

УДК 615.074,615.072

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОСАХАРОВ В ПЛОДАХ ЧЕРЁМУХИ ПОЗДНЕЙ – *PADUS SEROTINA* (EHRH.) AGARDH

Д.И. Писарев
О.О. Новиков
М.Д. Безменова
Е.А. Томчаковская
В.Н. Сорокопудов

Белгородский государственный
университет

e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

Предложена методика количественного определения моносахаров в плодах черёмухи поздней – *Padus serotina* (Ehrh.) Agardh методом УФ-спектрофотометрии, позволяющая дифференциально определять содержание гексоз и кетоз. Для определения гексоз в пересчёте на глюкозу использована реакция с фенолом в присутствии кислоты серной концентрированной. Содержание глюкозы в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $13,34 \pm 0,36\%$. Кетозы в пересчёте на фруктозу определяли с использованием в качестве реактивов резорцина в присутствии кислоты хлористоводородной разведённой (реакция Селиванова). Содержание фруктозы в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $3,54 \pm 0,04\%$.

Ключевые слова: моносахара, глюкоза, фруктоза, плоды черёмухи поздней, УФ-спектрофотометрия.

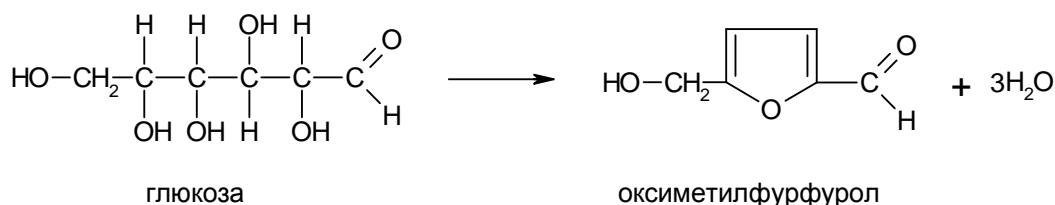
Углеводы входят в состав клеток всех живых организмов и вместе с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами определяют специфичность их строения и функционирования. Углеводы участвуют во многих метаболических процессах, но прежде всего они являются основными поставщиками энергии. Главными моносахаридными компонентами пищи являются глюкоза и фруктоза, основными источниками которых служат растения [1].

Существует ряд методов количественного определения моносахаров в растениях, все они имеют преимущества и недостатки. Нами взяты за основу ранее существовавшие методы количественного определения моносахаров в растениях – фенольный метод для 2-глюкозы и определение фруктозы по Кульку [2]. Данные методы нами усовершенствованы и предложены в варианте прямой спектрофотометрии. Расчёт концентрации проводился с использованием стандартных образцов глюкозы и фруктозы соответственно.

Целью настоящего исследования явилась разработка метода количественного определения моносахаров – альдоз и кетоз в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh по отдельности.

Для реализации поставленной цели было необходимо подобрать соответствующие условия для проведения количественного определения моносахаров в растительном сырье.

В основу количественного определения глюкозы в исследуемом объекте положена реакция взаимодействия оксиметилфурфуrolа с фенолом в среде кислоты серной концентрированной [3]. Сначала под воздействием кислоты серной концентрированной глюкоза дегидратируется с образованием оксиметилфурфуrolа:



А далее при действии фенола на оксиметилфурфурол образуется ауриновый краситель, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения $\lambda_{\text{max}} = 483 - 485 \text{ нм}$ (рис. 1).

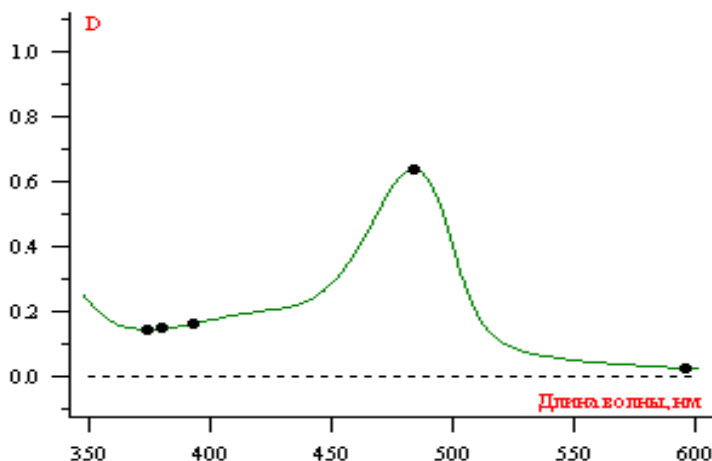


Рис. 1. Продукт взаимодействия оксиметилфурфурола со стандартным образцом глюкозы

Образование конечного продукта происходит в течении часа, он достаточно стабилен во времени, что позволяет использовать его для фотометрического определения.

На первом этапе проведения анализа было получено исследуемое водное извлечение плодов черёмухи. Для этого точную навеску сырья, предварительно измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм массой 1,0 г, помещали в плоскодонную колбу и заливали 20 мл воды, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания воды в бане. Извлечение охлаждали и фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию сырья проводили ещё четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объём извлечения доводили водой до метки и перемешивали.

Полученное извлечение использовали для количественного определения глюкозы и фруктозы.

Определение глюкозы. В пробирку вносили 1 мл извлечения, приливали 0,05 мл водного раствора фенола (92 г свежеперегнанного фенола и 8 мл воды) и 5 мл химически чистой кислоты серной концентрированной ($\text{H}_2\text{SO}_4 d - 1,84$) (раствор А). Содержимое пробирок перемешивали и давали отстояться в течение 1 ч. 0,1 мл раствора А доводили до метки в мерной колбе вместимостью 5 мл кислотой серной концентрированной, перемешивали (раствор Б). Параллельно в тех же условиях готовили контрольный раствор сравнения [2].

Полученный раствор Б фотометрировали на УФ-спектрофотометре СФ-56 в кювете толщиной 10 мм в диапазоне длин волн 350 – 600 нм.

Параллельно готовили стандартный раствор глюкозы.

0,0625 г глюкозы растворяли в воде в мерной колбе на 25 мл (раствор А), 1 мл раствора А разводили в мерной колбе на 5 мл (раствор Б). К 0,1 мл раствора Б приливали 0,05 мл водного раствора фенола (92 г свежеперегнанного фенола и 8 мл воды) и 5 мл химически чистой кислоты серной концентрированной ($\text{H}_2\text{SO}_4 d - 1,84$). Параллельно готовили контрольный раствор сравнения.

Полученные результаты приведены на рис. 2.

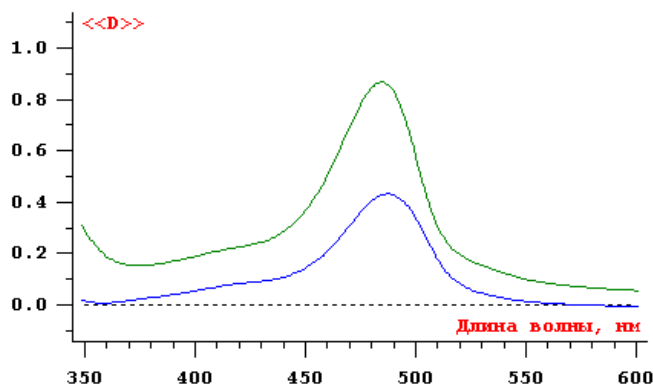


Рис. 2. УФ-спектр поглощения продуктов реакции исследуемого раствора и стандарта глюкозы с фенолом и кислотой серной концентрированной

— УФ-спектр поглощения исследуемого раствора
 — УФ-спектр поглощения стандарта глюкозы

Для расчетов использовали формулу (с учетом разбавления исследуемого раствора и раствора стандарта):

$$X\% = \frac{A_x \times C_{ст} \times W_1 \times W_2 \times 100}{A_{ст} \times l \times a \times V \times (100 - B)} \times 100$$

где $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора глюкозы; A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы; W_1 – общий объем извлечения из сырья, мл; W_2 – объем извлечения после разбавления, мл; a – масса сырья, г; V – аликвота, взятая для разбавления, мл; B – влажность сырья.

Таблица 1

Результаты количественного определения глюкозы в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh

$X(\%)$	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
13,00	0,34	0,1156	$\bar{X} = 13,34\%$ $\sum(\bar{X} - X)^2 = 0,42734$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,11935$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,306$ $\varepsilon = 2,3\%$
13,58	-0,24	0,0576	
13,72	-0,38	0,1444	
13,36	-0,02	0,0004	
13,01	0,33	0,1089	
13,39	0,021	0,000441	
$X=13,34$		$\Sigma=0,42734$	

Таким образом, содержание глюкозы в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $13,34 \pm 0,36\%$.

Определение фруктозы. Фруктоза относится к кетозам, поэтому в отличие от глюкозы реагирует с резорцином в присутствии кислоты хлористоводородной концентрированной (реакция Селиванова). Фруктоза при нагревании с кислотой теряет три молекулы воды и превращается в оксиметилфурфурол, который при взаимодействии с резорцином образует продукт вишнево-красного цвета, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения $\lambda_{max} = 415 - 420$ нм (рис. 3):

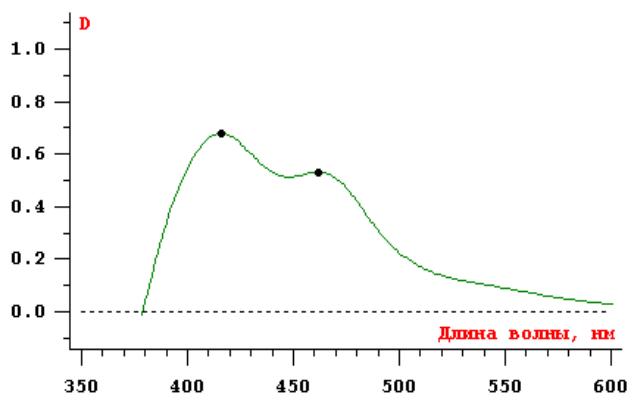


Рис. 3. УФ-спектр поглощения продукта взаимодействия оксиметилфурфурола с резорцином

При нагревании альдоз с кислотами также образуется оксиметилфурфурол. Однако эта реакция протекает медленнее, чем с кетозами, что обуславливает достаточную специфичность реакции Селиванова [3].

Реактив на кетозы: раствор А – 0,05% раствор резорцина в 96% этиловом спирте; раствор Б – в 1 л HCl (d= 1,18) растворено 0,216 г FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O.

Методика опыта. В пробирку вносили 1 мл извлечения, добавляли по 3 мл растворов А и Б. Параллельно готовили раствор сравнения, состоящий из 3 мл раствора А и 3 мл раствора Б. Пробирки соединяли с воздушным холодильником и помещали на 40 мин в водяную баню при 80°С. По окончании нагревания пробирки охлаждали под струей водопроводной воды [2]. По 2 мл полученных растворов доводили до метки в пикнометрах вместимостью 25 мл 96%-ным этиловым спиртом.

Параллельно в аналогичных условиях готовили стандартный раствор фруктозы, для чего 0,05 г фруктозы растворяли в 100 мл воды, и далее поступали, как описано выше.

Полученные результаты приведены на рис. 4.

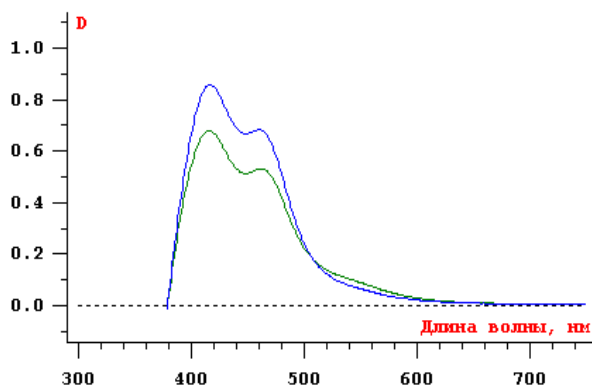


Рис. 4. УФ-спектр поглощения продуктов реакции исследуемого раствора и стандарта фруктозы с резорцином и кислотой хлористоводородной концентрированной

- УФ-спектр поглощения стандарта фруктозы
- УФ-спектр поглощения исследуемого раствора

Расчет проводили по формуле:

$$X\% = \frac{A_x \times C_{ст} \times W_1 \times W_2 \times 100}{A_{ст} \times l \times a \times V \times (100 - B)} \times 100$$

где $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора фруктозы; A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора фруктозы;



W_1 – общий объем извлечения из сырья, мл; W_2 – объем извлечения после разбавления, мл; a – масса сырья, г; V_1 – аликвота, взятая для разбавления, мл; B – влажность сырья.

Таблица 2

**Результаты количественного определения фруктозы в плодах
P. serotina (Ehrh.) Agardh**

X (%)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
3,50	0,04	0,0016	$\bar{X} = 3,54\%$ $\sum(\bar{X} - X)^2 = 0,0074$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,0157$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,04$ $\varepsilon = 1,14\%$
3,58	-0,04	0,0016	
3,52	-0,02	0,0004	
3,56	-0,02	0,0004	
3,51	0,03	0,0009	
3,59	-0,05	0,0025	
$\bar{X}=3,54$		$\Sigma=0,0074$	

Содержание фруктозы в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $3,54 \pm 0,04\%$.

Выводы. В результате проведенных исследований предложена методика количественного определения моносахаров методом УФ-спектрофотометрии, позволяющая дифференциально определить содержание гексоз и кетоз. Для определения гексоз в пересчете на глюкозу использована реакция с фенолом в присутствии кислоты серной концентрированной, максимум поглощения которой лежит в области $\lambda_{\max} = 483 - 485$ нм. Содержание рассчитывали с использованием стандартного образца глюкозы, которое в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $13,34 \pm 0,36\%$. Кетозы в пересчете на фруктозу определяли с использованием в качестве реактивов резорцина в присутствии кислоты хлористоводородной разведенной (реакция Селиванова), максимум поглощения реакции находится в области $415 - 420$ нм. Содержание фруктозы рассчитывали также с использованием стандартного образца фруктозы, которое в плодах *P. serotina* (Ehrh.) Agardh составило $3,54 \pm 0,04\%$.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.

Литература

1. Биохимия : учебник / под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.
2. Петров, К.П. Методы биохимии растительных продуктов / К.П. Петров. – Киев: изд. объединение «Вища школа». – 1978. – 224 с.
3. Практикум по химии углеводов/ под ред. Ю.А. Жданова. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Высшая школа. – 1973. – 204 с.

THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF MONOSACCHARIDES IN THE FRUIT CHERRY LATE – PADUS SEROTINA (EHRH.) AGARDH

D.I. Pisarev
O.O. Novikov
M.D. Bezmenova
E.A. Tomchakovskaya
V.N. Sorokopudov

Belgorod State University

e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

The technique of quantitative determination of monosaccharides in the fruit cherry late – *Padus serotina* (Ehrh.) Agardh by UV spectrophotometry allows the differential to determine the content of hexoses and ketosis. To determine the hexoses in terms of glucose used by reaction with phenol in the presence of concentrated sulfuric acid. Glucose content in the fruits of *P. serotina* (Ehrh.) Agardh was $13,34 \pm 0,36\%$. Ketosis in terms of fructose were determined using as reagents resorcinol in the presence of diluted hydrochloric acid (reaction Selivanova). Fructose in fruit *P. serotina* (Ehrh.) Agardh was $3,54 \pm 0,04\%$.

Key words: monosaccharides, glucose, fructose, fruit cherry later, UV-spectrophotometry.