

# Úloha č. 1: MONO-, OLIGO- A POLYSACHARIDY

## A. KVALITATIVNÍ REAKCE SACHARIDŮ

Cílem kvalitativních reakcí je rozdělení sacharidů dle jejich chemického složení.

Jednotlivé reakce provádějte v návaznosti dle Schéma 1: Postup kvalitativních reakcí sacharidů

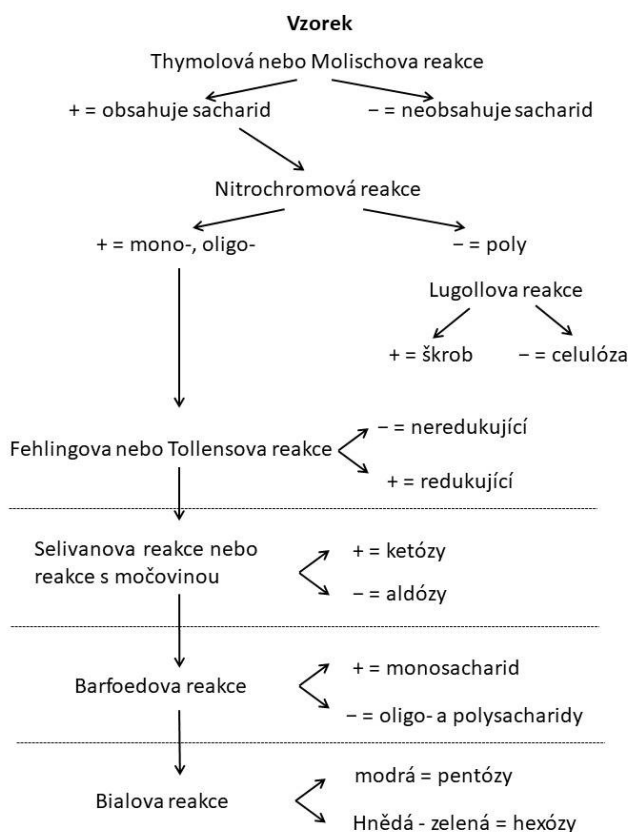


Schéma 1: Postup kvalitativních reakcí sacharidů

### Pomůcky:

Zkumavky, lžičky, špachtle, pipetky, kádinky, stojan, žíhací kruh, síťka, vodní lázeň (vaříč a kádinka).

### Vzorky:

Vzorky sacharidů – glukóza, fruktóza, sacharóza, laktóza, ribóza, dextrin, škrob, aj.

### Závěr:

Do tabulky (Tab. 2: Tabulka výsledků kvalitativních zkoušek jednotlivých vzorků) uveďte reakci každého vzorku. Vyplněnou tabulku uveďte to protokolu s popisem vlastních pozorování.

### **a. Thymolová reakce – důkaz sacharidů I.**

#### **Princip:**

Účinkem koncentrované HCl na monosacharidy dochází k dehydrataci a vzniku furfuralu či jeho derivátů. Furfural i jeho deriváty podléhají kondenzaci s fenoly (thymol) za vzniku barevného produktu. Sacharidy poskytují reakci s roztokem thymolu v přítomnosti HCl tmavočervené až purpurové sloučeniny

#### **Chemikálie:**

Koncentrovaná HCl, 5% (w/v) ethanolový roztok thymolu, NaCl

#### **Pracovní postup:**

1. Do několika zkumavek nasypete na špičku špachtle různých druhů pevných sacharidů a rozpustíte v destilované vodě. V případě kapalného sacharidu nalijte vzorek do zkumavky.
2. Do zkumavek se vzorky přidejte asi 5 kapek roztoku thymolu, 10 cm<sup>3</sup> konc. HCl a několik krystalků NaCl.
3. Zkumavku umístěte do vodní lázně a mírně zahřívejte, dokud nedojde ke změně barvy.
4. **Připravte slepý vzorek** – místo sacharidu nalijte pouze destilovanou vodu.
5. **Určete neznámý vzorek** – podle bodu 1.–3. určete zda vzorek obsahuje sacharid.

### **b. Molischova reakce – důkaz sacharidů II.**

#### **Princip:**

Účinkem koncentrované HCl na monosacharidy dochází k dehydrataci a vzniku furfuralu či jeho derivátů. Furfural i jeho deriváty podléhají kondenzaci s fenoly (1-naftol) za vzniku barevného produktu. Sacharidy poskytují reakci s Molischovým činidlem fialový prstenec na rozhraní koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a roztoku sacharidu.

#### **Chemikálie:**

**Molischovo činidlo** – 3% ethanolický roztok 1-naftolu; koncentrovaná H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### **Pracovní postup:**

1. Ke 2 ml roztoku vzorku ve zkumavce přidejte 5 kapek Molischova činidla a protřepejte.
2. Podvrstvěte 2 ml konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (kyselinu nechte opatrně stékat po stěně zkumavky)
3. Na rozhraní kyseliny a sacharidu vznikne intenzivně zbarvený (červený, červenofialový, fialový, modrý až hnědý) prstenec.
4. Zamícháním se kapalina zbarví tmavě fialově; zředěním vodou se vyloučí modrofialová sraženina rozpustná v etheru za vzniku žlutého roztoku.
5. **Připravte slepý vzorek** – místo sacharidu nalijte pouze destilovanou vodu.
6. **Určete neznámý vzorek** – podle bodu 1.–4. určete zda vzorek obsahuje sacharid.

**Pozn.:** reakce není specifická jen pro sacharidy a ovlivňují ji např. nečistoty v 1-naftolu (zelené zbarvení) nebo přítomnost bílkovin ve vzorku (bílý pruh).

### **c. Nitrochromová reakce – důkaz mono- a oligosacharidů**

#### **Princip:**

Reakcí koncentrované kyseliny dusičné a chromanu draselného se sacharidem dochází k oxidaci mono- a oligosacharidů. Chroman (Cr<sup>+6</sup>) se redukuje na modře zbarvené kationty

chromnaté ( $\text{Cr}^{+2}$ ). Sekundární alkoholická skupina sacharidu reaguje s chromanem v kyselém prostředí za vzniku modrého zbarvení. Polysacharidy nereagují.

**Chemikálie:**

Konc.  $\text{HNO}_3$ , 5% (w/v) roztok  $\text{K}_2\text{CrO}_4$

**Pracovní postup:**

1. Ke 2 ml vzorku sacharidu přidejte asi 3 ml konc.  $\text{HNO}_3$  a 5 kapek roztoku  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ .
2. Po chvíli (cca 2 min) pozorujte vznik modrého zbarvení
3. **Připravte slepý vzorek** – místo sacharidu nalijte pouze destilovanou vodu.
4. **Určete neznámý vzorek** – podle bodu 1.–2. určete, zda neznámý vzorek obsahuje polysacharid.

**Pozn.:** z polysacharidů reaguje inulin a škroby, kdy po delší době dochází k hydrolýze. Hydrolýzou vzniklé mono- a oligosacharidy pak poskytují pozitivní reakci

**d. Jodový test – důkaz polysacharidů (rozlišení škrobu a celulózy)**

**Princip:**

Škrob i celulóza jsou polysacharidy složené tisíce jednotek molekuly glukózy. Škrob se skládá ze dvou různých polysacharidů (amylóza a amylopektin). Škrob reaguje s Lugolovým roztokem za vzniku modrého zbarvení, které zahřátím mizí.

**Chemikálie:**

**Lugolův roztok** – 5 g  $\text{I}_2$  a 10 g KI v 85 ml destilované vody

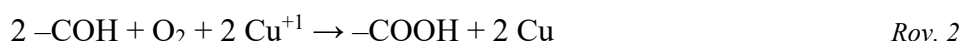
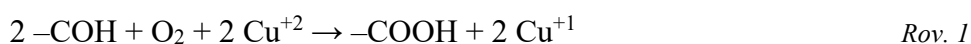
**Pracovní postup:**

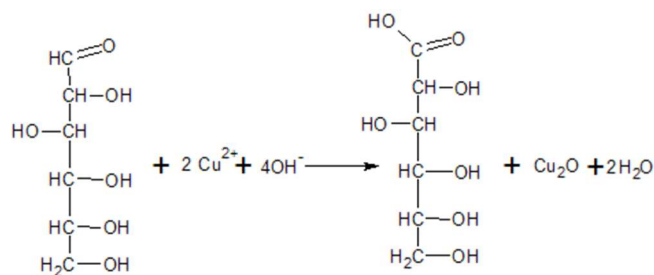
1. Ke 1 ml roztoku sacharidu přidejte asi 1 kapku Lugolova roztoku.
2. Po chvíli pozorujte vznik modrofialového až modročerného zbarvení.
3. Zkumavku zahřejte k varu dokud se směs neodbarví.
4. Po ochlazení se opět objeví modré zbarvení
5. **Připravte slepý vzorek** – místo sacharidu nalijte pouze destilovanou vodu.
6. **Určete neznámý vzorek** – podle bodu 1.–2. určete, zda neznámý vzorek obsahuje škrob.

**e. Fehlingova reakce – rozlišení redukujících a neredukujících sacharidů I**

**Princip:**

Oxidačně – redukční reakce probíhá pouze u skupiny tzv. redukujících cukrů. To jsou takové cukry, které mohou mít v otevřené formě volnou, oxidace schopnou, karbonylovou skupinu. Může jít jak o monosacharidy, tak disacharidy, trisacharidy či vyšší mery sacharidů. Má-li dojít k viditelné reakci (změna barvy sloučeniny mědi z modré na žlutočervenou), musí být v roztoku dostatečná koncentrace koncových merů, které mohou mít v otevřené formě volnou, oxidace schopnou, karbonylovou skupinu. Pokud tomu tak není, jedná se o tzv. cukr neredukující. Oxidačně – redukční reakce obvykle probíhá pouze do stupně redukce  $\text{Cu}^{+2}$  (Rov. 1) na  $\text{Cu}^{+1}$ . V případě vyšší koncentrace redukujícího sacharidu může dojít k redukci až na Cu (Rov. 2).





Obr. 13: Princip Fehlingovy reakce

### Chemikálie:

**Fehlingovo činidlo I:** 4 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  rozpustíte v destilované vodě a doplňte na 100 ml.

**Fehlingovo činidlo II** - 20 g  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 15 g  $\text{NaOH}$  rozpustíte v destilované vodě a doplňte na 100 ml.

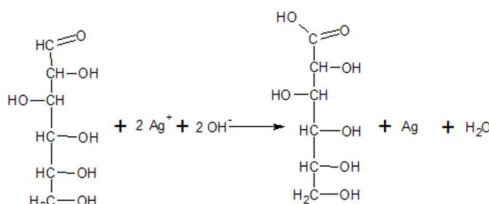
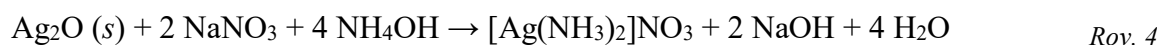
### Pracovní postup:

1. Do několika zkumavek nasypete na špičku špachtle různých druhů pevných sacharidů a rozpustíte v destilované vodě. V případě kapalného sacharidu nalijte vzorek do zkumavky.
2. Do zkumavek se vzorky přidejte 1 ml roztoku Fehling I a 1 ml roztoku Fehling II.
3. Zkumavku umístěte do vodní lázně a zahřívejte, dokud nedojde ke změně barvy.
4. **Připravte slepý vzorek** – místo sacharidu nalijte pouze destilovanou vodu.
5. **Určete neznámý vzorek** – podle bodu 1.–3. určete neznámý vzorek (redukující x neredukující)

### f. Tollensova zkouška – rozlišení redukujících a neredukujících sacharidů II

#### Princip:

Tollensovo činidlo (dusičnan diamminstříbrný  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ ) vzniká reakcí dusičnanu stříbrného a koncentrovaného roztoku hydroxidu amonného za vzniku amonného komplexu (Rov. 3 a Rov. 4). Reakcí Tollensova činidla s aldehydickou skupinou sacharidů vzniká amonná sůl karboxylové kyseliny a redukované stříbro (Rov. 5). Pozitivní reakce činidla s redukujícím cukrem se projeví vznikem tzv. stříbrného zrcátka na stěnách zkumavky.



Obr. 14: Princip Tollensovy reakce

### Chemikálie:

5% roztok  $\text{AgNO}_3$  v  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{NaOH}$  v  $\text{H}_2\text{O}$ , koncentrovaný  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$

### Pracovní postup:

1. Tollensovo činidlo připravte smísením stejného objemu roztoku  $\text{AgNO}_3$  a  $\text{NaOH}$  (Rov. 3). Následně do zkumavky přidejte koncentrovaný  $\text{NH}_4\text{OH}$ , přičemž se hnědá sraženina  $\text{Ag}_2\text{O}$

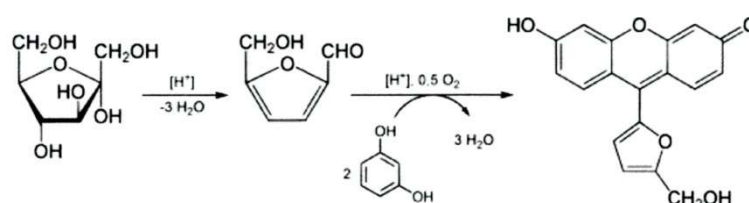
rozpustí (Rov. 4). **Delším stáním ve směsi může vznikat velmi výbušné Bertholetovo třaskavé stříbro  $\text{Ag}_3\text{N}$ !**

2. Do několika zkumavek připravte vzorky sacharidů ve formě vodného roztoku.
3. Ke vzorkům sacharidů ve zkumavkách přikápněte Tollensovo činidlo.
4. Za přítomnosti redukujícího cukru dojde dle Rov. 5 ke vzniku stříbrného zrcátka.
5. **Porovnejte se slepým vzorkem.** Místo vzorku sacharidů nadávkujte pouze vodu.
6. **Určete neznámý vzorek**

### g. Selivanova reakce – roližení aldóz a ketóz I.

#### Princip:

Podstatou reakce je dehydratace sacharidů koncentrovanými kyselinami na 5-(hydroxymethyl)fural, který následně reaguje s resorcinolem za vývoje třešňově červeného produktu (Obr. 5).



Obrázek 1: Princip Selivanovy reakce

Cílem reakce je rozlišení ketos (např. fruktóza) a aldós (např. glukosa). Ketosy reagují rychleji než aldósy. Aldósy poskytují pouze slabě růžové zbarvení kvůli pomalejší dehydrataci, kdy nejprve dochází k izomerizaci aldósy na ketosu. Reakce aldós je asi 20× pomalejší.

Pozitivní výsledek poskytuje fruktóza a sacharóza zatímco glukóza nereaguje.

#### Chemikálie:

**Selivanovo činidlo:** 0,05 g resorcinolu se rozpustí ve směsi 50 cm<sup>3</sup> HCl a 50 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O

#### Pracovní postup:

1. Ke vzorkům sacharidů ve formě roztoku (cca 1 cm<sup>3</sup>) přidejte cca 2 cm<sup>3</sup> Selivanova činidla.
2. Sledujte změnu zbarvení
3. **Porovnejte se slepým vzorkem**
4. **Určete neznámý vzorek**

### h. Reakce s močovinou – odlišení aldóz a ketóz II.

#### Chemikálie:

Močovina, konc. HCl

#### Pracovní postup:

1. Do zkumavky odvažte asi 0,5 g močoviny a přidejte 6 kapek HCl.
2. Ke směsi přidejte 3 kapky roztoku sacharidu.
3. Reakční směs promíchejte, aby se močovina rozpustila
4. Zkumavku zahřívejte 15 min na vodní lázni.

5. Sledujte změnu zbarvení – aldózy reagují vývojem zelenomodrého zbarvení, ketózy se barví červeně.
6. **Porovnejte se slepým vzorkem**
7. **Určete neznámý vzorek**

#### **i. Barfoedova reakce – důkaz monosacharidů**

##### **Princip:**

Roztoky sacharidů reagují s barefoedovým činidlem červenohnědou sraženinu

Octan měďnatý se v kyselém prostředí redukuje na oxid měďný (červená sraženina) a zároveň dochází k oxidaci monosacharidů na příslušné aldonové kyseliny (např.: glukosa – k. glukonová). Aldehydová skupina se oxiduje na karboxylovou skupinu, zatímco skupina  $-\text{CH}_2\text{OH}$  zůstává zachována. Přednostně se redukují monosacharidy. Všechny monosacharidy mají redukční účinky, protože mají volnou aldehydovou skupinu (aldosy), nebo je možná izomerizace ketoskupiny na aldoskupinu (ketosy)), až po delší době reagují redukující disacharidy.

Reakce sacharidů s Barfoedovým činidlem je podobně jako reakce sacharidů s Fehlingovým činidlem založena na redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}_2\text{O}$  (oranžová či červená sraženina). Redukce  $\text{Cu}^{2+}$  v Barfoedově testu probíhá v kyselém prostředí (kyselina octová), na rozdíl nebo Fehlingova testu, kdy  $\text{Cu}^{2+}$  se redukuje v zásaditém prostředí hydroxidu sodného

##### **Chemikálie:**

**Barfoedovo činidlo:** 7 g octanu měďnatého  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  a 0,9 ml konc. Kyseliny octové  $\text{CH}_3\text{COOH}$  se doplní po 100 ml destilovanou vodou.

##### **Pracovní postup:**

1. Ke 2 ml roztoku sacharidu přidejte 2 ml Barfoedova činidla.
2. Zkumavku ponořte do vodní lázně.
3. Sledujte změnu zbarvení – monosacharidy reagují vznikem červené sraženiny, ostatní roztoky jsou modré.
4. **Porovnejte se slepým vzorkem**
5. **Určete neznámý vzorek**

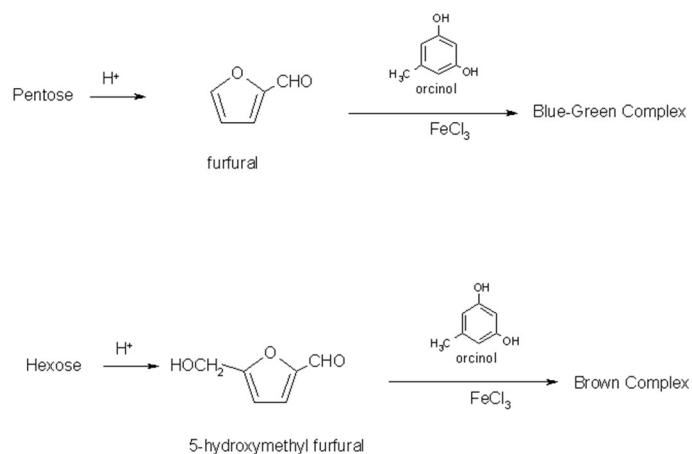
**Pozn.:** reakce je specifická na důkaz redukujících monosacharidů, redukující disacharidy vzhledem k slabě kyselé povaze Barfoedova činidla pozitivní reakci neposkytují vůbec nebo až po delší době.

#### **j. Bialova reakce – důkaz pentóz a hexóz**

##### **Princip:**

Bialova reakce odlišuje pentózy a hexózy. Dehydratací **pentózy** (5-uhlíkový sacharid) vzniká furfural, který reaguje s Bialovým činidlem za vzniku modrého kondenzačního produktu.

Dehydratací **hexózy** (6-uhlíkový sacharid) vzniká 5-hydroxymethylfurfural reaguje s Bialovým činidlem za vzniku hnědého, červenohnědého nebo zeleného kondenzačního produktu.



Obr. 15: Princip Bialovy reakce

### Chemikálie:

**Bialovo činidlo:** 6,25 mg  $FeCl_3$  + 0,75 g orcinol (5-methylbenzen-1,3-diol  $CH_3C_6H_3(OH)_2$ ) + 250 ml konc. HCl

### Pracovní postup:

1. K 1 ml Bialova činidla přidejte 5–6 kapek roztoku sacharidu.
2. Zkumavku zahřejte k varu.
3. Sledujte změnu zbarvení (2–3 min) **Porovnejte se slepým vzorkem**
4. **Určete neznámý vzorek**

**Pozn.:** reakce je specifická na důkaz redukujících monosacharidů, redukující disacharidy vzhledem k slabě kyselé povaze Barfoedova činidla pozitivní reakci neposkytují vůbec nebo až po delší době.

Tab. 2: Tabulka výsledků kvalitativních zkoušek jednotlivých vzorků

Vzorek/ Činidlo	Dextrin	Fruktóza	Glukóza	Laktóza	Ribóza	Sacharóza	Škrob	Slepý vz.	Neznámý vz.
Rozpustnost									
Thymol									
Molisch									
Nitrochrom									
Lugol									
Fehling									
Tollens									
Selivan									
Urea									
Bafoed									
Bial									