

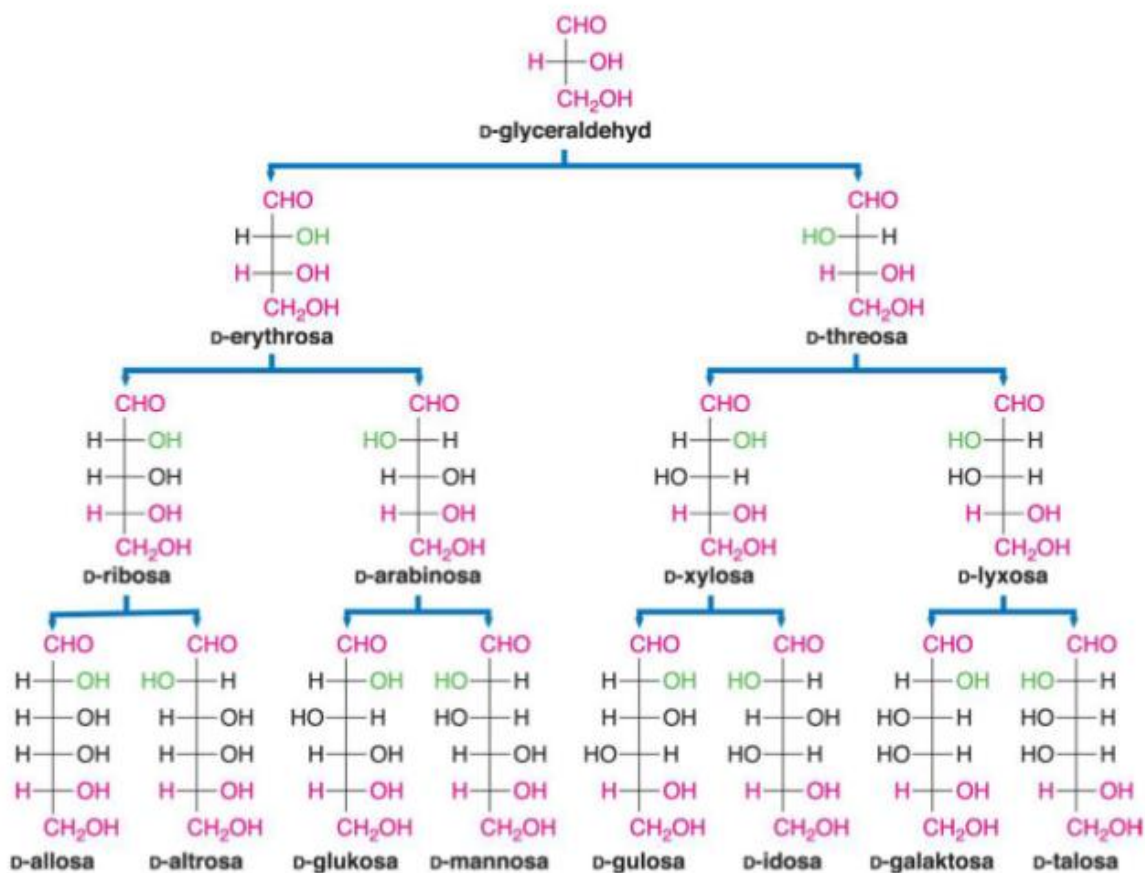
SACHARIDY

1 Teoretický úvod

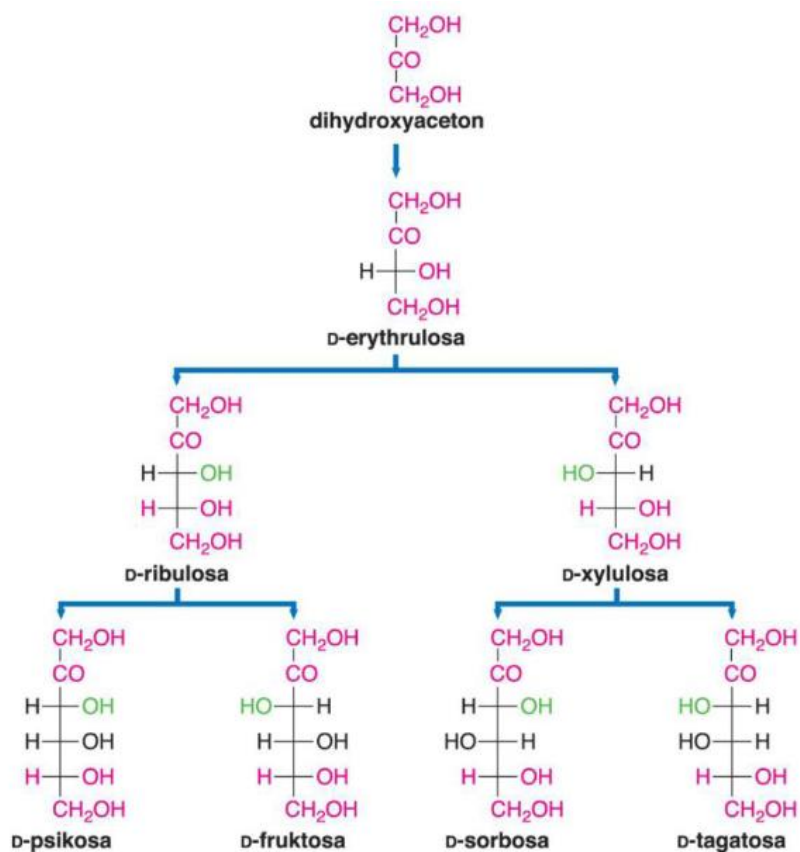
1.1 Obecná charakteristika sacharidů

Sacharidy jsou přírodní organické látky, které vznikají během fotosyntézy. Ve své molekule obsahují atomy uhlíku, vodíku a kyslíku v poměru 1:2:1. Z chemického hlediska jsou sacharidy definovány jako polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Spolu se svými deriváty se vyskytují ve všech rostlinných i živočišných buňkách, kde mají různé funkce. Jsou důležitým a lehce dostupným zdrojem energie (uvolnění při jejich oxidaci), jsou stavebními složkami buněk a tkání (celulosa, chitin), tvoří zásobní látky (glykogen, škrob) a jsou složkami nukleotidů a jiných účinných látek (koenzymy, antibiotika).

Monosacharidy patří mezi nejjednodušší sacharidy. Jde o aldehydy nebo ketony, které obsahují dvě a více hydroxylových skupin. Empirický vzorec většiny monosacharidů je $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Podle funkční skupiny je dělíme na aldosity (funkční skupina CHO) a ketosity (funkční skupina C=O). Nejjednodušší sacharidy mají v molekule tři uhlíky (triosy, $n = 3$), jsou to glyceraldehyd (aldosa) a dihydroxyaceton (ketosa). Sacharidy se čtyřmi, pěti, šesti a sedmi uhlíkovými atomy se nazývají tetrosy, pentosy, hexosy a heptosy (Obr. 1a, 1b).

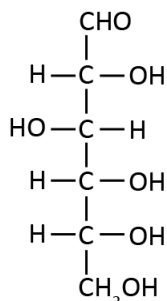


Obr. 1a Přehled D-aldos.



Obr. 1b Přehled D-ketos.

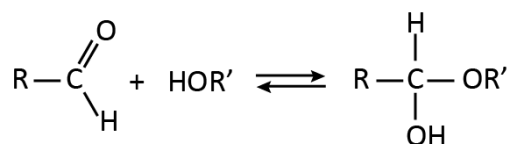
Uhlíkové atomy ve vzorcích monosacharidů se čísují tak, aby karbonylová skupina měla co nejnižší číslo. Chiralita skupin CHOH způsobuje izomerii monosacharidů určitého typu. Počet možných stereoizomerů (n) je dán počtem center chiralit (x); $n = 2^x$, takže lze např. odvodit 8 izomerních aldohexos ($x = 4$), z nichž každá tvoří dva enantiomery. Základem pro rozlišení enantiomerů je systém D/L; rozhodující je shoda konformace na uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem s konformací jednoho z obou enantiomerů aldotriose, glycerinaldehydu. Podle této představy lze strukturu monosacharidů vyznačit lineárními, tzv. Fischerovými vzorci (Obr. 2).



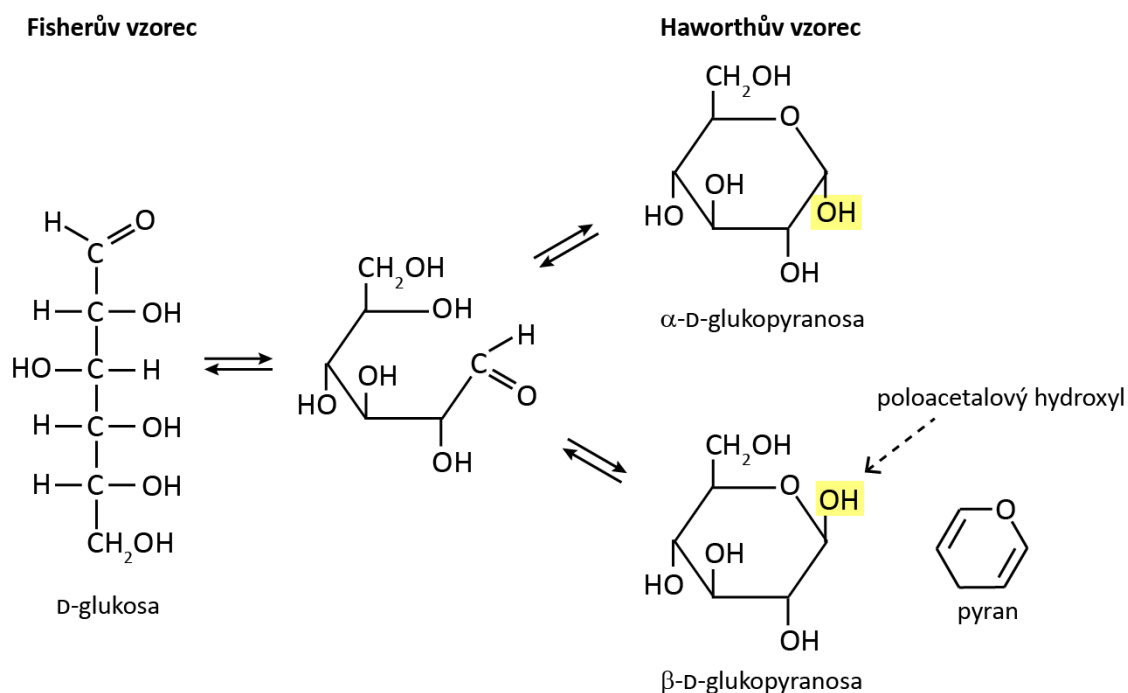
Obr. 2 Glukosa zapsaná ve Fischerově projekci.

Lineární Fischerovy vzorce nevystihují přesně strukturu a vlastnosti monosacharidů. Například glukosa nedává všechny reakce aldehydů nebo je poskytuje až po delší době. Ve vodném prostředí odolává vzdušnému kyslíku. Vysvětlení spočívá v tom, že molekuly

sacharidů nejsou lineární, ale cyklické. Všeobecně, aldehyd může reagovat s alkoholem za vzniku hemiacetalu (poloacetalu) (Obr. 3). Uhlík C-1 aldehydové skupiny v otevřené formě glukosy reaguje s C-5 hydroxylovou skupinou za vzniku intramolekulového hemiacetalu. Výsledný šestičlenný kruh se nazývá pyranosa, protože je podobný pyranu (Obr. 4).

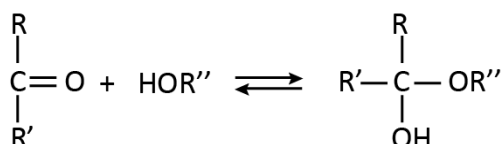


Obr. 3 Reakce aldehydu s alkoholem za vzniku hemiacetalu.

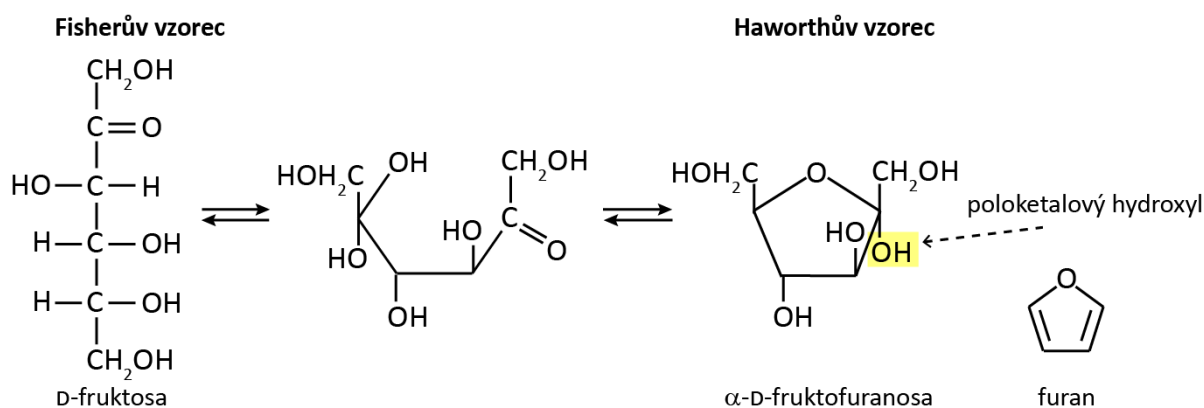


Obr. 4 Vytvoření pyranosy.

Podobně keton může reagovat s alkoholem za vzniku hemiketalu (poloketalu) (Obr. 5). Uhlík C-2 keto skupiny v otevřené formě fruktosy může reagovat s C-5 hydroxylovou skupinou za vzniku intramolekulového hemiketalu. Tento pětičlenný kruh se nazývá furanosa, protože je podobný furanu (Obr. 6).

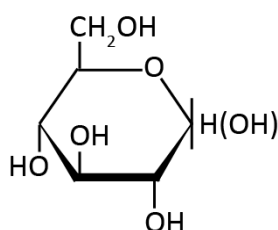


Obr. 5 Reakce ketonu s alkoholem za vzniku hemiketalu

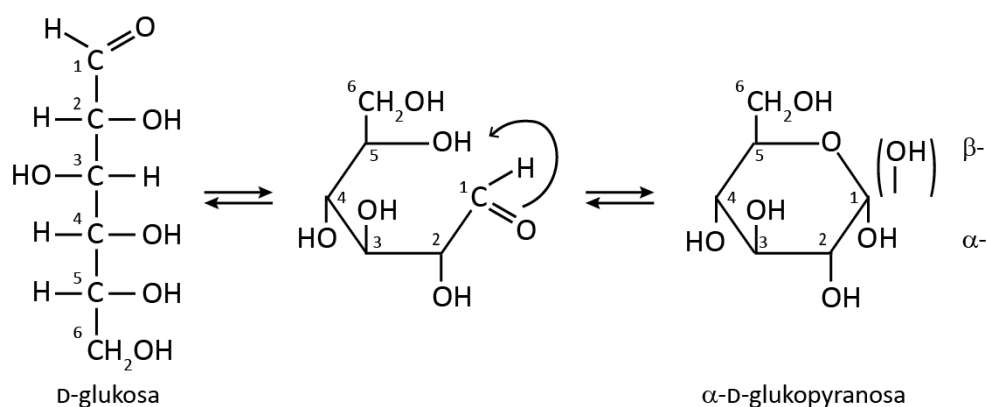


Obr. 6 Vytvoření furanosy.

Cyklické formy monosacharidů se zobrazují Haworthovými projekčními vzorci (Obr. 7). Polohy $-\text{OH}$ skupin určíme tak, že ty které směřují na lineárním řetězci vpravo, ty zakreslíme v cyklickém vzorci směrem dolů. Skupiny, které na lineárním řetězci směřují vlevo, zakreslíme směrem nahoru. Podle polohy na prvním uhlíku rozlišujeme tzv. konfigurační izomery (anomery) jsou to formy α a β . Určují se podle polohy $-\text{OH}$ skupiny nebo jiného substituentu na prvním uhlíku (Obr. 8). Označení α znamená, že hemiacetalová hydroxylová skupina na C-1 je pod rovinou kruhu; označení β znamená, že hemiacetalová hydroxylová skupina na C-1 je nad rovinou kruhu.



Obr. 7 Glukosa zapsaná podle Haworthovy projekce.

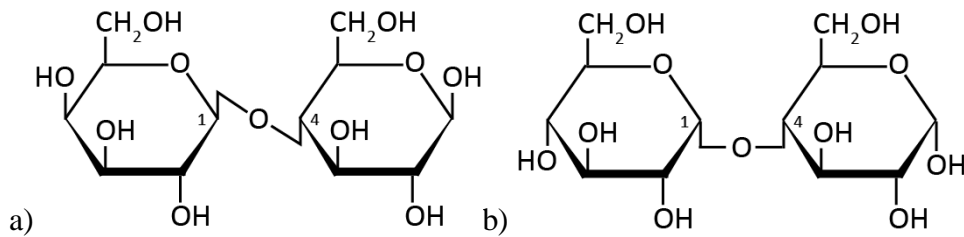


Obr. 8 Anomery – stanovení konformace α nebo β .

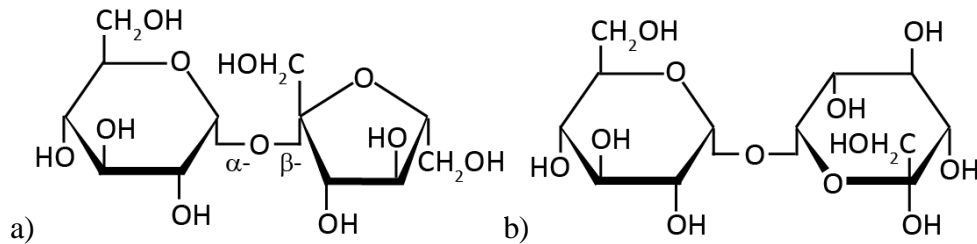
Monosacharidy jsou bílé krystalické látky rozpustné ve vodě, téměř nerozpustné v organických rozpouštědlech. Při zahřívání tají, při vyšších teplotách hnědnou (karamelizují). Jejich roztoky mají sladkou chuť, obvykle stácejí rovinu polarizovaného světla (jsou opticky aktivní). Ve volné formě se monosacharidy v přírodě vyskytují jen zřídka. Výjimku tvoří glukosa a některé ketosy, ostatní monosacharidy nejčastěji tvoří složky oligosacharidů, polysacharidů, glykosidů, nukleotidů, glykolipidů nebo glykoproteinů. Metabolickou formou monosacharidů jsou jejich fosforečné estery.

Aldehydovou a ketonovou formu trios představují produkty dehydrogenace 1,2,3-propantriolu (glycerolu), glyceraldehyd a dihydroxyaceton. Fosforečné estery obou těchto cukrů mají velký význam v metabolismu sacharidů. Z tetros je významná aldosa D-erythrosa, ve formě fosforečného esteru důležitý meziprodukt při syntéze i odbourávání sacharidů. Větší rozšíření mají pentosy, zejména D-ribosa, D-xylosa, D-arabiosa a L-arabiosa. D-ribosa je stavební složka nukleotidů, ostatní jsou základní složky polysacharidů, D-xylosa xylanů, které jsou součástí zdřevnatělých rostlinných buněk, L-arabiosa arabanů, které se vyskytují v rostlinných gumách a slizích. D-arabiosa tvoří složku některých heteroglykosidů. D-ribosa spolu s ketopentosami D-ribulosou a D-xylulosou se také ve formě fosforečných esterů uplatňuje v metabolismu sacharidů. Hexosy jsou v přírodě nejrozšířenější monosacharidy. Z aldohexos jsou nejvýznamnější D-glukosa, D-mannosa a D-galaktosa, z ketohexos D-fruktosa. D-glukosa vzniká jako produkt redukce oxidu uhličitého při fotosyntéze a je výchozí látkou pro biosyntézu nejen ostatních sacharidů, ale i ostatních organických látek v biosféře. Ve volné formě představuje transportní formu sacharidů u rostlin i živočichů. Vázaná glukosa je obsažena v disacharidech, zejména sacharose, laktose a maltose, polysacharidech a heteroglykosidech. V metabolickém procesu se uplatňují fosforečné estery glukosy a jejich derivátů. Epimer glukosy, D-mannosa, je součástí rostlinných polysacharidů mannanů a živočišných glykoproteinů. D-galaktosa je složkou disacharidu laktosy, významného pro výživu mláďat savců, některých strukturálních polysacharidů a glykolipidů, důležitých zejména pro funkci nervové tkáně. Volná D-fruktosa se vyskytuje jako β -D-fruktopyranosa v medu a ovocných šťávách. Vázaná D-fruktosa má strukturu β -D-fruktofuranosy, je složkou disacharidu sacharosy, polysacharidu inulinu a ve formě fosforečných esterů významným meziproduktem metabolických procesů.

Disacharidy jsou složeny ze dvou stejných nebo různých monosacharidů spojených *O*-glykosidovou vazbou. Podle typu vazby rozlišujeme disacharidy redukující, kdy do vazby je zapojen pouze jeden poloacetalový hydroxyl, zatímco druhý je volný. Příkladem takového disacharidu je laktosa (Obr. 9a) nebo maltosa (Obr. 9b). Ta může mít dva anomery, podle konformace volného poloacetalového hydroxyly. Druhou skupinou jsou sacharidy neredukující, kde jsou oba poloacetalové hydroxyly zapojeny do glykosidové vazby. Příkladem je dobře známá sacharosa (Obr. 10a) a trehalosa (Obr. 10b). Zde anomerie nepřichází v úvahu, neboť žádný poloacetalový hydroxyl není volný. Disacharidy jsou složkou potravy, nejsou však obecně vstřebávány ze střeva, a musí být proto v jeho stěně hydrolyticky štěpeny na své monosacharidové složky.



Obr. 9 a) Laktosa, b) maltosa.



Obr. 10 a) Sacharosa, b) trehalosa.

Polysacharidy patří mezi nejrozšířenější biopolymery v přírodě. Jsou složeny z velkého počtu monosacharidů nebo jejich derivátů, spojených glykosidovými vazbami do lineárních nebo rozvětvených řetězců. Tvoří-li polymer jen jeden druh monosacharidu, jde o homoglykany, účastní-li se stavby molekuly více monosacharidů, jde o heteroglykany. Stavební jednotku polysacharidu netvoří jednotlivé monosacharidy, ale oligosacharidy, charakterizované svými složkami a vazbou mezi nimi. Strukturální jednotkou amylosy je např. disacharid maltosa, celulosy cellobiosa atd. V závislosti na své struktuře mají různé polysacharidy různé vlastnosti: některé se rozpouštějí ve vodě (amylosa), jiné bobtnají a tvoří viskózní roztoky (pektiny), některé jsou ve vodě zcela nerozpustné (celulosa). Mají také různý fyziologický význam: v organismu jsou součástí stavebních a podpůrných struktur (celulosa, chitin), zásobními látkami (škrob, glykogen, inulin) a plní funkci fyziologicky aktivních látek (heparin, polysacharidy krevních skupin).

1.2 Sacharidy v potravě

Monosacharidy a disacharidy představují velmi důležitý zdroj energie nepostradatelný zejména pro buňky mozku a erytrocyty. Polysacharidy slouží jako zásobárna energie – u živočichů ve formě glykogenu. Nejdůležitějšími monosacharidy v potravě jsou **glukosa** (základní a nejrychlejší zdroj energie v lidském organismu, zdrojem glukosy jsou např. tabletky hroznového cukru), **fruktosa** (jednoduchý cukr přítomný v ovoci, sladkostech, nealkoholických nápojích a pečivu) a **galaktosa** (v mateřském mléce). Z disacharidů to jsou **sacharosa** (α -Glc (1→2) β -Fru) používaná jako sladidlo (bílý a hnědý cukr), **laktosa** (β -Gal (1→4) β -Glc) přítomná v mléce a **maltosa** (α -Glc (1→4) β -Glc) přítomná ve sladu.

S metabolismem sacharidů přijímaných v potravě se pojí poměrně častá onemocnění – **diabetes mellitus a laktosová intolerance**.

Diabetes mellitus je souhrnný název pro skupinu závažných chronických onemocnění, která se projevují poruchou metabolismu sacharidů. Rozlišují se dva základní typy: diabetes I. typu a diabetes II. typu, které vznikají důsledkem absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu. U **diabetu I. typu** jsou ničeny buňky slinivky břišní, které produkují hormon inzulín, vlastním imunitním systémem (autoimunitní onemocnění), **diabetes II. typu** je způsoben sníženou citlivostí tkání vlastního těla k inzulínu. Výsledkem nedostatku inzulínu je narušení transportu glukózy z krve do buňky buněčnou membránou, což vede k hyperglykémii a nedostatku glukózy intracelulárně. Stimuluje se glukoneogeneze a glykogenolýza, dále se zvyšuje lipolytické štěpení triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol v adipocytech.

Náhradní sladidla obsahují mnohem méně kalorií než klasický cukr, přičemž každé sladidlo má svoji vlastní „sladkost“ - dle použité látky může být sladidlo 10× až 300 000× sladší než cukr. Tato sladidla mohou být vyrobena synteticky nebo se může jednat o přírodní látky. Syntetická sladidla jsou většinou označována jako umělá. Přirozená náhradní sladidla, jako sorbitol a xylitol, se vyskytují např. v bobulích, ovoci a houbách, avšak mnohdy se vyrábějí synteticky. Umělá náhradní sladidla zahrnují sacharin, aspartam a cyklamát. **Aspartam** je dipeptid složený z kyseliny L-asparagové a L-fenylalaninu. Je asi 200x sladší než sacharosa a na trhu se objevuje pod různými obchodními značkami.

Laktosová intolerance je neschopnost organismu strávit mléčný cukr – laktosu. Je způsobena částečnou nebo úplnou neschopností organismu produkovat laktasu, tedy enzym rozkládající ve střevech laktosu na glukosu a galaktosu, které se dále vstřebávají do krevního oběhu. Pokud je laktasy nedostatek, laktosa se ve střevech nestráví a její přebytkem se pak živí přirozené střevní bakterie, které při jejím zpracování produkují plyny (CO₂ či H₂) a další látky, které dráždí tlusté střevo a tím způsobují nadýmání, střevní koliky, průjemy a zvracení. Intolerance laktosy je často zaměňována s alergií na mléko. Hlavní rozdíl mezi těmito metabolickými poruchami je v příčinách onemocnění. Zatímco laktosová intolerance je způsobena nedostatkem laktasy, u alergie na mléko se jedná o imunitní odezvu organismu na mléčné bílkoviny.

Řešením laktosové intolerance je buď úprava jídelníčku s vyřazením mléčných výrobků, užívání potravinových doplňků s obsahem laktasy, nebo konzumací bezlaktosových výrobků včetně rostlinných mlék.

2 Vybavení

2.1 Materiál

Kvalitativní a kvantitativní analýza sacharidů ve sladících přípravcích

- roztoky sladících přípravků – označené jako neznámý vzorek 1-4 (NV1 - NV4)
 - krystalový cukr (2 g/200 ml)
 - hroznový cukr (1 tbl./200 ml; 1 tableta váží 2,23 g a obsahuje 90 % cukru)
 - aspartam (8 tbl./ 200 ml; s obsahem laktosy 70 mg/tbl.)
 - negativní kontrola (voda)

2.2 Přístroje

- Vaříč, vodní lázeň, spektrofotometr, vortex.

2.3 Roztoky

Kvalitativní a kvantitativní analýza sacharidů ve sladících přípravcích

Standardy: 2% sacharosa, 2% glukosa, 0,5% kyselina asparagová, 0,5% fenylalanin

Fehlingovo činidlo I: 40 g síranu měďnatého pentahydrátu se rozpustí v 500 ml vody a doplní vodou do 1 l.

Fehlingovo činidlo II: 229,24 g vinanu draselnosodného a 150 g hydroxidu sodného se rozpustí v 750 ml vody a poté se doplní vodou do 1 l.

Ninhydrinové činidlo: 0,2 g ninhydrinu se rozpustí v ethanolu a doplní na objem 100 ml

Somogyi-Nelsonovo činidlo I: 25 g uhličitanu sodného, 20 g vinanu sodnodraselného, 20 g hydrogenuhličitanu sodného a 200 g síranu sodného se rozpustí v 800 ml vody, a poté se doplní vodou do 1 l. Roztok se uchovává při pokojové teplotě.

Somogyi-Nelsonovo činidlo II: 15 g síranu měďnatého se rozpustí v 80 ml vody, doplní do 100 ml a poté se okyselí 1 až 2 kapkami kyseliny sírové.

Somogyi-Nelsonovo činidlo III: 25 g molybdenanu amonného se rozpustí ve 450 ml vody. Přidá se 21 ml koncentrované kyseliny sírové a promíchá se. Poté se přidá 25 ml roztoku arzeničnanu sodného. Roztok se inkubuje 48 h při 37 °C.

0,33 M NaHCO₃: 2,77 g hydrogenuhličitanu sodného se rozpustí v 80 ml vody a poté se doplní vodou do 100 ml.

9% H₂SO₄: Smíchá se 9 ml kyseliny sírové s 87 ml vody.

3 Postup

3.1 Kvalitativní a kvantitativní analýza sacharidů ve sladících přípravcích

Cílem úlohy je rozlišit od sebe čtyři neznámé vzorky sacharidů (NV1 - NV4) pomocí kvantitativní a kvalitativní analýzy. Kvantitativní analýza umožňuje stanovení obsahu celkových sacharidů v každém ze vzorků. Pomocí kvantitativní analýzy, lze pak na základě obecných vlastností sacharidů rozlišit, zda se jedná o vzorek s obsahem krystalového cukru, hroznového cukru či umělého sladidla aspartamu.

Neznámé vzorky:

- krystalový cukr (2 g/200 ml)
- hroznový cukr (1 tbl./200 ml; 1 tableta váží 2,23 g a obsahuje 90 % cukru)
- aspartam (8 tbl./ 200 ml; s obsahem laktosy 70 mg/tbl.)
- negativní kontrola (voda)

3.1.1 Stanovení celkové koncentrace sacharidů (redukujících + neredukujících)

Redukující sacharidy lze stanovit metodou podle Somogyi a Nelsona. Zahříváním roztoku sacharidu s Fehlingovým činidlem dochází k redukci měďnatého komplexu na oxid měďný. Aby se zabránilo zpětné oxidaci Cu^+ , potlačí se rozpustnost kyslíku v roztoku přebytkem síranu sodného. Pomocí jednomocné mědi se potom redukuje roztok kyseliny arsenomolybdenové za vzniku modrého zbarvení, které se stanoví spektrofotometricky. Po hydrolyze kyselinou sírovou se stanoví celkové sacharidy.

- Pro přípravu kalibrační křivky pro obsah celkových sacharidů si nejprve naředte zásobní roztok sacharosy (4 mg/ml) tak, aby koncentrace výsledného standardu sacharosy činila 0,2 mg/ml.
- Do 100 ml odměrné baňky odměřte vypočítaný objem zásobního roztoku sacharosy a doplňte po rysku destilovanou vodou.
- Připravte si sadu 6 zkumavek a do označených zkumavek pipetujte roztoky standardu sacharosy (viz Tab. 1).
- Zkumavka s číslem 0 představuje blank (slepý vzorek), do které napipetujte 1 ml deionizované vody (nulová koncentrace sacharosy). S blankem pracujte stejně jako s ostatními vzorky.
- **Špičky pro neznámé vzorky je nutné před prvním použitím vždy důkladně vypláchnout destilovanou vodou!!**
- Ke standardům i vzorkům následně přidejte 0,12 ml 9% H_2SO_4 , promíchejte na vortexu a umístěte do vodní lázně vytemperované na 85 °C po dobu 30 minut.
- Po proběhnutí kyselé hydrolyzy sacharidů vzorky vytáhněte z vodní lázně, nechejte zchladnout a přidejte po 0,9 ml 0,33 M NaHCO_3 a 2 ml Somogyi-Nelsonova činidla I + II.
- Činidlo v požadovaném objemu připravte těsně před použitím smícháním roztoků Somogyi-Nelson I a Somogyi-Nelson II v poměru 4:1, uvedený poměr činidel je nutné přesně dodržet. Celkový objem činidla potřebný pro reakce je nutné si spočítat předem, podle množství standardů a vzorků.
- Vzorky důkladně promíchejte na vortexu a zkumavky dejte povařit po dobu 25 min.
- **Pro další práci je nutné pracovat v rukavicích a s ochrannými brýlemi!!!**
- Po inkubaci nechejte zkumavky se standardy a vzorky vychladnout, přidejte 2 ml Somogyi-Nelsonova činidla III, doplňte na výsledný objem 10 ml deionizovanou vodou.
- Promíchejte opakovaným převrácením zkumavky – hrdlo zkumavky uzavřete prstem – je nutné mít ochranné rukavice! **Promíchávání zkumavek provádějte opatrně, nad dřezem a s ochrannými brýlemi, ve zkumavkách se tvoří přetlak a činidlo může vyprsknout ven ze zkumavky.**
- Po promíchání vzorků změřte jejich absorbanci na spektrofotometru při 540 nm proti blanku (nulová koncentrace sacharosy).
- Pro měření použijte skleněné kyvety, v případě tvorby bublin je nutné pro jejich odstranění kyvetou jemně klepnout o desku stolu.
- Pokud hodnoty absorbance neznámých vzorků dosahují vyšších hodnot než 1, je nutné vzorky zředit.
- Průběh stanovení celkových sacharidů schematicky ilustruje tabulka 1.

Tab. 1: Schéma průběhu reakce pro stanovení obsahu celkových sacharidů

	příprava kalibračních standardů a vzorků						
	0	1	2	3	4	5	vzorek
Standard sacharosy (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	-
Vzorek (ml)	-	-	-	-	-	-	0,05
Destilovaná voda (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	-	0,95
	schéma pracovního postupu						
9% kyselina sírová	0,12 ml						
	Promíchejte, 30 minut hydrolyzujte při 85 °C						
0,33 M NaHCO ₃	0,9 ml						
SMG 1 + SMG 2 (4:1)	2 ml						
	Promíchejte, 25 minut povařte a nechte vychladnout						
SMG 3	2 ml						
	Promíchejte, doplňte objem do 10 ml a změřte absorbanci při 540 nm						

3.1.2 Kvalitativní analýza roztoků se sladícími přípravky

Kvantitativní analýza umožnila stanovení obsahu celkových sacharidů v jednotlivých vzorcích. Dané vzorky podrobte reakci s Fehlingovým činidlem pro důkaz redukujících cukrů a ninhydrinové reakci pro důkaz aminokyselin a určete, jaký typ sacharidů, případně sladidla, obsahují jednotlivé vzorky. Pro analýzu vytvořte schéma vedoucí k detekci příslušných sladících přípravků.

Fehlingova reakce

Pro reakci použijte NV 1-4, 2% glukosu a 2% sacharosu.

- Smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu s 0,5 ml Fehlingova činidla I a 0,5 ml Fehlingova činidla II, vznikne modrý roztok.
- Opatrně povařte. Tmavě modrý roztok přechází přes zelenou a žlutou na oranžovou až červenou barvu. V pozitivním případě vzniká červená sraženina Cu₂O.
- Zkumavky po reakci je pořádně umyjte pro odstranění sraženiny z jejich dna.

Ninhydrinová reakce

Oxidačně-redukční reakcí ninhydrinu (2,2-dihydroxy-1,3-indandion) s volnými amino- a imino- skupinami vznikají barevné produkty. Reakcí s primárními aminoskupinami modrofialový, který se nazývá Ruhemanova violeť ($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$). Reakcí s iminoskupinami, např. u prolinu (Pro) a jeho derivátů, žlutý ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$). V peptidech a proteinech, kde jsou aminokyseliny vázány peptidovou vazbou, reaguje pouze volná ϵ -aminoskupina lysinu (Lys). Pro zvýšení citlivosti reakce se přidává do reakční směsi částečně redukovaný ninhydrin zvaný hydrindantin, který reaguje s reakcí uvolněným amoniakem za výrazného prohloubení zbarvení.

Pro reakci použijte NV 1-4, 0,5% kyselinu asparagovou, 0,5% fenylalanin.

- K 0,5 ml roztoku vzorku přidejte 0,5 ml roztoku ninhydrinu a povařte.
- Asi po dvouminutovém varu vzniká v případě pozitivní reakce modrofialové zbarvení roztoku obsahujícího aminokyselinu.

4 Vyhodnocení

Kvalitativní a kvantitativní analýza sacharidů ve sladících přípravcích

- 1) Sestrojte kalibrační křivku pro sacharosu.
- 2) Na základě kalibrační křivky sacharosy spočítejte celkový obsah sacharidů (redukujících + neredukujících) ve vzorcích NV 1-4.
- 3) Uveďte a okomentujte výsledky Fehlingovy a ninhydrinové reakce.
- 4) Určete obsah neznámých vzorků NV 1-4 (cukr krystal - hroznový cukr – aspartam - voda) a uveďte schéma postupu, jak jste k identifikaci vzorků došli.
- 5) Porovnejte obsah sacharidů ve vzorcích stanovený z kalibrační křivky sacharosy s údaji uvedenými ve skriptech/vedoucím cvičení.