Assay of carbohydrate (part I)

- **目的:學習鑑定醣類及區分酮醣和醛醣的方法與鑑定還原醣的方法。**
- **碳水化合物(carbohydrate) 由C、H、O組成，或稱醣類、CHO。**
- **主要成分**
  - 單醣(monosaccharides)
  - 雙醣(disaccharides)
  - 寡醣(oligosaccharides):3~10，腸胃道益生菌(probiotics)之益生元(prebiotic)
  - 多醣(polysaccharides)
  - 衍生物：醣醇、醣酸、醣蛋白(醣類 + 蛋白質)、醣脂質 (醣類 + 脂肪)、花色苷、氰醣苷.....

Assay of carbohydrate (part I)

- **醣的呈色反應:**碳水化合物經濃硫酸 (95%)水解為單醣，再與硫酸作用形成醣醛。五碳醣(pentose)形成呋喃醛(furfural)；六碳醣(hexose)形成羧甲基呋喃醛(carboxymethyl furfural)。

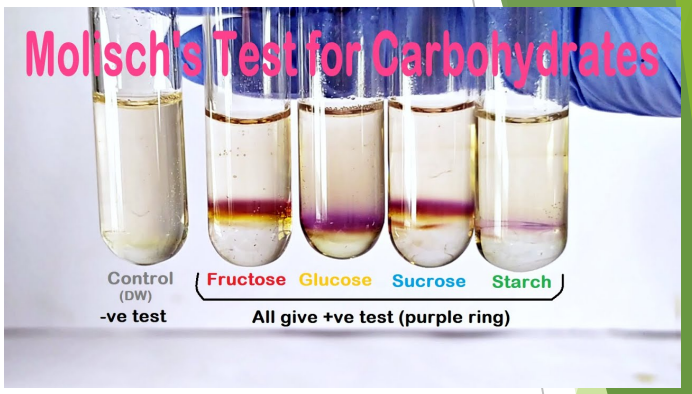
1) Molish 反應
2) 蔥酮反應
3) Seliwanoff反應
4) Bial反應

- **還原醣的鑑定:**含自由醛基或酮基的單醣和雙醣，還原醣在鹼性溶液中能將金屬離子（銅、鉍、汞、銀等）還原，醣本身被氧化成酸類，可檢測醣的還原性，並可測定還原醣含量。

1) Fehling(菲林)反應
2) Benedict(本尼迪)反應
3) Barfoed(巴福德)反應

Assay of carbohydrate (part I)

A. Molisch test (general test) for carbohydrates:



- 測試結構:醣
- 試劑:H_2SO_4、α-naphthol
- 結果:形成紫紅色化合物
- 原理:
  - 醣類加濃硫酸形成呋喃醛及其衍生物，與α-萘酚作用形成紅紫色化合物。
  - 醣液與濃硫酸液面間出現紫環，故稱紫環反應。
  - 反應靈敏度高，含蛋白質溶液亦可檢出微量之碳水化合物
  - 硝酸鹽(nitrate)及亞硝酸鹽(nitrite)妨礙呈色
  - 酮醣(ketose)呈色較醛醣(aldose) 為快。

https://www.youtube.com/watch?v=7fJte0iynSs

Assay of carbohydrate (part I)

B. Barfoed's test distinguishing mono-from disaccharides

- 測試結構:單醣
- 試劑:醋酸銅
- 結果:紅色Cu_2O沉澱
- 原理:
  - Barfoed's test的特點是需在酸性條件下進行還原作用
  - 酸性溶液中，單醣和還原雙醣的還原速度具差異性
    - 單醣約在3分鐘內即可還原Cu^{2+}
    - 還原雙醣則約需20分鐘
  - Barfoed's test可用以分辨單醣和還原雙醣

Assay of carbohydrate (part I)

C. Benedict's test for reducing sugar:

- 測試結構:還原醣
- 試劑:硫酸銅、碳酸鈉、檸檬酸鈉
- 結果:紅色Cu_2O沉澱
- 原理:
  - Benedict試劑是Fehling試劑的改良。利用檸檬酸作為Cu^{2+}的絡合劑，其鹼性比Fehling試劑弱，靈敏度高。
  - 還原醣濃度不同，就有不同顏色(綠→橘→紅→棕)

Reagents

1) 1% solutions of carbohydrates: xylose, glucose, fructose, maltose, sucrose, starch and glycogen
2) 1% glycine
3) conc. H_2SO_4
4) Molisch reagent: α-naphthol
5) Barfoed's reagent
6) Benedict's solution

Procedure

A. Molisch test (general test) for carbohydrates:

在8支試管分別加入0.5mL試藥

↓

分別加入1滴Molisch reagent

↓

MIX

↓

Add 0.5 ml of conc. H_2SO_4

(緩慢滴入 不可搖晃)

↓

觀察,紀錄

Procedure

B. Barfoed's test distinguishing mono-from disaccharides

在6支試管分別加入1mL試藥

↓

分別加入1mL Barfoed's reagent

↓

MIX

↓

沸水浴加熱5分鐘

↓

靜置冷卻 觀察試管底部是否出現紅色沉澱

Procedure

C. Benedict's test for reducing sugar:

在6支試管分別加0.5mL試藥

↓

分別加入0.5mL Benedict's solution

↓

MIX,沸水浴2mins

↓

觀察,紀錄

Result

- (有無反應請以+/-表示；以及顏色變化有無沉澱，如下A-(1)範例)

Reagent / Sample		A Molisch Test	B Barfoed's Test	C Benedict's Test
(1)	Xylose	+ (紫環)		
(2)	Glucose			
(3)	Fructose			
(4)	Sucrose			
(5)	Maltose			
(6)	Starch		×	×
(7)	Glycine		×	×
(8)	Unknown			