany związek wykazuje większą aktywność w tym kierunku. Bardzo znaczącym przeciwutleniaczem jest likopen (rys. 45), który zawiera aż 13 wiązań podwójnych (nie posiada β -jononu, czyli nie jest prowitaminą).



Rys. 45. Likopen

Witamina A należy do witamin, których zażywanie w dużych ilościach i przez dłuższy czas może być niebezpieczne. Uszkodzenia mogą dotyczyć oczu, kości, krwi, skóry, ośrodkowego układu nerwowego czy wątroby (zwłaszcza u dzieci). Objawy to głównie nadmierna pobudliwość, zmęczenie, nudności, bóle głowy, wypadanie włosów, suchość i swędzenie skóry, biegunki, powiększenie śledziony i wątroby. W cięższych zatruciach dochodzi do ślepoty i zaburzeń psychicznych. U kobiet w ciąży wzrasta ryzyko wystąpienia wad wrodzonych płodu. Należy wspomnieć, że β -karoten i inne prowitaminy nie są toksyczne nawet w nadmiarze i można je przyjmować bez ograniczeń, ponieważ organizm produkuje z nich tylko taką ilość witaminy A, jaka jest potrzebna.

Zawartość retinolu można oznaczyć za pomocą metod spektrofotometrycznych przez pomiar absorbancji światła w zakresie UV ($\lambda = 325$ nm). Ta metoda może jednak być stosowana tylko do analizy prób o dużym stężeniu (np. środków farmaceutycznych). Zastosowanie mają też metody kolorymetryczne, które

opierają się na reakcjach barwnych z takimi związkami, jak na przykład kwas trichlorooctowy lub trifluorooctowy, etylen, chlorek metylenu lub trichlorek antymonu. Z ostatnim spośród wymienionych odczynników retinol tworzy kompleks o niebieskim zabarwieniu.

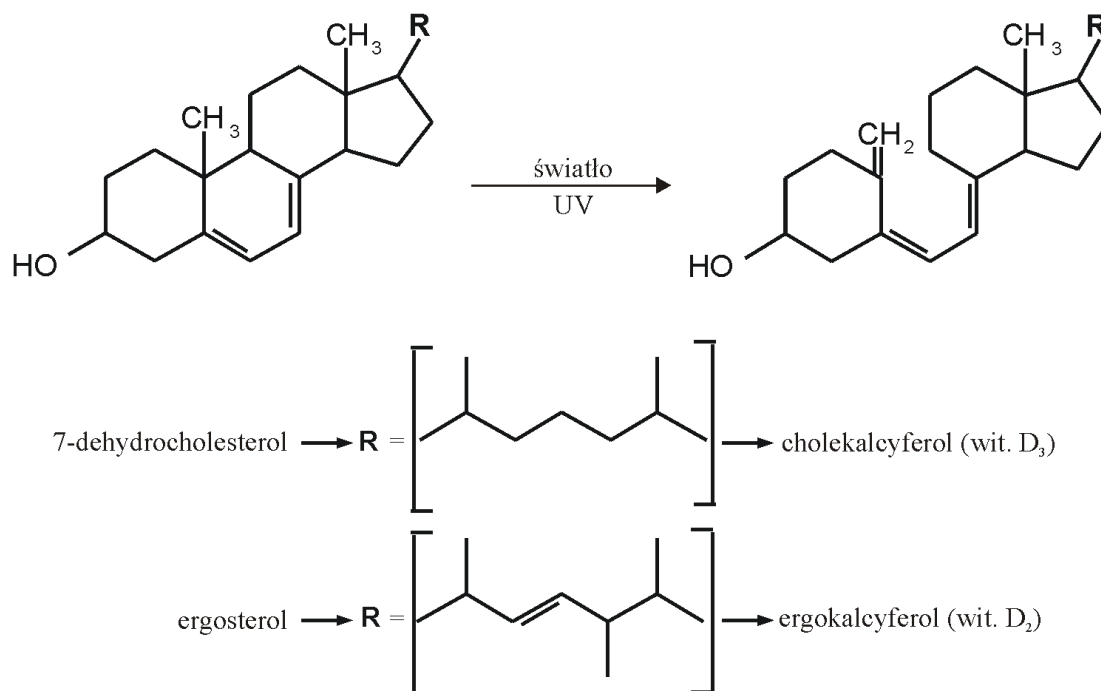
Najbardziej rozpowszechnioną metodą, w której do oznaczeń ilościowych retinolu wykorzystywany jest trichlorek antymonu, jest metoda Carra–Price’a. Przed wykonaniem reakcji barwnej należy wyizolować z badanej próby czystą frakcję zawierającą retinol. W tym celu wykonuje się reakcję zmydlenia próby i z użyciem eteru naftowego wydziela frakcję niezmydlającą się, która jest następnie oczyszczana metodami chromatograficznymi (np. chromatografia adsorpcyjna na tlenku glinu). Po zebraniu frakcji zawierającej retinol przeprowadza się reakcję barwną i dokonuje pomiaru absorbancji w zakresie światła widzialnego ($\lambda = 620 \text{ nm}$). Bardzo powszechne w ostatnim czasie są też metody wykorzystujące wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

W celu ilościowego oznaczenia karotenoidów, podobnie jak w przypadku retinolu, wykonuje się wstępnie ich ekstrakcję z wykorzystaniem rozpuszczalników niepolarnych (przeważnie jest ona poprzedzona zmydleniem). Następnie, najczęściej z wykorzystaniem chromatografii adsorpcyjnej na tlenku glinu, można przeprowadzić rozdział karotenoidów zawartych w ekstrakcie. Ilość karotenoidów w zebranych frakcjach oznacza się na podstawie wykonania pomiarów absorpcji światła widzialnego o długościach fal odpowiadających maksimum absorpcji poszczególnych związków (np. dla β -karotenu analityczna długość fali wynosi 451 nm, ewentualnie 426 nm). Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów absorbancji stężenie danych karotenoidów w analizowanych próbach odczytuje się z odpowiednich krzywych wzorcowych.

7.1.2. Witamina D

Obecnie znanych jest około dwunastu związków o aktywności witaminy D. Wszystkie są pochodnymi steroli i zawierają w swej budowie tzw. skondensowane pierścienie steroidowe, do których dołączony jest łańcuch boczny.

Witaminy D biorą udział w metabolizmie wapnia i fosforu. W organizmie gromadzone są w wątrobie, a zgromadzone zapasy wystarczają na pokrycie zapotrzebowania na nie przez okres od kilku do kilkunastu tygodni. Z punktu widzenia aktywności biologicznej najważniejszą rolę odgrywają cholekalcyferol, czyli witamina D_3 , oraz ergokalcyferol – witamina D_2 (rys. 46). Przemysłowo produkuje się też tylko te dwie witaminy, ponieważ inne kalcyferole mają bardzo niewielką aktywność biologiczną. Aktywne cząsteczki witamin powstają z odpowiednich prowitamin w wyniku przemian zachodzących pod wpływem światła UV. W organizmie zwierząt cholekalcyferol tworzy się po fotochemicznym rozszczepieniu 7-dehydrocholesterolu (pęknięciu ulega wiązanie pomiędzy węglem C-9 i C-10). Ta prowitamina powstaje w wyniku utlenienia cholesterolu i gromadzi się w powierzchniowych



Rys. 46. Prowitaminy witaminy D (7-dehydrocholesterol i ergosterol) oraz witamina D₃ (cholekalcyferol) i witamina D₂ (ergokalcyferol)

warstwach skóry, gdzie dociera światło słoneczne. Prowitaminą witaminy D₂ jest ergosterol zaliczany pierwotnie do mykosteroli, ponieważ występuje w znacznych ilościach w komórkach pleśni i drożdży. Poza grzybami wykryto go również u ślimaków i pierścienic. Co ciekawe, niektóre artykuły spożywcze zawierające znaczne ilości ergosterolu wzbogaca się w witaminę D poprzez ich naświetlanie.

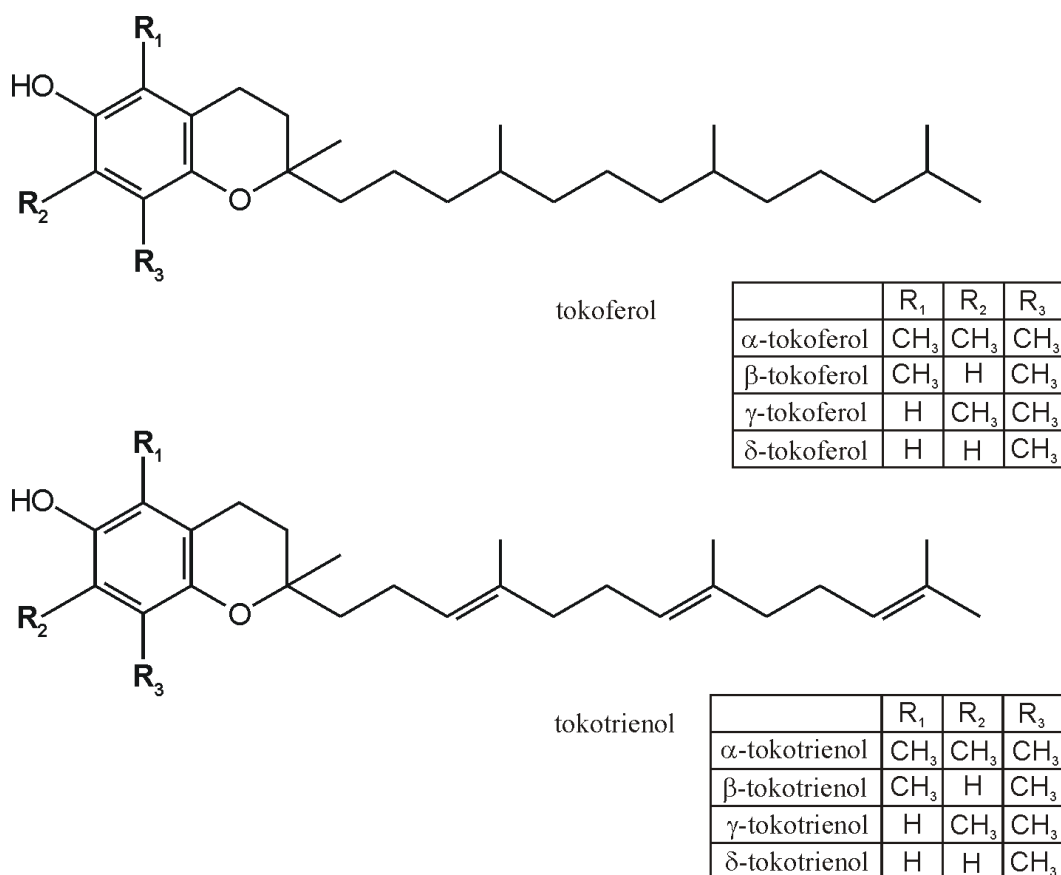
Witamina D występuje tylko w nielicznych produktach żywnościowych. W związku z tym istnieje ryzyko jej niedoboru, zwłaszcza w zimniejszych rejonach naszego globu. Niedobór witaminy D jest szczególnie niebezpieczny u dzieci ze względu na możliwość wystąpienia krzywicy. Zatem uzasadnione jest wzbogacanie niektórych artykułów spożywczych w tę witaminę. Jednak należy zachować ostrożność w przyjmowaniu znacznych jej ilości, szczególnie w postaci preparatów farmaceutycznych, gdyż w nadmiarze jest ona bardzo toksyczna. Do przedawkowania dochodzi przy zażywaniu witaminy D w dawkach dobowych przekraczających 25–75 μg/kg masy ciała (m.c.) dla dorosłych oraz 75–100 μg/kg m.c. dla niemowląt. Przy długotrwałym zażywaniu większych dawek dochodzi do uwalniania wapnia z kości i związanego z tym zwapnienia tkanek miękkich, w tym szczególnie nerek, naczyń krwionośnych, mięśnia sercowego. U dzieci dodatkowo pojawiają się zaburzenia wzrostu.

Oznaczanie witaminy D w produktach spożywczych jest dosyć skomplikowane. Należy uwzględnić to, że ta witamina występuje w większości artykułów

spożywczych w niewielkiej ilości. Jedynie nieliczne produkty, takie jak ryby (szczególnie węgorz), grzyby i wzbogacane margaryny, zawierają ilość witaminy D możliwą do wykrycia metodami chemicznymi. W celu wykonania oznaczeń ilościowych witaminy D na wstępie prowadzi się reakcję zmydlania, a następnie chromatograficznie oczyszczoną frakcję niezmydlającą się poddaje analizie z wykorzystaniem HPLC. Rzadziej w analizie ilościowej witaminy D stosuje się reakcje barwne z chlorkiem antymonu lub z chlorowodorkiem aniliny.

7.1.3. Witamina E

Aktywność witaminy E wykazuje około jedenastu związków. Są one dosyć szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Mają układ chromanu, do którego dołączony jest łańcuch boczny zawierający 13 atomów węgla. W przypadku pochodnych tokoferolu łańcuch boczny nie zawiera wiązań podwójnych, natomiast pochodne tokotrienolu posiadają trzy wiązania nienasycone (rys. 47). Obie te grupy związków są zaliczane do witamin E. Związki będące witaminą E są wrażliwe na promieniowanie UV i środki utleniające (znacznie trwalsze są ich pochodne, takie jak octany czy bursztyniany).



Rys. 47. Tokoferole i tokotrienole

Największą aktywność biologiczną wykazuje α -tokoferol, jego homolog β posiada 30–50% tej aktywności, a pozostałe tokoferole i tokotrienole od 1 do 20%. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że wszystkie tokoferole i tokotrienole mają aktywność przeciwutleniającą, która rośnie od α - do δ -, czyli odwrotnie niż aktywność biologiczna (decydujące znaczenie ma tu znacznie szybsze wydalanie z organizmu homologów β - i γ - niż α -tokoferolu, co wpływa na ich obniżoną aktywność biologiczną). Mimo że w organizmie człowieka występuje rozbudowany system antyoksydacyjny, witamina E jest jednym z ważniejszych „wyłapywaczy” tlenu singletowego i rodników nadtlenkowych. Przerywa też łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów.

Niedobór tokoferoli jest przyczyną wielu chorób metabolicznych, których genezę wiąże się z brakiem zdolności przeciwutleniających określonych tkanek. Zapotrzebowanie na witaminę E jest trudne do ustalenia. Wiadomo jednak, że wzrasta wraz ze zwiększaniem się w diecie nienasyconych kwasów tłuszczowych, które w dużej ilości występują w olejach ryb. Przyjmuje się, że na 1 g wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawartych w spożywanych produktach powinno przypadać około 0,6 mg α -tokoferolu.

Oznaczanie tokoferoli prowadzi się najczęściej z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC) oraz wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Wstępnie należy wykonać zmydlenie analizowanej próby i wydzielić frakcję niezmydlającą się, w której identyfikuje się i oznacza zawartość tokoferoli na podstawie czasów retencji i wysokości pików. Można też wykorzystać do analizy ilościowej metody kolorymetryczne oparte najczęściej na reakcji Emmerie-Engla, gdzie dochodzi do przekształcenia tokoferoli w tokoferylochinony. Pochodne te mogą dawać barwne produkty z α, α' -bipirydylem (pomiar absorpcji przy $\lambda = 520$ nm) lub z 4,7-difenylo-1,10-fenantroliną (pomiar absorpcji przy $\lambda = 534$ nm).

7.1.4. Witamina K

Związki należące do tej grupy są pochodnymi niewystępującego naturalnie menadionu (witamina K_3) wywodzącego się z naftochinonu. W przyrodzie spotyka się natomiast jego pochodne zawierające łańcuch boczny, w którym może być obecne jedno wiązanie podwójne (witaminy szeregu K_1) lub więcej (witaminy szeregu K_2). Najważniejszym przedstawicielem witamin K_1 jest dostarczany z pożywieniem filochinon, który zawiera 20 atomów węgla w łańcuchu bocznym. Witaminy K_2 są wytwarzane przez florę jelitową człowieka. Zaliczamy do nich na przykład menachinon-6 i menachinon-7, które mają odpowiednio 30 i 35 atomów węgla w łańcuchu bocznym i są oznaczane jako $K_2(30)$ i $K_2(35)$. Wzory chemiczne menadionu i menachinonu- n pokazano na rysunku 48.

Wolna witamina K jest wrażliwa na światło, czynniki utleniające oraz silne kwasy i zasady. Trwalsze są jej pochodne estrowe (octany, fosforany). Witamina K jest jednym z czynników odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesu