

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Metody stanovení cukrů v potravinách

Bakalářská práce

Autor práce: Kristýna Baštová

Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Hejtmánková CSc.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metody stanovení cukrů v potravinách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. dubna 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Aleně Hejtmánkové CSc. za její laskavý přístup, pomoc a rady, které mi pomohly při vypracování této bakalářské práce.

Metody stanovení cukrů v potravinách

Souhrn

Sacharidy patří mezi jedny z nejrozšířenějších látek v přírodě. Jsou nezastupitelným zdrojem okamžité energie pro organismus. V lidském těle není velká zásoba sacharidů, a proto je dobré vědět, ve kterých potravinách se sacharidy nachází, a to v jakém množství a jaké druhy. Množství sacharidů v potravinách je velmi důležitým faktorem i z hlediska výroby, jelikož ovlivňuje celou řadu reakcí při výrobním procesu a zároveň i cenu potravin.

Obecně se cukry rozdělují dle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule. Mezi nejjednodušší sacharidy neboli monosacharidy, se řadí glukosa a fruktosa. Glukosa je nejvíce zastoupený cukr, nachází se v ovoci, medu a v krvi člověka. Fruktosa je nejsladší přírodní cukr a vyskytuje se stejně jako glukosa v ovoci a medu. Sacharidy složené ze dvou a nejvýše deseti molekul monosacharidů se nazývají oligosacharidy. Nejběžnějším disacharidem je sacharosa složená z jedné molekuly glukosy a jedné molekuly fruktosy. Laktosa je tvořena molekulami galaktosy a glukosy a řadí se k nejvýznamnějším sacharidům mléka savců. K polysacharidům patří rostlinný i živočišný škrob či vláknina. Vláknina hraje podstatnou roli ve správné funkci trávicí soustavy.

Podle povahy sacharidu je třeba volit i vhodnou metodu jejich stanovení. K důkazu se využívají chemické reakce založené na změně zabarvení. Tyto důkazy sice potvrdí přítomnost sacharidů v testovaném vzorku, avšak už neurčí zastoupení jednotlivých druhů sacharidů. Tato nevýhoda se objevuje i u celé řady dalších metod. Ke stanovení sacharidů se volí i metody fyzikální, fyzikálně chemické, chemické a biologické. Jednou z aplikovaných fyzikálně chemických metod bývá polarimetrie, která se hojně využívá při stanovení sacharosy. Pro svou jednoduchost, časovou nenáročnost a citlivost se používají také spektrofotometrické metody, jež mají využití zejména pro sériovou analýzu.

V současnosti se nejvíce aplikuje metoda zvaná chromatografie - a to především kapalinová chromatografie, která se zakládá na rozdílné citlivosti jednotlivých sacharidů na stacionární a mobilní fázi. K hlavním výhodám této metody patří její přesnost a schopnost stanovení řady cukrů vedle sebe.

Klíčová slova: potraviny, sacharidy, metody stanovení, polarimetrie, chromatografie

Methods for the determination of sugars in foods

Summary

Sugars are among the most abundant substances in nature. They are an irreplaceable source of immediate energy for the organism. In the human body there is not a large supply of sugar, so it is good to know in which foods are carbohydrates present, how much and what kinds. The amount of carbohydrates in foods is a very important factor in terms of production, as it affects a number of reactions in the manufacturing process and also food prices.

Generally, sugars are divided by the number of sugar units in the molecule bound. The simplest sugars or monosaccharide include glucose and fructose. Glucose is the most abundant sugar found in fruits, honey and human blood. Fructose is the sweetest natural sugar and occurs as glucose in fruits and honey. Saccharides consisting of two and a maximum of ten monosaccharide molecules are called oligosaccharides. The most common disaccharide is saccharose composed of one molecule of glucose and one molecule of fructose. Lactose is made up of molecules of galactose and glucose, and ranks among the most important carbohydrate mammalian milk. Polysaccharides consist of vegetable and animal starch and fiber. Fiber plays an essential role in the proper function of the digestive system.

For the determination of carbohydrates should be chosen suitable methods. Various chemical reactions based on changes in colour are used to proof the presence of sugar. Although this evidence confirms the presence of carbohydrates in the tested sample, it does not recognize the structure of different types of carbohydrates. This drawback appears also in a variety of other methods. For the determination of carbohydrates are being used physical, physico-chemical, chemical and biological methods. Among applied physicochemical methods belongs polarimetry, which is widely used in the determination of sucrose. Spectrophotometric methods are also used for their simplicity, time saving and sensitivity. These methods are used mainly for mass analysis.

Currently, chromatography is being the most applied method - especially liquid chromatography, which is based on variations of the sensitivity of saccharides on stationary and mobile phase. The main advantages of this method are its precision and ability to determine a series of sugars at once.

Keywords: food, sugars, methods of determinative, polarimetry, chromatography

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Monosachridy	11
3.1.1 Názvosloví a struktura	11
3.1.2 Monosacharidy v potravinách.....	11
3.2 Oligosacharidy	13
3.2.1 Názvosloví a struktura	13
3.2.2 Oligosacharidy v potravinách	14
3.3 Polysacharidy.....	16
3.3.1 Struktura.....	16
3.3.2 Polysacharidy v potravinách.....	17
3.4 Chemické vlastnosti sacharidů.....	21
3.4.1 Sacharidy v buňkách	22
3.4.2 Sacharidy ve výživě	22
4 Metody stanovení cukrů	25
4.1 Izolace sacharidů	25
4.1.1 Izolace sacharidů extrakcí etanolem	25
4.1.2 Izolace maltosy a glukosy	26
4.2 Důkazy cukrů	26
4.2.1 Obecné reakce cukrů.....	26
4.2.2 Důkazy redukujících cukrů	27
4.2.3 Důkazy pentos.....	27
4.2.4 Důkaz hexos.....	28
4.2.5 Důkaz aldohexos.....	28
4.2.6 Důkaz ketohexos.....	28
4.3 Chromatografické metody stanovení cukrů	28
4.3.1 Sloupcová chromatografie	28
4.3.2 Chromatografie na papíře	29
4.3.3 Chromatografie na tenké vrstvě.....	29
4.4 Stanovení sacharidů	30
4.5 Stanovení polysacharidů.....	34
4.5.1 Stanovení škrobu.....	34
4.5.2 Stanovení dextrinů	36
4.5.3 Stanovení pektinu	36
4.5.4 Stanovení vlákniny	37

4.6 Chromatografie	38
4.6.1 Plynová chromatografie	38
4.6.2 Kapalinová chromatografie.....	39
5 Závěr.....	42
6 Použitá literatura	43

1 Úvod

Sacharidy jsou jedny z nejrozšířenějších látek v přírodě. Jsou obsaženy v rostlinných i živočišných buňkách. Rostlina je dokáže získat při fotosyntéze, ale živočichové je musí přijímat v potravě.

Z hlediska výživy jsou velmi důležitým zdrojem energie, stejně jako bílkoviny a tuky. Sacharidy tvoří více než polovinu energetické hodnoty naší stravy, 1 g dodá tělu přibližně 17 kJ. Potraviny bohaté na sacharidy, obsahují i řadu významných minerálů a vitaminů, například vitamin C a vitaminy skupiny B. Nestravitelné sacharidy, například vláknina, příznivě ovlivňují činnost trávicího traktu, a tím mají v potravě lidí nezastupitelnou roli. Nesmíme však zapomínat, že jejich velké množství v potravě má negativní účinek na organismus a může vést až k obezitě, zubnímu kazu či dalším onemocněním.

V dnešní době jsou sacharidy využívány jednak v potravinářském průmyslu, jako přísady při výrobě masných výrobků, pečiva či nealkoholických slazených nápojů, ale také jako plnidla ve farmaceutickém průmyslu.

U potravin je dobré sledovat nejen obsah sacharidů, nýbrž i glykemický index potravin, který nám ukáže, jak rychle po konzumaci sacharidové potraviny stoupne hladina cukru v krvi. Po potravinách s vysokým glykemickým indexem, nad 70, máme dříve hlad, a proto jsou nevhodné při cukrovce či redukční dietě.

Obsah sacharidů je jedním z ukazatelů jakosti plodin a v potravinářském průmyslu se provádí řada analýz pro jejich stanovení. Například u obilí je vysoký obsah sacharidů známkou dobré kvality. Při stanovování lze využít celé řady metod, některé jsou založeny na reakcích s chemickými činidly a následnou změnou zbarvení, jiné využívají fyzikálně chemické vlastnosti. Pro běžnou analýzu se dnes nejvíce využívá kapalinová chromatografie. Každá z metod má svá pozitiva i negativa, a proto dochází k neustálému vývoji a zlepšování.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je podat souhrnný literární přehled o analytických metodách používaných při stanovení mono- , di- , oligo- a polysacharidů v potravinách a zemědělských produktech. Charakterizovat jednotlivé metody z hlediska jejich využití při analýzách konkrétních rostlinných a živočišných vzorků včetně jejich výhod i případných nedostatků.

3 Literární rešerše

Sacharidy (z latinského *saccharum*, cukr) neboli cukry jsou základní složkou všech živých organismů a zároveň i nejrozsáhlejší třídou biologicky aktivních molekul (Voet et Voetová, 1995). Názvem sacharidy se označují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které obsahují v molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlovodíkové atomy a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb, tj. látky, ze kterých vznikají sacharidy hydrolýzou.

Sacharidy se dělí:

Podle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule:

- Monosacharidy
- Oligosacharidy
- Polysacharidy neboli glykany
- Složené, také konjugované nebo komplexní sacharidy (Velíšek, 1999).

Podle povahy karbonylové skupiny:

- Aldosy – obsahují aldehydovou skupinu
- Ketosy – obsahují ketoskupinu

Podle počtu atomů uhlíku:

- Triosy – sacharidy se třemi uhlíkovými atomy
- Tetrosy – sacharidy se čtyřmi uhlíkovými atomy
- Pentosy – sacharidy se pěti uhlíkovými atomy
- Hexosy – sacharidy se šesti uhlíkovými atomy

Nejjednodušší cukry představují monosacharidy. Mnoho těchto sloučenin je syntetizováno z jednodušších látek v procesu označovaném jako glukoneogeneze, jiné – a to většina biologicky aktivních molekul – jsou produkty fotosyntézy, světlem energizované reakce mezi vodou a oxidem uhličitým, kterou vyšší rostliny a některé mikroorganismy vytvářejí sacharidy. Metabolický rozklad monosacharidů poskytuje většinu energie potřebné pro průběh biologických pochodů, monosacharidy jsou rovněž základní složkou nukleových kyselin a důležitou součástí složitých lipidů.

Oligosacharidy se skládají z několika kovalentně vázaných monosacharidových jednotek. Bývají často sloučeny s proteiny (jako glykoproteiny) a lipidy (jako glykolipidy), v těchto sloučeninách mají jak stavební, tak regulační funkci.

Polysacharidy jsou tvořeny velkým počtem kovalentně vázaných monosacharidových jednotek a jejich molekulová hmotnost dosahuje až několika milionů daltonů. Jejich strukturální role je nepostradatelná pro všechny organismy, ale zejména pro rostliny, vzhledem k tomu, že celulóza, základní stavební materiál rostlin, představuje až 80 % jejich sušiny. Polysacharidy jako škrob u rostlin a glykogen u živočichů, slouží jako důležité zásobní látky (Voet et Voetová, 1995).

3.1 Monosachridy

3.1.1 Názvosloví a struktura

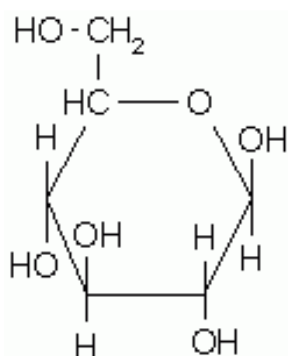
Monosacharidy, tedy aldosity i ketosity, se podle počtu uhlíků v řetězci dělí na triosity, tetrosy, pentosy, hexosy atd., resp. na aldotriosity, ketotriosity atd. Řetězec monosacharidů přítomných v potravinách bývá obvykle lineární, existují však také monosacharidy s rozvětveným řetězcem. Monosacharidy se vyskytují jako látky s volnou karbonylovou skupinou (acyklické látky) a jako cyklické hemiacetaly též nazývané poloacetyly nebo laktoly. Triosity jsou výhradně acyklickými látkami, tetrosy a vyšší monosacharidy existují převážně v pětičlenných a šestičlenných, výjimečně také v sedmičlenných cyklických strukturách. Lze je proto považovat za látky odvozené od oxolanu (tetrahydrofuranu), oxanu (tetrahydropyranu) nebo oxepanu a jsou tedy vlastně heterocyklickými sloučeninami (Velíšek, 1999).

3.1.2 Monosacharidy v potravinách

Monosacharidy jsou běžnou součástí všech potravin. V poměrně velkém množství jsou zastoupeny v ovoci a zelenině, jejich obsah se zvyšuje v době zrání. Výrazný vliv na množství monosacharidů mají podmínky posklizňového skladování a zpracování. Hlavními cukry jsou glukosa a fruktosa, v menším množství jsou přítomny další monosacharidy. Volná D-glukosa se nazývá hroznový cukr nebo také dextrosa. Spolu s D-fruktosou bývá nejběžnějším cukrem potravin. V malém množství se vyskytuje D-manosa, D-galaktosa, případně jiné druhy hexos. Pentosy jsou v potravinách zastoupeny v menším množství. Nejčastější pentosou je D-ribosa, L-arabiosa a D-xylosa (také zvaná dřevní cukr). Cukry se přidávají do mnoha potravinářských výrobků především pro zlepšení chuti a textury. Monosacharidy se přidávají nejčastěji ve formě invertního cukru a glukosových nebo fruktosových sirupů. Ve svalech teplokrevných živočichů se vyskytuje glykogen. Po smrti dochází k jeho velmi rychlému rozpadu, takže po procesu zrání jsou v masě monosacharidy nebo jejich fosforečné estery.

V mléce je nepatrné množství monosacharidů, hlavním cukrem je disacharid laktosa. Sušina vajec obsahuje asi 1 % sacharidů, část z nich je vázána ve formě glykoproteinů. Většinu monosacharidů tvoří glukosa (až 98 %), v malém množství jsou přítomny manosa, arabinosa, xyloza, ribosa a deoxyribosa. Významným zdrojem monosacharidů je med. Hlavními složkami jsou glukosa a fruktosa, v menším množství jsou přítomné různé oligosacharidy (sacharosa, maltosa aj.). Také cereálie a cereální výrobky obsahují monosacharidy, které vznikají degradací škrobu. Jejich obsah závisí na způsobu zpracování (na stupni hydrolýzy škrobu, na množství případně přidaných sacharidů) (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Glukosa



Obrázek č. 1 Glukosa (MŠMT ČR, 2004).

Glukosa (obr. 1), hroznový cukr nebo krevní cukr, patří mezi aldohexosy (MŠMT ČR, 2004). V přírodě se vyskytuje volná ve sladkém ovoci a v medu, v krvi člověka $3,5\text{--}5,6 \text{ mmol.l}^{-1}$. Vázaná je ve složených sacharidech, škrobu, celulóse a glykogenu, v disacharidech (sacharosa, laktosa, maltosa).

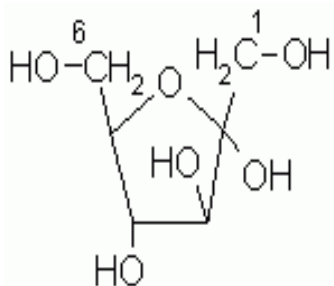
Vyrábí se ze škrobu (nejčastěji bramborového) hydrolýzou (rozkladem) zředěnou kyselinou chlorovodíkovou nebo kyselinou sírovou za vyšší teploty ($120\text{--}130 \text{ }^\circ\text{C}$), polysacharid se postupně rozštěpí přes dextriny, maltosu až na glukosu. Roztok se neutralizuje buď sodou (hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou) nebo křídou (hydrolýza kyselinou sírovou), filtruje se na kalolisech a v odparkách se za sníženého tlaku zahušťuje. Konečný produkt se nechá vykristalizovat.

Glukosa je bílá krystalická látka snadno rozpustná ve vodě, méně sladká než sacharosa. Je opticky aktivní, rovinu polarizovaného světla stáčí doprava (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

Glukosa je významným zdrojem energie organismu savců, proto se ve formě vodných roztoků užívá k infusím při léčbě různých patologických stavů. Pro označení hodnoty koncentrace glukosy v krvi se používá termín glykemie. V moči zdravých jedinců glukosa přítomna není,

neboť je v ledvinách plně resorbována z primární moči. Enzymem glukosaisomerasou může být glukosa přeměněna na výrazně sladší fruktosu, toho se využívá při výrobě tzv. fruktosového sirupu, který se používá v potravinářství (MŠMT ČR, 2004).

- Fruktosa



Obrázek č. 2 Fruktosa (MŠMT ČR, 2004).

Fruktosa (obr. 2), cukr ovocný, nejrozšířenější ketohehexosa, nejsladší přírodní cukr. Jako všechny významné monosacharidy existuje v přírodě téměř výhradně v konfiguraci D, otáčí však rovinu lineárně polarizovaného světla vlevo, proto se pro ni používá tradiční synonymum levulosa (MŠMT ČR, 2004).

Průmyslově se vyrábí hydrolýzou inulinu (v kořenech topinambur, jiřin, čekanky). Může se používat u hraničních diabetiků, kteří nesmí sladit sacharosou. Směs glukosy a fruktosy se nazývá invertní cukr. Vzniká hydrolytickým rozkladem sacharosy (inverze = změna optické otáčivosti, při hydrolýze sacharosy se původní pravotočivá sacharosa štěpí na směs pravotočivé glukosy a silněji levotočivé fruktosy, dojde tedy k zvratu optické otáčivosti z formy pravotočivé na levotočivou směs) (Odstrčil et Odstrčilová, 2006). Vyskytuje se v různých rostlinných šťávách a v medu (MŠMT ČR, 2004).

3.2 Oligosacharidy

3.2.1 Názvosloví a struktura

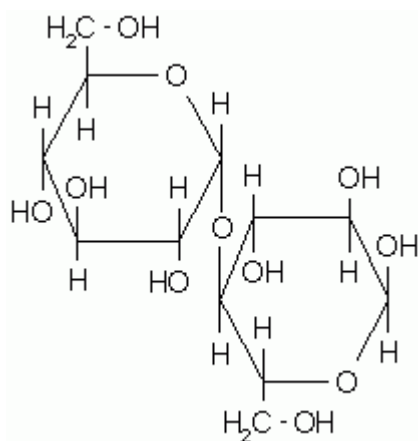
Mezi oligosacharidy se řadí oligomery monosacharidů, u nichž jsou na sebe vázány dvě a nejvýše deset molekul monosacharidů glykosidovou vazbou. Nazývají se také homoglykosidy. Podle počtu monosových jednotek se oligosacharidy dělí na di-, tri-, tetra-, penta- a dekasacharidy. Monosacharidy se v oligosacharidech mohou vyskytovat ve formě pyranosy nebo furanosy. Nejčastěji se v oligosacharidech vyskytují hexosy. Disacharid může teoreticky vznikat kondenzací α - nebo β - anomerní hydroxylové skupiny monosacharidu

s libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Kondenzují-li vzájemně dvě poloacetalové hydroxylové skupiny, neobsahuje vzniklý disacharid anomerní hydroxylovou skupinu a je proto neredukující. V každém jiném případě vzniká redukující disacharid (Velíšek, 1999).

3.2.2 Oligosacharidy v potravinách

V potravinách (v ovoci, zelenině, mléce, medu) je obsaženo velké množství volných nebo vázaných oligosacharidů. Jsou většinou složeny z glukosy, fruktosy, galaktosy a maltosy v různých kombinacích. Nejvýznamnějšími disacharidy jsou maltosa složená ze dvou molekul glukosy, sacharosy složená z glukosy a fruktosy a laktosa tvořená glukosou a galaktosou (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Maltosa

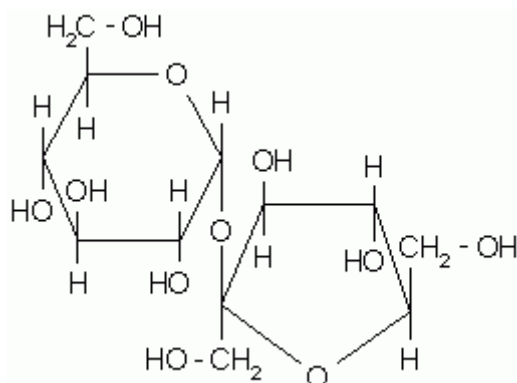


Obrázek č. 3 Maltosa (MŠMT ČR, 2004).

Cukr sladový (obr. 3), redukující disacharid tvořený dvěma zbytky glukosy v pyranosové formě, spojenými $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glykosidovou vazbou je obsažena ve většině potravin.

Je produktem enzymové hydrolýzy škrobu, proto je přítomna v klíčících semenech (také v klíčícím ječmeni sladu, proto se jí říká sladový cukr). V chlebovém těstě vzniká hydrolýzou škrobu (působením kvasinek *Saccharomyces cerevisce*). V poměrně velkém množství je maltosa i v medu (průměrně 7,3 %) (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Sacharosa



Obrázek č. 4 Sacharosa (MŠMT ČR, 2004).

Třtinový nebo řepný cukr, α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid, neredukující disacharid (MŠMT ČR, 2004). Sacharosa (obr. 4) je bílá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě, v alkoholu se rozpouští špatně. Je pravotočivá, při inverzi se štěpí na směs glukosy a fruktosy. Zahříváním na 180–200 °C se mění v karamel (používá se k barvení likérů, při výrobě cukrovinek). Je obsažena ve vegetativních částech rostlin (listy, stonky – např. cukrová třtina obsahuje 12–26 % sacharosy), v plodech (jablka, pomeranče, ananas, melouny, meruňky, broskve, datle), v zelenině, v cukrové řepě (3–20 %).

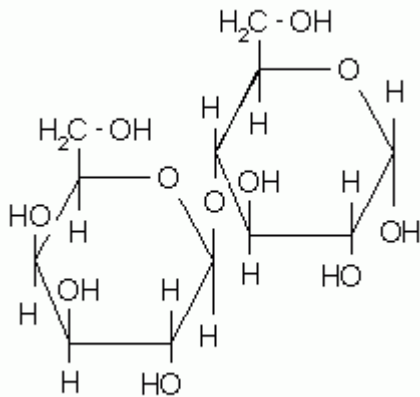
Hlavním průmyslovým zdrojem sacharosy je cukrová třtina (*Saccharum officinarum*) a v podmínkách ČR cukrová řepa (*Beta vulgaris ssp. vulgaris var. altissima*).

Nejprve se v pračkách odstraní nečistoty z cukrové řepy. Potom jsou řepné bulvy rozřezány na řízky, které se zalijí vodou, dochází k vyluhování buněčného obsahu řízků, vzniká difúzní šťáva. Další fáze je čištění (epurace) surové šťávy. K roztoku se přidá vápenné mléko (hydroxid vápenatý – $\text{Ca}(\text{OH})_2$), jeho působením dojde k neutralizaci kyselin, tím se zabrání inverzi sacharosy. Současně s neutralizací se vysrážejí organické kyseliny, bílkoviny, aminokyseliny, polysacharidy, redukovatelné sacharidy, organické a anorganické ionty. Tento děj se nazývá čerení. Přebytný hydroxid vápenatý se odstraní saturací oxidem uhličitým (vzniká uhličitan vápenatý).

Vysrážené zbytky, tzv. saturační kal se odfiltruje a vzniká lehká šťáva. Protože roztok sacharosy je stále velmi zředěný, provede se zahuštění odpařením vody. Vzniká těžká šťáva, která obsahuje 61–67 % sacharosy a 68–72 % sušiny. Z těžké šťávy nelze získat sacharosu krystalizací, proto se provádí další zahušťování v koncentrátorech. Získaná šťáva je hustá a má tmavě žlutou až nahnědlou barvu.

Štáva se naočkuje krystaly cukru a provede se krystalizace. Získané krystaly cukru se oddělí od matečného sirupu pomocí odstředivek. Takto získaný surový cukr obsahuje ještě některé nečistoty, je žlutý až tmavě hnědý. Používá se buď jako surový nebo se čistí tzv. rafinací a vzniká rafináda. Odpad při čištění se nazývá melasa a používá se jako krmivo (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Laktosa



Obrázek č. 5 Laktosa

Mléčný cukr (obr. 5), redukuující sacharid tvořený monosacharidy galaktosou a glukosou, nejvýznamnější sacharid mléka savců (MŠMT ČR, 2004). Je významný zdroj energie, její příjem vede k výraznému zvýšení glykémie. V kravském mléce je 4–5 % laktosy, lidské mléko ji obsahuje 5,5–7,5 %. Laktosa je obsažena ve většině výrobků z mléka. U potravin, které byly upraveny fermentativním mléčným kvašením (jogurt, acidofilní mléko, kefír, sýry) je její obsah nižší (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

3.3 Polysacharidy

3.3.1 Struktura

Polysacharidy jsou sacharidy, ve kterých jsou desítky, stovky či dokonce tisíce monosacharidů vzájemně vázaných glykosidovými vazbami. Protože mají pouze jednu volnou anomerní hydroxylovou skupinu na konci velmi dlouhého řetězce, nepatří mezi redukuující sacharidy a nevykazují mutarotaci. Dva nejběžnější polysacharidy jsou celulóza a škrob (McMurry, 2007).

3.3.2 Polysacharidy v potravinách

Polysacharidy jsou hlavním zdrojem energie. Přispívají v potravinách k formování textury, ovlivňují obecně organoleptické vlastnosti potravy. Rozpustné polysacharidy zvyšují viskozitu potravinářských výrobků a používají se v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu jako plnidla, zahušťovadla, stabilizátory dispersí a gelotvorné látky.

Význam polysacharidů stále roste v souvislosti s rozvojem nových potravinářských technologií. Dříve byl nejvíce využíván přirozený škrob. Jeho spotřeba dnes klesá a výrazně roste spotřeba modifikovaných škrobů. Rovněž se zvyšuje množství výrobků, které obsahují modifikovanou celulosu, rostlinné gummy, polysacharidy mořských řas a mikroorganismů. Dnes jsou nejvíce využívány gummy rostlinných semen, karagenany, agary, arabská guma, pektiny, algináty, modifikované celulosy (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Škrob

Škrob je hlavní energetickou složkou lidské potravy a významně ovlivňuje funkční vlastnosti potravin – je využíván k zahušťování potravin a k úpravě jejich textury. Mimo to se škrob využívá v papírenském a textilním průmyslu a při chemických a biochemických aplikacích. Ve farmaceutickém průmyslu je dominantní jeho použití jako excipientu např. jako pojiva, plniva či rozvolňovadla. Je studován i jako pomocná látka v nových formulacích léků s řízeným uvolňováním.

Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany - lineární amyloza s α -D(1→4) vázanými glukosovými jednotkami a větvený amylopektin, obsahující α -D(1→4) a α -D(1→6) vazby.

Poměr těchto polysacharidů, který se liší u škrobů různého původu, ovlivňuje řadu fyzikálních vlastností. U cereálního škrobu se obsah amylosy pohybuje v rozmezí 25–28 %, přičemž škroby některých modifikovaných genotypů kukuřice, ječmene nebo pšenice mají obsah amylosy zvýšený až na 70 %. Obsah amylosy v bramborách kolísá obvykle v rozmezí 17–21 % (Pérez et Bertoft, 2010) a rýžový škrob obsahuje 15–20 % amylosy (Benmoussa et al., 2007). Luštěninové škroby jsou charakteristické vysokým obsahem amylosy, např. u polního hrachu se uvádí rozmezí 33–50 %, u geneticky modifikovaných odrůd 8–72 %, a v dřeňovém hrachu 61–88 % (Ratnayake et al., 2001).

Nutriční hodnota škrobu souvisí se strukturou molekuly a s modifikací upravující biologickou dostupnost – mechanickou, tepelnou nebo chemickou. Podle úrovně stravitelnosti může být škrob rozdělen do tří kategorií: rychle stravitelný škrob (rapidly digestible starch – RDS), pomalu stravitelný škrob (slowly digestible starch – SDS) a rezistentní škrob (resistant starch

– RS) (Englyst et al., 1992). RDS úzce souvisí s glykemickým indexem, u kterého se předpokládá, že zvyšuje pravděpodobnost vzniku cukrovky a prediabetes, kardiovaskulárních chorob a obezity (Ludwig, 2000).

Rychle a pomalu stravitelné škroby jsou ve výsledku zcela hydrolyzovány. Tepelně modifikované (předželatinované) škroby jsou tráveny rychleji, ale neliší se energetickou (kalorickou) hodnotou od nativních škrobů s výjimkou rezistentních škrobů. Naproti tomu rezistentní škrob není rozštěpen enzymy v tenkém střevě, ale přechází až do tlustého střeva.

- Rezistentní škrob

Rezistentní škrob se tak řadí mezi nevyužitelné polysacharidy, má tedy podobnou funkci jako vláknina, do které bývá i zařazován. V tlustém střevě však může být střevní mikroflórou metabolizován na sekundární produkty. Na rozdíl od vlákniny nepůsobí tak hrubým chuťovým vjemem. Denní příjem RS není v ČR vysoký – asi 3,2 g v porovnání s doporučenou dávkou 5 g. Rezistentní škrob nejenže snižuje energetickou hodnotu stravy, ale může hrát důležitou roli v prevenci kolorektálního karcinomu, jehož výskyt v České republice je značný. Stravitelnost škrobu ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří původ (zdrojová rostlina), velikost škrobových zrn, poměr amylosy a amylopektinu, rozsah molekulárních asociací mezi složkami škrobu, typ a stupeň krystalinity, délka řetězce amylosy, molekulární struktura amylopektinu a přítomnost amyloso-lipidových komplexů (Zhang et Hamaker, 2012). Rezistentní škrob se člení do čtyř primárních kategorií:

- RS1 je fyzikálně nepřístupný škrob, např. škrob v luštěninách, kde je součástí materiálu buněčných stěn nebo proteinové matrice a není přístupný enzymové hydrolyze.

- RS2 je nativní škrob obsažený ve škrobových zrnech s typem krystalinity B nebo C (např. škrob ze syrových nikoliv uvařených brambor, z banánů a vysoceamylosový kukuřičný škrob).

- RS3 je retrogradovaná amylosa. RS3 je škrob nejprve zmazovatělý, amylosa je následkem zmazování uvolněna do roztoku jako nahodile uspořádané šroubovice, ty po ochlazení reasociují za vzniku dvojité šroubovice, stabilizovaných vodíkovými vazbami (Hoover et Zhou 2003). Tyto dvojšroubovice vznikající retrogradací vytvářejí hexagonální krystalickou strukturu, která brání přístupnosti vazbám α -amylasy ke glykosidovým vazbám. Běžná tepelná úprava potravin s obsahem RS3 nezpůsobí disociaci amylosové krystalinity, proto krystalinická amylosa zůstává velmi rezistentní k enzymové hydrolyze.

- RS4 je chemicky modifikovaný škrob (Chiu et al., 1999).

- Glykogen

Glykogen je polysacharid, jenž slouží živočichům k ukládání energie, podobně jako škrob rostlinám. Sacharidy přijaté v potravě, jež nejsou nutné k okamžitému pokrytí potřeby energie, tělo přeměňuje na glykogen, který může být dlouhodobě uskladněn. Podobně jako amylopektin ve škrobu, má i glykogen složitou strukturu tvořenou vazbami (1→4) a (1→6). Molekuly glykogenu jsou však větší než molekuly amylopektinu – obsahují až 100 000 glukosových jednotek – a jsou i více větvené (McMurry, 2007).

Během svalové práce se glykogen rozpadá anaerobně za tvorby kyseliny mléčné, nebo je aerobně odbouráván v Krebsově cyklu až na vodu a oxid uhličitý. Podobným způsobem se glykogen štěpí i během posmrtných změn. Glykogen je významný z technologického hlediska. Podle toho, kolik je ho obsaženo ve svalu v okamžiku porážky, dojde k hlubšímu či menšímu okyselení tkáně, což má význam pro tržnost i pro vaznost, a tedy i pro rozsah hmotnostních ztrát. U vyčerpaných zvířat s nízkým obsahem glykogenu dochází jen k malému okyselení a maso je proto málo údržné, v některých případech (tzv. PSE a DFD maso) dochází i k anomálnímu odbourávání glykogenu (Steinhauser et al., 1995).

- Celulosa

Celulosa, nejrozšířenější stavební polysacharid rostlin, je základem papíru, textilních tkanin, stavebních hmot, její deriváty se používají jako zahušťovací prostředky do potravin a jsou důležitou součástí různých forem léků (Větvička, 2004). Je obsažena v zelených řasách, houbách a dokonce i ve stěnách buněk jednoduchých mořských strunatců – pláštěnců. Celulosa je lineární polymer glukosy (až 15 000 jednotek). Vlákna se spojují prostřednictvím vodíkových vazeb a vytvářejí trojrozměrnou strukturu.

Celulosa tvoří v potravě tzv. nerozpustnou vlákninu. V ovoci a zelenině je asi 1–2 % celulosy, v obilovinách a luštěninách 2–4 %, v pšeničné mouce jen asi 0,2–3 % podle stupně vymletí, zato v otrubách je 30–35 % celulosy.

Celulosa je nerozpustná ve vodě, zředěných kyselinách a většinou rozpouštědel. Rozpouští se v koncentrovaných kyselinách, protože dochází k hydrolýze na rozpustné fragmenty s kratším řetězcem. Celulosu štěpí jen některé bakterie a plísně (enzym celulasa). Trávicí trakt býložravců obsahuje symbiotické bakterie, které produkují celulasu, a proto je pro ně celulosa využitelným polysacharidem. Pro člověka je celulosa nevyužitelná, a proto je s ostatními nerozpustnými polysacharidy jako vláknina cennou součástí potravy (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

- Pektiny

Základní struktura je tvořena řetězcem galakturonové kyseliny, některé jednotky jsou esterifikovány metanolem. Vyskytují se prakticky ve všech druzích zeleniny a ovoce (Odstrčil et Odstrčilová, 2006). Pektiny patří k nejrozšířenějším polysacharidům v přírodě, ale podobně jako škrob nebo deriváty celulosy, se široce používají v potravinářském průmyslu, např. jako výborná želírující látka. Pektin snižuje obsah cholesterolu v krvi a má také schopnost vázat ionty těžkých kovů. Chemické modifikace molekuly mohou výrazně měnit jeho vlastnosti a umožnit nová použití, dosud však toho, na rozdíl od škrobu, nebylo náležitě využíváno. Pektin má některé výhody proti škrobu vyplývající z přítomnosti částečně esterifikovaných karboxylů v jeho molekule. Tyto skupiny jsou vhodné pro snadné chemické modifikace (transesterifikace, amidace), které mohou vést k výrazným změnám fyzikálně-chemických a biologických vlastností vzniklých derivátů. Hydrofobně upravené deriváty pektinů vznikají vazbou nepolárních skupin na pektinové makromolekuly pomocí alkylace, acylace, esterifikace nebo amidace. Tyto deriváty nacházejí uplatnění při stabilizaci emulzí nebo pro zachycování a odstraňování nepolárních molekul, např. uhlovodíků, tuků, cholesterolu a žlučových kyselin. Pektin je v lidském těle dobře fermentovatelný substrát, proto je rozštěpen již v přední části tlustého střeva. Nádory a záněty však vznikají v dolní části tlustého střeva. Chemická derivatizace pektinu může snížit jeho dostupnost pro mikroorganismy a modifikovaný pektin by mohl být fermentován podél celého tlustého střeva a tím ho chránit. Amidace pektinu navíc zvýší jeho afinitu k žlučovým kyselinám a tukům. Dalším příkladem využití modifikovaného citrusového pektinu spočívá v tom, že blokuje galektin - závislou adhezi nádorových buněk na povrchu zdravé tkáně, a tím zabraňuje metastázi (Větvíčka, 2004).

- Chitin

Chitin je kopolymer acetylgalaktosaminu a glukosaminu. Je to hlavní stavební polysacharid exoskeletu korýšů, hmyzu a dalších bezobratlých živočichů. Je obsažen v buněčných stěnách některých řas, bakterií, kvasinek a hub.

Chitin je nerozpustný ve vodě, je prakticky nestravitelný. Částečnou alkalickou hydrolyzou se z chitinu vyrábí modifikovaný chitin – chitosan. Je také nestravitelný, avšak výrazně snižuje hladinu cholesterolu a tuku v krevním séru a v játrech (přesný mechanismus není ještě znám, pravděpodobně je na sebe váže, a tím znemožní vstřebávání) (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

3.4 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 ketosy od aldosa, pentosy od hexos apod. Vhodnou kombinací kvalitativních reakcí lze určit složení neznámé směsi cukrů. Pro chemickou charakterizaci jsou vhodné fenylsazony mono- a disacharidů. Velkou pomocí při identifikaci sacharidů je chromatografie. Řada reakcí uvedených níže je základem metod spektrofotometrického stanovení cukrů.

- Reakce založené na tvorbě furfuralu a jeho derivátů

Jednou z nejběžnějších reakcí je dehydratace sacharidů minerálními kyselinami na furfural (pentosy) a 5-hydroxymethylfurfural (hexosy). Tento aldehyd snadno kondenzuje s fenoly a aromatickými aminy (tymol, resorcin, orcin, floroglucin, naft-1-ol, anthron, difenylamin atd.) za vzniku zbarvení, které je obdobou trifenylmethanových barviv. Ke spektrofotometrickému stanovení se užívá kondenzačních produktů s fenolem, ovinem nebo resorcinem. Reakci mohou poskytovat i glykosidy a polysacharidy, pokud při podmínkách jejich důkazu dochází k jejich částečné hydrolýze.

- Reakce oxidoredukční

Tyto reakce jsou založeny na redukcí účinku volné karbonylové skupiny. Aldehydová skupina aldosa se přitom oxiduje na karboxyl, u ketos 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). Reakci lze dokázat i glycerol po hydrolýze tuků a složených lipidů.

- Tvorba fenylsazonů

Fenylsazony jsou kondenzační produkty mono- a disacharidů s přebytkem fenylnhydrazinu (podobně reagují *p*-nitrofenylhydrazin i 2,4-dinitrofenylhydrazin). Tyto látky jsou ve vodě málo rozpustné, dobře krystalizují 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 ketosa a dvě epimerní aldosa (např. fruktosa, glukosa a manosa). Jako vodítko při identifikaci může sloužit i rychlost tvorby osazonů a jejich rozpustnost, která se podstatně liší. Například osazony glukosy a fruktosy se vylučují krátce po zahřátí reakčního roztoku, kdežto sacharosa vyžaduje 20 až 30 minutové zahřívání. Osazony laktosy a maltosy se vylučují až po ochlazení. Kromě toho se fenylosazony glukosy, fruktosy a manosy (identické) nerozpouštějí v chladném acetonu, na rozdíl od fenylosazonů xylosy nebo arabinosy.

- Reakce s jodem

Amylosa – jedna z frakcí škrobu – poskytuje s jodem intenzivní modré zbarvení. Postata reakce spočívá v tom, že molekuly jodu pronikají do dutin vytvořených šroubovicí polysacharidu a ve formě klatrátu jeví změněné fyzikální vlastnosti (Káš et al., 2006).

3.4.1 Sacharidy v buňkách

Sacharidy spolu s tuky a proteiny se řadí k základním živinám. V buňkách zastávají rozmanité funkce:

- Jsou využívány především jako zdroj energie (1 gram cukru poskytuje 17 kJ), asi 75 % příjmu energie zajišťují polysacharidy, zbytek připadá na monosacharidy a oligosacharidy
- Jsou základními stavebními jednotkami mnoha buněk, chrání buňky před vnějšími vlivy (některé polysacharidy)
- Některé cukry jsou biologicky aktivní látky nebo složky mnoha biologicky aktivních látek, např. glykoproteinů, nukleových kyselin, koenzymů, hormonů, vitamínů aj.
- Ve formě vlákniny ovlivňují proces trávení potravy a průchod tráveniny zažívacím traktem
- Sacharidy výrazně ovlivňují organoleptické vlastnosti potravin (chuť, vzhled, texturu)
- Mnohé sacharidy se používají jako aditiva (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

3.4.2 Sacharidy ve výživě

Význam sacharidů ve výživě vyplývá ze skutečnosti, že kryjí polovinu a často dokonce valnou většinu energetické potřeby člověka, zpravidla 50–80 %. Podíl sacharidů ve výživě je

zvláště vysoký u obyvatelstva rozvojových zemí. V potravě naší populace tvoří sacharidy přibližně 50 % z celkové kalorické spotřeby (Provazník et al., 1998).

Sacharidy jsou pro organismus nejvýznamnějším zdrojem energie a dělíme je podle využitelnosti:

1. Sacharidy využitelné:

- Některé polysacharidy:
 - škrob, hlavním zdrojem jsou obiloviny a brambory,
 - dextriny vzniklé hydrolyzou škrobu (obsahují rovněž maltosové jednotky),
 - glykogen jaterní a svalový – struktura podobná škrobu.
- Některé oligosacharidy, hlavně disacharidy:
 - sacharosa, hlavním zdrojem je cukrová řepa a třtina
 - maltosa – vzniká hydrolyzou a ve sladu,
 - laktosa (mléčný cukr).
- Většina monosacharidů. V potravinách významná glukosa, fruktosa (ovoce, med) – málo se vyskytuje ribosa – vzniká v organismu z glukosy (nukleotidy).
- Některé deriváty sacharidů, např. aminocukry (glukosami aj.), alkoholické cukry (sorbitol aj.).

2. Sacharidy špatně využitelné:

- Z monosacharidů xylosa a arabinosa – vyskytují se velmi málo.
- Některé oligosacharidy – např. rafinosa, stachyosa nebo galaktinozitol – patří mezi flatulenční (nadýmavé) faktory. Vyskytují se hlavně v luštěninách. Netráví se v tenkém střevě, ale částečně je tráví mikroflóra tlustého střeva za vzniku plynů – CO₂ aj.
- Polysacharid inulin (chemicky jde o plyfruktosan), nachází se v topinamburech a čekance, hydrolyzát zvaný inulinový sirup se někdy využívá jako sladidlo pro diabetiky, jeho energetická hodnota je blízká hodnotě glukosy.

3. Sacharidy nevyužitelné:

- Monosacharidy, například manosa, sorbosa se vyskytují velmi málo,
- Polysacharidy,
- Celulosa, hemicelulosa, pentosany – jejich zdrojem jsou cereálie, zelenina, brambory a luštěniny,

- Rezistentní škrob je v pekařských výrobcích, extrudovaných výrobcích a luštěninách,
- Pektiny – nacházejí se v ovoci, zelenině,
- Chitin obsahují houby (Pánek, 2002).

Monosacharidy a oligosacharidy se v potravinářství označují jako cukry, protože mají mnoho společných vlastností a především mají sladkou chuť (Odstrčil et Odstrčilová, 2006).

Sacharidy jsou značně reaktivní složky potravin. Mezi nejběžnější a současně nejvýznamnější reakce sacharidů probíhající při skladování a zpracování potravin se řadí reakce s aminosloučeninami, pro které se vžil obecný název reakce neenzymového hnědnutí. Často se používá také názvu Maillardova reakce. Produkty těchto reakcí jsou důležité žluté, hnědé až černé pigmenty a aromatické látky mnoha potravin. Vznikají však také látky vykazující jisté antinutriční a toxické účinky (Velíšek, 1999).

4 Metody stanovení cukrů

Analýza sacharidů se provádí buď přímo u některých produktů, nebo z extraktu u ostatních potravinářských surovin a potravin, do nichž cukry přecházejí, přičemž pro důkaz i stanovení jsou postupy izolace obdobné.

Sacharidy z potravinářských surovin a potravin se většinou izolují extrakcí. K dokonalé extrakci musí být materiál velmi jemně rozemlet, nejlépe tak, aby velikost částic byla přibližně 0,3 mm. K rozmělnování lze použít různých typů vhodných mlýnků a homogénizátorů, při použití nevhodného mlecího zařízení dochází k dosti značným ztrátám vody ze vzorku. Jako extrakčního činidla se používá voda nebo 80% etanol, který je mnohem vhodnější především u vzorků, kde může docházet k enzymovým změnám, např. k tvorbě redukujících cukrů ze škrobu nebo k enzymové inverzi sacharosy. Při použití vody jako extrakčního činidla se předchází enzymovým změnám přidáním malého množství chloridu rtuťnatého (Hadorn et Jungkuz, 1950). Teplota extrakce nemá překročit 40 až 50 °C, aby nedošlo k porušení koloidního systému vzorku. U škrobnatého materiálu musí být extrakční teplota ještě nižší s ohledem na nebezpečí mazovatění škrobu. U materiálu obsahujícího tuk, např. u čokolád, má teplota odpovídat bodu tání přítomného tuku, jinak částice cukru zůstávají uzavřeny v tukovém obalu (Davídek, 1977).

4.1 Izolace sacharidů

4.1.1 Izolace sacharidů extrakcí etanolem

Rozpustné sacharidy přecházejí do roztoku 80% etanolu. Metoda je vhodná pro všechny druhy potravinářských materiálů.

Do 250ml kádinky se odváží 5 až 10 g jemně rozemletého vzorku a extrahuje se 1 hodinu 100 ml 80% etanolu při laboratorní teplotě za občasného míchání. Potom se etanolovým extrakt zfiltruje, k nerozpustnému zbytku se přidá dalších 100 ml 80% etanolu a zahřívá se 1 hodinu na vroucí vodní lázni pod zpětným chladičem. Jestliže je tento etanolový podíl po filtraci ještě znatelně zabarven, provede se třetí 12hodinová extrakce 80% etanolem v Soxhletově extrakčním přístroji. Etanolové filtráty se spojí a doplní v odměrné baňce na určitý objem a zfiltrují se. V alikvotní části takto připraveného extraktu se odstraní etanol odpařením na vroucí vodní lázni k suchu, odparek se rozpustí ve 100 ml vody a zahřeje na 80 °C, čímž se vysrážejí balastní nerozpustné látky. Tekuté vzorky se zahustí do sirupovité konzistence a dále zpracovávají jako etanolové extrakty (Anonymus, 1960).

4.1.2 Izolace maltosy a glukosy

Směs cukrů se rozdělí na sloupci aktivního uhlí a křemeliny elucí vodou a zředěným etanolem. Metoda je vhodná pro dělení cukrů ze škrobového sirupu a medu (Davídek, 1977). Chromatografická kolona se naplní suspenzí 0,7 g křemeliny ve vodě a mírně odsaje. Potom se přidá vodná suspenze 7 g směsi aktivního uhlí a křemelinou v poměru 1:1 a znovu se odsaje tak, aby horní konec sloupce zůstal pod vodou. Sloupec po promytí 100 ml vody je připraven k použití. K vlastnímu stanovení se na chromatografickou kolonu pipetuje 5 ml 2% cukerného roztoku, eluce se provádí za mírného podtlaku. Po protečení vzorku se opláchnou stěny kolony několika ml vody a glukosa se eluuje vodou do 100ml odměrné baňky. Eluáty se doplní příslušným elučním roztokem na 100 ml a použije se jich pro stanovení cukrů podle Somogyiho (Patterson et Savage, 1957), (Patterson et Buchan, 1961).

Stanovení redukujících sacharidů Somogyiho metodou

Redukující sacharidy v alkalickém prostředí a za zvýšené teploty (100 °C) redukují měďnatou sůl obsaženou v Somogyiho činidle. Vznikající měďná sůl vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex, jehož koncentrace se určí měřením absorbance při vhodné délce 540 nm proti slepému pokusu (Káš et al., 2006).

4.2 Důkazy cukrů

K důkazu jednotlivých cukrů se dříve používalo postupů, založených na barevných reakcích. Jejich použití je však omezeno, zvláště v těch případech, je-li v potravinách přítomno více cukrů. Nyní se používá daleko spolehlivějších metod chromatografických, přesto však nejdůležitější klasické reakce nelze opominout.

4.2.1 Obecné reakce cukrů

- Reakce podle Molische

K 1 ml zředěného vodného cukerného roztoku se přidají 1 až 2 kapky 12% etanolového roztoku 1-naftolu a opatrně se převrství 1 ml kyseliny sírové. V přítomnosti cukru vznikne na rozhraní obou vrstev fialový kroužek, po promíchání celý roztok zfialoví. Reakce je velmi citlivá, lze prokázat 0,01 % aldohexos a pentos a 0,0005 % fruktosy.

- Naftoresorcinová reakce podle Tollense

Při záhřevu roztoku cukru s malým množstvím etanolového roztoku naftoresorcinu a stejným objemem kyseliny chlorovodíkové vznikne fialové zbarvení, popřípadě sraženina rozpustná v etanolu.

- Reakce s difenylaminem a kyselinou chlorovodíkovou

K 1 ml cukerného roztoku se přidají 2 ml roztoku difenylaminu a směs se zahřívá 10 až 30 minut ve vroucí vodní lázni. Hexosy dávají modré a pentosy zelenožluté zbarvení (Davídek, 1977).

- Reakce tryptofanu a kyseliny sírové za přítomnosti kyseliny borité

Ke 2 ml cukerného roztoku se přidá 7 ml roztoku složeného z 50 g kyseliny borité, 230 ml vody a 770 ml kyseliny sírové a po ochlazení ve studené vodě poté 1 ml 0,1% roztoku tryptofanu. Po promíchání za přítomnosti hexos a pentos vzniká fialové zbarvení (Badin et al., 1953).

4.2.2 Důkazy redukujících cukrů

- Reakce Nylanderova

K 5 až 10 ml zkoumaného roztoku se přidá 1 ml Nylanderova činidla (2 g dusičnanu bizmutitého a 4 g vinanu sodnodraselného se rozpustí ve 100 ml 8% hydroxidu sodného). Za přítomnosti redukujícího cukru vzniká hnědočerná sraženina (Acker et al., 1967).

- Reakce se Soxhletovým činidlem

Ke směsi roztoků Soxhletova činidla I a II (2 ml + 2 ml) se přidají 2 až 3 ml zkoumaného cukerného roztoku a roztok se zahřeje k varu. Přítomnost redukujících látek se projeví vznikem oxidu měďnatého, který má černou barvu (Janíček et al., 1962).

4.2.3 Důkazy pentos

- Reakce s fluoroglucinem podle Wheelera a Tollense

K 5 ml 0,1% roztoku pentos se přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové, 20 mg fluoroglucinu a směs se povaří 2 minuty. Pentosy reagují za vzniku fialovočerveného zbarvení, methylpentosy nereagují (Weeler et Tollens, 1889).

- Reakce s acetonem podle Rosenthalera

K 5 ml 0,1% roztoku pentos se přidá 10 ml kyseliny chlorovodíkové, 1 až 2 ml acetonu a směs se zahřívá ve vroucí vodní lázni, až vznikne fialovočervené zbarvení. Zahřívá-li se směs dále 3 až 5 minut a potom se chladí 1/2 až 1 hodinu, zbarvení vyvolané pentosami zmizí (Rosenthaler, 1909).

4.2.4 **Důkaz hexos**

K 1 ml cukerného roztoku se přidá 10 ml kyseliny chlorovodíkové a 0,5 ml 0,3% etanolového roztoku. Směs se 3 minuty zahřívá ve vroucí vodní lázni. Přítomnost hexos se projeví vznikem fialového zbarvení. Hexosany reagují stejným způsobem. Pentosy a kyseliny uronové poskytují slabě hnědé zbarvení. Při použití zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:1) reaguje pouze fruktosa (Dische et Popper, 1926).

4.2.5 **Důkaz aldohexos**

K 1 ml cukerného roztoku se přidá 5 ml 0,4% roztoku α -aminodifenylu v kyselině octové a zahřívá se 45 minut na 100 °C. V přítomnosti aldohexos vznikne zelené zbarvení (Timell et al., 1956).

4.2.6 **Důkaz ketohexos**

K 0,5 až 1 g močoviny se přidá v porcelánové misce 5 až 6 kapek kyseliny chlorovodíkové a 2 až 3 kapky zkoušeného cukerného roztoku. Krouživým pohybem se rozpustí močovina a po pětiminutovém záhřevu na vodní lázni se přítomnost fruktosy projeví tyrkysově modrým kroužkem (Fearon et Drum, 1950).

4.3 **Chromatografické metody stanovení cukrů**

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. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované (Klouda, 2003).

4.3.1 **Sloupcová chromatografie**

Adsorpční chromatografie se používá v analytice sacharidů jednak k jejich izolaci z různých směsí, jednak k odstranění nečistot při přípravě čistých látek. Ze všech absorbentů se používá aktivní uhlí, neboť na něm lze dělit sacharidy na monosacharidy, disacharidy a trisacharidy. Avšak vysoká adsorpční mohutnost aktivního uhlí znesnadňuje eluci, část cukrů zůstává

i pevně vázaná a nedá se kvantitativně eluovat. K dělení cukrů je vhodná i rozdělovací chromatografie (Davídek, 1977).

4.3.2 Chromatografie na papíře

Chromatografie na papíře umožňuje velmi jednoduchým způsobem získat přehled o kvalitativním zastoupení jednotlivých cukrů v potravinách, což je zvláště cenné pro následující výběr vhodných metod jejich stanovení.

Sacharidy mají při dělení papírovou chromatografií hodnoty R_F velmi blízké, takže jejich identifikace na základě těchto hodnot lze použít jen u jednoduchých směsí. Účelnější je použití standardního přídatku nebo dělení v několika rozpouštědlových soustavách a k identifikaci použít činidel dávajících specifické barevné reakce s jednotlivými sacharidy.

Vzorky pro dělení sacharidů chromatograficky na papíře nesmějí obsahovat bílkoviny, jejich odstranění se provádí čiridly. Velmi výhodné je i použití extrakčního způsobu. Rušící anorganické soli lze odstranit na vhodných ionexech. Nejvhodnější je použití slabě bazických aniontů. V přítomnosti většího množství soli se doporučuje nejdříve provést atrakci cukrů 80% etanolem (Jayme et Knolle, 1960).

Nejpoužívanější technikou v papírové chromatografii cukrů je sestupné vyvíjení, zvláště opakované. Touto technikou je možné oddělit i sacharidy s velmi blízkými hodnotami R_F .

Jako nejvhodnější rozpouštědlová soustava pro dělení cukrů je směs n-butanol, kyselina octová, voda (4:1:5). Vyšších hodnot R_F lze dosáhnout v rozpouštědlové soustavě fenol nasycený vodou, obdobně i kolidin nasycený vodou (Patridge, 1948).

K nejrozšířenějším detekčním činidlům cukrů patří činidlo připravené z 0,93 g anilinu a 1,66 g kyseliny ftalové. Obě látky se rozpustí ve 100 ml n-butanolu nasyceného vodou. S aldopentosami vzniká červenohnědé zbarvení s červenou fluorescencí, s aldohexosami hnědé zbarvení se žlutohnědou fluorescencí. Neredukující cukry většinou nereagují (Jermyn et Isherwood, 1949).

4.3.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Z absorbentů se používá silikagelu a křemeliny. Silikagel je vhodnější, umožňuje použít až desetinásobného množství cukru. Lepší výsledky dává křemelina pufrovaná octanem sodným v chromatografické soustavě etylacetát, 65% propan-2-ol (65:35) a dále pak silikagel (Pastuska, 1961) 0,1N pufrovaný roztokem kyseliny borité v soustavách benzen, kyselin octová, metanol (1:1:3). K detekci cukrů se používá činidel jako u chromatografických metod

na papíře. Vhodným činidlem je směs složená z 9 ml 95% etanolu, 0,5 ml kyseliny sírové, 0,5 ml anisaldehydu a několika kapek kyseliny octové (Stahl et Kaltenbach, 1961).

4.4 Stanovení sacharidů

K stanovení sacharidů se používá řady fyzikálních, fyzikálně chemických, chemických a biochemických metod.

Polarimetrické metody jsou použitelné většinou pouze pro stanovení sacharosy, která je podstatnou složkou cukrovarnických nebo cukrovinkářských výrobků. Přítomnost opticky aktivních látek ovlivňuje výsledné stanovení. Také použitá čířidla, zvláště při jejich nedokonalém odstranění, stanovení nepříznivě ovlivňují.

Metody redukční nestechiometrické využívají redukujících vlastností cukrů, popřípadě jejich štěpných produktů v alkalickém prostředí.

Spektrofotometrické metody se vyznačují hlavně jednoduchostí, časovou nenáročností a poměrně velkou citlivostí, takže jsou vhodné pro sériovou analýzu. Většina z nich je založena na barevných reakcích derivátů furfuralu, vznikajícího z cukru v kyselém prostředí, nebo na stanovení barevné intenzity nespotřebovaného alkalického měďnatého roztoku (Jeníček et Hrdlička, 1954).

- Stanovení sacharosy přímou polarizací

Z otáčivosti vzorku se zjistí množství sacharosy. Metoda je vhodná pro stanovení sacharosy v surovém cukru, melase a v cukrovarnických produktech (Davídek, 1977).

Do 200ml odměrné baňky se odváží 2N vzorek surového cukru, rozpustí se mícháním se 100 až 150 ml vody a po vytemperování na 20 °C se doplní ke značce. Roztok se vyčिří suchým práškovým zásaditým octanem olovnatým a zfiltruje do kádinky. První podíl filtrátu se nesbírá, v dalším se zjistí polarizace při teplotě 20 °C v 200mm trubici. Hodnota zjištěná ze stupnice na polarimetru udává přímo procenta sacharosy. Rozdíl mezi dvěma stanoveními nemá být větší než 0,5 % (VÚPP, 1967).

- Stanovení sacharosy podle Clergeta

Z rozdílu hodnot přímé polarizace analyzovaného vzorku a polarizace po inverzi se zjistí množství sacharosy. Metoda je vhodná pro stanovení sacharosy ve směsi s jinými opticky aktivními látkami, které během inverze nemění svou polarizaci.

Do 200 ml odměrné baňky se naváží určité množství vzorku, rozpustí a vyčeri 2 až 4 ml roztoku zásaditého ostanu olovnatého. Obsah baňky se dokonale promíchá, vytemperuje na 20 °C, doplní po značku vodou a zfiltruje. První podíl filtrátu se nesbírá.

Z čirého filtrátu se nepipetuje 50 ml do 100ml odměrné baňky, vytemperuje na 20 °C, doplní vodou, promíchá a polarizuje se ve 200mm trubici. Výsledek násobený dvěma dává přímou polarizaci. Další 50 ml filtrátu se nepipetuje do 100ml odměrné baňky, přidá se 25 ml kyseliny chlorovodíkové a odměrná baňka s vloženým teploměrem se ponoří do vodní lázně teplé 71 °C tak, aby se obsah baňky vyhřál nejdéle za 3 minuty na teplotu 67 °C, při níž se udržuje přesně 5 minut. Potom se rychle ochladí na 20 °C, teploměr se vyjme a opláchně, obsah se doplní a zfiltruje. Polarizuje se ve 200mm trubici. Jelikož je roztok k polarizování tmavě zabarven, odbarví se pomocí 0,2 g aktivního uhlí.

Obsah sacharosy v % (S) se vypočte podle vzorce:

$$S = (100 (P - I)) / (143,5 - 0,5t)^3$$

P – zdvojnásobený přímý polarimetrický nález

I – zdvojnásobený polarimetrický nález po inverzi

t – teplota zinvertovaného roztoku při polarizaci v °C

Rozdíl mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být větší 0,3 % (Anonymus, 1960).

- Stanovení podle Thalera

Zjistí se optická otáčivost sacharosy pro inaktivaci opticky aktivních redukujících cukrů hydroxidem barnatým. Metoda je vhodná pro stanovení sacharosy v čokoládě a v čokoládových výrobcích.

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se naváží 10 g čokolády, přidá se 0,5 g uhličitanu vápenatého, 100 ml vody a pod zpětným chladičem se vše zahřívá ve vodní lázni při 50 až 60 °C za častého míchání tak dlouho, až je vzorek dokonale rozpuštěn. Potom se rychle ochladí, přidají se 2 ml 40% roztoku zásaditého octanu olovnatého, vše se promíchá a zfiltruje.

Z takto připraveného cukerného roztoku se odpipetuje 50 ml do 100ml odměrné baňky, přidá se 1 g hydroxidu barnatého a zahřívá se ve vodní lázni při 70 až 80 °C za občasného promíchání. Po 1 hodině záhřevu se baňka ochladí, obsah zneutralizuje 15% kyselinou octovou na fenolftalein, doplní vodou na 100 ml a zfiltruje. Čirý filtrát se polarizuje v trubici o délce 200 mm. Polarizační nález ve stupních Ventzkeho vynásobený faktorem 0,986 na korekci objemu sraženiny odpovídá množství sacharosy přítomné ve vzorku. Dvě souběžná stanovení se nemají lišit o více než 0,3 % (Thaler, 1940).

- Stanovení redukujících cukrů podle Ofnera

Oxid měďný vyredukovaný přítomnými redukujícími cukry se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a měďné ionty se zoxidují jodem na měďnaté. Přebytek jodu se určí titrací

thiosíranem sodným. Metoda je zvláště vhodná ke stanovení malého množství invertního cukru za přítomnosti značného množství sacharosu např. v těžké šťávě, surovém cukru apod. Naváží se 20 až 50 g vzorku do 200ml odměrné baňky, rozpustí a doplní se ke značce vodou. Roztok se vyčिří asi 0,7 g pevného zásaditého octanu olovnatého a po promíchání se roztok zfiltruje. Z filtrátu se odměří do 200ml odměrné baňky 160 ml roztoku, přidá se 15 ml roztoku hydrogenufosforečnanu sodného, doplní se ke značce, přidá se 1 g aktivního uhlí, vše se důkladně promíchá a po chvilce zfiltruje. Z takto připraveného filtrátu se odpipetuje ke stanovení 50 ml roztoku do 250 až 300ml Erlenmeyerovy baňky a přidá se 50 ml Ofnerova činidla. Obsah baňky se přivede během 4 až 5 minut do varu. Po přesně 5minutovém mírném varu se roztok rychle ochladí, přidá se 15 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové a za mírného kroužení baňkou přebytek 0,0323N roztoku jodu. Baňka se rychle uzavře zátkou, obsah baňky se občas promíchá, po 2 minutách se přidá 5 ml 0,5% roztoku škrobu a titruje 0,0323N roztokem thiosíranu sodného. Při větším množství redukujících látek, než odpovídá 15 ml 0,0323N roztoku jodu, je nutné stanovení opakovat s menším množstvím cukru, při čemž rozdíl do 50 ml se doplní vodou. Množství redukujících látek (x) se vypočte podle vzorce:

$$x = ((a - b) - 0,02c) / 2c$$

a – přidané množství 0,0323N roztoku jodu v ml

b – spotřeba 0,0323N roztoku thiosíranu sodného v ml

c – množství vyčiřeného roztoku použitého k redukci v ml

1 ml 0,0323N roztoku jodu odpovídá 1 mg redukujících látek. Rozdíl mezi dvěma stanoveními nemá být větší než 0,03% (VÚPP, 1967).

- Stanovení redukujících cukrů podle Potterata a Eschmanna

Oxid měďný vyredukovaný redukujícími cukry se rozpustí v kyselině dusičné a měďnaté ionty se stanoví komplexometricky. Metoda je vhodná pro stanovení redukujících cukrů v rostlinných potravinářských materiálech.

Do 100ml zábrusové baňky se pipetuje 10 ml vyčiřeného cukerného roztoku podle metody Luffovy – Schoorlovy. Roztok obsahuje 5 až 35 mg cukru, přidá se 10 ml alkalického roztoku síranu měďnatého s komplexonem a několik varných kaménků. Obsah baňky na azbestové síťce se přivede pod zpětným chladičem během 2 minut k varu a od této doby se slabě vaří přesně 10 minut. Poté se přidá zpětným chladičem 25 ml studené vody za účelem okamžitého přerušování varu. Po dokonalém ochlazení tekoucí vodou se tekutina odsaje. Filtrát má zůstat ještě slabě modře zbarven, jinak je nutno použít ke stanovení menšího množství zkoumaného

vzorku. Vyredukovaný oxid měďný se dobře promyje studenou vodou, která se několikrát odsaje obrácenou fritou, a rozpustí 4 až 5 kapkami kyseliny dusičné. Zůstává-li nerozpustný zbytek, přidá se dalších 5 ml 1N roztoku kyseliny dusičné a krátce se povaří. Roztok v baňce se po ochlazení neutralizuje 1N roztokem amoniaku až do slabě modrého zákalu, poté se přidá 5 ml 1N amoniaku, při čemž se tmavě modrý roztok vyjasní. Čirý roztok se ještě zředí vodou na 250 až 300 ml. Po přidání 30 mg směsi murexidu s chloridem sodným se titruje 0,02M roztoku komplexonu, při čemž zelená barva roztoku přechází v modrofialovou. Ze spotřebovaného objemu 0,02M roztoku komplexonu III se z tabulky odečte odpovídající množství redukujících cukrů. Vyšší množství kovů ruší stanovení, odstranění je možné přidáním přebytku komplexonu v alkalickém roztoku síranu měďnatého. Rozdíl mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být větší než 0,03 % (Potterat et Eschmann, 1954).

- Stanovení redukujících cukrů podle Lenea – Eynona

Alkalický roztok měďnaté soli se titruje za varu cukerným roztokem do vymizení modrého zabarvení. Metoda je vhodná pro stanovení redukujících cukrů v trvanlivém pečivu.

Do širokohrdlé 250 až 300ml Erlenmeyerovy baňky se nepipetuje přesně 12,5 ml Soxhletova roztoku I, obsahuje-li zkoušený vzorek 0,3 až 0,6 g redukujících cukrů ve 100 ml. Je-li jejich množství menší než 0,3 g, pipetuje se pouze po 5 ml Soxhletova roztoku I a II. Analyzovaným cukerným roztokem připraveným podle Luffa – Schoorla se naplní 50ml byreta. Z byrety se do Erlenmeyerovy baňky připustí 15 ml cukerného roztoku, přidá se několik varných kaménků a obsah baňky se zahřeje na síťce k varu během 2 až 3 minut. Po jedné minutě varu se přidá 2 až 5 kapek roztoku methylenové modři a z byrety se přidávají malé dávky cukerného roztoku bez přerušení varu, za stálého promíchávání obsahu krouživým pohybem, od počátku varu. Pro větší přesnost se titrace opakuje tak, že se ke Soxhletovým roztokům přidá z byrety téměř veškerý cukerný roztok potřebný k redukcí mědi, aby k vlastnímu dokončení titrace zbývalo pouze 0,5 až 1,0 ml cukerného roztoku. Roztok se zahřeje k varu, po 2 minutách se přidá 3 až 5 kapek methylenové modři a titrace se dokončí malými přídávky cukerného roztoku během 1 minuty. Ze spotřeby cukerného roztoku v ml se v příslušné tabulce zjistí množství redukujících cukrů ve 100 ml zkoušeného roztoku a přepočítá se na jejich celkový obsah v sušině. Dvě souběžná stanovení se nemají lišit o více než 0,3 % (Heyns, 1959).

- Stanovení aldosa metodou podle Auerbacha – Badländera – Borriese

Aldosy se oxidují v slabě alkalickém prostředí jodem na příslušné kyseliny, přebytek jodu se stanoví titračně thiosíranem sodným Metoda je vhodná pro stanovení aldosa, např. glukosy

vedle fruktosy v medu apod. Fruktosa se vypočítá z rozdílu veškerých redukujících cukrů a glukosy.

25 ml cukerného roztoku, který obsahuje 10 až 200 mg glukosy, se nepipetuje do zabroušené 500ml Erlenmeyerovy baňky, přidá se po 50 ml 0,2M roztoku uhličitanu sodného a 0,2M roztoku hydrogenuhličitanu sodného a poté 15 až 25 ml 0,1N roztoku jodu, baňka se zazátkuje a nechá stát v temnu 1,5 až 2 hodiny. Přebytek jodového roztoku nemá být vyšší než 8 ml. Po skončené době stání se zátka opláchne vodou, obsah baňky se okyselí 12 ml 25% kyseliny sírové a titruje se 0,1N roztokem thiosíranu sodného. Od spotřeby 0,1N roztoku thiosíranu sodného při vlastním stanovení cukrů je nutno odečíst spotřebu slepého pokusu. 1 ml spotřebovaného 0,1N roztoku thiosíranu sodného odpovídá 0,005 mg glukosy. Obsah fruktosy se vypočítá z rozdílu obsahu veškerých redukujících cukrů a zjištěného obsahu glukosy. Dvě souběžná stanovení se nemají lišit o více než 1 % (Auerbach et Bodländer, 1923), (Auerbach et al., 1926).

- Spektrofotometrické stanovení ribosy

Ribosa reaguje v silně kyselém prostředí s orcinolem v přítomnosti měďnatých iontů za vzniku zelenomodrého zbarvení, jehož intenzita je úměrná koncentraci ribosy. Metoda je vhodná pro stanovení ribosy v mase a masných výrobcích. Stejně reaguje i ribosa vázaná ve formě volných nukleosidů a nukleotidů. Pro stanovení volné ribosy je nutné uvedené látky oddělit. Ostatní cukry přítomné v mase stavení neruší.

Připraví se extrakt z masa a masných výrobků pro stanovení ribosy.

Do zkumavky se zabroušenou zátkou se pipetuje 1 až 5 ml zneutralizovaného extraktu, přidají se 4 ml orcinolového činidla a voda na celkový objem 10 ml. Uzavřená zkumavka se zahřívá 45 minut ve vroucí vodní lázni. Po ochlazení se intenzita zelenomodrého zbarvení proměří při 650 nm proti slepému pokusu.

Pro přípravu kalibrační křivky se připraví zásobní roztok ribosy a do sady zkumavek se zabroušenými zátkami se pipetuje 0, 1, 2 až 5 ml tohoto roztoku. Přidají se 4 ml orcinolového činidla, voda do celkového objemu 10 ml a dále se postupuje jako při vlastním stanovení (Cerriotti, 1955).

4.5 Stanovení polysacharidů

4.5.1 Stanovení škrobu

K důkazu škrobu se používá známé reakce s jodovým roztokem. Stejnou reakci jako škrobová zrnka dává i zmazovatělý škrob, ze štěpných produktů škrobu se barví modře pouze

amylodextrin. Reakce je velmi citlivá na teplotu. Při záhřevu zabarvení mizí, ochlazením se opět vrací. Jako činidla se používá 0,1N roztoku jodu nebo roztoku jodu a jodidu draselného. K rozlišení jednotlivých druhů škrobu podle původu neexistují dosud specifické chemické reakce, nejspolehlivější je důkaz mikroskopický. Škrob lze stanovit vážkově, polarimetricky, spektrofotometricky a po hydrolýze jako glukosu

- Polarimetrické stanovení škrobu

Škrob se převede v rozpustnou formu působením kyseliny chlorovodíkové a stanoví polarimetricky. Metoda je použitelná pro běžné potravinářské suroviny a potraviny obsahující škrob (Davídek, 1977).

- Metoda podle Ewerse

Do 100ml Kohlrauschovy odměrné baňky se naváží 5 g suchého, jemně rozmlétoho vzorku nebo 10 g rozstrouhaných brambor a přidá se 25 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové. Obsah baňky se kroužením důkladně promíchá a stěny se opláchnou dalšími 25 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové. Potom se baňka vlačí do vroucí vodní lázně a zahřívá přesně 15 minut, po 3 minutách se obsah baňky promíchá. Po 15 minutách se baňka vyjme z vodní lázně, přidá se dalších 20 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a ochladí se. Obsah baňky se vyčिří 3 ml 20% roztoku molybdenanu sodného nebo 10 ml 4% roztoku kyseliny fosfowolframové, popřípadě i 0,5 ml Carrezova činidla I a 0,5 ml Carrezova činidla II. Po vyčiření se baňka doplní vodou, obsah důkladně promíchá a zfiltruje se. Filtrát se polarizuje v polarizační trubici délky 200 mm. Obsah škrobu se vypočítá vynásobením stupňů odečtených na stupnici Soteil-Ventzkeho přepočítávacím faktorem pro příslušný druh škrobu. Přepočítávací faktory pro škrob: pšeničný 1,898, žitný 1,912, kukuřičný 1,879. Rozdíl mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být větší než 0,5 % (Ewers, 1908).

- Metoda podle Lintnera a Belschnera

2 g mouky se rozetrou v porcelánové misce s 10 ml vody a přidá se 15 až 20 ml kyseliny chlorovodíkové za pečlivého roztírání vzorku. Po 30minutovém stání se obsah třecí misky spláchne zředěnou kyselinou chlorovodíkovou do 100ml odměrné baňky a vyčiří se přidávkem 5 ml 8% roztoku kyseliny fosfowolframové. Po doplnění baňky zředěnou kyselinou chlorovodíkovou se obsah promíchá, zfiltruje a polarizuje v trubici o délce 200 mm. Při použití polarimetru Soleil-Ventzkeho se převede údaj na kruhové stupně vynásobením faktorem 0,3462. Množství škrobu se zjistí vynásobením údaje v kruhových stupních délkou polarizační trubice a dělením specifickou otáčivostí škrobu. Specifická otáčivost škrobu: pšeničný 182,7, žitného 182,7, kukuřičného 184,6. Rozdíl mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být větší než 0,5 % (Belschner, 1907).

- Stanovení škrobu po hydrolýze na redukující cukry

Po odstranění všech rušících látek se převede škrob kyselou hydrolýzou na redukující cukry, které se stanoví jako glukosa. Metoda je vhodná zvláště pro vzorky čistého škrobu. Jde-li o běžný potravinářský materiál obsahující škrob, výsledky ovlivňují sacharidy, které vznikají štěpením pentozanů kyselou hydrolýzou.

2,5 až 3 g dobře rozemletého a usušeného vzorku se smíchají v kádince s 50 ml studené vody. Za občasného promíchání se směs po 1 hodině zfiltruje a zbytek na filtru se dobře promyje 250 ml vody. Zbytek na filtru se převede do baňky se zábrusem směsí 200 ml vody a 20 ml 25% kyseliny chlorovodíkové a vaří pod zpětným chladičem 2,5 hodiny. Poté se roztok ochladí, zneutralizuje hydroxidem sodným, převede do 250ml odměrné baňky, doplní vodou a zfiltruje. V alikvotní části filtrátu se stanoví glukosa jodometricky. Z nalezeného množství glukosy se vypočte obsah škrobu vynásobením faktorem 0,90 (Anonymus, 1960).

4.5.2 Stanovení dextrinů

Dextriny se z analyzovaného vzorku vysrážejí etanolem a po hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou se stanoví jako glukosa. Metoda je použitelná pro produkty hydrolytického štěpení škrobu.

2 až 10 g vzorku se rozpustí na porcelánové misce v horké vodě a na vroucí vodní lázni zahustí do sirupovité konzistence. Dextriny se vysrážejí přidávkem 40 ml metanolu a 160 ml etanolu. Vzniklá sraženina se po usazení zfiltruje, na filtru se rozpustí 10 ml vody a rozpuštěné dextriny se opět srážejí etanolem. Po odfiltrování se znovu rozpustí ve vodě, převedou do 100ml odměrné baňky a doplní vodou. K další práci se vezme množství roztoku odpovídající jednomu gramu původního vzorku. K tomuto množství se ve 100ml odměrné baňce přidá 25 ml 3N roztoku kyseliny chlorovodíkové a 1 hodinu se zahřívá na vroucí vodní lázni. Po ochlazení se roztok zneutralizuje 30% hydroxidem sodným na methylovaně a po vytemperování doplní vodou. Ve 25 ml tohoto roztoku se pak stanoví glukosa jodometricky. Množství glukosy vynásobené faktorem 0,9 udává množství dextrinů v alikvotní části analyzovaného vzorku (Janíček et al., 1962).

4.5.3 Stanovení pektinu

Pektinové látky se převedou chloridem vápenatým na nerozpustný pektan vápenatý, který se stanoví vážkově. Metoda je vhodná na stanovení pektinu v surovinách a v některých výrobcích konzervářského průmyslu.

Odváží se přesně 100 až 150 g jemně rozemletého vzorku do 600ml kádinky, přidá se 300 až 400 ml vody a zahřívá se na vroucí vodní lázni 1 hodinu za občasného promíchání. Po ochlazení se obsah kádinky převede do 500ml odměrné baňky, doplní vodou a zfiltruje. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 600ml kádinky a pektin se sráží 50 ml 96% etanolu za neustálého míchání. Vzniklá sraženina se odfiltruje a rozpustí v horké vodě. Takto získaný roztok se zneutralizuje 0,1N roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein. Po krátké době se přidá ještě 100 ml 0,1N roztoku hydroxidu sodného a směs se nechá stát 15 minut. Potom se přidá 50 ml 1N roztoku kyseliny octové a po 5 minutách 50 ml 1N roztoku chloridu vápenatého. Po 1 hodině se směs 2 minuty povaří za stálého míchání, ještě horká zfiltruje a sraženina na filtru promyje. Sraženina se převede z filtru do kádinky a znovu krátce povaří s 200 až 300 ml vody. Filtruje se analytickým vysušeným zváženým filtrem, promývá horkou vodou do odstranění chloridových iontů a suší do konstantní hmotnosti při 100 °C. Množství pektanu vápenatého se vyjádří v procentech původního vzorku (Griebel, 1927).

4.5.4 Stanovení vlákniny

Stanovení vlákniny běžnými analytickými metodami není rovněž přesné, ovlivňuje ho přítomnost lignocelulos a pentozanů (Davídek, 1977).

- Stanovení podle Henneberga a Stohmanna

Vlákninou se v tomto případě rozumí zbytek po vyvaření zkoumaného vzorku v 5% kyselině sírové a v 5% hydroxidu sodném. Metoda je vhodná pro stanovení vlákniny v rostlinném materiálu. V současné době se používá při rozborech krmiv. V některých případech mohou výsledky ovlivnit přítomné pentosany.

Do 500ml Erlenmeyerovy baňky se naváží 2 až 3 g jemně rozemletého vzorku. U materiálů obsahujících malé množství vlákniny se navažuje až 5 g. Vzorek se vaří na azbestové síťce pod zpětným chladičem 30 minut s 200 ml 1,25% kyseliny sírové. Během mírného varu je nutno baňkou několikrát opatrně zamíchat. Poté se ještě za horka roztok zfiltruje přes filtrační kelímeček a promyje horkou vodou. Zbytek ve filtračním kelímku se převede do Erlenmeyerovy baňky 25% hydroxidem sodným a vaří se znovu 30 minut. Po skončeném varu se roztok zfiltruje přes zvážený filtrační kelímeček, dobře promyje horkou vodou, etanolem a diethyletherem. Obsah filtračního kelímku se vysuší při 105 °C a po vychladnutí se kelímeček zváží. Po zvážení se kelímeček vloží do muflové pece, obsah se spálí při teplotě kolem 650 °C a po opětném zvážení se hmotnost popela odečte od hmotnosti vysušené sedliny. Z rozdílu se pak vypočte čistá vláknina. Pro velkou hygroskopičnost vlákniny dochází při neopatrném sušení a vážení k značným chybám (Thaler, 1967).

- Stanovení podle Mergenthalera

K rozrušení balastních látek vzorků se používá směsi etylenglykolu, vody a kyseliny sírové, vláknina se stanoví vážkově. Metoda je vhodná pro potravinářské suroviny. Není časově příliš náročná.

Odváží se 2 g usušeného a jemně rozemletého vzorku a do 500ml Erlenmeyerové baňky se zábrusem, přidá se 150 ml směsi etylenglykolu s kyselinou sírovou a vodou. Směs se vaří pod zpětným chladičem 1 hodinu. Po ochlazení se přidá 150 ml vody a krátce povaří. Ještě za horka se zfiltruje zváženým filtračním kelímkem, promyje 50 ml horké vody, horkým etanolem a na konec diethyletherem. Vysouší se při 150 °C a zváží. Obsah se zpopelní v muflové peci při 650 °C a po vychladnutí zváží. Další postup je stejný jako u předchozí metody (Mergenthaler, 1959).

- Stanovení podle Scharrera a Kürschnera

Působením směsi kyseliny octové, dusičné a trichloroctové se rozruší balastní látky a získá se vláknina, která se stanoví vážkově. Metoda je vhodná pro stanovení vlákniny v rostlinném materiálu, poskytuje reprodukovatelné výsledky a je časově málo náročná.

Do 100ml baňky se zábrusem se naváží 1 g jemně rozemletého vzorku, přidá se 25 ml směsi složené ze 75 ml 70% kyseliny octové, 5 ml 65% kyseliny dusičné a 2 g kyseliny trichloroctové. Obsah se vaří pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Ještě vroucí tekutina se zfiltruje za sníženého tlaku přezíhaným a zváženým filtračním kelímkem. Pevný podíl v kelímku se promyje vroucí vodou, potom třikrát etanolem a nakonec diethyletherem. Kelímkem se suší při 100 °C až 110 °C, zváží se a jeho obsah se zpopelní. Další postup je stejný jako u metody podle Henneberga a Stohmanna. Rozdíl mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být větší než 0,2 % (Scharrer et Kürschner, 1932).

4.6 Chromatografie

4.6.1 Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek.

Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek (Klouda, 2003).

V analýze cukrů plynovou chromatografií se dnes téměř výhradně používá jejich trimethylsilyletherů, které jsou dostatečně stálé a těkavé, takže umožňují dělení až di-, tri- a tetrasacharidů. Voda, která je ve vzorcích často přítomna, ovlivňuje nepříznivě jejich stálost a mění charakteristiky používaných chromatografických kolon. Byla navržena řada metod silylace vzorků obsahujících určitá množství vody, např. silylace hexamethyldisilazanem s kyselinou triflouroctovou (Lott et Brobst, 1966).

4.6.2 **Kapalinová chromatografie**

Pro stanovení přesných zastoupení jednotlivých sacharidů ve vzorku, je nutné používat metodu zvanou chromatografie (obr. 6). V důsledku rozdílné afinity analytu k jednotlivým fázím dojde k rozdělení směsi cukrů na jednotlivé složky a na chromatogramu se zobrazí jednotlivé píky, které jsou charakteristické pro konkrétní sacharid. Z plochy či výšky píku lze stanovit množství jednotlivých sacharidů ve vzorku. Díky této schopnosti je chromatografie v dnešní době nejvyužívanější metodou při stanovování sacharidů v potravinách.

V současnosti jsou používány tři varianty kapalinové chromatografie. Nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a planární chromatografie (Opekar, 2002).

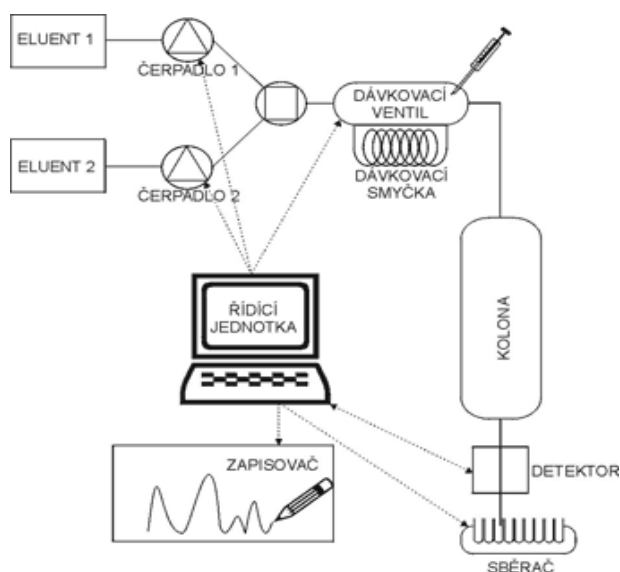
V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii.

V klasické kapalinové chromatografii se naplní skleněná trubice délky okolo 0,5 m a průměru 2 cm, dole zakončená fritou s kohoutem, zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic. Na horní vrstvu náplně se dávkuje malé množství vzorku a pak se přidává mobilní kapalná fáze. Působením gravitační síly mobilní fáze postupuje kolonou, složky vzorku se od sebe separují v různých časech a opouštějí spodní část kolony.

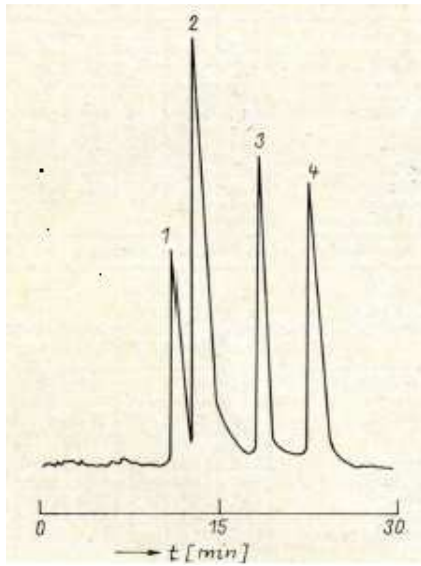
Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo základem vysoce účinné kapalinové chromatografie – HPLC (Klouda, 2003). Při průchodu mobilní fáze chromatografickou kolonou dojde k rozdělení směsi cukrů na jednotlivé složky a na chromatogramu se zobrazí jednotlivé píky, které jsou charakteristické pro konkrétní sacharid (obr. 7). Z plochy či výšky píku lze stanovit množství jednotlivých sacharidů ve vzorku. Nejčastěji používanou mobilní fází pro stanovení jednotlivých cukrů je směs acetonitrilu a vody. K detekci je používán refraktometrický detektor (Yamamoto et al., 2008). Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Srovnáme-li kapalinovou a plynovou chromatografii z hlediska účinnosti, je v kapalinové chromatografii nižší přídavek molekulární difuze složky, protože kapalina má výrazně vyšší viskozitu než plyn (Klouda, 2003).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má několik výhod:

1. Vysoká rozlišovací schopnost, která umožňuje běžné dělení takových směsí látek, které není možné rozdělit jinými metodami.
2. Rychlost, při které je úplného rozdělení dosaženo v čase kratším než 1h.
3. Vysoká citlivost, která dovoluje kvantitativně stanovit množství látek řádově v pikomolech.
4. Možnost automatizace (Voet et Voetová, 1995).



Obrázek č. 6 Schéma chromatografie (MŠMT ČR, 2004).



- 1. Rafinosa
- 2. Maltosa + Sacharosa
- 3. Glukosa
- 4. Fruktosa

Obrázek č. 7 Chromatogram (Ondroušek et al., 1984).

5 Závěr

Při stanovování sacharidů v potravinách je velmi důležité jasně specifikovat, za jakým účelem je rozbor vzorku obsahující sacharidy prováděn. Řada metod slouží pouze k důkazu přítomnosti sacharidů ve vzorku, ale nepodává konkrétní informace ohledně množství či druhu přítomného sacharidu.

Samotná analýza sacharidů se provádí buď přímo z roztoku vzorku obsahujícího sacharid, nebo z extraktů potravinářských surovin a potravin, do nichž cukry přecházejí.

K důkazu sacharidů je třeba z analyzovaného materiálu předem převést sacharidy do roztoku, jako rozpouštědlo se nejčastěji používá voda nebo 80% etanol.

Pro dokazování přítomnosti cukrů v potravinách se využívají chemické reakce založené na změně zabarvení. Tyto reakce pouze poskytují informace, zda zkoumaný vzorek obsahuje cukry, respektive o jakou skupinu cukrů se jedná, nikoliv konkrétní druh cukru.

Ke stanovení sacharidů se používá řady fyzikálních, fyzikálně chemických, chemických a biochemických metod. Metody redukční nestechiometrické, patřící mezi chemické metody odměrné analýzy, využívají redukčních vlastností cukrů, či jejich štěpných produktů v alkalickém prostředí. Metoda, která se aplikuje především pro určení sacharosy je polarimetrie, ta je založena na přítomnosti opticky aktivních látek. Většina spektrofotometrických metod je založena na barevných reakcích derivátů furfuralu, vznikajícího z cukru v kyselém prostředí, nebo na stanovení barevné intenzity nespotřebovaného alkalického měďnatého roztoku. Z hodnot absorbance barevného roztoku lze stanovit množství sacharidů ve vzorku.

Pro stanovení přesných zastoupení jednotlivých sacharidů ve vzorku, je nutné používat metodu zvanou chromatografie. V důsledku rozdílné afinity analytu k jednotlivým fázím dojde k rozdělení směsi cukrů na jednotlivé složky a na chromatogramu se zobrazí jednotlivé píky, které jsou charakteristické pro konkrétní sacharid. Z plochy či výšky píku lze stanovit množství jednotlivých sacharidů ve vzorku. Díky této schopnosti je chromatografie v dnešní době nejvyužívanější metodou při stanovování sacharidů v potravinách.

6 Použitá literatura

- Acker, L, Schormüller, J.: Kohlenhydrate Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. II/2, Springer Verlag, Berlin (1967).
- Anonymus: Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists., 9th Ed., Washington (1960).
- Auerbach, F., Bodländer, E., Borries, G.: Arb. Reichs-gesundh.-Amt. 57, 318, (1926).
- Auerbach, F., Bodländer, E.: Angew. Chem. 36, 602, (1923).
- Badin, J., Jackson, C., Schubert, M.: Proc, Soc. Exptl. Biol. Med. 84, 288, (1953).
- Belschner, G.: Dissert., Univerzität München (1907).
- Benmoussa M., Moldenhauer K. A. K., Hamaker B. R.: J. Agric. Food Chem. 55, 1475 (2007).
- Cerriotti, G.: J. Biol. Chem. 214, 59, (1955).
- Davídek, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin, Praha: SNTL (1977).
- Dische, Z., Popper, H.: Biochem. Z. 175, 371, (1926).
- Englyst H. N., Kingman S. M., Cummings J. H.: Eur. J. Clin. Nutr. 46 (Suppl. 2), S33 (1992).
- Ewers, E.: Z. öffnetl. Chem. 14, 150, (1908).
- Fearon, W. R, Drum, J. A.: Analyst 75, 56, (1950).
- Griehl, C., Weiss, F.: Z. Untersuch. Lebensmittel 54, 175, (1927).
- Hadorn, H., Jungkunz, R.:Mitt. Geb. Lenesmitteluntersuch. Hyg. 41, 435, (1950).
- Heyns, K.: Stärke 11, 215, (1959).
- Hoover R., Zhou Y.: Carbohydr. Polym. 54, 401 (2003).
- Chiu C.-W., Shi Y.-C., Sedam M.: US 5 902 410 (1999).
- Janíček, G., Šandera, K., Hampl, B.: Rukověť potravinářské analytiky, SNTL, Praha (1962).
- Jayme, G., Knolle, H: Z. Anal. Chem. 178, 84, (1960).
- Jeníček, G., Hrdlička, J.: Listy cukrovarnické 70, 27, (1954).
- Jermyn, M. A., Isherwood, F. A.: Biochem. J. 44, 402, (1949).
- Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: Laboratorní techniky biochemie, 1. vyd., Praha: VŠCHT (2006).
- Klouda, P.: Moderní analytické metody, Ostrava: Pavel Klouda (2003).
- Lott, C. E., Brobst, K. M.: Anal. Chem. 38, 1767, (1966).
- Ludwig D. S.: J. Nutr. 130, 280 (2000).
- McMurry, J.: Org. Chem., vyd. 1. Překlad Jaroslav Jonas. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (2007).

- Mergenthaler, E.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 109, 316, (1959).
- MŠMT ČR: Biochemické pojmy - výkladový slovník, Praha, cit. 28. 03. 2015 (2004).
online:http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.anotace.htm
- Odstrčil, J., Odstrčilová, M.: Chem. Potr., 1. vyd., Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů (2006).
- Ondroušek, S., Basarová, G., Louková, H.: Kvasný průmysl, cit. 13. 04. 2015 (1984).
online: <http://kvasnyprumysl.net/download.php?clanek=898>
- Opekar, F.: Základní analytická chemie, 1. vyd., Praha: Karolinum (2002).
- Pánek, J.: Základy výživy. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis (2002).
- Pastuska, G.: Z Anal. Chem. 179, 427, (1961).
- Patridge, S. M.: Biochem. J. 42, 238, (1948).
- Patterson, S. J., Buchan, J. L.: Analyst 86, 160, (1961).
- Patterson, S. J., Savage, R. J.: Analyst 82, 812, (1957).
- Pérez S., Bertoft E.: Starch/Stärke 62, 389 (2010).
- Potterat, M., Eschmann, H.: Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 45, 312, (1954).
- Provazník, K., a kol.: Manuál prevence v lékařské praxi, Státní zdravotní ústav, (1998).
- Ratnayake W. S., Hoover R., Shahidi F., Perera C., Jane J.: Food Chem. 74, 189 (2001).
- Rosenthaler, L.: Z. Anal. Chem. 48, 167, (1909).
- Scharrer, K., Kürschner, K.: Centralbl. Agriculturchemie B., 3, 302, (1932).
- Stahl, E., Kaltenbach, V.: J. Chromatog. 5, 351, (1961).
- Steinhauser. L. a kolektiv.: Hygiena a technologie masa. LAST (1995).
- Thaler, H.: Bestimmung der Cellulose und anderer Zellwandbestandteile, Handbuch deer Lebensmittelchemie, Bd II/2, Springer-Verlag, Berlin (1967).
- Thaler, H.: Z. Untersuch. Lebensmittel 80, 439, (1940).
- Timell, T. E., Glaudemans, C. P., Currie, A. L.: Anal. Chem. 28, 1916, (1956).
- Velíšek, J.: Chem. Potr. I, 1.vyd. , Tábor: Osis (1999).
- Větvicka V.: Chem. Listy 98, 963 (2004).
- Voet, D., Voetová, J.: Biochem., 1. české vyd., Praha: Victoria Publishing (1995).
- VÚPP: Návod k provádění rozborů v cukrovarnické laboratoři, Praha (1967).
- Weeler, H., Tollens, B.: Ann. Chem. 254, 320, (1889).
- Yamamoto, A., Kawai, M., Miwa, T., Tsukamoto, T., Kodama, S., Hayakawa, K.:
Determination of Adulteration in Apple Juice by HPLC with Novel Optical Rotation Detector, 56 (16), pp 7302–7304 (2008).
- Zhang P., Hamaker B. R.: Carbohydr. Polym. 87, 1552 (2012).