

Sacharidy

Analytické úkoly

- stanovení dominantního sacharidu v určitém materiálu (sacharosa v cukrovinkách, škrob v obilovinách, glykogen v mase...) → nutriční hodnota potraviny, výrobku; stanovení celkových sacharidů je neobvyklé resp. až nemožné, určuje se výpočtem z obsahu ostatních složek:

$$p_{\text{využ. sach.}} = 100 - p_{\text{H}_2\text{O}} - p_{\text{bílk.}} - p_{\text{tuk}} - p_{\text{vláknina}} - p_{\text{popel}} \quad [\%]$$

- stanovení sumy určité skupiny sacharidů (aldosy, pentosy, redukující cukry)
- stanovení jednotlivých monosacharidů a oligosacharidů
→ identifikace původu suroviny, důkaz falšování
→ sledování průběhu technologických procesů (fermentace)

Analytické úkoly

- stanovení sacharidu, který není typický pro příslušnou surovinu (škrob v jogurtech, rafinosa nebo škrob v masných výrobcích)
→ odhad receptury výrobku, důkaz falšování
- stanovení vlákniny
- stanovení jednotlivých polysacharidů
- identifikace sacharidové složky glykosidů, glykolipidů, glykoproteinů

Monosacharidy a oligosacharidy – kvalitativní a semikvantitativní analýza

Důkazy cukrů chemickými zkouškami

- MOLISCHOVA reakce
roztok cukru + α -naftol + $H_2SO_4 \rightarrow$ červenofialové zbarvení
reagují všechny sacharidy kromě 2-deoxycukrů
- reakce s FEHLINGOVÝM činidlem
($CuSO_4$ +vinan sodno-draselný+NaOH)
záhřevem cukru s činidlem vzniká cihlově červený Cu_2O ; reakci dávají jen redukující cukry a je nespecifická (reagují i aldehydy...)
- reakce s TOLLENSOVÝM činidlem
(amoniakální roztok oxidu stříbrného)
 $2 Ag(NH_3)_2OH + RCH=O \rightarrow 2 \underline{Ag} + RCOONH_4 + 3 NH_3 + H_2O$

Planární chromatografie cukrů

Chromatografické materiály

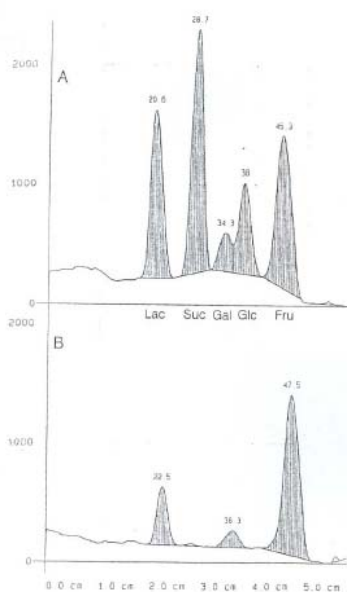
- papír
- celulóza (TLC)
- silikagel (TLC), někdy impregnace kyselinou boritou...

Činidla pro detekci cukrů

- anilin + difenylamin + H_3PO_4 (modré, zelené, červené skvrny)
- naftoresorcinol + H_2SO_4
- anisaldehyd + H_2SO_4
- anilin + kyselina ftalová
- trifenyltetrazoliumchlorid

TLC cukrů - příklady

Vrstva	Mobilní fáze	Dělené cukry	Detekce
celulosa	CH ₃ COOEt-pyridin-H ₂ O (6:3:1)	Lac, Gal, Glc, Fru	anilin-ftalová kys.
silikagel	CH ₃ CN-H ₂ O (85:15)	Raf, Mel, Lac, Mal, Sach, Gal, Glc, Fru, Xyl, Rha, dRib	anilin-difenylamin-H ₃ PO ₄
	BuOH-iPrOH-0,5% H ₃ BO ₃ (3:5:2)	Raf, Fru, Gal, Glc, Sach, Xyl	thymol-H ₂ SO ₄



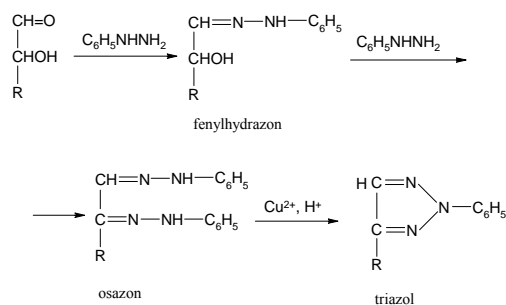
Denzitometrický záznam
HPTLC dělení cukrů
(A roztoky standardů,
B extrakt z jogurtu)

Podmínky: silikagel /
acetonitril-fosfátový pufr pH
5,9 (85:15) + 0,05%
2-aminoethyl-difenylborinát,

dvojitý vyvíjení, detekce:
anilin-difenylamin-H₃PO₄,
aktivace 5 min 120°C,
měření log 1/R, λ = 560 nm

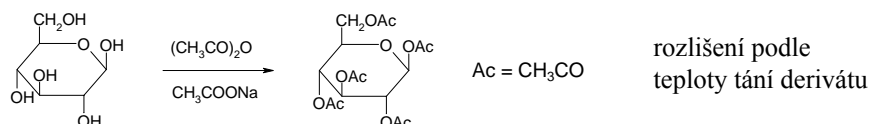
Identifikace cukrů přípravou derivátů

- příprava arylosazonů resp. triazolů reakcí s fenyldiazinem



osazony a triazolové deriváty cukrů lze identifikovat podle teploty tání; cukry lišící se pouze konfigurací na C2 tvoří stejný osazon (např. glukosu, fruktosu a mannosu nelze rozlišit)

- acylace cukrů (reakcí s acetanhydridem nebo benzoylchloridem)



Stanovení monosacharidů a oligosacharidů

Příprava vzorku pro stanovení cukrů

Kapalné vzorky

- zředění (sirupy, limonády → polarimetrie nebo titrace)
- *čištění* a zředění (ostatní vzorky → polarimetrie nebo titrace)
- odstranění iontů (→ HPLC)

Tuhé a polotuhé vzorky

- (odstranění tuku extrakcí nepolárním rozpouštědlem – pouze vzorky s vysokým obsahem lipidů)
- extrakce cukrů 80 % EtOH, vodou (možnost hydrolyzy)
- *čištění* extraktu
- zředění vodou (→ polarimetrie nebo titrace)
- zředění mobilní fází (→ HPLC)

Čiření je odstranění zákalu a rozpuštěných nesacharidových opticky aktivních látek (bílkoviny, AK...), příp. také barviv z cukerného extraktu adsorpcí nebo spolusrážením. Obvykle se přidávkem činidla nebo činidel k extraktu tvoří sraženina, filtrací je získán čirý roztok.

Některá činidla používaná k čiření

- CARREZOVA činidla: roztoky síranu (octanu) zinečnatého a hexakynoželeznatanu draselného:

$$2 \text{Zn}^{2+} + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \rightarrow \text{Zn}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$$
- neutrální octan olovnatý
- zásaditý octan olovnatý $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} + \text{PbO}$
- zásaditý dusičnan olovnatý: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{NaOH}$
- kyselina fosfowolframová
- další: tanin, $\text{Al}(\text{OH})_3$, aktivní uhlí, speciální ionexy

Polarimetrické metody stanovení cukrů

Hlavní využití

- analýza cukrovarnických surovin a produktů
- analýza čokolády, cukrovinek a pečiva

Specifické rotace některých sacharidů

Sacharid	$[\alpha]_D^{20}$	Sacharid	$[\alpha]_D^{20}$
sacharosa	+ 66,53	laktosa	+ 55,3
invertní cukr	- 20,59	maltosa	+ 137,5
D-fruktosa	- 93,78	D-galaktosa	+ 80,47
D-glukosa	+ 52,74	škrob	+ 181,3 až + 185,9

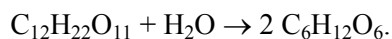
Běžná polarimetrická stanovení

- Stanovení sacharosy v nepřítomnosti jiných sacharidů:
prosté měření optické rotace v roztoku (po vyčiření)
koncentrace sacharosy
$$c_w = \alpha / (l \cdot 66,53) \text{ [g/ml]}$$
- Stanovení sacharosy v přítomnosti redukujících cukrů:
varem s roztokem Ba(OH)_2 se redukující cukry rozkládají na opticky inaktivní produkty
použití: stanovení sacharosy v čokoládě

Běžná polarimetrická stanovení

- Stanovení sacharosy vedle monosacharidu nebo vedle laktosy nebo maltosy:

měří se optická otáčivost roztoku vzorku před a po inverzi sacharosy
kyselinou chlorovodíkovou nebo citronovou (citronová kyselina
nehydrolyzuje laktosu ani maltosu):



342 g sacharosy 360 g invertního cukru

Optická otáčivost roztoku před inverzí:

$$\alpha_1 = l \cdot ([\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{S}} \cdot c_{\text{wS}} + [\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{B}} \cdot c_{\text{wB}})$$

Optická otáčivost po inverzi:

$$\alpha_2 = l \cdot ([\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{I}} \cdot c_{\text{wI}} + [\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{B}} \cdot c_{\text{wB}}) = l \cdot ([\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{I}} \cdot (360/342) \cdot c_{\text{wS}} + [\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\text{B}} \cdot c_{\text{wB}})$$

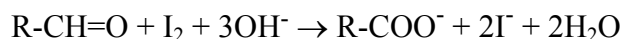
řešením soustavy rovnic se vypočítá koncentrace sacharosy c_{wS}
a koncentrace druhého cukru c_{wB}

Chemické metody stanovení redukujících cukrů

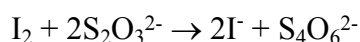
1. Metody založené na stechiometrických reakcích

Oxidace aldolů jodem

Ve slabě alkalickém prostředí se aldoly oxidují nadbytkem jodu na soli příslušných aldonových kyselin:

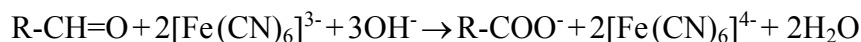


Po okyselení se přebytek jodu určí titrací thiosíranem sodným:

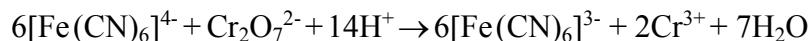


Oxidace aldolů hexakynoželezitanem draselným

Aldoly se oxidují nadbytkem činidla v prostředí uhličitanu sodného:



vzniklý kyanoželeznatan se pak ztitruje dichromanem draselným:



2. Metody založené na nestechiometrických reakcích

Princip:

- oxidace redukujících cukrů měďnatými ionty obvykle v alkalickém prostředí za horka
- některá činidla: FEHLINGOVO (CuSO_4 + vinan sodno-draselný + NaOH), LUFFOVO (CuSO_4 + kys. citronová + Na_2CO_3)
- reakci lze pro aldol zapsat takto:
$$\text{R-CH=O} + 2\text{Cu}^{2+} + 5\text{OH}^- \rightarrow \text{R-COO}^- + \text{Cu}_2\text{O} + 3\text{H}_2\text{O}.$$

Ve skutečnosti probíhá i řada jiných reakcí (isomerace, štěpení cukrů). Rovnice tedy nevystihuje probíhající chemické děje stechiometricky. Provádí-li se reakce za přesně definovaných podmínek (objem roztoku vzorku, objem činidla, doba ohřevu reakční směsi k varu, doba varu), reakce doběhne do určitého stupně (je dosaženo určité konverze reaktantů na produkty), přičemž tento stupeň je závislý na množství cukru ve vzorku. Různé redukující cukry reagují různou rychlostí a také vedlejší reakce nejsou u jednotlivých cukrů zcela totožné.

- Množství konkrétního cukru se určuje empiricky ze složení reakční směsi po ukončení reakce (ochlazení na laboratorní teplotu, okyselení). Lze stanovit buď
 - množství vyloučeného oxidu měďného (červenohnědá sraženina) nebo
 - zbytkové množství měďnatých iontů

Postupy založené na stanovení oxidu měďného

- **Metoda podle OFNERA** – oxid měďný vyloučený reakcí cukru s alkalickým roztokem měďnaté soli se po okyselení HCl oxiduje nadbytkem odměrného roztoku jodu na Cu^{2+} :

$$\text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + \text{I}_2 \rightarrow 2\text{Cu}^{2+} + 2\text{I}^- + \text{H}_2\text{O}$$
 Přebytek jodu se určí titrací thiosíranem.
- **Metoda podle BERTRANDA** – oxid měďný se rozpustí v roztoku síranu železitého a kyseliny sírové. Železitá sůl se přitom redukuje na železnatou. Ekvivalentní množství železnatých iontů se stanoví manganometrickou titrací:

$$\text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{Fe}^{3+} \rightarrow 2\text{Cu}^{2+} + 2\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$$

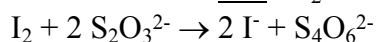
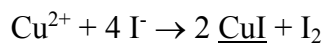
$$5\text{Fe}^{2+} + \text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 5\text{Fe}^{3+} + \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$$

Další postupy založené na stanovení oxidu měďného

- **Komplexometrická metoda** – oxid měďný se po odfiltrování rozpustí v kyselině dusičné a vzniklé měďnaté ionty se stanoví titrací komplexonem III (chelatonem 3) s použitím murexidu nebo PAR jako indikátoru:
$$3 \text{Cu}_2\text{O} + 2 \text{NO}_3^- + 14 \text{H}^+ \rightarrow 6 \text{Cu}^{2+} + 2 \text{NO} + 7 \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{Y}^{2-} \rightarrow \text{CuY}^{2-} + 2 \text{H}^+$$
- **Vázkové metody** – oxid měďný se odfiltruje a stanoví vázkově (váží se buď Cu_2O nebo kovová měď po redukcii oxidu v parách methanolu)

Postupy založené na stanovení zbytkových měďnatých iontů

- **Metoda podle LUFFA – SCHOORLA** – cukerný extrakt reaguje za horka s definovaným množstvím Cu^{2+} ve formě LUFFOVA roztoku (CuSO_4 + citronan sodný + Na_2CO_3) a vzniká oxid měďný. Směs se vaří přesně 10 minut. Po ochlazení a oxyselení se nadbytek Cu^{2+} stanoví jodometricky:

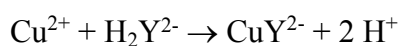


Provádějí se dvě titrace thiosíranem. První bez vzorku (místo cukerného extraktu se odpipetuje stejný objem vody) a druhá se vzorkem. Z rozdílu spotřeb 0,1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se z tabulky určí množství příslušného cukru.

Tabulka pro LUFFOVU – SCHOORLOVU metodu

0,1M Na ₂ S ₂ O ₃ [ml]	Glc, Fru, invert [mg]	Maltosa (bezvodá) [mg]	Laktosa (bezvodá) [mg]	0,1M Na ₂ S ₂ O ₃ [ml]	Glc, Fru, invert [mg]	Maltosa (bezvodá) [mg]	Laktosa (bezvodá) [mg]
1	2,4	3,9	3,6	12	30,3	47,5	44,6
2	4,8	7,8	7,3	13	33,0	51,6	48,4
3	7,2	11,7	11,0	14	35,7	55,7	52,2
4	9,7	15,6	14,7	15	38,5	59,8	56,0
5	12,2	19,6	18,4	16	41,3	63,9	59,9
6	14,7	23,5	22,1	17	44,2	68,0	63,8
7	17,2	27,5	25,8	18	47,1	72,2	67,7
8	19,8	31,5	29,5	19	50,0	75,5	71,7
9	22,4	35,5	33,2	20	53,0	80,9	75,7
10	25,0	39,5	37,0	21	56,0	85,4	79,8
11	27,6	43,5	40,8	22	59,1	90,0	83,9

- **Komplexometrická metoda** – přebytek Cu²⁺ po reakci s cukrem se stanoví titrací komplexonem III (chelatonem 3):



Zvláštní postup

alkalický roztok měďnaté soli se za varu titruje cukerným roztokem (vzorkem) do vymizení modrého zbarvení (metoda podle LANEAE-EYNONA)

STANOVENÍ DVOU AŽ TŘÍ CUKRŮ VEDLE SEBE
(KOMBINACE CHEMICKÝCH A POLARIMETRICKÝCH METOD)

Stanovení fruktosy vedle glukosy

Glukosa se předem oxiduje jodem v alkalickém prostředí, po okyselení se nadbytek jodu odstraní přidávkem Na_2SO_3 . V roztoku se pak stanoví fruktosa podle LUFFA-SCHOORLA.

Stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy

- první alikvotní podíl: stanovení Glc titrací jodem v alkalickém prostředí $\Rightarrow m_1 = m_{\text{Glc}}$
- druhý alikvotní podíl: stanovení sumy Glc + Fru na základě redukce měďnaté soli (např. metodou OFFNEROVOU, LUFF-SCHOORLOVOU) $\Rightarrow m_2 = m_{\text{Glc}} + m_{\text{Fru}}$
- třetí alikvotní podíl: inverze sacharosy kys. chlorovodíkovou stanovení sumy redukujících cukrů $\Rightarrow m_3$
 $m_{\text{Sach}} = 0,95 \cdot m_{\text{Inv}} = 0,95 \cdot (m_3 - m_2)$

Stanovení laktosy a sacharosy vedle sebe

Laktosa se záhřevem s hydroxidem barnatým převede na opticky inaktivní produkty a zbylá sacharosa se stanoví polarimetricky, laktosa se stanoví titračně podle LUFFA-SCHOORLA.

Stanovení glukosy, maltosy a dextrinů

Suma glukosy a maltosy se stanoví jodometricky na základě redukce měďnaté soli v prostředí NaOH. V jiném alikvotním podílu se stanoví samotná glukosa obdobně v prostředí octanu sodného (maltosa nereaguje). V dalším alikvotním podílu se dextriny hydrolyzují na glukosu a stanoví se suma všech redukujících cukrů.

Hmotnost dextrinů $m_{\text{dex}} = 0,9 \cdot (m_{\text{celk.}} - m_{\text{Glc}} - m_{\text{Mal}})$

Spektrofotometrické metody stanovení cukrů

1. Enzymové metody

viz část biochemické metody

2. Metody založené na redukčních účincích cukrů

Neokuproinová metoda

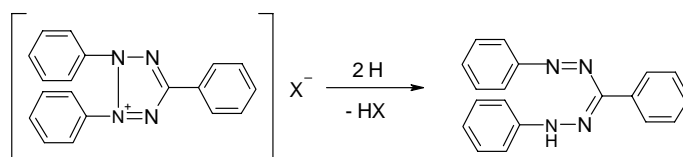
Měďné ionty (Cu^+) vzniklé reakcí Cu^{2+} s cukrem reagují s neokuproinem (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin) za vzniku oranžového komplexu rozpustného v EtOH ($\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$)

Metoda podle NELSONA a SOMOGYIHO

Měďné ionty (Cu^+) vzniklé reakcí Cu^{2+} s cukrem dále redukují arsenomolybdenovou kyselinu na molybdenovou modř ($\lambda_{\text{max}} = 820 \text{ nm}$)

Reakce s tetrazoliovými solemi

Trifenyltetrazolium chlorid nebo bromid se redukujícími cukry redukuje v alkalickém prostředí ($\text{pH} > 12,5$) na červenofialový trifenylformazan:

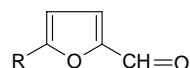


trifenyltetrazolium chlorid (bromid)

trifenylformazan

3. Metody založené na vzniku a reakcích derivátů furanu

Dehydratací cukrů v prostředí minerálních kyselin vznikají deriváty furfuralu:



pentosy → furfural (R = H)

methylpentosy → 5-methylfurfural (R = CH₃)

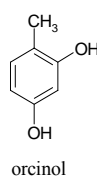
hexosy → 5-hydroxymethylfurfural (R = CH₂OH)

uronové kyseliny → 5-formylfuroová kyselina (R = COOH)

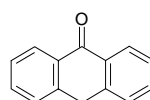
(2-deoxycukry takto nereagují)

Furfural a podobné sloučeniny kondenzují s fenoly, aromatickými aminy nebo polycyklickými sloučeninami za vzniku barevných produktů.

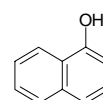
Nejčastěji používaná činidla:



orcinol



anthron



1-naftol

Přehled reakcí:

Činidlo	Doba reakce, teplota	Cukry	Zbarvení
orcinol / HCl nebo H ₂ SO ₄	30-45 min, 100°C	pentosy > hexosy	zelené (p), hnědé (h)
anthron / H ₂ SO ₄	10-15 min, 90-100°C	všechny	modrozelené
1-naftol / H ₂ SO ₄	3 min, 100°C	všechny	purpurové

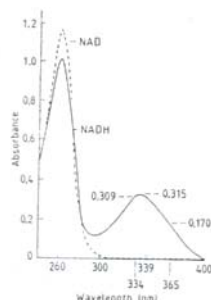
Vlastnosti metod:

- málo selektivní (⇒ kombinace s PC, TLC, HPLC)
- málo robustní (vliv doby a rychlosti ohřevu)
- dosti citlivé (možno stanovit µg množství cukru)

Biochemické metody analýzy cukrů

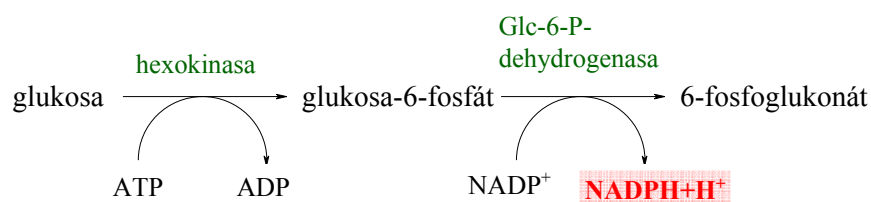
využívají většinou enzymově katalyzovaných oxidačně – redukčních reakcí cukrů, při nichž dochází k přeměně kofaktoru. Vznik nebo úbytek určité formy kofaktoru se obvykle měří spektrofotometricky.

Nejčastěji jde o dehydrogenace fosforečných esterů cukrů pyridinovými dehydrogenasami za současné konverze NAD^+ (nebo NADP^+) na $\text{NADH}+\text{H}^+$ (nebo $\text{NADPH}+\text{H}^+$). Redukovaná forma kofaktoru se stanoví měřením absorpance při 340 nm.

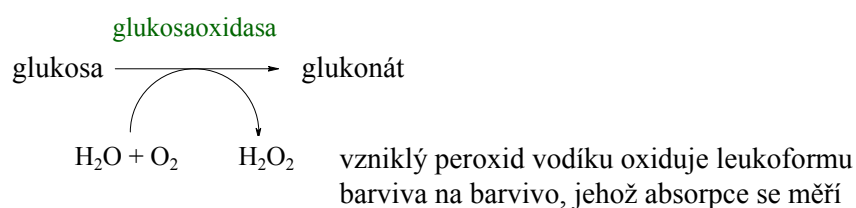


Absorpční spektra oxidované a redukované formy nikotinamidadeninukleotidu ($c = 5 \text{ mmol/l}$)

Stanovení glukosy

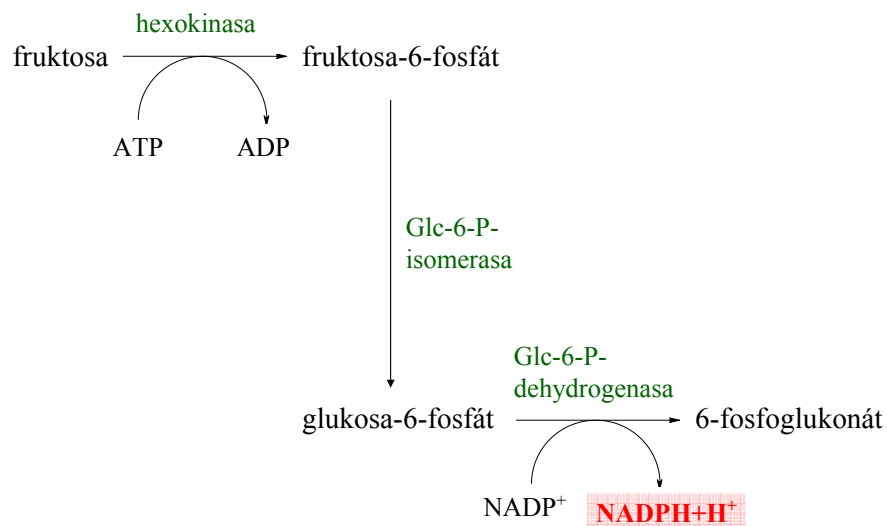


Jiný princip:



Enzymový systém lze zakotvit v čidle pro elektrochemické měření („enzymová elektroda“)

Stanovení fruktosy

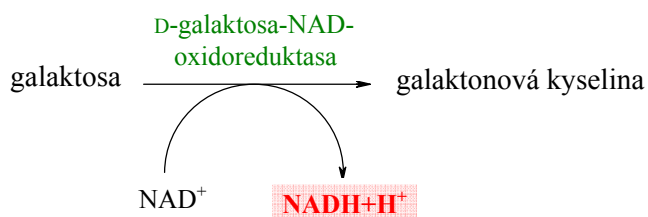


Stanovení sacharosy

Sacharosa se za katalýzy **invertasou** (β -fruktosidasou) hydrolyzuje na glukosu a fruktosu. Další průběh je stejný jako u glukosy (příp. fruktosy).

Stanovení laktosy

Laktosa (O- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)- α -D-glukopyranosa) se za katalýzy **β -galaktosidasou** hydrolyzuje na glukosu a galaktosu; galaktosa se enzymově dehydrogenuje:



Stanovení rafinosy

Rafinosa (α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopyranosyl-(1-2)- β -D-fruktofuranosid) může být hydrolyzována buď

- na galaktosu a sacharosu (enzym α -galaktosidasa) nebo
- na fruktosu a melibiosu (enzym invertasa).

Stanovení rafinosy založeno na dehydrogenaci galaktosy.

V druhém případě je nutné nejprve hydrolyzovat melibiosu na galaktosu a glukosu (enzym α -galaktosidasa).

Zhodnocení enzymových metod

Výhody	Problémy, nevýhody
specifičnost	nalezení optimálních podmínek pro více enzymů
jednoduchá příprava vzorku	nečistoty v enzymových preparátech
rychlost	vysoká cena čistých enzymů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie monosacharidů a oligosacharidů

Separční systémy HPLC

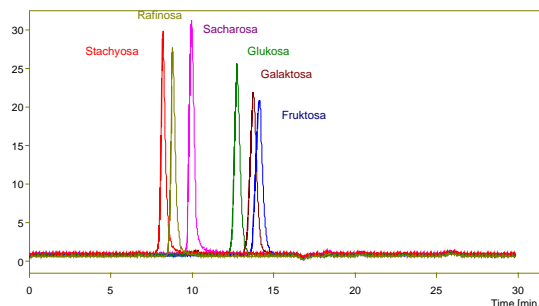
- dělení borátových komplexů cukrů na měničích aniontů
- dělení na měničích kationtů (v cyklu Na^+ , Ag^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+})
- dělení na stacionárních fázích s vázanou aminoskupinou
- dělení na měničích aniontů v silně alkalickém prostředí
- chromatografie v systému obrácených fází – RP HPLC (předkolonová derivatizace např. dabsyl- nebo dansylhydrazinem)

Možnosti detekce

- refraktometrická (RID)
- pulzní amperometrická (PAD)
- detekce použitím ELSD (*evaporative light scattering detector*)
- UV/VIS s pokolonovou derivatizací (např. orcinolem)
- UV/VIS nebo FLD s předkolonovou derivatizací
- UV ($\lambda = 190 \text{ nm}$)
- MS

Chromatografie cukrů na měničích kationtů

- stacionární fáze: silně kyselý katex obvykle v cyklu Na^+ , Ag^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+} (kolony v cyklu Ag^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+} vyžadují předchozí odstranění iontů ze vzorku – zařazení předkolony s katexem a anexem)
- mobilní fáze: voda
- detekce: RID (mez detekce cca $0,5 \mu\text{g}$), UV (190-210 nm)

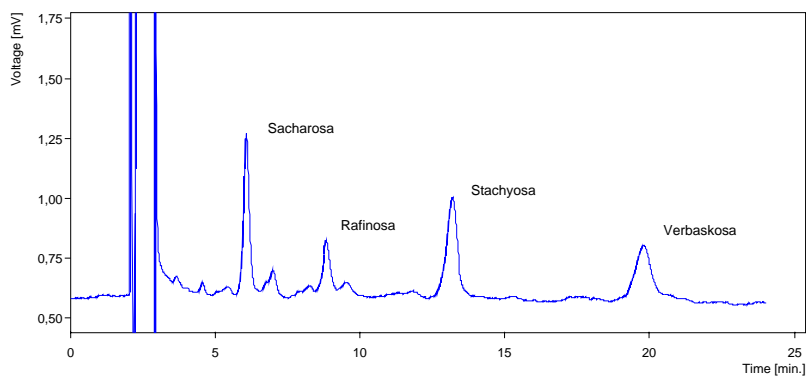
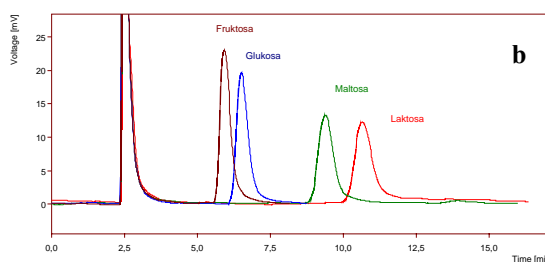
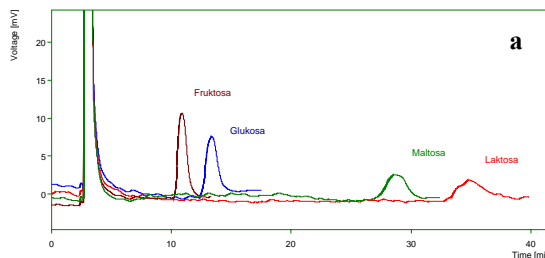


Nástřiky jednotlivých cukrů do kolony Ostion LGKS 0800 Na (250×8 mm, 10 μm)
teplota kolony: 80 °C
mobilní fáze: voda
průtok: 0,4 ml/min
nástřík: 20 μl
koncentrace cukrů: 500 $\mu\text{g/ml}$

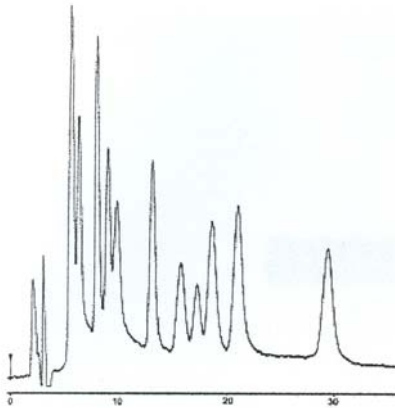
Chromatografie cukrů na amino-fázích

- stacionární fáze: silikagel s vázanými aminopropylovými skupinami
- mobilní fáze: fixní směs voda-acetonitril
- detekce: RID
(mez detekce cca 5 µg)

nástřiky Fru, Glc, Mal, Lac
do kolony Separon SGX NH₂
(250×4 mm, 5 µm)
průtok 1 ml/min, detekce RID,
nástřik 100 µl
a : CH₃CN-voda (80:20)
b : CH₃CN-voda (70:30)



Dělení oligosacharidů na amino-fázi
kolona Separon SGX NH₂ (250×4 mm, 5 µm)
mobilní fáze CH₃CN-voda (65:35)
průtok 1 ml/min, nástřik 100 µl,
detekce RID



Dělení monosacharidů, disacharidů a trisacharidů
 kolona LiChroCART (250 × 4,6 mm), stac. fáze LiChrosorb NH2, 5μm,
 předkolona 4×4 mm, stejná náplň,
 mobilní fáze CH₃CN-H₂O (75:25)
 detekce UV 190 nm
 pořadí eluovaných složek: rhamnosa (50 μg), xylosa (50 μg), fruktosa (25 μg),
 glukosa (100 μg), galaktosa (50 μg), sacharosa (100 μg), maltosa (100 μg),
 trehalosa (130 μg), laktosa (130 μg), melibiosa (130 μg), rafinosa (130 μg)

Chromatografie cukrů a alditolů na měničích aniontů v silně alkalickém prostředí (HPAEC)

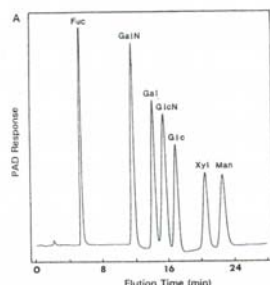
- stacionární fáze: speciální iontoměniče (výrobce Dionex)
- mobilní fáze: roztok NaOH nebo KOH (0,001-0,5 mol/l), případně s přidavkem octanových iontů nebo kationtů kovů alkalických zemin (Sr²⁺, Ba²⁺)
- detekce: pulzní amperometrická

Interakce se stacionární fází:

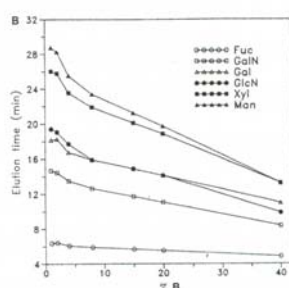
Cukry se chovají jako velmi slabé kyseliny; disociací protonu z hydroxylových skupin vznikají anionty, které jsou poutány kladně nabitými skupinami na povrchu ionexu. Z vazby na stacionární fázi cukry vymývá roztok hydroxidu.

Největší aciditu vykazuje poloacetalový hydroxyl ($pK_a \approx 12-12,5$), u glukosy klesá acidita dalších hydroxylů v řadě 2-OH > 6-OH > 3-OH > 4-OH.

Příklad dělení cukrů metodou HPAEC



Chromatogram cukrů
CarboPac PA1 (250×4,6 mm)
mob. fáze 1mM NaOH + 0,03 mM NaOAc
pořadí eluce koresponduje s hodnotami pK_a
(Gal 12,39; Glc 12,35; Xyl 12,29; Man 12,08)



Vliv složení mobilní fáze na retenční časy cukrů:
mob. fáze A: voda
mob. fáze B: 50 mM NaOH + 1,5 mM NaOAc

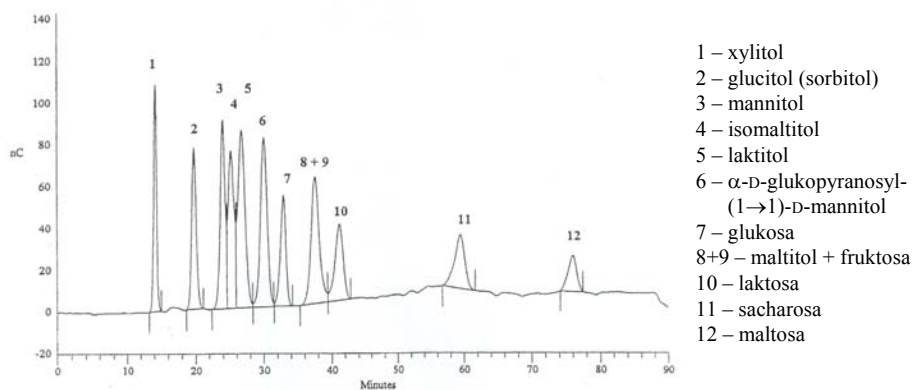
Podstata pulzní amperometrické detekce

měření proudu mezi pracovní Au elektrodou a referenční elektrodou
v cyklech o délce cca 1s

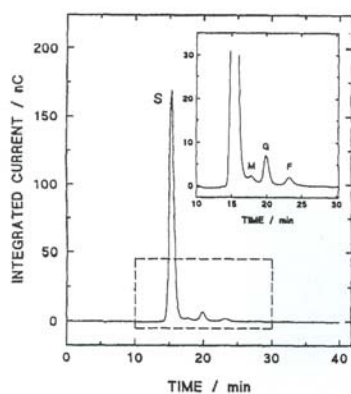
jednotlivé kroky cyklu:

1. vzorkování proudu (měření): potenciál cca +50 mV, délka 300-400 ms
2. čištění elektrody: potenciál +600 až +800 mV, délka 200 ms
3. čištění elektrody: potenciál -150 až -300 mV, délka 200-400 ms
4. stabilizace elektrody při detekčním potenciálu, délka 200 ms

Mez detekce cukrů při použití PAD: 3-10 ng

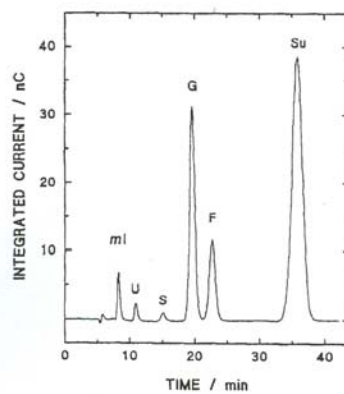


Separace alditolů, monosacharidů a disacharidů metodou HPAEC-PAD kolona CarboPac MA1 (250×4 mm), předkolona CarboPac MA1 (50×4 mm) mobilní fáze A: 1M NaOH, B: voda, teplota kolony 29°C gradient: start: 30 % A, 40. min: 45% A, 60. min: 45%A, 80. min: 80% A 81.-90. min: 30 % A průtok 0,4 ml/min, nástřik 10 μl



Analýza dietního třešňového džemu

Kolona CarboPac MA1, 8,5 μm (250×4 mm) a předkolona (5×4 mm) mobilní fáze 0,58M NaOH+2 mM Ba(CH₃COO)₂, průtok 0,4 ml/min nástřik 10 μl
G – glukosa, F – fruktosa, Su – sacharosa, S – sorbitol (glucitol), M –mannitol, ml – *myo*-inositol



Analýza mandarinkové šťávy
ředění vzorku 1:1000

Plynová chromatografie monosacharidů a oligosacharidů

Před stanovením plynovou chromatografií musejí být cukry převedeny na těkavé deriváty.

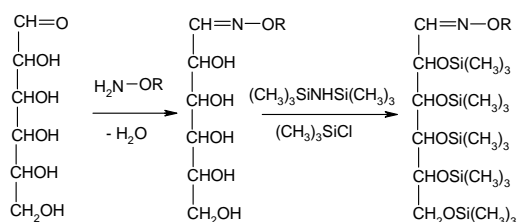
Možnosti derivatizace cukrů

1) přímá silylace

- náhrada vodíků hydroxyskupin trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
- provedení: reakce suchého vzorku s trimethylchlorsilanem a hexamethyldisilazanem
- jednotlivé strukturální formy cukru (acylická forma, anomery pyranos a furanos) poskytují různé deriváty
 \Rightarrow jeden cukr \rightarrow pět různých derivátů
 \Rightarrow nepřehledný chromatogram s velkým počtem píků

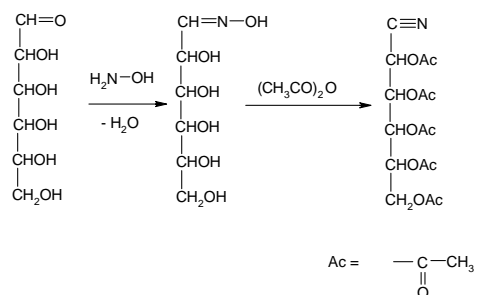
2) dvoustupňová derivatizace s oximací

- příprava oximů nebo methyloximů reakcí s hydroxylamin-hydrochloridem nebo methoxylamin-hydrochloridem v pyridinu (reagují jen redukující cukry)
- silylace nebo acetylace oximů resp. methyloximů redukujících cukrů a silylace nebo acetylace přítomných nezměněných neredukujících cukrů



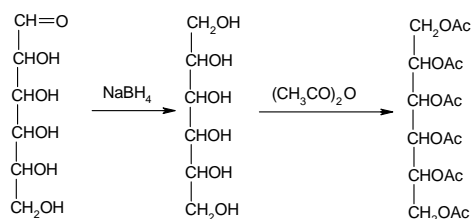
Acylaci lze uskutečnit acetanhydridem nebo trifluoracetanhydridem (velmi těkavé a stabilní deriváty).

Při acylaci oximů (nikoli methyloximů) aldosa dochází účinkem anhydridu kyseliny k dehydrataci a oximová skupina se mění na nitrilovou (oximy ketos této reakci nepodléhají):



3) dvoustupňová derivatizace s redukcí

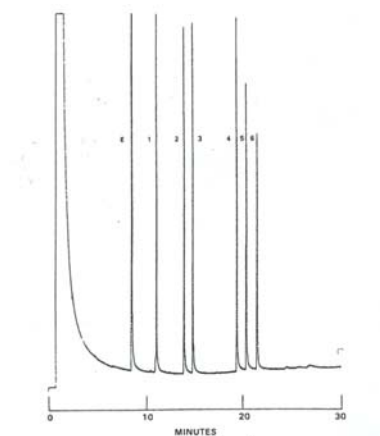
- redukce cukrů na alditoly tetrahydridoboritanem sodným
- acetylace alditolů acetahydridem v pyridinu



Nevýhody: nelze stanovit cukry i alditoly současně,
nelze stanovit aldosa a ketosa současně;
ketosa tvoří ekvimolární směs dvou alditolů
(z fruktosa vzniká glucitol a mannitol – tj. produkty
redukce glukosa a mannosy)

Podmínky GC stanovení cukrů

- většinou kapilární kolony, výběr stac. fáze se řídí druhem derivátu
- detekce FID, MS



GC analýza cukrů ve formě
aldonitrilacetátů:
kolona DB Wax Carbowax 30 m
teplotní program:
180 – 210 °C, 2°C/min,
prodleva při 210 °C do konce analýzy
detekce FID
E – erythritol
1 – rhamnosa
2 – arabinosa
3 – xylosa
4 – mannososa
5 – galaktosa
6 – glukosa

Srovnání vlastností HPLC a GC postupů při stanovení cukrů

HPLC	GC
snadná příprava vzorku	nutná derivatizace
rychlejší (kratší) analýza	vyšší separační účinnost (dělení anomerů)
vhodná i pro vyšší oligosacharidy	jen pro mono- až trisacharidy
většinou lepší správnost	vyšší citlivost

Stanovení polysacharidů a vlákniny

Stanovení škrobu

Vázkové stanovení

Z odtučněného vzorku se škrob extrahuje 20 % HCl (převedení na rozpustnou formu). Ve filtrátu se rozpustný škrob srazí ethanolem, sraženina se zfiltruje, vysuší a zváží.

Jiný postup (dle FELLENERGA): škrob se převede na rozpustnou formu varem s roztokem CaCl_2 . Po filtraci se z filtrátu škrob vysráží jodem. Sraženina se odfiltruje a promýváním ethanolem se z ní jod odstraní. Po vysušení se škrob zváží.

Stanovení škrobu

Polarimetrické stanovení

Škrob se záhřevem se zředěnou HCl (0,42-1,12 %) převede na rozpustnou formu. Po vyčiření a filtraci se měří optická rotace roztoku. Měrná otáčivost různých škrobu se pohybuje podle původu v rozmezí + 181,3 až + 195,5 stupňů kruhových.

Za přítomnosti nízkomolekul. sacharidů se provádí dvojí měření: (1) alikvotní podíl vyčiřeného extraktu a (2) alikvotní podíl, z něhož se škrob odstraní srážením ethanolem. Obsah škrobu se určí z rozdílu.

Postupy založené na hydrolýze škrobu

Škrob se varem s kyselinou chlorovodíkovou hydrolyzuje až na glukosu a ta se stanoví titračně nebo spektrofotometricky.

$$m_{\text{škrob}} = 0,9 \cdot m_{\text{Glc}}$$

Analýza částečně hydrolyzovaného škrobu

Kapalinovou chromatografií (HPAEC-PAD) lze separovat jednotlivé oligomery a polymery podle počtu glukosových jednotek (až do 60). To umožňuje např. u enzymově hydrolyzovaného amylopektinu rozlišovat původ škrobu nebo určovat původ maltodextrinových přípravků a škrobových sirupů.

Stanovení glykogenu

Glykogen se z živočišných tkání izoluje extrakcí trichloroctovou kyselinou. V extraktu se stanoví jako glukosa např. anthronovým činidlem (v prostředí H_2SO_4 dochází k úplné hydrolýze glykogenu, absorbance se měří při 620 nm).

$$m_{\text{glykogen}} = 0,9 \cdot m_{\text{Glc}}$$

Stanovení pektinu

Pektinové látky (polymery galakturonové kyseliny) jsou nevyužitelné sacharidy a patří tedy k rozpustným složkám tzv. *vlákniny*.

Vázkové stanovení. Pektiny se ze vzorku izolují extrakcí horkou vodou (někdy s přidávkem komplexotvorných látek) a následným srážením chloridem vápenatým (vzniká málo rozpustný pektan vápenatý). Sraženina se odfiltruje, promyje, vysuší a zváží.

Kapalinová chromatografie (HPAEC-PAD): stanovení oligo-galakturonových kyselin v pektinových přípravcích (dělení podle počtu cukerných jednotek) – použití pro určování původu pektinu.

Stanovení vlákniny

Vláknina potravy (dietary fibre) zahrnuje nevyužitelné polysacharidy a jejich doprovodné látky (lignin)

- nerozpustná vláknina: celuloza, některé hemicelulosity, lignin, (rezistentní škrob)
- rozpustná vláknina: pektiny, některé hemicelulosity (část arabinoxylanů, β -glukany, glukomannany, galaktomannany), rostlinné gumy a slizy.

Stanovení vlákniny v potravinách je založeno na odstranění lipidů ze vzorku, na hydrolyze a solubilizaci ostatních složek (bílkovin, využitelných sacharidů...) a zvážení zbytku nerozpustného za podmínek metody.

Příklady hydrolytických postupů při stanovení vlákniny

- var s 1,25 % H_2SO_4 a následně s 1,25 % NaOH
- var se směsí CH_3COOH , HNO_3 a CCl_3COOH
- hydrolyza 72 % H_2SO_4 48 hodin (\rightarrow lignin)
- solubilizace bílkovin použitím surfaktantů a následně kyselá hydrolyza jiných polymerů (zředěný roztok H_2SO_4)
- enzymová hydrolyza

Enzymová gravimetrická metoda stanovení vlákniny (total dietary fibre)

- odtučnění vzorku extrakcí petroletherem v SOXHLETOVĚ extraktoru (jen vzorky s obsahem tuku nad 10 %)
- suspendování navážky (odtučněného) vzorku v tlumivém roztoku pH = 6 a inkubace 30 min při 95°C s α -amylasou
- úprava pH na 7,5, inkubace 30 min při 60°C s proteasou
- úprava pH na 4,5, inkubace 30 min při 60°C s amyloglukosidasou
- vysrážení rozpustné vlákniny přidavkem ethanolu
- filtrace nerozpustného zbytku a sraženiny
- promytí filtru se zachycenou vlákninou ethanolem a acetonem
- vysušení a zvážení nerozpustného zbytku
- stanovení bílkovin v nerozp. zbytku dle KJELDAHLA (paralelní vzorek)
- stanovení popela v nerozpustném zbytku (paralelní vzorek)

$$m_{\text{vláknina}} = m_{\text{zbytek}} - m_{\text{bílk.}} - m_{\text{popel}}$$