

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 20:	Stanovenie redukujúcich a neredukujúcich sacharidov v klíčiach rastlínach
Princíp:	<p>V rastlinnom materiáli sa stanovujú redukujúce sacharidy metódou opísanou Somogyim a Nelsonom. Zahrievaním roztoku sacharidu s Fehlingovým roztokom dochádza k redukcii meďnatého komplexu na oxid meďný. Aby sa zabránilo späťnej oxidácii Cu^+, potláča sa rozpustnosť kyslíka v roztoku prebytkom síranu sodného. Pomocou jednomocnej medi sa potom redukuje roztok kyseliny arzénomolybdénovej za vzniku modrozeleného zafarbenia, ktorého intenzita sa stanoví spektrofotometricky. Po hydrolyze kyselinou sírovou sa stanovia celkové sacharidy. Rozdiel oboch stanovení udáva obsah neredukujúcich sacharidov.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. meďnaté činidlo A (25 g bezvodého uhličitanu sodného, 20 g vínanu sodnodraselného, 20 g hydrogenuhličitanu sodného a 200 g bezvodého síranu sodného rozpustíme v 800 ml destilovanej vody a doplníme destilovanou vodou do 1 litra. Roztok je potrebné udržiavať pri teplote 20 °C.) 2. meďnaté činidlo B (15 % roztok kryštalického síranu meďnatého v 100 ml destilovanej vody, okyslený 1 až 2 kvapkami kyseliny sírovej) 3. Nelsonovo činidlo (25 g molybdénanu amónneho rozpustíme v 450 ml destilovanej vody a pridáme 21 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Po premiešaní pridáme 3 g arzeničnanu sodného v 25 ml destilovanej vody a inkubujeme 48 hodín pri teplote 37 °C.) 4. 0,33 M roztok hydroxidu bárnateho 5. 5 % roztok síranu zinočnatého 6. 9 % roztok kyseliny sírovej 7. 0,33 M roztok hydrogenuhličitanu sodného 8. 0,33 M roztok uhličitanu sodného 9. morský piesok 10. pevný uhličitan vápenatý 11. štandard glukózy s koncentráciou 10 mg/100 ml 12. štandard sacharózy s koncentráciou 20 mg/100 ml
Materiál:	<p>klíčiace rastliny (klíčky pšenice), trecia miska, odparovacia miska, vodný kúpeľ, odmerná banka 25 ml, centrifúga, centrifugačné skúmavky, skladaný filter, filtračný lievik, sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, termostat, ultrazvuková vanička</p>
Postup:	<p>Klíčiace rastliny opláchneme destilovanou vodou. Rastlinné tkanivo usušíme papierovou vatou, odvážeme 1 g a rozstriháme nadrobno. Navážené tkanivo vložíme do odparovacej misky do pary nad vriacu vodu asi na 5 – 10 min. Po zmäknutí klíčky presunieme do trecej misky a rozotrieme s malým množstvom morského piesku, uhličitanu vápenateho a vody (5 – 8 ml). Zmes centrifugujeme 5 minút pri 3000 ot/min (900 g). Supernatant zlejeme do odmernej banky s objemom 25 ml. Priamo v centrifugačnej skúmavke sediment znova premiešame s malým množstvom destilovanej vody (5 – 8 ml) a po odstredení pridáme supernatant k prvému podielu. Tento rastlinný extrakt zbavíme bielkovín pridaním 2 ml 0,33 M roztoku hydroxidu bárnateho, obsah dobre pretrepeme a po niekoľkých minútach pripipetujeme 2 ml 5 % roztoku síranu zinočnatého. Obsah opäť dobre premiešame. Po doplnení destilovanou vodou na objem 25 ml extrakt prefiltrujeme cez hustý filter. Pre stanovenie sacharidov riedime tento bielkovín zbavený extrakt (filtrát) destilovanou vodou nasledovne: 1 ml filtrátu + 19 ml H_2O (20-násobné zriedenie).</p>

<p>Na stanovenie redukujúcich sacharidov použijeme štandard glukózy s koncentráciou 10 mg/100 ml. Do skúmaviek označených číslami 0, 1, 2, 3, 4, 5 pipetujeme roztoky štandardu podľa tabuľky 3.2 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou (vzorka 1) pipetujeme namiesto štandardu 1 ml riedeného extraktu.</p>								
TABUĽKA 3.2		0	1	2	3	4	5	vzorka 1
štandard glukózy	[ml]	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
extrakt (zriedený)	[ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O	[ml]	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	1
A + B (25:1)	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať, 25 min variť vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť								
Nelsonovo činidlo	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať a na 1 min vložiť do ultrazvukovej vaničky kvôli odstráneniu CO ₂ určiť absorbanciu pri 540 nm								
množstvo sacharidu v skú- mavke	[mg]	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	x₁
absorbancia pri 540 nm		–						
<p>Na stanovenie celkovej koncentrácie sacharidov (redukujúcich + neredukujúcich) použijeme štandard sacharózy s koncentráciou 20 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztoky štandardu podľa tabuľky 3.3 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou (vzorka 2) pipetujeme rovnako ako v predošlom prípade namiesto štandardu 1 ml riedeného extraktu.</p>								
TABUĽKA 3.3		0	1	2	3	4	5	vzorka 2
štandard sacharózy	[ml]	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
extrakt (zriedený)	[ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O	[ml]	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	1
9 % H ₂ SO ₄	[ml]	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
premiešať, 30 min hydrolyzovať pri 80 – 90 °C (v termostate)								
0,33 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	[ml]	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
A + B (25:1)	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať, 25 min variť vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť								
Nelsonovo činidlo	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať a na 1 min vložiť do ultrazvukovej vaničky kvôli odstráneniu CO ₂ určiť absorbanciu pri 540 nm								
množstvo sacharidu v skú- mavke	[mg]	0	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	x₂
absorbancia pri 540 nm		–						

Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme dva kalibračné grafy (závislosť absorbancie štandardného roztoku glukózy, resp. sacharózy od ich množstva) a z nich určíme množstvo redukujúcich (x_1) a celkových (x_2) sacharidov v mg na 1 ml riedeného extraktu. Hodnoty x_1 a x_2 vynásobíme zriedením pôvodného extraktu (20-násobné zriedenie), čím získame množstvo redukujúcich a celkových sacharidov v 1 ml pôvodného neriedeného extraktu. Aby sme zistili množstvo sacharidov (v mg), ktoré sú obsiahnuté v 1 g klíčkov, je treba tieto hodnoty vynásobiť číslom 25. Množstvo neredukujúcich sacharidov vypočítame z rozdielu hodnôt pre celkové a redukujúce sacharidy.
Záver:	Uvedieme množstvo redukujúcich a neredukujúcich sacharidov nachádzajúcich sa v 1 g rastlinných klíčkov.