

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu A B C D E F G H (zakroužkujte)	

přílohy protokolu: chromatogram

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. Chemické výpočty.

PRINCIP ÚLOHY

A. Barevné reakce sacharidů.

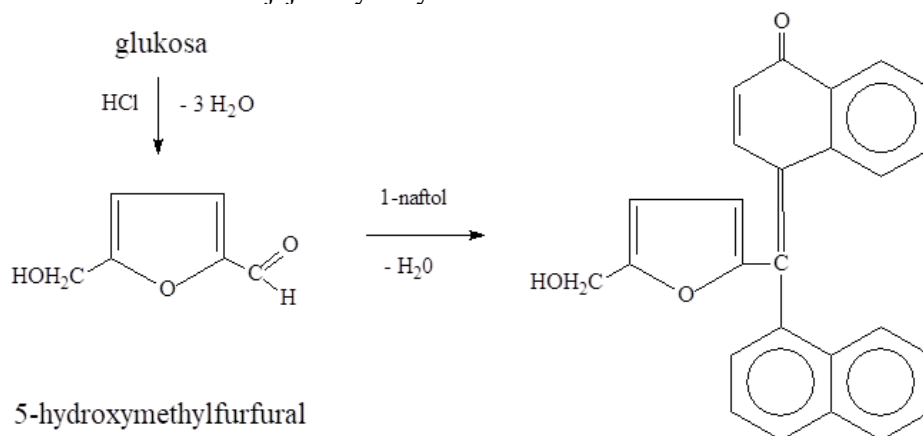
Chemické reakce sacharidů jsou založeny na jejich schopnosti tvořit dehydratací minerálními kyselinami furan-2-aldehyd nebo jeho deriváty a dále na reaktivitě hydroxylových a karbonylových skupin sacharidů. Některé polysacharidy tvoří barevné klathráty s jódem. Volbou vhodné kombinace kvalitativních 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)**. Aldehydická 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 I_2 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 fází bývá obvykle voda, zakotvená na hydrofilním nosiči (silikagel, škrob, celulóza apod.). Mobilní fází 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 fází se pohybují pomaleji, zatímco látky rozpustnější v mobilní fází 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 (látko se při chromatografii nepohybuje, zůstává na startu) do 1 (látko putuje 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.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Barevné reakce sacharidů.

Materiál a vybavení:

neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu obsahující jeden z níže uvedených sacharidů (**vysoká skleněná zkumavka označená tiskacím písmenem**)

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**)

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, 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 zapíšte 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. Zahřívajte 1–5 minut ve vroucí vodní lázni.

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. Zahřívajte 1–5 minut ve vroucí vodní lázni.

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>S jódem</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:

neznámý vzorek pro kvalitativní analýzu obsahující jeden z níže uvedených sacharidů (**plastová mikrozkuřavka označená tiskacím písmenem shodným s tím z části A**)

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**)

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 2A 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 2A a definitivně rozhodněte, který sacharid je obsažen v neznámém vzorku.

Souhrnný výsledek úloh 2A a 2B – sacharid v neznámém vzorku:

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvalitativní 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 2A a 2B – sacharid v neznámém vzorku:

Podpis vedoucího cvičení: