**Лабораторная работа № 9**

***Тема: Количественное определение содержания***

***растворимых углеводов в растениях***

Растворимые углеводы (сахара) являются неотъемлемым компонентом любой ткани растения. Количественный и качественный состав сахаров у разных растений может варьировать в широких пределах. В корнеплодах сахарной свеклы накапливается 19–21 % сахаров, представленных главным образом сахарозой. Ягоды винограда содержат 20–30 % сахаров, состоящих почти исключительно из глюкозы и фруктозы. Много сахаров содержат персики, абрикосы, яблоки, груши, сливы, цитрусовые и ягодные культуры. У всех растений, особенно у ягодных культур (земляника, смородина, малина, вишня, хурма), относительное содержание моносахаридов и сахарозы подвержено значительным колебаниям. На сахаристость и соотношение различных сахаров в плодах оказывают влияние самые разнообразные факторы – увлажнение почвы, температура, количество вносимых минеральных удобрений, длина светового периода и др. Поэтому при оценке сахаристости различных плодов и сортов одного и того же растения необходимо учитывать эти факторы, чтобы сопоставлять только сравниваемые между собой объекты.

Большая часть сахаров находится в клеточном соке, и одним из приемов оценки образцов является анализ сока растения. Сахара легко растворяются в воде и на этом свойстве основано их выделение из растений и перевод в водную вытяжку. Количественное определение сахаров проводят с помощью самых

разнообразных методов, основанных на их физических и химических свойствах. Наиболее общий классический химический метод количественного определения сахаров, обладающих свободной альдегидной или кетонной группой, основан на способности этих функциональных групп восстанавливать в щелочной среде окисную медь в закись меди.



Сахара, обладающие таким свойством, называются восстанавливающими, или редуцирующими. К ним относятся все моносахариды и некоторые олигосахариды, имеющие одну свободную карбонильную группу (мальтоза, лактоза). Сахароза и другие олигосахара, у которых связаны обе карбонильные группы, требуют предварительного гидролиза кислотой или ферментом. В водной вытяжке некоторых объектов кроме сахаров присутствуют также другие редуцирующие вещества (белки, крахмал, инулин), которые могут искажать результаты анализа. В таких случаях требуется использовать осадители, чтобы очистить вытяжку.

В случае анализа окрашенных объектов (виноград, листовые овощи, сахарная свекла) обязательно производят осветление вытяжек осаждением примесей. В качестве осадителей можно использовать:

1) смесь 30 % раствора сернокислого свинца и 15 % раствора желтой кровяной соли, взятых в равных объемах;

2) 4 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты;

3) 10 % раствор уксуснокислого свинца.

Некоторые объекты (томаты, яблоки, лимоны) содержат значительные количества кислот, которые могут во время извлечения сахаров при нагревании частично или полностью гидролизовать сахарозу. Поэтому если определяют не только общий сахар, но и отдельно сахарозу, необходимо перед нагреванием к водной вытяжке добавить мел для нейтрализации кислот.

Цель настоящей работы – определить количество сахаров (моно- и олигосахаридов) в различных растительных объектах.

**Реактивы и материалы:** дистиллированная вода, уксуснокислый свинец,

фосфорнокислый натрий, CuSO4 · 5H2O, NaOH, глицерин, соляная кислота, глюкоза, фарфоровая ступка и пестик, воронка Шотта, колба Бунзена, конические колбы объемом 100 мл, мерный цилиндр, пробирки, водяная баня.

**Ход работы**

*1. Извлечение сахаров водой*

Взвесить 5 г исследуемого материала (яблоки, капуста, морковь, лук), размельчить и растереть до гомогенной массы в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды, нагретой до 70 оС. Растертую массу количественно перенести в коническую колбу на 100 мл, объем вытяжки довести до 50 мл горячей дистиллированной водой и оставить на 10 мин для экстракции. По истечении указанного времени экстракт охладить, отфильтровать через воронку Шотта и количественно перенести вытяжку в мерную колбу. При необходимости довести объем водой до 50 мл.

Обязательно провести осветление вытяжки в случае окрашенных (мутных) экстрактов. Для этого в теплую, не доведенную до окончательного объема вытяжку добавить по каплям 10 % раствор уксуснокислого свинца до прекращения образования осадка. Обычно на вытяжку, полученную из навески 10 г, необходимо добавить 0,5–2 мл раствора уксуснокислого свинца. Избытка соли свинца следует избегать, так как он проходит через фильтр и мешает ходу анализа. Осветленную вытяжку отфильтровать и довести объем водой до 50 мл.

*2. Определение восстанавливающих сахаров*

Для определения содержания восстанавливающих сахаров предварительно следует приготовить раствор глицерата меди. Для этого необходимо сделать смесь (2:1) растворов № 1 (0,8 % CuSO4 · 5H2O) и № 2 (15 % NaOH с добавлением 1 мл глицерина). Отобрать 1 мл осветленной отфильтрованной вытяжки в пробирку, добавить 15 мл глицерата меди, перемешать и нагревать на водяной бане при 70 оС 6 мин. Затем пробирку охладить в холодной воде и отобрать прозрачную жидкость в кювету для определения оптической плотности раствора (проба 1).

*3. Определение суммы восстанавливающих и невосстанавливающих сахаров (сахарозы)*

Для определения содержания невосстанавливающих сахаров отобрать 0,5 мл осветленной отфильтрованной вытяжки, добавить 0,5 мл 1 % НСl, перемешать и поставить на кипящую водяную баню на 15 мин. По истечении указанного времени добавить 15 мл глицерата меди и нагревать на водяной бане ровно 6 мин. Охладить пробирку в холодной воде, дать вытяжке отстояться и отобрать прозрачную жидкость для оптического анализа (проба 2). В этой пробе определяется сумма восстанавливающих сахаров и сахарозы.

*4. Спектрофотометрия*

Оптическую плотность исследуемых растворов необходимо регистрировать на спектрофотометре при длине волны λ = 582 нм. Содержание сахаров в пробах можно определить по калибровочной кривой, построенной по глюкозе. Для этого необходимо приготовить 50 мл раствора, содержащего 10 мг/мл глюкозы, и затем методом разбавления получить остальные растворы согласно таблице:



Для определения оптической плотности (*D*582) этих растворов предварительно провести реакции с глицератом меди, аналогично опытным образцам. Количество восстанавливающих сахаров в исследуемом объекте (*А,* %) вычислить по формуле:



где *с* – содержание сахаров в пробе 1, найденное по калибровочной кривой;

*V* – объем вытяжки, полученной из навески;

*m* – масса навески в граммах.

По этой же формуле рассчитать сумму восстанавливающих сахаров и сахарозы, подставляя вместо *с* содержание сахаров в пробе 2, найденное по калибровочной кривой. Разность между вторым и первым определениями, умноженная на коэффициент 0,95, дает содержание сахарозы в исследуемом объекте.

Результаты оформить в таблицу.

