

## SACHARIDY

- zdroj energie
- funkční vlastnosti
  - textura
  - údržnost
  - chutnost
- interakce s jinými složkami
  - aromatické a chuťové látky
  - pigmenty

---

---

---

---

---

---

---

---

## ANALYTICKÉ ÚKOLY

- Kvalitativní analýza – identifikace, určení konfigurace, konformace
- Kvantitativní analýza

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Handbook of Food Analytical Chemistry:*

#### **Background Information**

The analytical methodology for the determination of sugars has improved dramatically and is continually evolving. The traditional wet chemistry and enzymatic assays that detected classes of sugars (e.g., reducing sugars) have largely been replaced by chromatographic methods utilizing both gas-liquid (GLC) and high-performance liquid (HPLC) chromatography. These methods offer high specificity and the ability to detect several sugars at the same time, and have been actively developed over the past two decades. **The HPLC technique is the key method for routine sugar analysis.**

---

---

---

---

---

---

---

---

## 1. VOLNÉ SACHARIDY

### 1. IZOLACE

extrakce: voda, 80 % ethanol

### 2. ČIŘENÍ

à odstranění opticky aktivních látek z roztoku cukrů

(taniny, aminokyseliny, glykosidy)

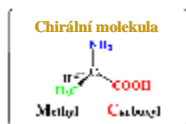
à odstranění koloidních látek (proteiny)

à odbarvení roztoku (různé pigmenty)

### G

nesmí docházet k adsorbci cuků

nesmí docházet ke změně spektra cukrů



---

---

---

---

---

---

---

---

## Nejčastěji využívaná čířidla

Ø neutrální octan olovnatý (roztok  $PbO$  v  $CH_3COOH$ )

Ø zásaditý octan olovnatý ( $PbO$  s  $Pb(CH_3COOH)_2$ )

= směs zásaditých octanů ( $Pb(OH)OOCCH_3$   
nebo  $Pb_3(OH)_4(OOCCH_3)_2$ ) - nevhodný pro  
redukující cukry

Ø kyselina hexakiswolframofosforečná  
(fosfowolframová)  $H_3[P(W_3O_{10})_4]$

---

---

---

---

---

---

---

---

Ø kyanoželeznatan zinečnatý (Carrezovo činidlo)

$2 ZnSO_4 + K_4[Fe(CN)_6] \rightarrow Zn_2[Fe(CN)_6] + 2 K_2SO_4$   
- univerzální

Ø aktivní uhlí - může adsorbovat cukry - kvalit. analýza

Ø měnič iontů - odstraňují bázičké a kyselé interferenty

Ø hydroxid hlinitý - pro produkty bohaté na fruktózu

Ø zásaditý dusičnan olovnatý  
(adiční sloučenina  $PbO$  s  $Pb(NO_3)_2$ )  
- Herlesovo činidlo

---

---

---

---

---

---

---

---

## Důkazy cukrů

- **Obecné reakce** (kyselina jodistá s hydroxykupinami)
- **Barevné reakce** (konc. kyselina sírová @ deriváty furalu @ kondenzační produkty s 1-naftolem)
- **Chromatografické metody** (jednotlivé - TLC)

---

---

---

---

---

---

---

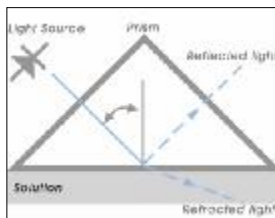
---

## 1. FYZIKÁLNÍ METODY

### A. Refraktometrie

Ø index lomu závisí na hustotě roztoku

**předpoklad:** konstantní teplota a fixní vlnová délka zdroje -  
(běžně 20°C, sodíková D čára)



---

---

---

---

---

---

---

---

### kalibrace refraktometrů:

- \* index lomu à potřeba přepočtu koncentrace z tabulek
- \* °Brix - přímo konc. roztoků čisté sacharózy (hm. %)



Abbého refraktometr

à **Důležité:**  
konstantní teplota

---

---

---

---

---

---

---

---

## B. Polarimetrie

Ø sloučeniny s chirálním centrem jako jsou cukry stáčí rovinu polarizovaného světla

à úhel otočení (rotace) závisí na koncentraci roztoku



---

---

---

---

---

---

---

---

specifická rotace:  $[\alpha]_D^{T_D} = 100 a / l \cdot c$

*T*... teplota ve °C

*D*... vlnová délka sodíkové lampy ( $\lambda = 589$ )

*a*... **pozorovaná optická rotace**

*l*... optická dráha (délka kyvety) v dm

*c*... **koncentrace** (g/100ml nebo % w/v)

Ø stanovení sacharózy v přítomnosti jiných cukrů

® dvojí polarizace (před a po inverzi)



---

---

---

---

---

---

---

---

## C. Hydrometrie

Ø měření hustot roztoků cukrů - °Brix nebo Baumé

*faktory ovlivňující odečet:*

§ teplota

§ povrchové napětí

§ přítomnost povrchových filmů

dříve densitometrické měření pyknometrem

(při 20/20 °C nebo 20/4 °C a odečet obsahu cukru z tabulek)

---

---

---

---

---

---

---

---

## D. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

### • Chromatografie v plošném uspořádání - TLC

detekce - využití redukčních schopností  
- barevné reakce derivátů 2-furaldehydu

\* *kvalitativní analýza*

- hodnoty  $R_f$
- barevné reakce

\* *(semi) kvantitativní analýza*

- "in situ" - po detekci densitometrem
- po eluci, nejčastěji spektrofotometrické metody

---

---

---

---

---

---

---

---

## KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Stanovení jednotlivých cukrů v připravených extraktech či přímý  
nástrik vzorků (nápoje)

u **stacionární fáze** - nejčastěji měniče iontů  
(anexy, katexy)

u **mobilní fáze** - voda, směs voda -  $CH_3CN$ ,

u **detektor** - refraktometrický  
elektrochemický  
spektrofotometrický  
(derivatizace)



---

---

---

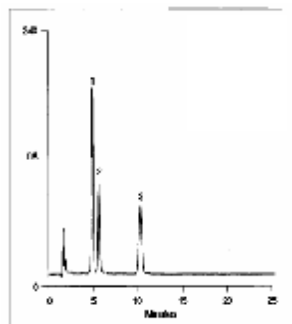
---

---

---

---

---



1 Glukosa,  
2 Fruktosa,  
3 Sacharosa

HPLC stanovení sacharidů v pomerančovém džusu  
Kolona: CarboPac PA-1 (anex, 4 x 250 mm)  
Mobilní fáze: 0,1M hydroxid sodný  
Pulsní amperometrický detektor

---

---

---

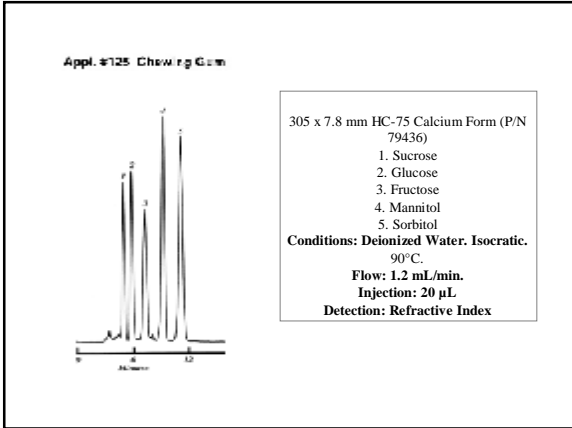
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

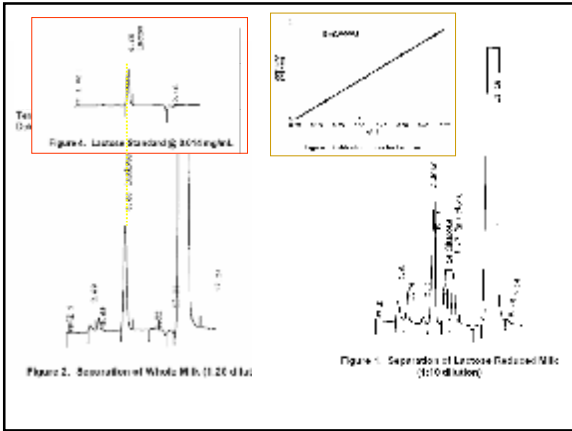
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

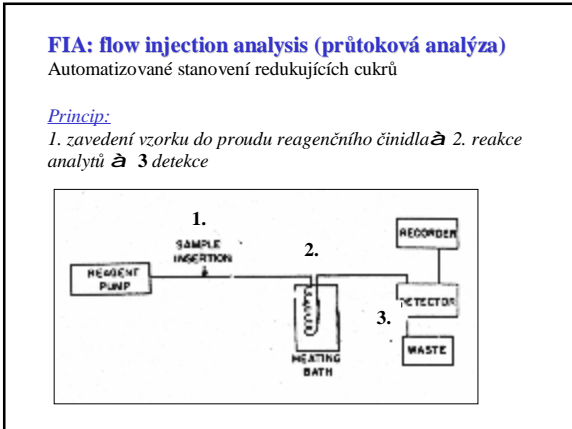
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

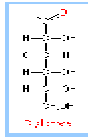
---

---

---

---

## PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE



Vysoký obsah polárních skupin, netěkavé

→ převedení cukrů na těkavé deriváty: **derivatizace**

estery - hlavně acetáty

ethery - hlavně methylethery a trimethylsilylethery cukrů, jejich alditolů nebo oximů

separace: silikonové stacionární fáze, detekce: FID

---

---

---

---

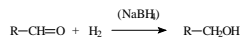
---

---

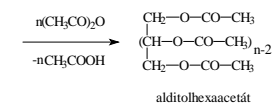
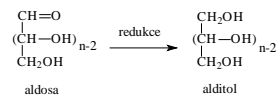
---

---

\* redukce, oximace:



\* převedení na acetáty:




---

---

---

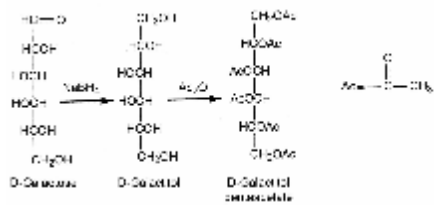
---

---

---

---

---




---

---

---

---

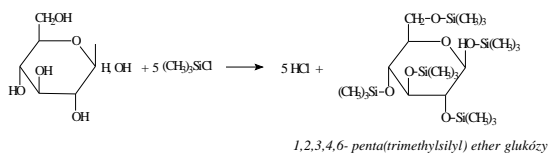
---

---

---

---

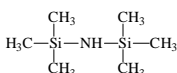
\* převedení na trimethylsilyletery



Silylační činidla - různé sloučeniny a jejich směsi, např.:



trimethylchlorosilan (TMCS)



hexamethyldisilazan (HMDS)

---

---

---

---

---

---

---

---

### Srovnání předností HPLC and GC

HPLC	GC
· vhodná i pro výše-molekulární sacharidy (polysacharidy)	· vhodná zvláště pro monosacharidy
· kratší čas analýzy	· větší citlivost detekce
· vyšší výtěžnost, lepší správnost	· je možné separovat <i>a-</i> a <i>b-</i> anomery
· jednodušší příprava vzorku - přímá analýza	· nutná derivatizace, větší pracnost

---

---

---

---

---

---

---

---

## 2. CHEMICKÉ METODY

- metody založené na **redukčních schopnostech** cukrů
- metody založené na **barevných kondenzačních reakcích** degradačních produktů cukrů

**G** destruktivní časově náročné postupy




---

---

---

---

---

---

---

---



## Stanovení redukujících cukrů

### 1. Metody založené na nestechiometrických reakcích

Ø reakce se solemi kovů - hlavně  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí a cukr redukuje alkalický roztok  $\text{Cu}^{2+}$  soli na  $\text{Cu}_2\text{O}$

*množství nezreagované  $\text{Cu}^{2+}$  soli nebo množství vyloučeného  $\text{Cu}_2\text{O}$  je závislé na množství přítomného redukujícího cukru*

---

---

---

---

---

---

---

---

redukující cukr +  $\text{Cu}^{2+}$  ®  $\text{Cu}_2\text{O}$  + oxidované degradační produkty cukru

alkalický roztok měďnaté soli:

Fehlingův (Soxhletův) roztok

I:  $\text{CuSO}_4$ , II: vinnan sodno-draselný,  $\text{NaOH}$

Pozn. stanovení sacharózy po inverzi ( $\text{HCl}$ , záhřev)

---

---

---

---

---

---

---

---

## Složení alkalických roztoků měďnatých solí

Metoda	$\text{CuSO}_4$	vinnan Na-K	$\text{NaOH}$	citronová kyselina	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	octan Na
Laneho – Eynonova (Soxhletův roztok)	+	+	+				
Ofnerova	+	+			+	+	
Luffova – Schoorlova	+			+	+		
Potteratova – Eschman	+				+		
Rotscheho	+					+	+
Somogyiho	+	+	+		+		

---

---

---

---

---

---

---

---

### 1.1 Metody založené na stanovení oxidu měďnatého

#### • VÁŽKOVÉ METODY

Přímé vážkové stanovení  $\text{Cu}_2\text{O}$ , případně stanovení obsahu Cu po redukcí

- v parách methanolu
- elektrolyticky po oxidaci  $\text{HNO}_3$  na  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

---

---

---

---

---

---

---

---

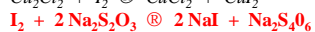
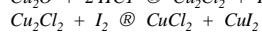
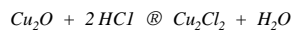
#### • TITRAČNÍ METODY

##### Ø Přímé stanovení

$\text{Cu}_2\text{O}$  se rozpustí

- v  $\text{HCl}$  (Offner)
- v octové kyselině
- šťavelanu draselném (Somogyi).

$\text{Cu}^+$  se stanoví jodometricky :



---

---

---

---

---

---

---

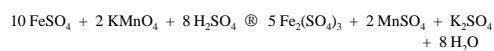
---

##### Ø Nepřímé stanovení

##### a) $\text{Cu}_2\text{O}$ se rozpustí

- v roztoku  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (Munson)
- v  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  (Quinsumbing, Thomas, Rotsh aj.)

$\text{Fe}^{2+}$  se stanoví manganometricky



---

---

---

---

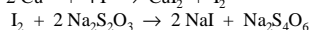
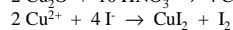
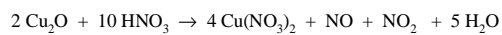
---

---

---

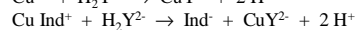
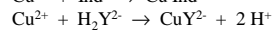
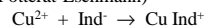
---

**b)  $\text{Cu}_2\text{O}$  se rozpustí - v  $\text{HNO}_3$ ,**



**$\text{Cu}^{2+}$  se stanoví komplexometricky**

(Potterat-Eschmann)



Ind = indikátor (murexid)

$\text{HY}^{2-}$  = komplexon II (dvojsodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny)

---

---

---

---

---

---

---

---

**1.2 Titrační stanovení založené na úplné spotřebě měďnatého činidla**

Roztok měďnaté soli se titruje cukerným roztokem do odbarvení (Soxhlet);

- Případně za přítomnosti methylenové modři jako indikátoru (LANE-EYNON)

---

---

---

---

---

---

---

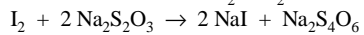
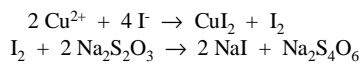
---

**1.3 Metody založené na stanovení nespotřebovaných měďnatých iontů**

*Často používaná*

**• Přebytek  $\text{Cu}^{2+}$  se stanoví jodometricky**

(Luff - Schoorl)



---

---

---

---

---

---

---

---

**Stanovení redukujících cukrů metodou podle Luffa-Schoorla**

Spotřeba 0,1 N thiostranu sodného (ml)	Glukosa, fruktosa, invertní cukr (mg)	Laktosa bezvodá (mg)	Maltosa bezvodá (mg)
1	2,4	3,6	3,9
2	4,8	7,0	7,8
3	7,2	11,0	11,7
4	9,7	14,7	15,6
5	12,2	18,4	19,6
6	14,7	22,1	23,5
7	17,2	25,8	27,5
8	19,8	29,5	31,5
9	22,4	33,2	35,5
10	25,0	37,0	39,5
11	27,6	40,8	43,5
12	30,3	44,6	47,5
13	33,0	48,4	51,6
14	35,7	52,2	55,7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

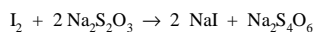
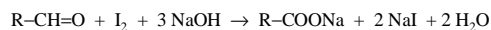
---

**2. Metody založené na stechiometrických reakcích**

Aldosy se oxidují na příslušné aldonové kyseliny

$R-CH=O + \text{oxidační činidlo} \rightarrow R-COOH + \text{redukované činidlo}$

- **Jodometrické stanovení**




---

---

---

---

---

---

---

---

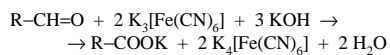
---

---

---

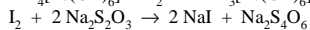
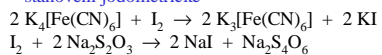
---

- **Stanovení oxidací hexakvanoželezitanem draselným**

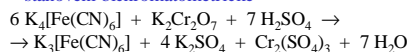


☞ následuje

\* stanovení jodometrické



\* stanovení bichromatometrické




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

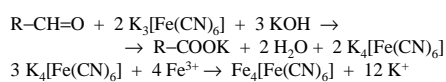
---

---

### 3. Stanovení spektrofotometrické

#### 1. OXIDACE ALDÓZY:

\* **hexakynoželezitanem**, vzniklý hexakynoželeznatan reaguje s  $\text{Fe}^{3+}$  na **berlínskou modř**



\* **tetrazoliovými solemi** → vzniká barevný **formazan**

---

---

---

---

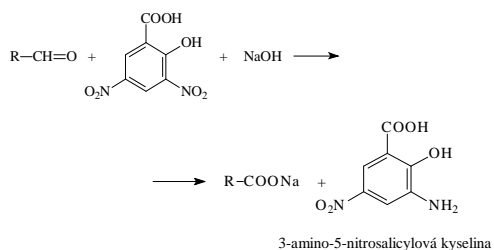
---

---

---

---

\* **3,5-dinitrosalicylovou kyselinou** → vzniká barevná **3-amino-5-nitrosalicylová kyselina**



---

---

---

---

---

---

---

---

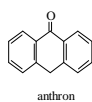
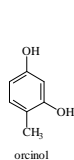
#### 2. DEGRADACE CUKRU V KYSELÉM PROSTŘEDÍ

⇒ **tvorba barevných kondenzačních produktů chromogenů s různými činidly**

chromogeny pentosy: 2-furaldehyd  
methylpentosy: 5-methyl-2-furaldehyd  
hexosy: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd

činidla

- 1-naftol
- anthron
- orcinol
- karbazol
- difenylamin
- indol aj.



---

---

---

---

---

---

---

---

Některé spektrofotometrické metody založené na kondenzačních reakcích

kyselina (%)	čínidlo	doba reakce (min)	teplota (°C)	cukr	zbarvení
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (80)	1-naftol	3	100	všechny cukry	purpurové
HCl (18)	orcinol (Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> )	45	100	pentosy >hexosy	zelené
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (67)	anthron	16	100	hexosy > pentosy	modré

---

---

---

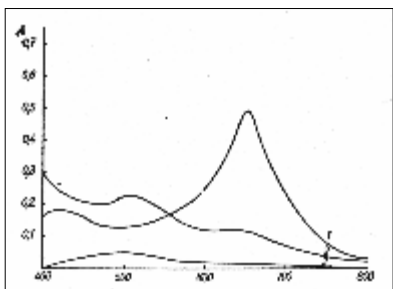
---

---

---

---

---



Absorpční spektrum ribosy, fruktosy a glukosy po reakci s orcinolem  
Křivka 1: ribosa, 2: fruktosa, 3: glukosa (1.2 µg/ml)

---

---

---

---

---

---

---

---

## BIOCHEMICKÉ METODY

dříve hlavně mikrobiologické, dnes enzymové (specifické)

### • ENZYMOVÉ METODY

kvantifikace reakčních produktů enzymové reakce -  
spektrofotometricky, elektrochem., enzymové elektrody

rozklad substrátu enzymy - stanovení produktů konvenčně  
(fyzikální či chemické metody)

---

---

---

---

---

---

---

---

Enzym č.	Název		System č.
	triviální	systematický	
I	<b>hexokinasa</b>	ATP:D-hexosa-6-fosfát transferasa	EC 2.7.1.1
II	<b>glukoso-6-fosfát-dehydrogenasa</b>	glukoso-6-fosfát:NADP oxidoreduktasa	EC 1.1.1.49
III	<b>glukosofosfát-isomerasa</b>	D-glukoso-6-fosfát ketol isomerasa	EC 5.3.1.9
IV	<b>invertasa, b-fruktosidasa, b-fruktofuranosidasa</b>	β-D-fruktofuranooid fruktohydrolasa	EC 3.2.1.26
V	<b>b-galaktosidasa</b>	β-D-galaktosid galaktohydrolasa	EC 3.2.1.23
VI	<b>galaktosodehydrogenasa</b>	D-galaktosa: NAD oxidoreduktasa	EC 1.1.1.48
VII	<b>melibiasa, a-galaktosidasa</b>	α-D-galaktosid galaktohydrolasa	EC 3.2.1.22

---

---

---

---

---

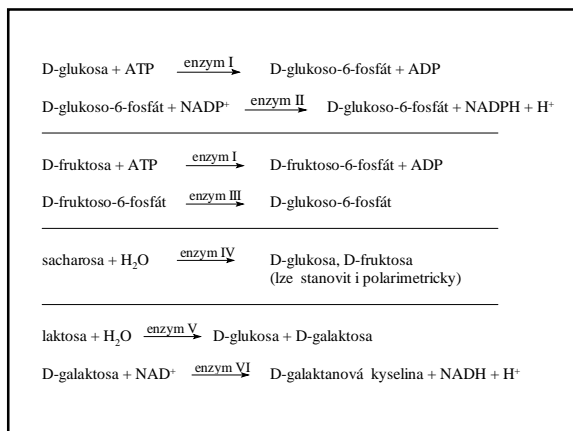
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

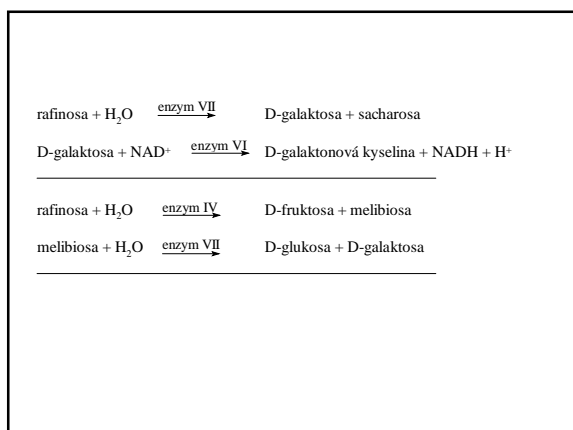
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

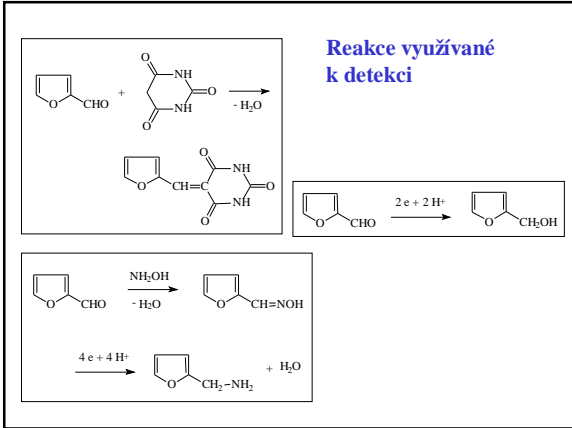
---

---

---

---

---




---



---



---



---



---



---