

Analisi degli Zuccheri



Gli zuccheri sono una classe di composti organici costituita da molecole semplici, con funzione soprattutto energetica, e macromolecole con funzione di riserva (es. amido e glicogeno) o strutturale (es. cellulosa).

Si chiamano carboidrati perché possiedono la seguente formula bruta:



Es. glucosio: $C_6(H_2O)_6 \rightarrow C_6H_{12}O_6$

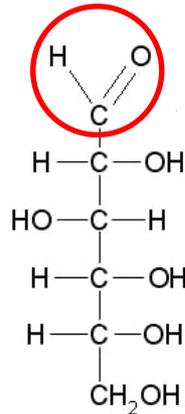
ribosio: $C_5(H_2O)_5 \rightarrow C_5H_{10}O_5$

Si possono classificare in:

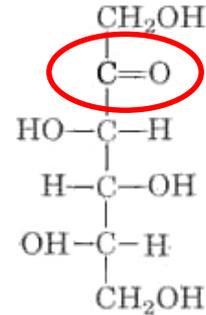
- a) *Monosaccaridi***, zuccheri semplici che si trovano liberi o come unità elementari di glucidi complessi.
- b) *Polisaccaridi***, zuccheri più o meno complessi dati dall'unione di più monosaccaridi (es. saccarosio \rightarrow disaccaride glucosio+fruttosio)

Monosaccaridi

Vengono chiamati aldosi o chetosi a seconda che contengano una funzione aldeidica o chetonica.



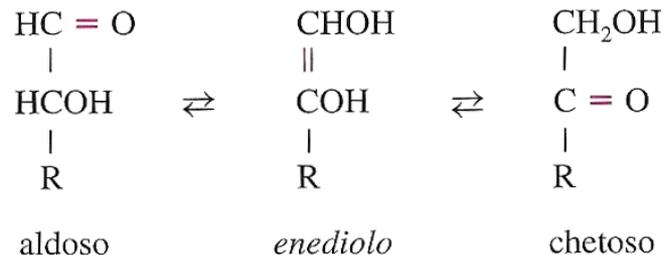
Aldoso



Chetoso

I monosaccaridi sono zuccheri **riducenti**: i metodi più comuni di analisi qualitativa e quantitativa si basano su questa proprietà.

In ambiente basico, sia gli aldosi che i chetosi tautomerizzano (isomerizzano) in **enedioli** → composti altamente riducenti.



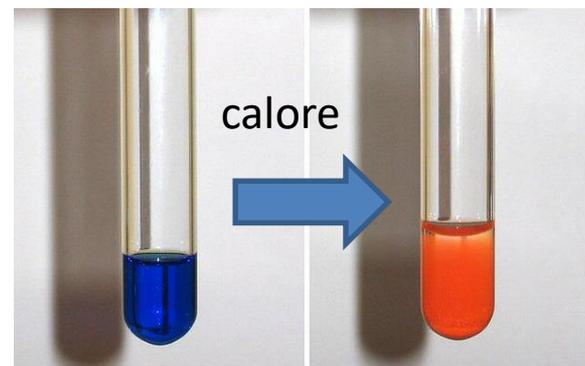
Analisi qualitativa

La reazione più utilizzata è la **REAZIONE DI FEHLING**.

L'attività riducente si esplica a carico del rame rameico (Cu^{2+}) che diventa rame rameoso (Cu^+).

In ambiente basico, il rame rameico sottrae elettroni agli enedioli diventando idrossido rameico giallo, che per riscaldamento si trasforma in ossido rameoso rosso insolubile.

La reazione è schematizzata così per un aldoso:



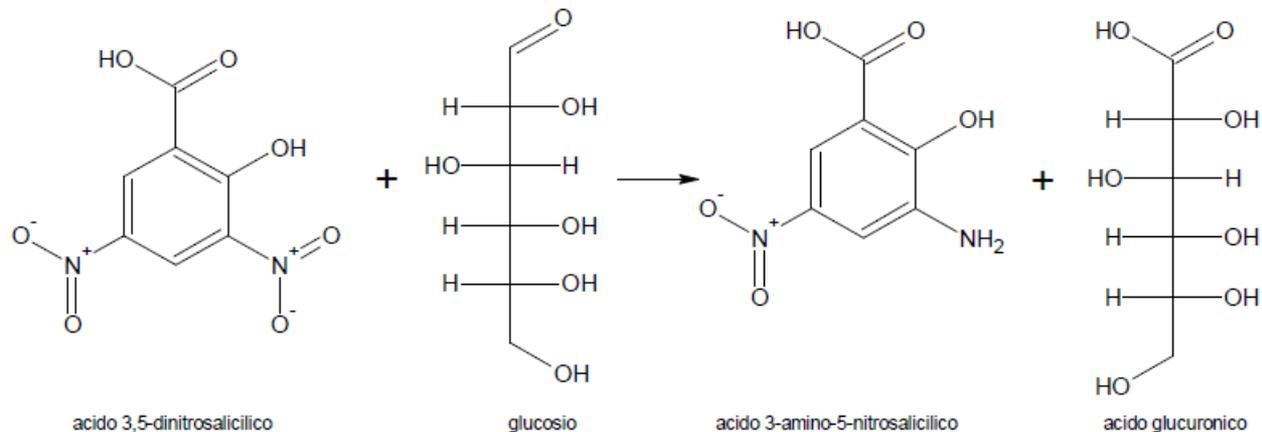
Fonte: Internet

Ci sono anche altri reattivi per l'analisi degli zuccheri riducenti che sfruttano la riduzione degli ioni rameici, ma anche la riduzione di altri metalli come argento.

Esempio di Analisi quantitativa

Saggio con acido 3,5 dinitrosalicilico (DNS)

Dosaggio colorimetrico che sfrutta l'ossidazione del gruppo aldeidico o chetonico con la riduzione del DNS, in condizioni alcaline, ad acido 3-amino-5-nitrosalicilico, un composto rossastro che assorbe a 540 nm.



Analisi quantitative specifiche per mono e oligosaccaridi

L'**HPLC** è il metodo di elezione per l'analisi dei mono- e oligosaccaridi, e può essere usato per l'analisi dei polisaccaridi dopo idrolisi → fornisce sia analisi qualitativa (identificazione del carboidrato) che quantitativa.

Caratteristiche

- L'analisi è rapida, tollera un range ampio di concentrazioni con un alto grado di precisione ed accuratezza.
- Non richiede derivatizzazione, come invece la GC.
- Possono essere analizzate miscele complesse.

GC (Gas Cromatografia).

Anche questo metodo fornisce sia dati qualitativi che quantitativi.

Prima dell'analisi, i carboidrati devono essere derivatizzati → sostituzione di gruppi funzionali (-NH, -OH ed -SH) di molecole organiche poco volatili con gruppi funzionali che le rendano più volatili.

Metodi Enzimatici

Carbohydrate	Reference	Kit Form ^a
Monosaccharides		
<i>Pentoses</i>		
L-Arabinose	(42, 43)	
D-Xylose	(42, 43)	
<i>Hexoses</i>		
D-Fructose	(42, 43)	x
D-Galactose	(42, 43)	x
D-Galacturonic acid	(42)	
D-Glucose		
Using glucose oxidase	(43), Sect. 10.3.4.3.3	x
Using glucose dehydrogenase	(42, 43)	
Using glucokinase (hexokinase)	(42, 43)	x
D-Mannose	(42, 43)	
Monosaccharide derivatives		
D-Gluconate/D-glucono- δ -lactone	(42, 43)	x
D-Glucitol/sorbitol	(42, 43)	x
D-Mannitol	(42, 43)	
Xylitol	(42, 43)	x
Oligosaccharides		
Lactose	(42, 43)	x
Maltose	(42, 43)	x
Sucrose	(42, 43)	x
Raffinose, stachyose, verbascose	(42, 43)	x
Polysaccharides		
Amylose, amylopectin (contents and ratio)		x
Cellulose	(42, 43)	
Galactomannans (guar and locust bean gums)	(42)	
β -Glucan (mixed-linkage)	(42)	x
Glycogen	(42, 43)	
Hemicellulose	(42, 43)	
Inulin	(42, 43)	x
Pectin/poly(D-galacturonic acid)	(42, 43)	
Starch	Sect. 10.4.1.1 (42, 43)	x

Fonte: Internet

Sono stati sviluppati diversi dosaggi enzimatici per i carboidrati, spesso specifici solo per la sostanza da misurare (es. glucosio).

Caratteristiche

- Rilevano anche basse concentrazioni di carboidrati.
- Sono specifici per uno specifico carboidrato.

Spesso non è necessaria o richiesta l'analisi di un singolo componente.

Per questo motivo sono **preferiti i metodi cromatografici**, che forniscono un valore per ogni zucchero presente nella miscela.

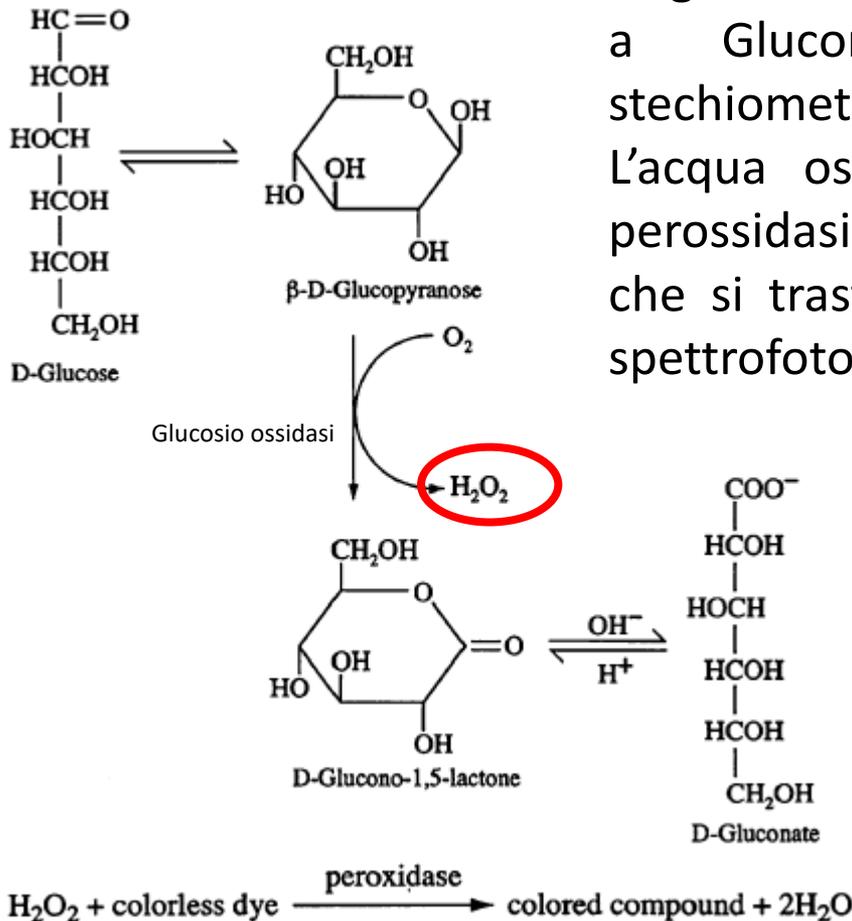
Uno dei dosaggi enzimatici più usati è quello del glucosio.

Dosaggio del glucosio

Per la determinazione del glucosio, si usa un dosaggio enzimatico accoppiato.

La glucosio ossidasi catalizza l'ossidazione del glucosio a Glucono-1,5-lattone con la formazione stechiometrica di acqua ossigenata.

L'acqua ossigenata prodotta viene utilizzata dalla perossidasi per ossidare un composto non colorato che si trasforma in un derivato colorato → dosato spettrofotometricamente.



Come accettore si usa la tetrametilbenzidina (TMB).

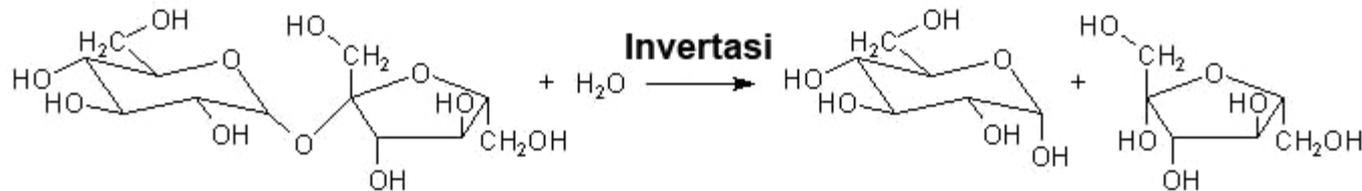
Disaccaridi e Oligosaccaridi Non Riducenti

Si può ricorrere a metodiche di degradazione o a metodiche cromatografiche.

Es. Saccarosio

Si può idrolizzare per via enzimatica (*invertasi*) dando una miscela di glucosio e fruttosio (**zucchero invertito**) → analisi dell'attività riducente.

Metodo usato in enologia per seguire la fermentazione dei mosti o l'adulterazione del mosto.



Lo stesso procedimento si può utilizzare anche per altri oligosaccaridi non riducenti.

Polisaccaridi

Sono polimeri di monosaccaridi o di loro derivati, uniti tra loro da legami glicosidici.

Proprietà

- Sono quasi insolubili in acqua a causa della loro idratazione solo in superficie.
- Non danno risultato positivo alla reazione di Fehling → le funzioni aldeidiche libere sono poche e scarse per fornire una reazione apprezzabile.
- Hanno:
 - **funzione di deposito** (amido nelle piante e glicogeno negli animali) e quindi energetica;
 - **funzione strutturale** (es. cellulosa della parete vegetale o la chitina degli insetti);
 - **funzione di adesione e riconoscimento** (Eparansolfati, eparina, proteoglicani e glicoproteine).

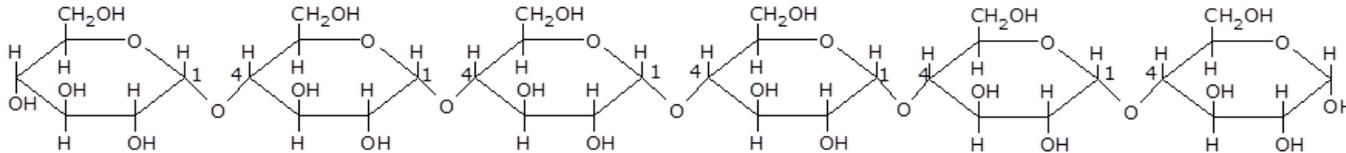
Amido

Presente nelle piante, rappresenta una riserva di glucosio conservato come amilosio e amilopectina.

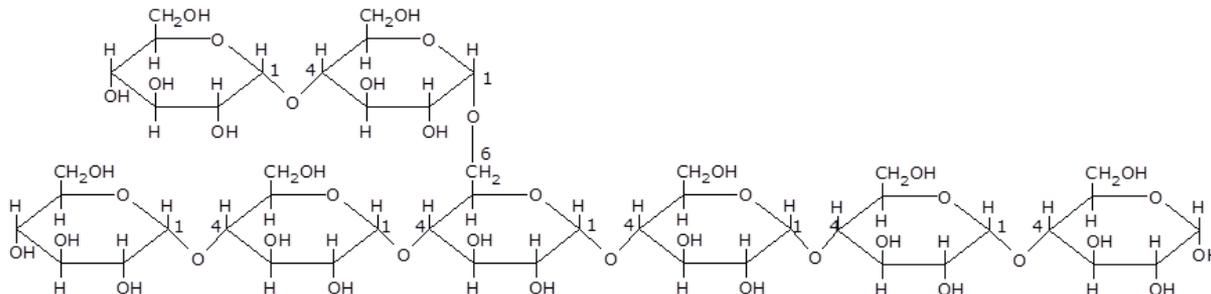
La forma polimerica del glucosio minimizza l'effetto osmotico.

Differenza tra amilosio e amilopectina:

Amilosio: polimero lineare del glucosio con legami $\alpha(1 \rightarrow 4)$ con conformazione ad elica. Il polimero termina con un C1 anomero riducente. E' solubile in acqua.



Amilopectina: polimero del glucosio con legami $\alpha(1 \rightarrow 4)$ e con ramificazioni $\alpha(1 \rightarrow 6)$. Ha una struttura più compatta. La presenza di più terminali di catena facilita l'attacco enzimatico per la degradazione. E' insolubile in acqua.



Analisi dell'Amido

Analisi qualitativa

Reazione allo iodio: una goccia di soluzione iodo-iodurata ($I_2 + KI$ in H_2O) aggiunta ad amido, provoca una **colorazione blu** per la formazione di un complesso amido-iodio.

Analisi quantitativa

Prima di essere quantificato, deve essere estratto (tramite acido perclorico e iodio).

La quantificazione prevede la sua idrolisi in monomeri di D-glucosio, che può essere:

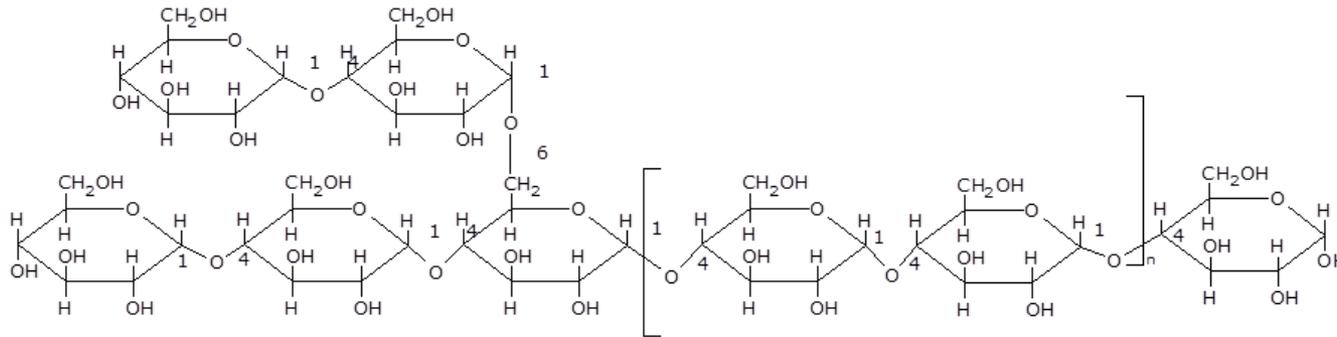
- Chimica: per 25 ore usando HCl 0,7 M;
- Enzimatica: usando enzimi specifici per l'amido → **amilasi**.

Il D-glucosio liberato può essere determinato tramite l'impiego della reazione accoppiata Glucosio ossidasi/perossidasi (GOPOD)

Glicogeno

E' simile all'amilopectina e possiede principalmente legami α (1 \rightarrow 4) con maggiori ramificazioni α (1 \rightarrow 6).

Questa struttura permette una rapida mobilizzazione del glucosio.



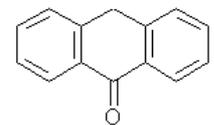
Fonte: Internet

Analisi qualitativa

Reazione allo iodio: con la soluzione iodo-iodurata dà una **colorazione rossa**.

Analisi quantitativa

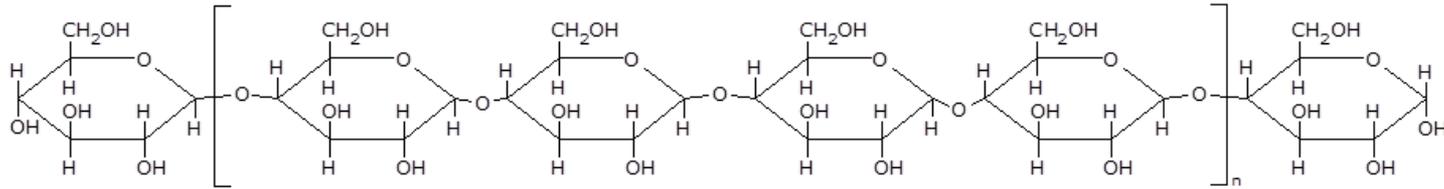
Deve essere estratto. Può poi essere quantificato direttamente tramite reazione chimica (con l'antrone) o idrolizzato \rightarrow dosaggio D-glucosio liberato tramite GOPOD.



Antrone

Cellulosa

È il maggior costituente della parete cellulare delle piante e consiste in lunghe catene di glucosio legato con legami $\beta(1\rightarrow4)$.



Fonte: Internet

Proprietà

- Non è solubile in acqua e nei comuni solventi organici, né in acidi o basi diluiti.
- Può essere disciolta in alcuni solventi speciali (idrossido di rame in ammoniacca).
- Può essere idrolizzata dopo trattamento con acido solforico concentrato ed ebollizione.
- **Non dà colorazione con lo iodio.**

Analisi qualitativa

Formazione dell'amiloide: Si scioglie la cellulosa con $H_2SO_4 \rightarrow$ diluendo la soluzione con acqua si forma un precipitato colloidale flocculento (*amiloide*).

La soluzione di cellulosa in acido solforico dà colorazione blu o nera con la soluzione iodo-iodurata. Se bollita dà reazione positiva per zuccheri riducenti \rightarrow rilascio di glucosio.