

УДК 547.458.88:634.0.813.17

В. М. Резников, Л. Г. Матусевич, Т. С. Селиверстова

Белорусский технологический институт им. С. М. Кирова

СРАВНЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-ПЕКТАТНОГО И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДОВ АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Одним из наиболее распространенных и надежных методов количественного определения пектиновых веществ (ПВ) считается кальций-пектатный метод, основанный на определении уронидной части ПВ [1, 2]. По этому методу пектины переводятся в раствор, омыляются и осаждаются в виде кальциевых солей, которые учитывают весовым методом. Недостатком кальций-пектатного метода является большая длительность анализа и возможность соосаждения непектиновых веществ. При сравнении метода, основанного на определении кальция в осадке, и весового метода определения пектата кальция установлено, что последний дает завышенные результаты [3].

В последнее время внимание исследователей привлекают колориметрические методы определения пектиновых веществ, основанные на образовании окрашенных соединений при взаимодействии галактуроновой кислоты с нафторезорцином, цистеином, карбазолом [4—10]. Следует отметить, что все эти колориметрические методы дают хорошие результаты только при использовании чистых растворов уроновых кислот. Реакция карбазола, нафторезорцина и цистеина с галактуроновой кислотой недостаточно специфична, в связи с чем нейтральные полисахариды, входящие в состав пектиновых веществ, мешают их определению. Н. П. Филипповым [11] разработан фотометрический метод определения галактуроновой кислоты в присутствии нейтральных моносахаридов, в условиях которого образуются окрашенные продукты со стабильной и воспроизводимой по интенсивности окраской. В то же время названные выше методы не дают представления о составе пектиновых веществ, не несут никакой информации о нейтральных полисахаридах, содержание которых в этих веществах может достигать 60% [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

Образец	Содержание углеводов		Из			
	мг	% к навеске	гексозанов		пентоз	
			мг	%	мг	
Экстракт*	194,1	9,7	67,2	34,6	20,1	
Фильтрат*	99,1	4,9	48,2	40,7	15,6	
Осадок кальций-пектата**	95,0	4,8	19,0	20,0	4,5	
Осадок кальций-пектата***	97,2	4,9	—	—	—	

* Содержание всех углеводов определено спектрофотометрическим методом

** Содержание всех углеводов рассчитано по разности между содержанием в экс

*** Определено по массе осадка кальций-пектата.

Житко и Розиком [12] был разработан спектрофотометрический метод для количественного определения отдельных компонентов и смеси, состоящей из галактуроновой кислоты и галактозы. К сожалению, этот метод пригоден только для анализа пектиновых веществ с указанным выше компонентным составом. Поскольку известно, что кроме этих моносахаридов в продуктах гидролиза пектиновых веществ, выделенных из растительных материалов, обнаружены и другие сахара [13, 14], нами обращено внимание на спектрофотометрический способ анализа углеводов, позволяющий раздельно определять уроновые кислоты, гексозы и пентозы [15]. Использование этого метода позволило бы не только количественно оценить общее содержание пектиновых веществ, но и получить характеристику их по группам углеводов. В основе метода лежит реакция моносахаридов с *o*-толуидиновым реагентом, приводящая к образованию окрашенных продуктов. Реакция с *o*-толуидином может быть применена и для анализа полисахаридов, однако в этом случае необходим их предварительный гидролиз. Обычно гидролиз полисахаридов проводят в две стадии — вначале концентрированной, а затем разбавленной серной кислотой.

Поскольку анализ пектиновых веществ предполагалось проводить непосредственно в экстракте (растворе лимоннокислого аммония), гидролиз может быть осуществлен только разбавленной кислотой, на что обычно требуется 4,5—5 ч. Вместе с тем известно, что галактуроновая кислота, образующаяся в результате гидролиза пектиновых веществ, неустойчива в кислой среде [1, 4, 10], и поэтому необходимо было выяснить, влияет ли предварительное нагревание галактуроновой кислоты в кислой среде на оптическую плотность продуктов реакции галактуроновой кислоты с *o*-толуидиновым реагентом (ОТР). С этой целью мы подвергали галактуроновую кислоту обработке 2н. H_2SO_4 в течение различного времени и после добавления *o*-толуидинового реагента записывали спектры окрашенных продуктов.

Как видно из рис. 1, характер спектра изменяется в зависимости от продолжительности нагревания: появляется полоса при 555 нм и изменяется оптическая плотность в области аналитических длин волн 365 и 385 нм. Следовательно, при расчете концентраций сахаров окажется завышенным содержание галактуроновой кислоты и соответственно изменится содержание других углеводных компонентов пектиновых веществ.

Это обстоятельство потребовало постановки дополнительного эксперимента, целью которого было определение оптимальной продолжительности гидролиза пектиновых веществ. В связи с этим выполнен гидролиз пектиновых веществ в течение различного времени (1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 6 ч). На рис. 2 представлены спектры гидролизатов, полученных при гидролизе в течение 4,5 и 3 ч, после реакции с *o*-толуидиновым реагентом.

ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ЛУБА

них			Содержание полиуроновых к-т, % к навеске	Распределение углеводных компонентов экстракта, %		
заван	полууроновых к-т			Гексозаны	Пентозаны	Полиуроновые к-ты
%	мг	%				
10,4	106,8	55,0	5,3	100,0	100,0	100,0
15,7	35,3	35,6	1,7	71,8	77,6	33,0
4,7	71,5	75,3	3,6	28,2	22,4	67,0
—	—	—	—	—	—	—

тракте и фильтрате.

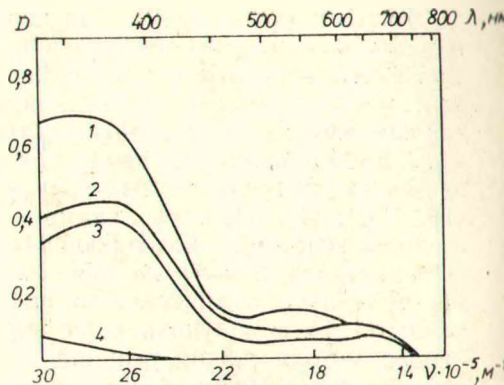
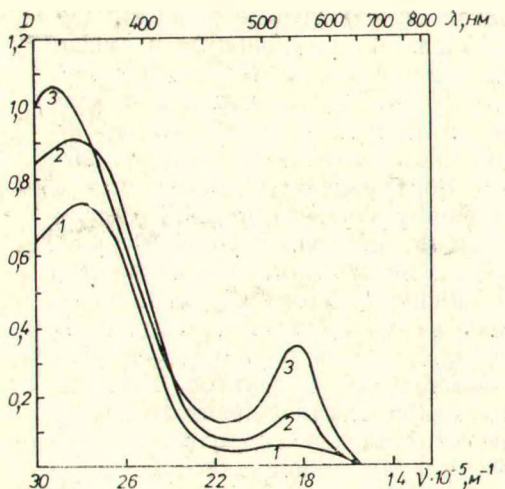


Рис. 1. Изменение спектров поглощения продуктов реакции галактуроновой кислоты с *o*-толуидиновым реагентом в зависимости от продолжительности нагревания галактуроновой кислоты в 2 н. H_2SO_4 : 1 — 0 ч; 2 — 1 ч; 3 — 4 ч.

Рис. 2. Спектры поглощения продуктов реакции с *o*-толуидиновым реагентом гидролизатов пектиновых веществ (продолжительность гидролиза: 1 — 4,5, 2 — 3 ч); модельной смеси (3) и нейтрализованного гидролизата пектиновых веществ (4).

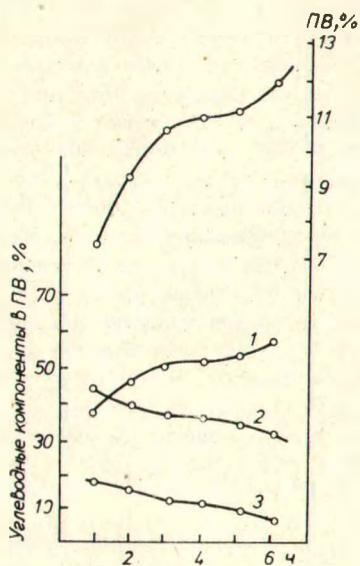
диновым реагентом (кривые 1 и 2), а также спектр продуктов реакции с *o*-толуидиновым реагентом модельной смеси (ГК—глюкоза—ксилоза 15:4:1 — кривая 3) и спектр нейтрализованного (не обработанного реагентом) гидролизата пектиновых веществ.

Как видно из рис. 2, спектр 3 модельной смеси имеет полосу поглощения при 365 нм. На спектре 1 в области 333—365 нм имеется плато и намечается полоса поглощения при 555 нм. Однако если вычесть поглощение нейтрализованного раствора гидролизата (спектр 4), то спектр 1 в области 333—365 нм приобретает такой же характер, как и спектр 3. Следовательно, полоса при 555 нм обусловлена наличием продуктов превращения галактуроновой кислоты. С увеличением продолжительности гидролиза эта полоса становится еще более отчетливой.

По данным спектров для различной продолжительности гидролиза были рассчитаны сумма всех определенных углеводов в процентах к исходному материалу и содержание в них уроновых кислот, гексоз и пентоз в процентах. Из рис. 3 видно, что соотношение углеводных компонентов в пектиновых веществах в процессе гидролиза изменяется: содержание уроновых кислот увеличивается, гексоз и пентоз уменьшается. Однако при продолжительности гидролиза 3—4 ч соотношение компонентов в пектиновых веществах изменяется сравнительно мало. Оптическая плотность при 630 нм, где поглощают только продукты реакции с гексозами, по истечении 3 ч остается практически постоянной. Более того, характер спектра, снятого после 3 ч гидролиза, аналогичен характеру спектра модельной смеси (см. рис. 2, кривая 2): в спектре отсутствует пик при 555 нм.

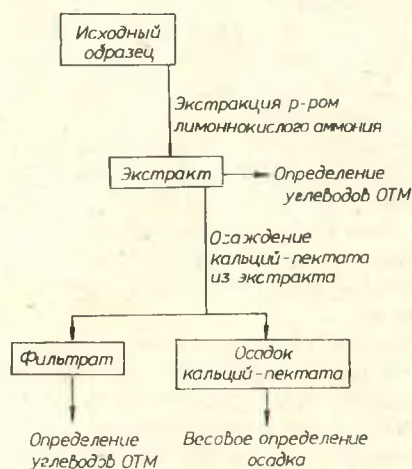
На основании проведенных экспериментов нами как оптимальная выбрана продолжительность гидролиза пектиновых веществ 3 ч, что позволяет использовать методику количественного определения сахаров с *o*-толуидиновым реагентом для исследования пектиновых веществ

Рис. 3. Зависимость содержания пектиновых веществ в лубе и соотношения углеводных компонентов в пектиновых веществах от продолжительности гидролиза: 1 — уруновые кислоты; 2 — гексозаны, 3 — пентозаны.



льна. Выбранная нами продолжительность гидролиза соответствует предлагаемой в методике Сомодь-Нельсона [17], который обнаружил, что после 3 ч гидролиза полисахаридов гидролизат обладает максимальной восстанавливающей способностью, тогда как после 4 ч кипячения эта способность заметно снижается.

Далее нами было проведено сравнение наиболее часто применяемого метода определения пектиновых веществ — кальций-пектатного со спектрофотометрическим толуидиновым методом. Анализ проводили по следующей схеме:



Результаты анализа, представленные в таблице, показывают, что при обработке луба раствором лимоннокислого аммония из него экстрагируется 9,7% углеводов, в которых на долю полиуруновых кислот приходится всего 55%. Важно отметить, что после обработки экстракта хлористым кальцием и удаления осадка пектата кальция в фильтрате также обнаружены полиуруновые кислоты в количестве 33% от их содержания в экстракте. Таким образом, в осадок пектата кальция переходит только $\frac{2}{3}$ полиуруновых кислот, извлекаемых из луба экстракцией лимоннокислым аммонием. Более того, в кальций-пектате (в Н-форме) на долю полиуруновых кислот приходится всего 75%, что подтверждает данные автора работы [3] о завышении результатов при определении пектиновых веществ кальций-пектатным методом.

Экстракция пектиновых веществ. Навеску лубяной части льняного стебля около 2 г, предварительно тщательно измельченную и проэкстрагированную спиртобензолом, помещают в колбу, заливают 100 мл лимоннокислого аммония (трехзамещенного) и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. Полученный экстракт отфильтро-

вывают в мерную колбу емкостью 250 мл, остаток снова заливают 100 мл раствора лимоннокислого аммония и экстракцию повторяют. Экстракт отфильтровывают в ту же мерную колбу; остаток на фильтре промывают горячей водой. Экстракт и промывные воды охлаждают и доводят до метки дистиллированной водой.

Определение пектиновых веществ кальций-пектатным методом. Из мерной колбы отбирают 100 мл экстракта, переносят в стакан на 300 мл и прибавляют 10 мл 1 н. NaOH для омыления эфиров. Раствор оставляют на ночь в темном месте, после чего к нему добавляют последовательно при перемешивании по 50 мл 1 н. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ и CaCl_2 (11,1 г/л) и опять оставляют на ночь. Затем нагревают до кипения и горячий раствор фильтруют через стеклянный фильтр № 2. Осадок промывают сначала холодной водой для удаления лимоннокислого кальция (проба на кальций щавелевой кислотой), затем горячей водой до отрицательной пробы на ионы хлора (проба с нитратом серебра).

Осадок на фильтре высушивают до постоянной массы при 105° С. Содержание пектиновых веществ (%) вычисляют по формуле

$$\text{ПВ} = \frac{2,5a \cdot 0,9235 K_3 \cdot 100}{C}$$

где a — масса кальций-пектата, г;

C — навеска абсолютно сухого растительного материала, г;

0,9235 — коэффициент пересчета кальций-пектата на пектиновую кислоту;

K_3 — коэффициент экстракции.

Определение пектиновых веществ спектрофотометрическим методом. Экстракт пектиновых веществ из мерной колбы смешивают с 4 н. H_2SO_4 в объемном соотношении 1 : 1 и кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. Гидролизат охлаждают и нейтрализуют равным объемом 2 н. Na_2CO_3 . *o*-Толундиновый реагент готовят по [16]. Затем проводят анализ углеводных компонентов. В пробирку вносят 0,5 мл нейтрализованного гидролизата, добавляют 4 мл ОТР и смесь нагревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане. После нагревания смесь охлаждают и снимают спектры поглощения или измеряют оптическую плотность при аналитических длинах волн на спектрофотометрах «Спекорд» или СФ-4А по отношению к контрольному раствору (0,5 мл воды и 4 мл ОТР). Затем измеряют оптическую плотность нейтрализованного раствора гидролизата (холостой раствор), разбавленного в 9 раз (учитывается разбавление при анализе с ОТР) по отношению к дистиллированной воде, при длинах волн 365 и 385 нм.

Для расчетов концентраций уроновых кислот, гексоз и пентоз используют значения оптической плотности при 365, 385 и 630 нм с вычетом оптической плотности холостого раствора. Содержание гексоз находят из калибровочного графика по оптической плотности при 630 нм. Для расчета концентраций уроновых кислот и пентоз вычитают из общего поглощения сахаров при 365 и 385 нм поглощение гексоз. Последние определяют по найденной ранее концентрации гексоз из заранее построенных для этих длин волн калибровочных графиков. Концентрации уроновых кислот и пентоз рассчитывают по уравнению Фирордта [18], коэффициенты в котором определяют из калибровочных графиков. Для пересчета моносахаридов в полисахариды используют коэффициенты 0,907 (полууроновые кислоты); 0,9 (гексозаны); 0,88 (пентозаны).

Выводы. 1. Кальций-пектатный метод количественного определения пектиновых веществ имеет следующие недостатки: в условиях метода происходит неполное осаждение уроновых кислот; с полиуроновыми кислотами осаждаются и нейтральные полисахариды; метод не может служить целям характеристики уронидной части пектиновых веществ.

2. Для количественного определения и анализа состава пектиновых веществ предложен спектрофотометрический метод, позволяющий с помощью *o*-толунидинового реагента определять полиуроновые кислоты, гексозаны и пентозаны непосредственно в растворе без осаждения пектиновых веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шелухина Н. П., Ашубаева Э. Д., Аймухамедова Г. Б. Пектиновые вещества, их некоторые свойства и производные. Фрунзе, 1970. 72 с.
2. Шарков В. И., Куйбина Н. И., Соловьева Ю. П., Павлова Т. А. Количественный химический анализ растительного сырья. М., 1976. 72 с.
3. Darignon L. Comparaison de quelques méthodes de composés pectiques. — *Fruits*, 1960, vol. 15, N 11, p. 469—472.
4. Шелухина Н. П., Турдакова И. И., Аймухамедова Г. Б. Галактуроновая кислота, методы ее получения и определения. Фрунзе, 1972. 94 с.
5. Dekker R. F. H., Richards G. N. Determination of pectic substances in plant material. — *J. Sci. Food and Agric.*, 1972, vol. 23, N 4, p. 475—483.
6. Гапоненков Т. К. Колориметрический метод определения галактуронозой кислоты в пектине. — *Изв. вузов. Пищ. технол.*, 1962, № 4, с. 160—162.
7. Пономарева Н. П. Карбазольный метод определения пектиновых веществ. — В кн.: Растительные полисахариды. Кишинев, 1970, с. 109—113.
8. Oseňšková J., Frinu M. Stanovení pektinů v řepě av difúzní stavě kolorimetrickou metodou. — *Listy cukrovarn.*, 1971, sv. 87, N 4, s. 87—91.
9. Сапожникова Ж. В., Семочкина Л. Т., Барнашова Г. С. Колориметрическое определение пектиновых веществ и активности полигалактоураназы. — *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1967, т. 3, вып. 1, с. 113—119.
10. Методы химии углеводов / Под ред. Н. К. Кочеткова. Пер. с англ. М., 1967. 512 с.
11. Филиппов Н. П. Фотометрическое определение галактуронозой кислоты в смеси с нейтральными моносахаридами. — *Журн. аналит. химии*, 1970, т. 25, вып. 12, с. 2459—2463.
12. Zitko K., Rosik V. Bestimmung den Pektins und begleiten der Polysacharide. — *Nahrung*, 1961, Bd. 5, N 5, S. 491—505.
13. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижова А. С., Шибачев В. Н. Химия углеводов. М., 1967. 671 с.
14. Worth H. G. J. The chemistry and biochemistry of pectic substances. — *Chem. Rev.*, 1967, vol. 67, N 4, p. 465—473.
15. Грушенко М. М., Аникеенко Т. С., Резников В. М. Совместное использование фенол-сернокислотного и толуидинового способов определения сахаров как метод изучения углеводного состава лигноуглеводного комплекса. — Тезисы докл. семинара «Лигноуглеводные комплексы древесины». Рига, 1975, с. 32—34.
16. Усов А. И., Яроцкий С. В. Раздельное определение гексоз и пентоз при помощи о-толуидинового реагента. — *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1974, № 4, с. 877—880.
17. Veirman E. Analyse van enkele niet-cellulose bestanddelen van vian. — *Ann. Scient. Text. Belg.*, 1969, N 3—9, S. 58—67.
18. Берштейн И. Я., Каминский Ю. П. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л., 1975. 230 с.

Поступило 24 IV 1981