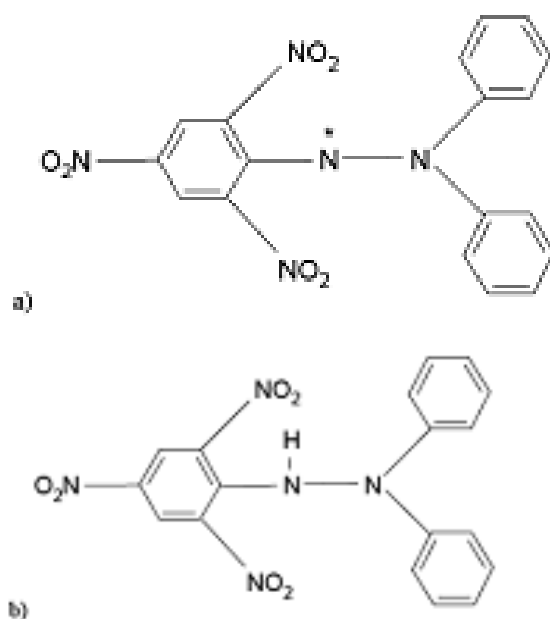


ĆWICZENIE 2

I. Badanie zdolności antyoksydacyjnych witaminy C i naparów

Antyoksydanty są to związki, które w niewielkich stężeniach ochraniają organizm przed działaniem wolnych rodników. Występują m.in. w ziołach, kawie, herbacie, kakao oraz innych produktach pochodzenia roślinnego. Ekstrakty roślinne bogate w polifenole i flawonoidy wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, związane z obecnością kilku grup hydroksylowych. Zdolności antyoksydacyjne zależą od położenia i liczby grup hydroksylowych; większa ich ilość nasila właściwości antyoksydacyjne.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych witaminy C i naparów z użyciem syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). DPPH jest stabilnym wolnym rodnikiem i ma niesparowany elektron na powłoce walencyjnej na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Jego alkoholowy roztwór ma ciemnofioletową barwę. W reakcji z substancją, która może oddawać atom wodoru tworzy formę zredukowaną DPPH i wówczas zanika fioletowe zabarwienie roztworu. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie. Stopień zmiany barwy roztworu DPPH po dodaniu do niego roztworu zawierającego antyoksydanty jest miarą ich zdolności do zmiatania wolnych rodników.



Rys. 1. DPPH a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

Wykonanie:

1. Przygotowanie roztworów i naparów antyoksydantów:

- a) 1 mM roztwór witaminy C.
- b) 0,5% napary wybranych herbat, kaw i ziół. 1g badanego antyoksydantu zalano 100ml wody o temperaturze 90 °C. Po upływie 8 minut napar sączone i chłodzono do temperatury pokojowej. Napary rozcieńczono wodą w stosunku 1:1.

2. Przygotowanie 0,5 mM alkoholowego roztworu rodnika DPPH.

Roztwór przygotowano rozpuszczając 19,71 mg DPPH w 100 ml etanolu. Otrzymany roztwór rozcieńczono tak, aby jego absorbancja przy długości fali $\lambda = 517$ nm wynosiła ok.0,9 (odczytywana wobec etanolu).

3. Pomiar absorbancji

Do 2,5 ml roztworu DPPH rozpuszczonego w etanolu dodać 33 μ l próby badanej (roztwór witaminy C, napary) i po wymieszaniu odstawić na 15 minut. Po 15 minutach wykonać pomiar absorbancji naparów wobec próby kontrolnej (etanolu).

4. Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_o - A_B) / A_o$$

A_o – absorbancja rodnika DPPH

A_B – wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant

II. Badanie właściwości cukrów, tłuszczów i aminokwasów na podstawie wybranych reakcji chemicznych.

A. Właściwości chemiczne cukrów

1. Próby redukcyjne

Najczęściej stosowanymi do utleniania grupy aldehydowej akceptorami elektronów są jony metali ciężkich: Cu^{2+} (próby: Fehlinga, Trommera, Hainesa, Benedicta), Bi^{3+} (próba Nylandera) i Ag^+ (próba Tollensa).

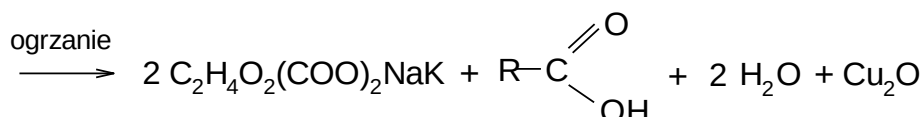
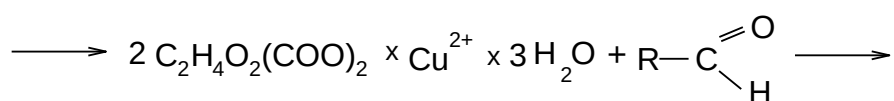
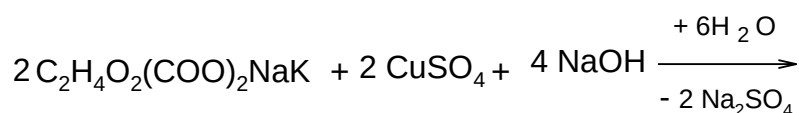
Monosacharydy (aldozy i α hydroksyketozy) wykazują również zdolność

redukowania powyższych jonów w środowisku alkalicznym, same zaś utleniają się do odpowiednich kwasów. Aldozy ulegają tej reakcji ze względu na obecność grupy $-CHO$, natomiast ketozy w środowisku alkalicznym ulegają izomeryzacji do odpowiedniej aldozy. W warunkach prób redukcyjnych, podczas zużywania formy łańcuchowej, cząsteczki pierścieniowe kolejno przechodzą w cząsteczki łańcuchowe. W efekcie tych przemian zwiększa się również ilość produktów zredukowanych ($Cu^{2+} \rightarrow Cu^{1+}$, $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ itp.). Właściwości redukcyjne wykazują także disacharydy, które posiadają wolną, niezablokowaną grupę $-OH$ przy węglu glikozydowym (półacetalowym).

Utleniane mogą być albo grupa aldehydowa, albo I-rzędowa grupa alkoholowa albo obie grupy w zależności od warunków utleniania. Łagodne utlenianie prowadzi do utlenienia grupy aldehydowej, w wyniku czego powstają kwasy *R-onowe*, w wyniku energicznego utleniania powstają kwasy *dikarboksylowe R-cukrowe*, a jeśli utlenieniu ulega tylko grupa alkoholowa I-rzędowa powstają kwasy *R-uronowe*. W tym ostatnim przypadku utlenianie winno odbywać się tylko po zablokowaniu grupy aldehydowej, co ma miejsce podczas przemian biochemicznych w żywych organizmach.

a) Próba Fehlinga

W próbie Fehlinga po zmieszaniu odczynników Fehling I ($CuSO_4 \times 5H_2O$ w rozcieńczonym H_2SO_4) i Fehling II (roztwór winianu sodowo-potasowego i $NaOH$) powstaje zasadowy roztwór kompleksu miedzi z winianem, co zapobiega wytrącaniu się osadu $Cu(OH)_2$ i maskowaniu końcowego produktu reakcji - czerwonego osadu Cu_2O . Dodany aldehyd ulega utlenieniu oddając elektrony, których akceptorem jest dwuwartościowa miedź. Kompleks miedzi z winianem po ogrzaniu rozpada się i powstaje czerwony osad tlenku miedzi (I).



Wykonanie:

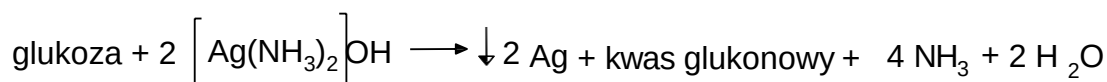
Zmieszać po 1 ml roztworów Fehling I i II, ogrzać do wrzenia aby sprawdzić czy nie wystąpi redukcja własna odczynnika. Następnie dodać kilka kropli roztworu (glukozy, sacharozy) i ponownie ogrzać. Pojawia się osad o barwie pomarańczowej do czerwonej, zależnie od stanu rozproszenia powstającego tlenku miedzi(I). Sacharoza tej próby nie daje.

b) Próba Tollensa (próba lustra srebrowego) — 1 próba na salę

Odczynnik Tollensa stanowi roztwór wodorotlenku diaminasrebra, który przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem w czystej, dokładnie odtłuszczonej probówce.

Wykonanie:

Do dokładnie odtłuszczonej probówki odmierzyć 1 ml 0,1 M roztworu AgNO_3 i wkraplać ostrożnie 2 M roztwór amoniaku $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Najpierw powstaje zmętnienie i osad AgOH , który po dodaniu dalszych kropli roztworu amoniaku rozpuszcza się wskutek powstania związku kompleksowego $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$. Do przyrządzonego w ten sposób odczynnika dodać 8 kropli badanego roztworu (glukozy lub laktozy), zmieszać i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej lub w płomieniu palnika. Po pewnym czasie na ściankach probówki wydziela się metaliczne srebro w postaci lustra.



c) Próba Barfoeda z glukozą i laktozą

Próba służy do odróżnienia cukrów prostych od dwucukrów redukujących. Dwucukry redukujące dają dodatni wynik reakcji dopiero po dłuższym ogrzaniu, a więc dopiero po hydrolizie do cukrów prostych. Próba jest stosowana w diagnostyce cukromoczu dla odróżnienia redukcji pochodzącej od glukozy lub od laktozy.

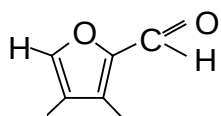
Wykonanie:

Do dwóch probówek odmierzyć po 0,5 ml odczynnika Barfoeda (roztwór octanu miedzi(II) i kwasu octowego), po czym do pierwszej dodać 1 ml roztworu glukozy, do drugiej laktozy, zmieszać i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej około 3 minut. Osad tlenku miedzi(I) pojawia się tylko w probówce zawierającej glukozę. Po dalszym ogrzewaniu (ok. 0,5 godziny) osad tlenku miedzi(I) pojawia się również w probówce

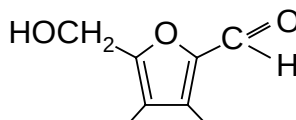
zawierającej laktozę.

2. Próby grupowe

Stężone kwasy, takie jak kwas solny, siarkowy, a nawet octowy odwadniają cząsteczki monosacharydów w wyniku czego powstają aldehydowe pochodne furanu, z pentoz powstaje furfural, a z heksoz hydroksymetylenofurfural



H H
furfural



H H
hydroksymetylenofurfural

Związki te, kondensując z fenolami, dają barwne pochodne triarylometanowe (w próbach Molischa, tymolowej) lub ksantenowe (w próbach Biala, Seliwanowa). Reakcje barwne dają nie tylko monosacharydy, ale również oligo- i polisacharydy, które pod wpływem kwasu ulegają hydrolizie do cukrów prostych.

Próby Molischa i tymolowa są próbami grupowymi na cukry. Wynik ujemny wyklucza obecność węglowodanów w środowisku, natomiast wynik dodatni nie jest jeszcze dowodem wystarczającym dla stwierdzenia ich obecności. Reakcje barwne z fenolami dają również inne substancje (aldehidy, aceton, kwasy: mlekowy, cytrynowy, mrówkowy i inne).

a) Próba Molischa

Wykonanie:

Do około 1 ml roztworu cukru dodać 2 krople alkoholowego roztworu α -naftolu, dobrze wymieszać i podwarstwić 1 ml stężonego H_2SO_4 . Po kilku minutach, na granicy warstw, powstaje czerwono-fioletowy pierścień. Czasami poniżej pierścienia pojawia się krążek zielony, który pochodzi od zanieczyszczeń α -naftolu.

b) Próba Seliwanowa na ketozy

W środowisku stężonego HCl ketoheksozy ulegają odwodnieniu o wiele łatwiej niż aldoheksozy. Powstały hydroksymetylenofurfural tworzy z rezorcyną (1,3-dihydroksybenzen) kompleks o barwie czerwonej. Próbę uważa się za dodatnią jedynie wtedy, gdy zabarwienie występuje przed upływem 1 minuty. Przy dłuższym ogrzewaniu, odczyn ten wypada również dodatnio z sacharozą i inuliną, które ulegają hydrolizie do fruktozy.

Wykonanie:

Do około 1 ml odczynnika Seliwanowa (0,5% roztwór rezorcyny w kwasie solnym rozcieńczonym wodą w stosunku 1:2) dodać 4-5 kropli roztworu fruktozy, zmieszać i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej ok. 1 minuty, po czym oziębic. W obecności ketoz próba barwi się na jasnoczerwono, zaś przy dużych ich stężeniach powstaje osad.

c) Próba Biała na pentozy

Zasada próby oparta jest również na zachowaniu się cukru wobec stężonych kwasów, po czym furfural kondensuje z orcyną w obecności FeCl_3 .

Wykonanie:

Do około 1 ml odczynnika Biała (roztwór orcyny w stężonym kwasie solnym z dodatkiem FeCl_3) dodać 3 krople roztworu pentozy (ksylozy) i ogrzać we wrzącej łaźni wodnej. Po kilkudziesięciu sekundach roztwór zabarwia się na zielono. Heksozy w powyższych warunkach tworzą połączenia o barwie żółtej.

d) Próba z jodem na skrobię

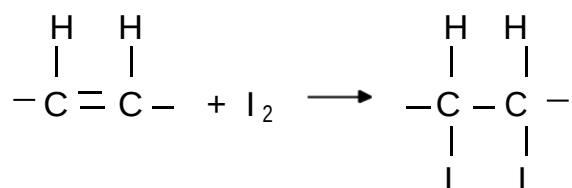
Wykonanie:

Do około 1 ml kleiku skrobiowego dodać 1 kroplę roztworu jodu w jodku potasu. Powstaje niebieskie zabarwienie znikające po krótkim ogrzaniu probówki w płomieniu palnika i powracające po jej oziębieniu.

B. Reakcje na kwasy tłuszczowe i lipidy

1. Przyłączanie chlorowca do nienasyconych kwasów tłuszczowych

Jod (lub inne chlorowce) łatwo przyłącza się w miejscu podwójnego wiązania, w wyniku czego brunatny roztwór jodu odbarwia się na skutek powstania bezbarwnego związku z organicznie związanym jodem.



Wykonanie:

Do 3 kropli oliwy dodawać kroplami odczynnik Húbla (roztwór jodu i chlorku rtęci(II) w alkoholu). Płyn odbarwia się po pewnym czasie w temperaturze pokojowej lub natychmiast po ogrzaniu

2. Rozpuszczalność tłuszczów

Tłuszcze posiadają długie hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych i dlatego rozpuszczają się dobrze w rozpuszczalnikach nie polarnych, takich jak chloroform, eter, benzen, nie rozpuszczają się natomiast w rozpuszczalnikach polarnych.

Wykonanie:

a) kilka kropli oliwy zalać 3 ml wody i wytrząsnąć. Tworzy się nietrwała emulsja tłuszczu w wodzie, która po pewnym czasie rozdziela się na dwie warstwy,

b) do kilku kropli oliwy dodać 2 ml chloroformu i wstrząsnąć. Tłuszcz ulega całkowitemu rozpuszczeniu.

3. Powstawanie mydeł

Ogrzewanie tłuszczu w środowisku alkalicznym doprowadza do hydrolizy wiązań estrowych, a uwolnione kwasy tłuszczowe tworzą z jonami sodu lub potasu rozpuszczalne sole, zwane mydłami. Z roztworów mydeł rozpuszczalnych można wytrącać mydła nierozpuszczalne odpowiednimi jonami (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+}).

Wykonanie:

Do kilku kropli oliwy dodać 3-4 ml alkoholowego roztworu KOH, mieszaninę ogrzewać kilka minut we wrzącej łaźni wodnej. Do mieszaniny dodać 10 ml wody destylowanej i wstrząsnąć. Pienienie się roztworu świadczy o obecności mydeł.

C. Reakcje na niektóre aminokwasy

Próba ksantoproteinowa na aminokwasy aromatyczne

Aminokwasy zawierające pierścień benzenowy (np. tyrozyna) pod wpływem stęż. HNO_3 ulegają nitrowaniu, w wyniku czego powstają pochodne nitrowe o barwie żółtej. Po zalkalizowaniu, związki nitrowe słabo dysocjują i barwa roztworu zmienia się na pomarańczową. Próbę tę dają również inne związki aromatyczne, jak fenol, benzen itp., a także większość białek, gdyż zawierają aminokwasy aromatyczne.

Wykonanie:

Do 1 ml roztworu aminokwasu aromatycznego (tyrozyny) dodać 5 kropli stęż. HNO_3 , po podgrzaniu roztwór żółknie.