

Možnosti stanovení sacharidů

Lucie Lipnická

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Lucie LIPNICKÁ

Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a technologie potravin

Téma práce: Možnosti stanovení sacharidů

Zásady pro vypracování:

- **Teoreticky vypracovat pojednání o sacharidech zaměřit se na jejich chemickou strukturu.**
- **Rozdělit metody pro stanovení sacharidů.**
- **Popsat principy a metodiku jednotlivých stanovení.**
- **Shrnout tyto metody a navrhnout doporučení pro jejich aplikaci.**



Rozsah práce:

Rozsah přilož:

Forma zpracování bakalářské práce: **tiskárenská/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Valšek, J. *Chemie potravin 1*, 1.vydání, OSSIS, Těboř 1999.

[2] Hájková, J., Ruměšková, M., Riegllová, J. *Analýza potravin*, RNDr. Ivan Straka 2000.

[3] Kuban, V., Kuban, P. *Analýza potravin*, 1.vydání, MZLU v Brně 2007.

[4] Voel, D., Voetová, J. *Biochemie*, 1.vydání, Victoria Publishing 1995

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum začetí bakalářské práce:

18. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce je shrnout chemické a fyzikální metody stanovení sacharidů a jednotlivě popsat jejich metodiku. Je zaměřena na využití chromatografických metod, především vysoceúčinné kapalinové chromatografie.

Klíčová slova: sacharidy, HPLC, IEC, polarimetrie

ABSTRACT

The aim of the thesis is to summarize the chemical and physical methods for the determination of saccharides and individual to describe their methodologies. It is focused on the use of chromatographic methods, especially high-performance liquid chromatography.

Keywords: saccharides, HPLC, IEC, polarimetry

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za vedení, vstřícný přístup a cenné rady, které mi v průběhu psaní této práce poskytovala. Můj dík patří také mé rodině, přátelům a známým, kteří mi, aniž by to mnohdy tušili, svojí vstřícností a tolerancí vytvořili skvělé podmínky nejen pro psaní této bakalářské práce, ale i po celou dobu mého studia na Univerzitě Tomáše Bati.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 SACHARIDY	10
1.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI SACHARIDŮ.....	10
1.2 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI SACHARIDŮ	12
1.3 FYZIOLOGIE A VÝŽIVA	13
1.3.1 Hormony regulující hladinu glukózy v krvi	13
1.3.2 Poruchy metabolismu sacharidů.....	14
1.4 MONOSACHARIDY	15
1.4.1 Formy výskytu monosacharidů v běžných potravinách	16
1.5 OLIGOSACHARIDY	18
1.5.1 Redukující sacharidy	18
1.5.2 Neredukující sacharidy.....	19
1.6 POLYSACHARIDY	20
1.6.1 Zásobní polysacharidy.....	21
1.6.2 Strukturní polysacharidy	24
1.6.3 Další stavební polysacharidy rostlin.....	25
2 IZOLACE A ČIŘENÍ SACHARIDŮ	28
2.1 IZOLACE SACHARIDŮ ETANOLEM	28
2.2 ČIŘIDLA CHEMICKÁ.....	29
2.2.1 Čiření neutrálním octanem olovnatým.....	29
2.2.2 Čiření zásaditým octanem olovnatým	29
2.2.3 Čiření podle Herlese.....	29
2.2.4 Čiření kyselinou fosfowolframovou.....	29
2.2.5 Čiření podle Carezze	30
2.3 ČIŘIDLA FYZIKÁLNÍ	30
3 CHEMICKÉ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ	31
3.1 TITRAČNÍ METODY	31
3.1.1 Metody založené na redukčních schopnostech sacharidů	31
3.1.1.1 Bertrandova metoda	31
3.1.1.2 Schoorleho metoda	32
3.1.1.3 Kolthoffova metoda	32
3.1.2 Metody založené na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů cukrů	33
3.1.2.1 Stanovení neutrálních cukrů podle Duboise	33
3.1.2.2 Stanovení redukujících cukrů mikrometodou podle Somogyiho.....	33
4 FYZIKÁLNÍ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ	34
4.1 GRAVIMETRICKÁ METODA.....	34
4.1.1.1 Podstata analytické metody.....	34

4.2	DENZITOMETRICKÉ METODY	34
4.2.1.1	Podstata analytické metody.....	34
4.3	OPTICKÉ METODY	35
4.3.1	Refraktometrická metoda	35
4.3.2	Polarimetrická metoda.....	36
4.3.2.1	Podstata analytické metody.....	36
4.3.2.2	Příklady využití refraktometrické metody.....	37
4.4	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	38
4.4.1	Chromatografie na tenké vrstvě	39
4.4.2	HPLC.....	40
4.4.2.1	Podstata HPLC.....	40
4.4.2.2	Čerpadla HPLC.....	41
4.4.2.3	Dávkovací zařízení	41
4.4.2.4	Kolony HPLC a stacionární fáze	42
4.4.2.5	Derivatizace pro sacharidy.....	43
4.4.2.6	Detektory v HPLC	45
4.4.2.7	Identifikace a kvantitativní vyhodnocení.....	47
4.4.3	Hydrofilní interakční chromatografie.....	48
4.4.4	Iontově-výměnná chromatografie.....	50
4.4.4.1	Mechanismus stanovení.....	50
4.4.4.2	Kolony v IEC a stacionární fáze	50
4.4.4.3	Stanovení mono-, di- a oligosacharidů vysoceúčinnou aniontovou chromatografií s pulzně- amperometrickou detekcí (HPAE-PAD)	51
4.5	ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY.....	53
4.5.1	Kapilární elektroforéza.....	53
4.5.2	Podstata kapilární elektroforézy	54
4.5.3	Detektory používané při kapilární elektroforéze	54
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK.....	64
	SEZNAM PŘÍLOH.....	65

ÚVOD

Obsah a zastoupení jednotlivých sacharidů je často důležitý ukazatel jakosti a proto jsou předmětem analytické kontroly a hodnocení výroby i tyto složky potravin. Analyticky se sleduje celkový obsah, obsah redukujících cukrů i jednotlivých sacharidů. V některých komoditách je významný i obsah polysacharidů. V potravinářství se nejčastěji sleduje obsah, případně kvalita škrobu, dextrinů, glykogenu, celulózy, pektinových látek, méně pak pentózanů, hemicelulózy, rostlinných slizů a gum. Obsah některých polysacharidů je indikátorem technologické zralosti plodin a tak je možné jejich stanovení využít na kontrolu nebo regulaci sběru plodin a na posouzení jakosti hotových výrobků nebo polotovarů (např. pokud je obsah škrobu v hrachu vysoký je to známka horší kvality, u obilí je tomu naopak atd.).

Pro stanovení monosacharidů, hlavně D-glukózy, D-fruktózy, di- a oligosacharidů (sacharóza, laktóza a maltóza) jsou významné především reakce funkčních slupin (-OH, -CHO, -CO) s chemickými činidly na barevné nebo oxidační či redukční produkty. Kromě toho se používají reakce fyzikálně-chemické a fyzikální (optická otáčivost, index lomu, NIRS - Near Infrared Spectrometry, spektrometrie v blízké červené oblasti atd.), nebo biologické vlastnosti (zkvasitelnost, enzymatické vlastnosti). Metody stanovení sacharidů se neustále zlepšují a vyvíjejí. Tradiční enzymovou zkoušku, která rozděluje sacharidy do tříd (např. redukující sacharidy), nahrazují chromatografické metody (plynová, kapalinová, vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Tyto metody mají vysokou specifitu a jsou schopny stanovit vedle sebe několik sacharidů. HPLC - High Performance Liquid Chromatography, vysocoúčinná kapalinová chromatografie se dnes již stala metodou pro běžnou analýzu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SACHARIDY

Názvem sacharidy se označují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které obsahují v molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb, tj. látky, ze kterých vznikají sacharidy hydrolyzou. K sacharidům se také řadí sloučeniny vzniklé ze sacharidů oxidací, substitučními a jinými reakcemi. Sloučeniny s aldehydovou funkční skupinou se nazývají aldózy a sloučeniny s ketonovou funkční skupinou se nazývají ketózy.

Sacharidy mají v buňkách různé funkce, mohou sloužit jako:

- zdroj energie,
- základní stavební jednotky mnoha buněk, chrání buňky před působením různých vnějších vlivů (např. glykoproteiny),
- jsou biologicky aktivními látkami (např. oligosacharidy mléka) nebo složkami biologicky aktivních látek jako jsou glykoproteiny, některé koenzymy, hormony, vitamíny aj.

Podle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule se sacharidy dělí na:

- monosacharidy,
- oligosacharidy,
- polysacharidy,
- a složené (konjugované nebo komplexní sacharidy) [1, 2].

1.1 Chemické vlastnosti sacharidů

Chemické reakce sacharidů jsou založeny na reaktivitě hydroxylových a karbonylových skupin a na schopnosti tvořit dehydratací minerálními kyselinami heterocyklický aldehyd furfural nebo jeho derivát. V některých případech je možné odlišit ketózy od aldóz, pentózy od hexóz apod. Vhodnou kombinací kvalitativních reakcí lze určit složení neznámé směsi cukru. Pro chemickou charakterizaci jsou vhodné fenylsazony mono- a disacharidů. Velkou pomocí při identifikaci sacharidů je chromatografie. Řada reakcí uvedených níže je podkladem metod spektrofotometrického stanovení:

- Reakce založené na tvorbě furfuralu a jeho derivátů

Jednou z nejběžnějších reakcí je dehydratace sacharidů minerálními kyselinami na furfural (pentózy) a 5-hydroxymetylfurfural (hexózy). Tento aldehyd snadno kondenzuje s fenoly a aromatickými aminy (tymol, resorcin, orcin, floroglucin, 1-naftol, antron, difenylamin atd.) za vzniku zbarvení, které je obdobou trifenylmetanových barviv. Ke spektrofotometrickému stanovení se užívá kondenzačních produktů s fenolem, orcinem nebo resorcinem. Reakci mohou poskytovat i glykosidy a polysacharidy, pokud při podmínkách jejich důkladu dochází k jejich částečné hydrolyze.

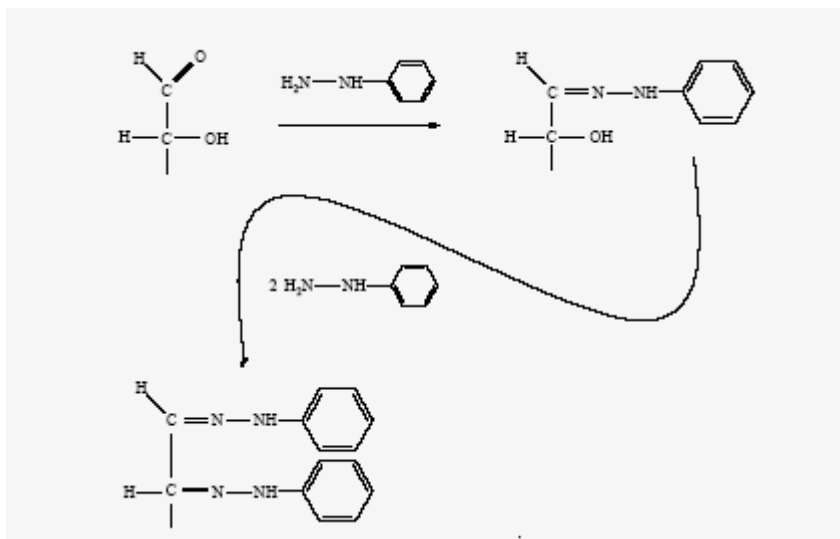
- Reakce oxidoredukční

Tyto reakce jsou založeny na redukujícím účinku volné karbonylové skupiny. Aldehydová skupina aldóz se přitom oxiduje na karboxyl, u ketóz dochází k oxidaci spojené se štěpením řetězce. Oligosacharidy, které nemají volnou karbonylovou skupinu (volný poloacetalový hydroxyl) reakci neposkytují. K nejpoužívanějším reakcím patří redukce solí měďnatých na Cu_2O (reakce Fehlingova, Benediktova, Trommerova), redukce solí antimonitých či bismutitých (reakce Nylanderova) a stříbrných (reakce Tollensova) na kov a redukce kyseliny pikrové na pikraminovou. Všechny předchozí reakce probíhají v alkalickém prostředí a dávají je také aldehydy. Všechny mono- a oligosacharidy redukují chroman v kyselém prostředí, z polysacharidů reagují jen ty, které za podmínek reakce hydrolyzují (např. inulin).

- Tvorba fenylosazonů

Fenylosazony jsou kondenzační produkty mono- a disacharidů s přebytkem fenylylhydrazinu (podobně reagují p-nitrofenylhydrazin i 2,4-dinitrofenylhydrazin). Tyto látky jsou ve vodě málo rozpustné, dobře krystalují a mají charakteristický tvar krystalků s ostrým bodem tání. Reakční mechanismus zahrnuje primární kondenzaci karbonylové skupiny sacharidu s fenylylhydrazinem na fenylylhydrazon. Ten při nadbytku činidla postupně reaguje s dalšími dvěma molekulami fenylylhydrazinu. Mechanismem zahrnujícím Amadoriho přesmyk konečně vzniká osazon. Z reakčního mechanismu je patrné, že totožný osazon poskytne trojice cukrů, která se liší pouze konfigurací OH- skupin na uhlících C-1 a C-2. Je to vždy ketóza a dvě epimerní aldózy (např. fruktóza, glukóza a mannóza). Jako vodítko při identifikaci může sloužit i rychlost tvorby osazonu a jejich rozpustnost, která se podstatně liší. Například osazony glukózy a fruktózy se vylučují krátce po zahřátí reakčního roztoku,

kdežto sacharóza vyžaduje 20 až 30 minutové zahřívání. Osazony laktózy a maltózy se vylučují až po ochlazení. Kromě toho se fenylosazony glukózy, fruktózy a mannózy (identické) nerozpouštějí v chladném acetonu, na rozdíl od fenylosazonů xylózy nebo arabinózy.



Obrázek 1: Tvorba fenylosazonů [3]

- Reakce s jodem

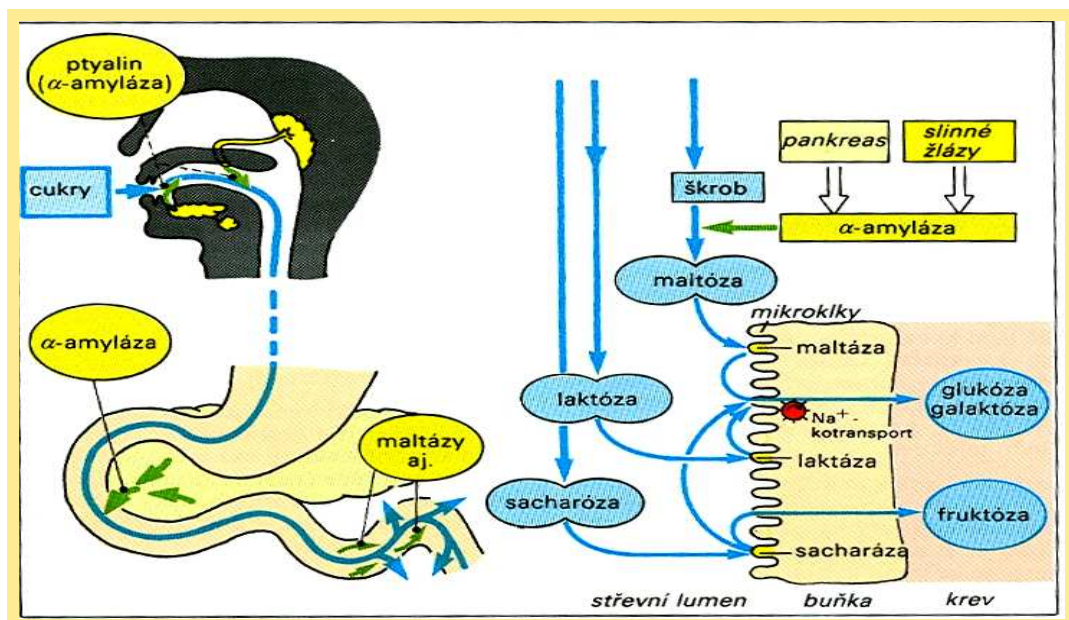
Amylóza - jedna z frakcí škrobu - poskytuje s jodem intenzivní modré zbarvení. Podstata reakce spočívá v tom, že molekuly jódu pronikají do dutin vytvořených šroubovicí polysacharidu a ve formě klatrátu jeví zmíněné fyzikální vlastnosti [3].

1.2 Fyzikální vlastnosti sacharidů

Roztoky monosacharidů zpravidla vykazují určitou optickou otáčivost. Tyto roztoky otáčejí rovinu polarizovaného světla buď doprava nebo doleva. Anomery vykazují rozdílné optické otáčivosti. Monosacharidy jsou látky krystalické s vysokým bodem tání. Záleží na podmínkách krystalizace zda vzniknou krystaly α - nebo β -anomeru. Monosacharidy se velmi dobře rozpouští ve vodě a roztoky o vysoké koncentraci cukrů tvoří viskózní sirupy. Snadno se tvoří přesycené roztoky. Také v metanolu a etanolu se poměrně dobře rozpouštějí. Nerozpustné jsou v nepolárních rozpouštědlech. Fyzikálními vlastnostmi se oligosacharidy velmi podobají monosacharidům. Jejich roztoky zpravidla vykazují optickou otáčivost a často i mutarotaci. Mají poměrně vysoký bod tání [1, 2].

1.3 Fyziologie a výživa

Cukry získávané potravou podléhají při přeměně v organismu mnoha reakcím. Polysacharidy se postupně štěpí *sacharidázami* na oligosacharidy. V tenkém střevě se řada cukrů vstřebává aktivně (glukóza a galaktóza ve formě fosforečných esterů) nebo difuzí (ostatní monosacharidy) do tělních tekutin. Jsou transportovány do jater, kde se transformují na glukózu, která je klíčovou sloučeninou metabolismu a zdrojem energie u živočichů a rostlin. Oxidací glukózy vznikají jednoduché organické sloučeniny, konečnými produkty oxidace jsou oxid uhličitý a voda. Přebytek glukózy se skladuje v játrech a ve svalech jako glykogen [2].



Obrázek 2: Sacharidy – trávení [4]

1.3.1 Hormony regulující hladinu glukózy v krvi

Inzulin, vylučovaný β -buňkami Langerhansových ostrůvků *pankreatu*, působí jako anabolický hormon, tj. podporuje tvorbu a ukládání zásobních tuků a sacharidů, zvyšuje syntézu bílkovin a zároveň potlačuje všechny opačné pochody. Jedním z jeho hlavních účinků je umožnění vstupu glukózy do tkáňových buněk; jeho nedostatek se projevuje zvýšením hladiny glukózy v krvi a rozvojem onemocnění *diabetes mellitus* (cukrovka). Glukagon, vylučovaný α -buňkami Langerhansových ostrůvků *pankreatu*, ale také buňkami sliznice žaludku a dvanáctníku, podporuje odbourávání zásobních látek, a to zejména glykogenu v játrech a triacylglycerolů v tukové tkáni. Má opačné účinky než inzulin, způsobí zvýšení hladiny glukózy (hyperglykemické účinky) a mastných kyselin v krvi a zároveň stimuluje

tvorbu glukózy z aminokyselin v játrech (glukoneogeneze) [5]. Bylo prokázáno že plody *Lonicera caerulea* (Zimolez modrý, Zimolez jedlý) obsahují okolo 7,2 % sacharidů (glukóza, fruktóza, sacharóza, rafinóza). Toto ovoce lze využít jako podpory při onemocnění *diabetes mellitus*, dále obsahuje směs glykosidů kyanidinu, která snižuje růst buněk rakoviny tlustého střeva, kyanidin 3–glykosid snižuje oxidační poškození DNA lidských lymfocytů *ex vivo* a kyanidin-3-rutinosid a kyanidin-3-glukosid potlačují metastázy buněk rakoviny plic [6].



Obrázek 3: Zimolez modrý (*Lonicera caerulea*) [7]

1.3.2 Poruchy metabolismu sacharidů

- Glykogenózy

Jsou charakterizovány depozicí enormních množství glykogenu v některých orgánech. Změněna může být i struktura molekuly glykogenu. Příčinou glykogenóz jsou deficiencie enzymu štěpících glykogen na glukózu (*glukózo-6-fosfatázy*, *glukosidázy*, *fosfofrutokinázy*). Často jsou nadměrnou depozicí glykogenu postižena játra (typ I, III a VI), kdy dochází k výrazné hepatomegalii. Játra nejsou schopna uvolňovat glukózu z glykogenu, což vede k hypoglykémii, hypoinzulinémii, hyperglukagonémii a výrazné retardaci růstu. Při glykogenózách typu V, VII, ale i III a IV dochází ke kumulaci glykogenu ve svalích - neschopnost štěpit glykogen na glukózu vede k nedostatku energetického substrátu pro svalovou kontrakci. Symptomatologie je většinou mírná, projevuje se zvýšenou únavou při intenzivní fyzické zátěži. Zajímavé je, že typ V se může projevit až ve stáří.

- Galaktosémie

Jsou dědičné poruchy metabolismu, při nichž se nemůže zužitkovat galaktóza. Jsou známy dvě enzymové poruchy, jedna spočívá v nedostatku *transferázy* (chybí *hexóza-1-fosfáturyldyltransferáza*), druhá v nedostatku *galaktokinázy* (chybí hromadění galaktóza-1-fosfátu

v tkáních). Nedostatek *transferázy* se začíná projevovat již v kojeneckém věku necharakteristickými symptomy (zvracení, průjem, apatie). V dalším průběhu dochází k jaterní cirhóze s jejími důsledky (krvácivost, *ikterus*, portální městnání) a konečně k nedostatečnosti jater s komatem. Při nedostatku *galaktokinázy* jsou projevy lehčí. Játra nejsou zpravidla postižena, naproti tomu se pravidelně vyskytují katarakty (zákaly očních čoček).

- Esenciální fruktosurie

Je důsledkem deficiencie *fruktokinázy*, enzymu fosforylujícího fruktózu. Fruktóza je ve střevě resorbována, není však v játrech fosforylována na fruktózo-1-fosfát a přechází do cirkulace. Koncentrace fruktózy v periferní krvi po jejím podání je u osob s touto poruchou podstatně vyšší než u zdravých osob. Asi 10 – 20 % podané fruktózy je vyloučeno močí, zbytek je využíván v periferních tkáních. Porucha je benigní a kromě fruktosurie nemá další nepříznivé projevy.

- Hereditární fruktózová intolerance

Je způsobená deficiencí *aldolázy* štěpící fruktózo-1-fosfát. Tento metabolit je tudíž v játrech kumulován, což inhibuje glykogenolýzu i glukoneogenezi, čehož klinickým důsledkem je hypoglykémie. První symptomy se objevují, když mateřské mléko je substituováno náhradními přípravky obsahujícími jako sacharidový zdroj sacharózu nebo fruktózu. Přívod této náhradní výživy vede ke zvracení, hypoglykémii, křečím a poruchám krevní koagulace. V důsledku hypoglykémie dochází k aktivaci sekrece hormonů stimulujících uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin z tukové tkáně. Z těchto jsou v játrech syntetizovány triglyceridy, jejichž výdej z jater je však narušen, což vede ke steatóze [8, 9].

1.4 Monosacharidy

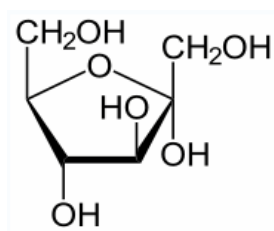
Řetězec monosacharidů přítomných v potravinách bývá lineární, existují však také monosacharidy s rozvětveným uhlíkovým řetězcem. Nejjednodušší aldózou je aldotrióza glycerinaldehyd. Podle počtu uhlíků v řetězci se dělí na triózy, tetrózy, pentózy, hexózy atd. Za nejjednodušší ketózu lze považovat opticky neaktivní 1,3-dihydroxyaceton. Podle počtu uhlíků v řetězci se dělí na triulózy, tetralózy, pentulózy, hexulózy atd. Monosacharidy existují ve dvou konformačních isomerech. Jejich ekvimolární směs je opticky neaktivní a nazývá se racemická směs. Celkový počet stereoisomerů u aldóz je 2^n (n = počet chirálních uhlíkových atomů), u ketóz 2^{n-1} . Příslušnost aldózy či ketózy k řadě D nebo L se určuje

podle shody konfigurace chirálního atomu uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem v řetězci. Aldehydy a ketony reagují s alkoholy za vzniku nestálých poloacetalů. Reakcí poloacetalů s další molekulou alkoholu vznikají stabilní acetaly. Přednostně se tvoří šestičlenné (pyranóza), případně pětičlenné (furanóza) kruhy. Pro označení konfigurace substituentů na anomerním uhlíku se užívá označení α - či β -anomer [1, 2].

1.4.1 Formy výskytu monosacharidů v běžných potravinách

Monosacharidy jsou běžnou složkou téměř všech potravin, ale jejich obsah je proměnlivý, stejně jako zastoupení jednotlivých cukrů. Ve velkém množství se vyskytují monosacharidy v ovoci, kde se jejich obsah zvyšuje během zrání a značně kolísá v závislosti na druhu ovoce, stupni zralosti, podmínkách zpracování. Pentózy jsou v potravinách přítomny v menším množství než hexózy. Hlavní pentózou je ribóza, arabinóza a xylóza. V masě se monosacharidy vyskytují až po proběhlém zrání a vznikají rozkladem glykogenu. Vyskytují se převážně ve formě fosforečných esterů. V mléce se monosacharidy vyskytují v nevýznamném množství. Ve vejcích jsou přítomny monosacharidy jako volné sacharidy, z nichž největší množství tvoří glukóza. Hlavními monosacharidy medu jsou glukóza a fruktóza. V cereáliích vznikají monosacharidy rozkladem škrobu a vyskytují se v nízkých koncentracích. V ovoci a zelenině jsou hlavní cukry glukóza a fruktóza. V řepných řízciích je ve větším množství obsažena arabinóza [1, 2].

- Fruktóza (levulóza, ovocný cukr) – patří mezi ketohexózy s jednou ketoskupinou, která se vyznačuje redukčními účinky. Z fruktózy, glukózy a sacharózy má největší sladivost právě fruktóza. Je rychleji stravitelná než glukóza. V menším množství je vhodným sladidlem pro diabetiky [5].



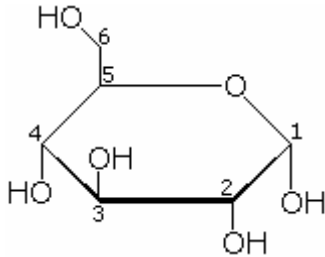
Fruktóza [7]

Tabulka 1: Obsah monosacharidů a dalších cukrů v ovoci (% v jedlém podílu) [1]

Ovoce	Glukóza	Fruktóza	Sacharóza	Cukry celkem
Jablka	1,8	5,0	2,4	11,1
Hrušky	2,2	6,0	1,1	9,8
Třešně	5,5	6,1	0	12,4
Švestky	3,5	1,3	1,5	7,8
Meruňky	1,9	0,4	4,4	6,1
Broskve	1,5	0,9	6,7	8,5
Jahody	2,6	2,3	1,3	5,7
Maliny	2,3	2,4	1,0	4,5
Rybíz červený	2,3	1,0	0,2	5,1
Rybíz černý	2,4	3,7	0,6	6,3
Pomeranče	2,4	2,4	4,7	7,0
Citrony	0,5	0,9	0,2	2,2
Ananas	2,3	1,4	7,9	12,3
Banány	5,8	3,8	6,6	18,0

- Glukóza (dextróza, hroznový cukr) – je to aldohexóza s jednou aldehydickou skupinou, která má podobné vlastnosti jako ketoskupina u fruktózy. V ovoci a zelenině je v množství 1 – 6 %. Velmi snadné krystalizace glukózy se v konzervárenství v některých případech využívá, častěji je však nežádoucí (krystalizace cukru z koncentrovaných šťáv apod.) Je snadno vstřebatelná a energeticky dobře využitelná [1]. Buněčnou membránou prochází obvykle pasivním transportem pomocí bílkovinných přenašečů, přes membránu buněk ledvinových tubulů a buněk střevního epitelu je přenášena mechanismem sekundárního aktivního transportu symportem se sodnými ionty. Účinkem mikroorganismů podléhá přeměně na etanol a na laktát [5]. V mikrobiologii se tato fermentace glukózy, využívá k identifikaci mikroorganismů. Využívají se agary s obsahem glukózy, např. pro *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* [10]. Glukóza

je významným zdrojem energie organismu savců, proto se ve formě vodných roztoků užívá k infuzím při léčbě různých patologických stavů. V moči zdravých jedinců glukóza přítomna není, neboť je v ledvinách plně resorbována z primární moči (glukosurie) [5].



D-glukóza [7]



Obrázek 4: *Listeria monocytogenes* [7]

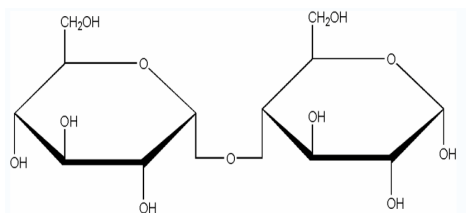
1.5 Oligosacharidy

Mezi oligosacharidy se řadí takové oligomery monosacharidů, u nichž jsou na sebe vázány dvě, nejvýše deset molekul monosacharidů glykosidovou vazbou. Disacharid může teoreticky vznikat kondenzací α - nebo β -anomerní hydroxylové skupiny monosacharidu s libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Kondenzují-li vzájemně dvě poloacetálové hydroxylové skupiny, neobsahuje vzniklý disacharid anomerní hydroxylovou skupinu a je proto neredukující. V každém jiném případě vzniká redukující disacharid [1, 2].

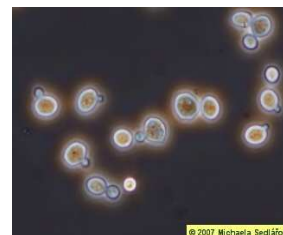
1.5.1 Redukující sacharidy

- Maltóza (O- α -D-glukopyranosyl-(1-4)-D-glukopyranosa), též zvaná sladový cukr.

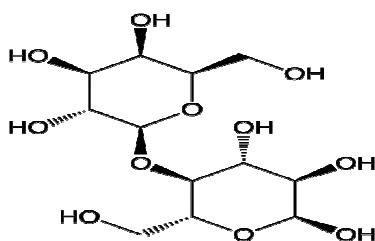
Je produktem enzymové hydrolýzy škrobu, je přítomná v klíčících semenech a tedy také v klíčícím ječmeni, (sladu). V chlebovém těstě vzniká enzymovou hydrolýzou působením kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. V poměrně vysokém množství je obsažena v medu průměrně 7,3 % [1]. Maltóza se používá jako výživný přídatek v potravinářském a farmaceutickém průmyslu (je mnohem méně sladká než glukóza při stejné výživové hodnotě). Bývá také složkou mikrobiologických živných médií [5].



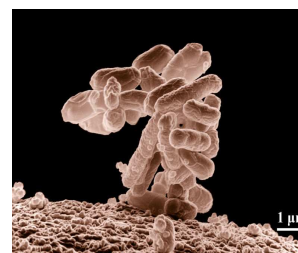
Maltóza [7]

Obrázek 5: *Saccharomyces cerevisiae* [7]

- Laktóza (O- α -D-galaktopyranosyl-(1–4)-D-glukopyranosa), též zvaná mléčný cukr. Vyskytuje se v mléce a ve všech mléčných výrobcích. Má poměrně malé kariogenní a laxativní účinky [11]. V trávicím traktu je rozkládána *hydrolázou β -galaktosidázou (laktázou)*; pokud je tento enzym nefunkční, dostávají se při příjmu laktózy břišní křeče a průjemy (tzv. laktózová intolerance) a laktóza musí být z potravy vyloučena. Laktóza je zpracovávána pouze některými mikroorganismy: bakteriemi mléčného kvašení na kyselinu mléčnou (podstata kysání mléka), působením některých kvasinek vzniká kefir [5]. Laktóza se užívá ve farmaceutickém průmyslu a jako součást některých živných médií pro mikroorganismy (*Clostridium botulinum* a *perfringens*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella spp.*) [10]. Izoluje se ze syrovátky ultrafiltrací nebo ionexovou chromatografií a její redukci se získá laktitol. Laktitol má uplatnění v mléčných výrobcích a je cukernou složkou diabetických mléčných čokolád. Je též používán při léčení hepatické encefalopatie. Z laktózy se mimo jiné připravují i prebiotické galaktooligosacharidy [12].



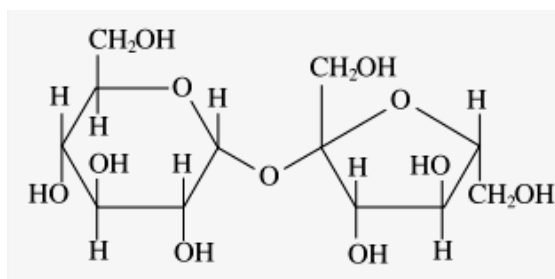
Laktóza [7]

Obrázek 6: *Escherichia coli* [7]

1.5.2 Neredukující sacharidy

- Sacharóza (β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid), též nazývaný řepný či třtinový cukr. Vzniká přenosem glukozylového zbytku z UDP-glukózy na fruktózu. Je důležitým metabolickým produktem všech zelených rostlin, kde slouží jako transportní rozpustný sacharid; živočichové ji nesyntetizují. V kyselém prostředí hydrolyzuje na ekvimolární směs glukózy a fruktózy (invertní cukr); stejnou reakcí za neutrálních podmínek katalyzuje

reakci rozkladu enzym *sacharáza* (též *invertáza*). Sacharóza se používá jako sladidlo v potravinářství. Může být zkvašována mikroorganismy, ale ve vyšších koncentracích inhibuje jejich růst – proto se používá jako konzervační činidlo (marmelády apod.). Mikroorganismy ústní dutiny ji rychle metabolizují, přičemž vznikají organické kyseliny, které mohou narušit povrch zubní skloviny a tím podpořit vývoj zubního kazu [5].



Sacharóza [7]

Tabulka 2: Obsah sacharózy v luštěninách (% v sušině) [1]

Luštěnina	Latinský název	Sacharóza
Fazol obecný	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2,2 – 4,9
Vigna mungo	<i>Vigna mungo</i>	1,3
Hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	2,3 – 3,5
Čočka jedlá	<i>Lens culinaris</i>	1,3 – 2,0

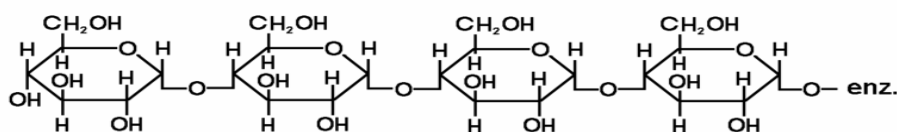
1.6 Polysacharidy

Polysacharidy (glykany) se skládají z více jak 10 monosacharidových jednotek, spíše několik tisíc, stovek tisíc strukturních jednotek spojených vzájemně glykosidovými vazbami. Polysacharidy jsou buď výlučně tvořeny identickými monomery (homopolysacharidy neboli homoglykany), častěji se však skládají z molekul dvou a více různých monosacharidů nebo obsahují deriváty monosacharidů (heteropolysacharidy neboli heteroglykany). Polysacharidy se běžně dělí dle původu, největší význam mají polysacharidy rostlin. Podle funkce se dělí na stavební a zásobní [1, 2].

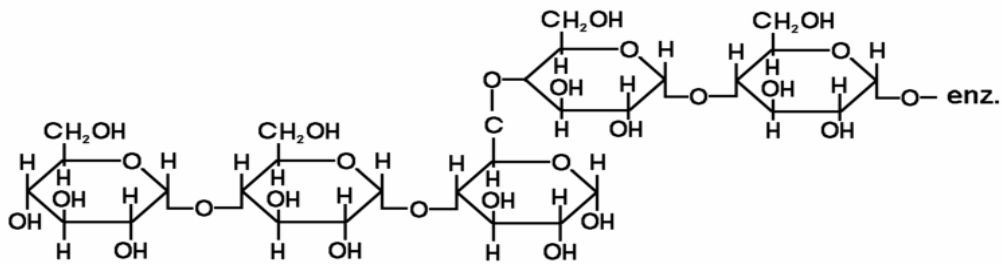
1.6.1 Zásobní polysacharidy

- Škrob

Je směs glukanů, syntetizovaných rostlinami jako jejich hlavní zásobní látka. V cytoplasmě rostlinných buněk je uložen v neropustných granulích, které se skládají z α -amylózy a amylopektinu. α -Amylóza je lineární polymer obsahující několik tisíc glukózových zbytků, vázaných vazbami $\alpha(1-4)$. Amylopektin se skládá převážně z glukózových zbytků, spojených vazbami $\alpha(1-4)$, ale má větvenou molekulu s vazbami $\alpha(1-6)$ přibližně vždy po 24 až 30 glukózových zbytcích [1, 13]. Fyzikálně-chemické vlastnosti škrobu (zejména rozpustnost, bobtnavost a schopnost želatinace, hydrolýzy nebo retrogradace) závisí na podílu amylózy a amylopektinu. Vyšší podíl amylopektinu snižuje teplotu želatinace a ulehčuje proces hydrolýzy a vzniku monosacharidů pro etanolové kvašení. Tento podíl amylózy a amylopektinu ve škrobu je u pšenice geneticky podmíněný a neovlivňuje jej lokalita pěstování ani klimatické podmínky. Ukládá se procesem asimilace v zásobních orgánech rostlin (semenech či hlízách brambor, kukuřice, pšenice, rýže) ve formě škrobových zrn. Zvláště bohaté na škrob jsou brambory, banány, obilniny a tapioka. Podle surovin, ze kterých je vyroben, rozeznáváme škrob bramborový, kukuřičný, pšeničný, rýžový a jiné. Škroby s vyšším zastoupením amylopektinu jsou vhodné na výrobu papíru, adheziv, mražených potravinových výrobků, těstovin a piva. Vyšší zastoupení amylózy předurčuje škrob na výrobu fotografických filmů, pro cukrárenství, ale zejména na výrobu funkčních potravin. Obsah škrobu v rostlinách výrazně ovlivňuje lokalita pěstování a klimatické podmínky [14]. Bylo prokázáno, že rezistentní škroby, které nejsou tráveny v tenkém střevě člověka, mohou být částečně fermentovány mikroflórou tlustého střeva, hrají důležitou roli ve výživě člověka, protože jejich zvýšená konzumace je spojena se snížením výskytu neinfekčních střevních onemocnění, včetně rakoviny tlustého střeva. Rezistentní škrob také snižuje postprandiální hladinu glukózy v krevní plasmě. Zvýšená konzumace rezistentního škrobu je proto žádoucí. Na druhé straně při fermentaci vznikající plyny způsobují trávicí obtíže [15].



Amylóza [7]



Amylopektin [7]

Tabulka 3: Obsah škrobu a jeho složení ve významných zdrojích [1]

Potravina	Škrob [%]	Amylóza [%]
Pšenice	59 - 72	24 – 29
Žito	52 - 57	24 – 30
Ječmen	52 - 62	38 – 44
Oves	40 - 56	25 – 29
Kukuřice	65 - 75	24 – 26
Rýže	70 - 80	8 – 37
Amarant	48 – 69	0 – 22

- Glykogen

Je to vysoce větvený polymer glukózy (polyglukan) s $\alpha(1-4)$ a $\alpha(1-6)$ glykosidovými vazbami. Jakožto rezervní látka uvolňuje při nedostatku energie glukózu (resp. glukóza-1-fosfát). Je uložen zejména ve svalech a játrech; je též obsažen v houbách a kvasinkách. Glykogen je hlavním zdrojem energie. Rychlosti syntézy glykogenu a jeho odbourávání jsou složitě řízeny hormony inzulinem, adrenalinem a glukagonem [5]. Hraje významnou roli při postmortálních změnách svaloviny. Anaerobní glykolýzou se z glykogenu tvoří kyselina mléčná, která snižuje pH masa a způsobuje posmrtnou ztuhlost. Na druhé straně při štěpení glykogenu zůstávají ve svalovině degradační produkty štěpení, mezi něž patří glukózo-1-fosfát, glukózo-1,6-difosfát, fruktózo-1,6-difosfát a další, včetně tříuhlíkatých sloučenin. Tyto látky se spolupodílejí na vytváření specifických sensorických vlastností masa společně s dalšími nízkomolekulárními látkami [16].

- Heterofruktany a heteromanany

Heterofruktany jsou polymery a oligomery D-fruktózy. Často se takto označují také polymery D-fruktózy obsahující jako koncovou jednotku D-glukózu, pro které se používá přesnější název glukofruktany. Mezi přírodní fruktany řadíme inulin a levany. Inuliny jsou polymery vzniklé polymerací lineárních řetězců D-fruktofuranóz $\beta(1-2)$. Inuliny jsou obsaženy v kořenech čekanky, česneku, cibuli, artyčocích, hlízách topinamburu [2, 19]. Fruktofuranozové jednotky jsou spojeny vazbou $\beta(1-2)$. Mají příznivý vliv na lidskou střevní mikroflóru a mohou upravovat některé z typů hyperlipidemií. Lidský organismus nemá enzym schopný inulin hydrolyzovat. $\beta(1-2)$ -fruktany inulinového typu jsou součástí dietní vlákniny, jsou svými účinky blízké β -glukanům, přírodním polysacharidům z kvasinek, hub a droždí, které působí jako nespecifické stimulatory imunitního organismu [20].



Obrázek 7: Artyčok [17]



Obrázek 8: Hlízy Topinamburu hlíznatého [18]

- Heteromannany

Jsou tvořeny jednotkami D-mannózy $\beta(1-4)$ glykosidovými vazbami. Jsou obsaženy v semenech rostlin, kávě, endospermu některých luštěnin. Pokud je na některé z mannózových jednotek vazbami $\beta(1-4)$ navázaná α -D-galaktóza, nazývají se tyto heteromannany galaktomannany (guarová, lokustová guma) [1, 2].

- Glukomannany

Bylo prokázáno, že esterifikované glukomannany, které jsou extrahovány z buněčných stěn kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*, deaktivují mykotoxiny z potravin. Glukomannany Karobu (*Ceratonia siliqua*, Svatojánský chléb) se používají jako stabilizátory do potravin, jako živná půda pro mikroorganismy a také v textilním, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [21].

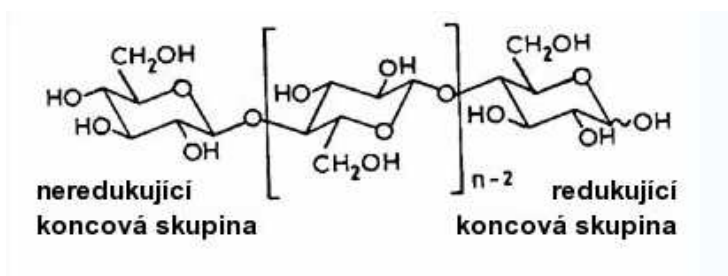


Obrázek 9: Karobové lusky [22]

1.6.2 Strukturní polysacharidy

- Celulóza

Celulóza je primární stavební složka stěny rostlinných buněk, obsahuje přes polovinu veškerého uhlíku, přítomného v biosféře. Ačkoliv celulóza je převážně rostlinného původu, nachází se rovněž v pevném vnějším plášti mořských bezobratlých pláštěnců. Celulóza je lineární polymer obsahující až 15000 D-glukózových zbytků spojených $\beta(1-4)$ glykosidovými vazbami. Živočichové nemají enzymy, které by dokázaly rozštěpit vazby $\beta(1-4)$ mezi jednotlivými glukózovými jednotkami. Proto je pro většinu živočichů celulóza nestravitelná a v potravě tvoří tzv. vlákninu. Pro komerční účely se izoluje ze dřeva odstraněním ostatních složek (lignin, hemicelulóza, oleje aj.). Celulózové vlákno se používá v papírenském a textilním průmyslu. Je hlavní složkou papíru a rostlinných vláken z bavlny, lnu a konopí; jejím derivátem jsou umělá vlákna, jako je acetát celulózy nebo viskóza, surovina k výrobě umělého hedvábí nebo celofánu. Nitrací celulózy vzniká nitrocelulóza, známá také jako střelná bavlna [13, 19].

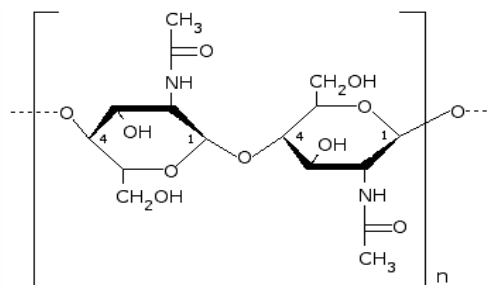


Celulóza [7]

- Chitin

Chitin je základní stavební složkou exoskeletu členovců, jako jsou koryši, hmyz a pavouci, jakož i dalších bezobratlých. Je rovněž přítomný v buněčných stěnách většiny hub a mnoha řas, kvasinek a je v přírodě téměř tak rozšířený jako celulóza. Chitin je homopolymer $\beta(1-4)$ vázaných N-acetyl-D-glukosaminových zbytků [13, 19]. Společně s chitosanem má

široké uplatnění v průmyslu a medicíně. Komerční chitin se získává především z odpadních produktů vzniklých při zpracování mořských živočichů. Chitosan, deacetylovaná forma chitinu, se pro své význačné vlastnosti používá v mnoha průmyslových oborech, zejména v potravinářství jako součást potravinových doplňků a přípravků na snížení hmotnosti [23].



Chitin [7]

1.6.3 Další stavební polysacharidy rostlin

- Hemicelulózy

Hemicelulózy jsou ve vodě nerozpustné polysacharidy doprovázející ve dřevě a v jiných rostlinných materiálech celulózu, od níž se liší jednak nižší molekulovou hmotností, jednak rozličností základních sacharidových jednotek: kromě hexóz (glukóza, mannóza aj.) jsou v hemicelulozách vázány i pentózy (např. xylóza, arabinóza) a alduronové kyseliny. Při chemickém zpracování dřeva na buničinu se hemicelulózy poměrně snadno hydrolyticky štěpí na nižší rozpustné cukry. Pro živočichy jsou nestravitelné. Pojem hemicelulózy historicky označuje všechny složky buněčných stěn extrahovatelné silnými alkaliemi bez ohledu na jejich chemickou strukturu [13, 19].

Patří sem hetroxylany a heteroglukany. Do heteroglukanů řadíme xyloglukany a β -glukany. β -Glukany mají hlavní řetězec tvořený glukózou vázanou $\beta(1-3)$ glykosidovou vazbou a jsou podle původu více či méně větveny vazbou $\beta(1-6)$. β -Glukany jsou součástí buněčných stěn rostlin, mikroorganismů a vyšších hub. Poměrně vyšší obsah těchto polysacharidů mají nesladovníkové ječmeny [24]. β -Glukany příznivě ovlivňují imunitní systém člověka, snižují hladinu cholesterolu v krvi, takže tyto polysacharidy mají v současné době uplatnění v potravinářských doplňcích, avšak intenzivně se ověřuje jejich využití ve farmacii. β -Glukany jsou také součástí kosmetických krémů, kde mají za úkol vázat vodu, působí jako antioxidanty a uklidňují podrážděnou pleť. Byla prokázána protinádorová aktivita houbových glukanů, působily preventivně proti vzniku metastáz [23]. Tento mechanismus

glukanů, ještě není přesně znám ale je nepochybné, že polysacharidy z hub neatakují rakovinné buňky přímo, ale aktivují imunitní systém. β -Glukany lze dále využít jako prebiotika. Tabulka účinků β -glukanů je uvedena v příloze PI. [25].

Tabulka 4: Některé β -D-(1–3)-glukany s významnou antinádorovou aktivitou [1, 26]

Název β -glukanu	Zdroj	
	Latinský název	Český název
Pachynan	<i>Poria cocos</i>	Pórnatka kokosová
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kvasinka pивní
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	Houževnatec jedlý
Pleuran	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Hlíva ústřičná
Skleroglukan	<i>Sclerotium gluconicum</i>	Hlízenka obecná
Tylopilan	<i>Tylophilus felleus</i>	Hřib žlučník
Flammulin	<i>Flammulina velutipes</i>	Penízovka sametonohá

- Pektiny

Pektiny jsou částečně metylované poly-D-galaktouronové kyseliny s vazbami α (1–4), tvoří komplexy s celulórou (pektocelulórou) i s jinými polysacharidy (arabinany). Pektin je v přírodě součástí buněčné stěny rostlin a patří nejen k nejrozšířenějším polysacharidům v přírodě, ale podobně jako škrob nebo deriváty celulózy, se široce používá v potravinářském průmyslu jako želírující látka, v konzervářském průmyslu k přípravě džemů, marmelád. Pektin snižuje obsah cholesterolu v krvi a má také schopnost vázat ionty těžkých kovů. V současné době se pektiny uplatňují i v prevenci cévních onemocnění [19]. Pektin je v lidském těle dobře fermentovatelný substrát, proto je rozštěpen již v přední části tlustého střeva. Chemická derivatizace pektinu může snížit jeho dostupnost pro mikroorganismy a modifikovaný citrusový pektin by mohl být fermentován podél celého tlustého střeva a tím ho chránit. Amidace pektinu navíc zvýší jeho afinitu k žlučovým kyselinám a tukům [23]. Dalším příkladem využití modifikovaného citrusového pektinu spočívá v tom, že inhibuje působení galectinu 3, což je živočišný lektin, na který se selektivně váží β -galaktosidázové zbytky. Tento protein reguluje růst buněk, podporuje adhezi nádorových

buněk na zdravé tkáni, proliferaci buněk, angiogenezi a má anti-apoptický účinek. Mechanismus účinku modifikovaného citrusového pektinu spočívá v blokaci tohoto proteinu a zabránění adheze nádorových buněk na zdravých tkáních. Dále vykazuje apoptický účinek [27, 28].

2 IZOLACE A ČIŘENÍ SACHARIDŮ

Sacharidy z potravinářských surovin a potravin se většinou izolují extrakcí. Jako extrakční činidlo se používá voda nebo 80% etanol, který je vhodnější u vzorků, kde může docházet k enzymovým změnám. Při použití vody jako extrakčního činidla se předchází enzymovým změnám přidáním malého množství chloridu rtuťnatého. Cukerné roztoky získané extrakcí nejsou zpravidla ještě použitelné pro další stanovení. Účelem čiření je odstranění opticky aktivních látek z roztoků cukru a odbarvení roztoku. Čiřidlo nesmí absorbovat cukry. Ideální čistící prostředek neexistuje, jeho použití se řídí druhem analyzovaného materiálu a zvolenou metodou stanovení cukrů. Adsorbenty jako hydroxid hlinitý a infusoriová hliníka (křemelina) mají převážně malý čiřící efekt, adsorbenty s vyšší adsorpční mohutností naproti tomu dobře odbarvují, ale při tom zároveň částečně adsorbují, především redukující cukry. Jako čistících prostředků se používá jednak látek, které srážejí koloidní látky, jednak se využívá adsorpce koloidních látek na vhodné sorbenty. Čiřidla se rozdělují na chemická a fyzikální [30, 31].

2.1 Izolace sacharidů etanolem

Rozpustné sacharidy přecházejí do roztoku 80% etanolu. Metoda je vhodná pro všechny druhy potravinářských materiálů. Odváží se 5 až 10 g jemně rozemletého vzorku a extrahuje 80% etanolem při laboratorní teplotě za míchání. Potom se extrakt zfiltruje, k nerozpustnému zbytku se přidá další podíl 80% etanolu a zahřívá se na vroucí vodní lázni pod zpětným chladičem. Jestliže je tento etanolový podíl po filtraci ještě znatelně zbarven, provede se další extrakce v Soxhletově extrakčním přístroji. Etanolové filtráty se spojí a doplní na určitý objem a zfiltrují se. V alikvotní části takto připraveného extraktu se odstraní etanol odpařením na vodní lázni, odparek se rozpustí v daném množství vody a zahřeje se na 80 °C, čímž se vysrážejí balastní nerozpustné látky. Tekuté vzorky se zahustí do sirupovité konzistence a dále zpracovávají jako etanolové extrakty [30, 31].

2.2 ČIŘIDLA CHEMICKÁ

2.2.1 Číření neutrálním octanem olovnatým

Roztok neutrálního octanu olovnatého (35%) se přidává ke vzorku v takovém množství, až se přestane tvořit sraženina, k dokonalému vysrážení balastních látek se přidává ještě malý nadbytek čířidla. Jestliže se roztok zakalí tvorbou uhličitanu olovnatého, odstraní se 10% hydrogenfosforečnanem sodným, buď před filtrací nebo až ve filtrátu. Při tomto způsobu číření se odstraní všechny opticky aktivní organické kyseliny, avšak odstranění bílkovin je nedokonalé. Slouží např. jako čířidlo pro invertní cukr [29, 30, 31].

2.2.2 Číření zásaditým octanem olovnatým

Používá se ho nejvíce v cukrovarnické analytice, neboť velmi dobře odstraňuje bílkoviny i všechny opticky aktivní kyseliny z neutrálních nebo slabě alkalických šťáv. Jeho účinnost klesá v kyselém prostředí [29, 30, 31].

2.2.3 Číření podle Herlese

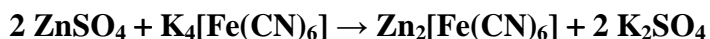
Podstatou čířidla je zásaditý dusičnan olovnatý, který vzniká smísením dvou roztoků dusičnanu olovnatého a hydroxidu sodného. Aby se dosáhlo velké čířící schopnosti, přidá se k roztoku nejdříve určitý podíl roztoku dusičnanu olovnatého, dobře se rozmíchá a potom se přidá stejný podíl roztoku hydroxidu sodného. Po půlhodinovém stání se roztok zfiltruje. Množství čířidla závisí na použité metodě a na množství přítomných nečistot. Čířidlo je vhodné pro roztoky slabě kyselé, neutrální i slabě alkalické. Silně alkalické roztoky je třeba předem zneutralizovat zředěnou kyselinou octovou na fenolftalein [29, 30].

2.2.4 Číření kyselinou fosfowolframovou

Kyselina fosfowolframová se používá jako 5% roztok od 2 ml do 10 ml na 100 ml roztoku, podle množství nečistot. Je zvláště výhodná pro kyselé roztoky, např. pro roztoky škrobu. Dobře odstraňuje bílkoviny a jejich štěpné produkty [29, 30].

2.2.5 Číření podle Carezze

Při tomto postupu je dosaženo čířícího účinku vytvořením objemné sraženiny kyanoželeznatanu zinečnatého v cukerném roztoku. Používá se 15% hexakyanoželeznatan draselný (Carezzův roztok I) a 30% síran zinečnatý (Carrezův roztok II).



Toto čířidlo má vysokou účinnost zvláště v kyselém prostředí. Neutrální a alkalické roztoky je nutno nejdříve okyselit mírně zředěnou kyselinou octovou. Carrezovo činidlo dokonale odstraňuje bílkoviny, méně slizovité látky [29, 30].

2.3 Čířidla fyzikální

Tato čířidla mají význam tam, kde roztoky i po chemickém vyčechení jsou velmi tmavé nebo zakalené, takže není možno použít pro stanovení sacharidů polarimetrické metody. Fyzikálním čířidlem je např. karbofin, křemelina aj. Tyto látky se ovšem nesmějí přidávat v přebytku, protože by se na ně adsorboval cukr.

Další čířidla: měniče iontů (odstranění anorganických rušících solí, aminokyselin...), tanin, hydroxid hlinitý [29, 30].

3 CHEMICKÉ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ

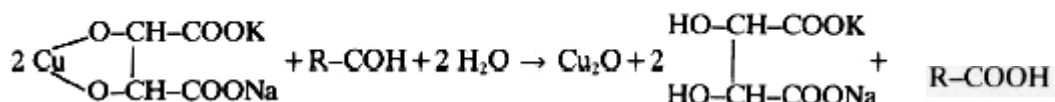
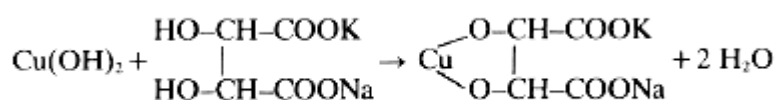
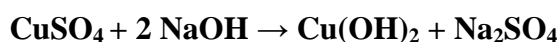
3.1 Titrační metody

Redukující cukry vyredukuje ionty stříbrné v amoniakálním prostředí na kovové stříbro nebo v alkalickém prostředí měďnatých iontů na oxid měďný Cu_2O . Dále lze pro stanovení využít metod na bázi Cu_2O nebo přebytku Cu^{2+} . V potravinářské praxi se na stanovení redukujících cukrů chemickými metodami používají hlavně Bertrandova, Schoorlova titrace. Neredukující cukry je nejprve potřeba enzymaticky nebo chemicky převést na redukující nebo je stanovit fyzikálně–chemickými metodami [31].

3.1.1 Metody založené na redukčních schopnostech sacharidů

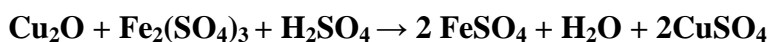
3.1.1.1 Bertrandova metoda

Jedná se o stanovení redukujících cukrů, které využívá tvorby oxidu měďného redukcí Fehlingova činidla (Fehling I – CuSO_4 , Fehling II - vínan sodnodraselný a NaOH) a jeho následnou nepřímou manganometrickou titrací. Smícháním obou roztoků se vytvoří tzv. Fehlingův komplex.



Ten se po přidání čirého vzorku za varu redukuje na červený oxid měďný, který dobře sedimentuje. Reakce není přesně stechiometrická, proto je důležité dodržet podmínky stanovení. Při redukci vzniká oxid měďný, příslušné cukerné kyseliny (např. kyselina glukonová) a regeneruje se vínan sodnodraselný. Přebytek Fehlingova činidla se odstraní dekantací horkou vodou a zbylý čistý oxid měďný se rozpustí v roztoku $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ v kyselině sírové. Měďné ionty se zoxidují na měďnaté a vznikne ekvivalentní množství Fe^{2+} , které se stanoví manganometricky v silně kyselém prostředí. Spotřeba KMnO_4 je úměrná množství vyre-

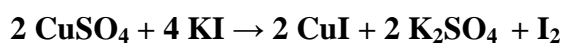
dukovaného Cu_2O a tím i množství redukujících sacharidů. Spotřebu je třeba korigovat na slepý pokus.



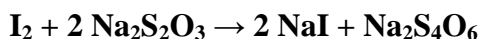
Na podobném principu je založena gravimetrická metoda. Sraženina se přefiltruje přes porcelánový filtrační kelímek, promyje vodou, etanolem a dietylerem, vysuší při $105\text{ }^\circ\text{C}$ přesně 45 minut a zváží. Obsah cukrů se určí z tabulek [29, 30, 31].

3.1.1.2 Schoorleho metoda

Redukujícími sacharidy se redukuje dvojmocná měď Fehlingova činidla na oxid měďný. Okyselením kyselinou sírovou se z komplexu uvolní nadbytečné měďnaté ionty, které se pak redukují jodidovými ionty na měďné, za vzniku elementárního jódu. Reakcí měďných iontů s nadbytečným jodidem draselným vzniká ihned těžce rozpustný jodid měďný [3, 29, 30, 31].



Elementární jód, který se při reakci uvolnil, se titruje roztokem thiosíranu sodného:



3.1.1.3 Kolthoffova metoda

Používá se pro stanovení aldóz vedle ketóz. Aldózy se oxidují ve slabě alkalickém prostředí na příslušné kyseliny. Ketózy, případně látky s intramolekulárně vázanou aldehydickou skupinou (př. sacharóza) se za těchto podmínek neoxidují. Do vyčiřeného základního roztoku cukrů se přidá roztok jódu a NaOH. Glukóza se oxiduje na tmavém místě 3 až 10 minut a nezreagovaný jód se následně stanoví thiosíranem sodným na škrobový maz. Podobně se provádí i slepý pokus, kde se místo vzorku pipetuje destilovaná voda. Reakce probíhá podle následující rovnice:



Stejným principem je možné stanovit i fruktózu vedle aldóz s tím rozdílem, že se fruktóza po oxidaci aldóz stanoví jako redukující cukr. Fruktózu je možné vypočítat jako rozdíl re-

dukujících cukrů a glukózy za předpokladu, že vzorek obsahuje jen tyto dva redukující cukry [29, 31].

Tabulka 5: Schoorlova tabulka závislosti spotřeby 0,05 M thiosíranu sodného na koncentraci některých cukrů [3]

0,05 M Na ₂ SO ₄ [ml]	Glukóza [mg]	Fruktóza [mg]	Mannóza [mg]	Xylóza [mg]	Sacharóza [mg]
1	3,2	3,2	3,1	3,1	3,1
2	6,3	6,4	6,3	6,3	6,2
3	9,4	9,7	9,5	9,5	9,3
4	12,6	13,0	12,8	12,8	12,4
5	15,9	16,4	16,1	16,1	15,6
6	19,2	20,0	19,4	19,4	18,8
7	22,4	23,7	22,8	22,8	22,0
8	25,6	27,4	26,2	26,2	25,2
9	28,9	31,1	29,6	29,6	28,4
10	32,3	34,9	33,0	33,0	31,7

3.1.2 Metody založené na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů cukrů

3.1.2.1 Stanovení neutrálních cukrů podle Duboise

Tato metoda je založená na dehydrataci cukrů kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymetylfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky [3, 29, 31].

3.1.2.2 Stanovení redukujících cukrů mikrometodou podle Somogyiho

Oxid měďný vyredukovaný redukujícími cukry se přidavkem arsenomolybdenového činidla podle Nelsona převede na barevný komplex, jehož zbarvení se proměří spektrofotometricky, při vlnové délce 500 nm. Metoda je udávána s přesností $\pm 0,01$ mg [29, 32].

4 FYZIKÁLNÍ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ

4.1 Gravimetrická metoda

Touto metodou je možné stanovit škrob po extrakci interferentů vodou, převedení na rozpustné formy a následné srážení etanolem. Sraženina se promyje, vysuší a zváží. Dále je možné pomocí gravimetrie stanovit obsah celulózy, kdy celulózu oddělujeme od doprovodných látek kyselou nebo alkalickou hydrolyzou a nehydrolyzovatelný zbytek se následně vysuší a zváží [31]. Pro běžné stanovení vlákniny byla vypracována metoda gravimetrická a metoda enzymově gravimetrická [33].

4.1.1.1 Podstata analytické metody

Analyt ve vzorku se srážením vhodným činidlem kvantitativně převede na málo rozpustnou dobře definovanou sloučeninu. Z její hmotnosti zjištěné vážením a z jejího známého stechiometrického složení se obsah analytu stanoví. Málo rozpustná sloučenina musí mít určité vlastnosti, aby jí bylo možno pro gravimetrické stanovení použít:

- musí být vyloučitelná v čisté formě,
- musí být snadno zfiltrovatelná,
- musí mít definované chemické složení,
- musí být dostatečně stálá [31, 34].

4.2 Denzitometrické metody

Pro stanovení cukrů se používají fyzikální metody, denzitometrické měření hydrometrem a pyknometrem. Metoda je vhodná pro stanovení obsahu cukru v sirupech a zdánlivé sušiny.

4.2.1.1 Podstata analytické metody

- Stanovení pomocí pyknometru

Stanovení je založeno na měření specifické hmotnosti (hmotnosti objemové jednotky vzorku) ve standardizované nádobce o definovaném objemu při teplotě 20 °C vztažené na specifickou hmotnost vody (1,000 při 15,5 °C). Specifická hmotnost tekutin je často udávána

s indexem 20/20 nebo 20/15, který udává teplotu kapaliny a vody při měření. Při praktické realizaci se počítá podle vzorce:

$$\rho = \frac{(m_s - m_0)}{m_w - m_0},$$

kde:

m_0 - hmotnost suchého a čistého pyknometru – [g],

m_w - hmotnost pyknometru naplněného vodou – [g],

m_s - hmotnost pyknometru naplněného sledovanou tekutinou (m_s) – [g],

ρ – hustota – [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$].

- Stanovení pomocí hustoměru

Stanovení pomocí hustoměru je založeno na Archimédově zákonu, který říká, že těleso ponořené do kapaliny je nadlehčováno silou, která je rovna hmotnosti kapaliny tělesem vytlačené. Hmotnost kapaliny vztažena na objemovou jednotku se měří jako objem vytlačený tělesem jednotkové hmotnosti (hustoměrem). V kapalinách s nižší hustotou se hustoměr ponoří více než v kapalinách s vyšší hustotou. K měření se používají speciální hustoměry, které jsou opatřeny stupnicí v procentech a nazývají se sacharometry. Stupnice pořízená empiricky je umístěna v úzkém krčku hustoměru [31, 34].



Obrázek 10: Sacharimetr [35]

4.3 Optické metody

4.3.1 Refraktometrická metoda

Pro stanovení cukrů v čistých cukerných roztocích lze použít metodu refraktometrickou. Jestliže roztok obsahuje směs cukrů, popřípadě s menším množstvím jiných látek, hovoříme raději o stanovení refraktometrické sušiny [30].

- Princip metody

Metoda je založena na měření indexu lomu látek. Prochází-li paprsek monochromatického záření rozhraním dvou transparentních prostředí, mění se jeho rychlost a směr, paprsek se láme. Index lomu, n , je roven poměru rychlostí světla v těchto dvou prostředích:

$$n = \frac{v_2}{v_1}$$

V praxi bývá jedním z prostředí vzduch a druhým analyzovaná látka (roztok). Rychlost šíření světla prostředím je obtížné měřit přímo, lze však měřit změnu jeho směru při průchodu rozhraním mezi oběma prostředími. Pro index lomu analyzované látky platí Snellův zákon lomu:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

kde α (úhel dopadu) a β (úhel lomu) jsou úhly, které svírá paprsek světla s kolmicí dopadu. Měření indexu lomu je založeno na určování mezního úhlu β_m , odpovídajícího lomu paprsku přicházejícího rovnoběžně s rozhraním. Jemu přísluší úhel dopadu $\alpha = 90^\circ$. Měření se provádí na přístrojích zvaných refraktometry [34].



Obrázek 11: Abbeho refraktometr [35]

4.3.2 Polarimetrická metoda

4.3.2.1 Podstata analytické metody

Polarimetrická stanovení jsou založena na měření optické aktivity, tj. na schopnosti některých látek stočit o určitý úhel rovinu polarizovaného světla procházejícího roztokem. Pomocí optické otáčivosti lze stanovit cukry ve směsi s látkami opticky inaktivními. Optická aktivita je dána přítomností asymetrického uhlíku v molekule látky. Úhel stočení roviny

polarizovaného světla při jeho průchodu roztokem opticky aktivní látky závisí na charakteru látky, na tloušťce vrstvy, na koncentraci roztoku, na teplotě a na vlnové délce použitého světla. Aby bylo možno posuzovat látky podle jejich optické aktivity, byla jako její měřítko zavedena tzv. **měrná otáčivost**. Je to úhel, o který se otočí rovina polarizovaného světla po průchodu 100 mm vrstvou roztoku o koncentraci $1\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Měření se provádí při teplotě $20\text{ }^\circ\text{C}$ obvykle v bílém světle. Při měření bezbarvých roztoků se doporučuje použít dichromanový filtr (roztok dichromanu draselného) nebo zdroj monochromatického světla (sodíkové výbojky) [34].

Tabulka 6: Specifická optická otáčivost některých sacharidů ve $^\circ$ [36]

Sacharid	Specifická rotace ($^\circ$)	Sacharid	Specifická rotace ($^\circ$)
Dextrin	+ 194,80	Maltóza	- 137,50
D-fruktóza	- 93,78	Rafinóza	+ 123,01
D-galaktóza	+ 80,47	Sacharóza	+ 66,53
D-glukóza	+ 52,74	Škrob	+ 196,40
Invertní cukr	- 20,59	Xylóza	+ 196,40
Laktóza	+ 55,30		

4.3.2.2 Příklady využití refraktometrické metody

- Stanovení sacharózy přímou polarizací

Zjistí se optická otáčivost sacharózy po inaktivaci opticky aktivních redukujících cukrů hydroxidem barnatým.

- Stanovení sacharózy metodou dvojího polarimetrování

Touto metodou se stanovuje obsah sacharózy v roztoku za přítomnosti jiných opticky aktivních látek. Roztok se polarimetruje před inverzí a po ní. Sacharóza se štěpí na glukózu a fruktózu podle rovnice:



Inverze se dosahuje působením kyseliny při vyšší teplotě. Hodnota polarizace po inverzi závisí na koncentraci použité kyseliny, na teplotě a době působení kyseliny a na přesném dodržování pracovního postupu.

- Postup

Vzorek se rozpustí a vyčechá roztokem zásaditého octanu olovnatého. Po filtraci a temperaci na 20 °C se polarizuje ve 200 mm trubici. Výsledek vynásobený dvěma dává přímou polarizaci (P). K dalšímu podílu filtrátu se přidává kyselina chlorovodíková a obsah se zahřívá 3 minuty na teplotu 67 °C, na které se musí udržovat přesně 5 minut. Poté se ochladí na 20 °C, zfiltruje. Polarizuje se ve 200 mm trubici, nález se zdvojnásobí (I). Jestliže je roztok k polarizování tmavě zbarven, odbarvuje se pomocí aktivního uhlí [30].

- Stanovení škrobu

Isolace škrobu se provádí po důkladné homogenizaci vzorku a převedení škrobu do roztoku zředěnou HCl zahříváním na vodní lázni za neustálého míchání. Koncentrace HCl závisí na druhu škrobu a je nutno ji dodržet (obiloviny 1,124%, brambory 0,4215%). Před měřením je nutno odstranit nerozpuštěné částice čířením pomocí Carezzova roztoku. Čirým filtrátem se naplní polarimetrická trubice o délce 200 mm a změří se úhel stáčení polarizovaného světla. Údaj na stupnici se vynásobí měrnou otáčivostí dle druhu škrobu (1,775 pro bramborový, 1,897 pro pšeničný atd.) [30, 31].

4.4 Chromatografické metody

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují (separují) složky obsažené ve vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Pohybem přes stacionární fázi je vzorek mobilní fází unášen. Složky vzorku se na stacionární fázi poutají silněji či slaběji a tím se postupně složky od sebe separují [37].

Pro jednodušší dělení skupin cukrů, například pro oddělení mono- a disacharidů lze použít chromatografii na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC). Výhodnější je použití vysokotlakého uspořádání TLC dávkováním mobilní fáze pomocí vysokotlakých čerpadel (HPTLC). V současné době je ale chromatografie na tenkých vrstvách je zcela nahrazena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) a jejími speciálními technikami jako HILIC (Hydrofilní interakční chromatografie,

Hydrophilic Interaction Chromatography) a IEC (Iontově-výměnná chromatografie, Ion Exchange Chromatography) komplexů sacharidů s kyselinou boritou. Z dalších separačních metod se zřídka používá plynová chromatografie, převážně z důvodů nízké těkavosti cukrů [31].

Tabulka 7: Srovnání HPLC a GC [36]

HPLC	GC
vhodná i pro výše molekulární sacharidy	vhodná zvláště pro monosacharidy
kratší čas analýzy	větší citlivost detekce
vyšší výtěžnost, lepší správnost	je možné separovat α - a β - anomery
jednodušší příprava vzorku – přímá analýza	je nutná derivatizace, větší pracnost

4.4.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Největší vliv na hodnotu R_f sacharidů má velikost molekuly (počet monosacharidových jednotek) a počet uhlíků v molekule. Podstatně se uplatňuje také prostorové uspořádání hydroxylů, jejich počet a charakter cyklické formy anomeru. Sacharidy jsou velmi málo rozpustné v organických rozpouštědlech, R_f jsou čísla vesměs malá, je-li mobilní fází organické rozpouštědlo. Ze sorbentů se pro TLC nejčastěji používá fáze na bázi křemeliny nebo mikrokryalické celulózy, případně silikagel, u něhož se doporučuje předchozí impregnace tenké vrstvy pufrém. Podle typu sorbentu je třeba cukry ve vzorku převést na vhodné deriváty (např. při použití silikagelu převedeme cukry na deriváty furfuralu, které následně kondenzují s hydrogenftalátem anilinu). Aldopentózy dávají červenohnědé zbarvení, aldohexózy hnědé zbarvení s nádechem do žluta. Ketózy dávají nepatrné zbarvení a je nutno je detekovat jinými metodami). Jako vyvíjecí směsi jsou nejčastěji používány směsi organických rozpouštědel a kyselin, například 1-butanol : CH_3COOH : H_2O v poměru 4 : 1 : 5, 1-butanol : pyridin : H_2O v poměru 6 : 4 : 3, etylacetát : CH_3COOH : H_2O v poměru 3 : 1 : 3, etylacetát : isopropanol : voda 3 : 2 : 1. Obdobně lze postupovat při papírové chromatografii [3, 29].

4.4.2 HPLC

K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor [37].

4.4.2.1 Podstata HPLC

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Aby docházelo k výše uvedené distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unáší složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se může natolik blížit rovnováze, že distribuci složky A mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , což je poměr rovnovážných koncentrací $[A]$ ve dvou koexistujících fázích, přičemž podle konvence se koncentrace složky ve fázi stacionární $[A]_S$ uvádí v čitateli:

$$K_D = \frac{[A]_S}{[A]_m} = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_S},$$

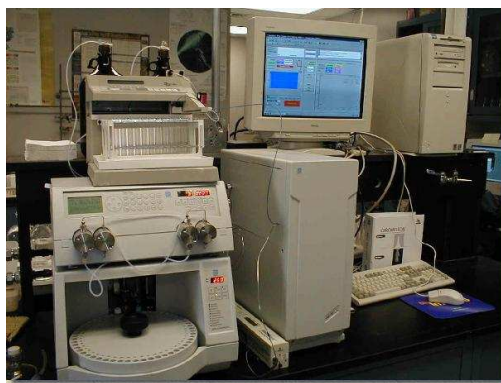
kde $(n_A)_S$ a $(n_A)_m$ jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi, V_S a V_m jsou objemy stacionární a mobilní fáze. Poměr látkového množství solutu ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství ve fázi mobilní za podmínek udává kapacitní poměr k (resp. kapacitní faktor):

$$k = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_m} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_m} = K_D \beta,$$

kde poměr V_S/V_M udává tzv. fázový poměr β (objemové veličiny u fázového poměru můžeme vztáhnout pouze na absorpční chromatografii). Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas t_R nebo eluční (retenční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah:

$$V_R = F_m \cdot t_R,$$

kde F_m je objemová rychlost [$\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$] [38].



Obrázek 12: HPLC [36]

4.4.2.2 Čerpadla HPLC

Nejvíce se používají čerpadla pístová, která pracují za konstantního průtoku, v nichž se kapalina z malé pístní komory vytlačuje a nasává zpět přes dva zpětné ventily, z nichž sací je spojen se zásobníkem mobilní fáze a výtlačný s kolonou. Výhodou těchto čerpadel je možnost čerpání mobilní fáze bez přerušení. Nevýhodou je vznik tlakových pulsů. Ty jsou z části eliminovány zařazením tlumiče pulsů nebo zařazením většího počtu čerpacích bloků. Pístová čerpadla se dvěma, třemi hlavami se používají v dnešní době nejvíce [39]. V kapalinové chromatografii se využívá dvou módů čerpání mobilních fází:

- izokratický, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná), alternativně lze čerpat zároveň ze dvou až čtyř rezervoárů při konstantním poměru složek a konstantním průtoku,
- gradientový mód, kdy v průběhu jedné analýzy lze programovaně měnit složení i průtok mobilní fáze. Kvalitní chromatografické zařízení synchronizuje činnost ventilů a čerpadel tak, aby gradientový profil byl reprodukovatelný [36].

4.4.2.3 Dávkovací zařízení

U HPLC může zařízení pro dávkování vzorků na kolonu velice výrazně ovlivnit účinnost separačního procesu. Existují tři odlišné způsoby dávkování vzorku na kolonu:

- přímý nástřik vzorku na kolonu injekční stříkačkou,
- nástřik vzorku prostřednictvím ventilu se smyčkou,

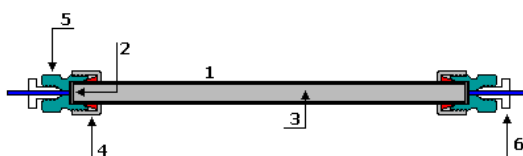
- dávkování vzorku pomocí automatických dávkovačů.

4.4.2.4 Kolony HPLC a stacionární fáze

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3 - 10 μm , o délce 5 - 30 cm. Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fázi, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky:

- musí být chemicky inertní,
- musí odolávat poměrně vysokým tlakům,
- vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký.

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečeným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6) [38].



Obrázek 13: Kolona HPLC [38]

Chromatografické kolony se podle použití dělí na mikrokolony, preparativní, analytické. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založené na anorganické matrici (silikagel), na nichž mohou být chemicky vázané nebo zakotvené různé stacionární fáze [39]. Při analýze sacharidů se používají kolony na bázi sulfonované divinylbenzenové pryskyřice v šesti kationtových cyklech (SUPELCOGEL). Dalším sorbentem je silikagel s více než 40 vázanými fázemi (SUPELCOSIL) [40].

Jako sorbentů se používá též křemene, oxidu zirkoničitého nebo polymeru (Prevail Carbohydrate). Na běžných stacionárních fázích je separace sacharidů nedokonalá, proto byla

zavedena vhodná chromatografická technika s využitím chirální fáze. Přítomností opticky aktivní látky ve stacionární nebo mobilní fázi dojde k interakci daného optického izomeru obsaženého ve vzorku a tím i ke zvýšení retence na koloně [39]. Pro vysoceúčinnou analýzu sacharidů se používá chirální kolona apHera NH₂ Amino, která je na bázi vinylalkohol kopolymeru [40].

4.4.2.5 Derivatizace pro sacharidy

Derivatizace v HPLC se používá z několika ryze praktických důvodů:

- zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce,
- zvýšení rozlišení nebo umožnění separace,
- zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně.

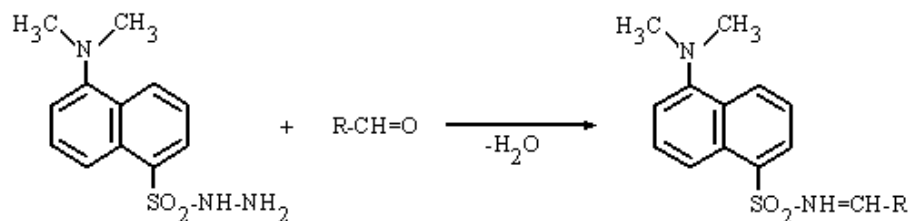
Způsoby derivatizace můžeme rozdělit na tři kategorie:

- předkolonová derivatizace (Pre-column Chromatography); chemická reakce probíhá před kolonou,
- postkolonová derivatizace (Post-column Chromatography); chemická reakce probíhá za kolonou,
- derivatizace na koloně; chemická reakce probíhá přímo v koloně.

Jako derivatizačních činidel pro stanovení sacharidů se používají substituované hydraziny (činidla pro karbonylovou skupinu) a činidla pro hydroxyderiváty.

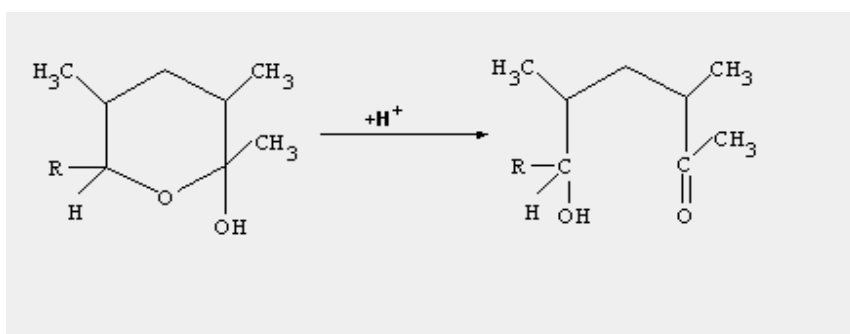
- Dansylhydrazin (Dns-H)

Aldehydy a ketony reagují se substituovanými hydraziny za vzniku hydrazonů a jsou analogické 2,4-dinitrofenylhydrazinu. Dansylhydrazin se připravuje reakcí koncentrovaného dansylchloridu s velkým nadbytkem monohydrátu hydrazinu v acetonu. Po ukončení reakce se reakční směs zředí vodou a produkt se extrahuje etylacetátem. Dansylhydrazin je rozpustný v organických rozpouštědlech, teplota tání 126 °C. Reakce Dns-H s karbonylovou skupinou probíhá v etanolické HCl za teploty varu asi 10 minut. Reakce je ukončena po ochlazení na laboratorní teplotu přidávkem pyruvátu a deriváty jsou extrahovány do dietylétheru. Bylo popsáno rovněž použití kyseliny trichloroctové v benzenu jako reakčního prostředí místo etanolické HCl.



Obrázek 14: Reakce vzniku hydrazinů [38]

Dále je možvo využít otevření cyklického hemiketalu v kyselém prostředí na otevřený hydroxyaldehyd, který obsahuje volnou karbonylovou skupinu, která může dále vstupovat do dalších reakcí. Reakce byla využita při stanovení maduramicinu v krmivech (fluoreskující derivát s excitačním maximem při 220 nm a emisním maximem 470 nm). Reakce karbonylové skupiny byla využita rovněž ke stanovení monosacharidů i polysacharidů. Fluoreskující deriváty mají excitační maxima závislá na složení derivátu - 240 nm a 360 - 370 nm a emisní maxima 525 - 540 nm.



Obrázek 15: Reakce hemiketalu v kyselém prostředí [38]

- 2-Difenylacetyl-1,3-indendion-1-hydrazin

2-Difenylacetyl-1,3-indendion-1-hydrazin reaguje rovněž s ketony a aldehydy za vzniku derivátů s excitačním maximem v rozmezí od 400 do 415 nm a emisním maximem kolem 525 nm.

- 4-Hydrazo-7-nitrobenzofurazan (Nbd-H)

Činidlo se připravuje obdobně jako Dns-H reakcí Nbd-Cl (4-chloro-7-nitrobenzofurazan) a nadbytkem hydrazinu a poskytuje deriváty obdobných vlastností. Výtěžek derivatizační reakce je asi 99 % .

- Acetylchloridy

Pro derivatizaci sacharidů a glykolů je vhodný benzoylchlorid. p-Nitrobenzoylchlorid je používán k derivatizaci mono-, di- a trisacharidů [38].

4.4.2.6 Detektory v HPLC

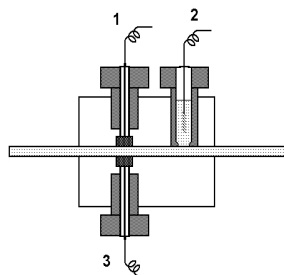
Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Nej-používanějšími detektory jsou refraktometrický, elektrochemický a hmotnostní.

- Refraktometrický detektor (Refractive Index Detector – RI) měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu [37].



Obrázek 16: Refraktometrický detektor [35]

- Elektrochemický detektor umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu. Obecně se tento detektor nehodí pro detekci gradientové eluce [39].



Obrázek 17: Elektrochemický detektor [38]

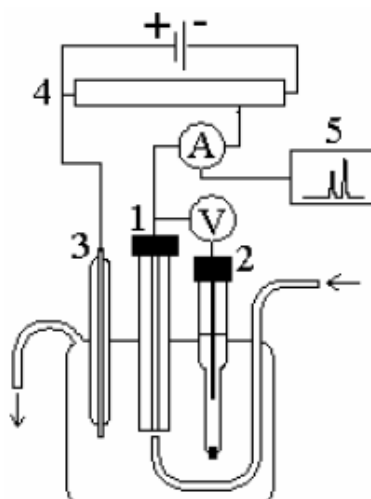
1 – pracovní elektroda, 2 – pomocná elektroda, 3 – referenční elektroda

- Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert – Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) [37]. Pro stanovení sacharidů v ovocných džusech se využívá spektrofotometrie v blízké – infračervené oblasti při vlnových délkách 1200 až 2450 nm [41].

- Amperometrický (polarografický) detektor měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Jako měrné elektrody se u amperometrických detektorů používají tuhé měrné elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny, mědi či jiného kovu. Povrch všech těchto materiálů se však zanáší produkty oxidace či redukce a nečistotami z mobilní fáze nebo vzorku a toto pak vyžaduje čištění těchto elektrod. U starších typů detektorů se toto čištění provádí mechanickým očištěním měrné elektrody po demontáži cely detektoru. U novějších typů se čištění provádí několikerým způsobem: otočení polaritý elektrodového systému, čímž dojde k rozpouštění vyloučených látek na povrchu elektrody, nebo vkládáním střídavého napětí na elektrodu (pulsní technika). Účinnost amperometrické elektrody je silně závislá na ploše povrchu znečištění díky elektrodepozicím a adsorpci, která na povrchu elektrody probíhá, z tohoto důvodu tudíž klesá i její analytický signál [38].



Obrázek 18: Amperometrický detektor [37]

Pro detekci sacharidů byl vyvinut aerosolový chemoluminiscenční detektor, který se používá jednak ve spojení s HPLC, ale i kapilární elektroforézou [42].

4.4.2.7 Identifikace a kvantitativní vyhodnocení

Identifikace se provádí porovnáním retenčního času analytu ve vzorku s retenčním časem kalibračního standardu. Další identifikační možností je přidavek standardu ke vzorku. Kvantitativní vyhodnocení se provádí metodou vnějšího standardu buď:

- odečtením koncentrace analytu z kalibrační křivky (tj. závislosti plochy, příp. výšky píku na koncentraci standardu v g.l^{-1} v rozsahu jednoho řádu, koncentrace analytu ve vzorku musí ležet uvnitř mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační přímky) a přepočtem na původní vzorek podle následujícího vztahu:

$$c_a = \frac{x \cdot V_a}{n}$$

- porovnáním plochy, případně výšky píku sledovaného analytu a standardu podobné koncentrace a přepočtem na původní vzorek podle následujícího vztahu:

$$c_a = \frac{c_{st} \cdot A_a}{A_{st} \cdot V_a} \cdot n, \text{ kde}$$

c_a - výsledná koncentrace analytu [g.kg^{-1} , popř. g.l^{-1}],

c_{st} - koncentrace standardu [g.l^{-1}],

A_a - plocha píku stanovovaného analytu,

A_{st} - plocha píku standardu,

x - hodnota koncentrace analytu odečtená z kalibrační křivky [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$],

V_a - objem roztoku vzorku po doplnění do odměrné baňky [l],

n - navážka vzorku [kg , popř. l] [43].

Pro výpočet hmotnostních % cukrů se užívá výraz:

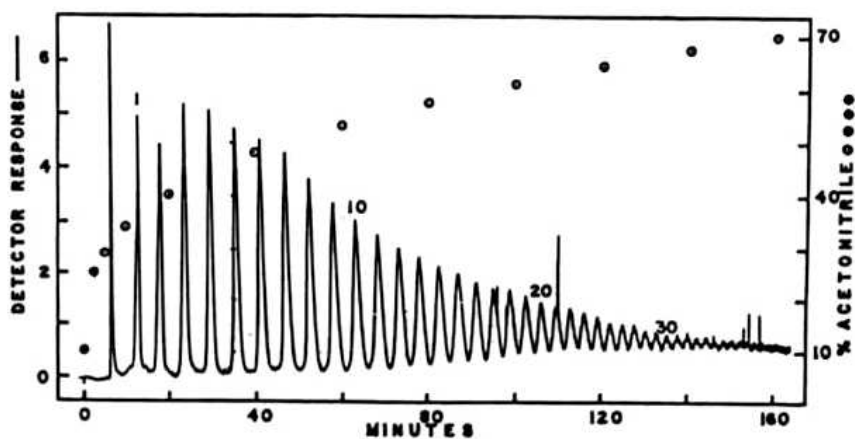
$$\% \text{cukru} = \frac{c \cdot V \cdot D \cdot 100}{w \cdot 1000}, \text{ kde}$$

c – výsledná koncentrace analytu,

V - původní objem,

D - je ředící faktor (může se lišit v závislosti na množství cukru, že každý je přítomen),

w - hmotnost vzorku v gramech [32].



Obrázek 19: Chromatogram částečně hydrolyzované amylozy, osa x je čas [min],
osa y je koncentrace acetonitrilu [%] [44]

4.4.3 Hydrofilní interakční chromatografie

Při separaci sacharidů se používá aminopropyllová fáze jako stacionární a mobilní fáze acetonitril a voda (7 : 3) ve spojení s refraktometrickým detektorem, UV detektorem při $UV < 200 \text{ nm}$ nebo ELSD detektorem (Evaporative Light Scattering, Odpařovací detektor).

V případě UV detekce je možné použít i gradientové eluce.

- Retenční mechanismus

Retenční mechanismus se může vysvětlit jako rozdělování solutu mezi na vodu bohatší stacionární fázi a na vodu chudší mobilní fázi. Stacionární fáze se tak chová jako „přenašeč“ vody, ale tento mechanismus má i své výjimky, které nejsou dostatečně prostudované. V případě separace sacharidů chromatografií HILIC, kdy se použijí chemicky vázané různé aminové fáze, dochází k různé retenci v závislosti na použitém chemicky vázaném ligandu. Jako druhý mechanismus se uplatňuje mechanismus iontové výměny, neboť mnohé stacionární fáze mají vlastnosti iontoměniče. Tento mechanismus může být s úspěchem použit při ovlivnění selektivity separace. K ovlivnění retence se používá také přísádek pufrů do mobilní fáze. Retence klesá se zvyšující se koncentrací solí. Vliv pH závisí na vlastnostech solutu; v případě že dochází k disociaci solutu retence se zvyšuje oproti neutrálním solutům.

- Stacionární fáze

Jako stacionární fáze se používá chemicky vázaný aminopropyl na silikagelu. Nevýhodou chemicky modifikovaného silikagelu je, že aminové skupiny vázané na silikagel dávají vznikat alkalickému prostředí v pórech silikagelu (koncentrace se pohybuje okolo $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Výsledné alkalické pH v pórech je příčinou, že dochází k pomalému rozpouštění silikagelu a hydrolyze chemicky vázané fáze. Jako alternativa se používá silikagel dynamicky pokrytý polyaminy (trietylentetramin nebo spermidin) nebo zesítněném polyaminy chemicky vázané na silikagel (polyvinylalkohol derivatizovaný polyaminy), které jsou hydrolyticky stabilnější. Jako další stacionární fáze se používá samotný silikagel, kde volné silanolové skupiny hrají roli středního iontoměniče. Mezi další stacionární fáze HILIC patří chemicky vázané fáze na silikagel jako je diol (glycidylpropyl) nebo acetamidopropylová fáze. K použitelným fázím pro HILIC je možné také zařadit neutrální hydrofilní polymerové fáze. Jsou to zejména hydrofilní metakrylátové fáze používané v GPC (Gel Permeation Chromatography, Gelová chromatografie). Povrch těchto stacionárních fází obsahuje polyolové skupiny, které jsou velmi hydrofilní.

- Mobilní fáze

Teoreticky je možné použít jako mobilní fáze všechny vodno-organické fáze. Typickou mobilní fází jsou směs acetonitril a voda nebo vodné pufrů. Obvyklá koncentrace acetonit-

rilu se pohybuje v rozmezí od 50 do 90 %, pro separaci sacharidů je 70% acetonitril optimální [38].

4.4.4 Iontově-výměnná chromatografie

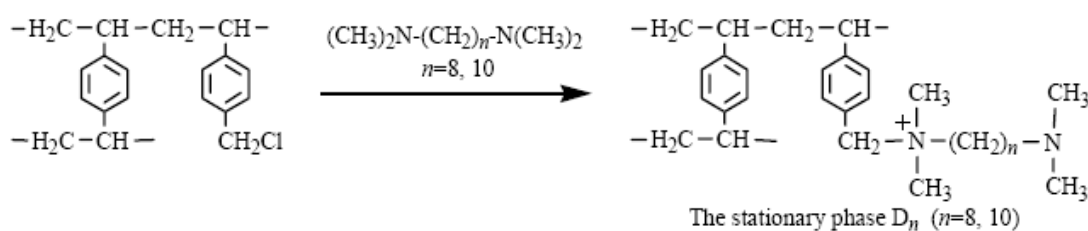
Pro tuto metodu lze použít libovolného kapalinového chromatografu, potřebná je pouze speciální kolona pro IEC [39].

4.4.4.1 Mechanismus stanovení

Stanovení je založeno na kombinaci několika procesů a to: iontové vyluce, iontové výměně, ligandové výměně, dělení podle velikosti molekuly, normální a obrácené (reverzní) rozdělovací chromatografii. Tento složitý mód interakcí se nazývá "iontem řízené rozdělování" (Ion-Moderated Partitioning). O tom, který z uvedených mechanismů separace převládá rozhoduje funkční skupina (silně $-SO_3H$ či slabě $-COOH$ kyselá) vázaná na skeletu nosiče a protion (forma) na ní vázaný (H^+ , Na^+ , Ca^{2+}). Při iontové výměně dochází k výměně příslušného iontu mezi mobilní fází a funkční skupinou na skeletu nosiče (stacionární fází). Ionty s větší afinitou k funkční skupině nosiče jsou eluovány později než ionty s nižší afinitou (např. glutamová kyselina je přes svou aminoskupinu pevněji vázána a tedy později eluována než kyselina glutarová, která aminoskupinu nemá). Při ligandové výměně se uplatňuje interakce protiontu vázaného na funkční skupině katexu a hydroxylových skupin analytu. Například vápenatá forma sorbentu umožňuje separaci α - a β - anomerů glukózy, kdežto vodíková forma nikoliv. Při dělení analytů podle velikosti molekuly jsou například trisacharidy eluovány dříve než disacharidy, zatímco monosacharidy jsou eluovány jako poslední. Menší molekula může pronikat do jemnějších pórů nosiče, zatímco větší molekula ne a je tedy dříve eluována z kolony [36].

4.4.4.2 Kolony v IEC a stacionární fáze

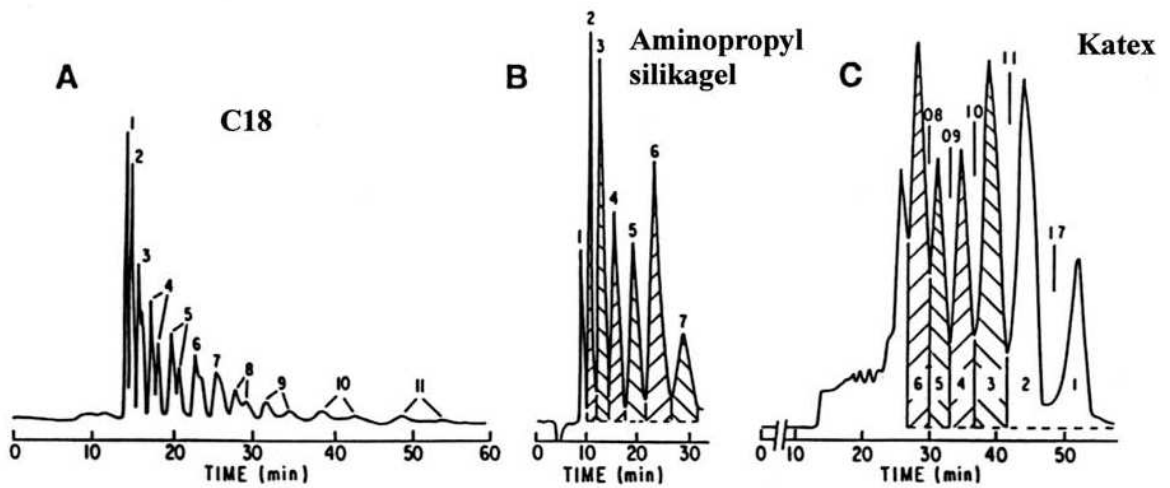
Při tomto stanovení se využívá jako stacionární fáze silikagel, který je méně častý a kopolymer styrenu a divinylbenzenu s funkčními skupinami $-SO_3H$, případně se jako stacionární fáze používá akrylát [45]. Pro HPLC s anion-výměnou se používají stacionární fáze D_8 a D_{10} , které vznikají reakcí porézní částice z chlorometylovaného kopolymeru styrendivinylbenzenu s N,N,N',N' -tetrametyldiaminooktanem a N,N,N',N' -tetrametyldiaminodekanem [46].

Obrázek 20: Stacionární fáze D_8 a D_1 [45]

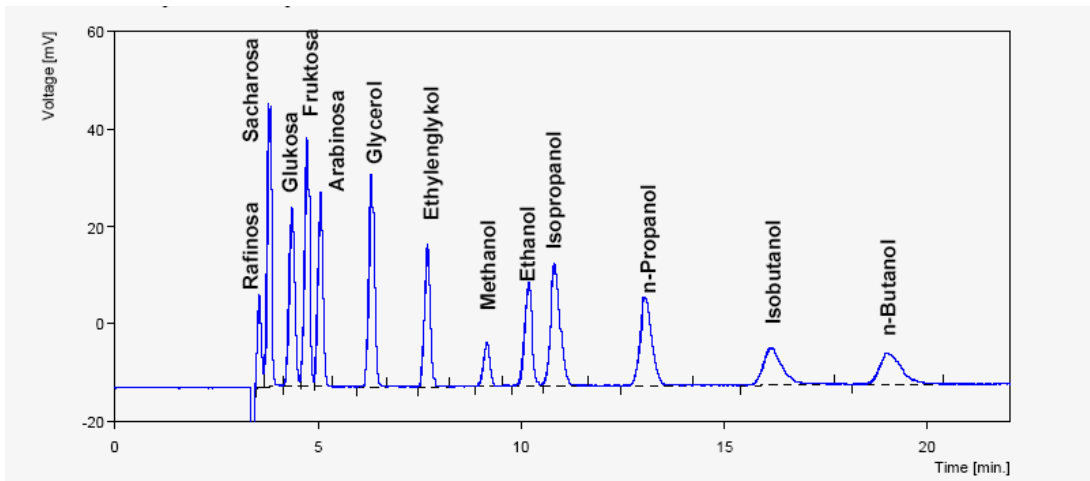
Dále pro anion-výměnou chromatografii se používá porézní monolit s kvartérními amin-funkcionalizovanými latexovými částicemi, nebo silně kyselého katexu (OSTION LGKS 0800 Ca^{2+} forma) [36, 47].

4.4.4.3 Stanovení mono-, di- a oligosacharidů vysoceúčinnou aniontovou chromatografií s pulzně- amperometrickou detekcí (HPAE-PAD)

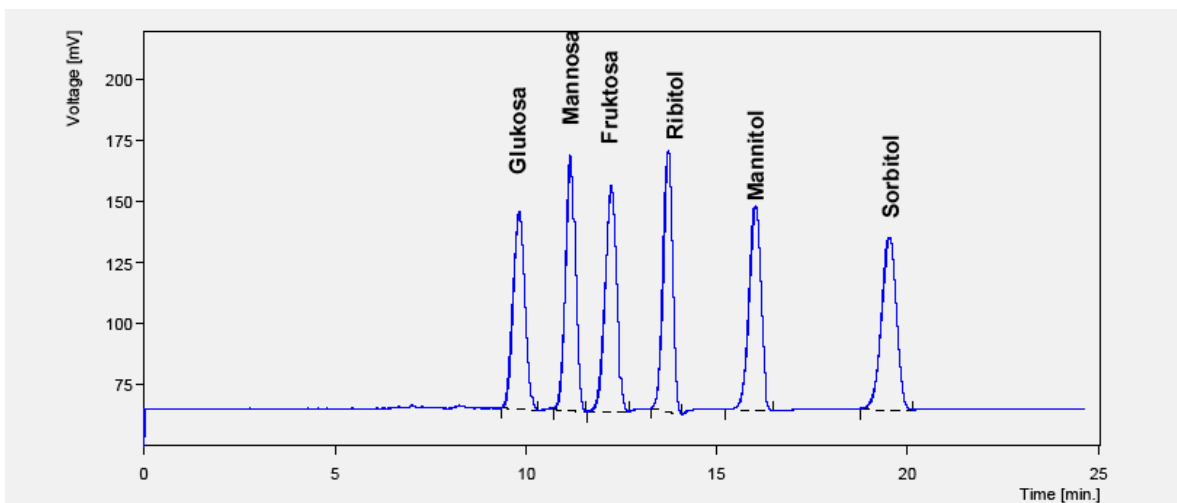
Sacharidy jsou za vysokého pH disociovány a lze je tedy separovat na anexových kolonách. Jejich pK_a závisí na strukturních vlastnostech molekul. Kolony Dionex CarboPac jsou schopny rozlišit jednotlivé mono-, di- a oligosacharidy podle jejich rozvětvení, izomerie vazeb, anomerace a sialylace. Mobilní fází při separaci mono- a disacharidů je hydroxid sodný nebo draselný, při analýze oligosacharidů se kombinuje v gradientu s octanem sodným. Tento separační systém je velmi selektivní a balastní látky z matrice stanovení neruší. Pulzně-amperometrická detekce umožňuje selektivní a vysoce citlivé stanovení. Disociované sacharidy jsou na povrchu zlaté elektrody oxidovány. Pulzní režim slouží k očištění povrchu od zplodin reakce a obnovení čistého povrchu pro detekci sacharidů. Odezvy analytů jsou pak dlouhodobě vysoce stabilní. Mez detekce se pohybuje v jednotkách pikomolů. HPAE-PAD (Vysoceúčinná aniontová chromatografie s pulzně- amperometrickou detekcí) je možné využít také jako semi-preparativní techniku. Přítomnost sodných iontů z eluentu v odebraných frakcích je však nežádoucí z důvodu možného rozkladu sacharidů. Odsolení eluentu se provádí membránovým odsolovačem zapojeným mezi detektor a sběrač frakcí. Membránový odsolovač nahrazuje sodné ionty v eluentu vodíkovými, takže sacharidy jsou přítomny v odebraných frakcích v prostředí vody nebo kyseliny octové [48].



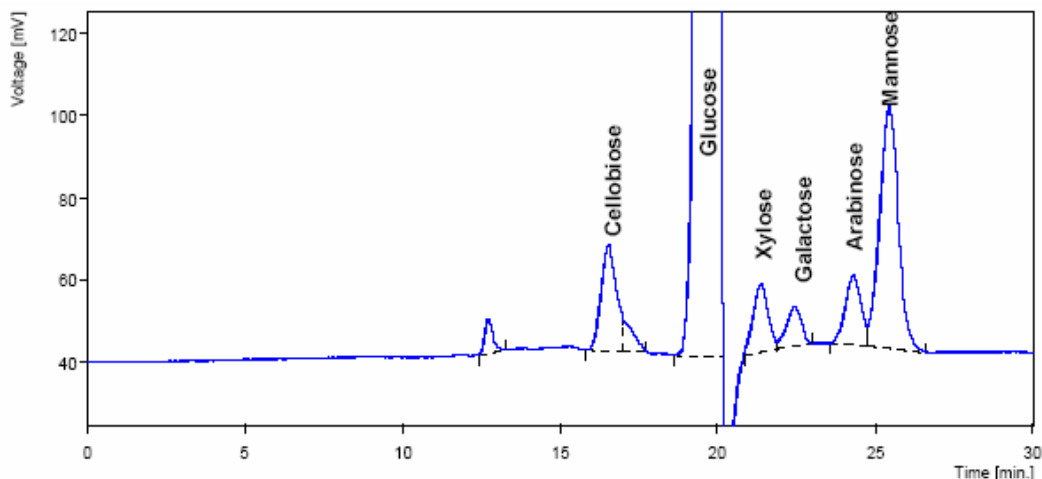
Obrázek 21: HPLC malto-oligosacharidů [44]



Obrázek 22: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: H – forma [49]



Obrázek 23: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: Ca – forma [49]



Obrázek 24: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: Pb – forma [49]

4.5 Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají dvou elektrokinetických jevů- elektroforézy a elektroosmózy.

Elektroforéza – po aplikaci napětí se nabitě částičky pohybují k opačně nabitě elektrodě.

Elektroosmóza – po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě [37].

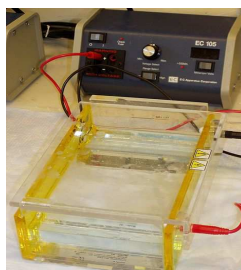
4.5.1 Kapilární elektroforéza

V laboratoři Ústavu analytické chemie AVČR byla vypracována rychlá metoda pro kontrolu autenticity ovocných šťáv, založená na kombinaci kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Tyto dvě metody podchycují dva hlavní identifikátory doslazování ovocných šťáv, a to koncentrační poměr sacharidů glukózy, fruktózy a sacharózy, resp. přítomnost oligosacharidů, které se ve většině šťáv nevyskytují, jsou ale přítomny v hydrolyzátech škrobu, což lze k detekci s výhodou využít. Pomocí hmotnostní spektrometrie se přítomnost těchto látek velmi rychle zjistí. Přístroj pro kapilární elektroforézu s nepřímou detekcí při 570 nm byl testován i pro stanovení dalších, z potravinářského hlediska zajímavých sacharidů - maltooligosacharidů vznikajících hydrolyzou škrobu a vyskytujících se v doslazovaných šťávách, manitolu, glukózy, xylózy a fruktózy, vyskytujících se v kávě, jejichž koncentrační poměr je ukazatelem pravosti instantních káv, a směsi glukózy, galaktózy

a laktózy, která je zajímavá pro mlékárenský průmysl, kde se využívá kapilární elektroforéza s nepřímou detekcí [50, 51].

4.5.2 Podstata kapilární elektroforézy

Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu. Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10-30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor obvykle fotometrický. Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram. Elektroforegram je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha výška píků kvantitu [37].



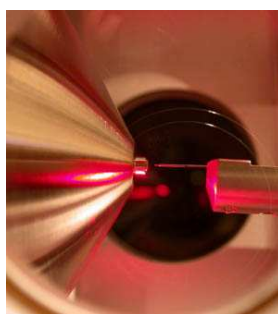
Obrázek 25: Kapilární elektroforéza [7]

4.5.3 Detektory používané při kapilární elektroforéze

- Elektrosprejový ionizační hmotnostní spektrometr (Electrospray ionization mass spectrometry ESI – MS) – je zdaleka nejefektivnější metodou detekce sacharidů, ale vyžaduje složité a drahé nástroje. Měření molekulových hmotností molekul (přesněji jejich různě nabitých iontů) má vždy několik kroků:

- molekula musí být převedena do plynné fáze (do vysokého vakua), přičemž získává charakteristický náboj,
- ion je urychlen. Z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje,
- pomocí detektoru se určí parametry charakterizující dráhu iontu,
- navazující elektronický systém umožní zpracovat signál vycházející z detektoru a vypočítat poměr hmotnosti a náboje příslušných iontů (m/z_i).

Většina současných metod umožňuje měřit současně poměry m/z_i směsí látek. Získáme tak celou řadu hodnot m/z_i proto hovoříme o hmotnostní spektrometrii. Pro přechod částic do plynné fáze se dnes uplatňuje metoda ESI (Electrospray Ionization – Elektrosprejová ionizace), která se užívá v kombinaci s chromatografickými metodami nebo s kapilární elektroforesou. Na ústí kapiláry, z níž pomalu vytékají jednotlivé frakce separovaných molekul, se aplikuje vysoký elektrický potenciál, který umožní náhlé odpaření a ionizaci molekul. Tento způsob ionizace umožňuje studium nativních molekul, její nevýhodou je relativně vysoký náboj iontů [52].



Obrázek 26: Hmotnostní spektrofotometrie [7]

MALDI – TOF je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Jsou-li molekuly vzorku ionizovány laserem přímo, většinou se štěpí nežádoucím způsobem. Proto se začala používat matrice – látka, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení. K stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, Time-of-Flight). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vypočítat rychlost částice [53].

ZÁVĚR

Pro stanovení monosacharidů a oligosacharidů jsou významné především reakce funkčních skupin s chemickými činidly na barevné nebo oxidační či redukční produkty a jejich detekce polarimetrií, spektrofotometrií nebo vizuální detekcí (titrační metoda), po vyčištění vzorku a oddělení rušivých složek. Pro stanovení složení polysacharidů je vhodné použít separační metody (HPLC, IEC), ovšem vlastní hydrolyza polysacharidů je natolik obtížná, že se nejprve provede hydrolyza a stanoví se jednotlivé složky hydrolyzátu a z nich se zpětně určí struktura polysacharidů. Jednou z nejběžnějších titračních metod je nepřímé stanovení nezredukované mědi jodometricky podle Schoorla. Metoda slouží ke stanovení obsahu redukujících cukrů vyjádřených jako invertní cukr v tekutém cukru nebo sirupu z invertního cukru, dále ke stanovení obsahu redukujících cukrů vyjádřeného a vypočteného (vztaženo na sušinu) jako glukozový ekvivalent ve škrobovém sirupu nebo obsahu redukujících cukrů vyjádřeného jako D-glukóza v glukóze monohydrátu a bezvodé glukóze. Metoda se používá jako arbitrážní, zvláště v cukrovarnickém průmyslu, pro stanovení cukrů v potravinářských surovinách rostlinného původu. Další uplatnění nachází při stanovení laktózy v krmivech obsahujících více než 0,5 % laktózy. Z optických metod má největší význam polarimetrie, která se používá ke stanovení sacharózy v surovém cukru, melase a v cukrovarnických produktech, dále ke stanovení škrobu po jeho hydrolyze HCl v běžných potravinářských surovinách a potravinách obsahující škrob. Nejúčinnějšími metodami pro kvalitativní a kvantitativní analýzu sacharidů jsou chromatografické metody. Pro běžnou analýzu sacharidů se používá HPLC a její speciální techniky jako HILIC a IEC. HPLC umožňuje rychlejší, účinnější analýzu. Dále lze provádět seriové analýzy. Používá se kolona na bázi sulfonované divinylbenzenové pryskyřice s velikostí částic 9 μm . Její K – forma (draselná) se používá pro separaci rafinózy, sacharózy, glukózy, fruktózy, kde mobilní fází je K_2HPO_4 . Pb – forma (olovnatá) se používá pro dělení monosacharidů, zvláště výhodná je pro separaci xylózy, galaktózy a mannózy. Mobilní fází je H_2O . Pro separaci monosacharidů a cukerných alkoholů se využívá Ca – forma (vápenatá), mobilní fází je H_2O . H – forma (vodíková) umožňuje rozdělení sacharidů, alkoholů a organických kyselin, které jsou obsaženy ve stejném vzorku, mobilní fází je zde H_2SO_4 nebo H_3PO_4 . Pro separaci mono-, di-, trisacharidů se používá silikagelová kolona s velikostí částic 5 μm s vázanými amino skupinami, kde mobilní fází je 75% CH_3CN . Nejpoužívanějšími detektory jsou refraktometrický a elektrochemický. HPLC metoda se používá nejčastěji pro stanovení

laktózy, maltózy, sacharózy, glukózy, fruktózy a sorbitolu v potravinách. Mobilní fází při separaci mono- a disacharidů v IEC je hydroxid sodný nebo draselný, při analýze oligosacharidů se kombinuje v gradientu s octanem sodným. Pulzně-ampérometrická detekce umožňuje selektivní a vysoce citlivé stanovení. Mez detekce se pohybuje v pikomolech. Pro analýzu sacharidů se používá zlaté pracovní elektrody. Tuto techniku je možné využít k analýze mono-, di- a oligosacharidů v hydrolyzátech bílkovin, ke stanovení sacharidů ve fermentačních roztocích, potravinách, léčivech, k identifikaci falšování džusů z oligosacharidového profilu, ke sledování autenticity instantní kávy podle zastoupení mono- a disacharidů. Pro stanovení sacharidů v potravinách a nápojích, je dále využívaná metoda iontové exkluze na sulfonovaném styren-divinylbenzenovém sorbentu. Jeho H - forma (vodíková) je vhodná pro organické kyseliny, alkoholy a některé cukry. Ca - forma (vápenatá) je vhodná pro monosacharidy a disacharidy a Pb - forma (olovnatá) je vhodná pro obtížně separovatelné sacharidy. Při separaci sacharidů pomocí HILIC se používá aminopropylová fáze jako stacionární a mobilní fáze acetonitril a voda (7 : 3) ve spojení s refraktometrickým detektorem, UV detektorem při $UV < 200$ nm nebo ELSD detektorem. V případě UV detekce je možné použít i gradientové eluce. Kapilární elektroforéza s nepřímou detekcí při 570 nm byla původně vyvinuta k ověřování autenticity ovocných šťáv, založená na kombinaci kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií MALDI – TOF. V dnešní době nachází své uplatnění i v mlékarenském průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Velíšek, J. *Chemie potravin I*, 1.vyd. , Tábor: Osis, 1999
- [2] *Distanční text – Chemie potravin*, UTB, 2007
- [3] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O. *Laboratorní techniky biochemie*, 1. vyd., Praha: VŠCHT, 2006
- [4] <http://is.muni.cz/elportal/estud/fsps/js06/t031/Sacharidy.ppt#268,18>, Přehled trávení – sacharidy, [on-line, 2009-04-19]
- [5] Kodíček, M. *Biochemické pojmy – výkladový slovník*, 2.verze, Praha: VŠCHT, 2007
- [6] Heinrich, J., Švarcová, I., Valentová, K. Plody *Lonicera caerulea*: perspektivní funkční potravina a zdroj biologicky aktivních látek, *Chem. listy*. 2008, ročník 102, s. 245-254
- [7] http://cs.wikipedia.org/wiki/Hlavn%C3%AD_strana, [on-line, 2009-04-19]
- [8] Karlson, P., Gerok, W., Gross, W. *Pathobiochemie*, 1.vyd., Praha: Academia, 1987
- [9] Provazník, K., a kol. *Manuál prevence v lékařské praxi*, Státní zdravotní ústav, 1998
- [10] Jičinská, E. Havlová, J. *Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách*, 1.vyd., Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996
- [11] Gajdůšek, S. *Laktologie*, 1.vyd., Brno: MZLU 2003
- [12] Čopíková J., Lapčík, O., Uher, M., Moravcová, J., Drašar, P. Cukerná nesacharozová sladidla a příbuzné látky, *Chem. listy*. 2006, ročník 100, s. 778–783
- [13] Voet, D., Voetová, J. *Biochemie*, 1. české vyd., Praha: Victoria Publishing, 1995
- [14] Mikulková, D., Kraic, J. Nové možnosti využitia škrobou s vysokým obsahom amylozy, *Chem. listy*.2006, ročník 100, s. 839–854
- [15] Dostálová, J., Kadlec, P., Pluháčková, E. Rezistentní škroby ve výživě člověka a jeho obsah v těstovinách, *Chem. listy*. 2007, ročník 101, s. 745-763
- [16] Straka, I., Malota, L. *Chemické vyšetření masa – klasické laboratorní metody*, Tábor: Osis, 2006

- [17] http://www.foodlife.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=3275&Itemid=115, [on-line, 2009-04-25]
- [18] <http://www.o-zdravi.cz/clanky/topinambur.html>, [on-line, 2009-05-04]
- [19] Vodrážka, Z. *Biochemie*, Academia, 2007
- [20] Valentová, K., Frček, J., Ulrichová, J. Jakon (*Smallanthus sonchifolius*) a Maka (*Lepidium meyenii*), tradiční andské plodiny jako nové funkční potraviny na evropském trhu, *Chem. listy*. 2001, ročník 95, s. 594-601
- [21] Suková, I. Karob jako levný zdroj, *Agronavigátor*, 69726, 2008
- [22] <http://www.polygrafia.cz/DATA/anotace.asp?ID=606>, [on-line, 2009-05-04]
- [23] Čopíková, J., Synytsya, A. Polysacharidy, jejich význam a uplatnění, *Chem. listy*. 2005, ročník 99, s. 621
- [24] Ehrenbergerová, J., Belcrediová, N., Havlová, P., Vaculová, K. Vlivy působící na obsah neškrobových polysacharidů v zrně jarního ječmene, *Chem. listy*. 2006, ročník 100, s. 839 – 854
- [25] Jablonský, I. Polysacharidy ve vyšších houbách a jejich účinky, *Chem. listy*. 2005, ročník 99, s. 661 – 671
- [26] http://www.fytokomplexy.cz/herbar/ZdrTemata4/Tema_Diabetes-mellitus/Penizovka-sametonoha.html, [on-line, 2009-05-10]
- [27] Lin, CH., Whang, E., a kol. Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 379, Issue 2, 2009, p. 626–631
- [28] Glinský, V., Raz, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets, *Carbohydrate Research*, 2008
- [29] Davídek, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*, Praha: SNTL, 1977
- [30] Hálková, J., Reiglová, J., Rumíšková, M. *Kvantitativní chemická analýza*, Brno: Ivan Straka, 2000
- [31] Kubáň, V., Kubáň, P. *Analýza potravin*, Brno: MZLU, 2007
- [32] Wilcy, J. *Handbook of food Analytical chemistry*, Hoboken, N.J. : Wiley Interscience, 2005

- [33] Kopáčová, O. Vlákna potravy a nutriční hodnota potravin, *Agronavigátor*, 31558, 2004
- [34] Opekar, F. *Základní analytická chemie*, 1. vyd., Praha: Karolinum, 2002
- [35] <http://www.helago.cz>, [on-line, 2009-04-08]
- [36] <http://www.vscht.cz>, [on-line, 2009-04-08]
- [37] Klouda, P. *Moderní analytické metody*, Ostrava: Pavel Klouda, 2003
- [38] <http://www.hplc.cz>, [on-line, 2009-03-28]
- [39] Bílková, K., Králová, B. *Izolace biomakromolekul*, Praha: VŠCHT, 1997
- [40] <http://www.Labicom.cz>, [on-line, 2009-05-04]
- [41] Rambla, F., Garrigues, S. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices, *Analytica Chimica Acta*, Volume 344, Issues 1-2, 1997, p. 41-53
- [42] Guangming, H., Sichun, Z. Development of an Aerosol Chemiluminiscent Detector of an to CE for saccharides analysis, *Analytical.chem*, Volume 77, Issue 22, 2005, p. 7556–7565
- [43] <http://web.vscht.cz/kohoutkj/navodCukry%20HPLC%202006.pdf>, [on-line, 2009-04-19]
- [44] <http://analyt.wz.cz/cukry/cukry2.pdf>, [on-line, 2009-05-10]
- [45] http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf, [on-line, 2009-04-05]
- [46] Masuda, T. High-performance Liquid Chromatographic Separation of Carbohydrates on a Stationary Phase Prepared from Polystyrene-based Resin and Novel Amines, *Journal of chromatography A*, Volume 961, Issue 1, 2002, p. 89-96
- [47] Hilder, E., Švec, F., Fréchet, J. Latex-functionalized Monolithic Columns for the Separation of Carbohydrates by Micro Anion-Exchange Chromatography, *Journal of chromatography A*, Volume 1053, Issue 1–2, 2004, p. 101-106
- [48] <http://www.vscht.cz/lam/Cukrblik00book.pdf>, [on-line, 2009-04-05]
- [49] http://kolony.cz/watrex/cz/show_items.php?cat=1210, [on-line, 2009-04-20]

- [50] Příbyla, L. Černý, V. Aplikace stanovení sacharidů v mléčných výrobcích, *Mléko*, 2006
- [51] Kopáčová, O. Vývoj screeningových mikrometod a vývoj zařízení pro specifické stanovení sacharidů v potravinách za účelem kontroly kvality a původnosti použitých surovin, *Agronavigátor*, 31562, 2004
- [52] <http://biomikro vscht.cz/maldiman/cz/theory/cz>, [on-line, 2009-04-20]
- [53] Havliš, J. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, *Vesmír*. 1999, ročník 78, s. 448
- [54] <http://www.cyberlekarna.cz>, [on-line, 2009-05-10]
- [55] <http://beta-glukan.cz>, [on-line, 2009-05-10]
- [56] <http://vitainfo.cz>, [on-line, 2009-05-10]
- [57] <http://obchod.medicina-kosmetika-leky.cz>, [on-line, 2009-05-10]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AVČR	Akademie věd České republiky
CMD	Membránový odsolovač
DNA	Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleová kyselina
Dns-H	Dansylhydrazin
ELSD	Evaporative Light Scattering, Odpařovací detektor
ESI	Electrospray Ionization, Elektrosprejová ionizace
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spektrometry, Elektrosprejový ionizační hmotnostní spektrometr
GPC	Gel Permeation Chromatography, Gelová chromatografie
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography, Hydrofilní interakční chromatografie
HPAE – PAD	Vysoceúčinná aniontová chromatografie s pulzně- amperometrickou detekcí
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysoceúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Ion Exchange Chromatography, Iontově výměnná chromatografie
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, Ionizace laserem za přítomnosti matrice
Nbd-H	4-Hydrazo-7-nitrobenzofurazan
NIRS	Near Infrared Spectrometry, Spektrometrie v blízké červené oblasti
RI	Refractive Index Detector, Refraktometrický detektor
TLC	Thin Layer Chromatography, Chromatografie na tenké vrstvě
TOF	Time-of-Flight, Detektor doby letu
UV	Ultraviolet Light, Ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tvorba fenylosazonů	12
Obrázek 2: Sacharidy – trávení	13
Obrázek 3: Zimolez modrý (<i>Lonicera caerulea</i>)	14
Obrázek 4: <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Obrázek 5: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Obrázek 6: <i>Escherichia coli</i>	19
Obrázek 7: Artyčok	23
Obrázek 8: Hlízy Topinamburu hlíznatého	23
Obrázek 9: Karobové lusky	24
Obrázek 10: Sacharimetr	35
Obrázek 11: Abbeho refraktometr	36
Obrázek 12: HPLC	41
Obrázek 13: Kolona HPLC	42
Obrázek 14: Reakce vzniku hydrazinů	44
Obrázek 15: Reakce hemiketalu v kyselém prostředí	44
Obrázek 16: Refraktometrický detektor	45
Obrázek 17: Elektrochemický detektor	46
Obrázek 18: Amperometrický detektor	47
Obrázek 19: Chromatogram částečně hydrolyzované amylózy	48
Obrázek 20: Stacionární fáze D ₈ a D ₁	51
Obrázek 21: HPLC malto-oligosacharidů	52
Obrázek 22: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: H - forma	52
Obrázek 23: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: Ca - forma	52
Obrázek 24: Sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent: Pb - forma	53
Obrázek 25: Kapilární elektroforéza	54
Obrázek 26: Hmotnostní spektrofotometrie	55






SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsah monosacharidů a dalších cukrů v ovoci (% v jedlém podílu).....	17
Tabulka 2: Obsah sacharózy v luštěninách (% v sušině).....	20
Tabulka 3: Obsah škrobu a jeho složení ve významných zdrojích.....	22
Tabulka 4: Některé β -D-(1–3)-glukany s významnou antinádorovou aktivitou.....	26
Tabulka 5: Schoorlova tabulka závislosti spotřeby 0,05 M thiosíranu sodného na koncentraci některých cukrů.....	33
Tabulka 6: Specifická optická otáčivost některých sacharidů ve °.....	37
Tabulka 7: Srovnání HPLC a GC	39

SEZNAM PŘÍLOH

P I Tabulka pozitivních léčebných účinků β -glukanů

PŘÍLOHA P I: Tabulka pozitivních léčebných účinků β -glukanů [54, 55, 56, 57]

Zdroj β -glukanu	Pozitivní léčebný účinek jednotlivých β -glukanů
<p>Hlíva ústříčná</p> 	<p>Osoby s imunodeficiencí jakéhokoliv původu: HIV infekce, zhoubná nádorová onemocnění, imunosupresivní léčba, chemoterapie a radioterapie pro osoby starší 40 let, u nichž dochází ke zpomalení některých přirozených imunitních reakcí, geriatrictí pacienti.</p> <p>Osoby infikované: virovou infekcí, bakteriální infekcí, plísňovou infekcí, parazitární infekcí.</p> <p>Osoby s chronickým onemocněním: osoby s <i>diabetes mellitus</i>, osoby s chronickým zánětem, osoby s častými infekcemi.</p>
<p>Kvasinka pivní</p> 	<p>Ke zvýšení nespecifické odolnosti (imunity) vůči některým infekčním chorobám (dýchacích cest a střev), jako podpůrný prostředek při léčbě akné a furunklózy (vřídkovité onemocnění kůže), součást dietetického režimu jako zdroj vitamínů při léčbě poruch vegetativního nervového systému.</p>
<p>Houževnatec jedlý</p> 	<p>Má imunostimulační, antiinfekční (eliminuje virové, bakteriální, plísňové a parazitární infekční onemocnění), protinádorové a radioprotektivní účinky. Úspěšně se osvědčil při léčbě a prevenci akné. Vedle aktivačního účinku na organismus působí také jako lapač volných radikálů a antioxidační látka.</p>
<p>Pórnatka kokosová</p> 	<p>Používá se při bušení srdce, hypertenzi, poruchách trávení, nespavosti, otocích, nadýmání, průjmech, zapomnětlivosti a při onkologickém onemocnění. Posiluje činnost sleziny, CNS a žaludku.</p>
<p>Penízovka sametonohá</p> 	<p>Zlepšuje činnost slinivky, čistí pokožku, má silné protinádorové a antibakteriální účinky, pomáhá při léčbě a prevenci akné, alergie, astmatu, bradavic, candidy, celiakie, Crohnovy choroby, cukrovky, ekzému, gynekologických výtocích, herpesu, chřipce, kandidóze, mykóze, nádorech, paradentóze, průjmu.</p>

