



Warszawa 2026

SKRYPT DO ĆWICZEŃ

Biochemia dla Studentów Analityki Medycznej



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

—
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY



WARSZAWSKI UNIwersytet MEDYCZNY

Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

Agnieszka Dominiak i Marta Włodarczyk

Biochemia

dla studentów kierunku Analityka Medyczna

Wydanie I

Warszawa 2026

Autorzy skryptu:

dr n. farm. Agnieszka Dominiak
dr n. med i n. o zdr. Marta Włodarczyk

Recenzenci:

dr n. chem. Jolanta Szymańska-Majchrzak
dr n. chem. Oliwia Zegrocka-Stendel

Wydano za zgodą Uczelnianej Rady ds. Kształcenia WUM

ISBN 978-83-7637-681-3

Wydano w Sekcji Druków Uczelnianych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
tel. (22) 57 20 329
e-mail: wydawnictwo@wum.edu.pl
www.drukiuczelniarne.wum.edu.pl

Spis treści

Od Auterek	5
Zasady Bezpieczeństwa i Higieny Pracy w Pracowni Biochemicznej.....	7
Ćwiczenie 1. Oznaczanie białka całkowitego w surowicy krwi metoda biuretową	10
Ćwiczenie 2. Węglowodany o właściwościach biologicznych.....	27
Ćwiczenie 3. Lipidy o właściwościach biologicznych	58
Ćwiczenie 4. Analiza kinetyki reakcji enzymatycznej katalizowanej przez fosfatazę	89
Ćwiczenie 5. Oznaczanie aktywności acetylocholinoesterazy w surowicy krwi oraz badanie efektów inhibitorów	113
Ćwiczenie 6. Badanie potencjału antyoksydacyjnego produktów spożywczych	135
Podsumowanie realizacji ćwiczeń laboratoryjnych.....	159

Od Autorek

Drodzy Studenci Analityki Medycznej!

Z radością oddajemy w Wasze ręce skrypt i wierzymy, że będzie on niezastąpionym towarzyszem Waszej codzienności w laboratorium biochemicznym. Opracowaliśmy go z dużą starannością, zgodnie z programem nauczania biochemii na kierunku Analityka Medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Znajdziecie w nim wprowadzenia teoretyczne do ćwiczeń, jak i szczegółowe instrukcje ich wykonania — tak, by praca z pipetą stała się intuicyjna, a spektrofotometr — zrozumiałym i przyjaznym narzędziem analitycznym. Każde ćwiczenie poprzedza krótki przegląd zagadnień, bo łatwiej pracować, gdy rozumie się, co się robi i w jakim celu. W ramach zajęć zajmiecie się m.in. oznaczaniem białek metodą biuretową, wykrywaniem węglowodanów i lipidów w oparciu o reakcje barwne charakterystyczne dla poszczególnych grup związków oraz oceną ich właściwości, analizą aktywności enzymów, a także badaniem potencjału antyoksydacyjnego wybranych produktów spożywczych. Dodatkowo, na koniec każdego ćwiczenia dołączyliśmy panel dyskusyjny, stwarzający możliwość wymiany opinii i refleksji w oparciu o przyswojoną wiedzę biochemiczną oraz jej zastosowanie w praktyce i życiu codziennym.

Mamy nadzieję, że opanujecie nie tylko podstawy biochemii, ale przede wszystkim zdobędziecie praktyczne umiejętności niezbędne do dalszej nauki — m.in. w zakresie biochemii klinicznej i diagnostyki laboratoryjnej.

Ten skrypt nie zastąpi podręczników, ale z pewnością pomoże Wam lepiej zrozumieć poruszane zagadnienia, nabrać pewności siebie w pracy laboratoryjnej i przekonać się, że biochemia to nie tylko teoria, ale wiedza potrzebna i użyteczna. A jeśli przy okazji uda się obudzić w Was choć odrobinę naukowej pasji — uznamy to za Nasz wspólny sukces!

Życzymy Wam wytrwałości oraz satysfakcji z odkrywania zarówno tego, co widoczne, jak i tego, co ukryte w biochemicznych reakcjach.

Powodzenia,

Autorki

Zasady Bezpieczeństwa i Higieny Pracy w Pracowni Biochemicznej

1. Każdy Student zobowiązany jest do zapoznania się z Zasadami Bezpieczeństwa i Higieny Pracy obowiązującymi w pracowni biochemicznej oraz do ich przestrzegania podczas zajęć laboratoryjnych.
2. W czasie pracy laboratoryjnej Student zobowiązany jest do stosowania odpowiedniej odzieży ochronnej, obejmującej: zapięty, czysty fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe oraz pełne obuwie z płaską, stabilną podeszwą. Długie włosy powinny być związane, a luźne elementy odzieży i biżuteria zabezpieczone w sposób uniemożliwiający kontakt z odczynnikami lub aparaturą laboratoryjną. Zabrania się posiadania długich paznokci, w tym sztucznych, przedłużanych oraz ozdobionych elementami mogącymi uszkodzić rękawiczki ochronne.
3. Student zobowiązany jest do dbałości o sprzęt oraz szkło laboratoryjne wykorzystywane podczas zajęć oraz do korzystania z nich zgodnie z przeznaczeniem i instrukcjami prowadzącego.
4. Student może wykonywać wyłącznie czynności przewidziane programem ćwiczenia i zgodnie z poleceniami prowadzącego. Zabrania się wykonywania nieautoryzowanych doświadczeń.
5. Przed rozpoczęciem ćwiczenia student powinien zapoznać się z instrukcją wykonywanego doświadczenia oraz zasadami bezpiecznej pracy z wykorzystywanymi odczynnikami i materiałem biologicznym.
6. Należy zachować szczególną ostrożność podczas pracy z materiałem biologicznym. Zużyty sprzęt jednorazowego użytku (np. końcówki do pipet) należy umieszczać wyłącznie w specjalnie do tego przeznaczonych i odpowiednio oznakowanych pojemnikach.

7. Stężone roztwory kwasów i zasad należy odmierzać przy użyciu odpowiednich pipet lub pipetorów, wykonując te czynności pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.
8. Do pobierania każdego rodzaju roztworu z butelki należy stosować oddzielne jednorazowe końcówki do pipet.
9. Ze względu na ryzyko zanieczyszczenia nigdy nie należy wlewać z powrotem do butelki roztworu uprzednio z niej pobranego.
10. Należy zachować szczególną ostrożność podczas pracy z wirówkami. Nieprawidłowe wyważenie probówek lub próba zatrzymania wirówki podczas jej pracy może spowodować poważne obrażenia.
11. Wszelkie rozlania odczynników, stłuczenia szkła laboratoryjnego, uszkodzenia sprzętu oraz inne sytuacje mogące stwarzać zagrożenie należy niezwłocznie zgłosić prowadzącemu zajęcia.
12. W przypadku oparzenia, skaleczenia, kontaktu odczynników chemicznych lub materiału biologicznego ze skórą, oczami lub odzieżą, a także każdego innego wypadku lub narażenia na działanie czynników niebezpiecznych, należy niezwłocznie poinformować prowadzącego zajęcia i postępować zgodnie z jego zaleceniami.
13. W trakcie zajęć laboratoryjnych student powinien utrzymywać czystość i porządek w miejscu pracy. Na stołach laboratoryjnych mogą znajdować się wyłącznie materiały i sprzęt niezbędne do wykonywania ćwiczeń.
14. Torby, plecaki oraz odzież wierzchnią (kurtki, płaszcze) należy pozostawiać wyłącznie w miejscach do tego przeznaczonych.
15. W laboratorium biochemicznym obowiązuje bezwzględny zakaz spożywania posiłków, picia napojów, żucia gumy, palenia wyrobów tytoniowych oraz używania papierosów elektronicznych.
16. Po zakończeniu zajęć student zobowiązany jest do starannego uporządkowania stanowiska pracy, umycia i odłożenia szkła laboratoryjnego na wyznaczone miejsce, przetrucia blatu stołu wodą lub środkiem dezynfekującym zgodnie

z poleceniem prowadzącego, osuszenia powierzchni, zdjęcia rękawiczek i fartucha laboratoryjnego oraz dokładnego umycia rąk. Klucze do szafek po zakończeniu każdych zajęć należy pozostawić w pracowni, w wyznaczonym miejscu.

Ćwiczenie 1.

Oznaczanie białka całkowitego w surowicy krwi metoda biuretową

Celem ćwiczenia jest poznanie zasad:

- doboru pomiarowej długości fali do oznaczania badanego związku na podstawie uprzednio zarejestrowanego widma absorpcyjnego produktu reakcji
- wykonywania i wykorzystywania krzywych kalibracyjnych (wzorcowych)
- wyznaczania równania kierunkowego funkcji liniowej $A = f(c)$ (tzw. równania kierunkowego krzywej wzorcowej): $y = ax + b$ oraz współczynnika regresji liniowej R^2 dla tej funkcji
- wykorzystywania równania kierunkowego $y = ax + b$ do obliczania stężenia i zawartości białka w próbce.

I. Wstęp merytoryczny

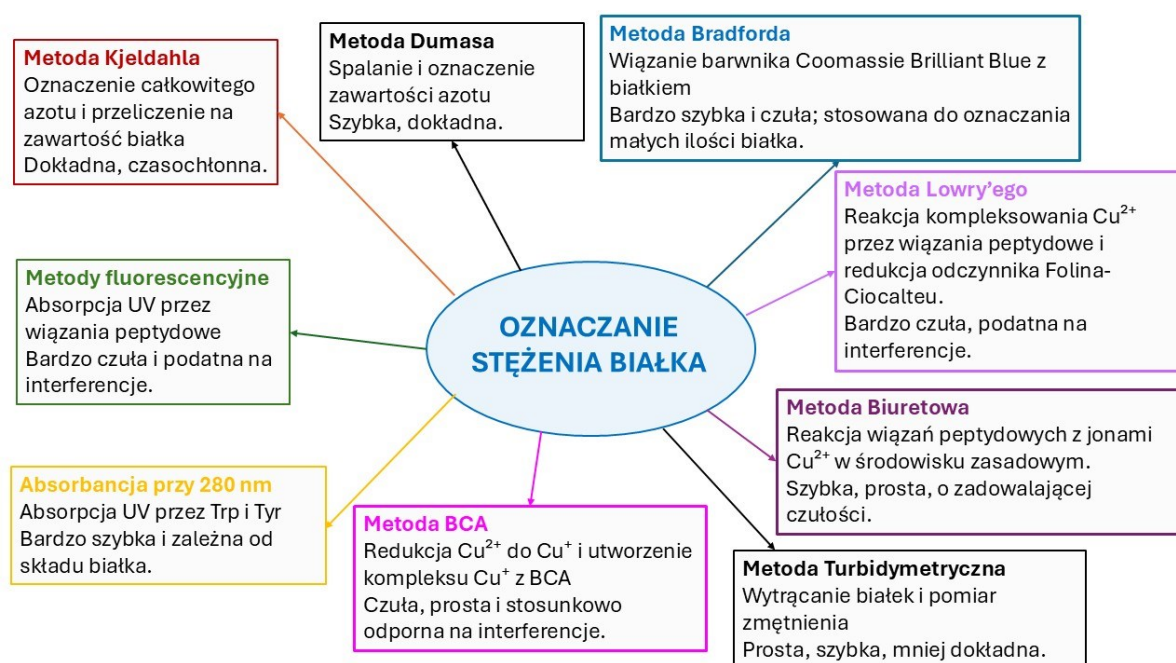
1. Białka osocza

Krew to płynna tkanka łączna, która składa się z dwóch głównych frakcji: płynnego osocza oraz zawieszonych w nim komórek i fragmentów komórkowych. Surowica (serum) jest pozbawiona fibrynogenu oraz innych czynników krzepnięcia i uzyskuje się ją po całkowitym skrzepnięciu krwi, pobranej „na skrzep”, bez antykoagulantu. Osocze (ang. plasma) stanowi pełny, płynny składnik krwi; uzyskuje się je poprzez odwirowanie krwi pobranej do probówki z dodatkiem antykoagulantu. Osocze krwi ludzkiej stanowi około 55% jej całkowitej objętości i składa się z wody, białek (głównie glikoprotein) oraz organicznych i nieorganicznych związków niskocząsteczkowych. Pod względem diagnostycznym najważniejszą frakcją białkową jest albumina stanowiąca ok 55–65% wszystkich białek osocza. Pełni ona funkcje transportowe, wiąże i przenosi wolne kwasy tłuszczowe, bilirubinę, hormony steroidowe, leki oraz jony. Albumina odpowiada za utrzymanie odpowiedniego ciśnienia onkotycznego. Pozostałe białka obecne w osoczu to α , β , γ globuliny oraz fibrynogen. Ponadto w osoczu znajdują się enzymy, prekursorzy enzymów a także inhibitory enzymów. Oznaczenie białka całkowitego w osoczu (głównie albumin i globulin) wykonuje się, aby ocenić homeostazę organizmu. Do precyzyjnej oceny konkretnych frakcji (albuminy, α_1 , α_2 , β , γ) służy metoda elektroforezy białek (proteinogram).

2. Oznaczanie białka całkowitego

Współczesna analityka medyczna i proteomika wykorzystują różnorodne techniki spektrometryczne do ilościowego oznaczania białka całkowitego, dostosowując czułość i swoistość metody do analizowanej próbki biologicznej. Klasyczna metoda biuretowa, oparta na tworzeniu barwnych kompleksów jonów

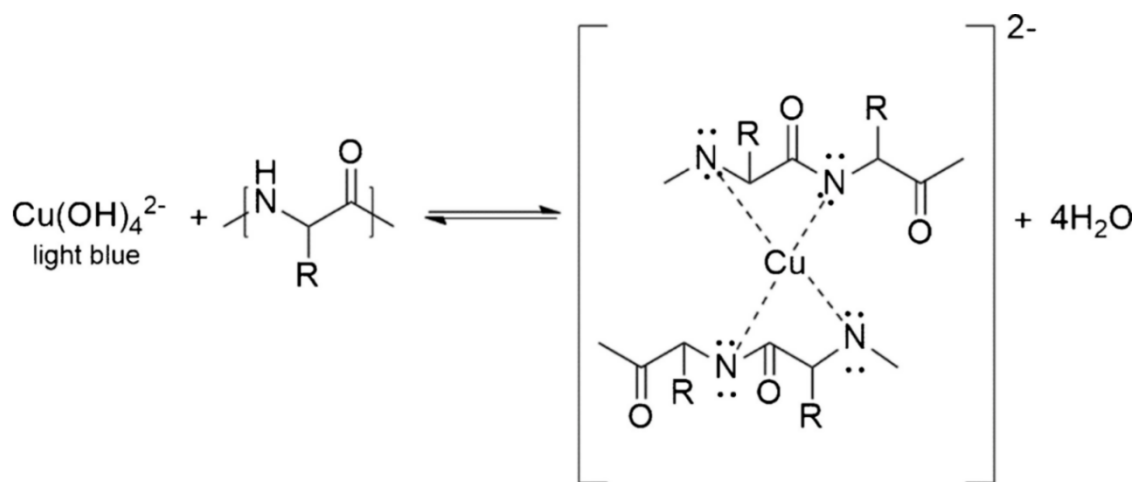
miedzi z wiązaniami peptydowymi w środowisku alkalicznym, pozostaje standardem w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. W badaniach proteomicznych i analizie próbek o niskim stężeniu stosowana jest znacznie bardziej czuła metoda Lowry'ego, łącząca reakcję biuretową z redukcją odczynnika Folina-Ciocalteu. Równie popularny jest test BCA z użyciem kwasu biczynoninowego, który wykazuje odporność na interferencję ze strony detergentów stosowanych do lizy komórek. Wśród alternatywnych metod wykorzystuje się metodę Bradforda z wykorzystaniem barwnika Coomassie Brilliant Blue oraz pomiar w zakresie dalekiego promieniowania UV (180–230 nm), gdzie mierzy się naturalną absorbancję wiązań peptydowych, a także przy 280 nm, charakterystycznym dla aminokwasów aromatycznych (tryptofan, tyrozyna). Wybór techniki (Ryc. 1.1.) zależy od rodzaju i ilości próbki, obecności substancji interferujących oraz wymagań dotyczących precyzji analizy.



Rycina 1.1. Zestawienie metod oznaczania stężenia białka z uwzględnieniem ich podstaw analitycznych oraz wybranych cech charakterystycznych

2.1. Oznaczanie białka całkowitego metodą biuretową

Związki chemiczne zawierające co najmniej dwa wiązania peptydowe (amidowe) reagują z solami miedzi w środowisku zasadowym. W wyniku utworzenia koordynacyjnego połączenia miedzi z sąsiadującymi ze sobą wiązaniami $-\text{CO}-\text{NH}-$, powstaje sól kompleksowa o barwie fioletowej. Intensywność zabarwienia roztworu jest wprost proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych (Ryc. 1.2.). W środowisku zasadowym reakcji, jon Cu^{2+} tworzy 4 wiązania koordynacyjne z atomami azotu grup $-\text{NH}$ wiązań peptydowych.



Rycina 1.2. Reakcja jonów Cu(II) z peptydem prowadząca do powstania barwnego kompleksu. Źródło: Spiaggia F: Fast ratiometric colorimetric sensing of total protein content in human serum based on classic biuret method. Anal Bioanal Chem. 2026 Apr 2

Zgodnie z prawem Lamberta-Beera absorbancja jest wprost proporcjonalna do iloczynu stężenia badanej substancji (c), grubości warstwy roztworu (drogi jaką pokonuje światło) (l) oraz współczynnika proporcjonalności zwanego absorpcją właściwą (a).

$$A = a \times l \times c$$

Po przekształceniu równania Lamberta-Beera można wyliczyć stężenie badanego roztworu.

W celu określenia maksimum absorbancji dla barwnego kompleksu powstającego w reakcji białka z odczynnikiem biuretowym rejestruje się widmo absorpcyjne, w tym przypadku kompleksu z odczynnikiem biuretowym. Widmo wykorzystuje się do doboru pomiarowej długości fali.

Widmo absorpcyjne to graficzny zapis zmian absorbancji substancji analizowanej w zależności od długości fali przechodzącej przez jej roztwór. Do wykonania widma absorpcyjnego należy użyć roztworu o jak najniższym stężeniu, które umożliwia dokładną rejestrację zmian. Maksimum absorbancji dla fioletowego kompleksu występuje w zakresie 540–550 nm. Dla peptydów jest ono przesunięte w kierunku światła o krótszej długości fali. Różne rodzaje białek niewiele różnią się między sobą wartościami maksimum absorbancji, także wartością współczynnika absorpcji molowej, czyli miarą pochłaniania światła o określonej długości przez daną cząsteczkę. Z tego powodu metoda biuretowa daje dość dokładne wyniki również w przypadku oznaczania białka w surowicach wybitnie patologicznych.

Kompleks peptydowo-miedziowy posiada dość rozległe maksimum absorbancji w zakresie światła nadfioletowego (330–340 nm). Przedział ten można także wykorzystywać do oznaczania zawartości peptydów. W tym zakresie może jednak dojść do interferencji ze strony glukozy lub niektórych aminokwasów (treoniny, histydyny) oraz składników buforów (np. buforu Tris).

2.2. Czulość metody

Czulość metody analitycznej określa zmianę sygnału analitycznego przypadającą na jednostkową zmianę stężenia oznaczanej substancji i odpowiada nachyleniu krzywej kalibracyjnej. Metoda biuretowa charakteryzuje się umiarkowaną czulością. Granica oznaczalności metody wynosi około 0,1 mg/ml.

2.3. Swoistość metody

Swoistość, inaczej specyficzność metody analitycznej, oznacza jej zdolność do oznaczania badanej substancji w obecności innych składników próbki,

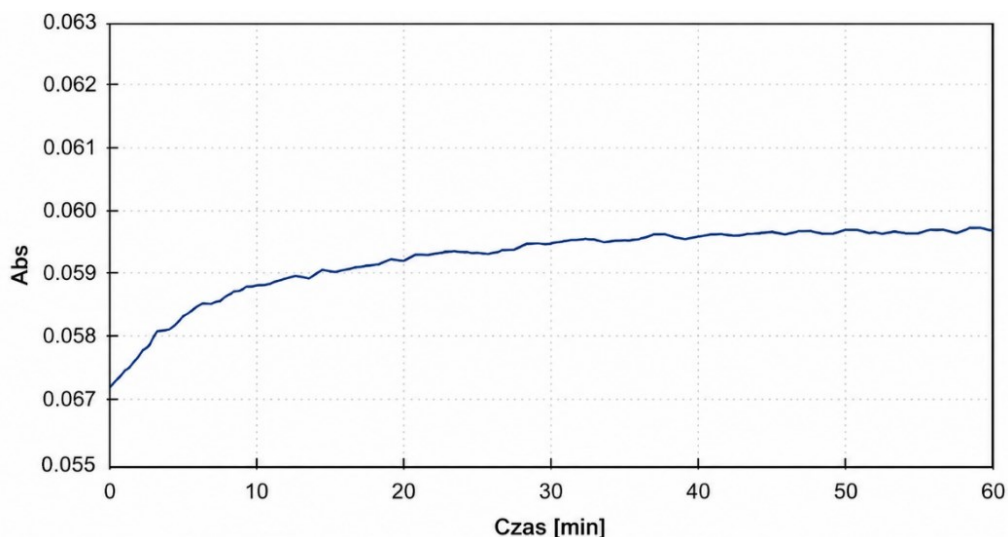
które mogłyby wpływać na wynik oznaczenia. Metoda biuretowa cechuje się wysoką swoistością względem wiązań peptydowych. Metoda ta została opisana w podręczniku „Standard Methods of Clinical Chemistry” wydanym przez Amerykańskie Towarzystwo Chemii Klinicznej (Reinhold J.G., 1953) i do dziś stanowi jedną z podstawowych metod oznaczania białka całkowitego w laboratoriach klinicznych.

2.4. Związki dające pozytywny wynik reakcji biuretowej

- białka i peptydy (zawierające co najmniej 3 aminokwasy),
 - inne związki zawierające w swej cząsteczce co najmniej 2 grupy
 - CO-NH– połączone ze sobą:
- bezpośrednio: np. diamid kwasu szczawiowego $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$,
 - poprzez atom azotu: np. biuret, czyli dimocznik,
 - poprzez atom węgla (diamid kwasu malonowego lub bursztynowego).

Dodatniego odczynu w reakcji biuretowej nie dają: wolne aminokwasy, dipeptydy ani mocznik.

Intensywność barwy kompleksu miedziowo-peptydowego (proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych) nie jest zupełnie stała i jeszcze po upływie 30 minut powoli narasta (Ryc. 1.3.). Wzrost ten w ciągu 1 godziny nie przekracza 5%, jest więc bez większego znaczenia z punktu widzenia klinicznego.



Rycina 1.3. Zmiana intensywności barwy kompleksu miedziowo-peptydowego w czasie

2.5. Liniowość metody

Liniowość określa zdolność metody do uzyskiwania wyników pomiaru analitycznego wprost proporcjonalnych do stężenia analitu (substancji oznaczanej), tzn. odpowiedź przyrządu pomiarowego (np. absorbancja) powinna być proporcjonalna do stężenia analitu. W tym ćwiczeniu absorbancja (A) powinna być proporcjonalna do stężenia białka (c). Liniowość wykazuje się poprzez analizę zależności $A = f(c)$ dla próbek o stężeniach analitu, obejmujących deklarowany zakres stężeń (np. 2–6 mg/ml).

Według zaleceń obowiązujących przy walidacji metod analitycznych należy wykonać badanie minimum 5-ciu serii wzorców (3–6 powtórzeń), których stężenia obejmują 80–120% stężenia analitu spodziewanego w próbce.

Liniowość metody w niniejszym ćwiczeniu można wstępnie ocenić na podstawie przebiegu wielopunktowego wykresu zależności absorbancji od stężenia analitu $A = f(c)$ w próbce badanej, który powinien być linią prostą, ponieważ wykresem funkcji liniowej jest linia prosta. Liniowość metody można potwierdzić na podstawie wartości współczynnika regresji R^2 dla badanej zależności $A = f(c)$. Współczynnik regresji liniowej, zwany także współczynnikiem determinacji (R^2), jest miarą dopasowania funkcji regresji

liniowej do danych doświadczalnych.

- jego wartość mieści się w przedziale (0; 1);
- dopasowanie funkcji regresji do danych empirycznych jest tym lepsze, im wartość R^2 jest bliższa 1. R^2 bliska 1 oznacza dobrą liniowość metody w badanym zakresie stężeń analitu;
- w przypadku głównej lub jedynej substancji oznaczanej, wartość współczynnika R^2 powinna być większa niż 0,995;
- jeżeli metoda wykazuje dobrą liniowość, to do sporządzenia krzywej kalibracyjnej, zwanej krzywą wzorcową, wystarczy 5–6 roztworów wzorcowych o różnych stężeniach;
- jeżeli liniowość nie jest zachowana, potrzebna jest większa liczba wzorców.

Często błędnie utożsamia się współczynnik regresji liniowej ze współczynnikiem korelacji liniowej. Współczynnik korelacji liniowej (ang. r) także określa zależność pomiędzy dwoma cechami, lecz przyjmuje wartości z przedziału $<-1, 1>$. Gdy $r = 0$, to cechy nie są skorelowane, gdy r przyjmuje wartość „-1” (korelacja doskonała ujemna), $r = „1”$ (korelacja doskonała dodatnia).

Postać kierunkowa funkcji liniowej (równanie kierunkowe funkcji liniowej)

$$y = ax + b$$

- współczynnik kierunkowy „ a ” decyduje o kącie nachylenia wykresu funkcji liniowej w stosunku do osi X .
- współczynnik „ b ” decyduje o punkcie przecięcia wykresu funkcji liniowej z osią Y , punkt przecięcia się funkcji liniowej z osią Y posiada współrzędne: (0, b).

II. Część praktyczna

Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- gotowy odczynnik biuretowy o składzie:
 - siarczan(VI) miedzi(II) – 60 mmol/l;
 - winian sodowo-potasowy – 167 mmol/l;
 - wodorotlenek sodu – 1000 mmol/l
- roztwory wzorcowe albuminy ludzkiej: 1, 2, 4, 6 i 8 mg białka w 1 ml.
- rozcieńczony serostandard o różnych stężeniach białka (analizy nr 1–10)
- woda dejonizowana
- spektrofotometr
- pipety automatyczne
- wytrząsarka Vortex
- plastikowe kuwety spektrofotometryczne
- probówki plastikowe o pojemności 10 ml

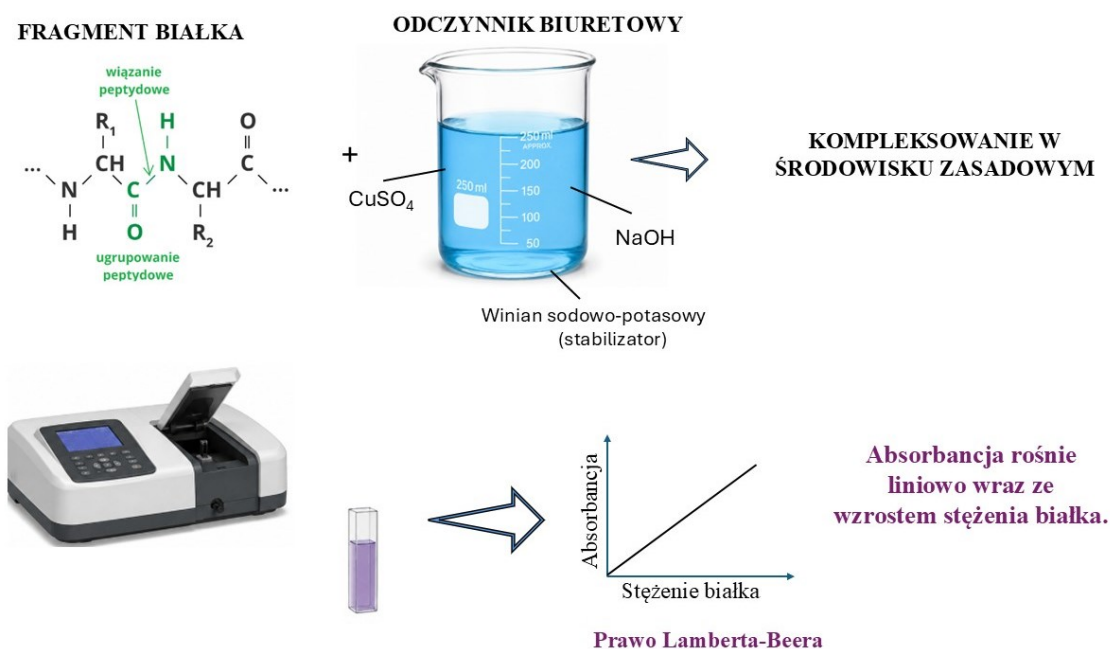
Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Wykonanie krzywej wzorcowej dla białka metodą biuretową

Do krótkich plastikowych probówek dodaj odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer probówki						
	1	2	3	4	5	6	7
	blank	1 mg/ml	2 mg/ml	4mg/ml	6 mg/ml	8 mg/ml	10 mg/ml
Odczynnik biuretowy	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Woda	0,5 ml	–	–	–	–	–	–
Roztwór albuminy (wzorzec)	–	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Próbki zamieszać przez 3-krotne, delikatne przechylenie do góry dnem probówki przykrytej folią i zatkanej dokładnie palcem. Inkubować 30 minut, a następnie dokonać pomiaru absorbancji wzorców (2–7) względem próby ślepej (blank; 1) zgodnie z instrukcją przy spektrofotometrze, przy długości fali 540 nm (używając jednej czystej kuwety) (Ryc. 1.4.). **Uwaga!** Zbyt intensywne mieszanie może spowodować spienienie się roztworu białka. Część spieniona (białko zdenaturowane) nie ma kontaktu z odczynnikiem i nie bierze udziału w reakcji biuretovej (wynik oznaczenia będzie zaniżony). Kuwety należy wypełnić roztworem do ok. 3/4 wysokości!



Rycina 1.4. Schemat obrazujący oznaczanie stężenia białka za pomocą metody biuretovej

Na podstawie danych absorbancji dla próbek 2–7 wykonaj wykres zależności absorbancji (A) od zawartości białka w roztworze (c). Dla uzyskanej krzywej wzorcowej wyznacz równanie kierunkowe: $y = ax + b$ oraz współczynnik determinacji R^2 (współczynnik regresji liniowej), posługując się programem Excel. Krzywą wzorcową dołącz do dokumentacji. Na podstawie uzyskanej krzywej wzorcowej określ zakres stężeń, w którym zależność $A = f(c)$ ma charakter prostoliniowy.

Stężenie białka wzorcowego (mg/ml)	Absorbancja
1	
2	
4	
6	
8	
10	
Równanie krzywej wzorcowej	
Współczynnik regresji liniowej (R^2)	



2. Uśredniona krzywa kalibracyjna

Wykonaj krzywą uśrednioną oraz wklej ją poniżej, bazując na wynikach absorbancji (A) innych grup. Dokonaj obliczeń statystycznych dla kolejnych punktów, uzyskanych z 4–5 niezależnie wykonanych krzywych wzorcowych (przez 4–5 zespołów): średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe od średniej arytmetycznej. Wklej wykres uśrednionej krzywej.

Stężenie białka (mg/ml)	A1	A2	A3	A4	A5	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe od średniej arytmetycznej
1							
2							
4							
6							
8							
Równanie uśrednionej krzywej wzorcowej							
Współczynnik regresji liniowej (R^2)							



3. Oznaczenie zawartości białka w analizie indywidualnej

Każda osoba przygotowuje wydaną przez asystenta próbkę indywidualną, do pomiaru w trzech powtórzeniach dla dwóch różnych rozcieńczeń (zgodnie z poniższą tabelą):

	Numer próbki						
	1 (blank)	2a	2b	2c	2d	2e	2f
Odczynnik biuretowy	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Woda	0,5 ml	0,49 ml	0,49 ml	0,49 ml	0,475 ml	0,475 ml	0,475 ml
Roztwór badany (analiza nr)	–	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,025 ml	0,025 ml	0,025 ml
Próbki zamieszać przez 3-krotne delikatne przechylenie do góry dnem próbki uprzednio przykrytej folią i zatkaną dokładnie palcem. Inkubować 30 minut, a następnie dokonać pomiaru absorbancji wzorców względem próby ślepej (blank) zgodnie z instrukcją przy spektrofotometrze, przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$ (używając jednej czystej kuwety).							

Aby obliczyć stężenie białka w indywidualnej analizie w mg/ml należy skorzystać z równania kierunkowej krzywej: za y podstaw wartość absorbancji i wyznaczyć x. Obliczeń dokonaj dla każdego z 3 niezależnych pomiarów. Oblicz średnią arytmetyczną. Na koniec uwzględnij rozcieńczenie analiz!

Nr próbki	Stężenie białka w próbce c (mg/ml)	Rozcieńczenie	Stężenie białka w próbce c (mg/ml)	Średnie stężenie białka w próbce c (mg/ml)	Odchylenie standardowe z trzech pomiarów

4. Wykonanie widma spektrofotometrycznego

Widmo spektrofotometryczne jest graficznym zapisem zmian absorbancji w zależności od długości fali promieniowania elektromagnetycznego przechodzącego przez badany roztwór.

Widmo spektrofotometryczne w zakresie promieniowania UV-Vis (340–750 nm) należy wykonać dla próbki o numerze 2 przygotowanej do sporządzenia krzywej wzorcowej. Próbka ta odpowiada stężeniu 1 mg białka/ml. Postępuj zgodnie z instrukcją przy spektrofotometrze. Wydrukuj i dołącz do sprawozdania wykres widma oraz tabele wyników.

Analizując wartości absorbancji w tabeli, zaznacz wszystkie maksima absorbancji dla produktu reakcji biuretovej oraz długości fali, przy których one występują. Określ, które jest optymalne dla oznaczenia produktu reakcji biuretovej. Następnie należy porównać długość fali, przy której doświadczalnie wyznaczono maksimum absorbancji, z długością fali stosowaną standardowo do oznaczania zawartości białka. Zastanów się, czy standardowo wykorzystywana do oznaczania białka metodą biuretową pomiarowa długość fali wynosząca 540 nm różni się od długości fali wyznaczonej podczas niniejszego ćwiczenia? Jeśli obserwujesz różnice, podaj ich potencjalne przyczyny.

Wydruk wykresu widma i tabeli wyników:





5. Podsumowanie i wnioski:

1. Który z wyznaczonych parametrów świadczy o dobrej liniowości metody biuretovej w badanym zakresie stężeń białka? Podaj wartość tego parametru.
2. Oceń celowość wykonania oraz wiarygodność krzywej wzorcowej uzyskanej z 5–6 niezależnych serii pomiarów.



Panel dyskusyjny

- *Dlaczego metodę biuretową rutynowo stosujemy do oznaczania białka w surowicy krwi, ale nie nadaje się ona do oznaczania białka w moczu lub płynie mózgowo-rdzeniowym?*
- *Do laboratorium dostarczono próbkę surowicy od pacjenta z ostrą hemolizą. Jak wpłynie to na wynik oznaczania białka całkowitego metodą biuretową i jak nowoczesny analizator eliminuje ten błąd?*
- *Kiedy rozpoznajemy hipoproteinemię, a kiedy hiperproteinemię oraz jakie są ich konsekwencje dla funkcjonowania organizmu?*
- *Czy hiperproteinemia zawsze oznacza chorobę?*

Ćwiczenie 2.

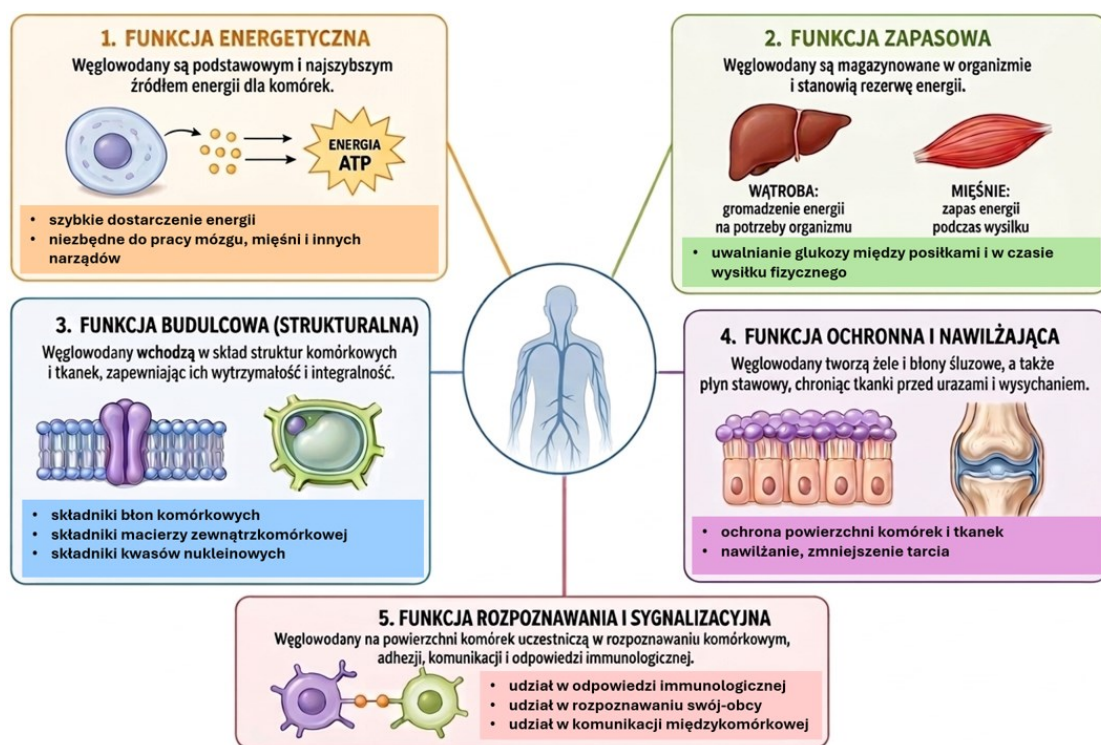
Węglowodany o właściwościach biologicznych

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z reakcjami charakterystycznymi dla cukrów prostych, disacharydów i polisacharydów na przykładzie poniższych reakcji:

- próby Molischa i próby z tymolem
- reakcji Fehlinga
- reakcji Barfoeda
- próby Biala
- próby Seliwanowa
- próby z odczynnikiem Lugola
- reakcji hydrolizy kwaśnej.

I. Wstęp merytoryczny

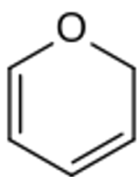
Węglowodany (cukrowce, sacharydy) są przeważnie związkami pochodzenia roślinnego, obficie występującymi w przyrodzie. W organizmach żywych pełnią fundamentalną funkcję podstawowego, łatwo dostępnego źródła energii niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania procesów metabolicznych (Ryc. 2.1.). Ponadto stanowią materiał zapasowy (glikogen), a także pełnią funkcje strukturalne, budując ściany komórkowe (rośliny i bakterie) i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Aktywnie uczestniczą w procesach rozpoznawania komórkowego jako składniki glikoprotein i glikolipidów. Ze względu na strukturę chemiczną i obecność specyficznej grupy funkcyjnej, cukry proste dzielą się na aldozy, które zawierają grupę aldehydową, oraz ketozy, które zawierają grupę ketonową. Ze względu na złożoność cząsteczki i liczbę jednostek cukrowych, węglowodany dzielą się na monosacharydy, czyli cukry proste; oligosacharydy (w tym najpopularniejsze disacharydy) oraz polisacharydy.



Rycina 2.1. Funkcje węglowodanów

1. Cukry proste

Monosacharydy – cukry proste, są to związki, których nie da się przekształcić w procesie hydrolizy na mniejsze cząsteczki. Monosacharydy mają ogólny wzór $C_nH_{2n}O_n$ i zawierają od 3 do 10 atomów węgla w cząsteczce. Cukry proste klasyfikuje się w zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce (Ryc. 2.2, Tab. 2.1.). Wyróżniamy więc triozy ($n = 3$), tetrazy ($n = 4$), pentozy ($n = 5$), heksozy ($n = 6$), heptozy ($n = 7$), etc. Najczęściej występujące cukry to triozy (aldehyd glicerynowy, dihydroksyacetony), pentozy (ryboza, deoksyryboza, arabinoza) i heksozy (glukoza, fruktoza, galaktoza, mannoza). Ze względu na rodzaj grupy karbonyłowej monosacharydy dzielimy na ketozy (np. dihydroksyacetony) i aldozy (np. aldehyd glicerynowy) (Tab. 2.2.). Monosacharydy w roztworach wodnych występują głównie w formie pierścieniowej, która jest efektem wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji aldozy lub ketozy odpowiednio do hemiacetalu lub hemiketalu. Utworzony w wyniku cyklizacji pierścień sześcioczłonowy nazywa się pierścieniem piranowym, zaś pięcioczłonowy – pierścieniem furanowym, analogicznie do organicznych związków chemicznych: piranu i furanu (Ryc. 2.2.).



piran

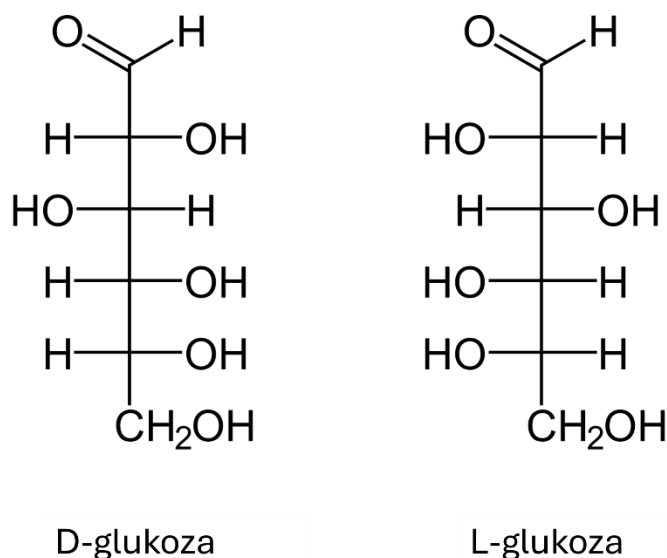


furan

Rycina 2.2. Wzory cząsteczki piranu i furanu

Monosacharydy (Ryc. 3) mogą posiadać jeden lub więcej asymetrycznych atomów węgla i dlatego mogą należeć do szeregu konfiguracyjnego D lub L. Do szeregu D zalicza się te cukry, które w formie otwartołańcuchowej

(przedstawionej wzorami 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 (Ryc. 2.3.).



Rycina 2.3. Przykład enancjomerów glukozy

Monosacharydy zawierające cztery lub więcej atomów węgla w cząsteczce, występują w postaci pierścieniowych form tautomerycznych tworzących się w wyniku powstawania wewnątrzcząsteczkowych wiązań półacetalowych (hemiacetalowych). Zjawisko istnienia dwóch odmian tej samej cyklicznej postaci monosacharydu, różniących się tylko orientacją przestrzenną pierwszego atomu węgla (tzw. węgla anomerycznego) w cząsteczce aldoz lub drugiego atomu węgla w cząsteczce ketoz, nosi nazwę anomerii. Formy α i β różnią się między sobą konfiguracją na atomie węgla anomerycznego (nowego centrum asymetrii), co jest związane z różną wartością skręcalności optycznej dla tych anomerów. W roztworze wodnym, w danych warunkach temperatury i ciśnienia między obiema formami anomerycznymi danego monosacharydu wytwarza się równowaga dynamiczna. Zmiana konfiguracji na anomerycznym atomie węgla monocukru w roztworze wodnym i przechodzenie formy α

w formę β nazywane jest mutarotacją (zmiana kąta skręcalności światła spolaryzowanego na skutek zmiany konfiguracji na anomerycznym atomie węgla). Epimery to rodzaj izomerów przestrzennych (diastereoizomerów), które różnią się między sobą położeniem grupy hydroksylowej przy jednym z asymetrycznych atomów węgla, np. epimerami D-glukozy są D-galaktoza oraz D-mannoza.

1.1. Glukoza

Monosacharyd z grupy aldoheksoz. Glukoza wchodzi w skład disacharydów (laktozy, maltozy, sacharozy) i polisacharydów: glikogenu, skrobi oraz celulozy. Jest białym, drobnokrystalicznym ciałem stałym, z roztworów wodnych łatwo krystalizuje jako monohydrat. Jest bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (nie zmienia pH roztworu). D-glukoza jest prawoskrętna, co oznacza, że grupa hydroksylowa (-OH) przy węglu C-5 znajduje się po prawej stronie w projekcji Fischera. Enancjomerem D-glukozy jest L-glukoza, niewystępująca w organizmach wyższych. Glukoza, jak wszystkie pentozy i heksozy, tworzy formy pierścieniowe. W roztworze wodnym istnieje głównie w postaci sześciocząłkowej formy piranowej. Jest magazynowana w postaci polisacharydów (skrobia, glikogen). Do najważniejszych przemian metabolicznych glukozy należą: glikoliza, glukoneogeneza, glikogenogeneza, glikogenoliza, cykl pentozofosforanowy oraz procesy glikozylacji białek.

1.2. Galaktoza

Jest aldoheksozą, różni się od glukozy jedynie konfiguracją przy czwartym atomie węgla (C-4). Posiada wolną grupę karbonylową (aldehydową), co pozwala jej uczestniczyć w reakcjach chemicznych (np. próba Fehlinga). U zwierząt występuje w postaci składnika laktozy (cukru mlekowego), glikolipidów i glikoprotein oraz antygenów zgodności grupowych erytrocytów (układu AB0). Jest wykorzystywana jako substrat energetyczny po przekształceniu w UDP-glukozę.

2.3. Mannoza

Należy do grupy aldoheksoz, różni się od glukozy konfiguracją przy drugim atomie węgla (C-2). Jej główna funkcja to udział w syntezie glikoprotein. Nadmiar mannozy może być kierowany do glikolizy poprzez jej fosforylację przez heksokinazę do mannozo-6-fosforanu, który następnie jest przekształcany przez izomerazę mannozo-6-fosforanowa do fruktozo-6-fosforanu.

2.4. Fruktoza

Fruktoza należy do ketoheksoz. Posiada grupę ketonową przy drugim atomie węgla (C-2). Jest izomerem strukturalnym glukozy. W roztworach najczęściej tworzy pięcioczłonowy pierścień (furanowę). Wchodzi w skład dwucukru sacharozy (glukoza + fruktoza), a także rafinozy i inuliny. Fruktoza w temperaturze pokojowej jest białą substancją krystaliczną, w wodzie rozpuszcza się lepiej niż glukoza. Fruktoza charakteryzuje się słodkim smakiem (jest nieco słodsza od sacharozy i znacznie słodsza od glukozy). Występuje w stanie wolnym w owocach, nektarze kwiatowym, miodzie oraz spermie ssaków (materiał energetyczny wykorzystywany przez plemniki). U ssaków fruktoza jest metabolizowana głównie w wątrobie, a częściowo także w mięśniach i tkance tłuszczowej, gdzie może być przekształcana do fruktozo-6-fosforanu lub fruktozo-1-fosforanu, a następnie włączana do glikolizy.

2. Cukry złożone

Oligosacharydy to związki, które powstają przez połączenie od dwóch do dziewięciu reszt monosacharydów (glukozy, fruktozy, galaktozy) wiązaniem O-glikozydowym. Najistotniejsze dla fizjologii człowieka są disacharydy takie jak: sacharoza i laktoza.

2.1. Disacharydy

Najpowszechniej występującymi cukrami złożonymi są disacharydy (Ryc. 2.4.), czyli dwa cukry połączone wiązaniem glikozydowym, w którym uczestniczy anomeryczny atom węgla jednej cząsteczki cukru oraz dowolny atom węgla drugiej cząsteczki. W zależności od sposobu powstania wiązania glikozydowego disacharydy dzielą się na dwie grupy:

- disacharydy utworzone przez połączenie monosacharydów grupami hydroksylowymi, znajdującymi się przy węglach anomerycznych. Powstałe w ten sposób disacharydy zaliczane są do grupy trehalozy (do tej grupy należy sacharoza)
- disacharydy powstałe przez połączenie grupy hydroksylowej jednego monosacharydu z grupą hydroksylową drugiego monosacharydu w pozycji 3, 4 lub 6. Ta grupa sacharydów nosi nazwę grupy maltozy (maltoza, laktoza, celobioza, izomaltoza, gencjobioza, wicjanoza).

Jeśli w jednym z cukrów znajduje się wolna grupa -OH przy anomerycznym atomie węgla, to disacharyd zachowuje się pod wieloma względami jak monosacharyd. Wykazuje m.in. właściwości redukujące. Do takich cukrów należą laktoza i maltoza. Cukry nieredukujące to disacharydy, w których grupy -OH przy anomerycznym atomie węgla obu monosacharydów biorą udział w wiązaniu glikozydowym (np. sacharoza, trehaloza).

2.1.1. Sacharoza

Sacharoza zbudowana jest z α -D-glukozy oraz β -D-fruktozy połączonych wiązaniem α,β -1,2-glikozydowym. W większych ilościach występuje w burakach cukrowych i trzcinie cukrowej. Nie ulega mutarotacji i nie posiada właściwości redukujących. Pod wpływem kwasów lub enzymu (sacharazy/inwertazy), sacharoza rozpada się na glukozę i fruktozę, mieszaninę nazywaną cukrem inwertowanym. Jest to reakcja inwersji, ponieważ zmienia się kierunek skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przez roztwór

z prawoskrętnego na lewoskrętny. Cukier inwertowany jest słodszy od samej sacharozy i trudniej krystalizuje (często spotykana w sztucznym miodzie i nadzieniach pralin).

2.1.2. Trehaloza

Trehaloza jest disacharydem złożonym z dwóch cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem α,α -1,1-glikozydowym. Cukier ten nazywano dawniej mykozą (cukier grzybowy). Występuje w organizmach niższych takich jak glony, grzyby, owady, niektóre rośliny pustynne. Nie ulega mutarotacji i nie posiada właściwości redukujących.

2.1.3. Maltoza

Maltoza jest disacharydem zbudowanym z dwóch reszt D-glukozy połączonych wiązaniem α -1,4-glikozydowym. Ma właściwości redukujące, tworzy dwa anomery: α i β , które w roztworach wodnych ulegają mutarotacji. Nazywana jest cukrem słodowym. Powstaje na drodze hydrolizy skrobi katalizowanej przez β -amylazę. Większe ilości maltozy stwierdza się w kiełkującym ziarnie zbóż (słód), batatach i kukurydzy. Jest słodsza od sacharozy. Wykorzystywana jest w przemyśle farmaceutycznym jako składnik leków.

Izomaltoza jest izomerem maltozy, gdzie reszty glukozy są połączone wiązaniem α 1,6glikozydowym. Maltoza rzadko występuje w przyrodzie jako samodzielny cukier; w niewielkich ilościach występuje w miodzie. W organizmie człowieka pojawia się w wyniku trawienia skrobi, a konkretnie rozgałęzień amylopektyny.

2.1.4. Laktoza

Laktoza, nazywana cukrem mlekowym, jest disacharydem powstałym z połączenia D-glukozy i D-galaktozy wiązaniem β 1,4-glikozydowym. Występuje przede wszystkim w mleku ssaków. Ze względu na możliwość występowania w dwóch formach anomerycznych, ma właściwości redukujące,

jak również ulega mutarotacji. Do jej strawienia niezbędny jest enzym laktaza. Niedobór tego enzymu prowadzi do nietolerancji laktozy.

2.2. Polisacharydy

Polisacharydy (wielocukry) (Ryc. 2.4.) są liniowymi lub rozgałęzionymi polimerami o dużej masie cząsteczkowej. Są produktem kondensacji od kilkuset do kilku tysięcy cząsteczek cukrów prostych. Nie posiadają właściwości redukujących. Strukturę liniową wykazuje amyloza wchodząca w skład skrobi (wiązania α -1,4-glikozydowe) i celuloza (wiązania β -1,4-glikozydowe), a strukturę rozgałęzioną amylopektyna, również wchodząca w skład skrobi oraz glikogen (wiązania α -1,4 i α -1,6-glikozydowe). W glikogenie wiązania α -1,6-glikozydowe występują co 6-10 reszt glukozy, a w skrobi co 25 reszt glukozy, powodując, że glikogen jest polisacharydem o strukturze bardziej rozgałęzionej w porównaniu ze skrobią. Polisacharydy w odróżnieniu od mono- i oligosacharydów są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie. Niektóre wykazują zjawisko pęcznienia i tworzenia układów koloidalnych (kleik skrobiowy). Polisacharydy są pozbawione słodkiego smaku, pełnią funkcje zapasowe i budulcowe.

Ze względu na budowę chemiczną, polisacharydy można podzielić na dwie grupy:

- Homopolisacharydy składające się z reszt jednego rodzaju dowolnego monosacharydu:
 - z reszt glukozy: skrobia, glikogen, celuloza
 - z reszt fruktozy: inulina i inne
 - z reszt arabinozy, ksylozy, mannozy: arabany, ksylany, mannany
 - z reszt kwasu galaktouronowego: substancje pektynowe
 - z reszt glukozoaminy: chityna owadów i grzybów.

- Heteropolisacharydy składające się z reszt różnych monosacharydów i ich pochodnych:
 - z reszt glukozy i mannozy: glukomannany
 - z reszt mannozy i galaktozy: galaktomannany
 - z pentoz i heksoz różnego rodzaju: hemicelulozy.

2.2.1. Skrobia

Skrobia jest to polisacharydem zbudowanym z cząsteczek amylozy (20–35%) oraz amylopektyny (65–80%). Cukier ten występuje w roślinach jako materiał zapasowy np. w bulwach ziemniaczanych i ziarnach zbóż. Amyloza ma strukturę liniową, jest polimerem zbudowanym z ok. 300 cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem α -1–4 glikozydowym. Amylopektyna ma budowę rozgałęzioną, czasem spiralną, którą warunkują połączenia α -1–4 glikozydowe oraz α -1–6 glikozydowe (występujące co 30 wiązań). Amyloza rozpuszcza się w wodzie zimnej i gorącej, natomiast amylopektyna rozpuszcza się w wodzie zimnej, a po podgrzaniu tworzy kleik – żeluje. Skrobia pod wpływem kwasów lub enzymów ulega hydrolizie częściowej lub całkowitej. Przy udziale α -amylazy ślinowej i trzustkowej przekształcana jest do mieszaniny dekstryn, glukozy, maltozy i izomaltozy. Pod wpływem wodnego roztworu jodu w jodku potasu (płynu Lugola) skrobia barwi się na ciemnoniebiesko/fioletowo, co znajduje zastosowanie w wykrywaniu tego polisacharydu.

Skrobia oporna to forma skrobi, która nie ulega strawieniu w jelicie cienkim, lecz trafia do jelita grubego, gdzie staje się pożywką dla korzystnych bakterii jelitowych. Bakterie jelitowe fermentują skrobię oporną, wytwarzając krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Ten rodzaj skrobi występuje naturalnie w niektórych produktach lub powstaje w wyniku odpowiedniej obróbki kulinarnej.

2.2.2. Glikogen

Glikogen to główny materiał zapasowy zwierząt (wątroba, mięśnie) i grzybów, zbudowany z cząsteczek D-glukozy połączonych w proste łańcuchy wiązaniami

α -1,4-glikozydowymi, w których co 8–12 monomerów występuje rozgałęzienie tworzone przez wiązanie α -1,6-glikozydowe. Glikogen w przewodzie pokarmowym podlega hydrolizie przy udziale α -amylaz: ślinowej i trzustkowej, zaś w wątrobie i mięśniach podlega reakcjom fosforolizy i hydrolizy odpowiednio przy udziale fosforylasy glikogenowej (wiązania 1,4-glikozydowe) i enzymu usuwającego rozgałęzienia (wiązania 1,6-glikozydowe) do glukozo-1-fosforanu i glukozy.

2.2.3. Heparyna

Heparyna jest polimerem należącym do glikozaminoglikanów (GAG). Składa się z powtarzających się jednostek dwucukrowych (kwasu L-iduronowego lub D-glukuronowego oraz D-glukozaminy), połączonych wiązaniem α -1,4-glikozydowym. Jej cechą charakterystyczną jest duża liczba grup siarczanowych i karboksylowych nadających cząsteczce heparyny silny ładunek ujemny. Produkowana i magazynowana w komórkach tłuszczowych (mastocytach) oraz granulocytach zasadochłonnych, głównie w płucach, wątrobie i jelitach. Jest także stosowana w farmakoterapii ze względu na jej główną funkcję zapobiegania tworzenia się zakrzepów. Probówki z heparyną służą do pozyskiwania osocza do badań biochemicznych.

2.2.4. Celuloza

Celuloza to polisacharyd powszechnie występujący w roślinach. Pod względem chemicznym jest polimerem cząsteczek D-glukozy powiązanych wiązaniami β -1,4 glikozydowymi. Łańcuchy są proste i sztywne, a nie spiralne jak w skrobi. Celuloza zawiera około 14 000 reszt glukozowych, które są stabilizowane za pomocą wiązań wodorowych. Celuloza nie rozpuszcza się w wodzie ani w większości typowych rozpuszczalników organicznych, a także jest odporna na działanie większości enzymów. Nie rozkładają jej organizmy zwierzęce, dlatego stanowi tzw. błonnik pokarmowy nierozpuszczalny. Niektóre mikroorganizmy w układzie pokarmowym przeżuwaczy produkują enzym rozkładający ją do celobiozy i glukozy. W przemyśle spożywczym stosuje

się dodatek E460 (celuloza mikrokrystaliczna), który zapobiega zbrylaniu się produktów sypkich i zagęszcza sosy, lody, jogurty.

2.2.5. Chityna

Chityna jest polisacharydem wchodzącym w skład ścian komórkowych grzybów oraz szkieletów zewnętrznych skorupiaków, owadów. Zbudowana jest z N-acetyloglukozaminy. Jest niezwykle odporna na czynniki chemiczne i mechaniczne. Stosowana w suplementach wspomagających odchudzanie, w systemach dostarczania leków oraz opatrunkach przyspieszających gojenie się ran.

2.2.6. Agar

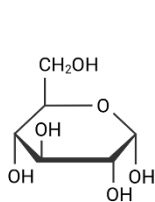
Agar to polisacharyd kwaśny, na skalę przemysłową izolowany z wodorostów, głównie krasnorostów (*Rhodophyta*). Wykorzystuje się go w mikrobiologii, genetyce, ponadto służy jako środek żelujący w piekarstwie i cukiernictwie. Składa się z dwóch frakcji: agarozy (ok. 70%) i agaropektyny (ok. 30%). Cząsteczki są połączone wiązaniami glikozydowymi, tworząc długie łańcuchy, które po ochłodzeniu splatają się w trójwymiarową sieć zatrzymującą wodę. Agarozą jest liniowym polimerem złożonym z cząsteczek agarobiozy. Agaropektyna to polisacharyd kwaśny złożony z cząsteczek D-galaktozy, zestryfikowany kwasem pirogronowym i kwasami uronowymi. Agar rozpuszcza się na gorąco a po ostygnięciu tworzy twardy żel.

Tabela 2.1. Klasyfikacja węglowodanów wraz z przykładami

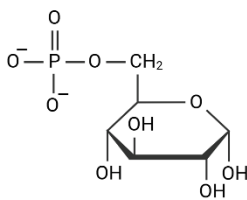
Monosacharydy	Disacharydy	Polisacharydy
Głukoza	Sacharoza	Glikogen
Fruktoza	Laktoza	Skrobia
Galaktoza	Trehaloza	Celuloza
Aldehyd glicerynowy	Maltoza	Chityna
Ryboza/deoksyryboza	Izomaltoza	Agar

Tabela 2.2. Podział węglowodanów wraz z przykładami

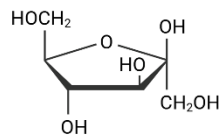
Aldopentozy	Ketopentozy	Aldoheksozy	Ketoheksozy
Ryboza	Rybuloza	Glukoza	Fruktoza
Arabinoza	Ksyluloza	Galaktoza	



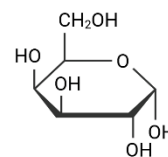
glukoza



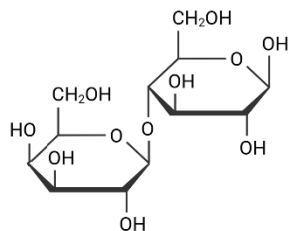
glukozo-6-fosforan



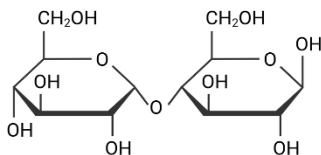
fruktoza



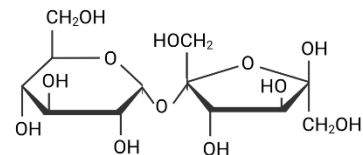
galaktoza



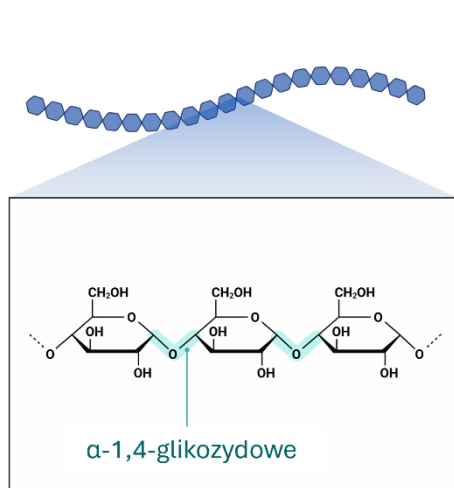
laktoza



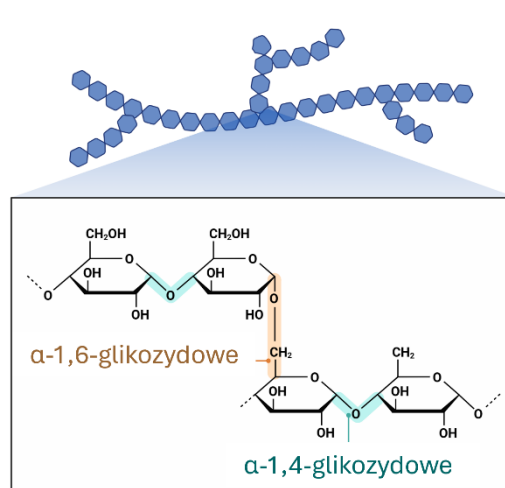
maltoza



sacharoza



amyloza



amylopektyna

Rycina 2.4. Przykłady węglowodanów. Źródło: BioRender.com

II. Część praktyczna

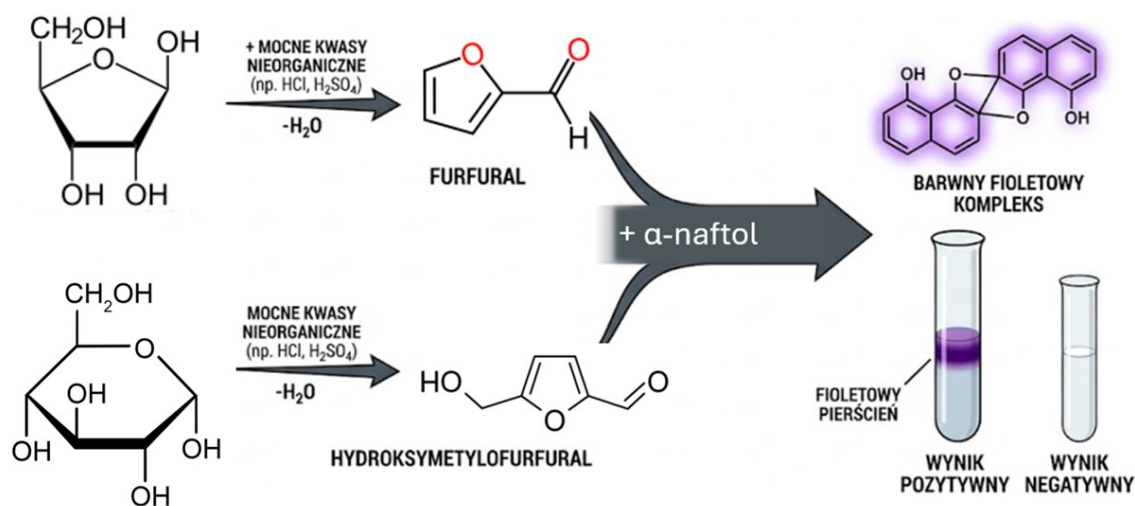
Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- probówki szklane
- pipety Pasteura
- pipety automatyczne
- wytrząsarka Vortex
- termoblok
- łaźnia wodna
- 2% alkoholowy roztwór α -naftolu
- stężony H_2SO_4
- stężony HCl
- 3% etanolowy roztwór tymolu
- 1% roztwór FeCl_3
- odczynnik Barfoeda (roztwór octanu miedzi)
- odczynnik Biala (roztwór orcyny w HCl)
- odczynnik Seliwanowa (roztwór rezorcyny w HCl)
- płyn Lugola (roztwór jodu w KI)
- roztwór Fehlinga I (wodny roztwór CuSO_4)
- roztwór Fehlinga II (roztwór winianu sodowo-potasowego w NaOH)
- materiał: 1% roztwory cukrów, roztwór nieznanego cukru.

Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Odróżnianie węglowodanów od innych związków organicznych – próba Molischa (reakcja z α -naftolem)

Monosacharydy zawierające więcej niż 4 atomy węgla, a także cukry złożone, w reakcji z mocnymi kwasami nieorganicznymi, np. HCl, H₂SO₄, ulegają odwodnieniu i cyklizacji, wskutek czego tworzą pochodne furanu, odpowiednio: pentozy – furfural, heksozy – hydroksymetylofurfural. Powstałe pochodne furfuralowe w środowisku alkoholu tworzą z α -naftolem barwne kompleksy (Ryc. 2.5.). Ujemny wynik próby wyklucza obecność sacharydów w badanym materiale, zaś pozytywny nie jest wystarczającym dowodem na obecność cukrów, gdyż reakcja zachodzi także przy udziale innych związków takich jak aldehydy, ketony (np. aceton) i niektóre kwasy organiczne (np. kwas cytrynowy, szczawiooctowy).



Rycina 2.5. Schemat reakcji węglowodanów z α -naftolem w próbie Molischa

Do krótkich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

Roztwór wodny:	Numer próbówki								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml

Do wszystkich próbówek dodać po 2 krople 2% roztworu α -naftolu i wymieszać na mieszadło Vortex. Zawartość każdej próbówki podwarstwić stężonym H₂SO₄ (2–3 krople) – ostrożnie wlewając po ścianie przechylonej próbówki, nie wstrząsać.

Obserwacje i wnioski:

2. Odróżnianie węglowodanów od innych związków organicznych – próba z tymolem

Pod wpływem działania silnych kwasów na węglowodany następuje ich odwodnienie i cyklizacja, w wyniku której tworzą się furfural i jego pochodne. Powstający barwny czerwony produkt jest wynikiem reakcji kondensacji pochodnych furfuralowych z tymolem. Reakcja wykazuje specyficzność podobną do próby Molischa.

Do długich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

Roztwór wodny:	Numer próbówki								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml

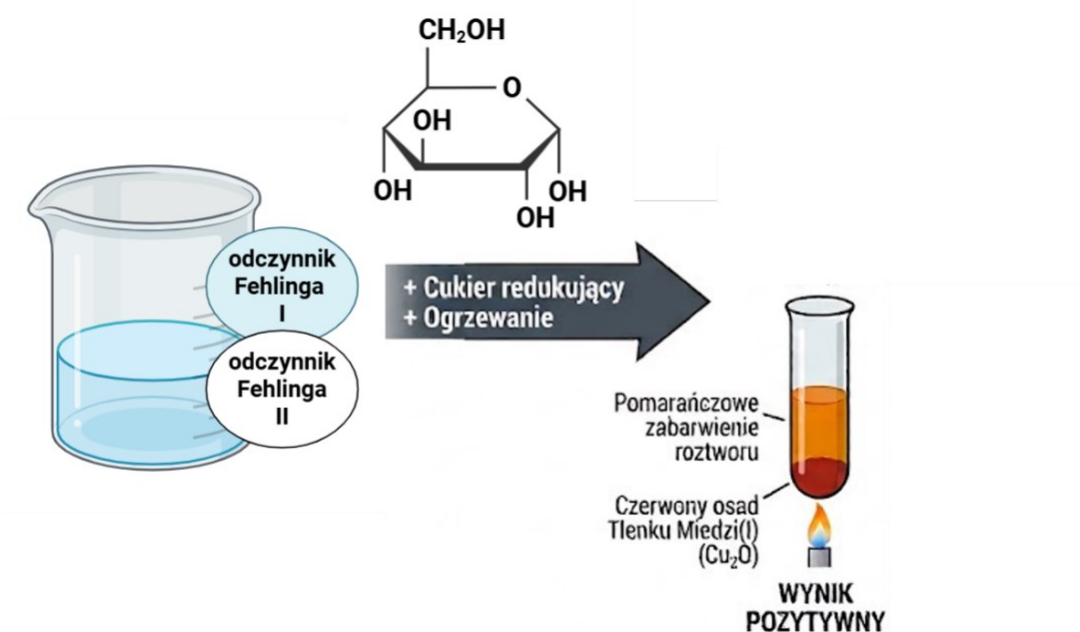
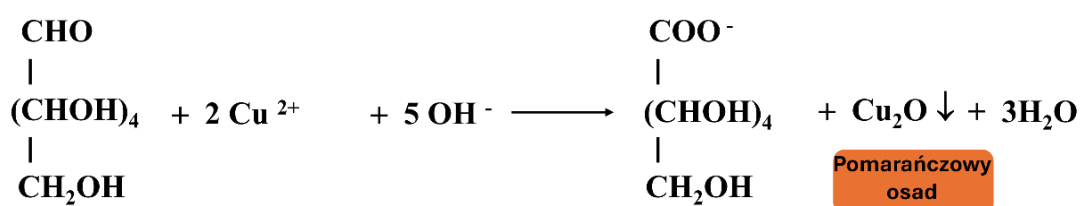
Do wszystkich próbek dodać po 4 krople 3% roztworu tymolu i wymieszać na mieszadło Vortex. Zawartość każdej próbówki podwarstwzić ok. 0,5 ml stężonego HCl (3–4 krople) – ostrożnie wlewając po ścianie przechylonej próbówki, nie wstrząsać. Probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na ok. 5 min.

3. Wykrywanie cukrów redukujących – próba Fehlinga

Występowanie w cząsteczce cukru wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej nadaje mu właściwości redukujące. W środowisku kwaśnym wolna grupa aldehydowa ($R-CHO$) jest zablokowana, uczestnicząc w tworzeniu formy pierścieniowej. Obecność zasady powoduje otwarcie pierścienia i uwolnienie grupy aldehydowej, która może ulegać utlenieniu do grupy karboksylowej, czemu towarzyszy redukcja utleniacza.

W próbie Fehlinga, po zmieszaniu roztworu Fehlinga I (niebieskiego, wodnego roztworu CuSO_4) i Fehlinga II (bezbarwnego roztworu winianu sodowo-potasowego, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, zwanego również solą Rochelle'a, oraz NaOH) powstaje zasadowy roztwór kompleksu jonów miedzi(II)

z winianem. Dodany cukier redukujący ulega utlenieniu, oddając elektrony, których akceptorem są jony miedzi(II). Kompleks jonów miedzi z winianem po ogrzaniu rozpada się i powstaje ceglastoczerwony osad tlenku miedzi(I). Powstające zabarwienie roztworu wynika z redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ . Kolor mieszaniny poreakcyjnej może zmieniać się od czerwono-pomarańczowego do zielonego. Zielone zabarwienie jest wynikiem nakładania się pomarańczowej barwy zawiesiny Cu_2O z niebieskim zabarwieniem odczynnika Fehlinga (Ryc. 2.6.).

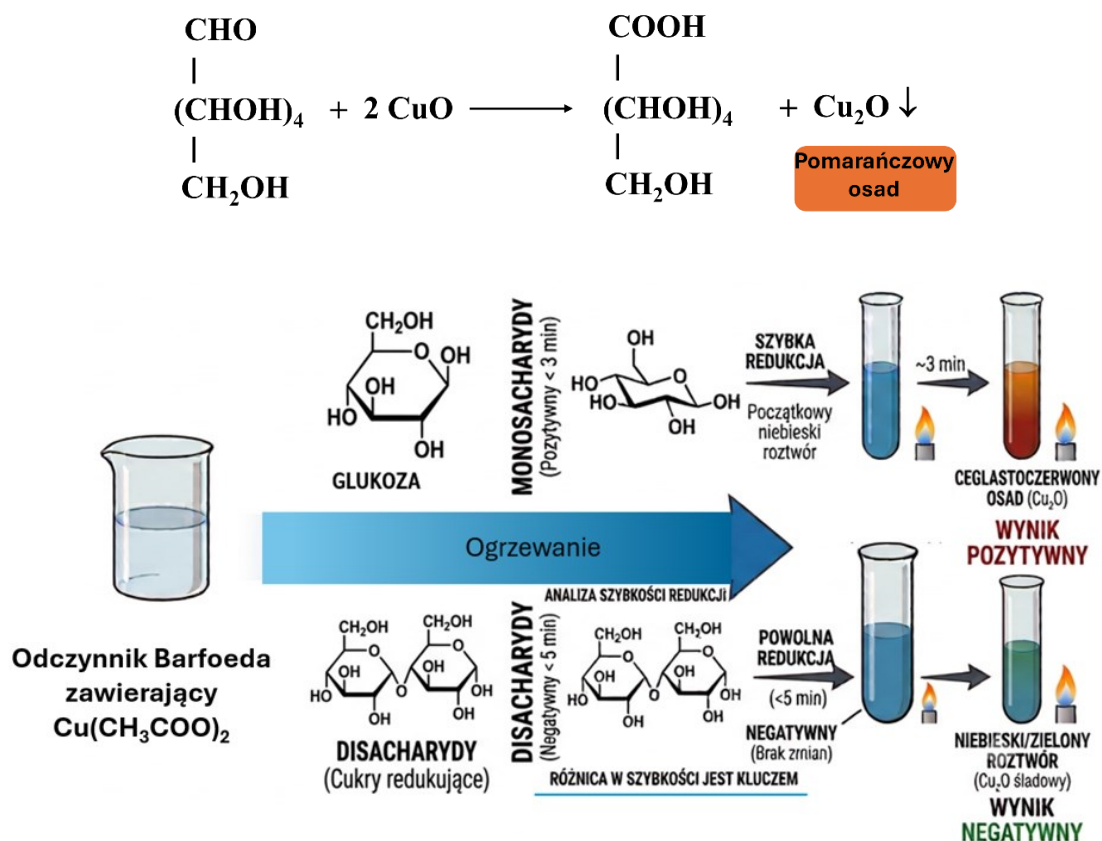


Rycina 2.6. Schemat reakcji cukrów redukujących w próbie Fehlinga

Do długich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer próbówki								
Roztwór wodny:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml
Do próbek dodać po 0,5 ml roztworu Fehlinga I (roztwór CuSO ₄), a następnie po 0,5 ml roztworu Fehlinga II (roztwór winianu sodowo-potasowego w NaOH) i wymieszać na mieszadło Vortex. Probówki wstawić do łaźni wodnej na ok. 10 min.									

Obserwacje i wnioski:



Rycina 2.7. Schemat reakcji mono- i disacharydów redukujących w próbie Barfoeda

Do długich szklanych probówek dodaj odczynniki według poniższej tabelki:

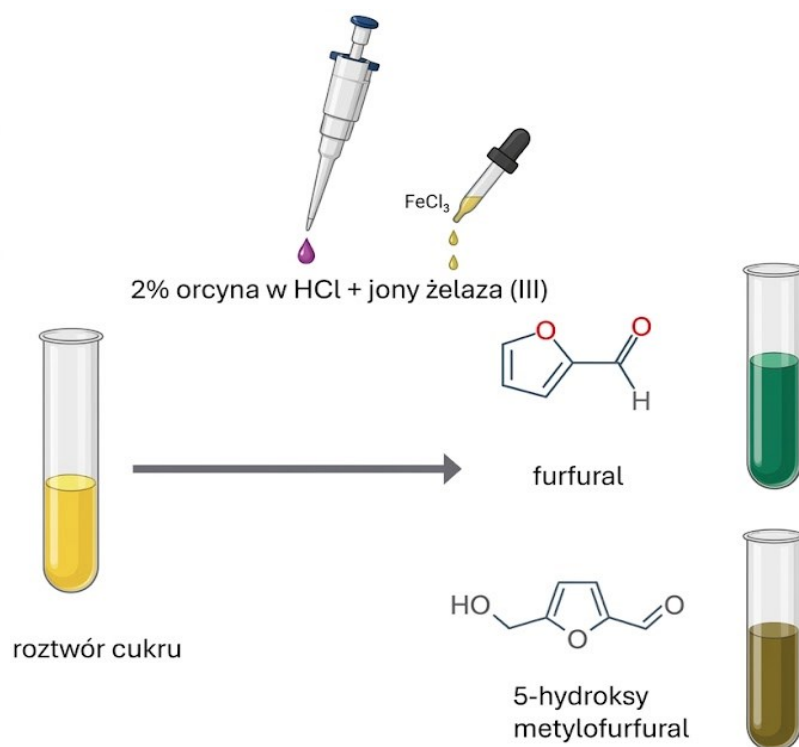
Roztwór wodny:	Numer probówki								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml

Do probówek dodać po 2,5 ml odczynnika Barfoeda i wymieszać na mieszadło Vortex.
Probówki wstawić do łaźni wodnej (ponad 85°C) na ok. 10 min.

Obserwacje i wnioski:

5. Odróżnienie pentoz od heksoz – próba Biala

Pentozy pod wpływem stężonego kwasu chlorowodorowego ulegają odwodnieniu do furfuralu, który w obecności jonów żelaza (III) tworzy z orcyną kompleks o barwie zielonej/zielono-niebieskiej (pentozofuranozy – zielony roztwór, heksozofuranozy – oliwkowo-brązowy roztwór) (Ryc. 2.8.). Próba Biała jest wykorzystywana w diagnostyce pentozurii poprzez wykrywanie L-ksylulozy w moczu.



Rycina 2.8. Schemat reakcji węglowodanów – pentoz i heksoz – w próbie Biala.
Źródło: opracowanie własne

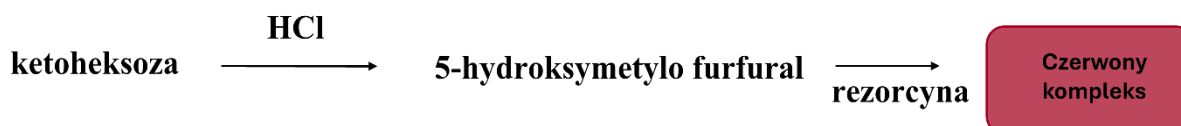
Do długich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer probówki								
Roztwór wodny:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest									0,5 ml
Do probówek dodać po 2 ml odczynnika Biala (2% roztwór orcyny w HCl) oraz po 1 kropli wodnego roztworu FeCl ₃ i wymieszać na mieszadło Vortex. Probówki wstawić do wrzącej łąźni wodnej na ok. 10 min.									

6. Odróżnienie ketoz od aldoz – próba Seliwanowa

W wyniku działania stężonego kwasu solnego węglowodany przekształcają się w pochodne furfuralowe, które kondensują z rezorcyną, tworząc produkt o barwie od różowej do czerwonej (Ryc. 2.9.). Dodatni wynik próby Seliwanowa dają wszystkie ketopentozy, ketoheksozy i oligosacharydy zawierające ketozy po ich hydrolizie w środowisku kwaśnym. Ketozy ulegają tej reakcji bardzo szybko, tworząc furfural (ketopentozy) lub 5-hydroksymetylofurfural (ketoheksozy) – już po około 30 sekundach. Pozytywny wynik próby Seliwanowa daje również sacharoza, która w wyniku hydrolizy rozpada się na glukozę i fruktozę. Powstająca fruktoza, jako ketoheksoza, ulega

odwodnieniu do 5-hydroksymetylofurfuralu, który reaguje z rezorcyną, tworząc barwny produkt kondensacji. Aldozy mogą w tych warunkach tworzyć 5-hydroksymetylofurfural po około 10 minutach, powodując powstanie lekko różowego zabarwienia (disacharydy zawierające fruktozę reagują pośrednio między samą fruktozą a jedną z aldoz).



Rycina 2.9. Schemat reakcji węglowodanów – ketoz – w próbie Seliwanowa.

Źródło: opracowanie własne

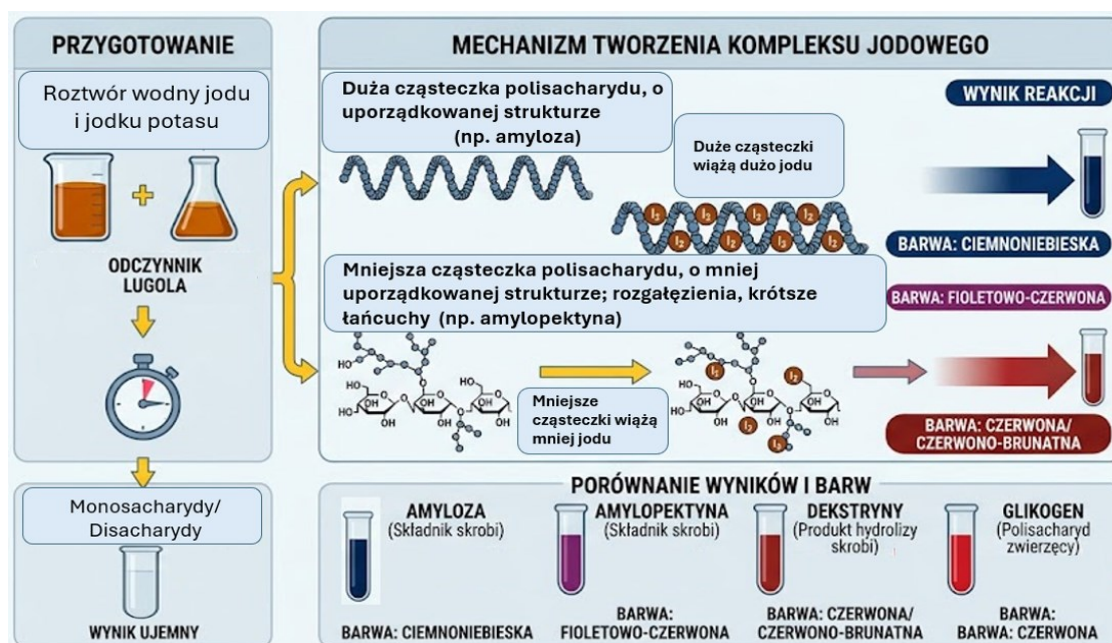
Do długich szklanych probówek dodać składniki według poniższej tabelki:

	Numer probówki								
Roztwór wodny:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml
Do probówek dodać po 0,5 ml odczynnika Seliwanowa i wymieszać na mieszadło Vortex. Probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na ok. 2–4 min.									

Obserwacje i wnioski:

7. Wykrywanie polisacharydów – próba z odczynnikiem Lugola

Reakcja ta pozwala na odróżnienie polisacharydów od innych węglowodanów, ponieważ kompleksy z jodem mogą tworzyć tylko duże cząsteczki o uporządkowanej strukturze.



Rycina 2.10. Schemat reakcji polisacharydów z odczynnikiem Lugola

Efekt barwny jest związany z wielkością cząsteczki – im większa cząsteczka polisacharydu, tym więcej cząsteczek jodu jest związanych w kompleksie. Amyloza barwi się intensywnie na kolor ciemnoniebieski. Kompleksy jodu z polisacharydami o krótszych łańcuchach mają barwę fioletowo-czerwoną (amylopektyna), a z glikogenem mają barwę czerwoną (Ryc. 2.10.).

Do długich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

Roztwór wodny:	Numer probówki								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glukozy	0,5 ml								
Fruktozy		0,5 ml							
Arabinozy			0,5 ml						
Sacharozy				0,5 ml					
Maltozy					0,5 ml				
Trehalozy						0,5 ml			
Skrobi							0,5 ml		
Nieznany								0,5 ml	
H ₂ O dest.									0,5 ml
Do probówek dodać po 3 krople płynu Lugola (wodny roztwór I ₂ w KI).									

Obserwacje i wnioski:

8. Kwaśna hydroliza polisacharydów

Polisacharydy w roztworach kwaśnych oraz pod wpływem enzymów ulegają hydrolizie. W wyniku hydrolizy wiązanie glikozydowe ulega rozerwaniu i powstają kolejno najpierw mniejsze makrocząsteczki, oligosacharydy, następnie disacharydy, a w końcu monosacharydy. W warunkach przemysłowych, hydroliza skrobi (z kukurydzy lub ziemniaków) przy użyciu kwasów pozwala uzyskać syropy glukozowe, glukozowo-fruktozowe oraz maltodekstryny powszechnie stosowane jako zamienniki cukru. W miarę postępu hydrolizy zanikają więc własności polisacharydów, a pojawiają się cechy monosacharydów.

Do długich szklanych probówek dodać odczynniki według poniższej tabelki:

Obserwacje i wnioski:

9. Podsumowanie:

Należy dokonać identyfikacji nieznanego roztworu cukru na podstawie wykonanych reakcji charakterystycznych.

	Wynik reakcji (+/-)
Reakcja Molischa	
Reakcja z tymolem	
Reakcja Fehlinga	
Reakcja Barfoeda	
Reakcja Biala	
Reakcja Seliwanowa	
Reakcja z płynem Lugola	
Reakcja hydrolizy kwaśnej	

Wniosek:

W próbce nr ... stwierdzono obecność:

.....

————— *Panel dyskusyjny* —————

- *Jakie substancje mogą dawać wyniki fałszywie ujemne lub dodatnie w klasycznych próbach redukcyjnych wykrywających węglowodany?*
- *Dlaczego nadmiar fruktozy (np. z syropu glukozowo-fruktozowego) prowadzi do stłuszczenia wątroby szybciej niż glukoza?*
- *Dlaczego po zjedzeniu owoców nie czujemy się tak syty, jak po spożyciu ziemniaków?*
- *Czy produkty „zero cukru” są rzeczywiście korzystniejsze dla zdrowia niż produkty z cukrem?*

Ćwiczenie 3.

Lipidy o właściwościach biologicznych

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z właściwościami chemicznymi kwasów tłuszczowych, tłuszczów właściwych i złożonych na podstawie następujących doświadczeń:

- *badanie rozpuszczalności lipidów*
- *wykrywanie kwasów żółciowych*
- *badanie właściwości emulgujących kwasów żółciowych*
- *wykrywanie glicerolu*
- *wykrywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych*
- *oznaczanie stężenia cholesterolu w surowicy krwi*
- *wykrywanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach.*

I. Wstęp merytoryczny

Lipidy, inaczej tłuszcze, to naturalne związki chemiczne o różnorodnej strukturze chemicznej. Lipidy są definiowane jako grupa związków dobrze rozpuszczalnych w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: chloroform, aceton, eter, a nierozpuszczalnych w wodzie. Lipidy proste dzieli się na dwa podstawowe typy: tłuszcze i woski, które zawierają wiązania estrowe i mogą ulec hydrolizie, oraz cholesterol i inne steroidy, które nie mają wiązań estrowych i nie ulegają hydrolizie.

Tłuszcze zwierzęce i oleje roślinne to najczęściej spotykane lipidy. Mimo, że fizycznie różnią się od siebie – tłuszcze zwierzęce, jak masło czy smalec, są ciałami stałymi, podczas gdy oleje roślinne, jak olej kukurydziany czy arachidowy są cieczami – ich struktury są bardzo podobne. Pod względem chemicznym tłuszcze zwierzęce i oleje roślinne są triacyloglicerolami (TAG; triglicerydami), triestrami glicerolu (gliceryny) z cząsteczkami długołańcuchowymi kwasów karboksylowych. Odmienność struktur związków lipidowych odzwierciedla różnorodność ich funkcji w żywych organizmach. Lipidy, o charakterze częściowo polarnym, głównie fosfolipidy, są podstawowymi składnikami błon komórkowych. Lipidy pełnią także funkcję materiału zapasowego, szczególnie w komórkach zwierzęcych, gdzie triacyloglicerole — lipidy niepolarne — są magazynowane w postaci kropli lipidowych. W komórkach roślinnych i bakteryjnych również mogą występować lipidy zapasowe, choć materiałem energetycznym mogą być także inne związki, takie jak skrobia czy glikogen.

1. Podział lipidów:

Lipidy proste — estry kwasów tłuszczowych i alkoholi:

- Tłuszcze właściwe — triacyloglicerole (TAG; triglicerydy, TG)
— estry glicerolu i nasyconych lub nienasyconych wyższych kwasów

tłuszczowych (12–24 C). Do pochodnych triacylogliceroli należą m.in. diacyloglicerole (DAG)

- Woski — estry wyższych monowodorotlenowych alkoholi i wyższych kwasów tłuszczowych (26–42 C).

Lipidy złożone — estry kwasów tłuszczowych i alkoholi zawierające dodatkowe grupy:

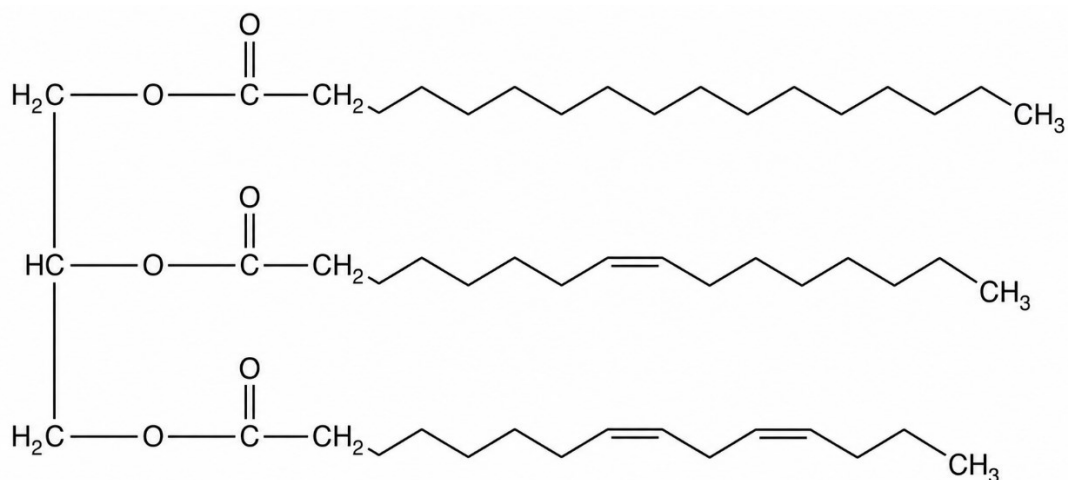
- Fosfolipidy:
 - glicerofosfolipidy np. lecytyna (fosfatydylocholina), kefalina (np. fosfatydyloseryna), fosfatydyloetanolamina, kardiolipina, fosfatydyloinozytol
 - sfingofosfolipidy – pochodne sfingozyny np. sfingomieliny
- Glikolipidy (glikosfingolipidy) – cerebrozydy, gangliozydy
- Inne lipidy złożone: sulfolipidy, aminolipidy, lipoproteiny.

Do prekursorów i pochodnych lipidów zalicza się kwasy tłuszczowe, steroidy, eikozanoidy, aldehydy tłuszczowe oraz niektóre witaminy rozpuszczalne w tłuszczach.

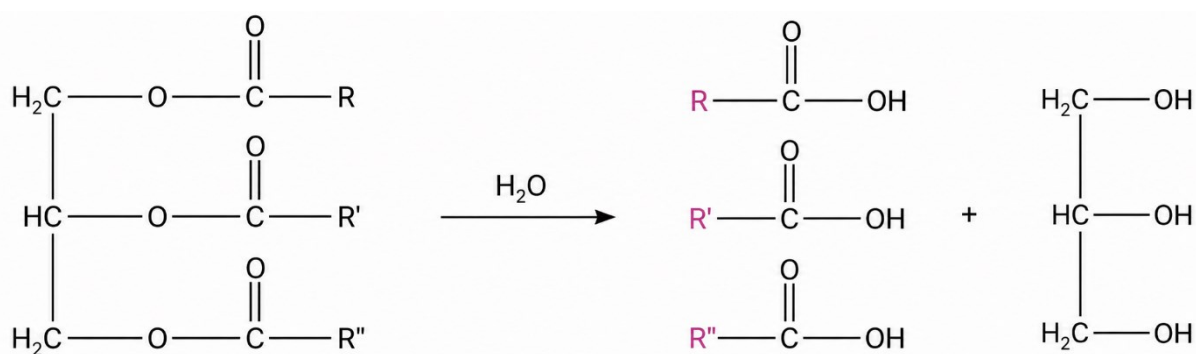
2. Lipidy o znaczeniu biologicznym:

Triacyloglicerole (TAG), zwane również triglicerydami (Ryc. 3.1.), to estry glicerolu (gliceryny) i trzech reszt wyższych kwasów tłuszczowych. Obok wolnych kwasów tłuszczowych, należą one do głównych materiałów energetycznych organizmu. Mogą być wykorzystywane bezpośrednio lub magazynowane w tkance tłuszczowej. Stanowią podstawową formę zapasową kwasów tłuszczowych. Ich stężenie w surowicy krwi ma istotne znaczenie diagnostyczne w ocenie zaburzeń lipidowych.

W wyniku hydrolizy triacylogliceroli (Ryc. 3.2.) powstają wolne kwasy tłuszczowe oraz glicerol.



Rycina 3.1. Struktura triacyloglicerolu zawierającego reszty kwasów: palmitynowego, oleinowego i linolenowego, o wzorze sumarycznym: $C_{55}H_{98}O_6$



Rycina 3.2. Hydroliza triacyloglicerolu do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych. Reakcja katalizowana jest przez lipazy i zachodzi z udziałem cząsteczek wody.
Źródło: Zintegrowany Portal Edukacyjny

2.1. Kwasy tłuszczowe to monokarboksylowe, alifatyczne kwasy karboksylowe o prostym łańcuchu węglowym. Najczęściej zawierają od 4 do 30 atomów węgla. Naturalnie występujące kwasy tłuszczowe mają zwykle parzystą liczbę atomów węgla w cząsteczce. Mają charakter amfipatyczny: łańcuch węglowodorowy jest hydrofobowy, natomiast grupa karboksylowa jest polarna i hydrofilowa.

Ze względu na liczbę atomów węgla, kwasy tłuszczowe dzielimy na:

- krótkołańcuchowe (≤ 6 atomów C)
- średniołańcuchowe (8–14 atomów C)
- długołańcuchowe (≥ 16 atomów C).

Ze względu na charakter wiązania pomiędzy atomami węgla dzielimy je na:

- Nasycone (>10 C, brak wiązania podwójnego) (np. kwas palmitynowy, kwas arachidowy)
- Nienasycone (przynajmniej jedno wiązanie podwójne):
 - Jednonienasycone (np. kwas oleinowy)
 - Wielonienasycone (np. kwas linolowy, kwas α -linolenowy, kwas arachidonowy)
 - Eikozanoidy (ikozanoidy) (np. prostaglandyny, tromboksany).

2.1.1. Nasycone kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe nasycone mają skład chemiczny wyrażony ogólnym wzorem:

$C_nH_{2n+1}COOH$ lub inaczej: $C_nH_{2n}O_2$.

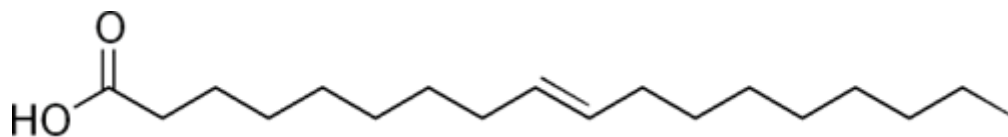
Kwasy tłuszczowe nasycone (Tab. 1) zawierające mniej niż 10 atomów węgla są cieczeniami, natomiast te z łańcuchem dłuższym niż 10 atomów węgla występują w stanie stałym (kwas kaprynowy zwany dekanowym, jest półstały w temperaturze pokojowej). Temperatura topnienia kwasów o parzystej liczbie atomów węgla rośnie wraz z długością łańcucha węglowego. Niższe kwasy tłuszczowe, aż do kwasu kaprynowego, charakteryzują się nieprzyjemnym zapachem i są odpowiedzialne za nieprzyjemny aromat zjełczałych tłuszczów. Nasycone kwasy tłuszczowe w warunkach laboratoryjnych są mało reaktywne i odporne na działanie czynników utleniających, jednak w procesach metabolicznych organizmów żywych ulegają łatwej degradacji i utlenieniu.

Tabela. 3.1. Zestawienie nasyconych kwasów tłuszczowych

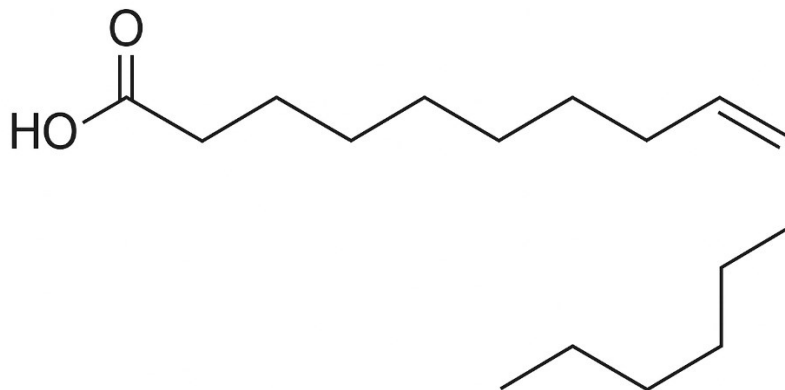
Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Liczba atomów węgla	Wzór półstrukturalny
Masłowy	butanowy	4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Kapronowy	heksanowy	6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Kaprylowy	oktanowy	8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Kaprynowy	dekanowy	10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Laurynowy	dodekanowy	12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirystynowy	tetradekanowy	14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitynowy	heksadekanowy	16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearynowy	oktadekanowy	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Arachidowy	eikozanowy	20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Behemowy	dokozanowy	22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Lignocerynowy	tetrakozanowy	24	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$

2.1.2. Nienasycone kwasy tłuszczowe

Nienasycone kwasy tłuszczowe zawierają w cząsteczce jedno lub więcej wiązań podwójnych typu etylenowego $-\text{CH}=\text{CH}-$. Temperatury topnienia kwasów nienasyconych są niższe niż temperatury topnienia kwasów nasyconych o tej samej liczbie atomów węgla, i to tym niższe, im więcej w ich cząsteczkach znajduje się wiązań podwójnych. Tłuszcze zawierające dużą ilość kwasów tłuszczowych nienasyconych mają płynną konsystencję i nazywa się je olejami. Nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład tłuszczów mają od 1 do 6 wiązań podwójnych. Obecność wiązania podwójnego w cząsteczce stwarza możliwość izomerii *cis* i *trans* oraz izomerii położenia wiązania. Naturalne lipidy zawierają kwasy tłuszczowe głównie w konfiguracji *cis* (Rys. 3.3.), tzn. reszty kwasów tłuszczowych są rozmieszczone po tej samej stronie wiązania podwójnego. Powoduje to zgięcie łańcucha w miejscu tego wiązania. W izomerach *trans* (Ryc. 3.4.) reszty te znajdują się po przeciwnych stronach wiązania nienasyconego.



Rycina. 3.3. Wzór strukturalny kwasu oleinowego o konfiguracji *trans*



Rycina 3.4. Wzór strukturalny kwasu oleinowego o konfiguracji *cis*

Izomery *trans* powstają pod wpływem różnych czynników fizycznych lub chemicznych, m.in. podczas przemysłowej modyfikacji tłuszczów. Przykładem jest reakcja katalitycznego uwodornienia olejów roślinnych, podczas której może dochodzić do konwersji izomerów *cis* w *trans*. Spożycie izomerów *trans* jest szczególnie szkodliwe dla zdrowia, ponieważ wbudowując się w błony komórkowe, zmieniają ich płynność i zaburzają funkcjonowanie lipoprotein, prowadząc do podwyższenia stężenia cholesterolu LDL, obniżenia HDL oraz zwiększając ryzyko rozwoju miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych. W warunkach naturalnych izomery *trans* powstają w żołądku przeżuwaczy w wyniku reakcji enzymatycznej.

Właściwości chemiczne kwasów nienasyconych wynikają z obecności wiązania podwójnego. Związki te mogą przyłączać m.in. chlorowce lub wodór (reakcje addycji), prowadząc do powstania odpowiednich kwasów nasyconych lub ich pochodnych chlorowcowych.

Reakcje addycji, polegające na przyłączaniu chlorowców lub innych podstawników do wiązań podwójnych w kwasach nienasyconych, wykorzystuje się w analizie tłuszczów, m.in. do oznaczania liczby jodowej czy liczby rodanowej.

2.1.2.1. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe

Zawierają w cząsteczce jedno wiązanie podwójne (Tab. 3.2) – niekiedy nazywane są kwasami monoenowymi. Ich skład odpowiada wzorowi ogólnemu: $C_nH_{2n-1}COOH$, czyli inaczej: $C_nH_{2n-2}O_2$.

Najważniejszym i najczęściej występującym w naturalnych tłuszczach kwasem monoenowym jest kwas oleinowy. W tłuszczach obecny jest także jego izomer geometryczny — kwas elaidynowy, będący odmianą *trans* izomerem kwasu oleinowego (który występuje w formie *cis*). Oprócz tego znane są również izomery położeniowe kwasu oleinowego, różniące się położeniem wiązania podwójnego w cząsteczce, m.in.: kwas petroselinowy oraz kwas wakcenowy. W przeciwieństwie do izomerów *trans*, izomery położeniowe mają korzystny lub neutralny wpływ na profil lipidowy.

Tabela 3.2. Zestawienie przykładowych jednonienasyconych kwasów tłuszczowych

Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Lokalizacja wiązania podwójnego	Wzór skrócony półstrukturalny	Występowanie
Kwas elaidynowy	kwas <i>trans</i> -oktadec-9-enowy	Δ^9	$C_{17}H_{33}COOH$	tłuszcze utwardzane
Kwas oleinowy	kwas <i>cis</i> -oktadec-9-enowy	Δ^9	$C_{17}H_{33}COOH$	olej z oliwek, oleje roślinne
Kwas palmitooleinowy	kwas <i>cis</i> -heksadec-9-enowy	Δ^9	$C_{15}H_{29}COOH$	tłuszcze zwierzęce, oleje roślinne
Kwas wakcenowy	kwas <i>trans</i> -oktadec-11-enowy	Δ^{11}	$C_{17}H_{33}COOH$	tłuszcze mleczne
Kwas erukowy	kwas <i>cis</i> -dokoz-13-enowy	Δ^{13}	$C_{21}H_{41}COOH$	olej rzepakowy

2.1.2.2. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe

Kwasy wielonienasycone (polienowe) (Tab. 3.3.) mogą zawierać w cząsteczce od 2 do 6 wiązań podwójnych. Ogólny wzór tych kwasów można przedstawić następująco: $C_nH_{2n-2x}O_2$, gdzie x oznacza liczbę wiązań podwójnych. Wiązania podwójne rozmieszczone są w charakterystyczny sposób, tworząc układ izolowany, tzn. są one oddzielone przynajmniej jedną grupą metylenową $-CH_2-$. Ma to duże znaczenie w procesie utleniania kwasów tłuszczowych, ponieważ atomy wodoru grupy metylenowej znajdującej się pomiędzy wiązaniami podwójnymi wykazują szczególną reaktywność wobec tlenu. Kwasy tłuszczowe zawierające wiązania podwójne w układzie sprzężonym występują znacznie rzadziej w naturalnych tłuszczach. Natomiast kwasy wielonienasycone o wiązaniami izolowanymi występują w większości tłuszczów naturalnych. Najbardziej rozpowszechnione są kwasy dienowe (zawierające dwa wiązania podwójne), szczególnie kwas linolowy ($C_{18}:2$, $\Delta^{9,12}$), którego bogatym źródłem są oleje roślinne.

Tabela. 3.3. Zestawienie przykładowych nienasyconych kwasów tłuszczowych

Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Lokalizacja wiązania podwójnego	Wzór skrócony pół-strukturalny	Występowanie	Rodzina omega
Kwas linolowy	kwas <i>cis,cis</i> -oktadeka-9,12-dienowy	$\Delta^{9,12}$	$C_{17}H_{31}COOH$	oleje roślinne (słonecznikowy, kukurydziany)	ω -6
Kwas α -linolenowy	kwas <i>cis,cis,cis</i> -oktadeka-9,12,15-trienowy	$\Delta^{9,12,15}$	$C_{17}H_{29}COOH$	siemię lniane, olej rzepakowy	ω -3
Kwas arachidonowy	kwas all- <i>cis</i> -eikozatetra-5,8,11,14-enowy	$\Delta^{5,8,11,14}$	$C_{19}H_{31}COOH$	tkanki zwierzęce, fosfolipidy	ω -6
Kwas eikozapentaenowy (EPA)	kwas all- <i>cis</i> -eikozapenta-5,8,11,14,17-enowy	$\Delta^{5,8,11,14,17}$	$C_{19}H_{29}COOH$	ryby morskie (łosoś, makrela)	ω -3
Kwas dokozaheksaenowy (DHA)	kwas all- <i>cis</i> -dokozaheksa-4,7,10,13,16,19-enowy	$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	$C_{21}H_{31}COOH$	łuste ryby morskie	ω -3

Wyróżniamy, najczęściej występujące, trzy rodziny kwasów omega: omega-3, omega-6 i omega-9. Cyfry 3, 6 i 9 określają, przy którym atomie węgla (począwszy od skrajnej grupy metylowej), znajduje się pierwsze wiązanie podwójne. Organizm człowieka potrafi syntetyzować podwójne wiązanie tylko w pozycji dziewiątej licząc od grupy metylowej (czyli omega-9). Prekursory kwasów omega z wiązaniem w pozycji 3 (omega-3: kwas α -linolenowy) i 6 (omega-6: kwas linolowy) muszą być dostarczone do organizmu wraz z dietą. Ich źródłem są m.in. oleje roślinne, takie jak: olej kukurydziany, sojowy, lniany, a także oleje z ryb.

Kwasy omega-3 i omega-6 są niezbędnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (NNKT) i muszą być dostarczane wraz z pożywieniem, zaś omega-9 są korzystne dla zdrowia, ale nie są niezbędne. Równowaga spożycia omega-3 i omega-6 jest kluczowa dla profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych. Zalecana proporcja kwasów tłuszczowych ω -6 do ω -3, wynosi optymalnie od 4:1 do 1:1 i jest uznawana za istotny element wspierający świadome wybory żywieniowe.

2.2. Fosfolipidy

Fosfolipidy (Tabela 3.4.) to liczna grupa polarnych lipidów zawierających estrowo związaną resztę kwasu fosforowego. Zalicza się do niej kilka klas związków, znacznie różniących się budową. Najważniejszymi fosfolipidami są estry glicerolu, w których dwie grupy hydroksylowe są zestryfikowane kwasami tłuszczowymi, a trzecia grupa hydroksylowa — kwasem fosforowym. Ten z kolei może być zestryfikowany aminoalkoholem (AA). Fosfolipidy występują we wszystkich organizmach żywych, zwierzęcych i roślinnych. Występują w większych ilościach w niektórych organach, np. w mózgu, a także w nasionach roślin.

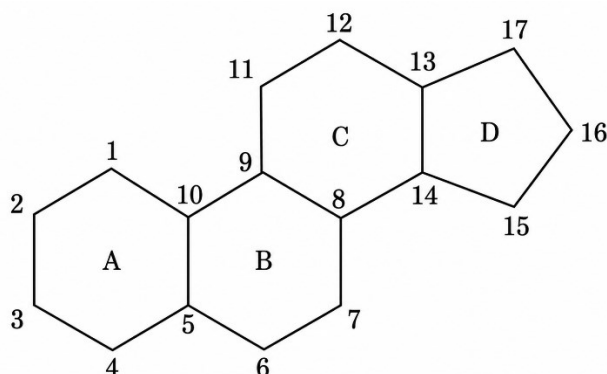
Tabela. 3.4. Zestawienie przykładowych fosfolipidów

Nazwa fosfolipidu	Budowa	Funkcje
Fosfatydyloglicerol	glicerol + 2 cz. kwasu tłuszczowego + reszta fosforanowa + glicerol	prekursor kardiolipiny
Difosfatydyloglicerol (kardiolipina)	2 cz. fosfatydyloglicerolu połączone resztą fosforanową	główny składnik błon mitochondrialnych
Fosfatydylocholina (lecytyna)	glicerol + 2 cz. kwasu tłuszczowego + kwas fosforowy + cholina	główny składnik błon komórkowych zwierząt, magazyn choliny, ważny lipid roślinny
Fosfatydyloetanolamina (kefalina)	glicerol + 2 cz. kwasu tłuszczowego + fosforan + kolamina (etanolamina)	składnik błon komórkowych, mózgu i osłonek mielinowych
Fosfatydyloinozytol	glicerol + 2 cz. kwasu tłuszczowego + fosforan + inozytol	składnik błon komórkowych, udział w przekazywaniu sygnałów
Fosfatydyloseryna	glicerol + 2 cz. kwasu tłuszczowego + fosforan + seryna	występuje w większości tkanek, ważna w sygnalizacji komórkowej
Sfingomielina	sfingozyna + kwas tłuszczowy (wiązanie amidowe) + fosforan + cholina	osłonki mielinowe, tkanka nerwowa, izolacja impulsów

cz. – cząsteczka

2.3. Sterole

Sterole są pochodnymi homologów cyklopentanoperhydrofenantrenu (Ryc. 3.5.) (szkieletu węglowego w formie czterech skondensowanych pierścieni).



Rycina. 3.5. Szkielet cyklopentanoperhydrofenantrenu – podstawowy szkielet steroidowy zbudowany z czterech skondensowanych pierścieni węglowych: trzech sześciocząłonowych (A, B, C) i jednego pięciocząłonowego (D)

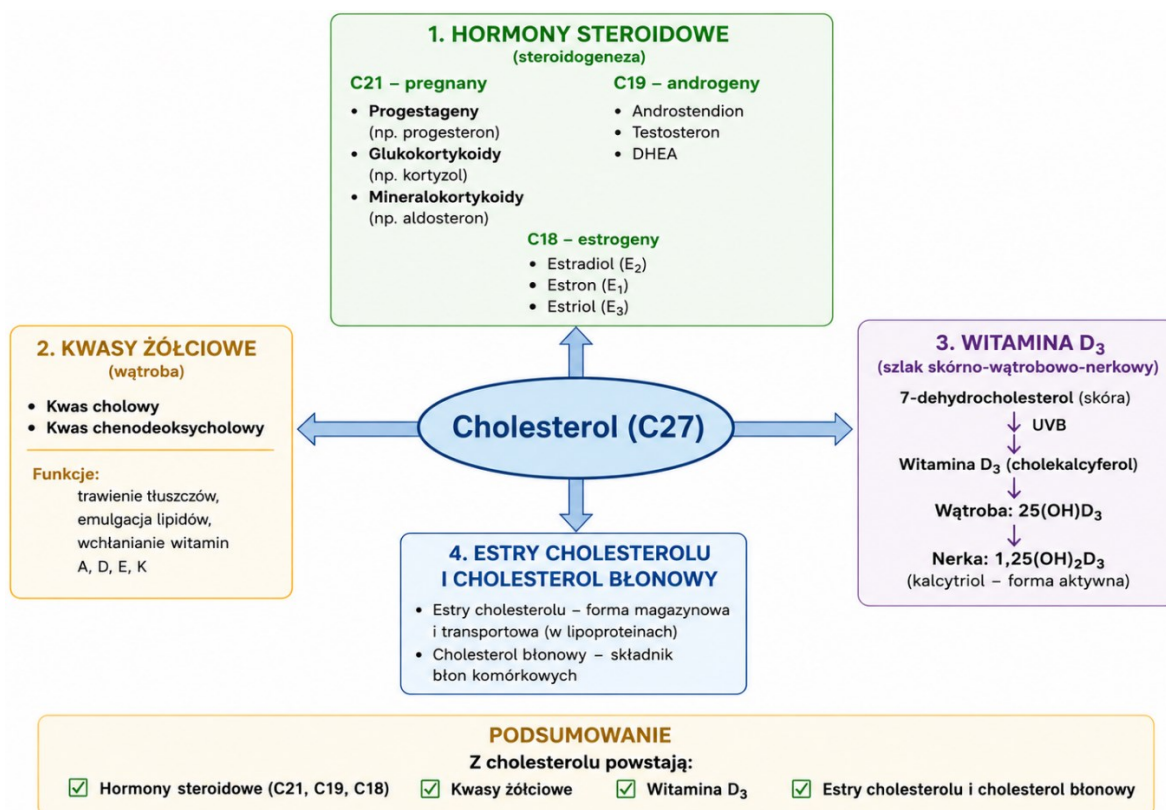
- sterole zwierzęce (Tab. 3.5.) — zoosterole — cholesterol, dehydrocholesterol, dihydrocholesterol
- sterole roślinne (Tab. 3.5.) — fitosterole — sitosterol, stigmasterol
- sterole grzybów i pleśni — fungisterole lub mykosterole, ergosterol (z drożdży, wykorzystywany do produkcji witaminy D₂)
- steroidy — witaminy D, kwasy żółciowe, hormony płciowe oraz hormony kory nadnercza.

Tabela. 3.5. Zestawienie przykładowych steroli zwierzęcych i roślinnych

Typ sterolu	Nazwa związku	Źródło	Charakterystyka
Zwierzęcy	Cholesterol	tkanki zwierząt (np. wątroba, mózg), produkty zwierzęce	główny sterol zwierzęcy, składnik błon komórkowych, prekursor hormonów steroidowych i witaminy D ₃
	7-dehydrocholesterol	skóra zwierząt i ludzi	prekursor witaminy D ₃
	Desmosterol	tkanki zwierzęce	pośredni produkt w biosyntezie cholesterolu
Roślinny	β-sitosterol	oleje roślinne, orzechy, nasiona	najczęściej występujący fitosterol, strukturalnie podobny do cholesterolu
	Kampesterol	oleje roślinne (np. rzepakowy), warzywa	obniża wchłanianie cholesterolu w jelitach
	Stigmasterol	soja, rośliny strączkowe	składnik błon komórkowych roślin
	Brassikasterol	rośliny kapustne	składnik błon komórkowych roślin

Cholesterol (Ryc. 3.6.) jest wykorzystywany do wytwarzania kwasów żółciowych, które pełnią funkcję detergentów i aktywatorów lipaz trzustkowych, uczestniczą w procesie trawienia i wchłaniania lipidów egzogennych w jelicie cienkim. Z 7-dehydrocholesterolu (prowitaminy D) w skórze, pod wpływem promieniowania UV-B, syntetyzowana jest witamina D₃ (cholekalcyferol).

Do steroidów zalicza się także hormony steroidowe – związki, które są hormonami biorącymi udział w regulacji wielu procesów biochemicznych, do nich zalicza się: estrogeny, glukokortykosteroidy, mineralokortykosteroidy, progestageny i androgeny.



Rycina 3.6. Wykorzystanie cholesterolu w organizmie człowieka

2.4. Kwasy żółciowe

Kwasy żółciowe są to organiczne kwasy, syntetyzowane w wątrobie z cholesterolu. Należą do steroidów, które zawierają od 1 do 3 grup hydroksylowych oraz grupę karboksylową w łańcuchu bocznym. Najczęściej spotykane naturalne kwasy żółciowe to:

- kwas cholowy ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroksycholowy) kwas pierwotny; stanowi 40–60% ogółu kwasów żółciowych u ludzi
- kwas chenodeoksycholowy ($3\alpha,7\alpha$ -dihydroksycholowy) kwas pierwotny; stanowi około 30–40% ogółu kwasów żółciowych u ludzi

- kwas deoksycholowy (3 α ,12 α -dihydroksycholowy) kwas wtórny; około 20–30%, powstaje z kwasu cholowego w jelicie
- kwas lithocholowy (3 α -hydroksycholowy), kwas wtórny; około 5–10%, powstaje w jelicie z kwasu chenodeoksycholowego.

Kwasy żółciowe występują w żółci głównie w postaci sprzężonej z aminokwasem glicyną (kwas glikocholowy i glikochenodeoksycholowy) lub tauryną (kwas taurocholowy i taurochenodeoksycholowy). W takiej postaci określa się je jako sprzężone kwasy żółciowe lub ich sole. W jelicie, pod wpływem aktywności bakterii jelitowych, dochodzi do ich odsprężania, a następnie część pierwotnych kwasów żółciowych ulega przemianom do wtórnych kwasów żółciowych, głównie kwasu deoksycholowego i lithocholowego. Zadaniem kwasów żółciowych jest ułatwienie wchłaniania nierozpuszczalnych w wodzie składników pokarmu takich jak tłuszcze, karotenoidy i niektóre witaminy (A, D, E, K). Emulgują substancje hydrofobowe tworząc z nimi kompleksy zwane kwasami choleinowymi, które posiadają zdolność przenikania przez błonę jelita. Ponadto kwasy żółciowe wspomagają usuwanie nadmiaru cholesterolu z organizmu oraz wydalanie niektórych toksyn i metabolitów leków. W diagnostyce laboratoryjnej kwasy żółciowe oznacza się w surowicy w celu oceny funkcji wątroby i przepływu żółci, szczególnie w diagnostyce cholestazy.

3. Chemiczne właściwości tłuszczów

Niektóre chemiczne właściwości tłuszczów zależą od ich składu. Dotyczy to przede wszystkim reakcji zachodzących w obecności wiązań podwójnych, takich jak uwodornianie czy utlenianie. Pozostałe reakcje wynikają z obecności wiązania estrowego w cząsteczkach tłuszczów.

3.1. Reakcja hydrolizy tłuszczów

Obecność wiązania estrowego stanowi charakterystyczną cechę tłuszczów właściwych. Wiązanie to może ulegać hydrolizie — zarówno w warunkach kwasowych i zasadowych, jak i enzymatycznie, z udziałem lipaz. Rozszczepienie wiązania estrowego pod wpływem hydrolizy zasadowej prowadzi do powstania glicerolu oraz soli kwasów tłuszczowych, zwanych mydłami — proces ten nosi nazwę zmydłania. Ze względu na ilościowy charakter reakcji, zmydłanie może być wykorzystywane w analizie ilościowej kwasów tłuszczowych — stanowi podstawę oznaczania tzw. liczby zmydlenia. Mydła można otrzymać nie tylko w wyniku zmydłania estrów, ale także bezpośrednio z wolnych kwasów tłuszczowych.

Mydła sodowe i potasowe są rozpuszczalne w wodzie i tworzą roztwory koloidowe o strukturze micelarnej. Z kolei mydła wapniowe, magnezowe i barowe są nierozpuszczalne — wytrącają się w postaci osadu. W środowisku wodnym kwasy tłuszczowe tworzą micide, w których hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe skierowane są do wnętrza, a grupy hydrofilowe na zewnątrz. W rozpuszczalnikach organicznych zachowanie to się odwraca — powstają micide odwrócone, z hydrofobowymi fragmentami skierowanymi na zewnątrz. Takie zachowanie na granicy faz skutkuje obniżeniem napięcia powierzchniowego. Dzięki temu mydła pełnią rolę emulgatorów, ułatwiając tworzenie trwałych emulsji tłuszczu z wodą — podobnie jak detergenty syntetyczne i kwasy żółciowe w przewodzie pokarmowym.

Zmydłanie tłuszczów w środowisku zasadowym polega na ogrzewaniu ich z roztworem wodorotlenku sodowego lub potasowego. W wyniku reakcji powstają sole sodowe lub potasowe kwasów tłuszczowych (czyli mydła) oraz glicerol. Powstające mydło emulguje tłuszcz w wodzie, zwiększając powierzchnię kontaktu między fazami i tym samym przyspieszając przebieg procesu zmydłania. Zmydłanie tłuszczów w środowisku kwaśnym polega na katalitycznym działaniu jonów wodorowych, które inicjują proces hydrolizy

wiązań estrowych. Reakcję przeprowadza się poprzez ogrzewanie tłuszczu z rozcieńczonym kwasem siarkowym w temperaturze powyżej 100°C, w naczyniu zamkniętym. Produktami reakcji są wolne kwasy tłuszczowe oraz glicerol.

3.2. Tworzenie emulsji

Emulsja jest to układ koloidalny dwóch mieszających się ze sobą cieczy (ośrodek rozpraszający i substancja rozproszona). Tego typu układy są termodynamicznie niestabilne, co oznacza, że z czasem dochodzi do rozdziału faz. Gdy fazą rozpraszającą jest woda, a rozproszoną olej, układ oznacza się jako O/W (olej w wodzie). Odwrotnie, gdy woda jest rozproszona w oleju — oznaczenie to W/O (woda w oleju).

W emulsjach powierzchnia styku dwóch faz (niemieszających się składników) jest bardzo duża, więc układ może być trwały tylko w przypadku, gdy siły napięcia powierzchniowego między fazami będą bliskie zeru. W przypadku przeciwnym faza rozproszona w bardzo krótkim czasie łączy się w fazę ciągłą i emulsja rozdziela się na dwie fazy ciągłe (zjawisko zwane koalescencją). Emulsje łatwo ulegają koalescencji, czyli łączeniu się kropelek cieczy rozproszonej w większe krople. Aby temu zapobiec, dodaje się emulgatory. Typ utworzonej emulsji zależy od emulgatora. Działanie emulgatorów polega na zmniejszaniu międzyfazowego napięcia powierzchniowego pomiędzy kropelkami substancji rozproszonej a cieczy rozpraszającej. Emulgatory są środkami powierzchniowo-czynnymi, które posiadają grupy zarówno hydrofilne, jak i lipofilne. Taka budowa powoduje, że umieszczają się one na granicy faz, jedną częścią "zanurzone" w fazie hydrofilowej a drugą w hydrofobowej. Tworząc monomolekularną warstwę, przyjmują na siebie funkcję granicy faz. Ponieważ ich powinowactwo do obu faz jest podobne, powodują praktycznie zanik napięcia powierzchniowego lub przynajmniej jego znaczne obniżenie, dzięki czemu stabilizują emulsję. Emulgatory pochodzenia naturalnego to np. lecytyna, a syntetycznego – estry glicerolu. Żółć jest naturalnym

emulgatorem, substancją zmniejszającą napięcie powierzchniowe tłuszczów. Tłuszcze pod wpływem żółci ulegają rozbiciu na drobne kropelki, co zwiększa powierzchnię ich kontaktu z lipazami i ułatwia ich trawienie.

3.3. Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych

Utlenianie kwasów tłuszczowych zawierających wiązania podwójne to złożone przemiany prowadzące do rozerwania tych wiązań. Utlenianie może być katalizowane przez enzym lipooksygenazę lub być inicjowane przez wysoce reaktywne czynniki chemiczne i fizyczne.

3.4. Wysycanie wiązań podwójnych w kwasach tłuszczowych

Obecność wiązania podwójnego, zawierającego prócz wiązania σ również dość słabe wiązanie π powoduje, że nienasycone kwasy tłuszczowe łatwo wchodzą w reakcje prowadzące do wysycenia podwójnego wiązania. Reakcje charakterystyczne służące do przerywania wiązań podwójnych to reakcje z chlorowcami, takimi jak Br_2 lub I_2 oraz reakcja z nadmanganianem potasu. W reakcji z chlorowcami następuje przyłączenie do podwójnego wiązania atomów chlorowca, na przykład w reakcji Hübla.

3.5. Reakcja uwodorniania tłuszczów

Podczas uwodorniania tłuszczów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe następuje przyłączenie wodoru do wiązań podwójnych, a reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych ulegają przemianie w reszty kwasów nasyconych. W wyniku wysycenia wiązań podwójnych tłuszcze półstałe i oleje przekształcają się w tłuszcze stałe. Proces uwodorniania olejów jest stosowany w przemyśle do tzw. utwardzania tłuszczów.

II. Część praktyczna

Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- etanol
- chloroform
- aceton
- roztwór deoksycholanu sodowego
- detergent
- wzorzec cholesterolu
- 7% wodny roztwór CuSO_4
- 10% wodny roztwór NaOH
- siarka sublimowana
- stężony roztwór NaOH (12 M)
- wodny roztwór KMnO_4
- 0,2% roztwór FeCl_3 w etanolu
- 0,5% roztwór α, α' -bipirydyny w etanolu
- glicerol
- olej roślinny
- smalec
- margaryna
- masło
- roztwór żółci
- witamina E
- probówki plastikowe oraz szklane
- pipety Pasteura
- pipety nastawne
- wytrząsarka Vortex
- termoblok
- łaźnia wodna

1. Badanie rozpuszczalności lipidów

Do 4 długich szklanych probówek dodaj badane lipidy oraz rozpuszczalniki według poniższej tabelki:

	Numer próbówki			
	1	2	3	4
Woda destylowana	1 ml	–	–	–
Etanol	–	1 ml	–	–
Chloroform	–	–	1 ml	–
Aceton	–	–	–	1 ml
Olej roślinny	4 krople	4 krople	4 krople	4 krople
Wytrząsać zawartość próbek na mieszadle Vortex przez 20 sek.				

2. Badanie właściwości kwasów tłuszczowych jako emulgatorów

Emulgatory to środki powierzchniowo czynne, które zawierają zarówno grupy hydrofilowe (przyciągające wodę), jak i lipofilowe (przyciągające tłuszcze). Obniżają one napięcie powierzchniowe na granicy faz, umożliwiając tworzenie stabilnych emulsji. Tłuszcze ulegają emulgacji w obecności detergentów, które zmniejszają napięcie powierzchniowe. Deoksycholan sodu to sól sodowa kwasu deoksycholowego; działa jako detergent jonowy, ułatwiający rozproszenie tłuszczów w środowisku wodnym.

Wykonanie:

Do 3 długich szklanych probówek dodaj odpowiednie składniki według poniższej tabelki:

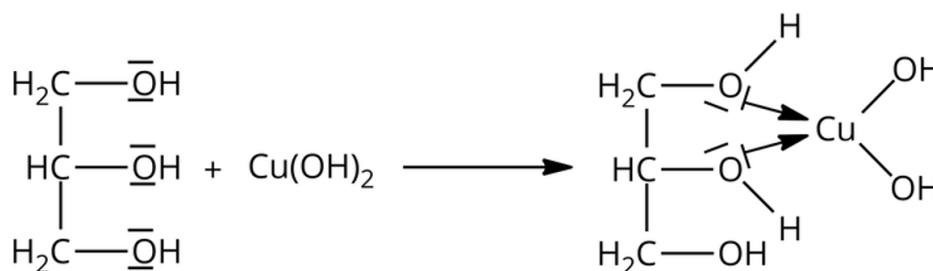
	Numer próbówki		
	1	2	3
Woda destylowana	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml
Olej roślinny	1 ml	1 ml	1 ml
Wymieszać zawartość probówek na Vorteksie, następnie dodać:			
Roztwór deoksyholanu sodowego	–	5 ml	–
Detergent	–	–	5 ml
Wytrząsać zawartość probówek na Vorteksie przez 10 sek.			

Obserwacje i wnioski

Obserwacje i wnioski

4. Wykrywanie glicerolu

Glicerol jest produktem hydrolizy triglicerydów. Jest to alkohol trihydroksylowy, który tworzy z wodorotlenkiem miedzi(II) ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) kompleksy o intensywnie niebieskim zabarwieniu (Ryc. 3.7.).



niebieskie zabarwienie

Rycina. 3.7. Schemat reakcji glicerolu z wodorotlenkiem miedzi(II) w środowisku zasadowym – powstanie kompleksu miedzi(II). Źródło: GroMar Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Wykonanie:

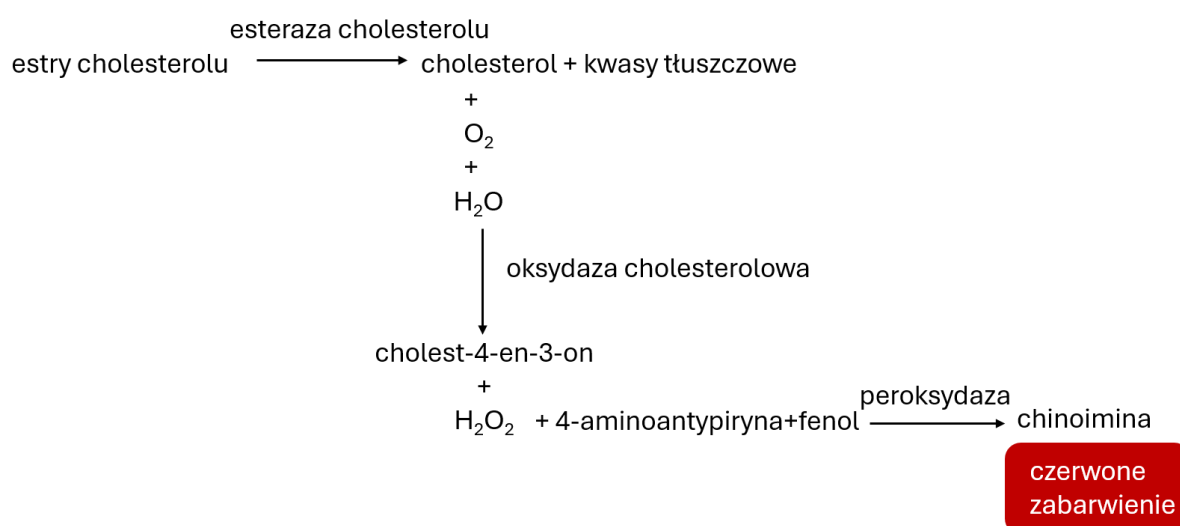
Do 2 szklanych probówek dodaj odpowiednie odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer próbowki	
	1	2
7% wodny roztwór CuSO ₄	1 ml	1 ml
10% wodny roztwór NaOH	1 ml	1 ml
Wymieszać zawartość probówek na Vorteksie, następnie dodać:		
Woda destylowana	1 ml	–
Glicerol	–	1 ml

Obserwacje i wnioski:

5. Oznaczanie stężenia cholesterolu w surowicy krwi

Do rutynowego oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi stosuje się metodę enzymatyczno-kolorymetryczną, która umożliwia ilościowe określenie zawartości cholesterolu na podstawie pomiaru absorbancji barwnego produktu reakcji. W pierwszym etapie (Ryc. 3.8.) estry cholesterolu ulegają hydrolizie pod wpływem hydrolazy estrów cholesterolu (EC 3.1.1.13), co prowadzi do uwolnienia wolnego cholesterolu. Następnie cholesterol jest utleniany przez oksydazę cholesterolową (EC 1.1.3.6) do cholest-4-en-3-onu, czemu towarzyszy powstawanie nadtlenku wodoru. W obecności peroksydazy nadtlenek wodoru reaguje z 4-aminoantypiryną oraz fenolem, prowadząc do powstania barwnego związku – chinoiminy o czerwonym zabarwieniu. Produkt ten charakteryzuje się maksymalną absorpcją światła przy długości fali 500 nm, co umożliwia jego ilościowe oznaczenie. Otrzymany wynik stanowi istotny parametr oceny gospodarki lipidowej organizmu i jest wykorzystywany m.in. w diagnostyce oraz monitorowaniu zaburzeń lipidowych.



Rycina 3.8. Przebieg reakcji enzymatycznych podczas oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego

Wykonanie:

Do 3 długich szklanych probówek dodaj odpowiednie odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer próbówki		
	próba badana	wzorzec	próba ślepa
Surowica	0,01 ml		
Wzorzec cholesterolu		0,01	
Woda destylowana		—	0,01
Odczynnik roboczy	1 ml	1 ml	1 ml
Wymieszać zawartość kuwet i inkubować przez 5 minut w temperaturze 37°C			
Zmierzyć absorbancję próby badanej oraz wzorca względem próby ślepej przy długości fali 500 nm.			

Policz stężenie cholesterolu stosując wzór:

$$\text{stężenie cholesterolu } \left(\frac{mg}{dl}\right) = \frac{A \text{ próby badanej}}{A \text{ próby wzorcowej}} \times c \text{ wzorca } \left(\frac{mg}{ml}\right)$$

A próby badanej – absorbancja próbki,

A wzorca – absorbancja wzorca,

C wzorca – stężenie wzorca (200 mg/dl; 5,17 mmol/L)

Obliczenia i wnioski:

Do szklanych probówek dodaj:

	Numer próbki	
	1	2
Olej roślinny	3–4 krople	–
Woda destylowana	2 ml	3 ml
Ogrzewać roztwór w termobloku kilka sekund, następnie dodać:		
Wodny roztwór KMnO_4	2 krople	2 krople
Po każdej kropli dokładnie wymieszać zawartość próbki.		

Obserwacje i wnioski

7. Wykrywanie nienasyconych steroli – reakcja Salkowskiego

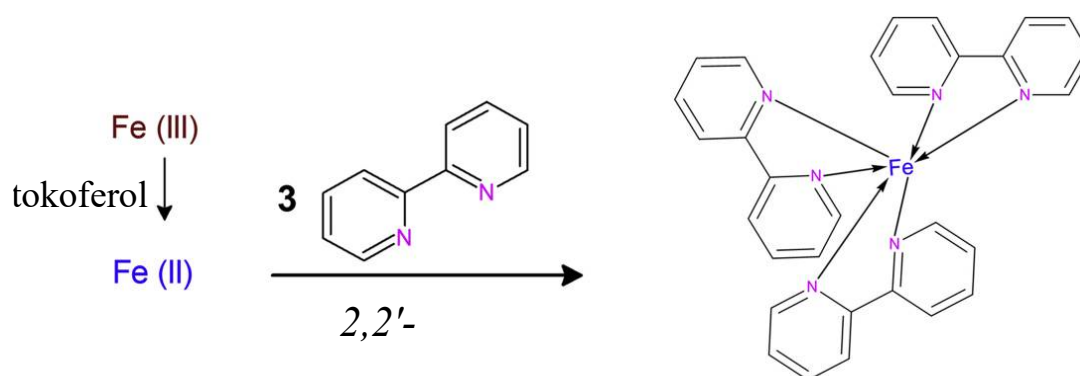
Do wykrywania steroli, takich jak cholesterol, wykorzystuje się reakcje ich odwadniania, np. reakcję Salkowskiego. Obecność nawet śladowych ilości wody uniemożliwia prawidłowy przebieg reakcji, dlatego próba musi być prowadzona w warunkach bezwodnych.

Do szklanych suchych (!) probówek dodaj:

Obserwacje i wnioski:

8. Wykrywanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Do witamin rozpuszczalnych w tłuszczach należą witaminy A, D, E i K. Witaminy A, E i K są związkami izoprenoidowymi, natomiast witamina D jest pochodną steroli. Witamina E zaliczana jest do tokoferoli – grupy związków naturalnie występujących w olejach roślinnych. Wspólną cechą tych związków jest obecność dwupierścieniowego szkieletu 6-hydroksychromanu oraz bocznego łańcucha zbudowanego z trzech jednostek izoprenowych. Związki te należą do najważniejszych naturalnych przeciwutleniaczy, a ich właściwości antyoksydacyjne (redukujące) wynikają przede wszystkim z obecności grupy hydroksylowej w pozycji 6 pierścienia 6-chromanolu. Zawartość witaminy E oznacza się na podstawie tworzenia barwnego kompleksu jonu Fe^{2+} (powstającego w wyniku redukcji Fe^{3+} przez tokoferole) z α,α' -bipirydyną w środowisku alkoholowym; powstający kompleks ma intensywną barwę różowoczerwoną (Ryc. 3.10.).



Rycina 3.10. Schemat redukcji jonów żelaza(III) do żelaza(II) przez tokoferol i tworzenia barwnego kompleksu z bipirydyną. Tokoferol redukuje jony Fe^{3+} do Fe^{2+} , ulegając jednocześnie utlenieniu do rodnika tokoferylowego. Powstałe jony Fe^{2+} tworzą z trzema cząsteczkami 2,2'-bipirydyny trwały kompleks $[\text{Fe}(\text{bipirydyna})_3]^{2+}$ o charakterystycznym różowo-czerwonym zabarwieniu, którego intensywność jest proporcjonalna do stężenia tokoferolu. Źródło: Naji KM: Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity, Heliyon, 2020 Jan 6;6(1):e03162

Wykonanie:

Do 3 krótkich szklanych probówek dodać odpowiednie odczynniki według poniższej tabelki:

	Numer próbówki		
	1	2	3
Witamina E	4 krople	–	–
Olej roślinny	–	4 krople	–
Woda destylowana	–	–	4 krople
Etanol	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
0,2% roztwór FeCl ₃ w etanolu	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
0,5% roztwór α , α' -bipirydyny w etanolu	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Pozostawić próbówki w temperaturze pokojowej na czas 5 minut.			

Obserwacje i wnioski:

Panel dyskusyjny

Czy produkty bogate w tłuszcze są bardziej kaloryczne niż produkty bogate w węglowodany lub białka?

Czy produkty „0% tłuszczu” są zawsze zdrowsze i co tracimy, eliminując tłuszcze z diety?

Na czym polega proces jęlczenia masła i innych tłuszczów oraz jakie są metody jego ograniczania?

Ćwiczenie 4.

Analiza kinetyki reakcji enzymatycznej katalizowanej przez fosfatazę

Celem ćwiczenia jest:

- *poznanie fizjologicznej roli fosfataz*
- *poznanie metody kinetycznej pomiaru aktywności enzymu*
- *wyznaczenie parametrów kinetycznych (V_{max} oraz K_M) dla reakcji z udziałem fosfatazy*
- *poznanie metody przeliczania zmiany absorbancji dla reakcji enzymatycznej na ilość moli uwalnianego produktu reakcji bez użycia krzywej wzorcowej*
- *poznanie definicji i wykorzystania parametru molowego współczynnika absorpcji*
- *wyznaczanie stałej Michaelisa (K_M) oraz szybkości maksymalnej (V_{max}) na podstawie wykresu Lineweavera-Burka*
- *wykazanie, że stała Michaelisa jest wyznacznikiem powinowactwa enzymu do substratu.*

I. Wstęp merytoryczny

1. Informacje ogólne

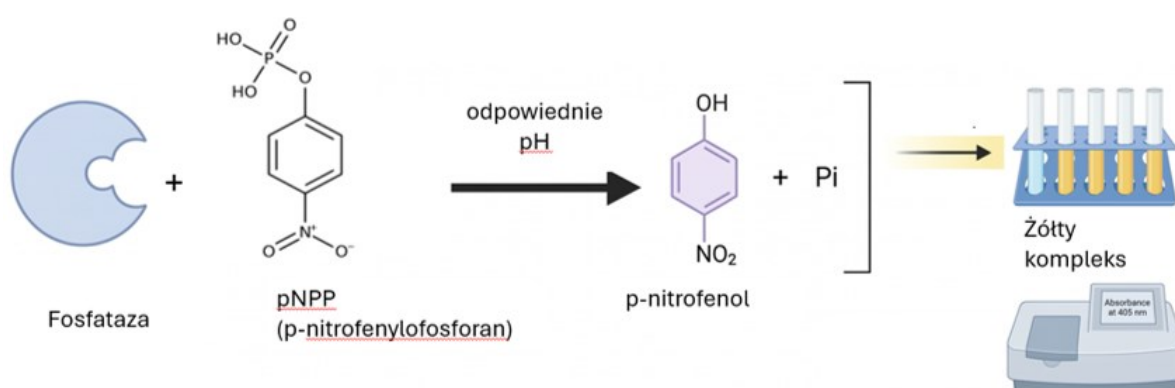
Fosfatazy to enzymy należące do klasy hydrolaz. Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB), fosfatazy są klasyfikowane w grupie EC 3.1.3, gdzie:

- 3 – hydrolazy (enzymy katalizujące reakcje hydrolizy z udziałem cząsteczki wody),
- 3.1 – hydrolazy działające na wiązania estrowe (enzymy katalizujące rozkład estrów kwasu fosforowego oraz innych estrów),
- 3.1.3 – fosfatazy fosfomonoestrowe (enzymy katalizujące hydrolizę monoestrów kwasu fosforowego),
- 3.1.3.1 – fosfataza zasadowa (alkaline phosphatase),
- 3.1.3.2 – fosfataza kwaśna (acid phosphatase).

Fosfatazy mają szerokie powinowactwo substratowe. Substratami dla fosfataz są estry fosforanowe białek, węglowodanów, tłuszczów i nukleotydów. Donorem grup fosforanowych może być np. glukoza-1-fosforan lub p-nitrofenylofosforan, a akceptorem np. cukry lub alkohole. Niektóre fosfatazy nie wykazują specyficzności substratowej lub hydrolizują tylko określone reszty fosforanowe. Wiele fosfataz pełni także funkcje transportujące reszty fosforanowe. Oznaczanie aktywności fosfataz ma znaczenie diagnostyczne. Zmiany chorobowe w określonych narządach prowadzą do wzrostu aktywności odpowiednich fosfataz w surowicy.

Najczęściej badana jest aktywność fosfatazy zasadowej (EC 3.1.3.1.) lub kwaśnej (EC 3.1.3.2) (Tab. 4.1.). Fosfataza zasadowa oznaczana w surowicy pochodzi głównie z wątroby (ok. 50%) i kości (ok. 48%). W przypadku fosfatazy kwaśnej ok. 30% stanowi forma pochodząca z gruczołu sterczowego. Inhibitorem fosfataz jest między innymi fosforan sodu. Przy ocenie aktywności fosfataz wykorzystuje się najczęściej substraty syntetyczne,

np. p-nitrofenylofosforan, glicerolofosforan, fenylofosforan. Miarą aktywności enzymu jest ilość uwolnionego nieorganicznego fosforanu lub reszty organicznej estru fosforanowego. Enzym wykazuje maksymalną aktywność w odpowiedniej temperaturze oraz pH. Najpopularniejszym syntetycznym substratem stosowanym w analityce jest p-nitrofenylofosforan, który w wyniku defosforylacji przekształca się w p-nitrofenol (Ryc. 4.1.). W środowisku alkalicznym związek ten przybiera żółte zabarwienie, a intensywność powstającego koloru mierzy się spektrofotometrycznie.



Rycina 4.1. Uproszczony schemat reakcji katalizowanej przez fosfatazę.
Źródło: BioRender.com

Tabela 4.1. Porównanie właściwości fosfatazy zasadowej i kwaśnej

	Fosfataza zasadowa	Fosfataza kwaśna
angielska nazwa	alkaline phosphatase (ALP)	acid phosphatase (ACP)
optimum pH	pH 9–11	pH 4–6
optimum działania	wymaga jonów Mg^{2+} , może być aktywowana przez inne kationy: Mn^{2+} , Co^{2+}	nie wymaga obecności Mg^{2+} , może być aktywowana przez jony dwuwartościowe: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}
hamowana przez:	anion fosforanowy	winiany, fluorki, fosforany
lokalizacja komórkowa	na zewnętrznej stronie błony plazmatycznej	w lizosomach, siateczce śródpłazmatycznej, aparacie Golgiego, w cytoplazmie

	Fosfataza zasadowa	Fosfataza kwaśna
występowanie tkankowe	głównie w kościach, nerkach, ścianie jelit, wątrobie, łożysku, mleku, żółci, moczu	głównie w wątrobie, nerkach, śledzionie, łożysku, erytrocytach
funkcja	bierze udział w procesie kalcyfikacji, biomineralizacji kości i chrząstek, transporcie lipidów i wapnia w jelitach	bierze udział w trawieniu wewnątrzkomórkowym w lizosomach, resorpcji kości oraz jest wydzielana przez gruczoł krokowy
wysoka aktywność obserwowana w:	— chorobach kości (krzywica, zapalenie kości, osteoporoza, osteomalacja, nowotwory kości, choroba Pageta) — nadczynności tarczycy — niedoborze witaminy D — chorobach wątroby i dróg żółciowych (żółtaczka mechaniczna, nowotwory) — ostrym zapaleniu trzustki	— raku gruczołu krokowego — przerzutach do kości — szpiczaku mnogim — zawale mięśnia sercowego — zakrzepowym zapaleniu żył — zapaleniu i marskości wątroby
fizjologiczny wzrost aktywności obserwuje się:	u wcześniaków, u dzieci w okresie dojrzewania, u kobiet w trzecim trymestrze ciąży oraz w fazie gojenia się złamań kości	u dzieci w okresie dojrzewania
spadek aktywności obserwuje się przy:	— bardzo wysokim/ toksycznym poziomie witaminy D — niedoczynności tarczycy — zespole nerczycowym — niedokrwistości złośliwej — niedożywieniu — odkładaniu się pierwiastków radioaktywnych w kościach	— terapii estrogenami — po kastracji

2. Założenia teoretyczne kinetyki reakcji enzymatycznych

Dla większości enzymów szybkość reakcji zmienia się wraz ze zmianą stężenia substratu (S). Ich właściwości kinetyczne opisuje model Michaelisa-Menten ujęty w równaniu:

$$V = \frac{V_{max} \times S}{S + K_M}$$

Kiedy stężenie substratu (S) jest niskie, to przy stałym stężeniu enzymu, szybkość reakcji (V) jest wprost proporcjonalna do stężenia substratu (V wykazuje zależność liniową od S). Przy wysokich stężeniach substratu V praktycznie nie zależy od (S).

Maksymalną szybkość reakcji (V_{max}) uzyskuje się wtedy, kiedy wszystkie centra aktywne enzymu są wysyczone substratem (szybkość reakcji nie zależy wówczas od stężenia substratu).

Stała Michaelisa (K_m) oznacza takie stężenie substratu, dla którego połowa miejsc aktywnych w enzymie jest wysyczona substratem, a szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej. Wartość K_m jest miarą powinowactwa enzymu do substratu i jej wartość określona jest w jednostkach stężenia.

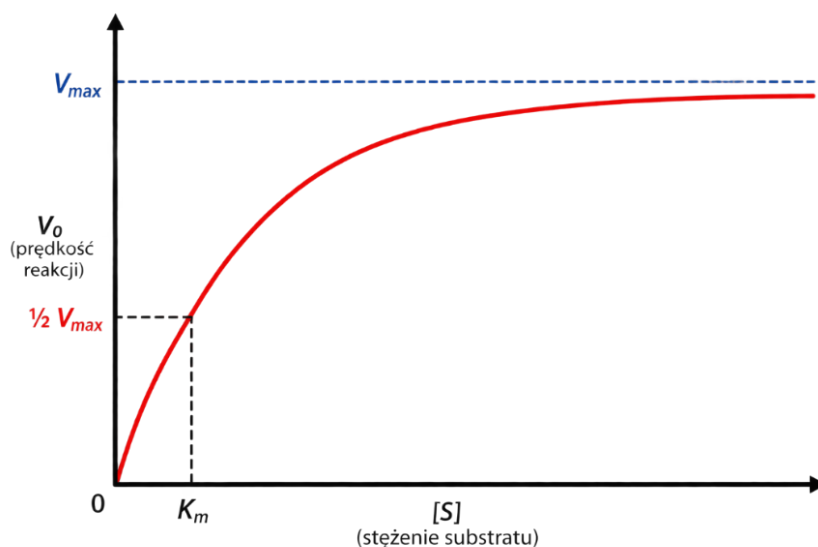
Jeżeli enzym działa zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten, to z pomiarów szybkości reakcji przy różnych stężeniach substratu można łatwo wyznaczyć wartość stałej Michaelisa i maksymalną szybkość reakcji (Ryc. 4.2.).

W tym celu należy przekształcić równanie Michaelisa w równanie prostej poprzez jego konwersję w formę odwrotności:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{S}$$

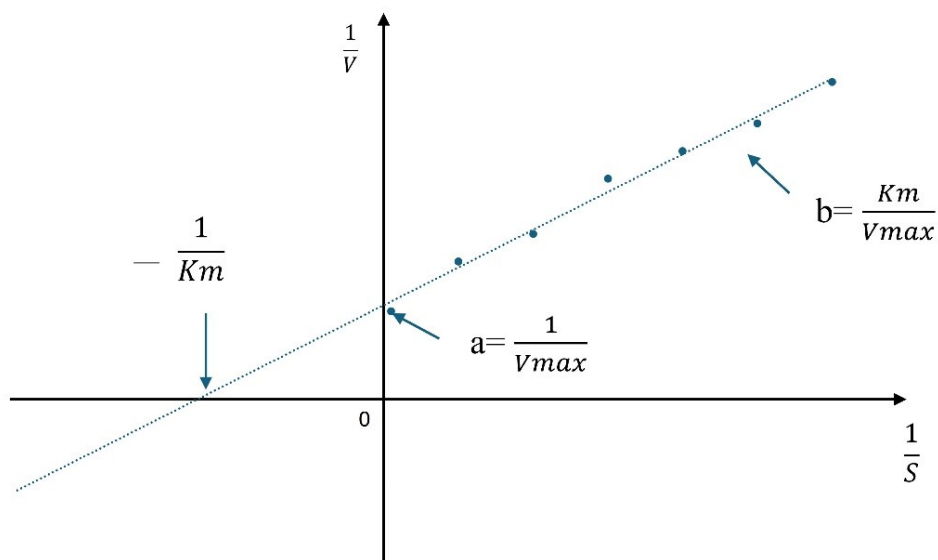
Wartości K_{Mas} i V_{max} są wielkościami charakteryzującymi dany enzym.

Przy stałej ilości enzymu na szybkość reakcji enzymatycznej wpływa zmiana temperatury, pH, obecności/zmiana stężenia soli, stężenie substratu.



Rycina 4.2. Kinetyka reakcji enzymatycznej w układzie Michaelisa-Menten

Wykres zależności $1/V$ od $1/S$ jest linią prostą o nachyleniu równym K_M/V_{max} , która przecina oś y w punkcie $1/V_{max}$ i nazywa się wykresem Lineweavera-Burka (Ryc. 4.3.). Punkt przecięcia z osią x wyznacza $-1/K_M$.



Rycina 4.3. Kinetyka reakcji enzymatycznej w układzie Lineweavera-Burka

2.1. Praktyczne znaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej

2.1.1. Znaczenie praktyczne wartości K_M

Wartość K_M posiada wymiar stężenia (mol/l) i wykorzystuje się ją do ustalenia stężenia substratu przy oznaczaniu aktywności enzymu w materiale biologicznym. Do oznaczenia aktywności enzymu w materiale biologicznym na ogół stosuje się stężenie substratu $100 \times$ wyższe od wartości K_M . Enzym działa wówczas z szybkością maksymalną. Znajomość wartości K_M umożliwia także obliczenie ułamka obsadzonych substratem miejsc aktywnych dla każdego stężenia substratu. Kiedy stała szybkości dysocjacji kompleksu enzym-substrat do wolnego enzymu i produktu jest wielokrotnie mniejsza niż stała dysocjacji tego kompleksu do wolnego enzymu i substratu, to K_M informuje nas także o wzajemnym powinowactwie enzymu do substratu.

2.1.2. Znaczenie praktyczne wartości V_{max}

Przy stałej ilości enzymu V_{max} wyrażone jest w molach/l $\times$ min⁻¹ (dawnej mol/min), na ogół jest to mikromol/l $\times$ min⁻¹) Przy znanej ilości miejsc aktywnych znajomość V_{max} pozwala określić liczbę obrotów danego enzymu. Liczba obrotów oznacza liczbę cząsteczek substratu, które w ciągu 1 sekundy mogą zostać przekształcone w produkt reakcji, przez 1 cząsteczkę enzymu w pełni wysyconego substratem. Liczba obrotów świadczy o aktywności metabolicznej enzymu. Jeżeli stężenie substratu jest wyższe od K_M to szybkość katalizy jest praktycznie równa liczbie obrotów.

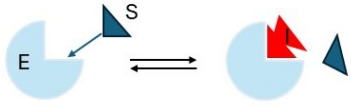
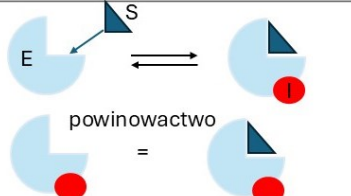
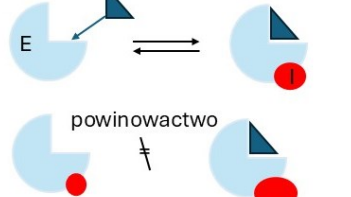
2.2. Jak inhibitory mogą wpływać na wartość K_M i V_{max} ?

W reakcjach odwracalnych, podlegających kinetyce Michaelisa-Menten, zmiana lub zachowanie wartości K_M i V_{max} w obecności inhibitora pomaga określić typ inhibicji. W obecności inhibitora krzywa zależności $1/V$ od $1/S$ jest mniej nachylona niż w układzie kontrolnym.

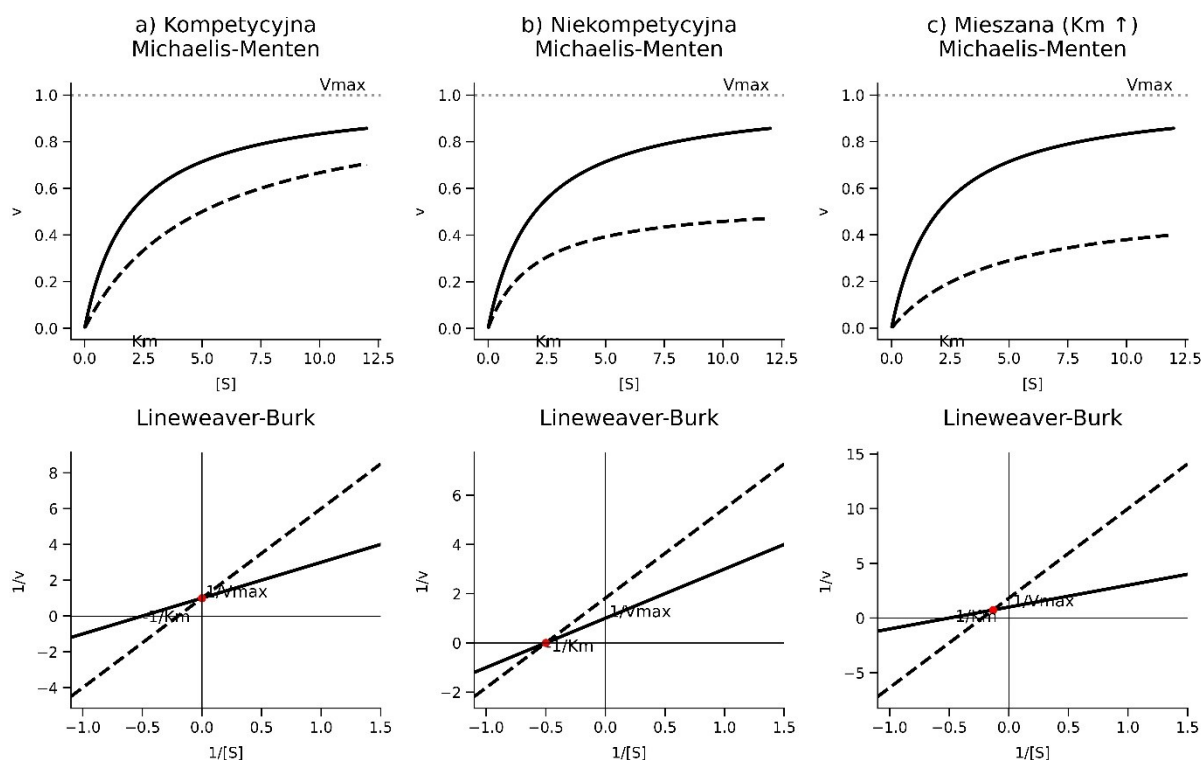
Inhibitor kompetycyjny (Ryc. 4.4., Ryc. 4.5.) współzawodniczy z substratem o centrum aktywne enzymu, ten typ inhibicji można więc odwrócić przez zastosowanie dostatecznie wysokich stężeń substratu. W przypadku inhibicji kompetycyjnej $V_{\max}$ nie ulega zmianie, natomiast wartość K_M wzrasta.

W inhibicji niekompetycyjnej (Ryc. 4.4., Ryc. 4.5.) miejsce wiązania substratu i inhibitora są różne. Inhibitor niekompetycyjny wiąże się zarówno z wolnym enzymem, jak i kompleksem enzym–substrat. Powinowactwo inhibitora do wolnego enzymu i kompleksu enzym–substrat jest takie samo. W wyniku związania inhibitora zmniejsza się zdolność enzymu do przekształcania substratu w produkt reakcji. W tym typie inhibicji zmniejsza się liczba obrotów enzymu (k_{cat}), a nie liczba cząsteczek enzymu zdolnych do wiązania substratu, jak ma to miejsce w inhibicji kompetycyjnej. W konsekwencji obniża się $V_{\max}$, natomiast K_M nie ulega zmianie.

Typ mieszany inhibicji (Ryc. 4.4., Ryc. 4.5.) występuje, gdy inhibitor wiąże się zarówno z wolnym enzymem, jak i kompleksem enzym–substrat, ale z różnym powinowactwem. W rezultacie inhibitor wpływa zarówno na wiązanie substratu przez enzym, jak i na jego zdolność do przekształcania substratu w produkt. W tym typie inhibicji zmieniają się zarówno wartość K_M , jak i $V_{\max}$. Wartość K_M może ulec zwiększeniu lub zmniejszeniu, w zależności od tego, czy inhibitor wykazuje większe powinowactwo do wolnego enzymu, czy do kompleksu enzym–substrat.

Typ inhibicji	Mechanizm	Parametry kinetyki enzymatycznej
KOMPETYCYJNA		K_M ↑ V_{max} stała
NIEKOMPETYCYJNA		K_M stała V_{max} ↓
MIESZANA		K_M ↓ lub ↑ V_{max} ↓

Rycina 4.4. Główne typy inhibicji: kompetycyjna; niekompetycyjna; mieszana



Rycina 4.5. Wykresy w układzie Michaelisa–Mentena i Lineweavera-Burka dla inhibicji: a. kompetycyjnej, b. niekompetycyjnej i c. mieszanej (wariant ze zwiększoną wartością K_M). linia ciągła – bez dodatku inhibitora, linia przerywana – z inhibitorem. Źródło: *A Review of CYP-Mediated Drug Interactions: Lee J: Mechanisms and In Vitro Drug-Drug Interaction Assessment. Biomolecules, 2024 Jan 12;14(1):99*

3. Molowy współczynnik absorpcji

Molowy współczynnik absorpcji ϵ , zwany także absorpcją molową, to parametr, który określa jak silnie roztwór danej substancji o stężeniu 1 mol/l, w kuwecie o długości drogi świetlnej równej 1 cm pochłania światło o określonej długości fali. Posiada on wartość stałą dla danej substancji, niezależnie od jej stężenia. Molowy współczynnik absorpcji stosuje się do przeliczenia zmiany absorbancji na mole substratu lub produktu, wówczas, gdy znana jest masa molowa w/w substancji. Dla stężenia wyrażonego w molach/l, jednostką molowego współczynnika absorpcji jest ($L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), równoznaczne z $\text{litr} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

II. Część praktyczna

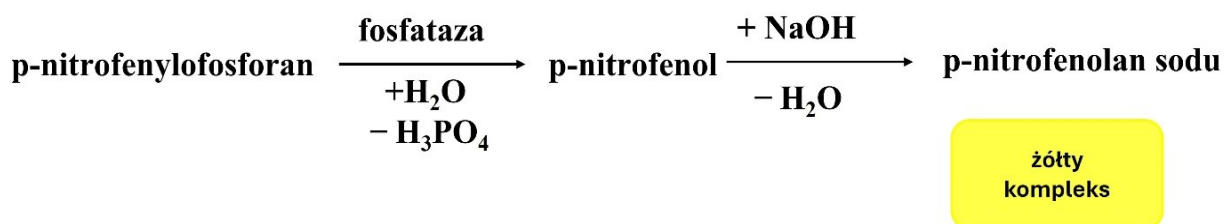
Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- bufor glicynowy (0,05 M, pH = 10,3) zawierający 23 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu
- bufor cytrynianowy (0,05 M, pH = 4,8) zawierający 23 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu
- 0,05 M wodny roztwór MgCl_2
- surowice kontrolne przygotowane na bazie surowicy krwi owczej, wzbogacane i standaryzowane na wartości prawidłowe surowicy ludzkiej – serostandard N lub wartości patologiczne – serostandard P
- spektrofotometr
- plastikowe kuwety spektrofotometryczne przeznaczone do pomiarów w świetle widzialnym

Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Porównanie aktywności fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi oraz ocena wpływu jonów magnezu na ich aktywność

Fosfatazy w odpowiednio dobranym do ich optimum pH (dla fosfatazy zasadowej $\text{pH} = 10,3$; dla fosfatazy kwaśnej $\text{pH} = 4,8$), hydrolizują p-nitrofenylofosforan do p-nitrofenolu i anionu fosforanowego (V). Powstający w trakcie reakcji produkt – p-nitrofenol, po dodaniu 1 mol/l roztworu NaOH tworzy sól (p-nitrofenolan sodu) o zabarwieniu żółtym. Związek ten wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 405 nm. Oznaczanie aktywności opiera się na pomiarze ilości uwolnionego p-nitrofenolu, który w środowisku zasadowym ma żółte zabarwienie (Ryc. 4.6.).



Rycina 4.6. Uproszczony schemat reakcji katalizowanej przez fosfatazę

2. Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi

Przygotować mieszaniny do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej zgodnie z poniższą tabelą (w kuwetach).

Nr kuwety	23 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu w 0,05 M buforze glicynowym (pH = 10,3)	Woda dest.	0,05 M wodny roztwór MgCl ₂	Surowica prawidłowa	Surowica patologiczna
1 (blank)	1,7 ml	0,2 ml	–	–	–
2	1,7 ml	0,1 ml	–	0,1 ml	–
3	1,7 ml	0,1 ml	–	–	0,1 ml
4	1,7 ml	–	0,1 ml	0,1 ml	–
5	1,7 ml	–	0,1 ml		0,1 ml
Zmierzyć absorbancję (długość fali 405 nm) próbek 2, 3, 4, 5 względem próbki 1 (próba ślepa/blank/zero): A ₀					
Inkubować kuwety w temperaturze 37 °C przez 30 min. Po tym czasie natychmiast dodać (z zachowaniem takiego samego dostępu czasowego) do wszystkich kuwet 0,1 ml NaOH (1M)					
Zmierzyć absorbancję (długość fali 405 nm) próbek 2, 3, 4, 5 względem próbki 1 (próba ślepa/blank/zero): A ₁					

Zapisz odczytane wyniki absorbancji:

Nr kuwety	A ₀	A ₁	A ₁ – A ₀
1 (próba ślepa)	–	–	–
2			
3			
4			
5			

Oblicz aktywność fosfatazy zasadowej w 1 ml surowicy krwi prawidłowej i patologicznej w warunkach kontrolnych (bez MgCl_2) oraz w obecności roztworu MgCl_2 zgodnie ze wzorem:

$$K = \frac{(A_1 - A_0) \times V_k}{t \times \varepsilon \times 1 \times V_s}$$

gdzie:

A_0 – absorbancja początkowa próbki

A_1 – absorbancja końcowa próbki

1 – grubość warstwy roztworu w kuwecie wyrażona w cm = 1 cm

V_k – końcowa objętość próbki w kuwecie = 2 ml

t – czas prowadzenia reakcji enzymatycznej = 30 min.

ϵ – współczynnik absorpcji molowej p-nitrofenolu = $18,5 \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

V_s – objętość surowicy w próbce = 0,1 ml

Obliczenia:

3. Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej w surowicy krwi

Przygotować mieszaniny do oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej zgodnie z poniższą tabelą (w kuwetach).

Nr kuwety	23 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu w 0,05 M buforze cytrynianowym (pH = 4,8)	Woda dest.	0,05 M wodny roztwór MgCl ₂	Surowica prawidłowa	Surowica patologiczna
1 (blank)	1,7 ml	0,2 ml	–	–	–
2	1,7 ml	0,1 ml	–	0,1 ml	–
3	1,7 ml	0,1 ml	–	–	0,1 ml
4	1,7 ml	–	0,1 ml	0,1 ml	–
5	1,7 ml	–	0,1 ml		0,1 ml
Zmierzyć absorbancję (długość fali 405 nm) próbek 2, 3, 4, 5 względem próbki 1 (próba ślepa/blank/zero): A ₀					
Inkubować kuwety w temperaturze 37 °C przez 30 min. Po tym czasie natychmiast dodać (z zachowaniem takiego samego dostępu czasowego) do wszystkich kuwet 0,1 ml NaOH (1M)					
Zmierzyć absorbancję (długość fali 405 nm) próbek 2, 3, 4, 5 względem próbki 1 (próba ślepa/blank/zero): A ₁					

Zapisz odczytane wyniki absorbancji:

Nr kuwety	A ₀	A ₁	A ₁ – A ₀
1 (próba ślepa)	–	–	–
2			
3			
4			
5			

Oblicz aktywność fosfatazy kwaśnej w 1 ml surowicy krwi prawidłowej i patologicznej w warunkach kontrolnych (bez MgCl_2) oraz w obecności roztworu MgCl_2 zgodnie ze wzorem:

$$K = \frac{(A_1 - A_0) \times V_k}{t \times \varepsilon \times 1 \times V_s}$$

gdzie:

A_0 – absorbancja początkowa próbki

A_1 – absorbancja końcowa próbki

1 – grubość warstwy roztworu w kuwecie wyrażona w cm = 1 cm

V_k – końcowa objętość próbki w kuwecie = 2 ml

t – czas prowadzenia reakcji enzymatycznej = 30 min.

ϵ – współczynnik absorbancji molowej p-nitrofenolu = $18,5 \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

V_s – objętość surowicy w próbce = 0,1 ml

Obliczenia:

4. Porównanie aktywności fosfatazy zasadowej i kwaśnej

Na podstawie uzyskanych wyników z części 2 i 3 należy porównać aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej w układzie prawidłowym oraz w surowicy patologicznej.

Przygotuj skład mieszaniny do oznaczania szybkości maksymalnej reakcji katalizowanej przez fosfatazę zgodnie z poniższą tabelą.

Roztwór p-nitrofenylo fosforanu w 0,05 M buforze glicynowym (pH = 10,3)	Numer kuwety									
	1 (ml)	2 (ml)	3 (ml)	4 (ml)	5 (ml)	6 (ml)	7 (ml)	8 (ml)	9 (ml)	10 (ml)
0										1,9
0,36	1,8									
0,72		1,8								
1,44			1,8							
2,88				1,8						
5,75					1,8					
11,50						1,8				
23,00							1,8			
34,50								1,8		
46,00									1,8	
Wyzerować spektrofotometr przy długości fali 405 nm na próbkę nr 10 (ślepa/blank) Następnie dodawać surowicę do kolejnych kuwet (stosując za każdym razem opóźnienie 1 min w stosunku do poprzedniej kuwety) i po wymieszaniu dokonać pomiaru absorbancji A_0										
Surowica	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–
Inkubować próbki 30 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie dodać po 0,1ml roztworu NaOH (1M) do kolejnych kuwet (stosując za każdym razem opóźnienie 1 min w stosunku do poprzedniej kuwety), a następnie wymieszać. Po wyzerowaniu spektrofotometru przy $\lambda = 405$ nm względem kuwety nr 10 (blank) dokonać kolejno pomiaru absorbancji A_1										
1 M NaOH	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Zapisz odczytane wyniki absorbancji:

Nr kuwety	A ₀	A ₁	A ₁ – A ₀
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			

Oblicz aktywność fosfatazy zasadowej (K = V) zgodnie ze wzorem:

$$K = \frac{(A_1 - A_0) \times V_k}{t \times \varepsilon \times l \times V_s}$$

gdzie:

A₀ – absorbancja początkowa próbki

A₁ – absorbancja końcowa próbki

l – grubość warstwy roztworu w kuvecie wyrażona w cm = 1 cm

V_k – końcowa objętość próbki w kuvecie = 2 ml

t – czas prowadzenia reakcji enzymatycznej = 30 min.

ε – współczynnik absorbancji molowej p-nitrofenolu = 18,5 × 10⁶ (M⁻¹ × cm⁻¹)

V_s – objętość surowicy w próbce = 0,1 ml

Obliczenia



Uzyskane wyniki należy opracować w układzie Michaelisa-Menten oraz Lineweavera-Burka z wykorzystaniem danych z tabeli poniżej.

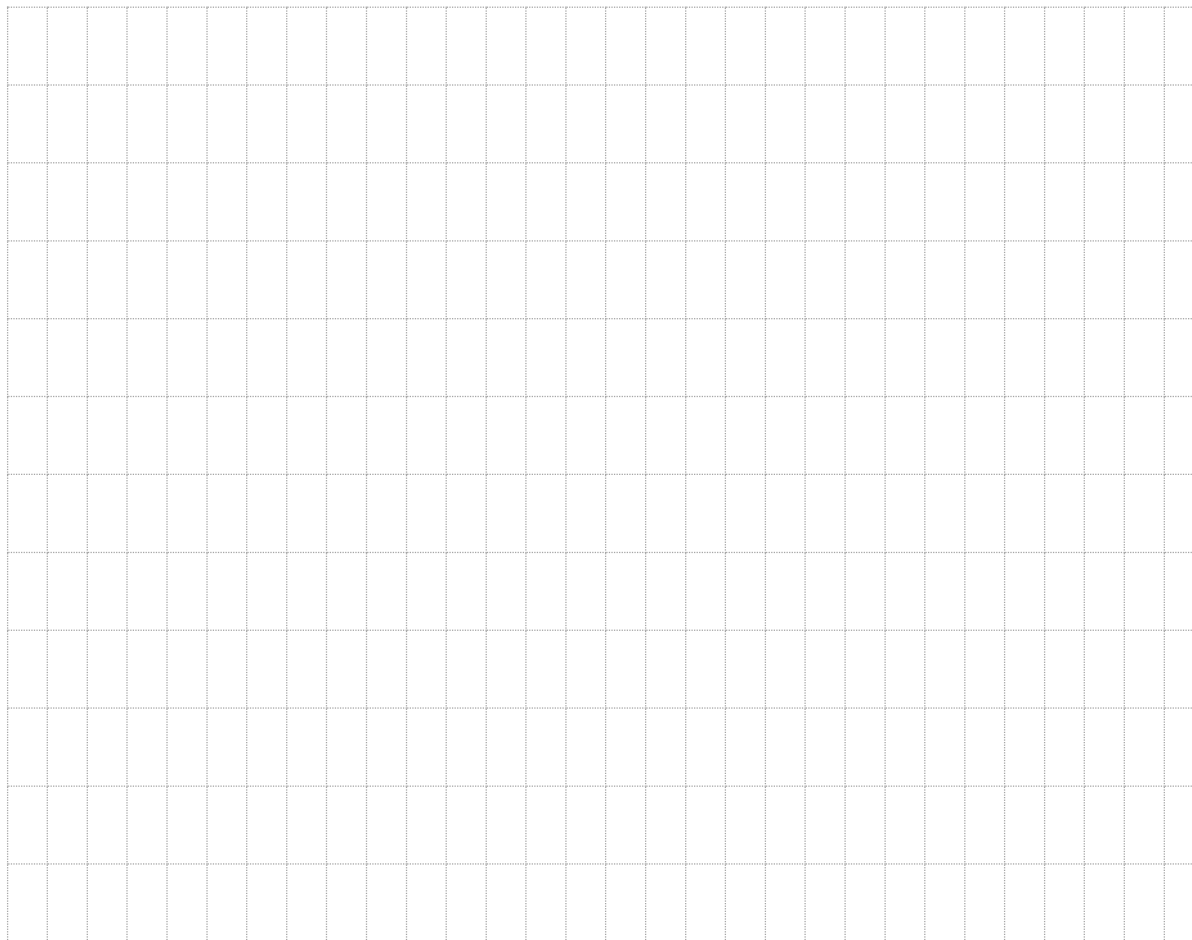
Zestawienie danych do wykonania wykresu Michaelisa-Menten oraz Lineweavera-Burka:

Nr próbki	Stężenie wzorcowego roztworu p-nitro fenylofosforanu użytego w reakcji (mmol/l)	Stężenie roztworu p-nitro fenylofosforanu w kuwecie (S) (mmol/l)	Szybkość początkowa reakcji (V) (mol/min)	1/S (l/mmol)	1/V (min/mol)
1	0,36				
2	0,72				
3	1,44				
4	2,88				
5	5,75				
6	11,50				
7	23,00				
8	34,50				
9	46,00				

Stałą Michealisa (K_M) i szybkość maksymalną reakcji ($V_{\max}$) katalizowanej przez fosfatazę zasadową można wyznaczyć:

- matematycznie: na podstawie równania Michaelisa-Menten lub równania Lineweavera-Burka $1/V = K_M / V_{\max} \times 1/(S) + 1/V_{\max}$;
- graficznie: na podstawie krzywej Michaelisa-Menten (wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu) i/lub wykresu Lineweavera-Burka (wykres zależności odwrotności szybkości reakcji do odwrotności stężenia substratu).

Sporządź wykres obrazujący kinetykę reakcji katalizowanej przez fosfatazę zasadową w układzie Michaelisa-Menten.



Sporządź wykres obrazujący kinetykę reakcji katalizowanej przez fosfatazę zasadową w układzie Lineaweavera-Burka.



Ćwiczenie 5.

Oznaczanie aktywności acetylocholinoesterazy w surowicy krwi oraz badanie efektów inhibitorów

Celem ćwiczenia jest:

- *poznanie znaczenia fizjologicznego i diagnostycznego esterazy acetylocholinowej (acetylocholinoesterazy; AchE) oraz jej inhibitorów*
- *ocena siły działania i skutków biologicznych inhibitorów AchE*
- *zapoznanie się z metodą pomiaru aktywności enzymu oraz metodą Ellmana*
- *pomiar aktywności AchE z wykorzystaniem substratu zastępczego*
- *analiza efektów hamowania lub stymulacji enzymu przez potencjalne inhibitory*
- *poznanie sposobów wyrażania aktywności właściwej enzymu.*

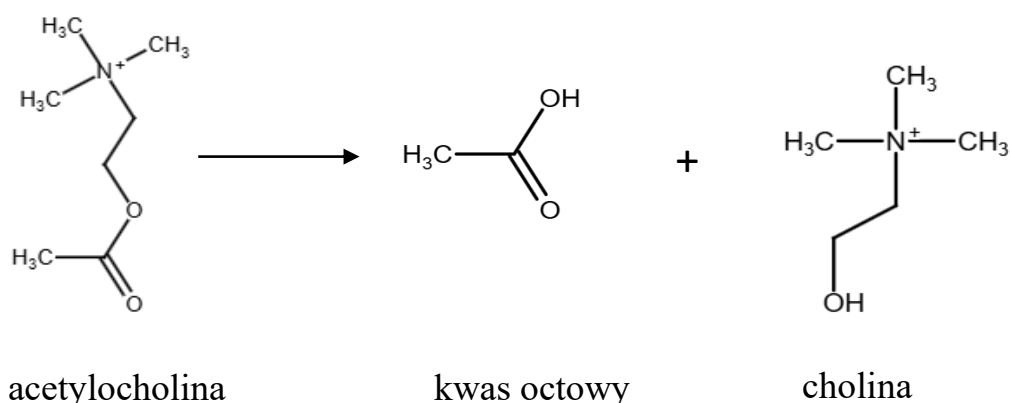
I. Wstęp merytoryczny

1. Funkcja biologiczna acetylocholiny i esterazy acetylocholinowej

1.1. Acetylocholina (ACh) pełni funkcję neuroprzekaźnika zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym, a jej działanie zależy od lokalizacji oraz typu receptora, z którym się wiąże. Acetylocholina (ACh) uczestniczy w regulacji czynności wielu narządów i układów organizmu:

- Układ sercowo-naczyniowy: powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych, obniżenie częstości akcji serca oraz zmniejszenie siły skurczu mięśnia sercowego.
- Układ pokarmowy: zwiększa perystaltykę przewodu pokarmowego oraz nasila amplitudę skurczów mięśni gładkich.
- Układ moczowy: powoduje skurcz mięśnia wypieracza pęcherza moczowego, zmniejszając pojemność pęcherza i ułatwiając mikcję.
- Układ oddechowy: stymuluje wydzielanie śluzu w drogach oddechowych oraz sprzyja skurczowi oskrzeli.
- Ośrodkowy układ nerwowy: odgrywa istotną rolę w procesach poznawczych, takich jak koncentracja, uczenie się oraz pamięć.

2. Funkcja esteraz acetylocholinowych



Rycina 5.1. Schemat reakcji katalizowanej przez esterazę acetylocholinową (AChE)

Czas trwania pobudzenia receptorów cholinergicznych przez ACh jest bardzo krótki, ponieważ cząsteczka ta ulega szybkiej hydrolizie enzymatycznej. ACh jest inaktywowana przez acetylocholinoesterazę (AChE), która katalizuje jej rozpad do choliny i kwasu octowego (Ryc. 5.1.). Mechanizm ten zapewnia, że pobudzenie receptorów jest krótkotrwałe, precyzyjnie kontrolowane i ograniczone przestrzennie do synapsy. AChE pełni w organizmie ssaków zarówno funkcje katalityczne, jak i niekatalityczne. Jej podstawową rolą w synapsach cholinergicznych jest szybkie zakończenie neurotransmisji poprzez hydrolizę ACh, co umożliwia repolaryzację błony postsynaptycznej i przygotowanie synapsy do kolejnego pobudzenia. Enzym ten występuje również w postaci związanej z błoną komórkową oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Oprócz funkcji enzymatycznej AChE uczestniczy w procesach rozwojowych układu nerwowego, szczególnie w synaptogenezie. W tym okresie może tworzyć kompleksy z białkami strukturalnymi i adhezyjnymi, wpływając na rozpoznawanie komórek, migrację neuronalną oraz stabilizację nowo powstających połączeń synaptycznych.

Zaburzenia równowagi cholinergicznej, w tym znaczne obniżenie poziomu acetylocholiny, wiążą się z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych,

w których dochodzi do postępującego obumierania neuronów. W chorobie Alzheimera obserwuje się deficyt transmisji cholinergicznej, co koreluje z zaburzeniami pamięci i funkcji poznawczych. W terapii tej choroby stosuje się inhibitory AChE, które zwiększają dostępność acetylocholiny w synapsach poprzez hamowanie jej degradacji. Leki te działają głównie poprzez wiązanie się z centrum aktywnym enzymu, w tym z miejscem anionowym, co prowadzi do odwracalnego zahamowania jego aktywności. Niektóre inhibitory mogą również wykazywać działanie allosteryczne, modyfikując konformację enzymu i jego zdolność katalityczną. Dodatkowo wybrane związki z tej grupy mogą wpływać pośrednio na procesy synaptogenezy, oddziałując z białkami uczestniczącymi w tworzeniu i stabilizacji synaps, co może sprzyjać odbudowie i funkcjonalnej poprawie połączeń neuronalnych.

2.1. Rodzaje esteraz acetylocholinowych

Esterazy acetylocholinowe należą do klasy hydrolaz (EC 3). Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB) EC 3.1.1.7, gdzie:

- 3 – hydrolazy (enzymy katalizujące reakcje hydrolizy),
- 3.1 – hydrolazy działające na wiązania estrowe,
- 3.1.1 – esterazy karboksylowe,
- 3.1.1.7 – acetylocholinoesteraza

Optimum pH aktywności acetylocholinoesterazy mieści się w zakresie 7,2–8,5.

Wyróżnia się dwa główne typy esteraz acetylocholinowych (Tab. 5.1):

- Acetylocholinoesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) – enzym specyficzny, występujący głównie w błonach presynaptycznych i postsynaptycznych synaps cholinergiczych oraz w erytrocytach. Odpowiada za szybki rozkład acetylocholiny w szczelinie synaptycznej.

- Cholinoesteraza (pseudocholinoesteraza, butyrylocholinoesteraza; EC 3.1.1.8) – obecna przede wszystkim w osoczu krwi oraz w płynie śródmiąższowym, charakteryzuje się szerszą swoistością substratową.

Tabela 5.1. Porównanie typów esteraz acetylocholinowych

Cecha	Acetylocholinoesteraza (AChE)	Butyrylocholinoesteraza (BChE, pseudocholinesteraza)
numer EC	3.1.1.7	3.1.1.8
główna lokalizacja	synapsy cholinergiczne (presynaptyczne i postsynaptyczne), erytrocyty	osocze krwi, wątroba (miejsce syntezy)
funkcja	szybka hydroliza acetylocholiny w szczelinie synaptycznej	hydroliza szerokiego zakresu estrów cholinowych
swoistość substratowa	wąska/bardziej swoista (głównie acetylocholina)	szeroka/mniej swoista (np. butyrylocholina, acetylocholina, inne estry)
rola fizjologiczna	zakończenie neurotransmisji cholinergicznej	detoksykacyjna
znaczenie kliniczne	cel działania inhibitorów (np. w chorobie Alzheimera)	ważna w anestezjologii (metabolizm sukcyntylocholiny, miwakurium)
wrażliwość na warianty genetyczne	rzadziej klinicznie istotna	duże znaczenie kliniczne (przedłużona blokada nerwowo-mięśniowa)

Prawidłowa aktywność pseudocholinoesterazy w osoczu wynosi zazwyczaj 8–18 j.m./ml. Wartość ta wykazuje istotną zmienność osobniczą i jest w dużym stopniu uwarunkowana genetycznie. Istotne obniżenie aktywności enzymu może mieć znaczenie kliniczne, jednak objawy pojawiają się zazwyczaj dopiero przy spadku aktywności poniżej około 75% wartości referencyjnych, co może skutkować wydłużoną reakcją na leki metabolizowane przez ten enzym.

2.2. Przełom cholinergiczny

Przełom cholinergiczny może wystąpić w wyniku przedawkowania inhibitorów acetylocholinoesterazy lub ekspozycji na silne toksyny cholinergiczne, takie jak fosforoorganiczne środki bojowe (np. sarin, soman, tabun). Dochodzi wówczas do niekontrolowanego wzrostu stężenia acetylocholiny w synapsach i nadmiernej stymulacji receptorów cholinergiczych.

Obraz kliniczny obejmuje:

- objawy wczesne: osłabienie siły mięśniowej, zimne poty, parcie na mocz, zaburzenia widzenia (np. zamazany obraz)
- objawy narastające: drżenia włókienkowe, mioza (zwężenie źrenic), postępujące osłabienie mięśni
- objawy zaawansowane: porażenie mięśni, w tym oddechowych, zaburzenia krążeniowe (wahania ciśnienia tętniczego i częstości akcji serca)
- objawy subiektywne: uczucie niepokoju, wewnętrzne drżenie oraz silne pobudzenie psychoruchowe.

Stan ten wynika bezpośrednio z blokady AChE i kumulacji acetylocholiny w synapsach, prowadzącej do ciągłej aktywacji receptorów cholinergiczych i zaburzenia homeostazy układu autonomicznego oraz nerwowo-mięśniowego.

2.3. Przyczyny obniżonej aktywności pseudocholinesterazy

Obniżona aktywność pseudocholinesterazy (butyrylocholinoesterazy) występuje w następujących sytuacjach:

- Uwarunkowania wrodzone:
 - wrodzony niedobór pseudocholinesterazy uwarunkowany genetycznie, występujący rzadko (ok. 1:100 000 osób), częściej w populacjach europejskich niż azjatyckich.

- Czynniki toksyczne:
 - zatrucia związkami fosforoorganicznymi, które hamują aktywność esteraz cholinowych
 - ekspozycja na kokainę, mogąca zaburzać metabolizm cholinesteraz.
- Choroby:
 - niewydolność wątroby (ostre i przewlekłe uszkodzenia hepatocytów);
 - choroby nowotworowe z przerzutami
 - zawał mięśnia sercowego
 - cholestaza (żółtaczka zastoinowa)
 - stany zapalne i infekcje ogólnoustrojowe
 - przewlekłe niedożywienie i wyniszczenie organizmu.
- Leki i substancje:
 - inhibitory cholinesterazy (np. neostygmina, fizostygmina)
 - leki psychotropowe (np. chlorpromazyna)
 - leki cytostatyczne (np. cyklofosfamid)
 - glikokortykosteroidy
 - metoklopramid
 - inhibitory MAO (np. fenelzyna)
 - leki zwiotczające mięśnie (np. pankuronium)
 - doustne środki antykoncepcyjne i estrogeny.

2.3.1. Warunki fizjologiczne z towarzyszącym niewielkim obniżeniem aktywności pseudocholinesterazy

Fizjologiczne, przejściowe obniżenie aktywności enzymu może występować w:

- ciąży
- okresie noworodkowym
- wieku podeszłym.

2.3.2. Komplikacje zdrowotne związane z niską aktywnością pseudocholinesterazy

Obniżona aktywność pseudocholinesterazy prowadzi do spowolnionego metabolizmu niektórych leków, co może skutkować ich przedłużonym działaniem i powikłaniami klinicznymi:

- sukcynylocholina – ryzyko przedłużonej blokady nerwowo-mięśniowej i zaburzeń oddychania po intubacji dotchawiczej
- leki zmiotczające mięśnie o działaniu kuraropodobnym (np. mivakurium, dekametonium) – możliwość wydłużonego porażenia mięśni szkieletowych
- kokaina – zwiększone ryzyko toksyczności kardiologicznej, w tym groźnych zaburzeń rytmu serca i nagłej śmierci sercowej.

2.4. Znaczenie diagnostyczne pseudocholinesterazy

Oznaczanie aktywności pseudocholinesterazy ma istotne znaczenie diagnostyczne. Ze względu na fakt, że enzym ten jest syntetyzowany głównie w wątrobie, jego aktywność może być wykorzystywana nie tylko do oceny ekspozycji na inhibitory cholinesteraz (np. związki fosforoorganiczne), ale również jako nieswoisty marker funkcji syntetycznej wątroby.

2.5. Inhibitory acetylocholinoesteraz

2.5.1. Mechanizm działania inhibitorów acetylocholinoesterazy (AChE I i II)

Centrum aktywne acetylocholinoesterazy (AChE) u ssaków zawiera katalityczną triadę aminokwasową Ser203–Glu334–His447, zlokalizowaną w głębi struktury enzymu i tworzącą tzw. miejsce katalityczne odpowiedzialne za hydrolizę substratu. W obrębie centrum aktywnego wyróżnia się również miejsce anionowe, zlokalizowane w jego części wejściowej, które uczestniczy w wiązaniu dodatnio naładowanej grupy cholinowej acetylocholiny. Wiele inhibitorów AChE oddziałuje z peryferyjnym miejscem anionowym

(PAS, peripheral anionic site), które znajduje się na powierzchni enzymu i odgrywa rolę w rozpoznawaniu substratu oraz regulacji aktywności enzymu.

Inhibitory AChE można podzielić na:

Inhibitory nieselektywne hamujące aktywność enzymu poprzez blokadę centrum katalitycznego oraz indukcję zmian konformacyjnych (allosterycznych), które zaburzają prawidłowe ułożenie triady katalitycznej. Do tej grupy należą m.in. dodatnio naładowane leki zwiotczające mięśnie o działaniu kuraropodobnym.

Inhibitory selektywne PAS wiążące się wyłącznie z peryferyjnym miejscem anionowym, nie blokując bezpośrednio centrum katalitycznego. Przykładami są jodek propidyny (barwnik fluorescencyjny stosowany w badaniach biologicznych) oraz fasykulina (toksyna pochodząca z jadu mamby).

2.5.2. Najczęściej spotykane inhibitory acetylocholinoesterazy (AChE)

- Związki fosforoorganiczne – obejmujące pestycydy oraz bojowe środki paralityczno-drgawkowe (np. sarin, soman, tabun).
Są to nieodwracalne inhibitory AChE i BChE, prowadzące do trwałej fosforylacji centrum aktywnego enzymu.
- Karbaminiany o działaniu odwracalnym:
 - pirydostygmina — odwracalny inhibitor AChE stosowany m.in. profilaktycznie w zatruciach bojowymi środkami fosforoorganicznymi, poprzez przejściowe zablokowanie enzymu i ograniczenie jego dostępności dla toksyny
 - neostygmina (czwartorzędowy karbaminian) — stosowana w leczeniu miastonii (łac. *myasthenia gravis*), pooperacyjnej atonii jelit i pęcherza moczowego oraz w odwracaniu blokady nerwowo-mięśniowej wywołanej lekami kuraropodobnymi
 - fizostygmina (trzeciorzędowy karbaminian) — przenika do ośrodkowego układu nerwowego, w związku z czym stosowana jest jako antidotum

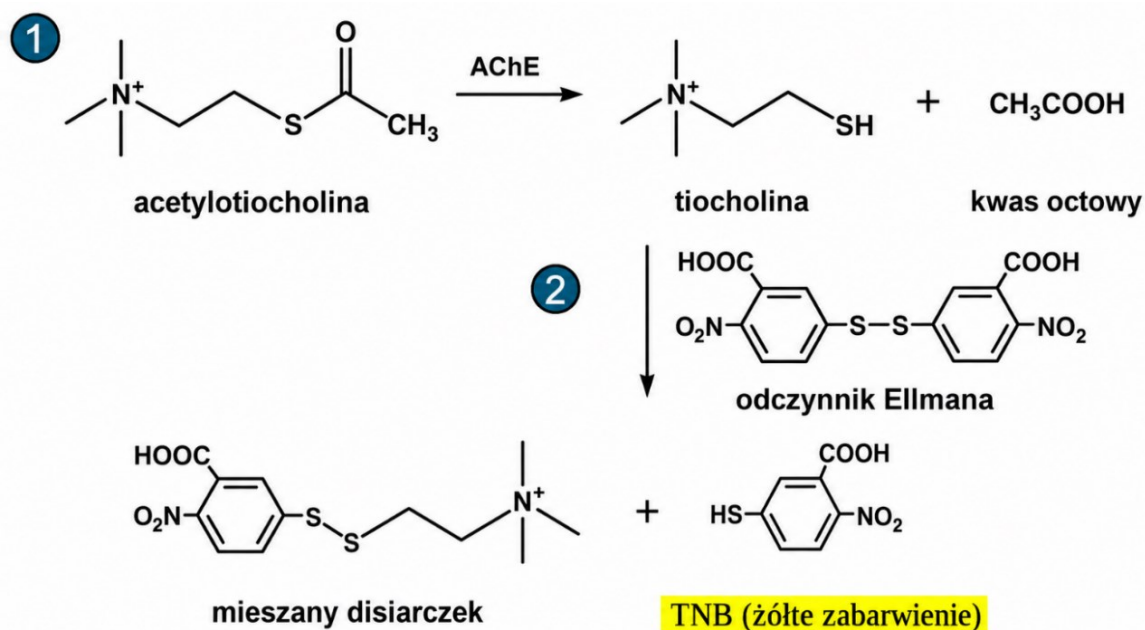
w zatruciach lekami o działaniu antycholinergicznym (np. atropina, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne).

- Substancje o niespecyficznym lub pośrednim wpływie na AChE:
 - leki neuroleptyczne (np. pochodne fenotiazyny)
 - barbiturany i niektóre anestetyki
 - opioidy (np. morfina)
 - leki przeciwhistaminowe i przeciwmalaryczne
 - środki znieczulenia miejscowego
 - hormony steroidowe (estrogeny, glikokortykosteroidy) oraz inne czynniki metaboliczne (np. kwasy żółciowe, witaminy z grupy B i K), które mogą przejściowo modulować aktywność enzymu, jednak ich wpływ ma charakter pośredni i nieswoisty.
- Leki stosowane w chorobie Alzheimera — odwracalne inhibitory AChE, takie jak donepezyl, rywastygmina i galantamina.
- Echotiofat (organofosforan) — trwały inhibitor AChE stosowany miejscowo w leczeniu jaskry.

3. Metoda oznaczania AChE

Do oznaczania aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) stosuje się syntetyczny substrat – acetylotiocholinę, zamiast naturalnej acetylocholiny. Wynika to z większej trwałości tego związku, odpowiedniego podobieństwa strukturalnego do naturalnego substratu oraz łatwości oznaczania produktów hydrolizy.

W wyniku rozpadu acetylotiocholiny katalizowanej przez AChE powstaje tiocholina, która następnie jest oznaczana metodą Ellmana. Metoda ta polega na reakcji z odczynnikiem Ellmana (DTNB – kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)), w wyniku której powstaje żółto zabarwiony anion TNB (5-tio-2-nitrobenzoesan) (Ryc. 5.2.). Intensywność barwy mierzona spektrofotometrycznie, jest proporcjonalna do aktywności enzymu.



Rycina 5.2. Schemat reakcji oznaczania aktywności AChE metodą Ellmana: (1) hydroliza acetylotiocholiny do tiocholiny, (2) reakcja tiocholiny z DTNB. Źródło: Pohanka M: *Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method*, *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 2631–2640

3.1. Oznaczanie stężenia grup –SH metodą Ellmana

Metoda Ellmana (Ryc. 5.2) polega na kolorymetrycznym oznaczaniu stężenia wolnych, zredukowanych grup tiolowych (–SH) z wykorzystaniem odczynnika DTNB (kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)). W reakcji tej grupy –SH redukują wiązanie disiarczkowe DTNB, prowadząc do powstania dwóch produktów: mieszanych disiarczków oraz anionu 2-nitro-5-tiobenzoesu (TNB[–]).

Powstający TNB[–] ma intensywną żółtą barwę i wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali około 412–417 nm (w zależności od warunków reakcji). To właśnie ilość tego barwnego produktu jest mierzona spektrofotometrycznie i stanowi podstawę do oznaczenia stężenia grup tiolowych.

Metoda Ellmana jest selektywna względem grup –SH, jednak na wartość absorbancji wpływa również pH środowiska reakcji.

Warto zauważyć, że odczynnik Ellmana charakteryzuje się ograniczoną stabilnością w roztworze wodnym, szczególnie w warunkach podwyższonego pH oraz w obecności czynników redukujących lub zanieczyszczeń zawierających grupy tiolowe. Z tego względu roztwory DTNB przygotowuje się najczęściej bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia, sam związek przechowuje w postaci stałej, chroniąc przed światłem i wilgocią.

II. Część praktyczna

Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- bufor fosforanowy o pH 7,4 i stężeniu 0,1 mol/l
- odczynnik Ellmana: roztwór DTNB (kwasu 5,5'ditio-bis-2 nitrobenzoesowego) o stężeniu 4 mmol/l. Naważkę 1,59 mg DTNB należy rozpuścić w 1 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 i stężeniu 0,1 mol/l
- roztwór jodku acetylotiocholiny o stężeniu 0,2 mol/l. Naważkę 86,7 mg jodku acetylotiocholiny należy rozpuścić w 1,5 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 i stężeniu 0,1 mol/l
- odczynnik biuretowy
- roztwory inhibitorów AchE:
 - 5×10^{-4} mol/l roztwór fizostygminy
 - 5×10^{-4} mol/l roztwór neostygminy
 - 5×10^{-4} mol/l roztwór fenazoliny
- roztwór zredukowanego glutationu (GSH) o stężeniu 1 mmol/l. Naważkę 1,54 mg GSH rozpuścić w 1 ml 0,1 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4
- spektrofotometr

- kuwety pomiarowe: plastikowe kuwety spektrofotometryczne przeznaczone do oznaczania w świetle widzialnym
- probówki do przygotowania rozcieńczenia fizostygminy
- surowica.

Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Oznaczanie aktywności pseudocholinoesterazy w surowicy krwi

Do pomiaru aktywności enzymu wykorzystuje się metodę kinetyczną. Pomiaru spektrofotometrycznego należy dokonać przy długości fali 417 nm, poprzez rejestrację wzrostu intensywności żółtego zabarwienia w czasie 2 minut. Zmianę absorbancji, odpowiadającą powstawaniu barwnego produktu (TNB), należy przeliczyć na ilość nmoli grup tiolowych uwolnionych w reakcji, na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla glutationu. Ilość uwolnionych grup tiolowych (tiocholiny powstającej z acetylotiocholiny) oznaczana w reakcji z DTNB stanowi miarę aktywności pseudocholinoesterazy w surowicy krwi.

Oznaczenie aktywności enzymu należy wykonać w układzie kontrolnym oraz w obecności inhibitorów: neostygminy, fenazyny oraz dwóch stężeń fizostygminy. Skład mieszanin inkubacyjnych przedstawiono w poniższej tabeli.

Przed przystąpieniem do właściwych oznaczeń należy dobrać ilość enzymu tak, aby po jego dodaniu do układu kontrolnego przebieg reakcji był liniowy w czasie 2 minut od rozpoczęcia pomiaru. W tym celu, stosując mieszaninę inkubacyjną dla układu kontrolnego, w trzech kolejnych próbach, rejestruje się przebieg reakcji po dodaniu odpowiednio: 10 μ l, 20 μ l lub 30 μ l surowicy.

Jeżeli wykres przebiegu reakcji traci liniowość przed upływem 2 minut, należy zmniejszyć ilość enzymu dodawaną do kuwety.

Skład mieszanin inkubacyjnych do oznaczania aktywności pseudocholinoesterazy w surowicy krwi w układzie kontrolnym oraz w obecności inhibitorów:

Skład układu	Układ kontrolny (ml)	Układ z fizostygminą o stężeniu 5×10^{-9} mol/l	Układ z fizostygminą o stężeniu 5×10^{-4} mol/l	Układ z neostygminą o stężeniu 5×10^{-4} mol/l	Układ z fenazoliną o stężeniu 5×10^{-4} mol/l
Bufor fosforanowy pH 7,4	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5
Jodek acetylotiocholiny	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DTNB	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Inhibitor	–	0,2	0,2	0,2	0,2
Woda	90 µl, gdy dodajesz 10 µl serostandardu 80 µl, gdy dodajesz 20 µl serostandardu 70 µl, gdy dodajesz 30 µl serostandardu				
Mieszaninę inkubacyjną zamieszać przez 3-krotne niezbyt szybkie przechylenie kuwety „do góry dnem”, wstawić do gniazda pomiarowego i wyzerować spektrofotometr					
serostandard	Dobrać ilość w 3 kolejnych próbach: 10 µl, 20 µl, 30 µl	• dodać uprzednio dobraną ilość serostandardu, mieszaninę inkubacyjną w kuwecie szybko, 3-krotnie zamieszać i wstawić ją do gniazda pomiarowego, • przez 2 minuty prowadzić rejestrację zmian absorbancji przy długości fali $\lambda = 417$ nm, • wydrukować krzywą przebiegu reakcji.			

1.1. Przygotowanie rozcieńzonego roztworu fizostygminy o stężeniu 5×10^{-9} mol/l

Należy zastosować dwa etapy rozcieńczenia:

1. Wyjściowy roztwór fizostygminy o stężeniu 5×10^{-4} mol/l należy rozcieńczyć 1000-krotnie wodą destylowaną i dokładnie wymieszać. W wyniku tego otrzymuje się roztwór o stężeniu 5×10^{-7} mol/l.
2. Następnie przygotowany roztwór 5×10^{-7} mol/l należy ponownie rozcieńczyć 100-krotnie wodą destylowaną, uzyskując końcowe stężenie fizostygminy wynoszące 5×10^{-9} mol/l.

1.2. Krzywa wzorcowa do oznaczania zawartości grup tiolowych w mieszaninie inkubacyjnej metodą Ellmana

Celem serii pomiarów jest sporządzenie krzywej wzorcowej do oznaczania zawartości grup tiolowych (-SH) w buforowanej mieszaninie inkubacyjnej o znanej objętości (2 ml). Zastosowany układ (poniższa tabela) odzwierciedla warunki panujące w mieszaninie inkubacyjnej stosowanej do oznaczania aktywności pseudocholinoesterazy.

Ze względu na nietrwałość oraz brak dostępności wzorca produktu reakcji (tiocholiny), do sporządzenia krzywej wzorcowej wykorzystuje się zredukowany glutation — związek zawierający jedną grupę tiolową, który reaguje stechiometrycznie z DTNB i stanowi jego analog.

Uzyskana krzywa wzorcowa służy do przeliczania zmian absorbancji na ilość nmoli tiocholiny uwalnianej przez pseudocholinoesterazę obecną w roztworze serostandardu. Pomiary absorbancji wykonuje się przy długości fali = 417 nm z użyciem spektrofotometru.

Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczania zawartości grup –SH w mieszaninie inkubacyjnej:

	Zawartość GSH (nmole w 2 ml mieszaniny reakcyjnej)	Woda dejonizowana (ml)	Ilość mikrolitrów roztworu GSH o stężeniu 1 mmol/l	Roztwór DTNB (ml)
1	0	2,00	–	100
2	20	1,98	20	100
3	40	1,96	40	100
4	60	1,94	60	100
5	80	1,92	80	100
6	100	1,9	100	100

Wyniki pomiarów należy wpisać do poniższej tabeli. Na podstawie uzyskanych danych należy wykonać wykres zależności absorbancji roztworu od zawartości grup tiolowych. Na osi X należy umieścić podpis: zawartość grup -SH (nmole/2 ml).

1.3. Oznaczenie białka w surowicy krwi metodą biuretową

Próba ślepa: 500 μ l wody + 2,5 ml odczynnika biuretowego.

Próba badana: (10/20/30) μ l serostandardu + (490/480/470) μ l wody + 2,5 ml odczynnika biuretowego.

Zmienna objętość serostandardu i wody wynika z doboru objętości podczas pomiaru aktywności enzymu, zapewniającej najlepszą liniowość pomiaru. Odczytu na spektrofotometrze należy dokonać przy długości fali $\lambda = 540$ nm po 30 min inkubacji.

Do obliczenia zawartości białka w surowicy, należy wykorzystać równanie krzywej wzorcowej do oznaczania białka metodą biuretową, wykonanej w ramach ćwiczenia 1. W obliczeniach należy uwzględnić rozcieńczenie serostandardu.



2. Opracowanie wyników

2.1. Krzywa wzorcowa do oznaczania grup -SH

Dane do wykonania krzywej wzorcowej do oznaczania grup -SH metodą Ellmana:

	Zawartość GSH (nmole w 2 ml mieszaniny reakcyjnej)	Absorbancja
1	0	
2	20	
3	40	
4	60	
5	80	
6	100	
	Równanie krzywej wzorcowej	
	Współczynnik regresji liniowej R^2	

Sporządź krzywą wzorcową do oznaczania zawartości grup -SH metodą Ellmana.



2.2. Obliczanie aktywności AchE

Na podstawie poniższego równania policz aktywność właściwą enzymu i wpisz uzyskane wartości w tabelę poniżej.

$$A = \frac{\text{ilość nmoli tiocholiny uwolnionej w ciągu 2 minut w 2 ml mieszaniny}}{\text{zawartość białka w kuwecie (mg)} \times \text{czas reakcji (min)}}$$

A – aktywność właściwa enzymu ($\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)

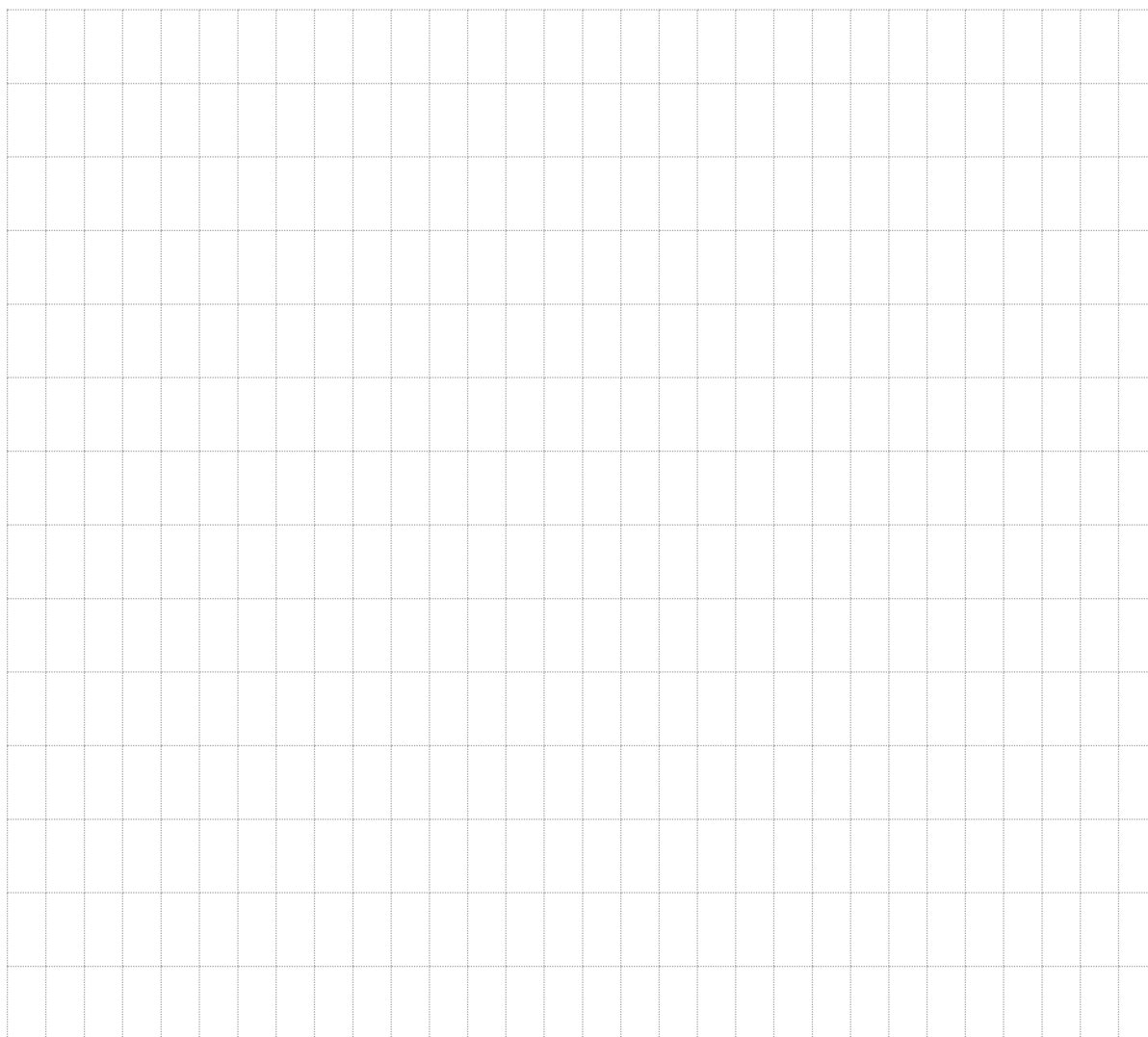
Ilość uwolnionych grup -SH pochodzących od tiocholiny, należy wyliczyć z równania uprzednio przygotowanej krzywej wzorcowej do oznaczania zawartości grup -SH metodą Ellmana. W pierwszej kolumnie poniższej tabeli, w wykropkowanych miejscach, należy wpisać obliczone stężenia końcowe zastosowanych inhibitorów AchE.

Zestawienie wyników:

Parametr Układ/ C końcowe inhibitora	Zmiana absorbancji (ΔE) w ciągu 2 min	Ilość nmoli tiocholiny uwolnionych w ciągu 2 minut	Zawartość białka w kuwecie pomiarowej (mg)	Aktywność enzymu	% Aktywności kontrolnej	% Inhibicji	% Aktywacji
Układ kontrolny					—	—	—
Fizostygmina stężenie końcowe mol/l							
Fizostygmina stężenie końcowe mol/l							
Neostygmina stężenie końcowe mol/l							
Fenazolina stężenie końcowe mol/l							

2.3. Porównanie aktywności AChE w układzie kontrolnym oraz w obecności inhibitorów

Należy wykonać wykres słupkowy aktywności AChE w poszczególnych badanych układach. Proszę dołączyć legendę – krótki tekst objaśniający występujące na wykresie grupy, a także stężenia badanych inhibitorów cholinoesterazy. Na osi Y należy przestawić aktywność AChE.



3. Podsumowanie i wnioski

1. Przy jakiej zawartości białka w kuwecie oraz przy jakim stężeniu substratu, zależność absorbancji od czasu reakcji wykazuje charakter prostoliniowy przez 2 minuty?
2. W jaki sposób dodanie fizostygminy, neostygminy lub fenazoliny w stężeniach rzędu: $\dots \times 10^{-\dots}$ wpływa na aktywność AChE, a jak wpływa zastosowanie fizostygminy w niższym stężeniu rzędu: $\dots \times 10^{-\dots}$?
Co to oznacza? (należy uogólnić, jak mogą działać inhibitory w wysokich, a jak w niskich stężeniach).

Panel dyskusyjny

- Czy poziom butyrylocholinoesterazy w organizmie może być związany ze stylem życia, dietą lub chorobami metabolicznymi?
- Czy w przypadku genetycznych wariantów pseudocholinesterazy należy zachować szczególną ostrożność podczas znieczulenia ogólnego?

Ćwiczenie 6.

Badanie potencjału antyoksydacyjnego produktów spożywczych

Celem ćwiczenia jest:

- *poznanie mechanizmów antyoksydacyjnych, które przeciwdziałają zjawisku stresu oksydacyjnego*
- *przybliżenie aktualnego podejścia nauki do roli antyoksydantów zawartych w produktach spożywczych w mechanizmach obrony antyoksydacyjnej organizmu*
- *zapoznanie z podstawowymi metodami wykrywania antyoksydantów oraz pomiaru właściwości przeciwutleniających.*

I. Stres oksydacyjny i mechanizmy antyoksydacyjne

1.1. Wolne rodniki

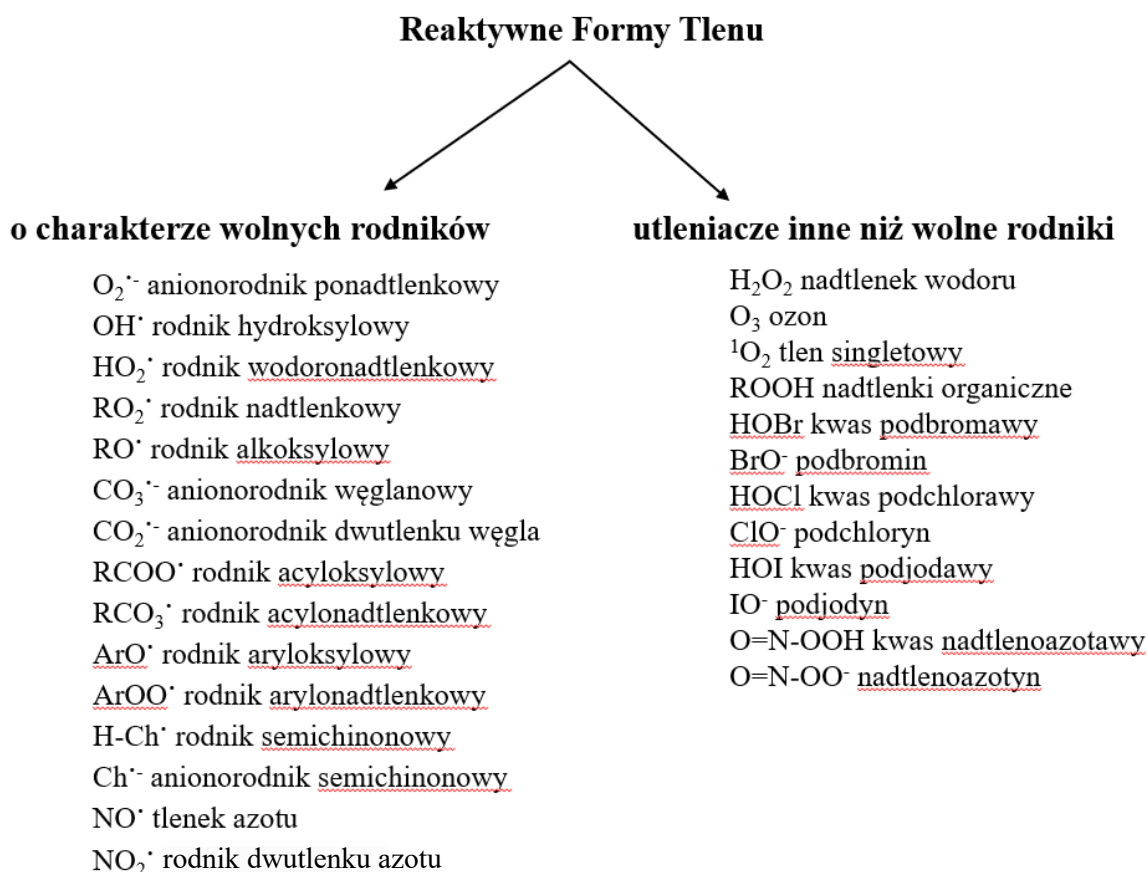
Wolne rodniki są to atomy lub cząsteczki zdolne do samodzielnego istnienia, posiadające co najmniej jeden niesparowany elektron. Charakteryzuje je wysoka aktywność chemiczna, szybko wchodzi w reakcje z innymi cząsteczkami dążąc do przyłączenia lub oddania elektronu, oraz mają krótki okres półtrwania, typowo od nanosekund (10^{-9} s dla rodnika hydroksylowego) do kilku sekund dla np. rodników azotowych.

1.2. Reaktywne formy tlenu (ROS – Reactive Oxygen Species; RFT – Reaktywne Formy Tlenu)

Reaktywne formy tlenu to związki tlenu wykazujące większą reaktywność niż tlen cząsteczkowy w stanie trypletowym. Do ROS zaliczamy związki rodnikowe, jak i utleniacze niebędące wolnymi rodnikami (Ryc. 6.1.).

Endogennym źródłem RFT jest łańcuch oddechowy oraz procesy utleniania zachodzące z udziałem oksydaz, lipooksygenaz, cyklooksygenaz i cytochromu P450. Do powstawania RFT przyczyniają się także autooksydacja hemoglobiny, przemiany puryn do kwasu moczowego oraz tzw. „wybuch oddechowy” komórek fagocytujących. Reaktywne formy tlenu mogą również powstawać na skutek działania czynników fizycznych, takich jak promieniowanie jonizujące, promieniowanie ultrafioletowe oraz ultradźwięki oddziałujące na roztwory wodne.

1.3. Antyoksydanty (przeciwutleniacze) są donorami atomów wodoru lub elektronów i neutralizują wolne rodniki przekształcając je w nieaktywne pochodne.



Rycina 6.1. Reaktywne formy tlenu i ich rodzaje (modyfikacja własna na podstawie: Koss-Mikołajczyk i wsp. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji. *Postępy Hig Med Dosw (online)*. 2017; 71: 1–16)

1.4. Stres oksydacyjny i jego następstwa

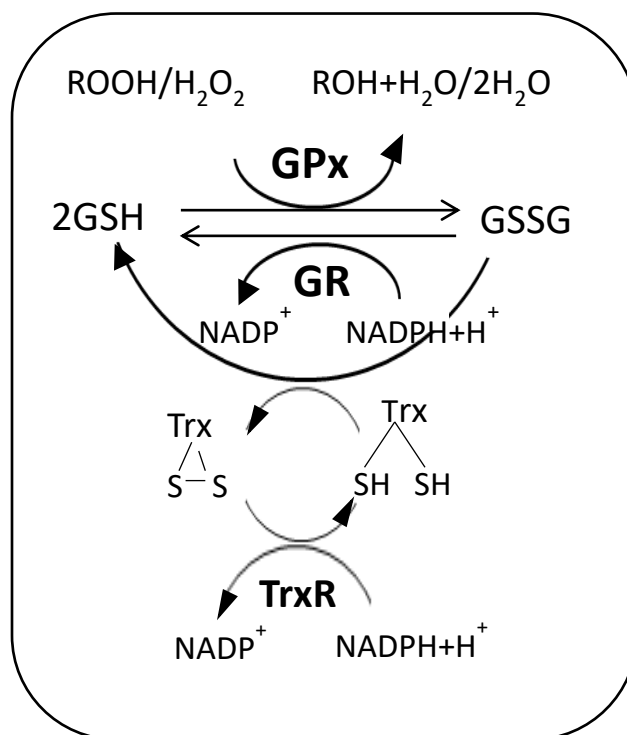
Reaktywne formy tlenu uwalniane w ilościach bezpiecznych dla komórki mogą odgrywać pozytywną rolę. Związki rodnikowe i utleniacze inne niż wolne rodniki uczestniczą w „wybuchu tlenowym” chroniąc komórki przed patogenami, biorą udział w neuromodulacji, neurotransmisji i regulacji plastyczności synaps, wpływają na ekspresję genów i różnicowanie się komórek oraz wewnętrzną homeostazę jonów wapnia.

W warunkach fizjologicznych w organizmie utrzymywana jest równowaga między procesami prooksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi. Stres oksydacyjny jest stanem zaburzania tej równowagi, na korzyść procesów

utleniania. Jego przyczynę upatruje się w nadmiernej produkcji RFT lub/oraz niewydolności obrony antyoksydacyjnej, na przykład w wyniku obniżenia stężenia antyoksydantów. Następstwa wpływu RFT na komórki w dużym stopniu zależą od ich stężenia i czasu działania. Niewielki i krótkotrwały wzrost RFT jest z reguły dobrze tolerowany i aktywuje działania obronne. Przeciwdziałanie zagrożeniom wywołanym przez RFT odbywa się na trzech poziomach, w które zaangażowane są uzupełniające się antyoksydacyjne układy enzymatyczne i nieenzymatyczne. Pierwszy poziom obrony antyoksydacyjnej polega na niedopuszczeniu do powstawania wolnych rodników tlenowych, drugi etap koncentruje się na przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych i w końcu trzeci etap odpowiada za odtwarzanie prawidłowej struktury uszkodzonych cząsteczek.

Wyróżniamy (Ryc. 6.2.):

1. antyoksydanty prewencyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD; EC 1.15.1.1), katalaza (CAT; EC 1.11.1.6), peroksydaza glutationowa (GPx; EC 1.11.1.9), a także białka wiążące jony metali przejściowych jak albuminy, transferryna, laktoferryna, ceruloplazmina, haptoglobina.
2. antyoksydanty interwencyjne: glutation, askorbinian, tokoferole, kwas moczowy, kreatynina, bilirubina, fenole, karotenoidy.
3. enzymy reparacyjne i regeneracyjne: ligazy, glikozylazy, tioredoksyna, reduktaza tioredoksyny (TrxR) oraz reduktaza glutationowa (GR), która wykorzystując NADPH regeneruje zredukowany glutation (GSH) z jego formy utlenionej (GSSG).



Rycina 6.2. Schemat działania systemu antyoksydacyjnego z udziałem GPx, GR i TrxR. Enzymy te utrzymują homeostazę redoks komórki poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu (RFT) i regenerację związków redukcyjnych. SOD przekształca anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2\bullet^-$) w H_2O_2 , który jest usuwany przez katalazę (CAT) lub peroksydazę glutationową (GPx). GPx redukuje H_2O_2 i nadtenki organiczne (ROOH) z udziałem zredukowanego glutationu (GSH), tworząc utleniony glutation (GSSG). Reduktaza glutationowa (GR), wykorzystując NADPH, regeneruje GSH z GSSG, natomiast reduktaza tioredoksynowa (TrxR) odnawia zredukowaną tioredoksynę (Trx), wspierając ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym

Pomimo, że organizm ludzki posiada złożony system obronny przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników, to w wielu wypadkach jest on niewystarczający. W związku z powyższym coraz większą uwagę zwraca się na możliwości wspomagania obrony antyoksydacyjnej organizmu. W żywności znajduje się znaczna ilość antyoksydantów, które mogą przyczyniać się do neutralizacji RFT i prewencji wielu patologicznych procesów. Ważnym źródłem egzogennych przeciwutleniaczy są świeże owoce i warzywa, soki, kawa, herbata, napary i wywary ziołowe.

Antyoksydanty naturalne można podzielić ze względu na rozpuszczalność w wodzie na:

1. antyoksydanty hydrofilowe: glutation i witamina C
2. antyoksydanty hydrofobowe: witamina E, karotenoidy, ksantofile, zredukowany koenzym Q10 oraz antocyjaniny, flawonoidy i fitoestrogeny.

Antyoksydanty fenolowe zawierają grupę hydroksylową związaną z pierścieniem aromatycznym o bardzo słabych właściwościach kwasowych. Dzięki temu mogą szybko reagować z rodnikami nadtlenkowymi, prowadząc do powstania względnie stabilnego rodnika fenoksyłowego. Biorąc pod uwagę budowę, fenolowe antyoksydanty występujące naturalnie w owocach i warzywach podzielono na monofenole (np. α - tokoferol) i polifenole (przynajmniej dwie grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia aromatycznego). Do roślinnych związków fenolowych zaliczamy np.: flawonoidy, taniny, kwasy fenolowe, stilbenoidy, lignany (Tabela 6.1.). Związki fenolowe w warzywach głównie lokalizują się w naziemnych częściach (liście, skórki owoców, nasiona). Wyjątek stanowi cebula, która jest bogata w polifenole, głównie kwercetynę.

Tabela 6.1. Przykłady występowania poszczególnych grup związków fenolowych

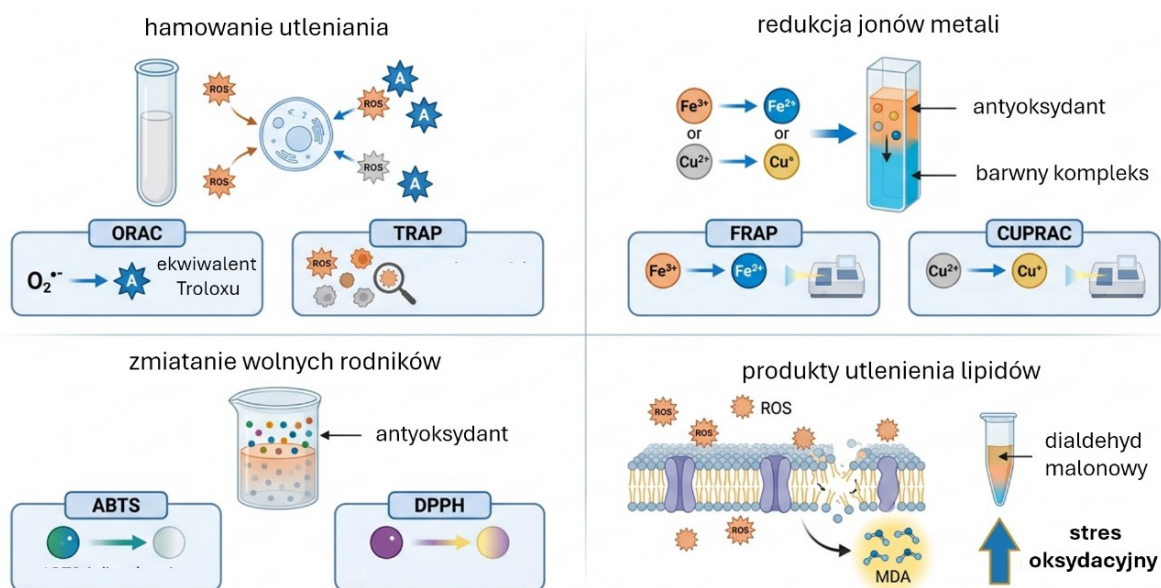
Związek fenolowy	Występowanie
Flawonoidy	Np. w cebuli (kwercetyna), jabłkach (kwercetyna, katechiny), cytrusach (hesperydyna, naryngenina), jagodach, herbacie (katechiny) oraz kakao (flawanole)
Taniny	Np. herbata (galotaniny), czerwone wino i winogrona (proantocyjanidyny), granaty (elagotaniny), owoce jagodowe, orzechy oraz kora niektórych drzew
Kwasy fenolowe	Np. w kawie (kwas chlorogenowy), zbożach (kwas ferulowy), jabłkach, gruszkach, ziemniakach i pomidorach
Stilbenoidy	Np. w winogronach i winie czerwonym (resweratrol), a także w orzeszkach ziemnych i borówkach.
Lignany	Np. w siemieniu lnianym (sekoizolarycirezynol), nasionach sezamu, pełnoziarnistych produktach zbożowych oraz w roślinach strączkowych.

W sytuacji zaburzenia obrony antyoksydacyjnej, komórki naszego organizmu są narażone na działanie tlenu cząsteczkowego i jego chemicznych pochodnych w nadmiernie wysokich stężeniach. Nasilony stres oksydacyjny trwający dłuższy czas prowadzi do licznych, niekorzystnych dla komórki zmian, w tym do zaburzeń metabolizmu komórkowego oraz upośledzenia sygnałów procesów apoptozy i nekrozy. RFT mogą oksydacyjnie modyfikować białka, węglowodany, lipidy oraz uszkadzać materiał genetyczny komórki. Układami szczególnie wrażliwymi na działanie stresu oksydacyjnego jest układ oddechowy, układ krążenia, układ nerwowy oraz narząd wzroku. Stres oksydacyjny jest istotnym czynnikiem etiopatologicznym procesu starzenia się oraz wielu chorób ogólnoustrojowych (szacuje się, że kilkudziesięciu), w tym chorób sercowo-naczyniowych, większości nowotworów (m.in. raka płuca, piersi, jelita grubego, prostaty, wątroby i skóry), chorób neurodegeneracyjnych jak choroby Alzheimera oraz przewlekłych chorób zapalnych, astmy, nadczynności tarczycy, otyłości czy talasemii.

2. Całkowity potencjał antyoksydacyjny określa zdolność badanego materiału biologicznego do neutralizacji RFT. Chemiczne metody oznaczania zdolności przeciwutleniającej (Ryc. 6.2.) są oparte na:

1. pomiarze wpływu przeciwutleniaczy na szybkość procesów utlenienia zachodzących w próbce. Metody te oceniają, jak skutecznie antyoksydanty mogą spowalniać lub hamować reakcje utleniania, które prowadzą do uszkodzeń komórek:
 - metoda ORAC-ang. **o**xxygen **r**adical **a**bsorbance **c**apacity – mierzy zdolność antyoksydantów do neutralizowania rodników tlenowych generowanych w warunkach laboratoryjnych. Wynik wyrażany jest w ekwiwalentach standardowego przeciwutleniacza (np. troloxu)
 - metoda TRAP – ang. **t**otal **r**eactive **a**ntioxidant **p**otential – określa całkowity potencjał antyoksydacyjny próbki, mierząc zdolność do wyłapywania różnych reaktywnych form tlenu.

2. redukcji jonów metali. Ta grupa metod opiera się na zdolności antyoksydantów do redukcji jonów metali z wyższych stanów utlenienia do niższych:
- metoda FRAP – ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter* – mierzy zdolność przeciwutleniaczy do redukcji żelaza(III) do żelaza(II) w obecności TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyny), co skutkuje powstaniem intensywnie niebieskiego kompleksu mierzonego spektrofotometrycznie
 - metoda CUPRAC ang. (*cupric ion reducing antioxidant capacity*)
 - opiera się na redukcji jonów miedzi(II) (Cu^{2+}) do miedzi(I) (Cu^{+}) w obecności chelatującego liganda, co prowadzi do powstania barwnego kompleksu absorbującego.
3. zdolności wyłapywania syntetycznego rodnika. Antyoksydanty redukują rodniki i tym samym powodują zmianę barwy roztworu, którą oznacza się spektrofotometrycznie. Pomiar zmiany intensywności barwy pozwala ocenić zdolność neutralizacji rodnika przez badany związek:
- metoda ABTS — skrót od związku 2,2'-azyno-bis(3-etylo-benzotiazolin-6-sulfonian)
 - metoda DPPH – skrót od 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl.
4. pomiarze ilości produktów utlenienia lipidów. Metoda ta ocenia stopień uszkodzeń lipidów przez wolne rodniki poprzez oznaczenie powstających produktów utlenienia, które są markerami stresu oksydacyjnego.
- najczęściej oznaczanym związkiem jest dialdehyd malonowy (MDA – ang. *malondialdehyde*). Wysoki poziom MDA świadczy o nasilonym stresie oksydacyjnym i uszkodzeniach lipidowych.



Rycina 6.2. Schemat najczęściej stosowanych metod oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Źródło: opracowanie własne z wykorzystaniem BioRender.com

II. Część praktyczna

Odczynniki, materiał biologiczny oraz aparatura:

- odczynnik Folina-Ciocalteu'a
- 20% roztwór węglanu wapnia
- woda destylowana
- etanolowy roztwór DPPH (100 μ M)
- roztwór $FeCl_3$
- płyn Lugola
- 1% kleik skrobiowy
- 3% roztwór nadtlenu wodoru (H_2O_2)
- roztwór kwasu askorbinowego (1%, 2%)
- etanol
- kwas galusowy $c = 1$ mg/ml

(przygotowanie: odważyć 5 mg kwasu galusowego, rozpuścić w kolbie miarowej o pojemności 5 mL w 0,5 mL etanolu, a następnie uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać)

- wybrane produkty spożywcze
- spektrofotometr
- kuwety pomiarowe: plastikowe kuwety spektrofotometryczne przeznaczone do oznaczania w świetle widzialnym;
- termoblok
- wytrząsarka Vortex
- zestaw probówek szklanych o pojemności 10 ml
- probówki eppendorf
- pipety automatyczne
- pipety Pasteura

Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Oznaczanie aktywności antyrodnikowej

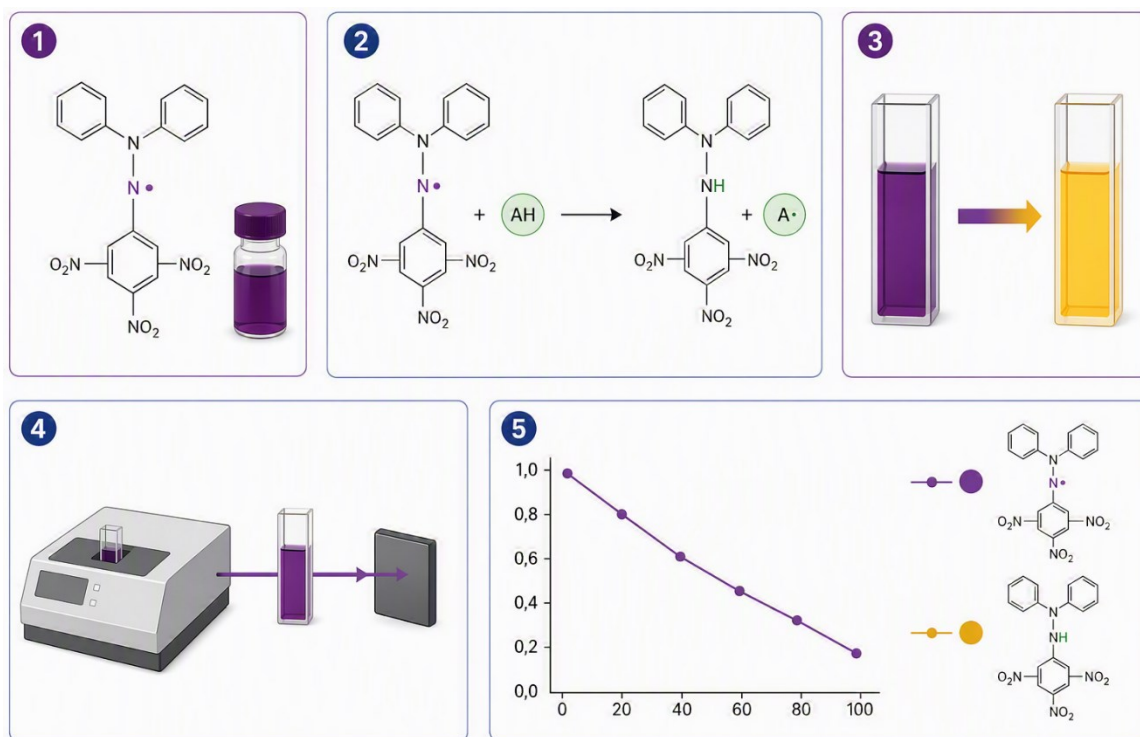
W badaniach nad właściwościami antyoksydacyjnymi związków wykorzystuje się ich zdolność do neutralizowania wolnych rodników. Jedną z popularnych metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej jest metoda oparta na reakcji z rodnikiem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowym (DPPH•).

Odczynnik DPPH jest organicznym związkiem chemicznym, występującym w postaci krystalicznego proszku, zawierającego stabilne cząsteczki wolnorodnikowe. W roztworze alkoholowym ma charakterystyczne fioletowe zabarwienie, z maksimum absorpcji przy długości fali 517 nm.

W obecności substancji o właściwościach przeciwutleniających rodnik DPPH• ulega redukcji (zgodnie z poniższym równaniem reakcji). W wyniku

tej reakcji fioletowa barwa (forma rodnikowa) stopniowo zanika, a roztwór przyjmuje barwę żółtą (forma zredukowana) (Ryc. 6.3.).

Zmianę zabarwienia mierzy się spektrofotometrycznie. Spadek absorbancji roztworu jest wskaźnikiem aktywności antyoksydacyjnej badanego związku lub ekstraktu.



Rycina 6.3. Schemat redukcji rodnika DPPH• do DPPH-H. **1** – rodnik DPPH• (forma utleniona, barwa fioletowa), **2** – dodanie przeciwutleniacza (antyoksydantu, AH) i rozpoczęcie reakcji redukcji rodnika, **3** – przekazanie atomu wodoru lub elektronu przez antyoksydant i zmiana barwy roztworu na żółtą, **4** – pomiar absorbancji metodą spektrofotometryczną przy długości fali 517 nm, **5** – rejestrowanie spadku absorbancji będącego miarą aktywności antyoksydacyjnej badanej substancji

Rozcieńcz 10-krotnie badane płynne produkty spożywcze, używając wody destylowanej jako rozpuszczalnika.

Oznacz długie szklane probówki według tabeli:

Próbka	Kontrolna (K)	Badana (B)
Sok z cytryny (R)	K ₁	B ₁
Herbata zielona (R)	K ₂	B ₂

Próbka	Kontrolna (K)	Badana (B)
Herbata czarna (R)	K ₃	B ₃
Wino białe (R)	K ₄	B ₄
Wino czerwone (R)	K ₅	B ₅
Kwas askorbinowy 2%	K ₆	B ₆

R – rozcieńczony

Dodaj do każdej oznaczonej szklanej probówki odpowiednie roztwory zgodnie ze schematem:

Oznaczenie	Próbka (ml)	Etanol (ml)	Etanolowy roztwór DPPH (100μM) (ml)
K0			1,5
K1	0,25	1,5	
B1	0,25		1,5
K2	0,25	1,5	
B3	0,25		1,5
K3	0,25	1,5	
B3	0,25		1,5
K4	0,25	1,5	
B4	0,25		1,5
K5	0,25	1,5	
B5	0,25		1,5
K6	0,25	1,5	
B6	0,25		1,5
Zawartość probówek dokładnie wymieszać na wytrząsarce Vortex			
Inkubować przez 10 min w temperaturze pokojowej, w ciemności			
Zmierzyć absorbancję etanolowego roztworu DPPH (K ₀), prób kontrolnych (K) oraz prób badanych (B) względem etanolu przy $\lambda = 517 \text{ nm}$. Aby prawidłowo dokonać pomiaru absorbancji należy napełnić kuwety pomiarowe roztworem do $\frac{3}{4}$ ich objętości (ok. 1,5 ml). Otrzymane wyniki należy umieścić w poniższej tabeli.			

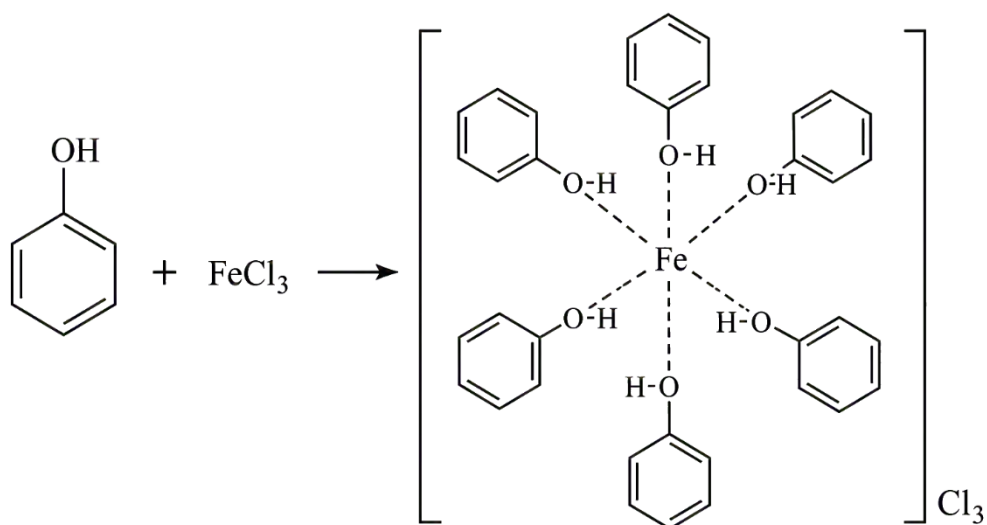
K₀ – etanolowy roztwór DPPH; K – próba kontrolna; B – próba badana



2. Identyfikacja jakościowa grup fenolowych

Fenole to związki organiczne, w których jedna lub więcej grup hydroksylowych (-OH) jest bezpośrednio połączona z pierścieniem aromatycznym. W roztworach wodnych fenole ulegają dysocjacji w niewielkim stopniu i wykazują właściwości bardzo słabych kwasów.

Związki zawierające grupę hydroksylową związaną bezpośrednio z pierścieniem aromatycznym mogą tworzyć kompleksy z jonami żelaza (III) (Fe^{3+}), zgodnie z poniższym schematem reakcji (Ryc. 6.4.). Kompleksy te mają charakterystyczne zabarwienie, którego barwa zależy od rodzaju związku fenolowego oraz warunków reakcji i może przyjmować odcienie m.in. fioletowe, niebieskie, zielone lub czerwone.



Rycina 6.4. Schemat reakcji fenolu z chlorkiem żelaza(III), prowadzącej do powstania barwnego kompleksu o purpurowo-fioletowym zabarwieniu

Przygotuj 6 probówek i dodaj do każdej z nich odpowiednie odczynniki zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli poniżej.

odczynniki	Numer probówki					
	1	2	3	4	5	6
sok (R)	1ml					
zielona herbata (R)		1 ml				
czarna herbata (R)			1 ml			
wino białe (R)				1 ml		
wino czerwone (R)					1 ml	
woda						1 ml
Dodaj 2–3 krople 5% FeCl ₃						
Wymieszać zawartość probówek na wytrząsarce Vortex.						

R – rozcieńczony

Obserwacje:

Wnioski:

3. Ilościowe oznaczanie związków polifenolowych

Polifenole to związki chemiczne zawierające co najmniej dwie grupy hydroksylowe (-OH) przyłączone do pierścienia aromatycznego. Stanowią one grupę substancji o różnorodnej strukturze chemicznej i właściwościach. Występują powszechnie w tkankach roślinnych. Wysoka zawartość tych związków występuje w liściach, kwiatach, zdrewniałych częściach roślin czy skórkach owoców.

W środowisku zasadowym związki fenolowe redukują kationy molibdenowe (VI) do kationu molibdenu (V), obecne w odczynniku Folina-Ciocalteu'a, tworząc kompleks o intensywnym niebieskim zabarwieniu. Kompleks ten wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 765$ nm. Intensywność absorpcji jest proporcjonalna do stężenia obecnych w próbce polifenoli, co umożliwia ich ilościowe oznaczenie.

Należy podkreślić, że odczynnik Folina–Ciocalteu'a nie jest całkowicie specyficzna dla polifenoli, ponieważ reaguje również z innymi związkami o właściwościach redukujących, takimi jak kwas askorbinowy, cukry redukujące oraz niektóre aminokwasy i białka. Może to prowadzić do zawyżenia wyniku oznaczenia.

Do obliczenia zawartości związków polifenolowych wykorzystuje się krzywą kalibracyjną sporządzoną dla kwasu galusowego (kwasu 3,4,5-trihydroksybenzoesowego; ryc. 6.5.), który pełni rolę standardu.

W ćwiczeniu wykorzystuje się gotowy roztwór kwasu galusowego o stężeniu $c = 1$ mg/mL.



Nr próbówki	V gotowego roztworu o c = 1mg/ml (ml)	V rozpuszczalnika (ml)	C końcowe (mg/ml)
1			0,5
2			0,4
3			0,3
4			0,2
5			0,1
6			0,05
7			0,025

Nanieś po 10 µl substancji na płytkę 96-dołkową zgodnie ze schematem:

Rodzaj próbki	Objętość i rodzaj odczynnika
Próba kontrolna – 3 dołki	10 µl wody dejonizowanej
Krzywa wzorcowa kwasu galusowego (5 rozcieńczeń, 3 powtórzenia)	10 µl roztworu odpowiedniego rozcieńczenia kwasu galusowego
Właściwa analiza polifenoli w badanych rozcieńczonych produktach (każdy produkt w 3 powtórzeniach)	10 µl roztworu odpowiedniego preparatu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	kontrola			Sok(R)								
B	0,025			zielona herbata(R)								
C	0,05			czarna herbata(R)								
D	0,1			wino białe(R)								
E	0,2			wino czerwone(R)								
F	0,3											
G	0,4											
H	0,5											
Do każdego dołka dodać 105 µl odczynnika Folina–Ciocalteu’a												
Do każdego dołka dodać 5 µl 20% roztworu węglanu sodu												
Wymieszać zawartość płytki i inkubować przez 45 minut w temperaturze pokojowej w warunkach zaciemnienia												
Dokonać odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda = 765 \text{ nm}$.												

R – rozcieńczony

Wykreśl krzywą kalibracyjną przedstawiającą zależność absorbancji (A) od stężenia kwasu galusowego (mg/ml), przeprowadź regresję liniową, a następnie wyznacz równanie prostej w postaci:

$$A = ax + b$$

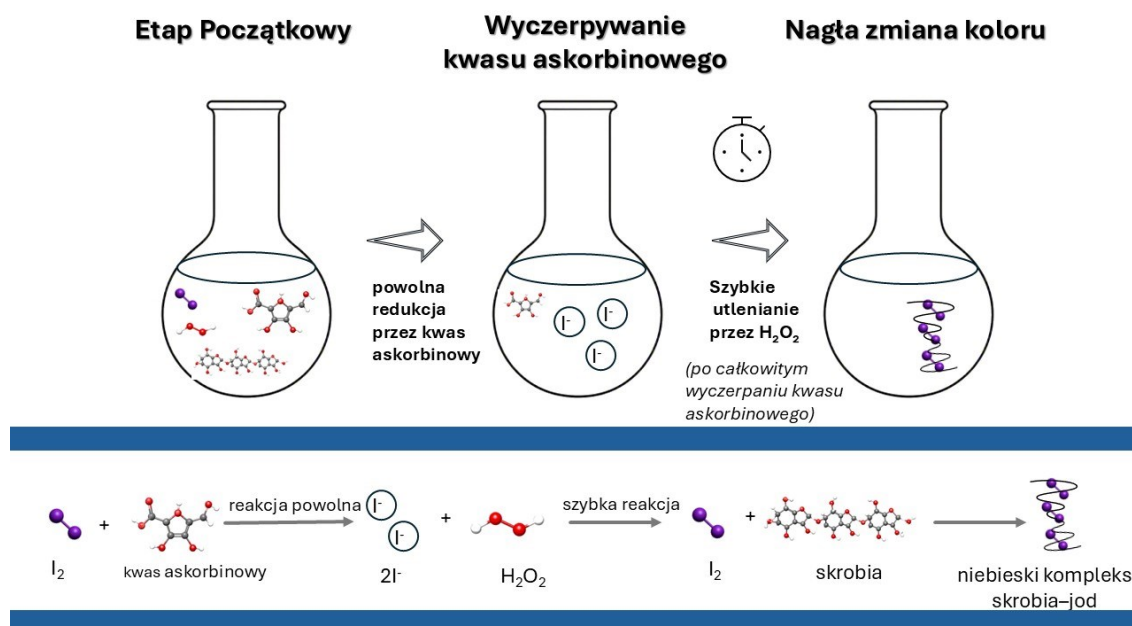
oraz współczynnik determinacji R^2 .



Oblicz na podstawie równania krzywej kalibracyjnej zawartość związków fenolowych wyrażoną jako ekwiwalent kwasu galusowego na ml roztworu. W obliczeniach należy uwzględnić rozcieńczenie roztworu badanego.

Obliczenia:

Wnioski:



Rycina 6.6. Ilustracja współdziałania dwóch reakcji — wolnej i szybkiej — w klasycznym jodowym zegarze

Przygotuj 3 długie szklane probówki i dodaj do każdej z nich odpowiednie odczynniki zgodnie ze schematem zamieszczonym w poniższej tabeli:

odczynniki	Numer probówki		
	1	2	3
	dodaj 0,15 ml płynu Lugola		
sok z cytryny	3 ml		
1% kwas askorbinowy		3 ml	
2% kwas askorbinowy			3 ml
Wymieszać zawartość probówek na wytrząsarce Vortex			
Dodać 0,5 ml kleiku skrobiowego i wymieszać			
Dodać 5 ml wody destylowanej			
Dodać 5 ml nadtlenu wodoru			
Wymieszać zawartość probówek			
Obserwować zmiany i czas reakcji.			

Obserwacje:

Wnioski:

Panel dyskusyjny

- *Jakie nawyki żywieniowe mają największy wpływ na równowagę oksydacyjną?*
- *Czy określenie „bogaty w antyoksydanty” zawsze oznacza korzyści zdrowotne?*
- *Dlaczego równowaga między prooksydantami a antyoksydantami jest ważniejsza niż maksymalne „eliminowanie wolnych rodników”?*

Podsumowanie realizacji ćwiczeń laboratoryjnych

Imię i nazwisko: Grupa:						
nr	Temat ćwiczenia	Data	Kartkówka	Realizacja ćwiczenia	Podpis	
1	Oznaczanie białka całkowitego w surowicy krwi metodą biuretowa.					
2	Węglowodany o właściwościach biologicznych.					
3	Lipidy o właściwościach biologicznych.					
4	Analiza kinetyki reakcji enzymatycznej katalizowanej przez fosfatazę.					
5	Oznaczanie aktywności acetylocholinoesterazy w surowicy krwi oraz badanie efektów inhibitorów.					
6	Badanie potencjału antyoksydacyjnego produktów spożywczych.					