

Л. Ф. Кабашникова,
Л. Н. Калитуха,
А. В. Деревинский

**Количественный анализ
свободных и связанных
углеводов**
в одной навеске
растительной ткани

УДК 57(075.8)

ББК 28.0я73

К12

Печатается по решению редакционно-издательского совета БГПУ

Рецензенты: Е. В. Спиридович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси; С. В. Судейная, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и основ сельского хозяйства БГПУ

Кабашникова Л. Ф., Калитухо Л. Н., Деревинский А. В.

К12 Количественный анализ свободных и связанных углеводов в одной навеске растительной ткани: Учеб.-метод. пособие.— Мн.: БГПУ, 2003.— 22 с.

ISBN 985-435-583-7

В пособии рассматриваются основные принципы количественного определения свободных и связанных углеводов в одной навеске растительной ткани; содержится анализ функций углеводов в растительном организме, их классификация. Подробно изложены основные этапы определения количества моносахаридов, общего количества моно- и дисахаридов, крахмала, расчеты содержания разных углеводов в растительной ткани, основные подходы к статистической обработке полученных результатов.

Адресуется студентам, преподавателям, аспирантам высших учебных заведений.

УДК 57(075.8)

ББК 28.0я73

ISBN 985-435-583-7

© Коллектив авторов, 2003

© УИЦ БГПУ, 2003

Хорошо построенную калибровочную кривую можно использовать в дальнейших опытах в виде формулы 1.11, подставляя на место Y значения оптической плотности опытной пробы и таким образом получая количественное значение X_i в миллиграммах.

Если для построения калибровочной кривой нет возможности воспользоваться компьютером, то строим кривую на миллиметровке и определяем значения X_i в месте пересечения прямой, проведенной из экспериментально полученного значения Y параллельно оси X .

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРАХМАЛА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

3.1. Принцип колориметрического метода определения крахмала

Крахмал — полимер глюкозы, состоящий из двух различающихся по структуре и свойствам полисахаридов — линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Молекулярная масса амилозы колеблется от 300 000 до 1 000 000 дальтон, а амилопектина — достигает сотен миллионов дальтон. У разных растений в крахмале содержится 10—30 % амилозы и 70—90 % амилопектина. При нагревании под действием кислот крахмал последовательно распадается до полисахаридов меньшей молекулярной массы (декстрины), затем до дисахарида мальтозы и затем до моносахарида глюкозы.

Предлагаемый метод [4] основан на гидролизе крахмала при нагревании растительной ткани в 80 %-ном растворе азотнокислого кальция и осаждении его из полученного раствора йодом. В присутствии йодистого калия и азотнокислого кальция йод полностью осаждает крахмал в виде темно-синего соединения, содержащего от 14 до 16 % йода. После центрифугирования и промывания осадок йодного крахмала растворяют в гидроокиси натрия, разбавляют дистиллированной водой до определенного объема и проводят реакцию с йодом в кислой среде. Оп-

тическую плотность полученного синего раствора измеряют при 610—660 нм, затем определяют концентрацию крахмала в колориметрируемом растворе по предварительно построенной калибровочной кривой.

3.2. Необходимые реактивы и оборудование

- 1) 80 %-ный раствор азотнокислого кальция (80 г CaNO_3 растворить в дистиллированной воде до конечного объема 100 мл);
- 2) 20 %-ный раствор азотнокислого кальция;
- 3) 0,5 %-ный раствор йода (1 часть 3 %-го раствора йода разбавить 5 частями дистиллированной воды);
- 4) 5 %-ный раствор азотнокислого кальция, содержащий 0,01 % йода (5 г CaNO_3 и 0,33 мл 3 %-го раствора йода растворить в дистиллированной воде до конечного объема 100 мл);
- 5) 0,1 N раствор NaOH (4 г в 1 л дистиллированной воды);
- 6) 1 N раствор HCl (82 мл в 1 л дистиллированной воды);
- 7) Дистиллированная вода.

Ножницы, ступка; пестик; мерный цилиндр; пипетки; пробирки; конические колбы на 100 мл; мерные колбы на 50 мл; воронка; электрическая плитка; секундомер; центрифуга; центрифужные пробирки.

3.3. Ход опыта

Берем мелко нарезанную навеску растительного материала, содержащую 5—50 мг крахмала (1—2 г листьев), и растираем ее в 5 мл 80 %-го азотнокислого кальция. Гомогенат переносим в коническую колбу на 100 мл, ступку и пестик промываем 10 мл 80 %-го азотнокислого кальция и выливаем в ту же колбу.

Колбу, закрытую воронкой, ставим на плитку, нагреваем до кипения и кипятим при слабом нагреве 3 мин, растворяя крахмал. Приливаем в колбу 20 мл дистиллированной воды.

Содержимое колбы переносим в центрифужные пробирки в равных объемах и центрифугируем при 2 000—3 000 об/мин в течение 2—3 мин, мутную надосадочную жидкость сливаем в мерную колбу объемом в 50 мл.

Колбу, в которой производилось кипячение, и осадок промываем горячей дистиллированной водой (5—10 мл) тщательно ресуспендируя

осадок, центрифугируем при 2 000—3 000 об/мин в течение 2—3 мин и присоединяем надосадочную жидкость к основному раствору в мерной колбе. Повторяем операцию 2—3 раза. Доводим дистиллированной водой до метки ($V = 50$ мл).

5 мл полученного раствора (V_1) смешиваем в центрифужной пробирке с 2 мл 0,5 %-го раствора йода, перемешиваем и оставляем на 15 мин для развития реакции, т.е. осаждения крахмала йодом.

Центрифугируем при 2 000—000 об/мин в течение 2—3 мин, прозрачный раствор отбрасываем, а осадок крахмала промываем 2 раза 5 %-ным раствором азотнокислого кальция, содержащим 0,01 % йода. К промытому осадку йодкрахмального соединения добавляем 10 мл 0,1 Н раствора NaOH. Пробирку помещаем в кипящую водяную баню на 5 мин.

Раствор переносим в мерную колбу на 50 мл, прибавляем 0,3 мл 0,5 %-го раствора йода, доливаем дистиллированной водой примерно до 40 мл, прибавляем 2 мл 1 Н раствора HCl, доводим водой до метки (50 мл), перемешиваем.

Оптическую плотность раствора измеряем при 580—610 нм.

Полученные результаты сравниваем с калибровочной кривой и вычисляем содержание крахмала по следующей формуле:

$$K = (50 \times C_i \times V \times 1000) : (1000000 \times H \times V_1) = (V \times C_i) : 200 \times V_1 \times H, \quad (3.1)$$

где

K — содержание крахмала, % от единицы массы навески;

C_i — концентрация крахмала в колориметрируемом растворе, мкг/мл;

V — общий объем исследуемого раствора, мл;

V_1 — объем исследуемого раствора, взятый для осаждения крахмала йодом (5 или 10), мл;

H — навеска исследуемого вещества, г;

50 — объем окрашенного колориметрируемого раствора, мл;

100 — коэффициент перевода значения в проценты;

1000000 — коэффициент перевода значения в граммы.

Статистическую обработку полученных данных проводим согласно п. 2.3.5.

3.3. Построение калибровочной кривой

Берем 50 мг очищенного крахмала, растираем в ступке с 3 мл 80 %-го раствора азотнокислого кальция, переносим в коническую колбу на 100 мл, промываем ступку 15 мл 80 %-го раствора азотнокислого кальция и кипятим 5 мин. Раствор охлаждаем, переносим в мерную колбу объемом 50 мл и доводим дистиллированной водой до метки. Из этого раствора, содержащего 1 мг крахмала в 1 мл, набираем в центрифужные пробирки 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 мл, доводим каждую до 5 мл 20 %-ным раствором азотнокислого кальция, прибавляем по 2 мл 0,5 % раствора йода, перемешиваем и оставляем на 15 мин. После этого центрифугируем и осадок промываем 2 раза 5 %-ным раствором азотнокислого кальция. Растворяем осадки в 10 мл 0,1 Н раствора NaOH при нагревании на кипящей бане в течение 5 мин. Растворы переносим в мерные колбы объемом 50 мл, прибавляем по 0,3 мл 0,5 %-го раствора йода, разбавляем дистиллированной водой до 40 мл, прибавляем по 2 мл 1 Н раствора HCl, доводим до метки (50 мл) и определяем оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 580—610 нм.

Строим кривую зависимости оптической плотности образцов от содержания крахмала (мкг/мл), проводим линейную аппроксимацию и используем полученную формулу для определения C_i (аналогично определению X_i , описанному в пункте 2.4.).