

Научная статья
УДК 543
doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.059

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ АНТРОНЫМ РЕАКТИВОМ

Лидия Николаевна Середина¹, Мария Александровна Ярцева², Никита Сергеевич Цветов³

^{1,3}Лаборатория медицинских и биологических технологий Центра наноматериаловедения
Кольского научного центра РАН, Апатиты, Россия

²Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина Кольского научного центра РАН,
Апатиты, Россия

³Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева
Кольского научного центра РАН, Апатиты, Россия

¹*l.sereda@ksc.ru*

²*m.yarceva@ksc.ru*

³*n.tsvetov@ksc.ru*

Аннотация

Представлены результаты определения срока хранения антронового реактива и водного раствора глюкозы. Установлено, что продолжительность срока хранения антронового реактива составляет 7 сут, водного раствора глюкозы — не более 7 сут с периодом выдерживания не менее 2 сут. Полученные данные могут быть использованы для более точного определения общего содержания углеводов в растительных экстрактах и применены в пищевой и фармацевтической промышленности.

Ключевые слова:

антрон, углеводы, срок хранения

Благодарности:

статья выполнена при поддержке федерального бюджета по теме государственного задания Кольского научного центра РАН № FMEZ-2023-0012.

Финансирование:

государственное задание по теме НИР № FMEZ-2023-0012.

Для цитирования:

Середина Л. Н., Ярцева М. А., Цветов Н. С. Модификация метода определения общего содержания углеводов антроном реактивом // Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. 2024. Т. 15, № 1. С. 355–360. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.059.

MODIFICATION OF THE METHOD FOR DETERMINING THE TOTAL CARBOHYDRATE CONTENT WITH AN ANTRON REAGENT

Lidiya N. Sereda¹, Maria A. Yartseva², Nikita S. Tsvetov³

^{1,3}Laboratory of Medical and Biological Technologies, Nanomaterial Research Centre of the Kola Science Centre of the RAS, Apatity, Russia

²Polar Alpine Botanical Garden-Institute of the Kola Science Centre of RAS, Apatity, Russia

³I. V. Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials of the Kola Science Centre of RAS

¹*l.sereda@ksc.ru*

²*m.yarceva@ksc.ru*

³*n.tsvetov@ksc.ru*

Abstract

The paper presents the results of determining the shelf life of an antron reagent and an aqueous glucose solution. It was found that the shelf life of the antron reagent is 7 days, the aqueous glucose solution is no more than 7 days with a holding period of at least 2 days. The data obtained can be used to more accurately determine the total carbohydrate content in plant extracts and applied in the food and pharmaceutical industries.

Keywords:

antron, carbohydrates, shelf life

Acknowledgments:

the article was carried out with the support of the federal budget on the topic of the state assignment of the Kola Science Centre of RAS No. FMEZ-2023-0012.

Funding:

state assignment on the topic of research No. FMEZ-2023-0012.

For citation:

Sereda L. N., Yartseva M. A., Tsvetov N. S. Modification of the method for determining the total carbohydrate content with an antron reagent // Transactions of the Kola Science Centre of RAS. Series: Engineering Sciences. 2024. Vol. 15, No. 1. P. 355–360. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.059.

Введение

Сохранение жизнеспособности растений при действии неблагоприятных факторов окружающей среды осуществляется сложной системой взаимосвязанных метаболических процессов, в которой существенную роль играют углеводы. Присутствие их в тканях травянистых растений обуславливает антифризную, осморегуляторную, криопротекторную, стабилизационную функции, способствуя водоудерживающей способности клеток, сохранению нативной структуры белков, стабилизации клеточных мембран, и выступает регулятором экспрессии генов, фотосинтеза, гликолиза, метаболизма азота и сахарозы, а также проявляет неспецифическую составляющую стрессового ответа [1].

Простым и удобным способом колориметрической оценки общего содержания различных углеводов, встречающихся в биологическом материале, является метод их определения с антроновым реактивом, основанный на расщеплении сложных углеводов до моносахаров в сильноокислом растворе с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфуrolа, образующего при реакции с антроном комплексное соединение сине-зелёного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию углеводов в реакционной среде.

Впервые сине-зелёное окрашивание, регистрируемое при нагревании углеводов с антроном в кислой среде, было получено Р. Дрейвудом в процессе исследования восемнадцати углеводных материалов, в том числе нескольких производных целлюлозы [2], затем У. Э. Тревельян и Дж. С. Харрисон [3] применили метод для определения углеводов дрожжей. Однако систематические исследования реакции антронового реактива с различными гексозами и пентозами в растительном материале впервые провели Э. В. Йемм и А. Дж. Уиллис [4], после чего метод получил широкое распространение.

В работе [2], использовался 0,2 %-й антроновый реактив в концентрированной серной кислоте, в исследовании [4] реактив, приготовленный по методике [3], а именно путём растворения 0,2 г антрона в 100 мл 70 %-й серной кислоты. В современных работах зачастую используют приведённую в статье [5] методику, в которой 0,15 г антрона растворяли 100 мл 72 %-й серной кислоты. В ОФС 1.2.3.0019.15 [6] подробно описано приготовление 0,2 %-го антронового реактива с использованием концентрированной серной кислоты, выдерживаемого не менее 4 ч. Во всех перечисленных методиках предлагается использовать свежеприготовленный реактив.

Необходимо отметить, что информация о сроке хранения антронового реактива приводится лишь в статье [6]: при нахождении в тёмном месте при температуре 6–8 °С его срок хранения составляет не более 7 сут, аналогичные сведения о водном растворе глюкозы отсутствуют. В связи с вышесказанным целью работы является определение срока хранения антронового реактива и водного раствора глюкозы.

Методы исследований

Химические реактивы. Серная кислота (98 %), глюкоза, антрон («Вектон», Россия), деионизированная вода, полученная при помощи системы очистки воды Millipore Simplicity UV (Merck Millipore, Франция).

Приготовление антронового реактива. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 0,025 г антрона, растворяли в концентрированной серной кислоте, доводили до метки и перемешивали. Полученный реактив содержал 1 мг/мл антрона.

Приготовление стандартного раствора глюкозы. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,01 г стандартного образца глюкозы, растворяли в воде, доводили до метки и перемешивали. Полученный раствор содержал 1 мг/мл глюкозы. Далее бинарными разбавлениями готовились растворы в концентрационном диапазоне 0,5–0,03125 мг/мл.

Методика. В стеклянную вialsу вносили 0,2 мл стандартного раствора глюкозы используемых концентраций и 0,1 мл антронового реактива и термостатировали в течение 15 мин в сушильном шкафу ШС-10-02 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при температуре 95 °С. Оптическое поглощение полученных растворов регистрировали на планшетном фотометре Elisa DEL-100 (Hangzhou Miu Instruments, Китай) при 625 нм.

Статистическая обработка. Химические анализы проводились в трёхкратной повторности. Статистическая значимость различий обсуждаемых результатов оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Тьюки при уровне значимости (p -value) $\leq 0,05$. Расчёты проводились в MS Excel 2021 (Microsoft, США).

Результаты и обсуждения исследований

Тестирование антронового реактива и водного раствора глюкозы проводилось на протяжении 7 сут. Результаты определения срока хранения антронового реактива и водного раствора глюкозы представлены на рис. 1 и в таблице. Показано, что в течение всего периода исследования способность антрона образовывать с гидроксиметилфурфуролом комплексное соединение достоверно значимо ($p \leq 0,05$) не изменялась, что согласуется с приведёнными рекомендациями [6], а водный раствор глюкозы начинает проявлять значимую ($p \leq 0,05$) активность после 2 сут выдерживания.

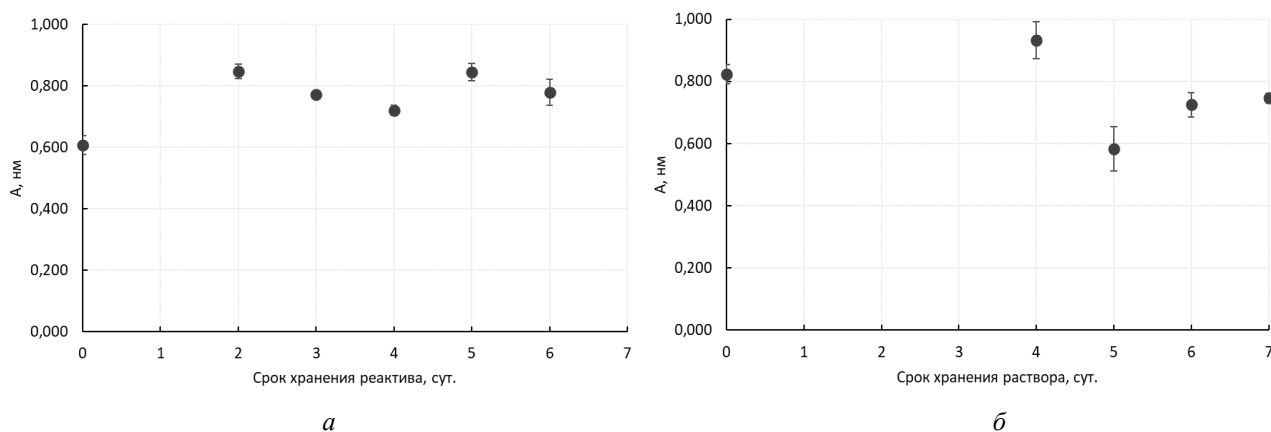


Рис. 1. Зависимость активности антронового реактива (а) и водного раствора глюкозы (б) от продолжительности хранения

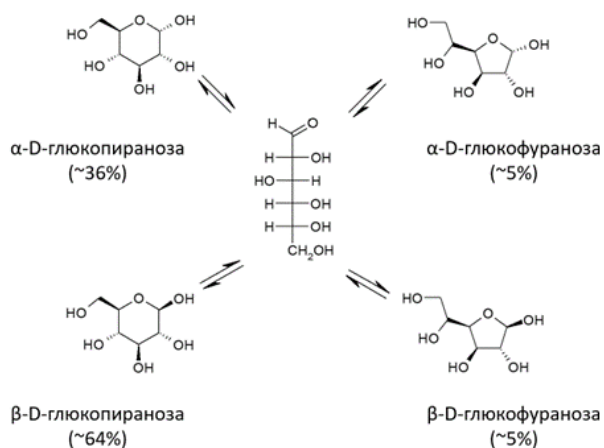


Рис. 2. Равновесие форм глюкозы в водном растворе

Известно, что структура глюкозы представляет собой шестичленное кольцо, состоящее из альдегидной и пяти гидроксильных групп. Кольцо находится в растворе в четырёх аномерных формах (α - и β -D-глюкопираноза, α - и β -D-глюкофураноза) и одной линейной (рис. 2).

Проведённые исследования показывают, что соотношение содержания α -аномера по отношению к β -аномеру в водном растворе при комнатной температуре составляет 36:64: ≈ 5 : ≈ 5 . Подобное обилие β -аномера в водном растворе можно объяснить только сильными сольватационными эффектами, уравнивающими α -аномер [7–10], что, объясняет необходимость выдерживания исследуемого раствора для достижения равновесия процентного соотношения форм.

Значения теста Тьюки при уровне значимости $(p\text{-value}) \leq 0,05$

Group 1	Group 2	Mean	Std err	Q-stat	Lower	Upper	p-value	Mean-crit	Cohen d	Примечания
Для антропного реактива										
7	6	0,040	0,027	1,467	-0,088	0,17	0,83	0,128	0,847	Незначимо
7	5	0,080	0,027	2,910	-0,048	0,21	0,31	0,128	1,680	Незначимо
7	4	0,157	0,027	5,722	0,029	0,29	0,02	0,128	3,304	Значимо
7	0	0,072	0,027	2,631	-0,056	0,20	0,39	0,128	1,519	Незначимо
6	5	0,120	0,027	4,377	-0,008	0,25	0,07	0,128	2,527	Незначимо
6	4	0,117	0,027	4,255	-0,011	0,24	0,08	0,128	2,457	Незначимо
6	0	0,032	0,027	1,164	-0,096	0,16	0,92	0,128	0,672	Незначимо
5	4	0,237	0,027	8,632	0,109	0,37	0,00	0,128	4,984	Значимо
5	0	0,152	0,027	5,540	0,024	0,28	0,02	0,128	3,199	Значимо
4	0	0,085	0,027	3,091	-0,043	0,21	0,26	0,128	1,785	Незначимо
Для водного раствора глюкозы										
7	5	0,066	0,016	4,200	-0,009	0,141	0,095	0,075	2,425	Незначимо
7	4	0,058	0,016	3,693	-0,017	0,133	0,168	0,075	2,132	Незначимо
7	3	0,008	0,016	0,507	-0,067	0,083	0,999	0,075	0,292	Незначимо
7	2	0,068	0,016	4,305	-0,007	0,143	0,084	0,075	2,486	Незначимо
7	0	0,172	0,016	10,911	0,097	0,247	0,000	0,075	6,300	Значимо
5	4	0,125	0,016	7,893	0,050	0,200	0,001	0,075	4,557	Значимо
5	3	0,074	0,016	4,706	-0,001	0,149	0,053	0,075	2,717	Незначимо
5	2	0,002	0,016	0,106	-0,073	0,077	1,000	0,075	0,061	Незначимо
5	0	0,239	0,016	15,111	0,164	0,314	0,000	0,075	8,725	Значимо
4	3	0,050	0,016	3,187	-0,025	0,125	0,283	0,075	1,840	Незначимо
4	2	0,126	0,016	7,999	0,051	0,201	0,001	0,075	4,618	Значимо
4	0	0,114	0,016	7,218	0,039	0,189	0,003	0,075	4,167	Значимо
3	2	0,076	0,016	4,812	0,001	0,151	0,046	0,075	2,778	Значимо
3	0	0,164	0,016	10,405	0,089	0,239	0,000	0,075	6,007	Значимо
2	0	0,240	0,016	15,217	0,165	0,315	0,000	0,075	8,785	Значимо

Выводы

В результате проведённых исследований удалось определить продолжительность срока хранения антронового реактива — 7 сут и водного раствора глюкозы — не более 7 сут с периодом выдерживания 2 сут. Полученные данные могут быть использованы для определения общего содержания углеводов в растительных экстрактах и применены в пищевой и фармацевтической промышленности.

Список источников

1. Содержание воды и сахаров в листьях лекарственных растений в течение вегетации / М. А. Живетьев [и др.] // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2011. Т. 7, № 4. С. 69–79.
2. Dreywood R. Qualitative test for carbohydrate material // Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition. 1946. Vol. 18 (8). P. 499–499.
3. Trevelyan W. E., Harrison J. S. Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates // Biochemical J. 1952. Vol. 50 (3). P. 298–303.
4. Yemm E. W., Willis A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone // Biochemical J. 1954. Vol. 57 (3). P. 508–514.
5. Irigoyen J. J., Einerich D. W., Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants // Physiologia plantarum. 1992. Vol. 84 (1). P. 55–60.
6. ОФС 1.2.3.0019.15 Определение сахаров // Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М., 2018.
7. Molteni C., Parrinello M. Glucose in aqueous solution by first principles molecular dynamics // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120 (90). P. 2168–2171.
8. Solvent effect on the anomeric equilibrium in D-glucose: a free energy simulation analysis / S. Ha [et al.] // J. Am. Chem. Soc. 1991. Vol. 113 (5). P. 1553–1557.
9. Schmidt R. K., Karplus M., Brady J. W. The anomeric equilibrium in D-xylose: free energy and the role of solvent structuring // J. Am. Chem. Soc. 1996. Vol. 118 (3). P. 541–546.
10. Infrared and Raman spectra, conformational stability, ab initio calculations of structure, and vibrational assignment of α and β glucose / C. Araujo-Andrade [et al.] // J. Molecular Structure. 2005. Vol. 714 (2–3). P. 143–146.

References

1. Zhivetev M. A., Graskova I. A., Pomortsev A. V., Voinikov V. K. Water and carbohydrate content at leaf of plants used in medicine during vegetation. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2011, Vol. 7 (4), pp. 69–79.
2. Dreywood R. Qualitative test for carbohydrate material. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, 1946, Vol. 18 (8), pp. 499–499.
3. Trevelyan W. E., Harrison J. S. Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. Biochemical Journal, 1952, Vol. 50 (3), pp. 298.
4. Yemm E. W., Willis A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical Journal, 1954, Vol. 57 (3), pp. 508.
5. Irigoyen J. J., Einerich D. W., Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia plantarum, 1992, Vol. 84 (1), pp. 55–60.
6. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii, XIV izd. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed.], Moscow, 2018.
7. Molteni C., Parrinello M. Glucose in aqueous solution by first principles molecular dynamics. Journal of the American Chemical Society, 1998, Vol. 120(9), pp. 2168–2171.
8. Ha S., Gao J., Tidor B., Brady J. W., Karplus M. Solvent effect on the anomeric equilibrium in D-glucose: a free energy simulation analysis, Journal of the American Chemical Society, 1991, Vol. 113 (5), pp. 1553–1557.

9. Schmidt R. K., Karplus M., Brady J. W. The anomeric equilibrium in D-xylose: free energy and the role of solvent structuring, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, Vol. 118 (3), pp. 541–546.
10. Araujo-Andrade C., Ruiz F., Martínez-Mendoza J.R., Terrones H. Infrared and Raman spectra, conformational stability, ab initio calculations of structure, and vibrational assignment of α and β glucose. *Journal of Molecular Structure*, 2005, Vol. 714 (2–3), pp. 143–146.

Информация об авторах

Л. Н. Середа — младший научный сотрудник;

М. А. Ярцева — аспирант;

Н. С. Цветов — кандидат химических наук, научный сотрудник.

Information about the authors

L. N. Sereda — JuniorResearcher;

M. A. Yartseva — Postgraduate Student;

N. S. Tsvetov — PhD (Chemistry), Researcher.

Статья поступила в редакцию 08.04.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 12.04.2024.
The article was submitted 08.04.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 12.04.2024.