

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu A B C D E F G H (zakroužkujte)	neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)

přílohy protokolu: chromatogram, graf (kalibrační přímka pro stanovení redukujících sacharidů Somogyiho metodou)

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Struktura sacharidů (monosacharidy vs. disacharidy vs. trisacharidy vs. polysacharidy). Struktura monosacharidů (pentosy vs. hexosy, aldosity vs. ketosy). Struktura disacharidů a trisacharidů (monosacharidové podjednotky a jejich vzájemné vazby). Redukující vs. neredukující oligosacharidy. Barevné reakce sacharidů. Princip rozdělovací chromatografie. Retenční faktor. Lambert-Beerův zákon. Glukosaoxidasová reakce a princip stanovení koncentrace glukosy enzymovou elektrodou. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen části A, B.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen části A, B.

PRINCIP ÚLOHY

A. Barevné reakce sacharidů

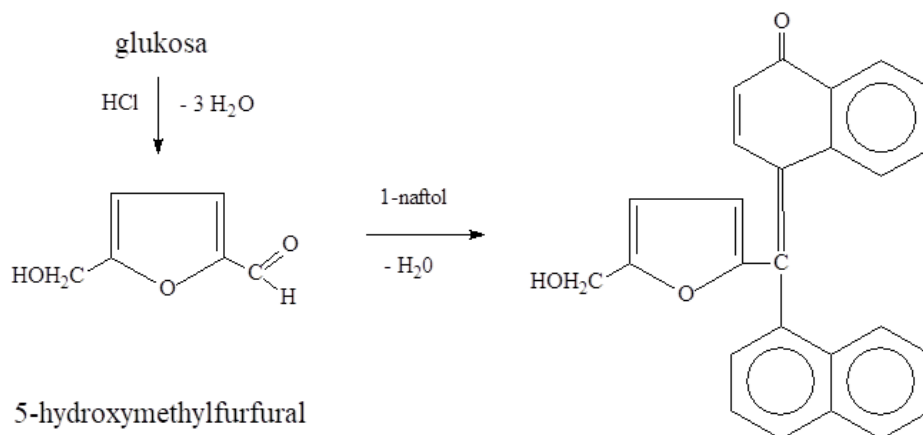
Chemické reakce sacharidů jsou založeny na jejich schopnosti tvořit dehydratací minerálními kyselinami furan-2-aldehyd nebo jeho deriváty a dále na reaktivitě hydroxylových a karbonylových skupin sacharidů. Některé polysacharidy tvoří barevné klathráty s jódem. Volbou vhodné kombinace kvalitativních reakcí lze určit základní charakteristiky neznámého vzorku. Barevné reakce sacharidů lze dále využít např. pro jejich kvantitativní fotometrické stanovení, pro jejich chromatografickou detekci, případně pro identifikaci cukerných složek biopolymerů.

1. Reakce založené na tvorbě furan-2-aldehydu a jeho derivátů

Monosacharidy jsou účinkem minerální kyseliny dehydratovány na furan-2-aldehyd (označovaný také jako furfural – týká se pentos) nebo 5-hydroxymethylfuran-2-aldehyd (týká se hexos). Furan-2-aldehyd nebo 5-hydroxymethylfuran-2-aldehyd kondenzuje s fenoly nebo aromatickými aminy (thymol, 1-naftol, orcin, resorcin, difenylamin a jiné) za vzniku barevných derivátů, které jsou obdobou trifenylmethanových barviv. Různé sacharidy poskytují v různých reakčních prostředích různě zbarvené produkty. Volbou reakčního prostředí proto získáváme reakce s různou specifitou. Pro kvalitativní určení sacharidu v neznámém vzorku se v této úloze využije:

- **Thymolova reakce**, která poskytuje barevný produkt **se všemi sacharidy**.
- **Selivanova a Rothenfusserova** reakce, poskytující specifické zbarvení pro **všechny ketosy**.
- **Bialova** reakce, poskytující specifické zbarvení pro **všechny pentosy**.

Barevné reakce mohou poskytovat i oligosacharidy, polysacharidy nebo glykosidy, pokud při podmínkách stanovení dochází k jejich hydrolyze.



2. Redoxní reakce

Redoxní reakce sacharidů jsou založeny na oxidaci **volné karbonylové funkční skupiny sousedící s hydroxylovou skupinou (α -ketol)**. Aldehydicke skupina aldosa se přitom oxiduje na karboxylovou, zatímco u ketos dochází k oxidaci ketoskupiny spojené se štěpením molekuly sacharidu. Oligosacharidy, které nemají volnou karbonylovou skupinu (resp. volný hemiacetalový hydroxyl), barevnou reakci **neposkytují**. K nejpoužívanějším oxidačním činidlům patří oxid měďnatý (**Fehlingova a Somogyiho reakce**), soli stříbra, antimonu nebo bismutu a kyselina pikrová.

3. Reakce s jódem

Pokud má polysacharid šroubovicové uspořádání, pronikají molekuly I₂ do dutin vytvořených šroubovicí a vzniklý klathrát se vyznačuje změnou fyzikální vlastnosti (**změna zbarvení**). Řetězce tvořené 30–35 monosacharidovými podjednotkami poskytují **modré** zbarvení, řetězce tvořené 8–12 monosacharidovými podjednotkami poskytují **červené** zbarvení, kratší řetězce zbarvení neposkytují.

B. Rozdělovací chromatografie sacharidů

Základem všech chromatografických metod je **distribuce analyzovaných látek mezi stacionární a mobilní fází** na základě rozdílné interakce analyzovaných látek s těmito fázemi.

Při **rozdělovací chromatografii** se jako stacionární a mobilní fáze používají dvě navzájem nemísitelná nebo omezeně mísitelná rozpouštědla. Aby bylo možno docílit vzájemného pohybu dvou nemísitelných fází, je nutno jednu z nich zakotvit (stacionární fáze). Stacionární fázi bývá obvykle voda, zakotvená na hydrofilním nosiči (silikagel, škrob, celulóza apod.). Mobilní fáze je méně polární organické rozpouštědlo, zpravidla směs rozpouštědel s určitým rovnovážným obsahem vody, která je nutná k tomu, aby při eluci nedocházelo k vymývání stacionární vody z nosiče. Pokud se jedná o tzv. chromatografii s reverzní fází, ukotvuje se naopak nepolární rozpouštědlo na hydrofobním nosiči.

Při **rozdělovací chromatografii v plošném uspořádání** se látky nanesou na plochu nosiče s ukotvenou stacionární fází, přes kterou protéká mobilní fáze. Látky více rozpustné ve stacionární fázi se pohybují pomaleji, zatímco látky rozpustnější v mobilní fázi se pohybují rychleji. Rychlost pohybu látek je charakterizována **retenčním faktorem (R_f)**, který je definován jako **podíl vzdálenosti analytu od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu**. Teoreticky může R_f dosahovat hodnot od 0 (látky se při chromatografii nepohybují, zůstávají na startu) do 1 (látky putují současně s čelem mobilní fáze). Optimálně má být R_f v rozmezí 0,15 – 0,8. Jakmile dojde čelo rozpouštědla k okraji plochy nosiče, proces se ukončí, chromatogram se vysuší a jednotlivé látky, nejsou-li barevné, se detekují nejčastěji vybarvením skvrn látek pomocí chemických činidel. Někdy je možné pozorovat skvrny v ultrafialovém světle, radioaktivní látky lze lokalizovat měřením radioaktivity apod.

V této úloze bude k identifikaci neznámého vzorku sacharidu použita **rozdělovací chromatografie v plošném uspořádání na tenké vrstvě silikagelu** (Silufol). **Stacionární fáze je polární a tvoří ji voda vázaná v silikagelu, mobilní fáze je méně polární a tvoří ji směs ethylacetátu, isopropanolu a vody.** Pohyblivost sacharidů je při rozdělovací chromatografii ovlivněna především velikostí molekuly (počet monosacharidových podjednotek – monosacharidy vs. oligosacharidy) a počtem uhlíků v molekule (pentosy vs. hexosy), dále prostorovým uspořádáním hydroxylových skupin (rozlišení epimerů) a jejich počtem (sacharid vs. deoxysacharid). Vliv na pohyblivost sacharidů má dále charakter cyklické struktury (furanosy jsou pohyblivější než pyranosy), u oligosacharidů se uplatňuje i způsob spojení podjednotek (1,4-disacharidy jsou pohyblivější než 1,6-disacharidy). Detekce sacharidů na chromatogramu bude provedena jejich reakcí s hydrogenftalátem anilinu. Aldopentosy poskytují s touto látkou po zahřátí v kyselém prostředí intenzivní zbarvení odlišného odstínu než aldohexosy, a ketosy se barví slaběji. Redukující oligosacharidy rovněž poskytují zbarvení, neredukující oligosacharidy zbarvení neposkytují a nelze je touto metodou identifikovat.

C. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů Somogyiho metodou

Sacharidy obsahující volnou hemiacetalovou hydroxylovou skupinu **redukují** v alkalickém prostředí za zvýšené teploty (100 °C) **komplexní měďnatou sůl** (vytvořenou při smíchání Somogyi-Nelsonova činidla I a II) za vzniku **měďných iontů**, které dále **redukují arsenomolybdenan** (součást Somogyi-Nelsonova činidla III) **na molybdenovou modř**. Ta je barevným reakčním produktem s absorpčním maximem při vlnové délce 740 nm, jehož koncentraci lze stanovit fotometricky. **Intenzita modrého zbarvení je tedy přímo úměrná koncentraci redukujících sacharidů.** Při nízkých koncentracích redukujících sacharidů ve vzorku je výsledné zbarvení modrozelené nebo trávově zelené. Metoda je **velmi citlivá**: je vhodná pro vzorky obsahující velmi malá látková množství redukujících sacharidů (řádově 0,1 μmol). Na druhé straně však jakékoliv **nečistoty** redukujících látek ve zkumavkách a pipetách falešně pozitivně ovlivňují získané výsledky.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Barevné reakce sacharidů

Materiál a vybavení:

1% roztoky sacharidů (standardní vzorky): arabinosa (**ara**), ribosa (**rib**), glukosa (**glc**), galaktosa (**gal**), fruktosa (**fru**), sacharosa (**sac**), trehalosa (**tre**), maltosa (**mal**), škrob (**škr**), glykogen (**gly**)

neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu (obsahuje jeden z výše uvedených sacharidů) (?)

koncentrovaná kyselina chlorovodíková

3% roztok thymolu v ethanolu

Selivanovo činidlo (roztok resorcinu v kyselině chlorovodíkové)

Rothenfusserovo činidlo (roztok difenylaminu v ethanolu, kyselině octové a chlorovodíkové)

Bialovo činidlo (roztok orcínu a chloridu železitého v kyselině chlorovodíkové)

Fehlingovo činidlo I (roztok síranu měďnatého)

Fehlingovo činidlo II (roztok vlnanu sodno-draselného v hydroxidu sodném)

Somogyi-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, síranu sodného a vlnanu sodno-draselného)

Somogyi-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyi-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a arseničnanu sodného v kyselině sírové)

Lugolův roztok (roztok jódu a jodidu draselného)

zkumavky, Pasteurovy pipety, kahan a trojnožka nebo vaříč, držák na zkumavky, hrnec, kruhový stojan na zkumavky

Postup:

Reakce proved'te s roztoky známých sacharidů a s neznámým vzorkem podle rozpisu v tabulce na následující straně. Reakce v tmavě vyznačených polích tabulky vynechejte. Vznik barevných produktů, případně sraženin, popište do tabulky v řádku „popis“. Je-li zbarvení vzorku příliš intenzivní, tak, že nelze rozeznat jeho odstín, zřed'te vzorek vodou. Na základě znalosti specifity reakce, struktury a chemických vlastností sacharidu **rozhodněte, zda je výsledek reakce pro daný sacharid pozitivní (+) nebo negativní (-)**. Totéž rozhodněte v případě neznámého vzorku, a to na základě podobnosti zbarvení. Výsledky zapište do tabulky.

Roztoky činidel nepipetujte ani nepoužívejte dávkovače – odměřujte pomocí plastových Pasteurových pipet („kapátek“)!

Thymolová reakce (reakce na přítomnost sacharidu): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu, 3 kapky roztoku thymolu a 3 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Opatrně povařte 1 – 5 minut.

Selivanova reakce (reakce na přítomnost ketosy): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu a 2 ml Selivanova činidla. Zahřívajte 1 minutu ve vroucí vodní lázni.

Rothenfusserova reakce (reakce na přítomnost ketosy): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu a 2 ml Rothenfusserova činidla. Zahřívajte 10 minut ve vroucí vodní lázni.

Bialova reakce (reakce na přítomnost pentosy): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu a 2 ml Bialova činidla. Zahřívajte 5 minut ve vroucí vodní lázni.

Fehlingova reakce (reakce na přítomnost redukujícího sacharidu): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu, 0,5 ml Fehlingova činidla I a 0,5 ml Fehlingova činidla II. Opatrně povařte.

Somogyiho reakce (reakce na přítomnost redukujícího sacharidu): smíchejte 0,5 ml roztoku sacharidu, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla II. Zahřívajte 10 minut ve vroucí vodní lázni. Po zchlazení přidejte 2 ml Somogyi-Nelsonova činidla III.

Reakce s jódem (reakce na přítomnost polysacharidu): 0,5 ml roztoku sacharidu smíchejte s kapkou Lugolova roztoku.

		ara	rib	glc	gal	fru	sac	mal	tre	gly *	škr	?
reakce na přítomnost sacharidu												
<i>Thymolová</i>	popis											
	+/-											
reakce na přítomnost ketosy												
<i>Selivanova</i>	popis											
	+/-											
<i>Rothenfusserova</i>	popis											
	+/-											
reakce na přítomnost pentosy												
<i>Bialova</i>	popis											
	+/-											
reakce na přítomnost redukujícího sacharidu												
<i>Fehlingova</i>	popis											
	+/-											
<i>Somogyiho</i>	popis											
	+/-											
reakce na přítomnost polysacharidu												
<i>Sjódem</i>	popis											
	+/-											

*glykogen – jen pokud je k dispozici

Vyhodnocení:

Předběžně identifikujte neznámý sacharid na základě informací, které jste získali o jeho struktuře a chemických vlastnostech.

Průběžný výsledek – sacharid v neznámém vzorku:
--

PRAKTICKÁ ČÁST B. Rozdělovací chromatografie sacharidů

Materiál a vybavení:

2% roztoky sacharidů v 30% isopropanolu (standardní vzorky): ribosa (**rib**), 2'-deoxyribosa (**drib**), glukosa (**glc**), galaktosa (**gal**), mannoza (**man**), fruktosa (**fru**), maltosa (**mal**), laktosa (**lac**), cellobiosa (**cel**)

neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu z úlohy 1A (?)

směs ethylacetát:isopropanol:voda (3:2:1)

hydrogenftalátanilinové činidlo (roztok hydrogenftalátu anilinu v butanolu)

Silufol, pravítko, tužka, chromatografická komůrka, kapiláry nebo dávkovače, infralampa, rozprašovač

Postup:

Na desce Silufolu označte tužkou startovací linii asi 1 cm od okraje. Vzorky (standarty a neznámý vzorek) nanášejte čistými kapilárami na start tak, aby maximální velikost skvrny byla 2–3 mm (v pořadí podle tabulky níže). Zkratkou označte druh nanášeného sacharidu. Silufol krátce vysušte pod infralampou a umístěte do chromatografické komůrky s vyvíjecí směsí (mobilní fáze). Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne vzdálenosti asi 1 cm od horního okraje, označte je tužkou a chromatogram vysušte 5 minut pod infralampou. Suchý chromatogram postříkejte hydrogenftalátanilinovým činidlem a umístěte na 30 minut pod infralampu k vysušení. Dále pokračujte až poté, co jste předložili vedoucímu cvičení výsledek úlohy 1A ke kontrole. Tužkou si označte středy skvrn na chromatogramu.

Výsledky a vyhodnocení:

Vlastní chromatogram odevzdáte připevněný k protokolu.

Uveďte vzdálenost start – čelo rozpouštědla: _____ cm

Určete R_f vzorků obsahujících známé sacharidy a R_f neznámého vzorku (viz tabulka).

sacharid	vzdálenost středu skvrny od startu [cm]	R_f
ribosa (rib)		
2'-deoxyribosa (drib)		
glukosa (glc)		
galaktosa (gal)		
mannosa (man)		
fruktosa (fru)		
maltosa (mal)		
laktosa (lac)		
cellobiosa (cel)		
?		

Přiřaďte k sobě hodnotu R_f neznámého vzorku a nejbližší hodnotu R_f mezi známými sacharidy. O jaký sacharid se jedná? Zakroužkujte jej v tabulce. V případě blízkých hodnot R_f můžete použít zbarvení skvrn jako pomocný parametr. Srovnajte výsledek s výsledkem úlohy 1A a definitivně rozhodněte, který sacharid je obsažen v neznámém vzorku.

Souhrnný výsledek úloh 1A a 1B – sacharid v neznámém vzorku:

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů Somogyiho metodou

Materiál a vybavení:

standardní roztok glukosy (0,2 mmol.l⁻¹)

neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje glukosu o neznámé koncentraci)

Somogyi-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vlnanu sodno-draselného a síranu sodného)

Somogyi-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyi-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a hydrogenarseničnanu sodného v kyselině sírové)

zkumavky, pipety, dávkovače, odměrné baňky 50 ml a 100 ml, kahan a trojnožka nebo vaříč, hrnec, kruhový stojan na zkumavky, vortex, fotometr, kyvety

Postup:

Nejprve si zředíte část neznámého vzorku pro kvantitativní analýzu následujícím způsobem: pipetujte 1 ml vzorku do 50 ml odměrné baňky a doplňte destilovanou vodou po rysku. Po důkladném promíchání pipetujte z takto zředěného roztoku 10 ml do 100 ml odměrné baňky, doplňte opět destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchejte (tuto odměrnou baňku označte písmenem N).

Nachystejte si sadu osmi zkumavek, které **důkladně vypláchnete destilovanou vodou!**

Používejte pouze dokonale čisté zkumavky a pipety. Metoda stanovení je velmi citlivá, jakákoliv stopa redukujících látek hrubě zkresluje její výsledek.

Podle tabulky připravte nejprve sadu šesti roztoků o celkovém objemu 0,5 ml a známé koncentraci glukosy k sestrojení kalibrační přímky (zkumavky č. 1–6). Pipetujte podle rozpisu pipetami, které jste vypláchli destilovanou vodou. Zkumavka č. 1 neobsahuje glukosu vůbec, proto se použije jako slepý vzorek. Do zkumavek č. 7 a 8 pipetujte zředěný neznámý vzorek z odměrné baňky označené písmenem N.

zkumavka č.	pipetovaný objem			vypočtená c(glc) [mmol.l ⁻¹]	A ₇₄₀
	0,2 mmol.l ⁻¹ roztok glc [ml]	zředěný neznámý vzorek (odměrná baňka N) [ml]	destilovaná voda [ml]		
1	0,0	0,0	0,5		0,00
2	0,1	0,0	0,4		
3	0,2	0,0	0,3		
4	0,3	0,0	0,2		
5	0,4	0,0	0,1		
6	0,5	0,0	0,0		Ø A ₇₄₀
7	0,0	0,5	0,0	?	
8	0,0	0,5	0,0	?	

V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyi-Nelsonovo činidlo III) – pracujte se zvýšenou opatrností!

Do všech zkumavek dávkujte (pumpičkovým dávkovačem) 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I, vzorky důkladně promíchejte a zahřívejte asi 5 minut ve vroucí vodní lázni. Potom přidejte (pumpičkovým dávkovačem) do všech vzorků 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla II a zahřívejte ve vroucí vodní lázni dalších 10 minut.

Po ochlazení na laboratorní teplotu (lze chladit pomocí studené vody) přidejte pumpičkovým dávkovačem do všech vzorků 2 ml Somogyi-Nelsonova činidla III, vzorky promíchejte a po 5 minutách

stání při laboratorní teplotě (zbarvení je stále po dobu několika hodin) opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

Změřte absorbanci roztoků č. 2–8 při vlnové délce 740 nm proti slepému vzorku č. 1 (roztoky po měření vracejte do zkumavek), výsledky запиšte do tabulky. V případě výskytu bublinek (CO_2) v kyvetách zatřekejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO_2 vypudíte. Přesáhne-li absorbance některého z roztoků hodnotu 0,8 (nad touto hodnotou již není závislost absorbance na koncentraci lineární – neplatí Lambert-Beerův zákon), zřeďte celou sadu roztoků č. 1–8 v poměru 1:1 destilovanou vodou; naměřenou hodnotu absorbance musíte v tomto případě vynásobit dvěma.

Vzhledem k tomu, že kalibrační graf pro stanovení redukujících sacharidů budete používat v dalších úlohách (úloha č. 6), je nezbytně nutné získat správné výsledky. Nesprávnou závislost ihned konzultujte s vyučujícím.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace glukosy ve zkumavkách č. 2–6, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7–8 a doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{740} na koncentraci glukosy). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte koncentraci glukosy ve zředěném neznámém vzorku (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě neznámého zředěného vzorku (odměrná baňka N).

Ředění neznámého vzorku: _____ krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci glukosy ve zředěném neznámém vzorku, abyste získali koncentraci glukosy v původním neznámém vzorku.

Výsledek:
koncentrace glukosy v neznámém vzorku stanovena Somogyiho metodou: $c =$ _____ mmol.l^{-1}

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu A B C D E F G H (zakroužkujte)	neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)

ÚLOHA 2A

Průběžný výsledek – možné sacharidy v neznámém vzorku:

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 2B

Souhrnný výsledek úloh 1A a 1B – sacharid v neznámém vzorku:

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 2C

zkumavka č.	A ₇₄₀
1	0,000
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

Podpis vedoucího cvičení: