

4. ANALIZA JAKOŚCIOWA CUKRÓW

Cukrowce (sacharydy) stanowią grupę związków organicznych wyprowadzonych z klasy stosunkowo prostych substancji określanych jako cukry proste czyli monosacharydy. Oprócz cukrów prostych, do cukrowców zaliczamy:

- proste pochodne monosacharydów tj. estry fosforanowe, deoksycukry, kwasy cukrowe, aminocukry,
- cukry złożone, czyli produkty kondensacji dwóch (disacharydy), 3–10 (oligosacharydy) lub większej liczby (polisacharydy) jednostek monosacharydowych.

Pod względem chemicznym monosacharydy są to polihydroksyaldehydy lub polihydroksyketony. Ze względu na rodzaj grupy karbonylowej monosacharydy dzieli się na aldozy i ketozy a biorąc pod uwagę liczbę atomów węgla: na triozy, tetrozy, pentozy, heksozy itd. W cząsteczkach cukrów prostych występuje 1 lub więcej asymetrycznych atomów węgla tj. atomów węgla połączonych z 4 różnymi atomami lub grupami atomów. Obecność tych atomów warunkuje występowanie cukrów w licznych odmianach izomerycznych (enancjomery, epimery, anomery). Dzięki obecności grupy karbonylowej, monosacharydy w środowisku zasadowym redukują (a same się utleniają) jony metali, co stanowi podstawę wielu oznaczeń jakościowych i ilościowych cukrów.

Disacharydy są O-glikozydami, których cząsteczki powstają w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek monosacharydów. Wiązanie glikozydowe powstaje pomiędzy ugrupowaniem hemiacetalowym (lub hemiketalowym) jednego monosacharydu oraz jedną z grup hydroksylowych drugiego monosacharydu. W zależności od natury reagującej grupy hydroksylowej drugiego monosacharydu, disacharydy dzielimy na dwie klasy:

- disacharydy redukujące (tzw. typ maltozy) utworzone w wyniku przereagowania jednej z grup alkoholowych drugiego monosacharydu,
- disacharydy nieredukujące (tzw. typ trehalozy), których wiązanie glikozydowe utworzone jest z udziałem grupy hydroksylowej ugrupowania hemiacetalowego drugiego monosacharydu.

Polisacharydy to wielkocząsteczkowe cukrowce, które powstają w wyniku polikondensacji monosacharydów, łączących się wiązaniami glikozydowymi. Tworzące się łańcuchy mogą być proste lub rozgałęzione. Polisacharydy dzielimy na dwie klasy:

- homogliki, zbudowane z jednakowych jednostek monosacharydowych, np. skrobia, glikogen, celuloza, chityna,
- heterogliki, zbudowane z różnych jednostek monosacharydowych, np. heparyna, kwas hialuronowy.

Monosacharydy pełnią funkcję wysokoenergetycznego paliwa biochemicznego, są postacią transportową cukrowców w organizmach zwierzęcych oraz są składnikami budulcowymi innych cukrowców i związków biologicznych z innych klas. Disacharydy są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym, funkcjonując jako formy

transportowe lub zapasowe, natomiast polisacharydy pełnią funkcje zapasowe lub strukturalne.

Do wykrywania i rozróżniania cukrowców stosuje się dwie podstawowe grupy reakcji, wykorzystujące następujące własności tych związków:

1. Pod wpływem mocnych kwasów nieorganicznych cukry ulegają odwodnieniu do pochodnych furfuralowych. Heksozy tworzą w tych warunkach 5-hydroksymetylofurfural, a pentozy furfural. Powstałe pochodne furfuralowe mogą kondensować z różnymi związkami aromatycznymi: fenolami, chinonami czy aminami aromatycznymi, tworząc kompleksy o charakterystycznych zabarwieniach.
2. Cukry posiadające wolną grupę karbonylową wykazują silne właściwości redukujące.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Natura chemiczna cukrowców i ich klasyfikacja.
- Budowa, nazewnictwo, stereoizomeria oraz właściwości chemiczne monosacharydów (student powinien umieć narysować formy łańcuchowe i pierścieniowe podstawowych monosacharydów jak: glukoza, fruktoza, mannoza, galaktoza, ryboza, deoksuryboza szeregów L i D w odmianach anomerycznych α i β).
- Wiązania glikozydowe, typy wiązań glikozydowych: O-, N-, S-glikozydowe (student powinien umieć narysować wskazany disacharyd np. β -D-galaktopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopiranozę).
- Disacharydy występujące powszechnie w przyrodzie – budowa, nazewnictwo, właściwości chemiczne i fizyczne.
- Homoglikany występujące powszechnie w przyrodzie (skrobia, glikogen, celuloza, chityna) – budowa, właściwości, synteza.
- Heteroglikany występujące powszechnie w przyrodzie (glikozoaminoglikany).
- Funkcje biologiczne cukrowców (monosacharydów, disacharydów, polisacharydów).
- Glikoproteiny i proteoglikany – budowa i funkcje.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

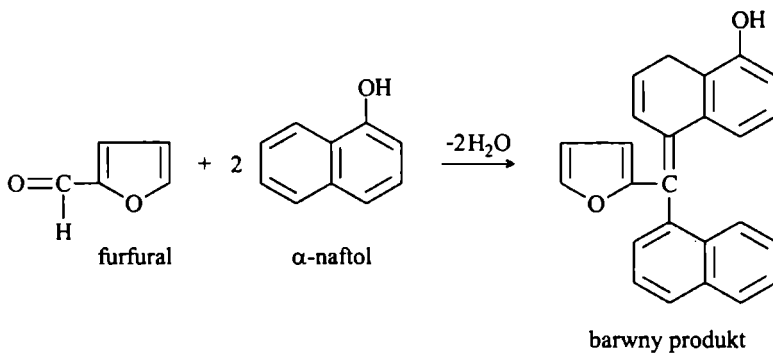
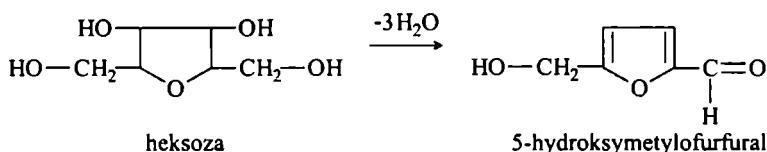
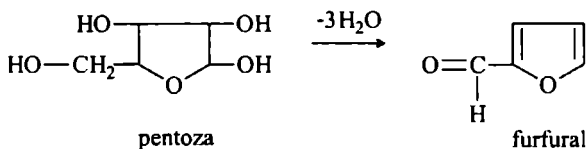
4.1. Analiza jakościowa cukrów prostych. Identyfikacja nieznanego cukrowca

Każda grupa studentów otrzymuje dwie próbki roztworów cukrów. Jej zadaniem jest zidentyfikowanie cukrów zawartych w próbkach poprzez przeprowadzenie wybranych reakcji z przedstawionych poniżej. W trakcie przygotowywania się do ćwiczeń (przed przyjściem na ćwiczenia) studenci powinni opracować optymalny schemat postępowania (tak, aby rozpoznać cukier stosując jak najmniejszą liczbę reakcji). Do każdej prowadzonej reakcji powinni zastosować kontrolę pozytywną i kontrolę negatywną. Na przykład jeśli student przypuszcza, że jego próbka zawiera arabinozę, powinien przeprowadzić reakcję na 3 próbach: swojej próbce, pentozie (kontrola pozytywna) i heksozie (kontrola negatywna).

4.1.1. Reakcja Molischa

ZASADA:

W środowisku silnie kwaśnym cukier ulega odwodnieniu do furfuralu (lub jego pochodnej), który kondensuje z α -naftolem. Reakcję dają wszystkie rozpuszczalne cukrowce. Również nierozpuszczalne cukrowce w powyższych warunkach dają fioletowe zabarwienie na granicy faz.



WYKONANIE:

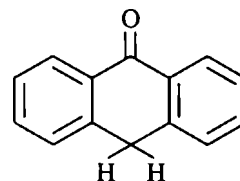
Do 1 ml 1% roztworu glukozy dodać 2 krople świeżo przygotowanego 10% alkoholowego roztworu α -naftolu i wymieszać. Następnie podwarstwić około 1 ml stężonego H_2SO_4 . Na granicy faz tworzy się fioletowy pierścień.

4.1.2. Metoda antronowa

(reakcja charakterystyczna dla cukrów obojętnych)

ZASADA:

Pierwszy etap polega na przeprowadzeniu cukru w jego pochodną furfuralową (jak w odczynie Molischa), która następnie tworzy z antronem kompleks o barwie zielonej. Aminocukry dają w tej reakcji odczyn ujemny. Metoda antronowa jest wykorzystywana do ilościowego oznaczania cukrów.



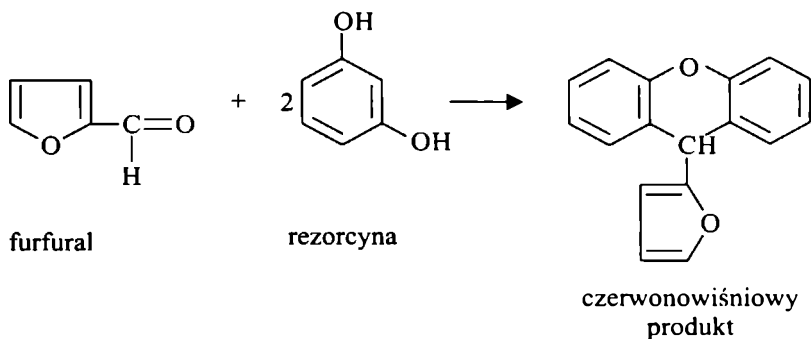
WYKONANIE:

Do suchej próbki odmierzyć 1 ml roztworu glukozy, a następnie dodać 1 ml 0,2% antronu w stężonym H_2SO_4 (**UWAGA:** z roztworem antronu należy postępować z taką ostrożnością jak ze stężonym kwasem siarkowym) i dokładnie wymieszać. Pojawia się zielone zabarwienie.

4.1.3. Reakcja Seliwanowa (reakcja charakterystyczna dla ketocukrów)

ZASADA:

Pierwszy etap polega na przeprowadzeniu ketocukru w jego pochodną furfuralową (jak w odczynie Molischa), która ulega kondensacji z rezorcyną (1,3-dihydroksybenzen) dając produkt o czerwonościowej barwie. Dodatni odczyn Seliwanowa dają wszystkie ketopentozy, ketoheksozy i oligosacharydy zawierające ketozy, ale istotne jest zachowanie odpowiednich warunków. Bardzo ważne są: stężenie użytego kwasu oraz czas ogrzewania. 12% HCl i 30 sekund ogrzewania wystarczy do przeprowadzenia ketoz w hydroksymetylofurfural, natomiast aldozy pozostają w tych warunkach niezmienione. Jeżeli jednak użyje się kwasu bardziej stężonego lub zastosuje dłuższy czas ogrzewania, wówczas również aldozy dają dodatni odczyn Seliwanowa.



WYKONANIE:

Do 2 ml 1% roztworu fruktozy oraz do 2 ml 1% roztworu glukozy dodać po 1 ml stężonego HCl (otrzymuje się roztwór o stężeniu 12%), ogrzać i utrzymywać we wrzeniu przez 30 sekund. Mieszaninę ostudzić, dodać kilka kryształków rezorcyny i ponownie ogrzać do wrzenia; zaobserwować pojawienie się czerwonościowego zabarwienia w próbce z fruktozą. Porównać wynik testu przeprowadzonego z roztworami glukozy i fruktozy.

4.1.4. Reakcja Biała (reakcja charakterystyczna dla pentoz)

ZASADA:

Pierwszy etap polega na przeprowadzeniu pentozy w furfural (jak w odczynie Molischa), który w obecności jonów Fe^{3+} ulega kondensacji z orcyńną (2,3-dihydroksy-5-metylobenzen) dając produkt o zielononiebieskiej barwie. 5-hydroksymetylofurfural (produkt odwodnienia heksoz) reaguje z orcyńną znacznie słabiej dając produkt o barwie oliwkowobrazowej.

WYKONANIE:

Do dwóch probówek odmierzyć po 1 ml odczynnika orcynowego (roztwór orcyny i FeCl_3 w HCl) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 3 min. Do jednej probówki dodać 1 ml roztworu arabinozy, a do drugiej 1 ml roztworu glukozy i kontynuować ogrzewanie we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Porównać wynik reakcji odczynnika orcynowego z pentozą i heksozą.

4.1.5. Reakcja Elsona-Morgana (reakcja charakterystyczna dla aminocukrów)

ZASADA:

Aminocukry ulegają acetylowaniu pod wpływem acetyloacetonu. Utworzona pochodna ulega w środowisku alkalicznym cyklizacji do oksazolu, który ulega kondensacji z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem, tworząc kompleks o barwie różowej.

WYKONANIE:

Przygotować alkaliczny roztwór acetyloacetonu przez dodanie 100 μl acetyloacetonu do 4,9 ml Na_2CO_3 . Do 1 ml roztworu chlorowodoru glukozoaminy (0,01%) oraz do 1 ml roztworu glukozy dodać po 0,5 ml alkalicznego roztworu acetyloacetonu, zamieszać, zamknąć szklanym korkiem i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 min. Lekko oziębnić i dodać po 2,5 ml 96% etanolu i po 0,5 ml odczynnika Ehrlicha (roztwór *p*-dimetyloaminobenzaldehydu w HCl). Porównać wynik testu dla glukozy i glukozoaminy.

4.1.6. Odczyny redukcyjne

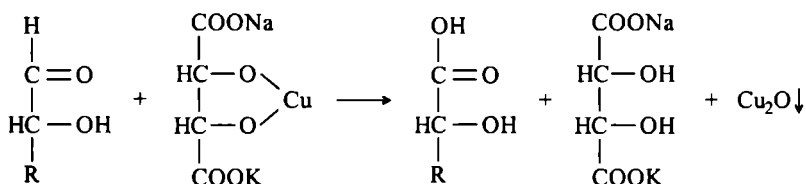
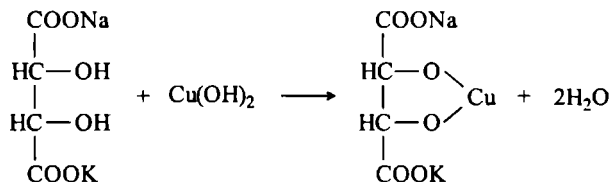
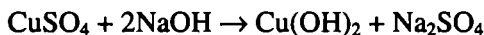
Cukry proste w roztworach obojętnych lub słabo kwaśnych występują w formach pierścieniowych, w których grupa aldehydowa lub ketonowa cukru jest zaangażowana w tworzenie wiązania półacetalowego. W środowisku zasadowym lub silnie kwaśnym formy pierścieniowe przechodzą w formy łańcuchowe i powstające wolne grupy aldehydowe lub ketonowe mogą ujawnić swoje właściwości redukujące. W disacharydach, w których w połączeniu pomiędzy monosacharydami nie uczestniczy węgiel anomeryczny jednego z monosacharydów (maltoza, laktoza), możliwe jest otwarcie pierścienia tego monosacharydu i odtworzenie wolnej grupy karbonylowej, przez co cukier wykazuje własności redukujące. Sacharoza nie wykazuje własności redukujących, gdyż jest połączeniem glukozy i fruktozy, w którym wiązanie O-glikozydowe zostało utworzone pomiędzy anomerycznymi atomami węgla obu monosacharydów.

Właściwości redukujące stanowią podstawę wielu metod analitycznych, służących do wykrywania i ilościowego oznaczania cukrów. Najbardziej znane próby polegają na redukcji przez cukier kationów metali (Cu^{2+} — próba Fehlinga, Benedicta, Trommera, Barfoeda; Bi^{3+} — próba Nylandera; Ag^+ — próba Tollensa). Cukry redukujące kationy metali same utleniają się do kwasów cukrowych. Aldozy utleniają się do kwasów aldonowych, natomiast bardziej skomplikowane utlenianie ketoz prowadzi do rozbicia cząsteczki i powstania mieszaniny kwasów.

4.1.6.1. Odczyn Fehlinga

ZASADA:

W odczynie Fehlinga redukcji ulega Cu^{2+} do Cu^+ . Używa się odczynnika Fehlinga I, który zawiera CuSO_4 oraz odczynnika Fehlinga II, który zawiera NaOH i winian sodowo-potasowy. Winian sodowo-potasowy zapobiega wytrącaniu się osadu $\text{Cu}(\text{OH})_2$, co może nastąpić przy małej ilości cukru. Sól ta wiąże jony Cu^{2+} tworząc kompleksową sól kwasu winowego.



WYKONANIE:

W jednej probówce mieszać 1 ml roztworu Fehlinga I i 1 ml roztworu Fehlinga II. Do drugiej probówki nalać 2 ml 1% roztworu glukozy i zawartość obu probówek ogrzewać do wrzenia. Oba roztwory zlać razem. Pojawia się zabarwienie lub brunatnoczerwony osad wydzielonego Cu_2O .

4.1.6.2. Odczyn Barfoeda

(odróżnienie cukrów prostych od dwucukrów redukujących)

ZASADA:

Odczyn ten stanowi modyfikację reakcji Fehlinga. Redukcję jonów miedzi prowadzi się w środowisku słabo kwaśnym (rozcieńczony roztwór kwasu mlekowego), w którym redukcja przebiega wolniej niż w środowisku zasadowym. Ponadto, w tych warunkach redukcja jonów miedzi (II) przebiega znacznie szybciej w środowisku cukrów prostych niż w obecności dwucukrów redukujących, a więc dobranie odpowiednich warunków reakcji pozwala na rozróżnienie pomiędzy tymi dwoma grupami związków.

WYKONANIE:

Do jednej probówki odmierzyć 1 ml roztworu glukozy, do drugiej 1 ml roztworu maltozy, a do trzeciej 1 ml roztworu sacharozy. Do wszystkich probówek dodać po 2,5 ml odczynnika Barfoeda (roztwór octanu miedzi (II) w kwasie mlekowym) i probówki ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. W probówce zawierającej cukier prosty ceglastoczerwony osad Cu_2O wytrąca się po około 3 min, w probówce zawierającej maltozę po około 15–20 min, a w probówce zawierającej sacharozę nie wytrąca się w ogóle.

4.2. Analiza jakościowa polisacharydów

4.2.1. Reakcja skrobi i glikogenu z jodem

ZASADA:

Skrobia i glikogen w obecności jodu pierwiastkowego tworzą barwne połączenia. Tworzenie tych połączeń polega na adsorpcji jodu na powierzchni koloidowych cząsteczek tych homoglikanów, w wyniku czego drobiny jodu występują w specjalnym stanie rozproszenia. Skrobia w opisanych warunkach tworzy z jodem połączenie fioletowoniebieskie, zaś glikogen – brunatnoczerwone.

WYKONANIE:

Do jednej probówki wlać 2 ml roztworu skrobi, a do drugiej 2 ml roztworu glikogenu. Do obu probówek dodać po 1 kropli silnie rozcieńczonego roztworu jodu w jodku potasu (płyn Lugola – barwa słomkowa).

4.2.2. Wpływ temperatury na reakcję skrobi i glikogenu z jodem

ZASADA:

Barwa skrobi i glikogenu z jodem jest trwała w temperaturze pokojowej. W podwyższonej temperaturze, ze względu na zmianę struktury przestrzennej cząsteczki skrobi i glikogenu, adsorpcja jodu nie jest możliwa i barwa zanika.

WYKONANIE:

Probówki z poprzedniego ćwiczenia zawierające skrobię i glikogen, zabarwione jodem, ogrzać do wrzenia. Barwa zanika. Powraca ona po oziębieniu probówek, początkowo w letniej, a następnie w zimnej wodzie.

ODCZYNNIKI:

1% wodne roztwory cukrów: D-arabinozy, D-galaktozy, D-glukozy, D-fruktozy, mannozy, sacharozy, glukozoaminy; 1% wodne zawiesiny skrobi i glikogenu; 10% roztwór α -naftolu w 95% etanolu; 0,2% roztwór antronu w stężonym H_2SO_4 ; rezorcyna *in substantia*; odczynnik orcynowy (100 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1 g orcyny w 100 ml stężonego HCl); 0,25 M Na_2CO_3 ; acetyloaceton; odczynnik Ehrlicha (2% *p*-dimetyloamino-benzaldehyd w 20% HCl); odczynnik Fehlinga I (86,6 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ rozpuścić w wodzie do objętości 2,5 l, dodać 2,5 ml stężonego H_2SO_4); odczynnik Fehlinga II (rozpuścić osobno 432,5 g winianu sodowo-potasowego i 175 g NaOH, zmieszać i uzupełnić wodą do 2,5 l); odczynnik Barfoeda (48 g $Cu(CH_3COO)_2$ rozpuścić w 900 ml H_2O , dodać 50 ml 8,5% kwasu mlekowego, uzupełnić wodą do 1 l i przesączyć); roztwór jodu w jodku potasu (płyn Lugola, 15 g KJ rozpuścić w 500 ml wody, dodać 6,5 g jodu i mieszać aż do całkowitego rozpuszczenia się jodu).

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Kuchenka elektryczna (łaźnia wodna, 100°C).