

CENTRAAL INSTITUUT VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

Gestencilde Mededelingen

jaargang 1953

nr. 3

DE BEPALING VAN OPLOSBARE SUIKERS IN GRAS

Mej. M.S.M. Bosman

DE BEPALING VAN OPLOSBARE SUIKERS IN GRAS

door Mej. M.S.M. Bosman

Resumé

Een methode is uitgewerkt voor de bepaling van oplosbare mono-, di- en polysacchariden in gras. Er werd een goede overeenstemming verkregen tussen bepalingen in het verse en in het gedroogde materiaal verricht.

Het materiaal werd gedroogd, door het eerst gedurende 5 minuten te verhitten in een autoclaaf bij 110° C, daarna 2 uur bij 70° C in een elektrische stoof met luchtcirculatie.

De mono- en disacchariden werden door warme extractie met 90 % alcohol in een Soxhlet-apparaat van de polysacchariden gescheiden. Deze laatste werden daarna met water geëxtraheerd. De reductie van de suikers werd uitgevoerd volgens de methode van van der Plank.

1. Vorbewerking

Voor onze proeven namen we van Lolium perenne de spruiten - zonder wortels en dode bladeren - tot de bovenste zichtbare bladscheden van het basale deel. Op deze plaatsen is nl. een hoog suikergehalte te verwachten.

Het materiaal werd in stukjes van een paar mm geknipt en goed gemengd. Dit gemengde product was ons uitgangsmateriaal. Omdat het voor onze toekomstige proeven beschikbare verse materiaal de 5 gram niet zal overschrijden, werd bij alle methoden uitgegaan van ± 5 gram vers materiaal.

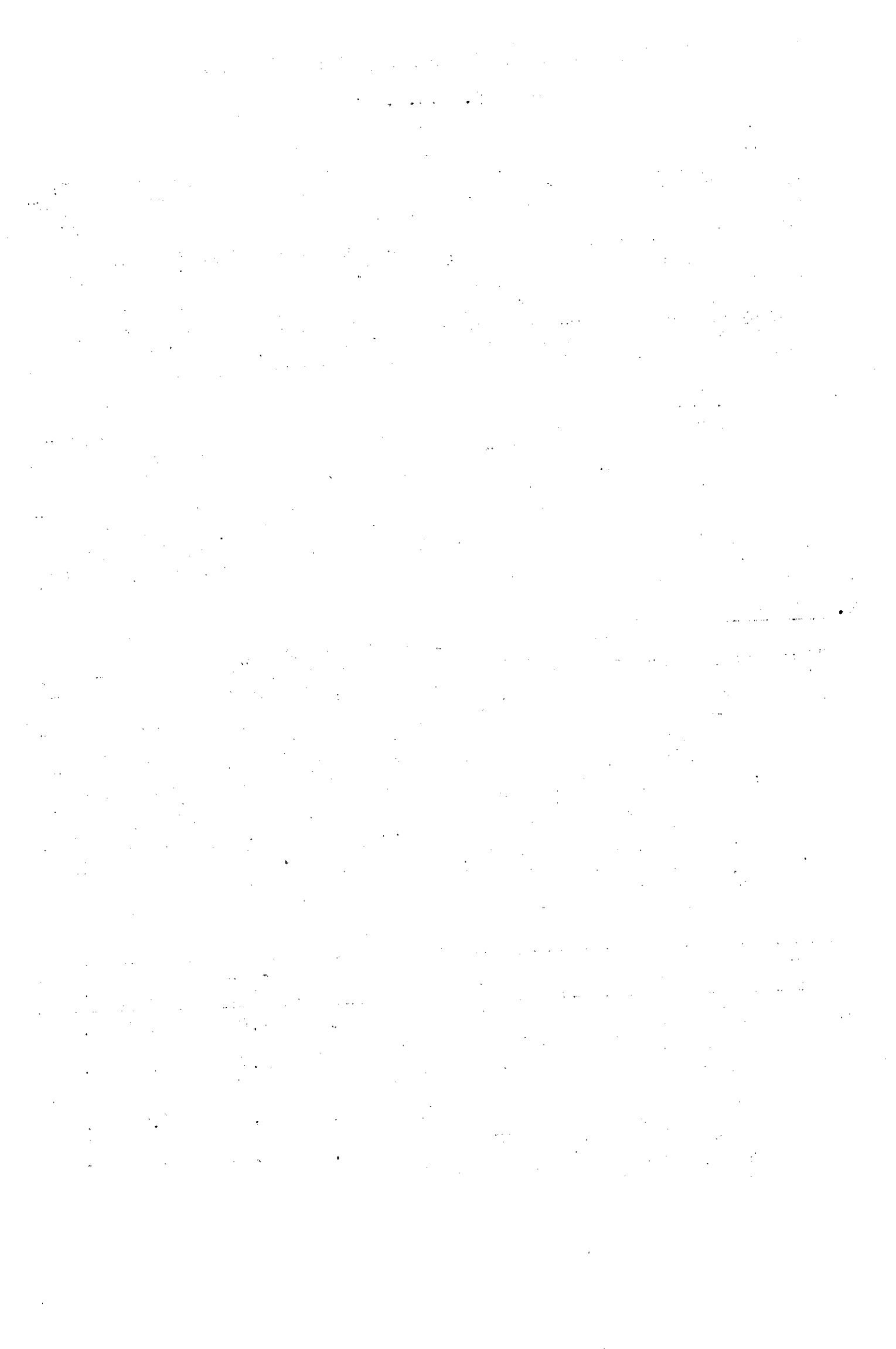
2. Extractie

Voor de extractie van de mono- en disacchariden wordt volgens de literatuur¹⁾ alcohol gebruikt in concentraties variërende van 80-95 %. Hierdoor worden deze van de polysacchariden, die in genoemde alcoholconcentraties onoplosbaar zijn, gescheiden.

Uit onze proeven met vers gras is gebleken, dat soms bij alcoholconcentraties van 80 % nog polysacchariden in oplossing gaan, die dan als disacchariden worden meebepaald (zie Tabel I). Daarom is het wenselijk, voor de extractie geen lagere alcoholconcentratie te gebruiken dan 90 %. Ook met 96 % alcohol werd een volledige extractie van mono- en disacchariden verkregen. Voor een onvolledige extractie met 90 % alcohol behoeft men dus niet bang te zijn. Wanneer in onderstaande tabellen niet anders wordt vermeld, is voor de extractie 90 % alcohol gebruikt. De resultaten zijn gemiddelden van 3 bepalingen, die steeds minder dan 5 % afweken van de gemiddelde waarde.

Tabel I

Mon-ster	Methode van Extractie	Mono-sacch.	Mono-disacch.	Poly-sacch.	Totaal suikers
M	Eerst opgekookt met alcohol dan in de Soxhlet (alcoholconcentratie 80 %)	0.69	2.08	1.37	3.45
M	In autoclaaf en bij 70° C gedroogd met luchtcirculatie dan in de Soxhlet (droogmethode III)	0.63	1.78	1.66	3.38
N	Eerst opgekookt met 96 % alcohol dan in de Soxhlet met 96 % alcohol	0.93	2.10	1.75	3.85
N	In autoclaaf en bij 70° C gedroogd met luchtcirculatie dan in de Soxhlet (droogmethode III)	0.87	2.11	1.72	3.83



- De volgende methoden van extractie werden door ons geprobeerd:
- Vers materiaal 10 minuten uitkoken met alcohol, afkoelen, filtreren en in een gedeelte van het filtraat de mono- en disacchariden bepalen.
 - Het verse materiaal direct in de Soxhlet extraheren.
 - Het verse materiaal opkoken met alcohol, daarna filtreren en residu met filter in de Soxhlet extraheren.
 - Vers materiaal opkoken met alcohol, 8 dagen laten staan en dan in de Soxhlet extraheren.

De resultaten van a, c en d kwamen goed overeen. Methode b was niet geschikt, omdat de eerste porties alcohol die overhevelen waarschijnlijk te veel water bevatten en dus polysacchariden meenemen (tabel II).

Tabel II

Monster	Methode van extractie	Monosacch.	Mono- + disacch.	Polysacch.
P	a	1.03	3.26	3.98
P	b	1.06	3.99	3.14
P	c	1.05	3.28	4.01
Q ^x)	a	0.82	2.85	4.61
Q	b	0.84	4.38	2.85
R	c	1.24	3.17	3.94
R	d	1.23	3.12	3.91

x) Bij monster Q werd uitgegaan van + 10 gram vers materiaal om bij extractie b de invloed van het plantensap te vergroten.

Het toevoegen van calciumcarbonaat om inversie tijdens de extractie te voorkomen bleek niet noodzakelijk. Er werd geen verschil gevonden met de monsters zonder toevoeging (tabel III).

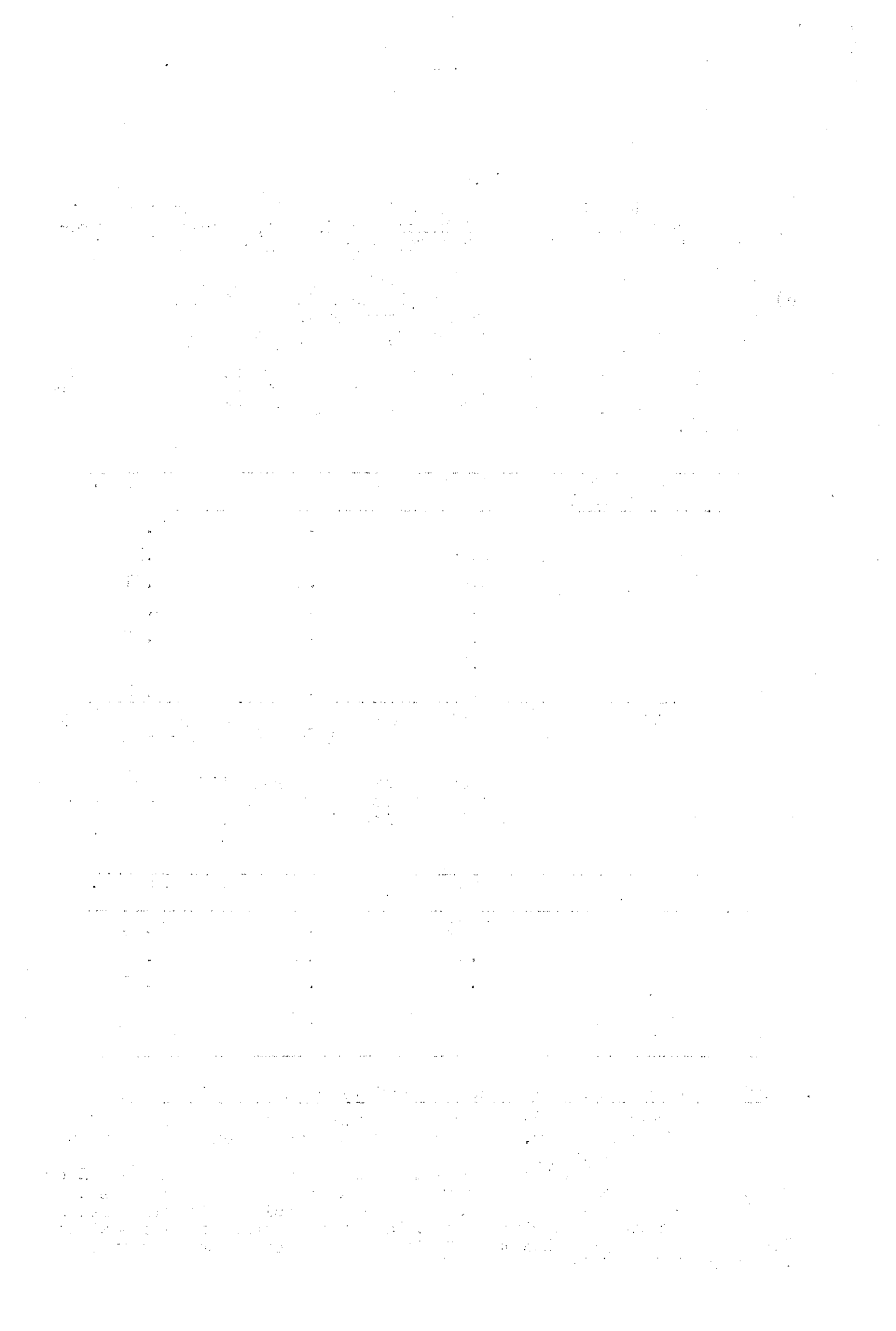
Tabel III

Monster	Methode van extractie	Monosacch.	Mono- + disacch.	Polysacch.
R	c	1.24	3.17	3.94
R	d	1.23	3.12	3.91
R	als c maar met CaCO ₃	1.26	3.22	3.79
R	als d maar met CaCO ₃	1.21	3.07	4.09

3. Verwijderen van de reducerende niet-suikerachtige verbindingen

De reducerende niet-suikerachtige verbindingen werden verwijderd met neutraal loodacetaat. De overmaat loodacetaat werd neergeslagen met sec. natriumphosfaat.

De Man en de Heus¹⁾ passen deze methode van klaren ook toe. Door te klaren met basisch loodacetaat werden lagere gehalten gevonden. Dit kan wijzen op beter klaren, maar ook op precipitatie van suikers door dit alkalische klaringsmiddel. De monsters geklaard met basisch loodacetaat waren zo slecht te filtreren, dat deze methode voor de praktijk niet bruikbaar is (tabel IV).



Tabel IV

Monster	Klaringsmiddel	Monosacch.	Mono- + disacch.	Polysacch.
R	neutraal loodacetaat	1.24	3.17	3.94
R	basisch loodacetaat	1.14	2.97	3.41

4. Inversie van di- en polysacchariden

Hiervoor gebruikten we dezelfde tijd en dezelfde zuurconcentratie als de Man en de Heus¹⁾, nl. 30 minuten bij 100° C in een zwavelzuurconcentratie van 0.05 N.

Er werd geen verschil gevonden met de in andere gevallen op ons Instituut toegepaste inversie van 15 min. bij 100° C met een zwavelzuurconcentratie van 0.2 N (tabel V).

Tabel V

Monster	Inversie	Mono- + disacch.	Polysacch.
P	de Man en de Heus	3.99	4.01
P	C.I.L.O.	3.94	4.03

5. Bepaling van het reducerend vermogen

Het reducerend vermogen werd bepaald volgens de methode van van der Plank²⁾. Deze methode wordt al enige jaren in ons laboratorium toegepast, is zeer nauwkeurig en geschikt voor serie-werk.

6. Drogen van het materiaal

Daar het voor een laboratorium zeer moeilijk is een groot aantal verse monsters direct te verwerken, werd speciale aandacht besteed aan het drogen van het materiaal.

Op 3 manieren is het materiaal gedroogd:

- I. Gedurende 5 à 6 uren bij 105° C in een Inventumstoof zonder kunstmatige luchtcirculatie.
- II. Eerst een half uur bij 105° C daarna bij 70° C zonder kunstmatige luchtcirculatie.
- III. 5 minuten in een metalen doos verhitten in een autoclaaf met een binnentemperatuur van 110° C en daarna 2 uur bij 70° C in een elektrische stoof met luchtcirculatie³⁾.

Methode I

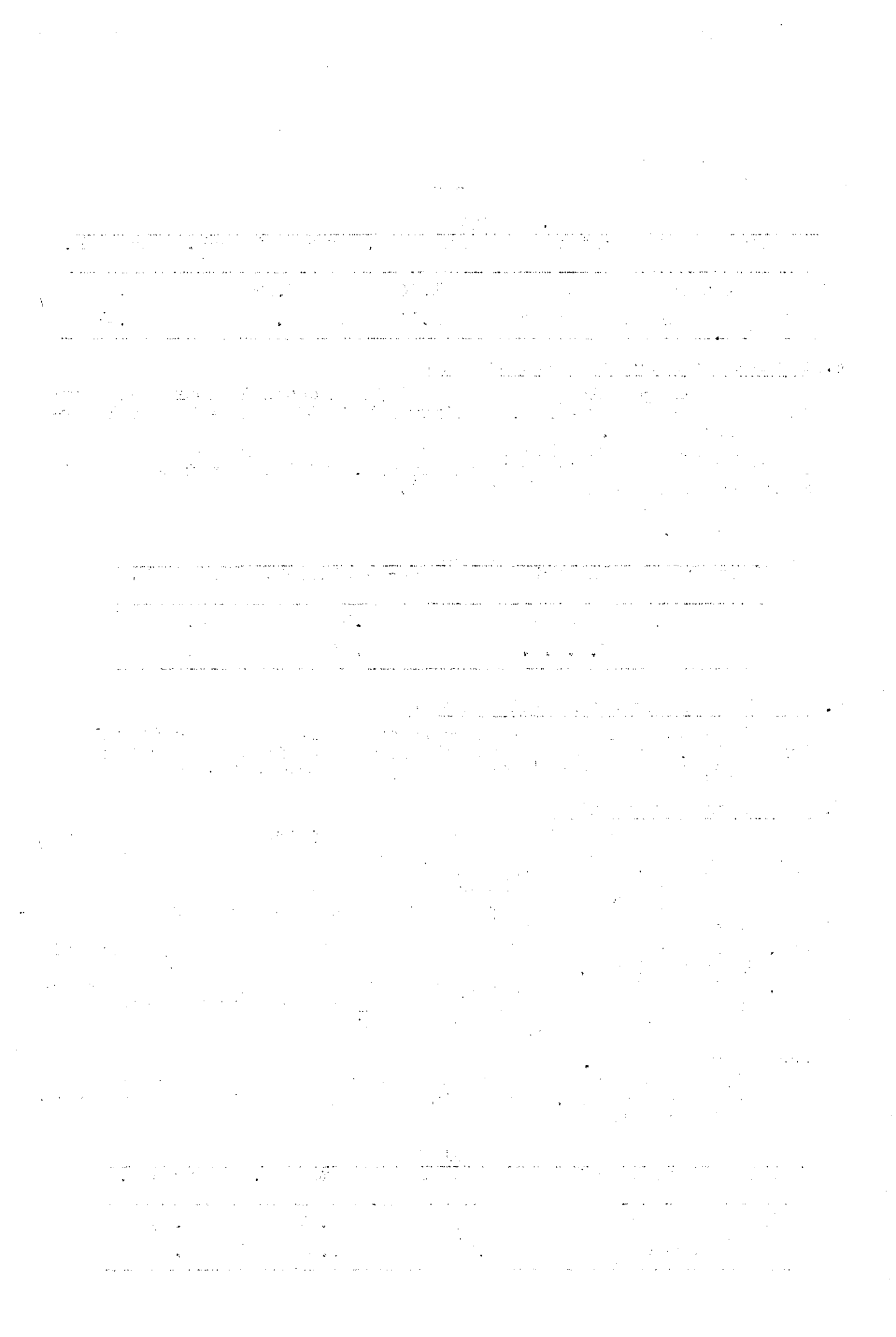
Bij deze droogmethode werd een lager gehalte aan mono- en disacchariden gevonden. Het gehalte aan polysacchariden was niet veranderd (tabel VI).

Tabel VI

Monster	Vorbewerking	Monosacch.	Mono- + disacch.	Polysacch.
R	vers	1.24	3.17	3.94
R	droogmethode I	0.98	2.41	3.87

Methode II

Waarschijnlijk worden bij deze manier van drogen andere koolhydraten omgezet in suikers. De monosacchariden werden steeds hoger gevonden dan in het verse materiaal, terwijl ook het totale suikergehalte in het gedroogde materiaal hoger was dan in het verse (tabel VII).



Tabel VII

Monster	Vorbewerking	Monosacch.	Totaalopl. suiker
S	vers	0.51	8.80
S	droogmethode II	1.12	10.13
T	vers	0.79	5.15
T	droogmethode II	1.19	5.34

Methode III gaf goede overeenstemming met de bepalingen in het verse materiaal verricht (tabel VIII).

Tabel VIII

Monster	Vorbewerking	Mono-sacch.	Mono-+disacch.	Poly-sacch.	Totaalopl. suiker
M	vers	0.69	-	-	3.45
M	droogmethode III	0.63	-	-	3.38
N	vers	0.93	2.10	1.75	3.85
N	droogmethode III	0.87	2.11	1.72	3.83

Voorschrift

Benodigde Reagentia

- Alcohol (90 %)
- Neutraal loodacetaat (40 %)
- Secondair natriumphosfaat (10 %)
- NaOH (+ 1 N)
- H₂SO₄ (10 N)

Oplossingen van van der Plank

- A. 23 gram CuSO₄ - 5 H₂O per liter
- B. 35 gram NaHCO₃ (anhydr) } per liter
- 28 gram Na₂CO₃ (anhydr) }
- 17 gram seignettezout }
- 1 gram kaliumjodaat }
- C. 10 gram K.J. } per liter
- 19 gram kaliumoxalaat }
- D. Zwavelzuur (1 N)
- E. Zetmeeloplossing (500 mg per liter).

Men moet het bicarbonaat afzonderlijk oplossen beneden 25° C en dan deze oplossing voegen bij de oplossing van het carbonaat, tartraat en jodaat, die eveneens in de koude is gemaakt. Vlak voor het gebruik mengt men 2 delen A met 5 delen B. Dit mengsel is oplossing P.

Methode

+ 5 gram vers materiaal wordt in een metalen doos direct gedurende 5 minuten verhit in een autoclaaf met een binnentemperatuur van 110° C. Daarna plaatst men de doosjes gedurende 2 uur in een elektrische droogstoof van 70° C met luchtcirculatie. Wij gebruikten hiervoor de droogkast van de Birmingham & Blackburn Construction Co Ltd. Het zo gedroogde materiaal wordt verkleind, in een filtertje gerold, daarna met 90% alcohol geëxtraheerd in een Soxhletapparaat.

Van het extract wordt de alcohol in vacuo afgedestilleerd en de achtergebleven vloeistof met warm water overgespoeld in een maatkolfje van 100 ml. Na afkoelen en neutraliseren met NaOH wordt geklaard met

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

+ 2 ml neutraal loodacetaat. Men laat de vloeistof een kwartier staan, vult aan en filtreert. Van het filtraat pipetteert men 50 ml xx) in een maatkolfje van 100 ml. Men verwijdert de overmaat loodacetaat met + 2 ml secundair natriumphosfaat, vult aan tot 100 ml en filtreert (opl. X). In oplossing X bepaalt men de monosacchariden volgens van der Plank.

Men pipetteert hiervoor 5 ml opl. X in een pyrex buis (150 bij 32 mm). Hierbij voegt men 5 ml van de van der Plank-oplossing (P). Men schudt om, bedekt de buis met een porceleinen kroesje gevuld met koud water en reduceert precies 15 minuten in een kokend waterbad, waarna men 2 minuten in koud water afkoelt. Nu voegt men eerst 5 ml oplossing C toe, schudt om en dan direct 5 ml oplossing D.

De buizen worden dan 15 minuten in het donker weggezet, waarna men titreert met 0.01 N thio tot lichtgroen (zetmeel als indicator). Men bepaalt de blanco reductie op dezelfde manier, door in plaats van de suikeroplossing 5 ml water toe te voegen.

Het gehalte wordt berekend uit een tabel, gemaakt door van bekende hoeveelheden glucose op bovenstaande manier de reductie te bepalen.

Voor bepaling van de in alcohol oplosbare disacchariden pipetteert men 25 ml van oplossing X in een maatkolfje van 100 ml, voegt 25 ml water toe en na neutralisatie met NaOH t.o.v. phenolphthaleïne 0.25 ml H_2SO_4 (10 N).

² ⁴Men plaatst het kolfje gedurende 30 minuten in een kokend waterbad. Na afkoelen, neutraliseren en aanvullen bepaalt men in 5 ml van de oplossing de mono-plus disacchariden volgens van der Plank.

Het filttertje met residu uit het Soxhlet apparaat wordt een paar minuten in de stoof van 70° C met luchtcirculatie gelegd. Als de alcohol verdampt is, wordt het filttertje met inhoud overgebracht in een kolfje en gedurende 15 minuten gekookt met 100 ml gedestilleerd water. Na afkoelen wordt geneutraliseerd en geklaard. Daarna wordt het volume op 125 ml gebracht. Na een kwartier staan wordt gefiltreerd. In 50 ml van het filtraat wordt de overmaat lood met sec. natriumphosfaat verwijderd. Na aanvullen en filtreren wordt 50 ml geïnverteerd en afge- maakt als boven aangegeven.

Literatuur

1. Fructosans in the monocotyledons. A Review By H.K. Archbold. The New Phytologist Volume 39 (1940) 185-217.
Th. J. de Man and J.G. de Heus. The carbohydrates in grass. (I) The soluble carbohydrates. Rec. trav. Chim. 68 (1949) 43-50.
2. Biochem. Journ. 30 (1936) 457.
3. F.R. Whatley, Lawrence Ordian and Daniel I. Arnon. Plant Physiology 26 (1951) 414-418.

Februari 1953.

xx) De hier aangegeven verdunningen zijn gebaseerd op de suikergehalten van de bovenaardse stengels.

S. 1471

100 ex.

