

Sacharidy

*Reakce, chromatografie, optická
otáčivost*

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Lenka Fialová



2012/2013

Obsah

OBSAH.....	2
1. ÚVOD	3
2. REAKCE SACHARIDŮ	3
2.1. Reakce založené na vzniku furfuralu a jeho derivátů	4
Molischova reakce.....	5
Bialova reakce.....	7
Selivanova reakce	8
2.2. Reakce s Schiffovým činidlem.....	10
2.3. Reakce na průkaz redukčních vlastností sacharidů.....	11
Benedictova reakce	14
Barfoedova reakce.....	15
2.4. Reakce na průkaz škrobu	16
2.5. Analýza neznámého vzorku	17
3. TENKOVRSTEVNÁ CHROMATOGRAFIE SACHARIDŮ.....	19
4. OPTICKÁ OTÁČIVOST SACHARIDŮ.....	19
4.1. Inverze sacharózy	20

1. Úvod

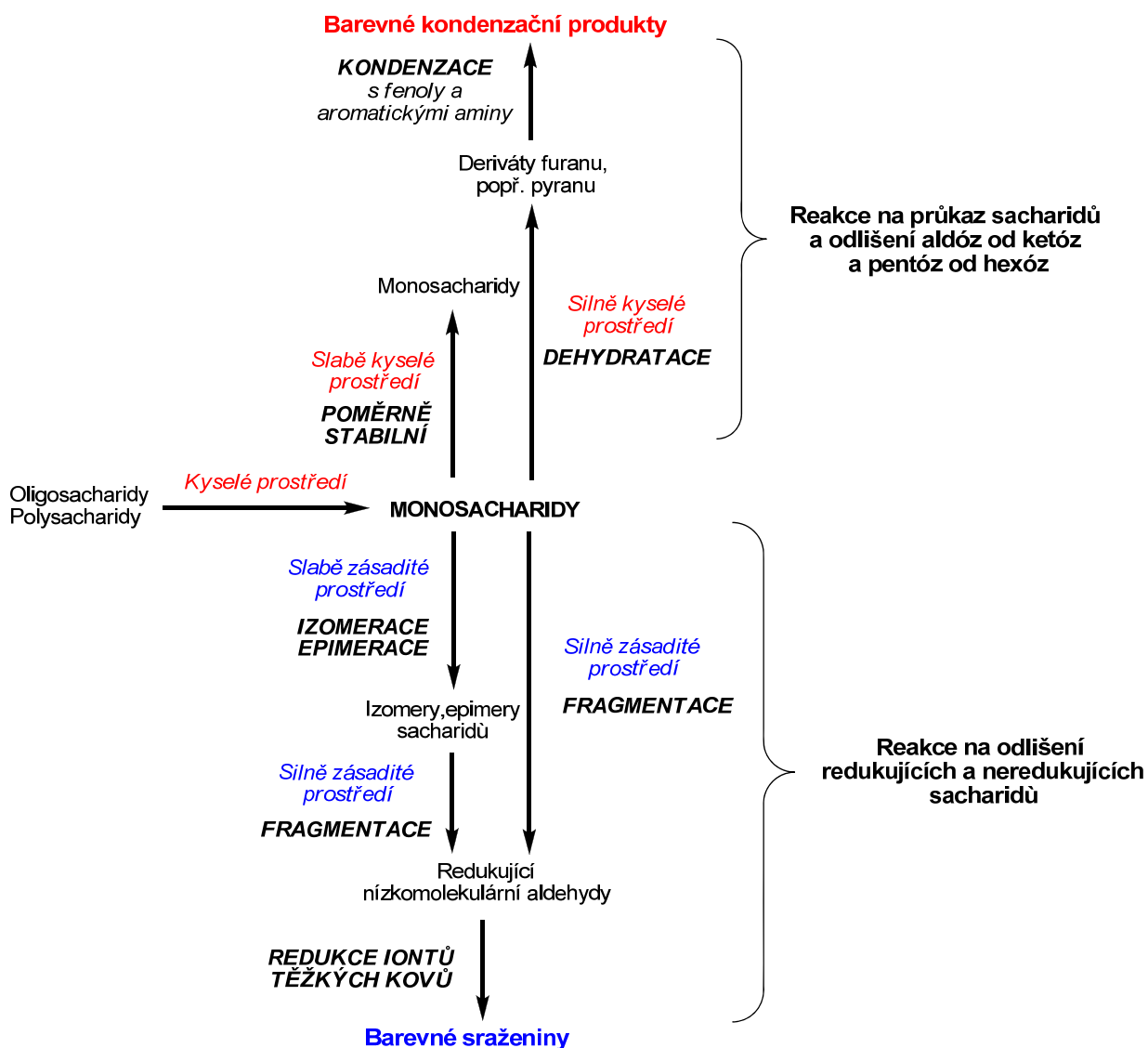
Sacharidy patří k velmi rozšířeným organickým sloučeninám, které jsou přítomné v rostlinných i živočišných tkáních. V našem organismu představují nejpohotovější zdroj energie, ale jsou i důležitou součástí buněčných membrán a extracelulární matrix.

Podle počtu sacharidových jednotek dělíme sacharidy na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. *Monosacharidy* obsahují jednu monosacharidovou jednotku, *oligosacharidy* 2 – 10 monosacharidových jednotek a *polysacharidy* jsou sestaveny z více než 10 monosacharidových jednotek.

Monosacharidy jsou *polyhydroxyaldehydy* a *polyhydroxyketony* tvořené obvykle 3 – 7 uhlíkovým nevětveným řetězcem. Podle charakteru karbonylové funkční skupiny je dělíme na *aldózy* a *ketózy*; podle počtu atomů uhlíku *na triózy, tetrózy, pentózy, hexózy, popř. další*.

2. Reakce sacharidů

Různé chemické reakce využívají chování sacharidů v kyselém nebo zásaditém prostředí i reaktivity karbonylových a hydroxylových funkčních skupin.

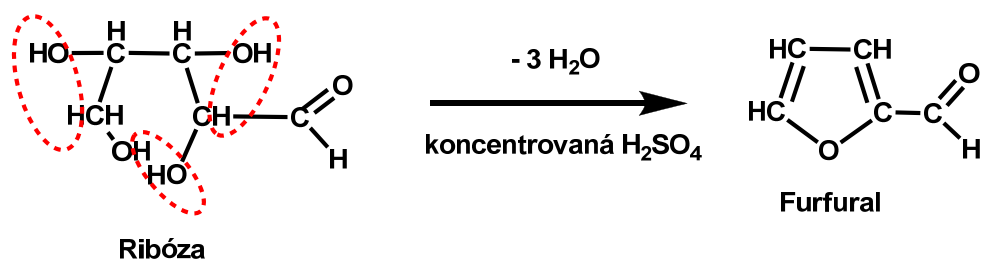


Pomocí jednoduchých chemických reakcí můžeme rozlišit sacharidy od nesacharidových látek (Molischova zkouška), pentózy od hexóz (Bialova reakce), aldohexózy od ketohexóz (Selivanova reakce), redukující sacharidy od neredukujících (Benedictova a Fehlingova reakce), redukující monosacharidy od disacharidů (Barfoedova reakce), a škrob od jiných polysacharidů (reakce s Lugolovým roztokem).

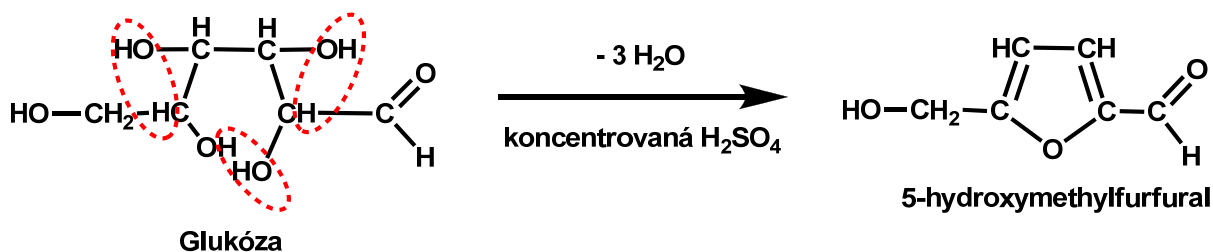
2.1. Reakce založené na vzniku furfuralu a jeho derivátů

Působením koncentrovaných anorganických kyselin (HCl, H₂SO₄) dochází k **dehydrataci monosacharidů**. Postupnou dehydratací vznikají **deriváty furanu**; odštěpení tří molekul vody se tvoří z pentóz furfural (2-furankarbaldehyd) a z hexóz 5-hydroxymethylfurfural (5-hydroxymethyl-2-furankarbaldehyd).

Vznik furfuralu z ribózy



Vznik 5-hydroxymethylfurfuralu z glukózy



Vzniklé aldehydy snadno **kondenzují s fenoly a aromatickými aminy** (např. 1-naftol, resorcinol) na barevné produkty. Reaktivita různých sacharidů je různá, a proto lze tyto reakce použít k odlišení např. ketóz od aldóz či pentóz od hexóz. Podobně mohou reagovat i oligosacharidy a polysacharidy, jejichž glykosidové vazby podléhají hydrolýze působením kyselin přítomných v činidlech.

Kondenzační reakce furfuralu a jeho derivátů jsou využívány v některých chemických reakcích sacharidů jako je Molischova, Selivanova nebo Bialova reakce.

Molischova reakce

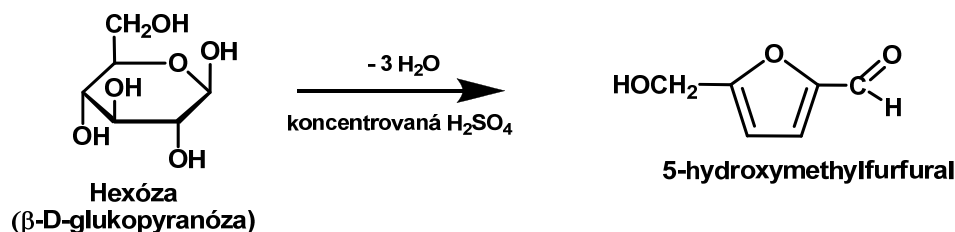
Význam

- Molischova reakce je *obecnou zkouškou na sacharidy*. Pozitivně reagují všechny monosacharidy, oligosacharidy i polysacharidy.

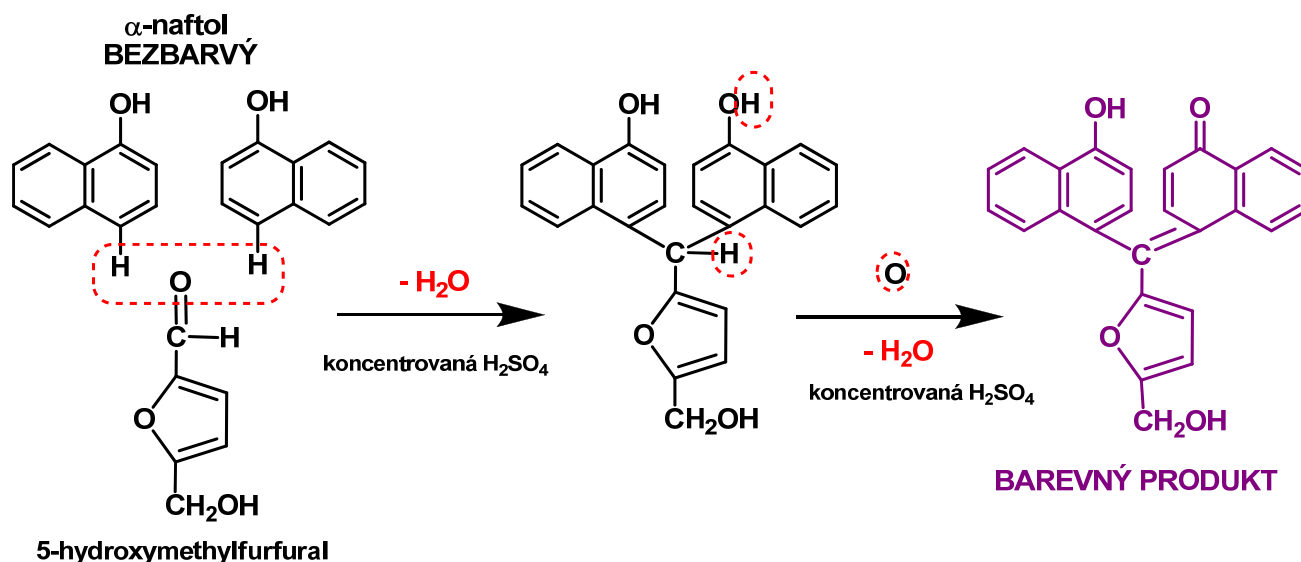
Princip

- V prvním kroku vzniká z monosacharidů obsahujících 5 nebo 6 atomů uhlíku působením *koncentrované kyseliny sírové* furfural, popř. 5-hydroxymethylfurfural.
- Ve druhém kroku furfural nebo jeho deriváty kondenzují se dvěma molekulami *α-naftolu* a vytváří se barevný produkt. V případě oligosacharidů nebo polysacharidů těmto reakcím předchází rozštěpení glykosidových vazeb kyselou hydrolyzou.

První krok - dehydratace monosacharidu koncentrovanou kyselinou sírovou



Druhý krok - kondenzace furfuralu nebo jeho derivátu s 2 molekulami α-naftolu

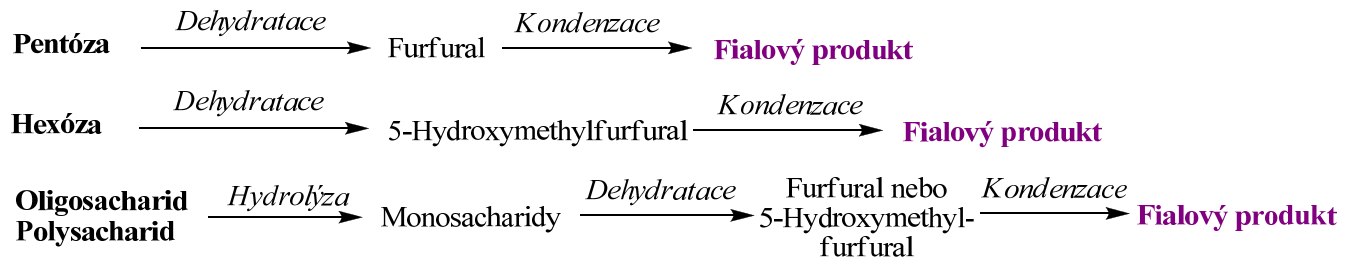


Činidlo

- Jako *Molischovo činidlo* se označuje α -naftol v 96 % etanolu.

Hodnocení

- Kondenzační produkt má fialové zbarvení.
- Reakci disacharidů a polysacharidů předchází rozštěpení glykosidových vazeb.



Bialova reakce

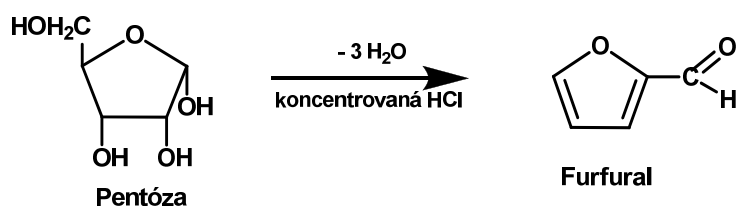
Význam

- Bialova reakce se používá *k odlišení pentóz od hexóz*.

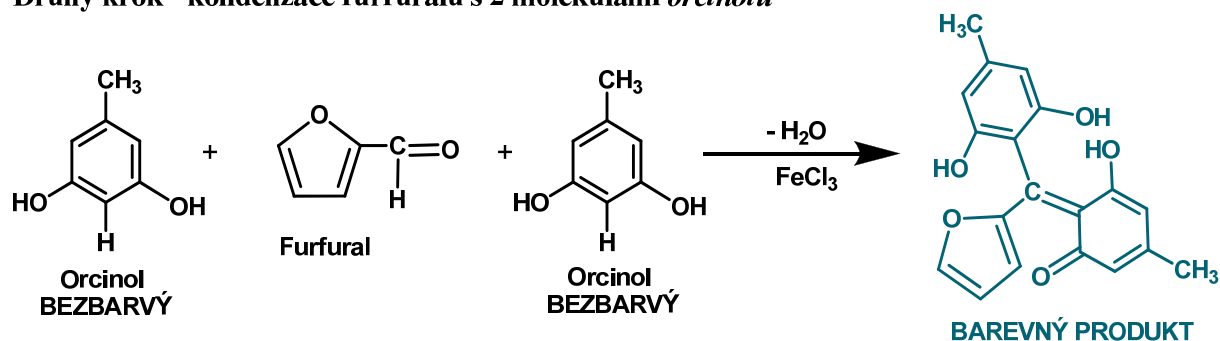
Princip

- Z pentóz (aldóz nebo ketóz) vzniká dehydratací *kyselinou chlorovodíkovou* furfural, který reaguje s *orcinolem* (5-methyl-1,3-benzendiol) a *chloridem železitým* za tvorby modrozeleně zbarveného produktu.

První krok - dehydratace pentózy koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou



Druhý krok - kondenzace furfuralu s 2 molekulami orcinolu

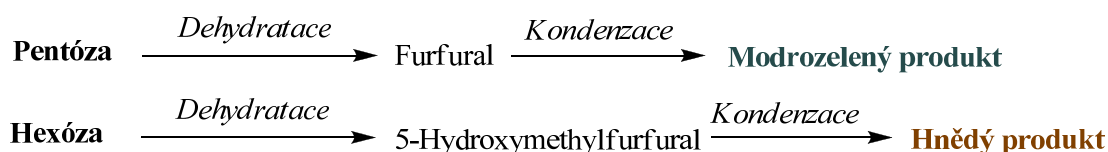


Činidlo

- V *Bialově činidle* je obsažena kyselina chlorovodíková, orcinol a chlorid železitý.

Hodnocení

- V přítomnosti **pentóz** se vyvíjí modrozelené zbarvení. Pouze modrozeleně zbarvené produkty jsou pokládány za pozitivní reakci.
- **Hexózy**, z nichž dehydratací vzniká 5-hydroxymethylfurfural, poskytují odlišné zbarvení – žluté až hnědé a reakce má pomalejší průběh. Oligo- a polysacharidy reagují podobně, ale pomaleji.



Selivanova reakce

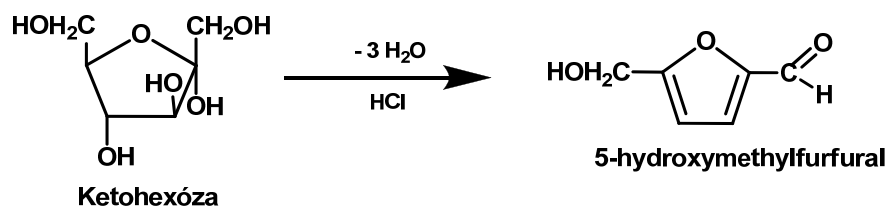
Význam

- Selivanova reakce slouží **k rozlišení aldohexóz od ketohexóz**.

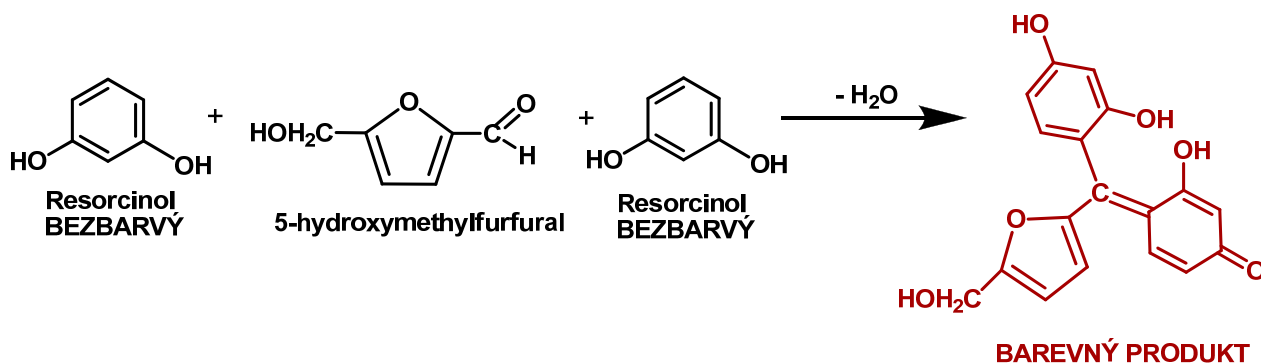
Princip

- Odlišení aldohexóz od ketohexóz je založeno na různé rychlosti jejich dehydratace. K dehydrataci sacharidu je podobně jako v Bialově zkoušce použita **kyselina chlorovodíková**.
- Dehydratační produkt 5-hydroxymethylfurfural v případě Selivanovy reakce kondenzuje **s resorcinolem**.

První krok - dehydratace ketohexózy kyselinou chlorovodíkovou



Druhý krok - Kondenzace 5-hydroxymethylfurfuralu s 2 molekulami resorcinolu

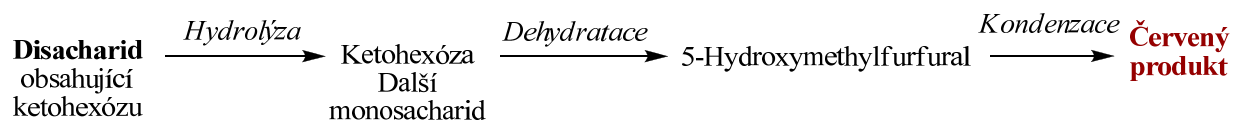
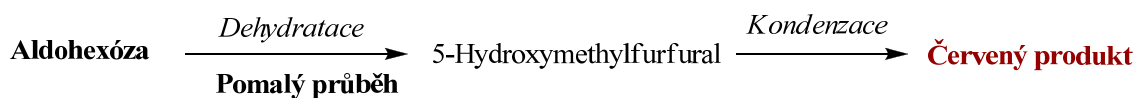
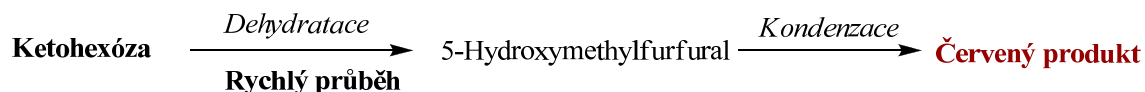


Činidlo

- Selivanovo činidlo** je roztok resorcinolu v kyselině chlorovodíkové.

Hodnocení

- **Ketózy** reagují rychle během 1 – 2 minut vývinem višňově červeného zbarvení.
- Reakce **aldóz** je pomalejší (několik minut), protože dehydratace aldóz na 5-hydroxymethylfurfural probíhá mnohem pomaleji než u ketóz.
- **Disacharidy** obsahující ketohehexózu také poskytují Selivanovu reakci. Nejdříve ale musí proběhnout hydrolýza glykosidových vazeb. Proto vývin zbarvení trvá u takového disacharidu delší dobu než u ketohehexózy, ale ve srovnání s aldohexózami je reakce rychlejší.



2.2. Reakce s Schiffovým činidlem

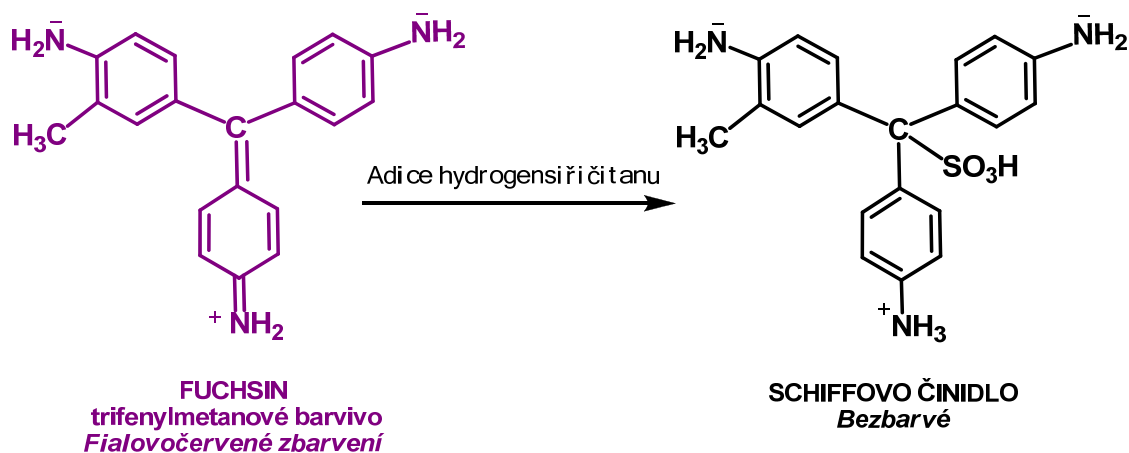
Význam

- Reakce s Schiffovým činidlem¹ se používá pro důkaz *volné aldehydové skupiny*. Reakci mohou poskytovat i některé ketony.

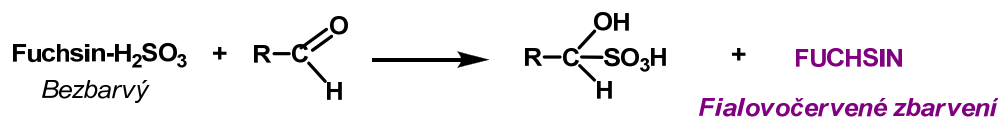
Princip a hodnocení

- Schiffovo činidlo je vodný roztok fialovočerveného barviva *fuchsinu*, ke kterému se přidává hydrogensířičitan nebo sířičitan. Hydrogensířičitan se aduje na centrální uhlíkový atom a tím se naruší chinoidní struktura, podmiňující zbarvení. Vzniká bezbarvý roztok kyseliny fuchsinsířičité.
- Po přidání *aldehydu* se z vazby na fuchsin uvolní kyselina sířičitá, která se naváže na aldehydovou skupinu pevnější vazbou. V molekule fuchsinu dojde k obnovení chinoidní struktury a roztok se opět zbarví *fialovočerveně*.
- Reaktivita *aldóz* s Schiffovým činidlem je ve srovnání s aldehydy mnohem pomalejší, protože při vzniku cyklických forem tvoří aldehydová funkční skupina hemiacetalovou vazbu. Ve vodných roztocích jsou monosacharidy přítomné převážně v cyklické formě, která neumožňuje adiční reakce hydrogensířičitanu.

Příprava činidla



Reakce s aldehydem



¹ Se jménem německého chemika Huga Schiffa (1834 – 1915) je spojen i termín Schiffova báze. Označuje produkt, který vzniká kondenzační reakcí mezi aromatickým či alifatickým primárním aminem a aromatickým aldehydem nebo ketonem.

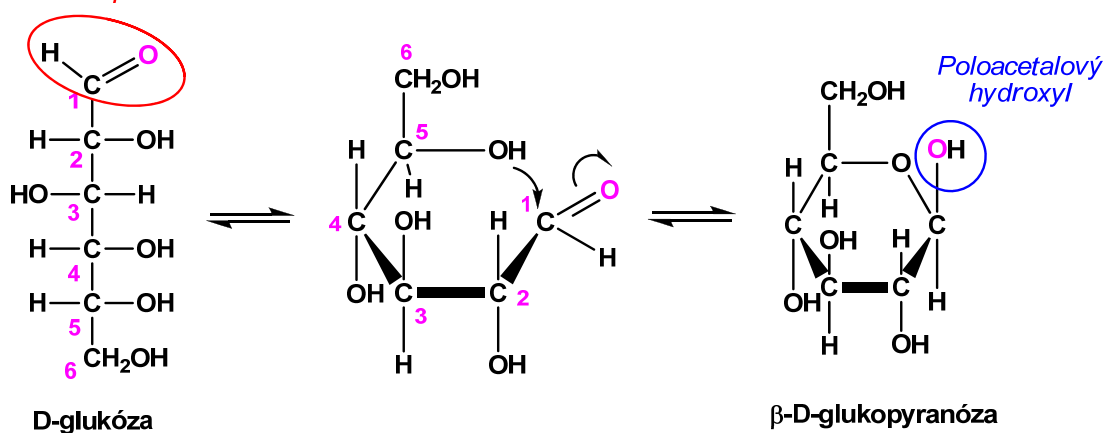
2.3. Reakce na průkaz redukčních vlastností sacharidů

Z analytického hlediska je důležité dělení sacharidů na redukující a neredučující. Podmínkou redukčních vlastností sacharidů je přítomnost *volné nebo potenciálně volné aldehydové funkční skupiny*.

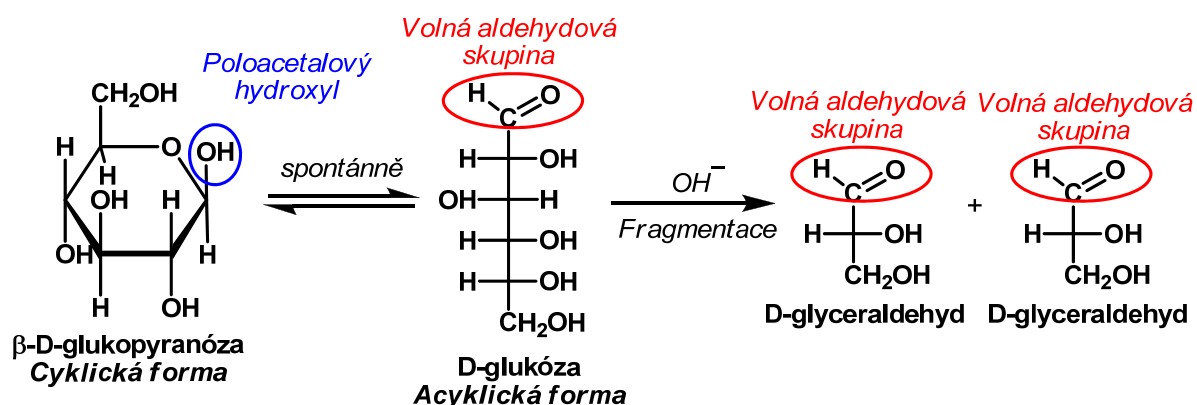
Redukční vlastnosti aldóz

- Přítomnost aldehydové funkční skupiny je typická pro acyklickou formu **aldóz**. Monosacharidy se 4 a více uhlíky ale vytvářejí cyklické formy, kdy se na karbonylovou skupinu spontánně aduje jedna z hydroxylových skupin a vzniká intramolekulový poloacetal (hemiacetal).

Volná aldehydová skupina



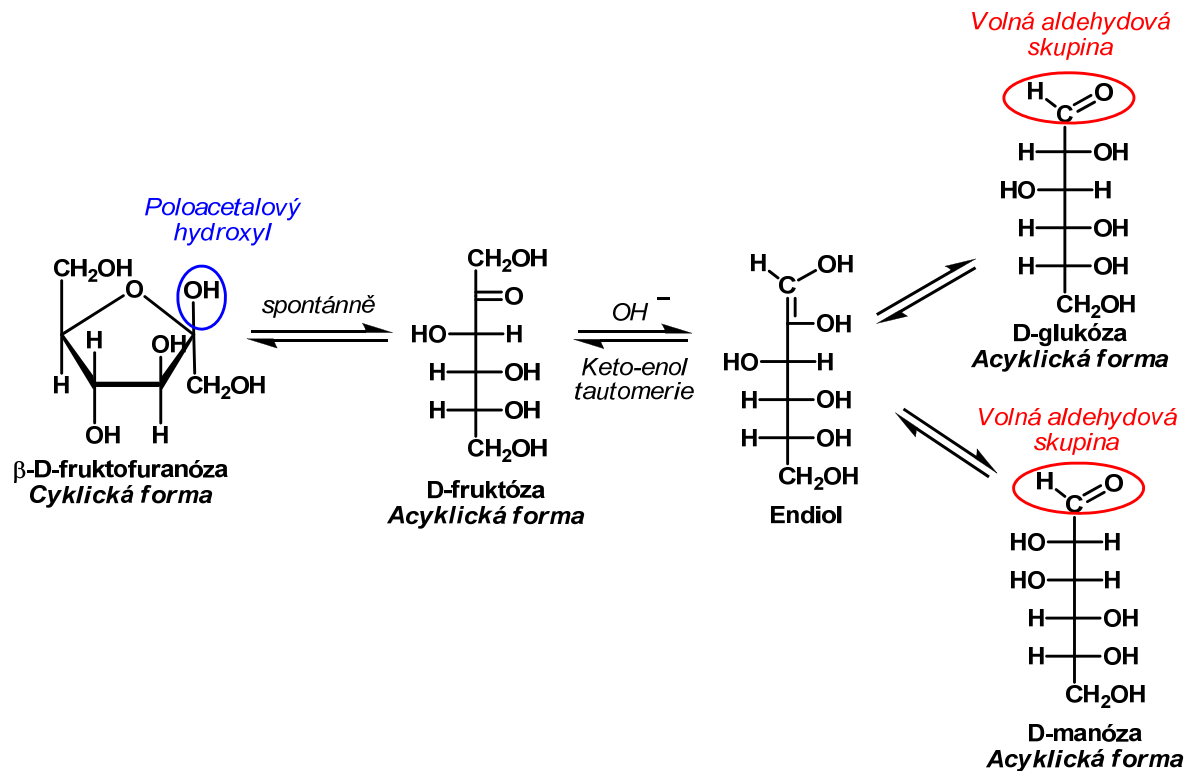
- V roztoku je převládající formou monosacharidů cyklická forma, která nemůže být oxidována. Cyklus se však v roztoku může otevřít a uvolněná aldehydová skupina je schopna se oxidovat. Navíc v silně alkalickém prostředí se za vyšší teploty monosacharidy štěpí a vznikají silně redukující nízkomolekulární aldehydy (např. formaldehyd, acetaldehyd, glycerinaldehyd).



- Odlišnou reaktivitu karbonylové skupiny sacharidů ve srovnání s aldehydy lze demonstrovat reakcí s *Schiffovým činidlem*.

Redukční vlastnosti ketóz

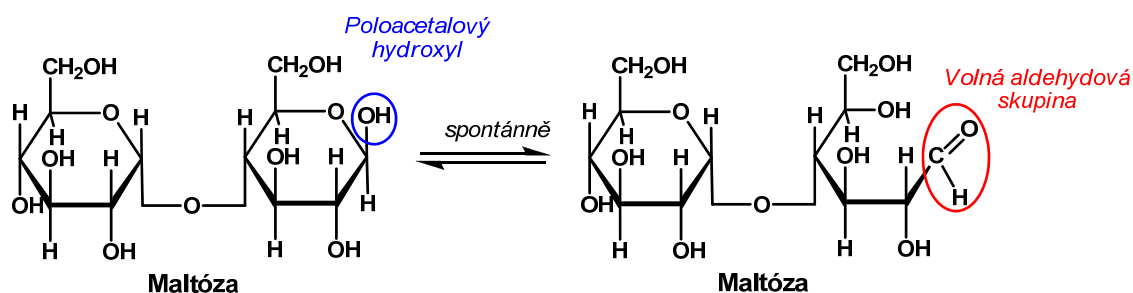
- **Ketózy** sice neobsahují aldehydovou funkční skupinu, ale v alkalickém prostředí probíhá izomerace na aldózy, které se mohou dále štěpit na redukující fragmenty (viz výše).



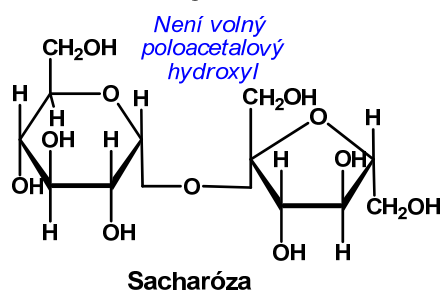
Redukční vlastnosti disacharidů a polysacharidů

- **Z disacharidů** mají redukční vlastnosti ty, v nichž jeden z monosacharidů má volný poloacetalový (hemiacetalový, anomerní) hydroxyl, který není součástí glykosidové vazby (např. maltóza, laktóza). Cyklus monosacharidu s volným poloacetalovým hydroxylem se může otevřít a účastnit se oxidoredukčních reakcí. Naopak disacharidy, na jejichž glykosidových vazbách se podílí poloacetalové hydroxyly obou monosacharidů (např. sacharóza), nemají redukční vlastnosti, neboť v tomto případě nemůže dojít k otevření cyklické formy ani jednoho z monosacharidů.
- **Škrob** téměř neredukuje. Jedinými skupinami schopnými redukce jsou koncové glukózy s volnou poloacetalovou hydroxylovou skupinou.
- Glykosidová vazba v disacharidech a polysacharidech může být hydrolyticky rozštěpena a uvolněné monosacharidy mají redukční vlastnosti.

Redukující disacharid



Neredukující disacharid



Redukující sacharidy jsou schopny za vyšších teplot redukovat ionty těžkých kovů (např. Ag^+ , Cu^{2+} , Bi^{3+}) vázané v komplexu. Redukční vlastností sacharidů se prokazují různými reakcemi. **Tollensova reakce** využívá dusičnanu diamminstříbrného, z něhož se v přítomnosti redukujících sacharidů vyredukuje stříbro (viz praktická cvičení Organika). Další možností jsou oxidační činidla obsahující Cu^{2+} v alkalickém prostředí jako je tomu v případě **Fehlingovy** (viz praktické cvičení Organika) a **Benedictovy zkoušky**, nebo ve slabě kyselém u **Barfoedovy zkoušky**. Redukce Cu^{2+} na Cu^+ je spojena s oxidací aldehydových skupin na karboxylovou skupinu.

Redukční zkoušky se používají jako jednoduché vyšetření moči při podezření na dědičnou poruchu metabolismu sacharidů.

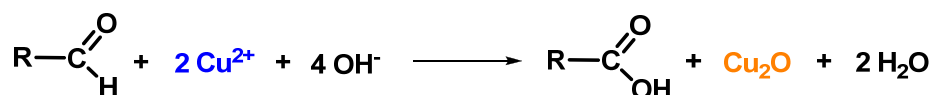
Benedictova reakce

Význam

- Benedictova reakce slouží k **důkazu sacharidů s redukčními vlastnostmi**.

Princip

- V **zásaditém prostředí** sacharidy s redukčními účinky **redukují Cu^{2+} ionty obsažené v činidle na Cu^+** a zároveň je volná aldehydová skupina sacharidů nebo jejich fragmentů oxidována na karboxylovou funkční skupinu. Reakce probíhá za vyšší teploty.



K provedení Benedictovy zkoušky stačí malé množství vzorku, a proto je tato zkouška vhodná pro vyšetření zvýšeného množství redukujících sacharidů v moči novorozenců v rámci diagnostiky dědičných poruch metabolismu sacharidů.

Činidlo

- Základní složkou **Benedictova činidla** je pentahydrát síranu měďnatého, dále obsahuje uhličitan sodný a citronan sodný.
- Uhličitan sodný zabezpečuje alkalické prostředí, které je zapotřebí pro průběh reakce. Uhličitanové anionty by však s měďnatými kationty vytvořily sraženinu uhličitanu měďnatého.
- Proto je další součástí činidla citronan sodný, který udržuje Cu^{2+} ionty v rozpustné formě jako citronan měďnatý. Podobně je tomu i v případě Fehlingova činidla, v němž tuto funkci má vinan draselno-sodný.

Hodnocení

- Redukce Cu^{2+} **redukujícími sacharidy** se projeví vznikem oranžovočerveně zbarvené sraženiny Cu_2O , popř. žlutě zbarveného CuOH , který při vyšší teplotě přechází také na Cu_2O .

Monosacharid (např. glukóza, fruktóza)	+	Cu^{2+}	\longrightarrow	Oranžovočervená sraženina Cu_2O
Redukující disacharid (např. maltóza, laktóza)	+	Cu^{2+}	\longrightarrow	Oranžovočervená sraženina Cu_2O
Neredukující disacharid (např. sacharóza)	+	Cu^{2+}	\longrightarrow	Žádná změna zbarvení

- Pozitivní zkoušku poskytují nejen redukující sacharidy, ale **i jiné sloučeniny s redukčními účinky**, např. kyselina askorbová nebo kyselina homogentisová. Kyselina askorbová (vitamin C), která je odvozená od cukrů, má ve srovnání s redukujícími sacharidy silnější redukční účinky, které se projevují již za pokojové teploty.

Barfoedova reakce

Význam

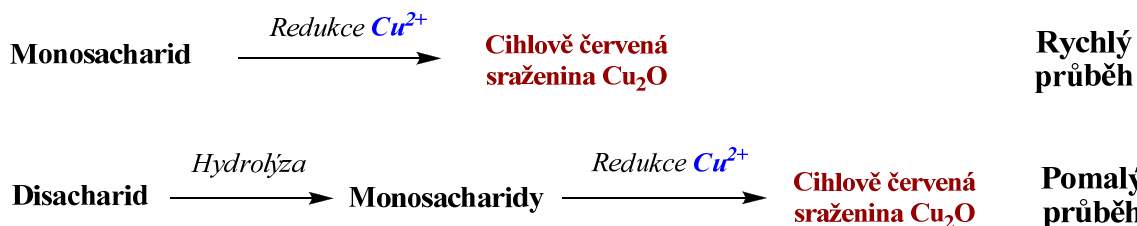
- Pomocí Barfoedovy reakce lze **rozlišit redukující monosacharidy od redukujících disacharidů**.

Princip

- Monosacharidy **redukuji za vyšší teploty Cu^{2+} ionty**, které jsou v činidle ve formě octanu měďnatého. Na rozdíl od Benedictovy zkoušky probíhá oxidoredukční reakce **v slabě kyselém prostředí**. Tyto podmínky umožňují v prvních minutách reakce rychlejší oxidaci monosacharidů ve srovnání s disacharidy.

Hodnocení

- Během 2 – 3 minutového zahřívání reagují **monosacharidy** vytvářením cihlově červeného precipitátu oxidu měďného.
- **Disacharidy** reagují až po déle trvajícím zahřívání, kdy může dojít k rozštěpení na redukující monosacharidy.



Činidlo

- **Barfoedovo činidlo** je roztok octanu měďnatého v prostředí kyseliny octové.

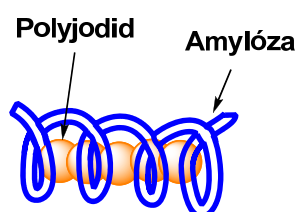
2.4. Reakce na průkaz škrobu

Význam

- *Pro důkaz škrobu* se používá reakce s Lugolovým roztokem.

Princip

- Amylóza, která je jednou ze součástí škrobu, je tvořena nerozvětveným řetězcem molekul glukopyranóz spojených α -1,4-glykosidovými vazbami. Řetězec amyλόzy je svinut do šroubovice. Do dutiny šroubovice vstupují lineárně uspořádané polyjodidové ionty, které jsou součástí Lugolova roztoku. Vzniklý komplex polyjodidů s amyλόzou poskytuje tmavě modré zbarvení, které po zahřátí vymizí.

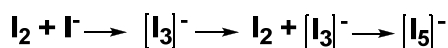


Hodnocení

- Za **tmavě modré zbarvení škrobu** při reakci s Lugolovým roztokem je zodpovědná **amyλόza**.
- **Amylopektin** vytváří s Lugolovým roztokem **červenohnědé až červené zbarvení**. Podobně reaguje i glykogen, který je rovněž jako amylopektin větvený.
- Zbarvení **štěpných produktů škrobu** (dextrinů) je ovlivněno délkou polysacharidového řetězce. Barví se fialově (amylodextrin), purpurově až červeně (erytrodextrin) nebo se nebarví vůbec (achrodextrin).
- Při reakci **monosacharidů a disacharidů** s Lugolovým *roztokem nedochází ke změně zbarvení*.





Činidlo

- Lugolův roztok je roztok jódu v jodidu draselném, který zvyšuje rozpustnost jódu ve vodě. Molekuly jódu s jodidovými anionty vytvářejí lineárně seskupené trijodidy a pentajodidy, které jsou lépe rozpustné ve srovnání s jódem:

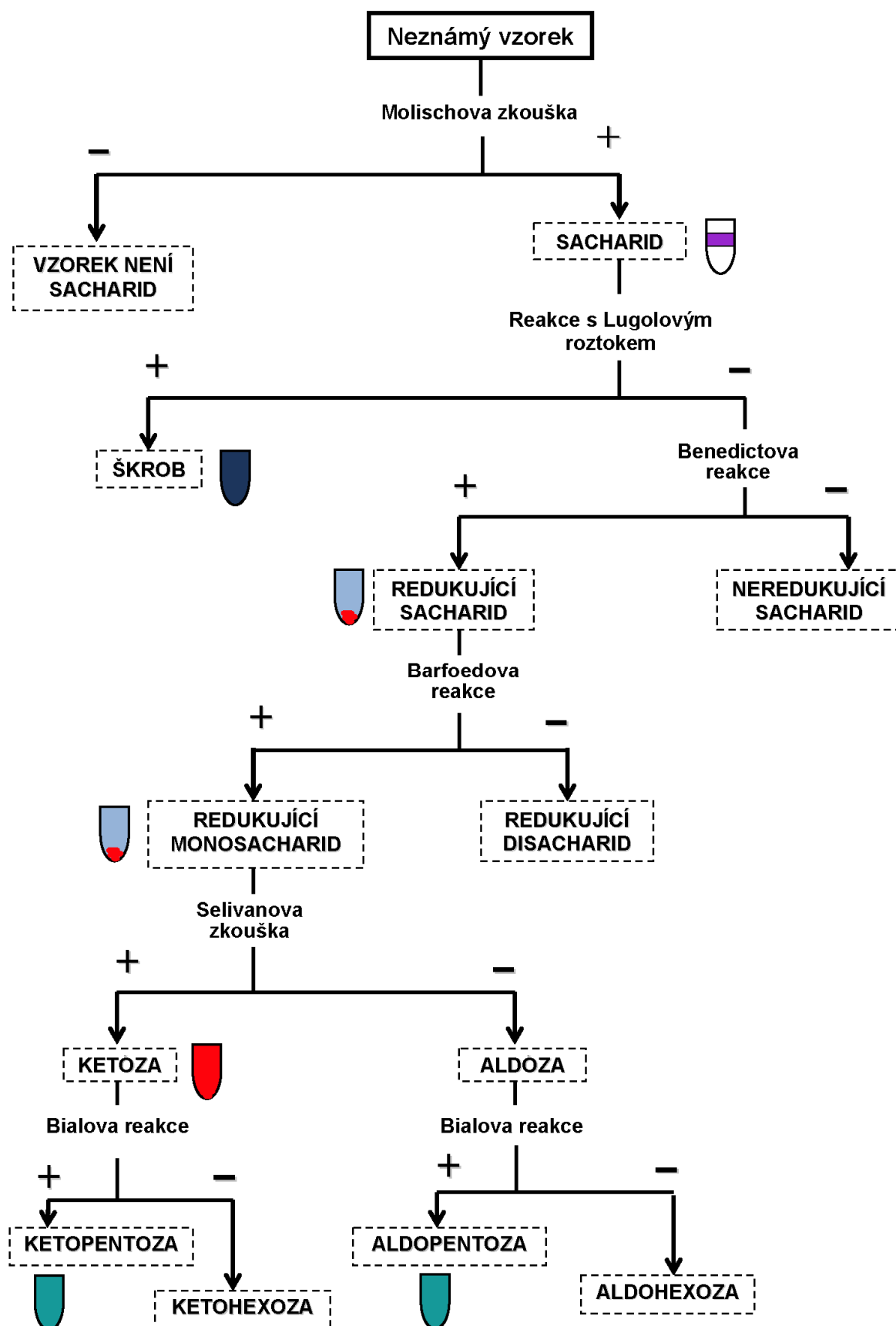


2.5. Analýza neznámého vzorku

Výše popsané reakce lze použít k důkazu neznámého vzorku sacharidu. Význam a hodnocení reakcí shrnuje tabulka.

Reakce	Využití	Pozitivní výsledek	
<i>Molischova reakce</i>	Důkaz sacharidů	Sacharid Fialový prstenec	
<i>Reakce s Lugolovým roztokem</i>	Důkaz škrobu	Škrob Tmavomodré zbarvení	
<i>Bialova reakce</i>	Odlišení pentóz od hexóz	Pentózy Modrozelené zbarvení	
<i>Selivanova reakce</i>	Odlišení ketohehexóz od aldohexóz	Ketohexózy Červené zbarvení	
<i>Benedictova zkouška</i>	Odlišení redukujících sacharidů od neredukujících	Redukující sacharidy Oranžovočervená sraženina	
<i>Barfoedova reakce</i>	Odlišení redukujících monosacharidů od redukujících disacharidů	Redukující monosacharidy Červená sraženina	

Při analýze neznámého vzorku postupujeme podle schématu:



3. Tenkovrstevná chromatografie sacharidů

Tenkovrstevná chromatografie je jednou z metod, využívaných při analýze sacharidů.

Sacharidy jsou látky hydrofilní povahy, což významně ovlivňuje chování při chromatografickém dělení. Hodnota R_f sacharidů je dána řadou faktorů jako je velikost sacharidů (monosacharidy, oligosacharidy), počet uhlíků v molekule a dále počet a prostorové uspořádání hydroxylů. Větší počet hydroxylových skupin způsobuje, že dochází k výrazné interakci mezi adsorbentem a sacharidem.

K detekci sacharidů je možno využít jejich redukčních vlastností nebo převedení aldóz a ketóz na deriváty furfuralu, které potom poskytují barevné reakce s různými aromatickými aminy a fenoly, podobně jako je tomu např. u Molischovy zkoušky.

Tenkovrstevná chromatografie umožňuje přesnější identifikaci sacharidů v moči (např. galaktóza, fruktóza) při vyšetřování pacientů s dědičnými poruchami metabolismu.

4. Optická otáčivost sacharidů

Charakteristickou vlastností sacharidů je *optická otáčivost*. Obsahují minimálně jeden chirální uhlík a patří tedy mezi opticky aktivní látky, které mohou stáčet rovinu polarizovaného světla doprava nebo doleva.

Velikost úhlu α , o který opticky aktivní látka stočí rovinu polarizovaného světla, lze změřit pomocí optické analytické metody **polarimetrie**².

Velikost úhlu α závisí na několika faktorech:

- na koncentraci roztoku opticky aktivní látky;
- na tloušťce vrstvy roztoku, kterou prochází polarizované světlo;
- na teplotě měřeného roztoku;
- na vlnové délce použitého polarizovaného světla;
- na struktuře opticky aktivní látky;
- na charakteru použitého rozpouštědla.

Vztah mezi úhlem α a koncentrací opticky aktivní látky popisuje rovnice:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} \times \frac{l \times w}{100}$$

α	úhel, o který opticky aktivní látka stočí rovinu polarizovaného světla ve stupních
l	délka polarimetrické trubice v metrech
w	hmotnostní koncentrace látky v g/l
$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$	specifická otáčivost

Specifická otáčivost charakterizuje opticky aktivní látku. Má konstantní hodnotu pro danou látku, teplotu a vlnovou délku použitého světla. Je definována jako úhel, o který otočí rovinu polarizovaného světla vrstva roztoku o délce 0,1 m obsahující 1000 g látky v 1 l. Měření se obvykle provádí při teplotě 20 °C a používá se žluté sodíkové světlo o vlnové délce 589 nm, označované jako čára D.

² Další informace o polarimetrii naleznete na <http://el.lf1.cuni.cz/> v souboru Optické metody používané v biochemii [9]

$$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = \frac{\alpha \times 100}{l \times w}$$

Hodnoty specifické otáčivosti jsou uvedeny v tabulkách.

Vztahu mezi koncentrací opticky aktivní látky v roztoku a úhlem otočení roviny polarizovaného světla se využívá ke stanovení koncentrace různých biochemicky významných látek. Pokud známe specifickou otáčivost testované látky a změříme úhel α , můžeme vypočítat její koncentraci podle vzorce, který získáme úpravou předchozí rovnice:

$$w(\text{g/l}) = \frac{\alpha \times 100}{[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} \times l}$$

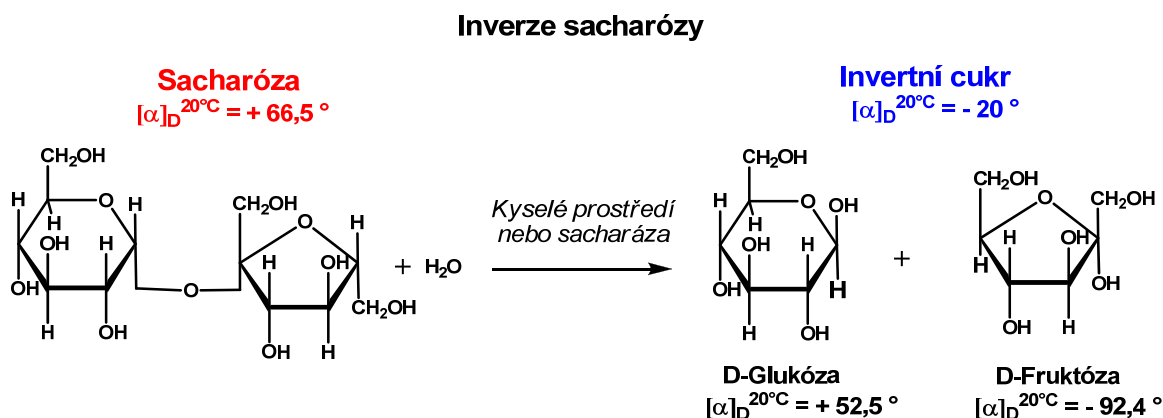
K měření optické aktivity se používají polarimetry.

Hodnoty specifické otáčivosti většiny sacharidů jsou známé. Proto je možno pomocí polarimetrie stanovit koncentraci roztoků sacharidů, což se využívá např. v cukrovarnictví. V minulosti se polarimetricky stanovovala koncentrace glukózy v moči u diabetiků. Polarimetrie se dále může použít ke zjištění čistoty a identifikaci některých látek pro potřeby farmacie.

4.1. Inverze sacharózy

Sacharóza (řepný, třtinový cukr) je využívána v potravě pro svoji sladkou chuť jako nejobvyklejší sladidlo.

Sacharóza může být hydrolyzována buď v *kyselém prostředí*, nebo pomocí enzymu *sacharázy (invertázy)*. Výsledkem hydrolyzy je ekvimolární směs D-glukózy a D-fruktózy označovaná jako **invertní cukr**. Označení vyjadřuje změnu optické otáčivosti, ke které při hydrolyze sacharózy dochází. Sacharóza je pravotočivá, invertní cukr levotočivý. Invertní cukr je o něco sladší než sacharóza.



Literatura:

1. *Káš J., Kodíček M., Valentová O:* Laboratorní techniky biochemie. 1. vydání. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2008.
2. *Kraml J. a kolektiv:* Návod k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie. Karolinum, Praha 1991.
3. *Velíšek J.:* Chemie potravin 1. Osis, Tábor 1999.

Internetové zdroje:

1. Optické metody používané v biochemii [online]. Praha, 2008 [cit. 2008-03-04]. Dostupné z WWW: <http://el.lf1.cuni.cz/151363870/>
2. Classification of carbohydrates
http://chem.alleggheny.edu/chem%20234/07_Carbohydrate%20Lab.pdf