

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ «БИОХИМИЯ»

Лабораторные работы

Учебное пособие

*Допущено методическим советом Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве учебного пособия для студентов,
обучающихся по направлению «Биология»*

Пермь 2012

УДК 577.1(076)

ББК 28.072

Б - 79

Составители: доценты М.Г. Кусакина, В.И. Суворов, Л.А. Чудинова

Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / сост. М.Г. Кусакина, В.И. Суворов, Л.А. Чудинова; Перм. гос. нац. исслед. ун-т.- Пермь, 2012.- 148 с.

ISBN 978-5-7944-1840-8

Цель пособия – формирование умений и навыков работы с биологическим материалом, освоение методов биохимического анализа, обеспечение фундаментальной подготовки студентов в умении организации экспериментальных исследований в области биохимии.

Рассматривается техника проведения лабораторных работ, устройство типовых приборов и экспериментальных установок, современные методики определения количественного содержания и качественного состава углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот, органических кислот и минеральных элементов.

Предназначено для студентов биологического факультета университета, обучающихся по направлению 020400 Биология, профилю Биохимия, квалификации бакалавр.

Табл.24 ..Библиогр. 15 назв.

УДК 577.1(076)

ББК 28.072

Печатается по решению редакционно-издательского совета Пермского государственного национального исследовательского университета

Рецензенты:

д-р биол наук, проф. **Н.Л. Колясникова** (Перм. гос.с.-х. академия)

канд. биол. наук **В.Б. Марценюк** (Перм. гос. фарм. Академия)

ISBN 978-5-7944-1840-8

Кусакина М.Г., Суворов В.И.,
Чудинова Л.А, составление,
2012

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
РАЗДЕЛ 1. БЕЛКИ И ДРУГИЕ АЗОТСОДЕЖАЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ.....	5
Определение общего азота (по Кьельдалю).....	5
Определение белкового и небелкового азота в растениях (по Барншетйну).....	7
Определение фракционного состава белковых веществ в растениях.....	8
Определение содержания белка биуретовым методом.....	11
Количественное определения белка по методу Лоури.....	11
Определение белка в растениях с помощью красителя амидо- черного.....	12
Спектрофотометрическое определение белка по методу V. F. Kalb, R. W. Bernlohr.....	13
Спектрофотометрический метод определения белка.....	14
Определение азота нитритов.....	14
Определение аминного азота медным способом.....	16
РАЗДЕЛ 2. УГЛЕВОДЫ.....	18
Определение сахаров по Бертрану.....	19
Определение фруктозы по Кольтгофу.....	22
Фотометрический метод определения глюкозы по Вознесенскому.....	24
Ускоренный полумикрометод определения суммы растворимых сахаров (по Дюбойсу).....	25
Определения растворимых сахаров методом Хагедорна–Иенсена.....	26
Определение состава сахаров методом хроматографии на бумаге.....	28
Определения крахмала фотоэлектроколориметрическим методом.....	33
Определение клетчатки по методу Кюршнера и Хафера в модификации А. И. Ермакова.....	34
Определение пектиновых веществ по пектату кальция.....	35
РАЗДЕЛ 3. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ДРУГИЕ ФОСФОРСОДЕРЖАЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ.....	38
Определение общего фосфора методом Дениже.....	38
Определение фракционного состава фосфорных соединений.....	40
Определение содержания фитина в семенах растений.....	42
Спектрофотометрическое определение нуклеиновых кислот по пуринам...	42
Раздельное определение нуклеиновых кислот по пуринам.....	45
Спектрофотометрическое определение нуклеиновых кислот методом Волгина и Партье.....	48
Количественное определение нуклеиновых кислот по пентозам.....	50
Характеристика вторичной структуры нуклеиновых кислот по гиперхромному эффекту.....	52
Определение нуклеотидного состава ДНК методом бумажной	

хроматографии	53
Электрофорез нуклеиновых кислот	56
РАЗДЕЛ 4. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ	
Определение титруемых кислот (общей кислотности)	58
Определение лимонной кислоты	60
Определение щавелевой кислоты	61
Определение яблочной и лимонной кислот с применением трилона Б	62
Определение янтарной кислоты	65
Определение винной кислоты	66
Определение пировиноградной кислоты	67
Определение органических кислот методом ионного обмена и хроматографии на бумаге	68
Определение пролина в растениях	73
РАЗДЕЛ 5. НЕОГРАНИЧЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	75
Определение золы в растениях	76
Определение полуторных окислов железа и алюминия	76
Определение кальция в растениях объемным методом	77
Определение магния	79
Комплексометрическое определение содержания ионов кальция и магния в одной пробе растений	80
Определение калия кобальтнитритным методом	81
Определение кремниевой кислоты	83
Определение калия и натрия в растениях методом пламенной фотометрии	83
Определение свободного натрия в растениях	84
Определение ионов серной кислоты	85
Микроопределение серы в растительном материале	86
Определение содержания ионов хлора по методу Шестакова и Качеева	87
Определение содержания свободного хлора в растениях меркурометрическим методом	88
ПРИЛОЖЕНИЕ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия – важнейшая дисциплина в биологическом образовании. Биохимия изучает химические соединения, входящие в состав живых клеток, и те изменения, которые с ними происходят в процессе жизнедеятельности. Биохимия – это наука о молекулярных основах жизни.

В связи с этим различают статическую и динамическую биохимию, которые, однако, тесно связаны друг с другом.

Главная задача, стоящая перед современной биохимией, заключается в том, чтобы определить, каким образом неживые молекулы, составляющие живые организмы, взаимодействуют друг с другом, поддерживая живое состояние и обеспечивая его воспроизведение. Биохимия рассматривает химическое строение того или иного компонента живых клеток в первую очередь в связи с выполняемой им функцией в обмене веществ. Этим она принципиально отличается от химии природных соединений и именно поэтому является неотъемлемой частью биологии.

В последнее время достигнуты большие успехи в области аналитической химии, физики и биологии, что нашло отражение в методах проведения биохимических исследований, повысилась их производительность и точность.

В пособие представлены классические биохимические методы количественного и качественного изучения внутриклеточных веществ (спектроскопия, пламенная фотометрия, хроматография, электрофорез, ферментативный анализ и др.). Учебное пособие написано на основе отечественных и зарубежных публикаций. В некоторые методики внесены авторские модификации. При описании работ приводятся краткие теоретические сведения.

Все представленные работы многократно выполнялись студентами. Использование малодоступного оборудования и реактивов сведено к минимуму. Лабораторные работы представлены по следующим разделам биохимии: углеводы, белки, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные органические соединения, неорганические соединения.

Лабораторный практикум поможет студентам приобрести необходимые умения и навыки работы в области биохимического анализа, которые в дальнейшем могут использоваться при выполнении выпускных экспериментальных работ по направлению Биология (профиль биохимия), квалификации бакалавр.

РАЗДЕЛ 1

БЕЛКИ И ДРУГИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Азот входит в состав белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коэнзимов, хлорофилла, фитогормонов (ауксина, цитокинина) и других соединений.

Растительные клетки в своем составе имеют три фракции веществ, содержащих азот, – неорганический азот (NO_3^- , NH_4^+), низкомолекулярные (аминокислоты, амиды, азотистые основания) и высокомолекулярные (белки, нуклеиновые кислоты) органические формы азота. Все эти фракции веществ, включающие в свой состав азот, находятся в определенном равновесии между собой.

В зеленых растениях белковый азот – основная азотсодержащая фракция, составляющая 80–95 %, доля нуклеиновых кислот – около 10 %, аминокислот и амидов – 5 % суммарного азота, присутствующего в растительном материале.

Биосинтез белка в растениях является сложным, многоступенчатым процессом, требующим наличия источника энергии и участия многих ферментов и отдельных структур клетки. По функциональным признакам выделяют конститутивные, каталитические и запасные белки.

В вегетативных частях растений белки представлены главным образом ферментами, тогда как в семенах основная часть белковой фракции приходится на запасные белки. Биологическая ценность белка зависит от его сбалансированности по аминокислотному составу.

Отдельные белковые фракции являются генетическими маркерами, связанными с определенными биологическими свойствами (холодо- и морозоустойчивость, устойчивость к возбудителям болезней), хозяйственно ценными признаками (качество клейковины, хлебопекарные и технологические свойства).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА (ПО КЪЕЛЬДАЛЮ)

Метод основан на минерализации растительного материала при нагревании с крепкой серной кислотой в присутствии катализаторов.

Азот белковых и других веществ отщепляется в виде аммиака и сохраняется в растворе, так как, реагируя с избытком серной кислоты, переходит в аммиачную соль этой кислоты.

Из сернокислой соли аммиак вытесняется щелочью и отгоняется в точно отмеренное количество титрованной 0,1 н. серной кислоты. Оттитровывают его 0,1 н. раствором щелочи. По выделившемуся аммиаку определяют количество азота.

Реактивы

- 1) серная кислота концентрированная;
- 2) селеновый катализатор (готовят растиранием и смешиванием 100 г сернокислого калия (K_2SO_4), 10 г сернокислой меди (CuSO_4) и 2 г селена);

- 3) смешанный индикатор: 30 мг метиленовой сини растворяют в 20 мл 95 % этилового спирта, 66 мг метилового красного растворяют в 50 мл 95 %-го этилового спирта, растворы индикаторов сливают вместе. В кислом растворе индикатор дает красно-фиолетовое окрашивание, в щелочном – зеленое;
- 4) фенолфталеин (50 мг индикатора растворяют в 50 мл 60 %-го этилового спирта);
- 5) едкий натр (NaOH) – 40 %-й раствор;
- 6) едкий натр (NaOH) – 0,1 н. раствор; 7) серная кислота (H₂SO₄) – 0,1 н. раствор.

Определение титра 0,1 н. NaOH по янтарной кислоте

Берут 3–4 навески янтарной кислоты по 0,20–0,25 г, предварительно высушенной в сушильном шкафу при 100°C в течение 2 ч. Навески переносят в конические колбы и растворяют в 50 мл дистиллированной воды, затем прибавляют 2–4 капли фенолфталеина и титруют раствором 0,1 н. NaOH до появления не исчезающей в течение 1 мин розовой окраски.

$$T_{NaOH} = \frac{a}{X \cdot 0,0059}, \text{ где}$$

а – вес навески янтарной кислоты, г;

X – объем 0,1 н. NaOH, пошедшей на титрование, мл;

0,0059 – количество янтарной кислоты, соответствующее 1 мл точно 0,1 н. раствора NaOH, г.

Определения титра 0,1 н. серной кислоты по титрованному раствору NaOH

В три колбы наливают по 25 мл 0,1 н. раствора NaOH, приливают 2 капли смешанного индикатора и титруют 0,1 н. раствором серной кислоты до перехода зеленого окрашивания в фиолетовое.

$$T_{H_2SO_4} = \frac{X \cdot T_{NaOH}}{Y}, \text{ где}$$

X – объем 0,1 н. NaOH, взятый для титрования, мл;

T_{NaOH} – титр 0,1 н. раствора NaOH;

Y – объем 0,1 н. серной кислоты, израсходованной на титрование, мл.

Ход работы

Взвешивают навеску 0,5–1,0 г тонко размолотого сухого материала и помещают в колбу Къельдаля. Навеску вещества можно взвешивать в сухой длинной пробирке, которая затем вводится в колбу Къельдаля, навеска высыпается таким образом, чтобы не загрязнить горла колбы.

В колбу Къельдаля приливают 15 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 4 г селенового катализатора (для повышения температуры сжигания). Далее колбу ставят на плитку в вытяжном шкафу. Колбу Къельдаля постепенно нагревают и содержимое доводят до кипения. При образовании пены в период окисления рекомендуется снять колбу с нагревателя и дать пене осесть, а потом снова нагреть, не допуская попадания пены в горло колбы.

Нагревание продолжают до полного просветления жадности, исчезновения бурой и появления чисто зеленой окраски от меди.

Отгонка аммиака: колбу после полного сжигания материала снимают с нагревателя, охлаждают и содержимое осторожно по каплям разбавляют дистиллированной водой примерно до 1/3 объема колбы. Затем содержимое переносится в колбу для отгонки, при этом колба для сжигания споласкивается несколько раз небольшими порциями воды, которые переносятся в колбу для отгона. Далее прибавляют несколько капель смешанного индикатора для наблюдения перехода реакции кислой в щелочную и колбу присоединяют к перегонному аппарату.

Приемную колбу с 20–30 мл титрованной 0,1 н. серной кислоты с несколькими каплями индикатора подставляют к холодильнику таким образом, чтобы конец холодильника трубки был погружен в жидкость.

Через воронку отгоночного аппарата сливают 50 мл 40 %-й NaOH и начинают отгонку аммиака, пропуская пар из парообразователя. При этом необходимо отметить, что в отгоночной колбе произошел переход реакции среды из кислой в щелочную, что отмечается переходом окраски индикатора из красно-фиолетовой сначала в зеленую, а затем в коричневую. Только в условиях щелочной среды происходит отгонка аммиака. Если окраска индикатора не изменилась, то следует добавить 5–10 мл 40 %-й NaOH.

При нормальном кипении через 15 мин, когда отгонится примерно 70–90 % всего аммиака, трубку холодильника поднимают несколько выше уровня кислоты в приемной колбе и продолжают отгонку еще 5 мин.

После отгонки конец трубки обмывают дистиллированной водой. Затем в приемную колбу прибавляют еще 4–5 капель индикатора и оттитровывают остаток серной кислоты 0,1 н, раствором NaOH. Во время титрования при переходе реакции из кислой в щелочную меняется цвет индикатора (метилрот с метилблау – из красно-фиолетового через бесцветный в изумрудный).

Вычисление результатов: титр серной кислоты выражают в мг азота, где 1 мл 0,1 н. H_2SO_4 соответствует 1,42 мг азота. Количество серной кислоты, пошедшей на связывание выделившегося аммиака, составит

$$X = a \cdot T_{H_2SO_4} - b \cdot T_{NaOH}, \text{ где}$$

a – объем 0,1 н. серной кислоты, взятой в приемный стакан, мл;

b – объем 0,1 н. NaOH, пошедшей на титрование, мл;

T – титры, $X \cdot 1,42 = \text{мг азота}$ взятой пробы.

Содержание азота выразить в процентах на сухую массу.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО И НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА В РАСТЕНИЯХ (ПО БАРНШТЕЙНУ)

Белковые вещества способны переходить в нерастворимое состояние и тем отделяться от других азотистых веществ растений. Осаждение белков основано на свойстве их осаждаться в водных растворах гидратом окиси меди при избытке в растворе $CuSO_4$. Отмытый от солей и растворимых азотистых

веществ осадок белка сжигается с серной кислотой по методу Кьельдаля с последующим отгоном азота в виде аммиака и определением его путем связывания серной кислотой. Найденное количество азота пересчитывается на белок.

Реактивы

- 1) 6%-й раствор медного купороса ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- 2) 1,25%-й раствор едкого натра (NaOH);
- 3) 5%-й раствор хлористого бария (BaCl_2).

Ход работы

1,0 г мелко размолотого вещества помещают в химический стакан на 100–150 мл, размешивают в 50 мл горячей дистиллированной воды и нагревают до кипения. Если анализируется вещество, богатое крахмалом, то во избежание клейстеризации навеску кипятить нельзя. В этом случае ограничиваются 10-минутным нагреванием на водяной бане при 50°C . Не охлаждая содержимого стакана, прибавляют в него 25 мл 6 %-го раствора CuSO_4 . Затем при помешивании порциями туда же приливают 25 мл 1,15 %-го раствора едкого натра. Образуется основная соль сернокислой меди – $\text{CuSO}_4 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$.

В стакане выпадает осадок комплекса белковых молекул и меди. Пока он отстаивается (не менее 1 ч), приготавливают фильтрование. Берут коническую колбу на 250 мл и вставляют в воронку с беззольным фильтром. Отстоявшуюся над осадком жидкость сливают на фильтр по стеклянной палочке, а осадок промывают в стакане несколько раз горячей водой. Затем осадок без потерь переносят на фильтр и продолжают промывание теплой водой до тех пор, пока последняя проба не перестанет давать муть с хлористым барием. Это реакция на ион серной кислоты медного купороса и одновременное испытание на полноту отмывания небелковых азотистых веществ.

Фильтр вместе с воронкой помещают в термостат и сушат при $50\text{--}60^\circ\text{C}$ до тех пор, пока бумага не будет легко сниматься с воронки (1–2 ч). Тогда фильтр с осадком переносят без потерь в колбу Кьельдаля. Приливают 15 мл концентрированной серной кислоты и катализатор. Сжигают и отгоняют азот так же, как при определении общего азота.

Содержание белкового азота рассчитывают аналогичным образом, как и в случае определения общего азота. В фильтрате и промывных водах определяют небелковый азот. Промывные воды вместе с фильтратом сгущают на кипящей водяной бане и определяют азот по Кьельдалю.

Если известно общее содержание азота в материале, можно ограничиться определением азота или в осадке, или в фильтрате и по разнице между общим азотом и азотом, найденным в осадке или в фильтрате, судят о количестве белкового и небелкового азота.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Все известные белки делятся на две группы: простые белки – протеины,

состоящие только из аминокислот, и сложные белки – протеиды, состоящие из простых белков в соединении с различными небелковыми группами.

Простые белки по их отношению к растворителям – воде, спирту и разбавленным растворам солей, кислот и щелочей – также делятся на группы.

Альбумины – хорошо растворимы в воде, в растворах солей, кислот и щелочей. Эти белки, составляют основную массу белков протоплазмы клеток.

Глобулины – плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в слабых растворах солей, в разведенных растворах кислот и щелочей. Из глобулинов состоит основная масса белков семян.

Проламины (глиадины) – нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в 70–80%-м этиловом спирте, разбавленных кислотах и щелочах. Содержат большое количество глутаминовой кислоты и пролина. Находятся в зернах злаков.

Глютелины – нерастворимы в воде и нейтральных растворах солей, но легко растворяются в разбавленных щелочах и кислотах. Содержатся в злаках.

Определение содержания различных групп белковых веществ дает возможность характеризовать биохимические процессы, связанные с превращением белковых веществ в ходе роста и развития растений под влиянием различных факторов.

Реактивы

- 1) 5%-й раствор K_2SO_4 ;
- 2) 75%-й раствор C_2H_5OH ;
- 3) 0,2%-й раствор KOH ; 4) все реактивы, необходимые для определения общего азота (см. метод Кьельдаля).

Ход работы

Берут навеску по 2–4 г тонко измельченной муки и переносят в центрифужные пробирки. Заливают 8 мл 5%-го раствора K_2SO_4 и очень тщательно размешивают стеклянной палочкой. Пробирки закрывают пробками и встряхивают 15 мин. Затем центрифугируют 10 мин при 3–5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в колбу Кьельдаля, осадок вновь заливают 8 мл 5%-го раствора K_2SO_4 , перемешивают, взбалтывают и вновь центрифугируют. Экстракт сливают в ту же колбу Кьельдаля. Также делают 3-й раз. Затем в колбу Кьельдаля приливают 10 мл концентрированной серной кислоты, 2 г смешанного катализатора, 1 мл этилового спирта. Колбу закрывают колпачком и ставят на сжигание на электроплитку. Сжигают и отгоняют азот также, как при определении общего азота. Это солерастворимая фракция белков.

После извлечения первой фракции в центрифужную пробирку с осадком добавляют 8 мл 75 %-го спирта, перемешивают и взбалтывают 15 мин. Затем центрифугируют 10 мин при 3–5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в другую колбу Кьельдаля. Это повторяют 3 раза. Колбу ставят на кипящую водяную баню без колпачка для выпаривания спирта на 3–4 ч. Затем в колбу добавляют 10 мл серной кислоты, 1 мл спирта и 2 г смешанного катализатора. Потом сжигают и отгоняют азот, как при определении общего азота. Это

спирторастворимая фракция.

Для определения щелочерастворимых белков пользуются 0,2 %-м раствором щелочи. После солевого извлечения экстрагируют раствором щелочи, чтобы извлечь глобулины.

Осадок в центрифужной пробирке заливают 8 мл 0,2 %-го раствора KOH, перемешивают стеклянной палочкой, закрывают пробками и встряхивают 15 мин. Затем центрифугируют 10 мин при 3–5 тыс. об/мин и экстракт сливают в колбу Кьельдаля. Так повторяют 3 раза, затем в колбу добавляют 10 мл серной кислоты, 1 мл спирта и 2 г катализатора, сжигают и отгоняют азот также, как при определении общего азота по Кьельдалю.

Пример расчета: предположим, что при отгонке аммиака для солерастворимой фракции в стакан для отгона брали 30 мл 0,1 н. серной кислоты; 30 мл титрованной серной кислоты, умноженных на титр H_2SO_4 , – количество NaOH, пошедшей на титрование 0,1 н. NaOH и умноженное на титр 0,1 н. NaOH. Получаем разницу – количество связанной 0,1 н. серной кислоты аммиаком. Известно, что 1 мл 0,1 н. серной кислоты соответствует 1,42 мг азота. Умножаем разницу на 1,52 и получаем количество азота в пробе. Рассчитываем на 1 г навески и выражаем в процентах. Далее умножая на соответствующий коэффициент, определяют содержание белка в процентах. Такие расчеты производят для каждой фракции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

Количественное определение белка основано на измерении интенсивности окраски, получаемой в результате реакций серноокислой меди в щелочной среде с пептидными связями белка ($-CO-NH-$). Интенсивность окраски коррелирует с содержанием белка в растворе.

Реактивы

- 1) раствор мочевины: к 75 г мочевины добавляют кусочек тимола объемом примерно 3 куб. мм, приливают 200 мл воды и смесь нагревают для растворения мочевины. Далее добавляют 0,8 г активированного угля, все содержимое тщательно перемешивают и фильтруют а мерную колбу на 250 мл, объем доводят до метки дистиллированной водой;
- 2) биуретовый реактив: к 100 мл 0,2 н. раствора NaOH добавляют 2,25 г калия-натрия виннокислого, после растворения добавляют 1,25 г йодистого калия и объем доводят до 250 мл 0,2 н. раствором NaOH.

Ход работы

В пробирки наливают 0,2 мл белкового раствора, 4,8 мл раствора мочевины, 10 мин выдерживают и после этого добавляют 5 мл биуретового реактива. Смесь тщательно перемешивают, и пробирки помещают в водяную баню с температурой $40^{\circ}C$ на 10 мин. Температура водяной бани должна быть $40^{\circ} \pm 3^{\circ}C$, при более высокой температуре происходит восстановление биуретового реактива. Через 2 мин после выдерживания на бане раствор

колориметрируют при 545 нм (зеленый светофильтр ФЭКа). В ходе определения можно брать меньше или больше 0,2 мл белкового раствора, но необходимо доводить раствором мочевины до 5 мл.

Биуретовый метод позволяет определить белок в растворах с концентрацией от 0,04 до 1,6 мг белка в реакционной смеси (или соответственно от 0,2 до 8 мг в 1 мл).

Приготовление вытяжки: для приготовления белкового раствора размельченная навеска 200 мг семян обрабатывается 5 мл 0,2 н. раствором NaOH, приготовленного на 20 %-м спирте в центрифужной пробирке в течение 30 мин. После центрифугирования осадок вновь обрабатывается 5 мл этого же раствора в течение 10 мин. Центрифугируется, и все надосадочные жидкости объединяют. Для определения содержания белка берут 0,2 мл вытяжки.

Построение калибровочной кривой: количество белка высчитывают на основании предварительно составленной калибровочной кривой по белку альбумину. Для этого готовят водные растворы с содержанием 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мг белка в 10 мл раствора.

Готовят исходный раствор: 1 г альбумина растворяют в 100 мл воды, в 10 мл данного раствора содержится 100 мг белка.

- 1) 10 мл исходного раствора содержат 100 мг белка;
- 2) 8 мл "-" + 2 мл H₂O содержат 80 мг белка в 10 мл раствора;
- 3) 6 мл "-" + 4 мл "-" 60 мг "-";
- 4) 4 мл "-" + 6 мл "-" 40 мг "-";
- 5) 2 мл "-" + 8 мл "-" 20 мг "-";
- 6) 1 мл "-" + 9 мл "-" 10 мг "-";
- 7) 0,5 мл "-" + 9,5 мл "-" 5 мг "-".

Для построения калибровочной кривой из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,2 мл, добавляют 4,8 мл раствора мочевины, выдерживают 10 мин и добавляют 5 мл биуретового реактива, дальше поступают так и, как при определении содержания белка в вытяжке (см.ход анализа). Количество белка рассчитывают в мкг / мл.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ ЛОУРИ

Метод основан на колориметрировании синей окраски, возникающей при взаимодействии белков со смесью, состоящей из щелочного раствора меди и реактива Фолина. Метод применяют для определения белка в растворах с концентрацией от 10 до 100 мкг/мл.

Реактивы

- 1) 2 %-й раствор Na₂CO₃ в 0,1 н. растворе NaOH;
- 2) 0,5 %-й раствор CuSO₄·5H₂O в 1 %-м растворе двузамещенного виннокислого натрия или калия (1 г соли растворяют в 30 мл H₂O, добавляют 0,5 г CuSO₄·5H₂O и объем доводят до 100 мл дистиллированной водой);
- 3) реактив Фолина: в колбу на 2 л вносят 100 г вольфрамата натрия и 25 г молибдата натрия, растворяют в 700 мл воды. К смеси добавляют 50 мл 85 %-

го раствора H_3PO_4 и 100 мл концентрированной HCl . Смесь кипятят с обратным холодильником 10 ч (не слишком сильно). Затем добавляют в колбу 150 г сульфата лития, 50 мл воды и 5 капель брома. Для удаления избытка брома смесь кипятят без холодильника под тягой. После охлаждения объем смеси доводят до литра, фильтруют и хранят в темной склянке на холоду в течение длительного времени.

Для анализа используется реактив Фолина, примерно 1 н. по кислоте. Поэтому 1–2 мл раствора переносят в колбу для титрования, добавляют 30 мл H_2O , 2 капли спиртового раствора фенолфталеина и титруют раствор 0,1 н. NaOH до слаборозовой окраски. Исходя из результатов титрования реактив разбавляют дистиллированной водой так, чтобы кислотность была равна 1 н. (обычно в 1,5–2 раза). Для анализа и построения калибровочной кривой следует использовать реактив Фолина, разбавленный одинаково. 4) смесь 1 и 2-го реактивов в соотношении 50:1. Смешивание производят перед определением. На следующий день после определения этот реактив не годится.

Приготовление вытяжки: для приготовления раствора белков размельченная навеска 200 мг семян обрабатывается 5 мл 0,1 н. раствора NaOH , приготовленного на 20 %-м спирте в центрифужной пробирке в течение 30 мин на центрифуге. После центрифугирования осадок вновь обрабатывается 5 мл этого же раствора в течение 30 мин. Надосадочные жидкости объединяют и используют для определения содержания белка.

Ход работы

Берут 1 мл вытяжки, добавляют 5 мл 0,5 %-го раствора CuSO_4 (смесь 1 и 2-го реактивов в соотношении 50:1), перемешивают и выдерживают 10 мин. Затем к смеси приливают 0,5 мл рабочего раствора Фолина. Выдерживают 30 мин и определяют интенсивность окраски на фотоколориметре с красным светофильтром (или на спектрофотометре при 750 нм). Количество белка в растворе находят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: навеску чистого белка (кристаллического альбумина, сывороточного γ -глобулина) в 20 мг растворяют в 100 мл 0,1 н. NaOH . Для полного растворения белка нагревать его в течение 15 мин на кипящей водяной бане.

1 мл данного раствора содержит 200 γ белка. Для построения калибровочного графика из исходного раствора готовят растворы, содержащие в 1 мл 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 и 10 γ . Берут по 1 мл исследуемых растворов, добавляют 5 мл раствора сернокислой меди и выдерживают 10 мин. Затем к смеси приливают 0,5 мл рабочего раствора Фолина и дальше ведут анализ так же, как при определении содержания белка в вытяжке (см. ход анализа). Количество белка рассчитывают в мкг/мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В РАСТЕНИЯХ С ПОМОЩЬЮ КРАСИТЕЛЯ АМИДО-ЧЕРНОГО

В последние годы разрабатываются новые методы количественного определения белков, основанные на взаимодействии амино-группы белка с сульфогруппой красителя. Наиболее часто применяется амидо-черный 10 В. Он осаждает белки почти сразу и позволяет количественно измерять появление даже небольшой разницы в окраске надосадочной жидкости по сравнению с контролем. При этом амидо-черный 10 В не осаждается свободными аминокислотами и полифенолами. Мочевина, нуклеиновые кислоты, неорганические соли не мешают определению.

При количественном определении белка краситель связывается и осаждается совместно с белками. При этом количество его в растворе уменьшается прямо пропорционально концентрации белка. Измерив уменьшение экстинкции (оптической плотности), вычисляют содержание белка в растворе. Более высокая точность достигается при растворении осадка с последующим спектрофотометрированием.

Ход работы

Для получения гомогената 0,5 г растительных тканей тщательно растирают с 5 мл воды. К готовому гомогенату добавляют 5-45 мл (в зависимости от содержания белка) воды. Для анализа берут по 1 мл гомогената и приливают 2 мл осаждающего реагента (осаждающий реагент состоит из 37,65 г лимонной кислоты, 1,136 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,6 г амидо-черного 10 В и бидистиллированной воды до 1 л). После перемешивания смесь оставляют на 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют 15 мин при 6000 об/мин. 1 мл надосадочной жидкости переносят в мерную колбу на 25 мл, доводят водой до метки и определяют оптическую плотность раствора на ФЭКе с красным светофильтром или на спектрофотометре при 615 нм.

Построение калибровочной кривой: готовят исходный раствор, растворяя 150 мг бычьего альбумина в 100 мл воды. В 1 мл этого раствора разбавлением готовят растворы с концентрацией 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 мг/мл. Берут 1 мл раствора белка и приливают по 2 мл осаждающего реагента и дальше работают, как и с опытными вариантами. После измерения оптической плотности строят калибровочную кривую, откладывая на оси ординат концентрацию.

Содержание белка X (в $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot B}{A}, \text{ где}$$

A – вес навески, г;

B – объем гомогената, мл;

C – концентрация белка по калибровочной кривой, мг/мл.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ V. F. Kalb, R. W. Bernlohr

10 мг сухой навески растирают в фарфоровой ступке с 1 мл

дистиллированной воды в течение 10 мин. Затем добавляют еще 9 мл воды (объем доводят до 10 мл). Переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 15 мин при 6000 об/мин (предварительно уравнив пробирки путем взвешивания на технотехнических весах).

Оптическую плотность центрифугатов определяют на спектрофотометре при двух длинах волн: 230 и 260 нм. Содержание белка рассчитывают по уравнению

$$X = 183 \cdot OD_{230\text{нм}} - 75,8 \cdot OD_{260\text{нм}}, \text{ где}$$

X – содержание белка в микрограммах на 10 мл.

По чувствительности данный метод аналогичен методу Лоури, но более быстрый.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

Спектрофотометрический метод определения белка основан на способности ароматических кислот (аминокислот: триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при 280 нм. Измеряя величину оптической плотности при этой длине волны находят количество белка в растворе. Поскольку белки отличаются разным числом ароматических аминокислот, то поглощение одним и тем же количеством белка у них неодинаково. Условно считают, что при концентрации "усредненного" белка в растворе, равной 1 мг/мл, величина оптической плотности при 280 нм равна 1,0 (при толщине слоя жидкости в 1 см).

Определению белка данным методом мешает присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Измеряя оптическую плотность одного и того же раствора при 260 нм (для учета поглощения соединений нуклеотидной природы) и 280 нм, содержание белка рассчитывают с помощью номограммы: экспериментально полученные величины оптической плотности при 260 и 280 нм находят в соответствующих столбцах номограммы и соединяют их прямой линией; точка пересечения этой прямой со шкалой, на которой дана концентрация белка, определяет содержание белка в исследуемом растворе.

Содержание белка можно найти по формуле Калькара на основе данных определения оптической плотности при 280 и 260 нм. Содержание белка, мг/мл, вычисляется по Формуле

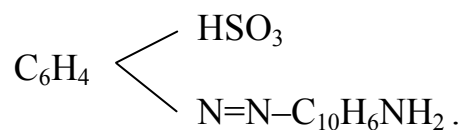
$$X = 1,45 \cdot D_{280} - 0,74 \cdot D_{260}$$

Метод спектрофотометрического определения белка широко используется при работе с индивидуальными белками.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА НИТРИТОВ

Метод определения нитритов основан на образовании из сульфаниловой кислоты, α - нафтиламина и нитритов азосоединения, окрашенного в розовый

цвет. Реакция идет в две стадии. Вначале сульфаниловая кислота, взаимодействуя с NHO_2 , дает диазосоединение, которое затем в реакции с α -нафтиламином превращается в конечный продукт:



Линейная зависимость между интенсивностью окраски и содержанием иона NO_2^- сохраняется при содержании в литре раствора до 2 мг азота нитритов.

Оптическую плотность окрашенных растворов определяют на ФЭКе, используя синий светофильтр. Измерять следует всегда через равные промежутки времени после прибавления реактива Грисса. Окраска развивается довольно медленно и в то же время при стоянии раствора исчезает.

Ход работы

Для определения азота NO_2^- 0,5–2 г растительного материала растирают в фарфоровой ступке с точно измеренным количеством (10–20 мл) дистиллированной воды, 5 мин настаивают и фильтруют через сухой плотный фильтр. После этого 5–15 мл прозрачного бесцветного фильтрата вносят пипеткой в мерную колбу на 50 мл (25 мл), туда же добавляют 8 мл (4 мл) нитритного реактива и доливают дистиллированной водой до метки. Колориметрируют через 15–20 мин. Концентрацию азота нитритов в пробе рассчитывают по калибровочной кривой. Для построения последней используют дважды перекристаллизованный нитрит натрия, который сушат до постоянной массы при 85°C. Готовят два образцовых раствора – 1 и 2. 1-й запасной раствор в 1 л содержит 0,4927 г соли (0,1 мг N в 1 мл); навеску берут на аналитических весах. Хранят раствор в темной склянке в холодильнике и, если необходимо, добавляют консервант (1 мл толуола или хлороформа на 1 л раствора). 2 рабочий раствор получают разбавлением запасного раствора. Серию стандартных растворов нитрита натрия с содержанием азота от 0,02 до 0,5 мг в 1 л готовят непосредственно перед измерением их плотности.

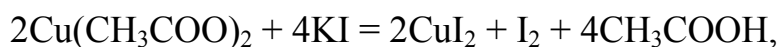
Нитритный реактив (реактив Грисса) состоит из смеси 1:1 растворов сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина. Для приготовления сульфаниловой кислоты 0,5 г химически чистого реактива растворяют в 100 мл 32 %-й ($d = 1,04$) уксусной кислоты. Вначале уксусную кислоту разбавляют дистиллированной водой (1:1) и затем доводят до нужной плотности по ареометру.

Второй компонент смеси готовят растворением 0,1 г α -нафтиламина в 20 мл воды при нагревании; раствор фильтруют через стеклянный фильтр (№ 1) в колбу, содержащую 180 мл уксусной кислоты ($d = 1,04$).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА МЕДНЫМ СПОСОБОМ

Метод основан на способности аминокислот и различных пептидов образовывать комплексные растворимые соединения с медью, определяемой йодометрическим методом.

Сущность метода в следующем: к определенному количеству испытуемого раствора прибавляется при слабощелочной реакции избыток суспензии фосфорнокислой меди в боратном буферном растворе, в результате чего после взбалтывания раствора образуются медные соли большинства аминокислот. Затем избыток фосфата меди отфильтровывается, и в прозрачном растворе после добавления CH_3COOH и KI определяется медь объемным способом по выделяющемуся йоду путем титрования слабым $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. При этом реакция протекает так:



Каждый мл 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,28 мг аминного азота.

Реактивы

- 1) раствор хлорной меди – 2,73 г в 100 мл воды;
- 2) трехзамещенный фосфат натрия: 12,9 г двухосновного фосфата натрия растворяют в 100 мл прокипяченной и охлажденной воды без CO_2 , добавляют 1,44 г NaOH и после растворения доводят объем водой до 200 мл;
- 3) боратный буфер: 5,72 г буры растворяют в 150 мл воды, добавляют 10 мл 1 н. HCl и доводят объем водой до 200 мл;
- 4) суспензия фосфорнокислой меди: 1 объем хлорной меди добавляют к 2 объемам второго реактива и хорошо перемешивают, после чего приливают 2 объема буферной смеси (3 реактив);
- 5) раствор тимолфталейна: 0,05 г растворяют в 20 мл 50 %-го раствора $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;
- 6) 0,01 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 7) 1 %-й раствор крахмала (раствор прокипятить).

Ход работы

Навеску измельченных семян в 200 мг помещают в центрифужную пробирку и заливают 5 мл 0,2 н. NaOH , приготовленного на 20 %-м спирте. Центрифугируют в течение 30 мин при 3 тыс.об/мин. После центрифугирования осадок вновь обрабатывают 5 мл того же раствора в течение 10 мин на центрифуге. Все надосадочные жидкости объединяют. Для определения аминного азота берут 5 мл вытяжки. Их помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2 капли тимолфталейна и 10 мл смеси, состоящей из взвешенного осадка фосфата меди в боратном растворе. Содержание колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо встряхивают и центрифугируют или фильтруют через плотный фильтр. Из центрифугата или фильтрата берут по 5–10 мл в фарфоровую чашку или колбу, подкисляют 0,25–0,5 мл крепкой CH_3COOH , добавляют 0,2–0,4 г KI и титруют выделившийся йод 0,01 н. свежеприготовленным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, приливая к концу титрования 4–5 капель крахмала до исчезновения типично синей окраски. Число мл 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ умножают на 0,28, в результате чего

получают 1 мг аминного азота во взятой части испытуемой жидкости. Результаты выразить в процентах, учитывая объем вытяжки и вес навески.

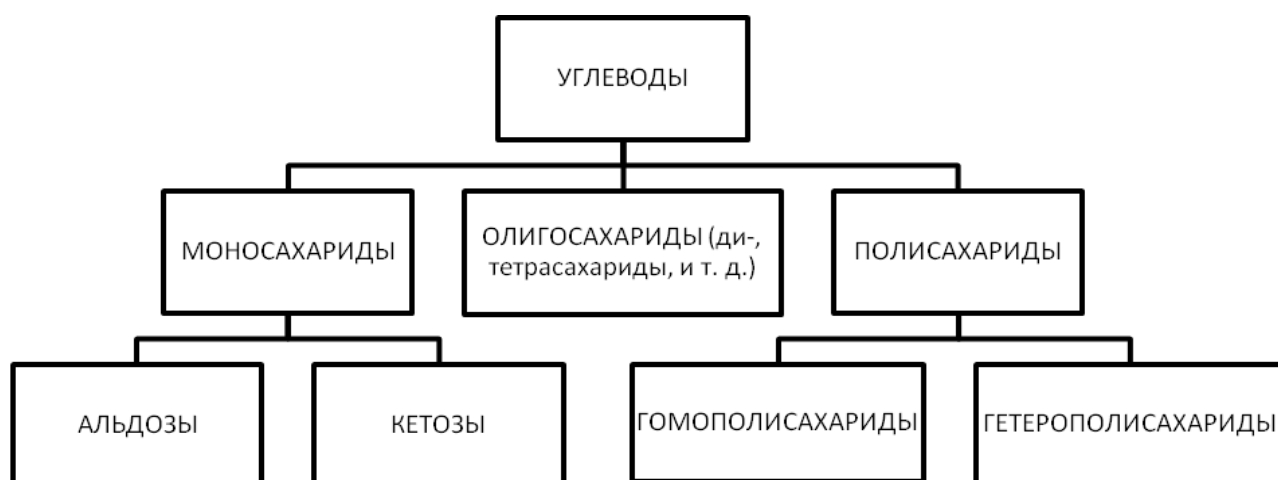
При применении данного способа особое внимание обратить на то, чтобы центрифугат или фильтрат был прозрачным, так как присутствие малейшего осадка фосфорнокислой меди дает преувеличение цифры титрования.

РАЗДЕЛ 2

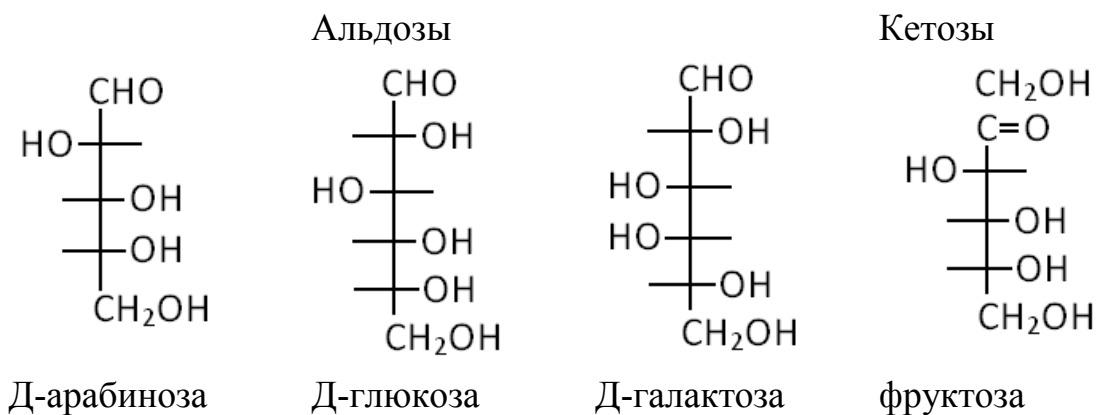
УГЛЕВОДЫ

Углеводы составляют 85-90% веществ, входящих в состав растительного организма. Их традиционно определяют как вещества, содержащие углерод, водород и кислород в соотношении $(CH_2)_n$ где $n=3$. Один атом углерода несет карбонильную группу, остальные – гидроксидные. К углеводам относят и другие, очень сходные соединения, хотя они не соответствуют определению.

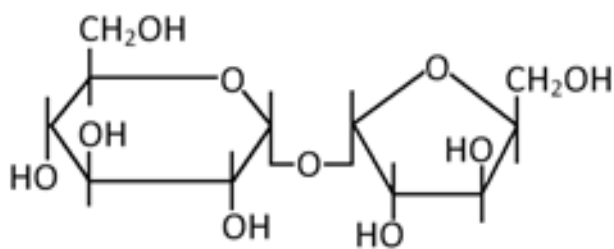
Углеводы можно подразделить на моносахариды, олигосахариды, полисахариды и недостаточно четко определенную группу соединений, называемых сложными углеводами.



Моносахариды можно классифицировать как альдозы и кетозы в зависимости от природы их функциональной группы. Различие между моносахаридами обусловлено неодинаковым числом атомов углерода, строением активной группы и присутствием хиральных или асимметрических, атомов углерода.



Олигосахариды представляют собой небольшой полимер, образованный из n -моносахаридных остатков, связанных гликозидной связью высвобождением $n-1$ молекул воды. Наименьшая величина $n=2$, а наибольшая достигает 20. Наиболее распространенный олигосахарид – сахароза.



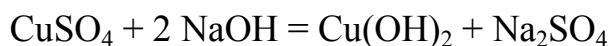
Фуранозидная конфигурация фруктозидной группы в сахарозе определяет высокую отрицательную величину свободной энергии гидролиза ее глюкозидо-фруктозидной связи, равную 6600 кал/моль. Высокий энергетический уровень глюкозидо-фруктозидной связи в сахарозе может, по-видимому, определять широкий круг превращений, в которых она участвует. В этом, видимо, и заключается физиологическое преимущество сахарозы перед другими олиго- и полисахаридами. Считают, что в основе использования сахарозы в качестве транспортной формы сахаров лежит принцип защищенности реакционноспособных групп моносахаридов, входящих в состав ее молекулы, от быстрого использования в метаболизме. В растительном организме непроизводительные траты транспортируемого углерода ограничиваются не только посредством образования нередуцирующих сахаров, но и путем защиты от ферментативного расщепления.

Полисахариды сходны с олигосахаридами в том, что они образуются при конденсации моносахаридов, соединяющихся гликозидными связями. Однако их молекулярная масса гораздо выше.

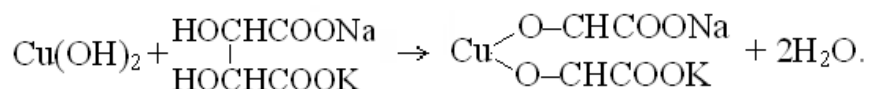
Сложные полисахариды – это углеводы, связанные с неуглеводными молекулами, к ним относятся гликопротеиды и гликолипиды – полимеры, в которых углевод ковалентно связан с белком или липидом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ ПО БЕРТРАНУ

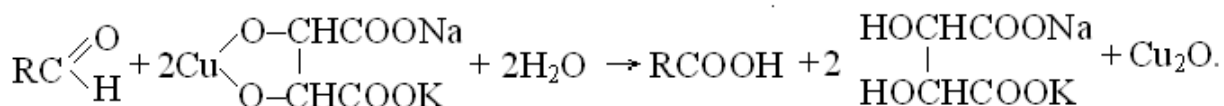
Метод основан на способности редуцирующих сахаров, обладающих свободной карбонильной группой, восстанавливать в щелочном растворе окисную медь в закисную. Реакция протекает количественно. Сахароза и другие олигосахара, у которых связаны обе карбоксильные группы (сахароза) и одна мальтоза, требуют предварительного гидролиза кислотой и ферментом. Задача заключается в том, чтобы определить количество образовавшегося осадка закиси меди, которое строго соответствует количеству сахара, находящемуся в растворе. Для этой цели осадок закиси меди растворяют серноокислым окисным железом в присутствии серной кислоты, при этом закись меди количественно окисляется окисным железом, восстанавливая его в закисное, а последнее в свою очередь также количественно окисляется марганцевоокислым калием. При этом протекают следующие реакции:



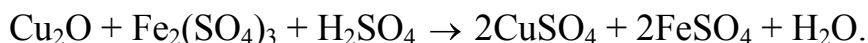
В присутствии сегнетовой соли в щелочной среде гидрат окиси меди в осадок не выпадает, т. к. образуется комплексное соединение



Феллингова жидкость окисляет альдегидные и кетонные группы. При взаимодействии раствора сахара с феллинговой жидкостью сахар окисляется и образует закись меди



Количество закиси азота определяют объемным методом. Для этого на закись меди действуют серноокислым окисным железом в кислом растворе. В результате реакции закисная медь переходит в окисную, а железо восстанавливается



Количество образовавшегося двухвалентного железа определяют окисление его перманганатом калия в кислой среде



По количеству затраченного на титрование перманганата вычисляют количество закиси меди и затем содержание сахаров в растворе.

Растворимые сахара находятся в любом растении, они являются первым продуктом фотосинтеза. Широко распространены в основном три сахара: моносахара – глюкоза, фруктоза, дисахарид – сахароза.

Реактивы

- 1) 10% уксуснокислый основной свинец;
- 2) 0,1 н. раствор KMnO_4 . 3,161 г KMnO_4 растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды, кипятят 30 мин., охлаждают, фильтруют и доводят водой в мерной колбе до 1 литра. Реактив хранится в склянке из темного стекла;
- 3) раствор окисного серноокислого железа. 50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл дистиллированной воды, затем постепенно прибавляют 108,7 мл концентрированной кислоты, охлаждают и доводят водой в мерной колбе до 1 литра;
- 4) раствор сернокислой меди 40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл дистиллированной воды и доводят объем до 1 литра;
- 5) раствор щелочи. 150 г едкого натра растворяют в воде, в раствор добавляют 200 г сегнетовой соли $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и доводят раствор до 1 литра;
- 6) 5% раствор HCl ;
- 7) щавелевокислый натрий ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), высушенный в термостате в стеклянном бюксе в течение 2-х часов при 120°C ;
- 8) углекислый натрий (Na_2CO_3);
- 9) 4% раствор едкого натра (NaOH);

Приготовление вытяжки

Навеску сырого растительного материала 10–20 г, в зависимости от содержания сахаров, растирают в фарфоровой ступке до однородной массы или используют гомогенизатор и количественно переносят в коническую колбу на 250 мл, приливают 100 мл горячей дистиллированной воды, а затем нагревают 30 мин на водяной бане при 75–80°C.

Некоторые объекты обладают значительным содержанием кислот (томаты, яблоки, виноград, лимоны), которые могут во время извлечения сахаров при нагревании частично или полностью гидролизовать сахарозу, поэтому перед нагреванием на бане в колбу необходимо добавить на кончике скальпеля CaCO_3 для нейтрализации органических кислот.

Затем раствор переносят в мерную колбу на 250 мл, несколько раз ополаскивая колбу. При остывании вытяжки (или охлаждении под водопроводной водой) осаждают белки прибавлением 2,5 мл 10% раствора уксуснокислого основного свинца, объем доводят до метки и затем, тщательно перемешав содержимое, фильтруют вытяжку в другую колбу. В вытяжке проводят определение по Бертрану.

Определение редуцирующих сахаров

Берут пипеткой 5–20 мл исследуемого раствора и помещают в коническую колбу на 100 мл, туда же наливают смесь 20 мл раствора сернокислой меди и 20 мл щелочного раствора сегнетовой соли, осторожно смешивают их (жидкость Феллинга). Количество сахара в пробе должно быть не менее 10 мг, но не более 100 мг (предпочтительно 40–60 мг). Так как анализ требует сохранения определенных объемов реагирующих веществ, при предположении содержания сахара в вытяжке более 100 мг, берут 5–10 мл раствора и добавляют соответственно 15–10 мл воды. Перемешивают содержимое и колбу помещают на электрическую плитку. Смесь должна кипеть ровно 3 мин. с момента закипания. Колбу снимают с плитки и в течение 1–2 мин дают отстояться выпавшему красному осадку закиси меди – Cu_2O . Если осадок не образовался, то необходимо увеличить навеску. Если исчезла синяя окраска – необходимо уменьшить количество взятого на определение раствора, разбавив его водой.

Жидкость фильтруют через асбестовый фильтр 40 при помощи насоса Камовского, по возможности не перенося осадок на фильтр. Осадок в колбе промывают горячей дистиллированной водой декантацией, затем переносят его на фильтр и вновь также промывают. Все промывные воды из колбы Бунзена выливают, под фильтр ставят чистую колбу и осадок на фильтре растворяют в 20 мл окисного сернокислого железа. Сразу не отсасывают, дают полностью раствориться осадку. Затем промывают фильтр несколько раз горячей дистиллированной водой. Фильтрат из колбы Бунзена переносят в коническую колбу на 200 мл, подогревают на плитке до 70°C и сразу же титруют 0,1 н. раствором KMnO_4 из бюретки до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. При этом определяют сумму моносахаров (глюкозу и фруктозу).

Определение суммарного содержания сахаров

Для определения сахаров берут 50 мл исследуемого раствора в коническую колбу на 100 мл, добавляют 5 мл 5% HCl, закрывают обратным холодильником и помещают в кипящую водяную баню на 30 мин для гидролиза сахарозы. По окончании гидролиза колбу с исследуемым раствором быстро охлаждают под краном водопровода и добавляют несколько капель метилового красного. Затем раствор в колбе нейтрализуют 4% раствором NaOH, который приливают по каплям, до перехода красной окраски индикатора в золотисто-желтую. После нейтрализации раствор переносят в мерную колбу на 100 мл. Содержимое доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают, берут пипеткой 20 мл и определяют содержание сахаров методом Бертрана (как при определении редуцирующих сахаров). В этой пробе находятся моносахара, найденные ранее в отдельной пробе, а также сахароза. Разность между 2-ым и 1-ым определением, умноженная на коэффициент 0,95 составляет содержание сахарозы. Коэффициент 0,95 необходим потому, что 1 г сахара получается из 0,95 г сахарозы.

Определение титра KMnO_4

Титр раствора марганцевокислого калия определяют по щавелевокислему натрию ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$). Щавелевокислый натрий определяют высушивают в стеклянном бюксе при 120°C в течении 2-х часов в сушильном шкафу. На аналитических весах берут навеску 0,2 г, растворяют в 50 мл дистиллированной воды, добавляют туда 2,5 мл концентрированной серной кислоты, нагревают до 70°C и горячую жидкость титруют раствором KMnO_4 до исчезающего в течение 1 мин. розового окрашивания. Титр KMnO_4 в г. меди вычисляют по формуле:

$$T = \frac{A \cdot 0,9492}{B}, \text{ где}$$

A – навеска щавелевокислого натрия в г;

B – мл израсходованного KMnO_4 ;

0,9492 – коэффициент для пересчета на медь.

Титр KMnO_4 выражают в мг меди, т.к. в таблицах Бертрана представлены весовые значения меди и соответствующие им эквиваленты сахара.

Вычисление процентного содержания моносахаров

Количество мл перманганата, пошедших на титрование, умножают на титр по меди по таблице Бертрана и находят, какому количеству сахара он соответствует. Процент редуцирующих сахаров вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot H}, \text{ где}$$

X – количество редуцирующих сахаров в %;

A – количество сахара во взятом объеме (V_1), найденное по таблице Бертрана;

V – объем вытяжки, полученный из навески;

V_1 – проба вытяжки (мл), взятая для определения;

H – навеска материала (мг).

Вычисление суммарного содержания сахаров

Сумма сахаров вычисляется по формуле:

$$y = \frac{A \cdot V \cdot 100 \cdot 2}{V_1 \cdot H}$$

Результат представляет собой сумму сахаров (редуцирующие сахара и сахароза). Для вычисления содержания сахарозы из суммарного количества сахара вычитают содержание редуцирующих сахаров. В связи с тем, что при гидролизе сахарозы (молекулярная масса 342) образуется две молекулы гексоз (молекулярная масса $180 \cdot 2 = 360$), полученный результат содержания сахарозы умножают на коэффициент 0,95 ($342/360 = 0,95$).

Процент сахарозы (z) равен $y - x \cdot 0,95$ (x – сумма глюкозы и фруктозы)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗЫ ПО КОЛЬТГОФУ

Метод заключается в предварительном разрушении альдоз и других редуцирующих веществ посредством настаивания с щелочным раствором йода и последующего определения по Бертрону фруктозы, остающейся без изменения в этих условиях.

Метод Кольтгофа применяют в тех условиях, когда требуется знать не только общее содержание редуцирующих сахаров, но и отдельно глюкозу и фруктозу. Глюкозу вычисляют из разности между общим содержанием редуцирующих сахаров и количеством фруктозы.

Реактивы

- 1) 0,5 н. раствор йода (6,35 г йода растворяют в концентрированном растворе, полученном из 10г KJ, растворенном в минимальном количестве воды и доводят дистиллированной водой до 100 мл);
- 2) 0,5 н. раствор NaOH;
- 3) 4 н. раствор NaOH;
- 4) 10% раствор сульфата натрия;
- 5) 1% раствор Na_2SO_4 ;
- 6) 5% раствор H_2SO_4 ;
- 7) 150 г NaOH и 200 г сегнетовой соли растворяют в воде и доводят объем до 1 литра;
- 8) 40 г CuSO_4 в 1 литре воды;
- 9) KMnO_4 (5 г в 1 литре воды);
- 10) 50 г FeSO_4 200 г H_2SO_4 (конц.) и довести объем до 1 л;
- 11) 10% основной уксуснокислый свинец;
- 12) Метилоранж (50 мг растворить в 100 мл воды), хранить в темной склянке.

Ход работы

Навеска сырого растительного материала 10–25 г в зависимости от содержания сахаров, растирается в фарфоровой ступке до однородной массы и количественно переносится в коническую колбу на 200 мл, заливается 150 мл горячей дистиллированной воды и нагревается 30–60 мин на водяной бане при 75–80°C.

Затем содержимое переносят в мерную колбу на 200 мл, несколько раз ополаскивая колбу. При остывании вытяжки или охлаждении водопроводной водой осаждают белки прибавлением 2,5 мл 10% р-ра нейтрального уксуснокислого свинца, объем доводят до метки и затем, тщательно перемешав содержимое, фильтруют вытяжку в другую колбу. 25 мл вытяжки в которой требуется определить содержание фруктозы, помещают в мерную колбу на 100 мл, приливают пипеткой 5–10 мл 0,5 N раствора I_2 , чтобы его хватило на разрушение альдоз, о примерном содержании которых судят по определению сахаров по Бертрону (до гидролиза) и полуторный объем 0,5 N раствора щелочи по сравнению со взятым объемом йода. Оставляют при комнатной температуре на 10 мин. При этом раствор становится слабоокрашенным. После некоторого времени раствор подкисляют 5% серной кислотой (если 0,5 N раствора щелочи было взято 7,5 мл, то надо кислоты 5 мл, при других объемах щелочи надо рассчитать необходимое количество кислоты). Выделившийся при этом избыток йода удаляют прибавлением 10% раствора сульфита натрия (20 мл до значительного осветления раствора до молочной окраски, затем прибавлением 1% раствора до обесцвечивания. Если после приливания серной кислоты йод не выделился, тогда опыт надо повторить, взяв больше йода или меньше вытяжки).

После обесцвечивания приливают 3 капли метилоранжа, нейтрализуют 4 н. раствором NaOH и доводят объем до 100 мл дистиллированной водой. Из полученного раствора (100 мл) берут пробы по 20 мл и обычным путем определяют сахара по Бертрону.

Особенность определения фруктозы состоит в том, что растворы медного купороса и сегнетовой соли приливают обязательно одновременно, для чего их предварительно смешивают в отдельной колбе (по 20 мл каждого) и приливают смесь. В противном случае образуется труднорастворимый осадок. Для вычисления пользуются таблицей пересчета от мг меди к мг фруктозы.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ ПО ВОЗНЕСЕНСКОМУ

Метод основан на определенной зависимости между содержанием сахаров в растворе и обесцвечиванием его после кипячения с жидкостью Феллинга и последующим фотометрическим анализом.

Реактивы

- 1) Уксуснокислый свинец (10%-й раствор);
- 2) Сернокислая медь (40 г растворить в 1 л воды);
- 3) Щелочной раствор сегнетовой соли (150 г NaOH растворить в воде, добавить 200 г виннокислого калия-натрия и довести объем до 1 л);
- 4) Стандартный раствор чистой глюкозы, содержащий 1 мг глюкозы в 1 мл раствора (100 мг глюкозы растворить в 100 мл воды).

Ход работы

Вытяжка готовится так же, как при определении сахаров по Бертрону.

В 3 три пробирки наливают 3–6 мл (в зависимости от содержания сахаров) вытяжки, 3 мл жидкости Феллинга (сегнетова соль + CuSO_4 в соотношении 1:1). Две пробирки помечают на 10 мин в кипящую водяную баню, после чего их быстро охлаждают под струей водопроводной воды и центрифугируют в продолжении 10 мин. при 3000–4000 об/мин. В результате закись меди выпадает в осадок.

Прозрачный раствор из пробирок сливают в кюветы (с рабочей длиной 20 мм). В другую кювету наливают раствор из третьей пробирки, не подвергавшейся кипячению и являющейся контролем.

Определяют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре в кюветах на 1 см. Чтобы найти, какое количество сахара соответствует найденной оптической плотности, строят калибровочный график. Для этого готовят ряд растворов, содержащих следующее количество глюкозы – 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мг в 6 мл воды и добавляют по 3 мл жидкости Феллинга (общий объем растворов 9 мл). Растворы кипятят 10 мин на водяной бане, центрифугируют и определяют оптическую плотность при красном светофильтре на левом барабане.

В качестве контроля для калибровочного графика используют смесь дистиллированной воды и 3 мл жидкости Феллинга (не кипятить).

Вычерчивают график. По оси абсцисс откладывают концентрации глюкозы, а на оси ординат – оптическую плотность. Калибровочный график должен представлять собой прямую линию.

УСКОРЕННЫЙ ПОЛУМИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ РАСТВОРИМЫХ САХАРОВ (ПО ДЮБОЙСУ)

Растворимые сахара извлекаются из растительного материала спиртом; спирт удаляют, а сахара растворяют в воде. К раствору сахаров добавляют фенол и серную кислоту, в результате чего раствор окрашивается в желто-оранжевый цвет. Степень окрашивания пропорциональна содержанию сахаров в растворе. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре. Метод отличается высокой чувствительностью и дает возможность определить до 10 мкг сахаров.

Реактивы

- 1) 1%-й раствор фенола (10 г свежеперегнанного фенола растворить в 1 л воды);
- 2) Серная кислота (плотность 1,84);
- 3) 96%-й этиловый спирт;
- 4) 80%-й этиловый спирт;
- 5) сахара.

Ход работы

1–2 г хорошо измельченного свежего растительного материала, содержащего 5–50 мг сахаров (для сухого материала навеску уменьшают), взвешивают на аналитических весах, переносят в стакан или коническую колбу

на 50–100 мл, заливают 10 мл 96%-го спирта. Колбу помещают на водяную баню и содержимое триады доводят до кипения при помешивании стеклянной палочкой. Затем охлаждают и после осаждения растительного материала фильтруют через беззольный фильтр в фарфоровую чашку на 50 мл. При фильтровании необходимо сливать лишь верхний прозрачный спиртовый раствор и избегать перенесения осадка на фильтр.

После этого в колбу с растительной массой приливают 10–12 мл 80%-го спирта, содержимое перемешивают, дважды нагревают на водяной бане до кипения и после охлаждения вновь сливают раствор через фильтр в фарфоровую чашку. Такую экстракцию повторяют дважды. Затем осадок из колбы переносят на фильтр и промывают 2–3 раза небольшими порциями теплого 80%-го спирта.

Спирт из фарфоровых чашек удаляют выпариванием при комнатной температуре, используя вентилятор или фен (после удаления спирта образцы можно длительное время хранить в эксикаторе).

Содержимое чашек после удаления спирта растворяют в 5–7 мл воды, тщательно перемешивая стеклянной палочкой, и осторожно переносят раствор в мерную колбу на 50 мл. Чашку несколько раз ополаскивают небольшими порциями воды, сливают воду в мерную колбу, доводя водой до метки, закрывают пробкой, тщательно перемешивают, и, если появляется небольшой осадок, дают ему отстояться. Затем полученный раствор разбавляют в 10 раз. Для этого 5 мл раствора переносят в другую колбу на 50 мл, доводят колбу водой до метки и содержимое перемешивают. При большом количестве сахаров проводят 20-ти кратное разбавление (5 мл разбавляют в мерной колбе до 100 мл).

Для колориметрирования 1 мл раствора переносят в пробирку, добавляют 1 мл 1%-го водного раствора фенола, наливают точно 5 мл химически чистой серной кислоты (не разбрызгивая ее по стенкам пробирки). Пробирки оставляют на 10 мин, затем встряхивают и выдерживают на водяной бане 10–20 мин при 25–30°C для развития окраски. Окраска стабильна в течение нескольких часов. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре (кюветы толщиной 10 мм) с сине-зеленым светофильтром или на спектрофотометре при 490 нм. В качестве контрольного варианта вместо раствора сахарозы берут 1 мл дистиллированной воды.

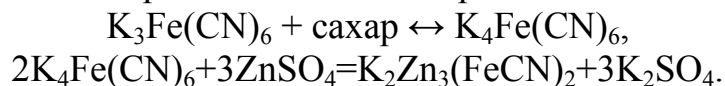
Концентрацию сахаров устанавливают по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика используют раствор сахарозы. 500 мг высушенной при 60°C сахарозы растворяют в колбе на 500 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Затем берут 7 мерных колб емкостью по 100 мл и вносят в них 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 мл раствора сахарозы, доводят водой до метки. В каждой колбе будет содержаться соответственно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 мкг сахарозы. Из каждой колбы берут по 1 мл в пробирки, добавляют 1 мл фенола, приливают 5 мл серной кислоты; пробирки оставляют на 10 мин. Затем встряхивают и выдерживают на водяной бане 10–20 мин при 25–30°C.

Содержимое пробирок колориметрируют и строят калибровочный график.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРИМЫХ САХАРОВ МЕТОДОМ ХАГЕДОРНА–ИЕНСЕНА

Метод основан на восстановлении сахаром в щелочном растворе красной кровяной соли в желтую кровяную соль. Последняя выводится из раствора вносимым в смесь сернокислым цинком. Неиспользованное же количество красной кровяной соли определяется иодометрически:



Реактивы

- 1) красная кровяная соль (1,65 г и безводная сода 10,6 г в 1 л воды). Хранить в склянке из темного стекла;
- 2) 5 г йодистого калия (10 г сернокислого цинка и 50 г хлористого натрия растворяют в воде и доводят до 200 мл (раствор готовят перед употреблением);
- 3) 3%-й раствор уксусной кислоты (без примеси железа);
- 4) 1%-й раствор растворимого крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия, служащего антисептиком;
- 5) раствор гипосульфита 1/200 н. (навеска 1,4 г в 1 л). Титр устанавливается по 1/200 н. раствору йодного калия (KIO_3), который готовится растворением чистой безводной соли 0,1783 г (точно!) в воде и доводится до 1 л. Перед началом работы проверяется;
- 6) 4,5%-й раствор ZnSO_4 ; 7) 2%-й раствор NaOH .

Ход работы

Навеску сухих листьев (примерно около 0,2 г) измельчают и растирают с небольшим количеством воды в ступке до однородной массы. Последнюю количественно переносят в небольшую колбочку, нагревают при 70°C на водяной бане около 30 мин. Для осаждения белков прибавляют к вытяжке 5 мл 4,5%-го ZnSO_4 и 3 мл 2%-го NaOH , нагревают 3 мин на кипящей водяной бане. Горячую смесь фильтруют в мерную колбу на 50 мл, осадок на фильтре тщательно промывается горячей водой. После охлаждения фильтрат доводят до метки. Из колбочки берут пипеткой две пробы по 5 мл каждая в пробирки (в зависимости от содержания в пробе сахара величина ее может быть больше или меньше 5 мл), добавляют в них по 2 мл раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ с Na_2CO_3 , доливают в пробирки по 8 мл воды. Одновременно заряжают по две холостые пробы, каждая из которых состоит из 13 мл воды и 2 мл $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Приготовленные смеси нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 3 мл раствора $\text{KI} + \text{ZnSO}_4 + \text{NaCl}$ и по 2 мл 3%-го раствора CH_3COOH и по 2 капли крахмального индикатора. Затем раствор титруют гипосульфитом из микробюретки до обесцвечивания. Титрование холостых проб необходимо, т.к. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ при кипячении может отчасти восстанавливаться (при отсутствии сахара).

Перед началом работы титр гипосульфита проверяется: берут 2 мл KIO_3 , прибавляют 3 мл раствора $\text{KI} + \text{ZnSO}_4 + \text{NaCl}$, 2 мл уксусной кислоты, 2 капли крахмального индикатора и титруют гипосульфитом до обесцвечивания.

Если на 2 мл KIO_3 пошло точно 2 мл гипосульфита, то его титр будет точно соответствовать 1/200 н. Желательно, чтобы раствор гипосульфита был более концентрированный. Предположим, что 2 мл KIO_3 будут эквимоллярны 1,9 мл гипосульфита, тогда поправка к титру будет: $2:1,9=1,05$.

Расчет производят следующим образом: навеска листьев 151,2 мг; поправка к титру гипосульфита – 1,05; количество гипосульфита, пошедшего на титрование 5 мл раствора, 1,416 и 1,418. Средняя из двух определений равна 1,417. $1,417 \cdot 1,05 = 1,48785 = 1,49$. Этому числу мл по таблице соответствует 0,090 мг глюкозы.

При титровании холостой пробы гипосульфита пошло 1,09 и 1,89 мл. $1,89 \cdot 1,05 = 1,97925 = 1,98$. Этому числу по таблице соответствует 0,03 мг глюкозы.

Следовательно, в 5 мл восстанавливающих сахаров находится $0,090 - 0,03 = 0,087$ мг; в 50 мл содержится: $0,087 \cdot 10 = 0,87$ мг; 0,87 мг содержится в навеске (151,2 мг), в 100 содержится X:

$$X = \frac{0,85 \cdot 100}{151,2} = 0,58 \% \text{ глюкозы}$$

Для определения общего содержания сахаров берут 25 мл исследуемого раствора в коническую колбу на 50 мл, прибавляют 3 мл 5% раствора соляной кислоты, закрывают обратным холодильником и помещают в кипящую баню на 30 минут для гидролиза сахарозы.

После окончания гидролиза колбы с исследуемым раствором быстро охлаждают проточной водой и добавляют 3 капли метилового красного. Затем раствор в колбе нейтрализуют 4% раствором NaOH, который приливают по каплям, до перехода красной окраски в золотисто-желтую. После нейтрализации раствор переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят до метки дистиллированной водой и определяют общее содержание сахаров методом Бертрана (как при определении редуцирующих сахаров).

Результат представляет собой сумму сахаров (редуцирующие сахара плюс сахароза). Для вычисления содержания сахарозы из суммарного количества сахаров вычитают содержание редуцирующих сахаров. В связи с тем, что при гидролизе сахарозы (молекулярная масса 342) образуется 2 молекулы гексоз (молекулярная масса $182 \cdot 2 = 360$), полученный результат содержания сахарозы умножают на коэффициент 0,95 ($342/360 = 0,95$).

При вычислении процентного содержания сахарозы учитывают, что для определения суммы сахаров раствор был разбавлен в 2 раза (с 25 до 50 мл).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА САХАРОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Определение состава сахаров важно для характеристики физиолого-биохимических процессов в растениях.

В свободном состоянии в растениях содержатся различные моносахариды и олигосахариды – пентозы, гексозы, ди- и трисахариды. Количество и состав этих сахаров могут изменяться в зависимости от вида и возраста растений, времени суток, погодных условий и условий выращивания. Различные органы и ткани одного и того же растения часто значительно различаются по составу сахаров.

Общепринятые методы анализов, как правило, основаны на определении редуцирующей активности сахаров либо непосредственно в вытяжке, получаемой из растительного материала, либо после гидролиза ди- и трисахаридов в соответствующих условиях. Но этими методами определяют лишь суммарное содержание отдельных групп растворимых сахаров, а определение состава и содержания отдельных сахаров обычными химическими методами крайне сложно и длительно, а иногда невозможно. Поэтому для определения отдельных сахаров используют хроматографические методы, среди которых наиболее быстрым и простым является метод хроматографии на бумаге.

Принцип метода

Разделение веществ методом хроматографии на бумаге основано на различном распределении их между двумя несмешивающимися жидкостями, одной из которых служит вода, другой – тот или иной органический растворитель (чаще других *n*-бутанол, пиридин или фенол).

Водная фаза неподвижна, т.к. вода прочно удерживается фильтровальной бумагой, а фаза органического растворителя – подвижна. Суть метода заключается в том, что через полоску фильтровальной бумаги, на которую нанесен водный раствор разделяемой смеси сахаров, пропускают органический растворитель. При этом сахара распределяются между водой и растворителем в соответствии с величиной их коэффициентов распределения. Коэффициенты распределения у различных сахаров неодинаковы, поэтому происходит разделение смеси сахаров.

При непрерывном движении растворителя вещество непрерывно перераспределяется между двумя фазами – наблюдается движение исходного пятна по потоку растворителя и разделение его на отдельные пятна.

Для идентификации сахаров рядом с испытуемой смесью в тех же условиях пропускают смесь чистых сахаров «свидетелей» или «метчиков».

Хроматографический метод используется как для качественного, так и для количественного анализа.

Хроматографический анализ углеводов состоит из следующих основных этапов:

1. Фиксация растительных материалов, экстракция сахаров.
2. Нанесение полученного экстракта на хроматограмму.
3. Хроматографическое разделение сахаров.
4. Проявление хроматограммы.
5. Элюция сахаров с хроматограммы.
6. Количественное определение сахаров.
7. Составление градуированных кривых (стандартных).

Реактивы

- 1) Метчики сахаров: глюкоза, галактоза, арабиноза, фруктоза, сахароза, раффиноза;
- 2) 50 мг сахара в 25 мл 20% C_2H_5OH ;
- 3) 80%-й этиловый спирт;
- 4) растворитель: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1: 5. Смесь помещают в делительную воронку, взбалтывают в течение 30–40 мин и отстаивают 30 мин. Употребляют верхний слой. Нижний слой наливают на дно камеры для насыщения ее парами растворителя;
- 5) водонасыщенный бутанол. Смешать равные количества бутанола и дистиллированной воды и встряхивать в делительной воронке в течение 30 мин. Дать отстояться 30 мин и слить нижний слой. Употребляют верхний слой;
- 6) анилинфталатный реактив. 1,66 г фталевой кислоты и 0,75 мл свежеперегнанного анилина растворяют в 100 мл водонасыщенного бутанола. Лучше применять свежеприготовленный проявитель. Хранить в склянке из темного стекла;
- 7) ледяная уксусная кислота;
- 8) 60%-й этиловый спирт;
- 9) 0,05%-й раствор резорцина в этиловом спирте;
- 10) смесь концентрированной HCl и 0,216 г/л $FeNH_4(SO_4)_2$ в соотношении 1:1;
- 11) проявитель для кетосахаров: смесь мочевины 1 г, 1 н. HCl 10 мл и 96%-й этиловый спирт 90 мл;
- 12) 20%-й этиловый спирт.

Фиксация растительного материала, экстракция сахаров, нанесение полученного экстракта на хроматограмму

Содержание сахаров можно определять в свежем или фиксированном материале. Фиксируют кипящим 96%-м этиловым спиртом.

Для анализа в навеске должно содержаться около 100 мг сахаров. Поэтому для листьев многих растений навеска будет составлять 5–10 г (для воздушно-сухого материала 200 мг).

Для фиксации навеску помещают в стакан, заливают 5–6-кратным объемом кипящего этилового спирта (96°C) и кипятят на водяной бане в течений 5 мин. Если материал содержит значительное количество кислот, то для их нейтрализации в стакан добавляют немного мела. Фиксированный материал можно хранить в холодильнике несколько месяцев.

Навеску растительного материала растирают в ступке до однородной массы и переносят в коническую колбу на 50 мл с обратным холодильником и наливают 10 мл 80%-го этилового спирта.

Экстракцию сахаров проводят на водяной бане при температуре 70–80°C в течение 30 мин. Экстракт вместе с растительными остатками помещают в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 3 мин. при 3000 об/мин. Экстракт сливают в выпаривательные чашки, а осадок в центрифужной пробирке заливают 10 мл 80%-го спирта, перемешивают, выдерживают 5 мин., вновь центрифугируют и сливают экстракт в ту же выпаривательную чашку.

Всю операцию повторяют еще раз. Экстракт выпаривают на водяной бане при 40°C.

Содержимое чашек смывают 3 мл 80%-го этанола. Из них на хроматографический анализ употребляют 0,1 мл.

Если исследуемый материал содержит много пигментов, их необходимо удалить из экстракта петролейным эфиром.

Выпаривательную чашку с осадком промывают 2–3 раза небольшими порциями горячей воды и сливают их в делительную воронку. Общий объем вытяжки в делительной воронке должен составлять 25–30 мл. Затем чашки 2–3 раза ополаскивают петролейным эфиром и сливают в делительную воронку (общий объем эфира тоже 25–30 мл). Смесь в воронке встряхивают в течение 5–10 мин, дают отстояться. Воду сливают в фарфоровую чашку. Слой эфира удаляют. Такую обработку повторяют 2–3 раза до полного удаления пигментов.

Водный экстракт упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане при температуре 60°C до 3 мл.

Полученную вытяжку сахаров с помощью микропипетки наносят на хроматограмму. Раствор наносят количественно в одно пятно, диаметр которого не должен превышать 3–4 мм.

Для хроматографии лучше применять бумагу «быструю». Можно использовать и другие марки.

Размер «восходящей» хроматограммы 6 * 24 см; нисходящей – 6 * 50 см.

Отступая 4–5 см от края листа бумаги, проводят карандашом линию (старт). На этой линии через каждые 3 см ставят точки, обозначающие места нанесения растворов сахаров.

В качестве камер используют стеклянные банки с притертыми крышками. Применяют восходящую и нисходящую хроматографию. В качестве растворителя используют смесь: н-бутиловый спирт – уксусная кислота – вода в соотношении 4:1:5. Уксусную кислоту необходимо проверить на содержание альдегидов, при которых она приобретает розовую окраску в присутствии анилина. Растворитель встряхивают в делительной воронке в течение 30–40 мин, затем дают отстояться. Верхний слой наливают в чашки Петри, которые устанавливают в камеры для хроматографирования. В чашки Петри помещают хроматограммы, свернутые в виде цилиндра. Нижний слой наливают на дно камеры и используют для насыщения ее парами растворителя. Растворитель пропускают через хроматограмму 3-кратно по 24 ч с последующим высушиванием на воздухе при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Необходимо, чтобы граница растворителя проходила в 1–1,5 см от верхнего конца хроматограммы.

При нисходящей хроматографии растворитель пропускают 3-кратно по 24 ч. При этом хорошо разделяются все сахара, за исключением 3 пар: глюкоза-галактоза, фруктоза-арабиноза, фруктоза-ксилоза. Если в вытяжке обнаружены пары этих сахаров, то растворитель нужно пропускать 3 раза по 40 ч.

После разделения сахаров хроматограммы высушивают под тягой для удаления следов растворителя и определяют положение сахаров на хроматограмме.

Кроме исследуемого раствора для хроматографии готовят растворы сахаров «свидетелей». Обычно в качестве «свидетелей» на хроматограмму наносят: рибозу, ксилозу, арабинозу, глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу и смесь этих сахаров. Растворы их готовят в 2%-й концентрации.

Количественное определение сахаров в элюате.

Содержание сахаров в элюате может быть определено разными методами. Наиболее чувствительными и позволяющими работать в большом диапазоне концентраций с минимальной ошибкой являются два метода: 1) анилиньфталатный метод – для определения альдосахаров (глюкоза, галактоза, арабиноза) и 2) резорциновый в модификации Кулька – для определения кетосахаров (фруктоза, сахароза, раффиноза).

1. Принцип этого метода заключается в том, что анилиньфталат реагирует с альдосахаром на бумаге при нагревании. Образующийся окрашенный продукт элюируется ледяной уксусной кислотой и колориметрируется на ФЭКе.

Хроматограммы равномерно смачиваются анилиньфталатным реактивом, в течение 10 мин просушивают на воздухе, а затем нагревают в сушильном шкафу 30 мин при температуре 80°C. При этом альдосахара проявляются в виде коричневых пятен.

Пятна вырезают, измельчают ножницами, помещают в пробирки и приливают туда 3 мл ледяной уксусной кислоты. Уксусная кислота должна быть химически чистой (т.е. не иметь реакции на альдегиды с анилином – розовое окрашивание; если окрашивание есть, уксусную кислоту перегоняют и собирают фракцию с температурой кипения 117°C).

Элюация происходит в течение 10 мин в пробирках с обратными холодильниками на кипящей водяной бане. После охлаждения производят фотоколориметрирование элюата в кювете на 0,5 см, используя синий светофильтр. Расчет количества сахара ведут по стандартным калибровочным кривым.

2. Принцип метода заключается в том, что резорцин вступает в реакцию с кетосахарами при нагревании в сильно кислой среде и дает розовую окраску, интенсивность которой изменяется на ФЭКе.

Особенностью метода является то, что для определения кетосахаров накладывают проявленные хроматограммы на непроявленные и находят местонахождение пятен сахаров. Количественное содержание сахаров определяют в пятнах с непроявленных хроматограмм.

В качестве проявителя используют реактив, состоящий из смеси: мочевины 1 г, 1 н. HCl 10 мл, и 90 мл 96%-го этилового спирта. Хроматограмму проявляют в течение 10 мин при температуре 100°C.

Проявленную хроматограмму накладывают на непроявленную. Установив местонахождение пятен сахаров на непроявленных хроматограммах, отмечают границы этих пятен и вырезают их. Затем участки хроматограммы с сахарами измельчают ножницами, заливают 6 мл 60%-го этилового спирта и

нагревают в течение 30 мин на водяной бане при температуре 80°C в пробирках с обратными холодильниками.

После охлаждения элюат перемешивают, при этом происходит полное извлечение сахаров.

Берут 2 мл полученного элюата в пробирки и последовательно добавляют по 3 мл: 0,05%-го раствора резорцина в этиловом спирте и смеси концентрированной HCl и 0,216 г/л $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ в соотношении 1:1.

Содержимое тщательно перемешивают и пробирки с обратными холодильниками помещают на водяную баню на 40 мин при температуре 80°C. После нагревания смесь быстро охлаждают проточной водой. Измерение интенсивности окраски проводят с помощью ФЭКа в кювете на 1 см, используя синий светофильтр.

Количественное содержание кетосахаров в элюате устанавливают по стандартным калибровочным графикам.

Построение калибровочных графиков

Построение градуировочных графиков для каждого сахара отдельно является очень ответственным этапом количественного хроматографического анализа.

Для построения калибровочных графиков используют альдосахара: глюкозу, галактозу, арабинозу и кетосахара: фруктозу, сахарозу, раффинозу. Используют метод восходящей хроматографии как более быстрый.

На хроматограмму наносят от 20 γ до 200 γ чистого раствора свидетелей, приготовленных на 20%-м этаноле. Это количество сахара должно содержаться в 0,1 мл раствора. Для построения графиков необходимо 6–8 точек. Исходным раствором служит раствор, содержащий 50 мг сахара в 25 мл 20%-го этилового спирта. В 0,1 мл этого раствора содержится 200 γ сахара. Из него готовят растворы, содержащие в 0,1 мл 100, 50, 40, 25 и 20 γ сахара.

Растворитель пропускают 3-кратно с последующим подсушиванием. При построении калибровочной кривой для кетосахаров проявляют одну хроматограмму для установления местоположения сахара на другой хроматограмме.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Метод основан на свойстве крахмала растворяться в растворе салициловой кислоты. Затем крахмал определяют по интенсивности синего окрашивания с реактивом I-KI.

Реактивы

- 1) раствор салициловой кислоты: 2,5 г кислоты растворить в 25 мл 96%-го спирта, затем довести в мерной колбе до 1 л дистиллированной водой. Если появятся хлопья, то раствор нагреть на водяной бане до полного растворения салициловой кислоты;
- 2) раствор I-KI: 200 мг йодистого калия растворяют в 2 мл дистиллированной

воды, прибавляют туда 100 мг кристаллического йода и растворяют его. После полного растворения доливают дистиллированную воду и доводят в мерном цилиндре до 90 мл. Йод плохо растворяется, но нагревать его нельзя. Лучше брать мелкие кристаллики йода. Хранить в темной склянке;
3) 0,1 н. HCl.

Ход работы

300 мг навески (сухой, тонко измельченной), помещают в колбу на 100 мл и заливают 20 мл салициловой кислоты. В колбу вставляют пробку с обратным холодильником, помещают на кипящую водяную баню на 45 мин. При этом необходимо 3–4 раза взболтать содержимое колбы. Через 45 мин колбу охлаждают и доливают салициловой кислотой до 100 мл. Затем колбу вновь нагревают на кипящей бане и в горячем состоянии вытяжку фильтруют через двойной складчатый фильтр. Берут 10 мл фильтрата, переносят в мерную колбу на 100 мл, прибавляют 70 мл дистиллированной воды, 15 мл 0,1 н. раствора HCl, 2 мл реактива I–KI, доводят водой до метки и колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром. Находят оптическую плотность раствора. Для расчета содержания крахмала пользуются калибровочным графиком.

Построение калибровочной кривой

100 мг крахмала (чистого, просушенного в течение суток над концентрированной серной кислотой в эксикаторе) заливают 20 мл салициловой кислоты и проводят дигестию (нагревают в течение 45 мин на водяной кипящей бане, заливают салициловой кислотой и доводят до 100 мл). Это исходный раствор содержащий в 1 мл 1 мг крахмала. Берут растворы, содержащие 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 мг крахмала, помещают в мерные колбы на 100 мл, добавляют 70 мл дистиллированной воды, 15 мл 0,1 н. раствора HCl, 2 мл раствора I–KI затем доводят водой до метки.

Колориметрируют при красном светофильтре и находят оптическую плотность по красной шкале правого отсчетного барабана. При колориметрировании в качестве контроля используют раствор, содержащий H₂O, HCl, I–KI в таких же количествах, как и в опытных растворах, только вместо 10 мл вытяжки берут 10 мл салициловой кислоты.

Колориметрирование проводят по первому способу: на пути правого пучка света устанавливают кювету с опытным раствором, на пути левого – с контролем. Индекс левого барабана устанавливается на 0 шкалы оптической плотности. Стрелку гальванометра подводят к нулю левым барабаном. После этого в правый пучок света помещают кювету с растворителем (контролем) и вращением правого отсчетного барабана стрелку гальванометра возвращают в нулевое положение. Величины оптической плотности отсчитывают по красной шкале.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ ПО МЕТОДУ КЮРШНЕРА И ХАФЕРА В МОДИФИКАЦИИ А.И. ЕРМАКОВА

Метод основан на окислительном разрушении и растворении различных соединений, входящих в состав растений (в том числе сопутствующих клетчатке) растворами азотной кислоты в спирте и спиртовой щелочи. При этом клетчатка практически не растворяется, а отфильтровывается и взвешивается.

Реактивы

- 1) этиловый спирт;
- 2) смесь этилового спирта (4 объема) с одним объемом азотной кислоты с уд. весом 1,4 (азотную кислоту приливают к спирту, размешивая);
- 3) 0,3 М спиртовой раствор щелочи.

Ход работы

Навеску сухого растительного материала 3 г помещают в конические колбы на 250 мл, приливают 50 мл смеси спирта и азотной кислоты, закрывают обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 1 ч. Кипение должно быть равномерным. Через час коричнево-желтый раствор сливают и отсасывают через тигль Гуча. При фильтровании следят за тем, чтобы на фильтре был слой жидкости. Осадок в колбе промывают небольшими порциями крепкого спирта, затем прибавляют 50 мл 0,3 М спиртового раствора щелочи и нагревают вновь на кипящей водяной бане в течении 1 ч. При отсасывании щелочного раствора белый осадок клетчатки переносят на фильтр того же тигля, промывают 2 раза порциями по 10 мл горячей воды, а затем 1–2 раза спиртом. Потом тигль Гуча сушат до постоянного веса при 105°C, охлаждают и взвешивают (тигель также сушат и взвешивают перед употреблением).

Процентное содержание клетчатки (х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(B_j - b) \cdot 100}{n}, \text{ где}$$

b – вес сухого тигля (без осадка);

B_j – вес тигля с сухим осадком;

n – навеска.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ПЕКТАТУ КАЛЬЦИЯ

Пектиновые вещества широко распространены в растениях. Они входят в состав клеточных стенок, склеивают соседние клетки между собой. Это коллоидные вещества, одним из характерных свойств которых является студнеобразующая способность.

Пектиновые вещества являются производными углеводов. Это высокомолекулярные полимерные соединения. В отличие от углеводов обладают кислотными свойствами вследствие присутствия в них галактуроновой кислоты.

Главным компонентом молекулы пектина является галактуроновая кислота.

Пектиновые вещества состоят из большого числа остатков галактуроновой кислоты, связанных между собой гликозидной связью. Большая часть карбоксильных групп этих остатков этерифицирована метилом.

В клеточных стенках пектин находится в соединении с целлюлозой и ионами металлов, образуя нерастворимый в воде протопектин. В зрелых плодах и овощах часть пектина находится в растворимом состоянии в клеточном соке. Протопектин можно перевести в раствор, прокипятив со слабой кислотой, в результате чего он гидролизует, образуя растворимый пектин. Под действием щелочи или фермента пектиназы из пектина получается пектиновая кислота. Ее кальциевая и магниевая соли входят в состав срединных межклеточных пластинок.

Метод основан на переводе различных пектиновых веществ в раствор, превращении их в пектиновую кислоту, на осаждении последней в виде кальциевой соли и учета ее весовым способом.

Реактивы

- 1) 0,03 н. раствор соляной кислоты;
- 2) 1%-й раствор лимоннокислого аммония;
- 3) 0,4%-й раствор едкого натра;
- 4) 6%-й раствор уксусной кислоты;
- 5) 0,5 и 11,1%-ные растворы хлористого кальция.

Ход работы

Навеску свежего материала в 25 г тщательно растирают в ступке до однородной массы, переносят в коническую колбу, заливают 100 мл воды, нагретой до 45°C, и держат при этой температуре 30 мин на водяной бане. Затем колбу закрывают пробкой и взбалтывают 15–20 мин на электрокачалке. Через 20 мин жидкость фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу на 250 мл. Осадок в колбе заливают водой (75 мл), получают второй экстракт и в третий раз заливают водой 50–60 мл. все экстракты, соединенные в мерной колбе, доводят до черты. Если раствор мутный, его еще раз фильтруют.

Таким образом, получается первая вытяжка водорастворимых пектинов (1).

Затем в коническую колбу с осадком приливают 50 мл 0,3 н. раствора соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником и помещают на 30 мин в кипящую водяную баню. После этого фильтруют через складчатый фильтр в мерную колбу на 500 мл, осадок несколько раз промывают на фильтре горячей водой, сливая в ту же колбу. Фильтр вместе с осадком переносят в экстракционную колбу, заливают 50–70 мл 1%-го раствора лимоннокислого аммония, помещают в кипящую баню на 30 мин. фильтруют в ту же мерную колбу, промывают горячей водой, охлаждают, доводят смесь до метки. Получается вытяжка, содержащая нерастворимый в воде протопектин и пектиновую кислоту (2).

В дальнейшем весь ход анализа в обеих вытяжках совершенно одинаков и производится следующим образом.

Омыляют пектиновые вещества. Для этого к 50 или 100 мл первой вытяжки прибавляют равный объем (50 или 100 мл) 0,4%-го раствора едкого натра и оставляют на ночь при комнатной температуре. Утром раствор подкисляют тем же объемом (50 или 100 мл) нормальной уксусной кислоты и осаждают пектиновую кислоту 50 или 100 мл 11,1%-го раствора хлористого кальция. Полученный осадок пектата кальция отфильтровывают через заранее высушенный до постоянного веса фильтр. Затем осадок на фильтре промывают холодной дистиллированной водой для освобождения от хлористого кальция (проверка по реакции на хлор с азотнокислым серебром). После этого промывают несколько раз горячей водой для удаления солей. Фильтр с осадком переносят в бюкс и сушат до постоянного веса при 100–105°C. Вес осадка (разница между весом фильтра с осадком и без него) умножают на 0,9235 (для перевода на пектиновую кислоту). Учитывают разбавление и вычисляют процентное содержание пектина (вес осадка не должен превышать 0,03 г).

Со второй вытяжкой протопектина поступают так же, с той лишь разницей, что ее нейтрализуют едким натром до прибавления щелочи, необходимой для омыления.

Пример расчета. Навеска сырой моркови 25 г, вытяжка доведена до 250 мл, вес осадка пектата кальция 0,028 г.

В 50 мл содержится 0,028 г,

в 250 мл — х

$$X = \frac{250 \cdot 0,028}{50} = 0,1405 \text{ г, т.е.}$$

в навеске 25 г содержится 0,1405 г пектата кальция, или 0,562 % на сырое вещество.

При перерасчете на сухой вес (при содержании сухого вещества 11,8 %) это даст $11,8:0,562=100:x$, $x=4,59$ %. Для перевода пектата кальция на пектиновую кислоту: $4,59 \cdot 0,9235=4,24$ %.

Вытяжка протопектина доведена до 250 мл и из нее 25 мл. Осадок составляет 0,0281 г, т.е. в навеске 25 г содержится 0,281 г или 1,12 % на сырое вещество, на сухое $11,8:1,12=100:x$, $x=9,53$ % или $9,53 \cdot 0,9235=8,80$ % протопектина.

Общее количество пектиновых веществ составит $4,24+8,80=13,04$ % на сухую массу.

РАЗДЕЛ 3

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ДРУГИЕ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Фосфор занимает особое положение среди всех химических соединений, входящих в состав растений. Обмен фосфорных соединений играет важную роль в сложном комплексе взаимосвязанных и взаимозависимых реакций, составляющих в целом метаболизм живых клеток.

Фосфорсодержащие соединения растений широко распространены и весьма разнообразны. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других веществ. В качестве фитина он является резервным веществом. Особая роль в различных звеньях обмена веществ принадлежит нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатам (в частности, АДФ и АТФ), представляющих собой макроэргические соединения. Образование их осуществляется в процессе фотосинтетического и окислительного фосфорилирования.

Фосфор как носитель энергии необходим для многих биохимических процессов, таких как синтез белков, углеводный метаболизм, фотосинтез, дыхание и т.д. Фосфорный обмен – один из важных звеньев метаболических процессов, связанных с ростом растений.

Нуклеиновые кислоты, наряду с белками, составляют основу организации живой материи. Они играют первостепенную роль в синтезе белка и в процессе воспроизведения специфических свойств организма. Нуклеиновые кислоты включают в себя наследственную информацию и являются существенной частью тех механизмов клетки, благодаря которым эта информация передается потомству и реализуется в формообразовательных процессах в ходе онтогенеза.

Учет содержания нуклеиновых кислот (НК) в растениях сопряжен с определенными трудностями. Они обусловлены главным образом низким содержанием НК относительно других соединений, мешающих их определению. Существуют различные методы определения НК в растительных тканях, основанные на анализе их составных компонентов: азотистых оснований, пентоз или фосфора.

Различают несколько методов экстракции и разделения НК. Основой для всех модификаций служат методы Г.Шмидта и С.Таннгаузера, а также М.Огура и К.Розена, основанные на последовательном извлечении нуклеиновых кислот с помощью разбавленных растворов щелочи и кислот.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ФОСФОРА МЕТОДОМ ДЕНИЖЕ

Метод основан на способности фосфорной кислоты давать синее окрашивание с молибденово-кислым аммонием в присутствии хлористого олова.

Реактивы

1) Раствор H_2SO_4 (75 мл концентрированной кислоты с уд. весом 1,84 и доводят дистиллированной водой до 0,5 л);

- 2) раствор молибденовокислого аммония (10 г соли растворяют в воде и доводят до 0,5 л;
- 3) раствор хлористого олова (10 г соли растворяют под тягой в 25 мл концентрированной HCl, тщательно перемешивают, далее берут пипеткой 0,25 мл раствора и доводят 1 н. H₂SO₄ до 10 мл – берут на определение 0,1 мл);
- 4) 1 н. H₂SO₄;
- 5) 10 н. H₂SO₄ (143 мл концентрированной кислоты доводят до 0,5 л водой);
- 6) 40%-ный раствор KOH;
- 7) 2% -ный раствор H₂SO₄;
- 8) индикатор метилрот (0,01 г растворяют в 30 мл 96° спирта и доводят до 50 мл водой).

Ход работы

Тщательно измельченную навеску растительного материала в 50 мг помещают в колбу Кьельдаля на 150 мл и прибавляют 2 мл 10 н. H₂SO₄ и 1,5 мл концентрированной HNO₃. Колбу закрывают колпачком и ставят на сжигание в вытяжном шкафу на электроплитку. Раствор сжигается до появления белого дыма. Сжигание считается законченным, когда раствор в колбе станет бесцветным; если раствор имеет желтоватый цвет, то добавляют 15–20 капель HNO₃ и продолжают сжигание. Затем колбу охлаждают, приливают в нее 15–20 мл воды и кипятят 10 мин для гидролиза пиррофосфата до ортофосфата. Из колбы раствор сливают в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки водой. Получается испытуемый раствор для определения общего фосфора.

В мерную колбу на 50 мл берут 1 мл испытуемого раствора, добавляют 15 мл воды и 2 капли индикатора метилрот, приливают по каплям 40%-ный раствор NaOH до появления желтой окраски. Потом прибавляют по каплям 2% H₂SO₄ до появления слаборозовой окраски. Затем приливают 10 мл смеси H₂SO₄ и молибденовокислого аммония в отношении 1:1 (реактивы 1 и 2). Доливают воду почти до метки, перемешивают, приливают микропипеткой 0,1 мл хлористого олова, доводят до метки, перемешивают. Через 20 мин колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах толщиной 5 или 10 мм.

Содержание общего фосфора определяют по следующей формуле:

$$\text{Общий фосфор (мкг на 1 г навески)} = \frac{\text{количество} \times 50}{\text{навеска}(\text{г})},$$

где 50– разведение.

Построение калибровочной кривой

Готовят стандартный раствор. Навеску 0,1756 г KН₂РO₄, прокаленного в термостате в течение 2 час при температуре 105° растворяют в мерной колбе на 250 мл (5 мл этого раствора содержит 800 мкг фосфора). В мерную колбу на 250 мл берут 5 мл этого раствора и доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивая. В 1 мл этого раствора содержится 4 мкг фосфора. Шкала строится по количеству фосфора в 50 мл раствора. В мерные колбы на 50 мл берут по одному, двум, трем, четырем пяти, шести и т.д. мл стандартного раствора.

Затем в каждую колбу приливают 10 мл смеси H_2SO_4 и молибденовокислого аммония в соотношении 1:1, доводят водой почти до метки, перемешивают и приливают по 0,1 мл хлористого олова. Доводят содержимое колбы до метки, перемешивают и через 20 мин колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром, определяют оптическую плотность каждого из растворов. Затем строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс содержание фосфора в мкг, а по оси ординат – оптическую плотность растворов. Для определения неизвестной концентрации достаточно измерить оптическую плотность и затем найти по графику соответствующее значение концентрации.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Метод основан на последовательном выделении с помощью различных растворителей фосфорсодержащих веществ, их гидролизе и определении содержания фосфора.

Реактивы

- С 1 по 8 реактивы из предыдущей работы;
9) 10%-ная трихлоруксусная кислота (ТХУ);
10) смесь спирта и эфира в соотношении 3:1;
11) смесь спирта и хлороформа в соотношении 1:1;
12) 1 н. хлорная кислота; 2 н. NaOH.

Ход работы

Кислоторастворимый фосфор

Тонко измельченную навеску растительного материала 200 мг помещают в центрифужную пробирку, заливают 10 мл 10%-ной ТХУ и настаивают при перемешивании стеклянной палочкой 10 мин. Затем центрифугируют при 3000–5000 об/мин 5 мин и надосадочную жидкость сливают в мерную колбу на 50 мл. Осадок вновь заливают 10 мл 10%-ной ТХУ выдерживают 10 мин и вновь центрифугируют. Так повторяют еще раз. Все экстракты отделенные центрифугированием, объединяют, доводят в мерной колбе до 50 мл водой (это кислоторастворимая фракция).

Из содержимого мерной колбы берут 5 мл в колбу Кьельдаля, добавляют 2 мл 10 н. H_2SO_4 , 1,5 мл HNO_3 и сжигают до появления белого дыма. После охлаждения колб приливают 20 мл воды и кипятят 10 мин. Содержимое колб Кьельдаля переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят водой до метки и берут на определение 5 мл (см. определение общего фосфора). Кислоторастворимый фосфор (органический и неорганический) определяют по формуле:

$$P = \frac{\text{мкг} \cdot 50 \cdot 50}{5 \cdot 5 \cdot \text{навеска}(г)} \quad (\text{мкг P на 1 г сухого вещества}).$$

В этой же фракции без сжигания определяют неорганический фосфор. Для определения берут 5 мл (см. определение общего фосфора).

$$P = \frac{\text{мгк} \cdot 50}{5 \cdot \text{навеска}(г)} \text{ (мкг Р на 1 г сухого вещества)}$$

Липоидный фосфор

Оставшийся осадок в центрифужной пробирке заливают 10 мл смеси этилового спирта и эфира в соотношении 3:1 и настаивают при перемешивании 20 мин. Центрифугируют при 3000–5000 об./мин, центрифугат сливают в колбу Къельдаля. Затем содержимое пробирки заливают 10 мл смеси спирта и хлороформа в соотношении 1:1, закрывают обратным холодильником и нагревают на водяной бане 20 мин при температуре не выше 50°. Затем раствор центрифугируют и центрифугат сливают в ту же колбу Къельдаля. Два соединенных экстракта выпаривают на водяной бане в колбе Къельдаля без колпачка до тех пор, пока на дне не останется несколько капель. В охлажденную колбу наливают 2 мл 10 н. H₂SO₄ и 1,5 мл HNO₃ и сжигают до появления белого дыма. После охлаждения колб приливают 20 мл воды и кипятят 10 мин. Затем содержимое в мерной колбе на 50 мл доводят водой. На определение берут 5 мл (см. определение общего фосфора). Липоидный фосфор определяют по формуле:

$$P = \frac{\text{мгк} \cdot 50}{5 \cdot \text{навеска}(г)} \text{ (мкг Р на 1 г сухого вещества)}$$

Нуклеиновый фосфор

Оставшийся осадок в пробирке заливают 10 мл 1 н. хлорной кислотой и настаивают при перемешивании стеклянной палочкой 10 мин. Затем центрифугируют при 3000–5000 об./мин 5 мин, надосадочную жидкость сливают в мерную колбу на 50 мл. Так повторяют еще 2 раза. Все экстракты, отделенные центрифугированием, соединяют и доводят в колбе до метки 1 н. хлорной кислотой. На сжигание берется 5 мл. После сжигания и доведения водой до 50 мл на определение нуклеинового фосфора используется 20 мл (см. определение общего фосфора).

$$P = \frac{\text{мгк} \cdot 50 \cdot 50}{5 \cdot 20 \cdot \text{навеска}(г)} \text{ (мкг Р на 1 г сухого вещества)}$$

Фосфопротеиновый фосфор

Осадок в пробирке заливают 10 мл 2 н. NaOH и экстрагируют 10 мин. Центрифугируют 5 мин при 3000–5000 об./мин, центрифугат сливают в мерную колбу на 50 мл. Так повторяют еще два раза. Все экстракты доводят до метки этой же щелочью. На сжигание берется 5 мл. После сжигания охлаждают, добавляют 20 мл воды и кипятят 10 мин. Затем доводят объем до 50 мл водой. На определение фосфопротеинового фосфора берут 20 мл (см. определение общего фосфора).

$$P = \frac{\text{мгк} \cdot 50 \cdot 50}{5 \cdot 20 \cdot \text{навеска}(г)} \text{ мкг Р на 1 г сухого вещества}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТИНА В СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ

Метод определения фитина (соли инозитгексафосфорной кислоты) основан на извлечении его соляной кислотой с последующим осаждением хлорным железом с образованием фитата железа, нерастворимого в разбавленной кислоте.

Реактивы

- 1) 0,6%-ный раствор HCl ;
- 2) 0,5%-ный раствор FeCl_3 в 0,6%-ной HCl

Ход работы

В мерную колбу на 50 мл помещают 1 г тонкоизмельченных семян, приливают 40 мл 0,6%-ного раствора HCl и настаивают 3 ч, периодически взбалтывая. Затем экстракт фильтруют через плотный обеззоленный фильтр.

В две центрифужные пробирки (на 20–25 мл) берут по 10 мл фильтрата и по каплям при встряхивании приливают в них 0,5%-ный раствор FeCl_3 в 0,6%-ном растворе HCl до момента появления хлопьевидного осадка (обычно требуется 0,5 мл раствора). Проводить осаждение лучше на ночь. Если надосадочная жидкость будет прозрачной, значит, осаждение проведено полностью. Осадок отделяют центрифугированием при 4000–5000 об/мин в течение 5 мин и дважды промывают его 0,6%-ной HCl .

Осадок в центрифужной пробирке заливают 2 мл концентрированной H_2SO_4 , после растворения осадка раствор переносят в колбу Кьельдаля на 50 мл, пробирку отмывают еще 1 мл H_2SO_4 и 3 мл HNO_3 . Колбу с растворенным осадком ставят на сжигание на 30–60 мин. Озоление ведут вначале при умеренном нагреве. Фосфор фитина после озоления определяют колориметрическим методом. Количество найденного фосфора (в P_2O_5) умножают на коэффициент 1,55 и находят содержание фитина в пересчете на инозитгексафосфорную кислоту.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ПУРИНАМ

Спектрофотометрический метод определения нуклеиновых кислот (НК) в ультрафиолетовом свете (УФ) зарекомендовал себя как весьма надежный, чувствительный и экономичный метод анализа. В настоящее время широкое применение нашло прямое спектрофотометрическое определение НК в тканевых экстрактах при изучении нуклеинового обмена. Такое определение дает вполне удовлетворительные результаты также при работе с эмбриональными тканями растений. Однако, использование этого метода для определения НК в дифференцированных тканях высших растений связано с трудностями: низкое относительное содержание НК в тканях, высокое содержание белка по отношению к НК, наличие в тканях пигментов, дубильных, лигнинообразующих и других веществ, поглощающих УФ в прилежащих областях спектра НК.

В.Г.Конарев и С.Л.Тетерев (1970) предложили метод прямого определения НК по сумме пуриновых оснований, извлеченных из серебряного комплекса. Этот вариант метода позволяет быстро и довольно точно с малой затратой реактивов производить массовые анализы в любых растительных клетках.

Определение суммы нуклеиновых кислот по пуринам

Метод основан на способности НК при сравнительно мягком кислотном гидролизе отделять пурины, осаждающиеся в виде серебряных комплексов, которые отмываются от примесей и после извлечения из комплексов определяются спектрофотометрически.

Реактивы

- 1) 80%-ный этиловый спирт с 0,001 н. H_2SO_4 ;
- 2) 80%-ный этиловый спирт нейтральный;
- 3) ацетон;
- 4) смесь этилового спирта с этиловым эфиром(1:1);
- 5) 1 н. H_2SO_4 ;
- 6) 0,5 н. $AgNO_3$;
- 7) 1 н. HCl ;
- 8) насыщенный раствор Ag_2SO_4 в 0,01 н. H_2SO_4 .

Сернокислое серебро можно получить из азотнокислого серебра по реакции: $2AgNO_3 + H_2SO_4 = Ag_2SO_4 + 2HNO_3$

34 г $AgNO_3$ растворяют в фарфоровой чашке с 6-10 мл воды. К полученному перенасыщенному раствору постепенно добавляют 20 мл концентрированной H_2SO_4 . Аморфный белый осадок промывают 100 мл 80%-ного спирта на стеклянном фильтре № 3 и затем сушат 96%-ным спиртом. Полученную соль в бюксе подсушивают 1-2 ч в термостате при 60° и выдерживают сутки в эксикаторе, избегая попадания света. Реактив хранится в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

Подготовка исследуемого образца

Определение нуклеиновых кислот проводится в свежем или фиксированном материале. Фиксацию растений проводят различными способами, например, лиофилизацией, кипящим этанолом, смесью кипящего этанола с ацетоном (3:1). Растительную ткань, фиксированную в органических растворителях, досушивают в термостате при $55-70^\circ$, растирают до пылевидного состояния и хранят в эксикаторе на КОН, фосфорным ангидридом или $CaCl_2$.

Тонко измельченный, фиксированный, воздушно-сухой материал (листья, стебли, зерно и т.д.) в количестве 1–2 г смачивают 5 мл 80%-ного этанола, содержащего 0,001 н. H_2SO_4 , растирают в фарфоровой ступке и постепенно в течение 15 мин добавляют подкисленный спирт до 20 мл. Взвесь фильтруют при слабом вакууме через воронку Бюхнера. Осадок промывают на фильтре нейтральным 80%-ным спиртом, затем ацетоном и смесью спирта с эфиром (1:1). Промывку проводят частями по 5 мл из расчета 20 мл каждого растворителя. Осадок подсушивают на фильтре на воздухе. Данная операция

позволяет удалить из исследуемого материала хлориды, свободные пурины нуклеинового происхождения, пигменты и большую часть липидов.

Гидролиз 1 н. H₂SO₄

Осадок с фильтра количественно переносят в колбу, добавляют 20 мл 1 н. H₂SO₄ и осторожно перемешивают. Колбу соединяют с воздушным холодильником и помещают в кипящую водяную баню на 1 час. После гидролиза содержимое колбы охлаждают и фильтруют через воронку с беззольным фильтром или центрифугируют при 3000 об./мин. В этих условиях достигается количественное отделение пуринов от нуклеиновых кислот.

Осаждение пуринов

К 10 мл гидролизата на холоду добавляют 1 мл 0,5 н. раствора AgNO₃, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 1 ч, при этом осаждается серебряный комплекс пуринов. Пуриновый комплекс отделяют центрифугированием при 2000 об/мин. Центрифугат отбрасывают, а осадок подвергают двукратной промывке насыщенным раствором Ag₂SO₄ в 0,01 н. H₂SO₄ по 1–2 мл каждый раз, тщательно перемешивая и выдерживая перед центрифугированием на льду. При этом особое внимание следует уделять полноте удаления центрифугата при последней промывке осадка. Просушку стенок пробирок производят полосками фильтровальной бумаги.

Растворение серебряного комплекса пуринов

Осадок растворяют в 1 мл 1 н. HCl и выдерживают 1 ч при температуре 15–25° в термостате. После разрушения серебряного комплекса осадок AgCl удаляют центрифугированием. Центрифугат, содержащий сумму пуринов, спектрофотометрируют.

Спектрофотометрирование

Лучшая воспроизводимость результатов получается при концентрации пуринов от 4 до 12 мкг на 1 мл измеряемого раствора. Для этого солянокислые растворы разводят в 50-200 раз дистиллированной водой. Измерение проводят в кюветах на 10 мм при 255 нм, контроль – 1 н. HCl, разведенная в соответствующее количество раз.

Начиная с момента осаждения пуринов, следует избегать попадания на растворы и осадки прямых солнечных лучей, в противном случае конечный раствор окажется потемневшим и непригодным для спектрофотометрирования.

Расчет содержания нуклеиновых кислот

Вычисление содержания НК производится по формуле:

$$C_{НК} = \frac{E_{\max} \cdot K \cdot F}{H}, \text{ где}$$

C – концентрация НК, в мг% в навеске,

E – экстинция при максимуме поглощения,

F – разведение,

H – навеска, в г,

K – постоянное число, выведенное на основании молекулярной массы пуринов (аденина и гуанина), миллимолярной экстинкции и их процентного содержания в молекуле условного тетрануклеотида.

Для получения результатов анализа в мг% нуклеиновых кислот (при условии осаждения половины взятого на гидролиз объема и точного соблюдения описанной методики) $K = 11,32$.

Преимуществом метода прямого спектрофотометрирования является возможность определения малых количеств НК в растительном материале и значительного сокращения времени анализа и расхода реактивов.

Пример расчета. Завязь кукурузы с гигроскопической влагой 10,88% в количестве 1,0 г гидролизовалась 20 мл 1 н. H_2SO_4 , после фильтрации на осаднение было взято 10 мл (половина взятого на гидролиз объема). Осадок серебряного комплекса растворялся в 1 мл 1 н. раствора HCl . Для измерения на разведение было взято 0,2 мл раствора и доведено до 20 мл дистиллированной водой, т.е. $F = 100$. В качестве контроля использовалась 0,01 н. HCl в максимуме поглощения при 255 нм $E = 1,100$. Отсюда,

$$C_{НК} = \frac{E_{\max} \cdot K}{H} = \frac{1,100 \cdot 11,32 \cdot 100}{1,0} = 1245,2 \text{ мг\%}$$

В пересчете на абсолютно сухое вещество сумма НК составила 1397,2 мг %.

РАЗДЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ПУРИНАМ

Для рекогносцировочного определения соотношения пуринсодержащих соединений применим метод последовательного отделения пуринов.

В основу метода положена различная извлекаемость пуринсодержащих соединений и различная чувствительность ДНК и РНК к кислотному гидролизу. Пурины, выделенные из гидролизатов в виде серебряных комплексов, определяются спектрофотометрически, затем вычисляется количественное содержание НК по пуринам.

Реактивы

- 1) 7%-ный раствор ТХУ;
- 2) 1%-ный раствор ТХУ;
- 3) 10 н. H_2SO_4 ;
- 4) 0,1 н. H_2SO_4 ;
- 5) 0,5 н. $AgNO_3$;
- 6) 1 н. HCl ;
- 7) насыщенный раствор Ag_2SO_4 в 0,01 н. H_2SO_4 .

Определение кислоторастворимых пуринсодержащих соединений

Свежий или фиксированный горячим спиртом материал в количестве 0,2-1,0 г на сухое вещество растирают в фарфоровой ступке на льду с 10 мл 7%-ной ТХУ в течение 20 мин и центрифугируют 15 мин при 5000-6000 об/мин.

Кислый экстракт сливают в мерную колбу на 100 мл. Осадок 2 раза промывают охлажденным 1%-ным раствором ТХУ. Каждый раз перед центрифугированием осадок тщательно суспензируют. В заключение осадок 1-2 раза промывают 10 мл холодной дистиллированной водой. Все центрифугаты соединяют с кислым экстрактом и объем доводят до 100 мл водой.

От полученного экстракта отбирают 20 мл в колбочку с обратным холодильником, добавляют 2 мл 10 н. H_2SO_4 (конечная концентрация 1 н.) нагревают на кипящей водяной бане 1 ч. Гидролизат охлаждают, фильтруют через плотный бумажный фильтр и половину объема берут на осаждение пуринов. Для этого к гидролизату, охлажденному на льду, добавляют 1 мл холодного раствора 0,5 н. $AgNO_3$ при перемешивании и смесь ставят в холодильник на 1 ч. Осадок пуринов отделяют центрифугированием при 2000-3000 об/мин, центрифугат отбрасывают, а осадок 2 раза промывают насыщенным раствором Ag_2SO_4 в 0,01 н. H_2SO_4 при тщательном перемешивании стеклянной палочкой. Каждый раз берут по 5 мл раствора и перед центрифугированием выдерживают на льду по 5 мин.

После второй промывки стенки центрифужной пробирки осторожно просушивают полосками фильтровальной бумаги от раствора Ag_2SO_4 . Осадок заливают 1 мл 1 н. HCl при тщательном перемешивании тонкой стеклянной палочкой и выдерживают в темноте 1 ч при комнатной температуре. Образовавшийся осадок хлористого серебра отделяют центрифугированием и отбрасывают. В центрифугате определяют пурины на спектрофотометре. Для этого солянокислый раствор разводят в 5-10 раз и измеряют оптическую плотность при 255 нм.

Расчеты производят на пурины или на НК по формуле:

$$C_{НК} = \frac{E_{\max} \cdot K \cdot F}{n} = \text{мг}\%, \text{ где}$$

K – постоянное число, выведенное на основании суммы молекулярного веса пуринов и миллимолярных экстинций, при пересчете на нуклеиновые кислоты, $K = 11,32$,

E – экстинция в максимуме поглощения,

F – разведение,

n – навеска в г (20 мл составляет 1/5 часть навески).

Для получения результатов анализа (в мг %) необходимо точное соблюдение условий, описанных в предлагаемой методике. При работе со свежим материалом навеску следует увеличить в 5-6 раз.

После удаления кислоторастворимой фракции остаток промывают последовательно этиловым спиртом, ацетоном, спирто-эфирной смесью и эфиром (по 10 мл). Экстракты отбрасывают. Таким образом, удаляется основная масса липидов и пигментов, после чего в остатке определяют НК.

Определение ДНК

Остаток после удаления кислоторастворимой фракции, липидов и пигментов (остаток 1) тщательно суспендируют в 20 мл 0,1 H_2SO_4 и выдерживают в термостате при 37° 18 час. После этого инкубат охлаждают и

центрифугируют при 5000-6000 об/мин 5 мин. Центрифугат сливают в колбочку на 50 мл. Осадок (остаток 2) промывают центрифугированием 5 мл 0,1 н. H_2SO_4 для количественного удаления раствора, содержащего пурины ДНК. Раствор добавляют к первому центрифугату, к которому приливают 2 мл 10 н. H_2SO_4 (конечная концентрация 1 н. раствор). Смесь гидролизуют на кипящей бане 1 час, охлаждают и фильтруют.

Из всего гидролизата пурины осаждают 2 мл 0,5 н. $AgNO_3$ и выдерживают в холодильнике в течение 1 часа.

Отделение осадка серебряного комплекса, его промывка сернокислым серебром и последующий гидролиз 1 н. HCl по прописи для кислоторастворимой фракции.

Солянокислый раствор препарата ДНК разводят в 5-10 раз и определяют оптическую плотность при 255 нм.

Расчет содержания ДНК по пуринам производится по формуле:

$$C_{ДНК} = \frac{E_{\max} \cdot K \cdot F}{n \cdot 2} = \text{мг\% ДНК}, \text{ где}$$

E – экстинция в максимуме поглощения,

K – для ДНК – 11,94,

F – разведение,

n – навеска в г.

Увеличение знаменателя в 2 раза связано с тем, что для осаждения пуринов ДНК берется весь объем гидролизата навески.

Определение РНК

Остаток после удаления ДНК (остаток 2) подвергают гидролизу для отщепления пуринов РНК. Его количественно переносят в колбочку, заливают 20 мл 1 н. H_2SO_4 и гидролизуют на кипящей водяной бане 1 час. После фильтрации в половине объема раствора, взятого на гидролиз (10 мл) осаждают пурины РНК. Для этого добавляют 1 мл 0,5 н. $AgNO_3$ и смесь ставят в холодильник на 1 час.

Отделение осадка серебряного комплекса, его промывка сернокислым серебром и последующий гидролиз 1 н. HCl по прописи для кислоторастворимой фракции.

Солянокислый раствор препарата РНК разводят в 5-10 раз и определяют оптическую плотность при 255 нм.

Расчет содержания РНК по пуринам производится по формуле:

$$C_{РНК} = \frac{E_{\max} \cdot K \cdot F}{n} = \text{мг\% РНК}, \text{ где}$$

E – экстинция в максимуме поглощения,

K – для РНК – 11,32,

F – разведение,

n – навеска в г.

Определение НК по пуринам в сравнении с методом определения их по фосфору дает несколько завышенные результаты для ДНК и заниженные для

РНК. В большей степени это касается тканей богатых лабильной ДНК, незащищенной белками.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ВОЛГИНА И ПАРТЬЕ

Свойство пуриновых и пиримидиновых оснований интенсивно поглощать ультрафиолетовые лучи в зоне 260 нм используется для определения НК спектрофотометрическим методом. Высокая чувствительность, специфичность, надежность этого метода делают его весьма перспективным

Применение спектрофотометрического метода для определения НК в растениях, однако, связано с большими трудностями из-за наличия в нем веществ, которые, так же как и НК, обладают свойством поглощать ультрафиолетовые лучи (особенно мешают пигменты, белки и пептиды). Значительная часть этих примесей удаляется предварительной обработкой растительного материала различными растворителями и слабыми растворами охлажденных кислот (HClO_4 , ТХУ) в условиях, исключающих потери и деградацию НК.

Данный метод определения НК разработан Волгиным и Партье. Преимуществом этой модификации является сокращение времени щелочной экстракции по сравнению с методом Шмидта и Тангаузера и другими его модификациями, что значительно ускоряет проведение анализа в целом.

Реактивы

- 1) 96%-ный этанол;
- 2) 85% и 100%-ный ацетон;
- 3) серный эфир;
- 4) 96%-ный этанол, забуференный 2%-ным (конечная концентрация) ацетатом натрия;
- 5) смесь 96%-ного этанола со 85%-ным ацетоном (3:1);
- 6) смесь 96%-ного этанола с серным эфиром (1:1),
- 7) 0,2 н., 0,5 н., 1,2 н. HClO_4 ;
- 8) 0,5 н. КОН.

Предварительная обработка материала

Навеску 2–5 г свежего растительного материала, содержащего приблизительно 2–10 мг РНК и 1–2 мг ДНК, фиксируют 50 мл кипящей смеси 96%-ного этанола со 100% ацетоном (3:1) 2 мин, после чего навеску гомогенизируют в этой смеси растворителей и последовательно обрабатывают смесью 96%-ного этанола с 85% ацетоном (3:1) 2 мин, 85%-ным ацетоном, серным эфиром, 100%-ным ацетоном. Осадок отделяют высокоскоростным центрифугированием, затем охлаждают и добавляют 10–20 мл тщательно охлажденной 0,2 н. HClO_4 .

Осадок смешивают с хлорной кислотой на льду и выдерживают 10 мин. Смесь центрифугируют, центрифугат отбрасывают, а осадок дважды промывают охлажденной 0,2 н. HClO_4 по 10 мл. Чтобы избавиться от избытка

кислоты в осадке, центрифужную пробирку переворачивают на фильтровальную бумагу. Остаток хлорной кислоты отмывают (1–2 раза) на холоду этанолом, забуференным ацетатом натрия.

Все операции, связанные с обработкой материала хлорной кислотой и ее отмывкой, должны проводиться быстро и при температуре 0–3°.

Далее осадок последовательно обрабатывается при комнатной температуре смесью 96%-ного этанола с эфиром (1:1), серным эфиром и ацетоном. Последняя промывка ацетоном проводится с целью предотвращения ороговения материала. Белый порошок после обработки ацетоном досушивается в вакуум-эксикаторе над КОН или над фосфорным ангидридом.

Щелочная экстракция нуклеиновых кислот и отделение РНК от ДНК

Из подготовленного материала НК извлекают 0,5 н. КОН в течение 1 ч при 37°.

На 100–150 мг порошка расходуется 10–15 мл щелочи. Обычно одночасовой период щелочной инкубации при 37° является достаточным для полного извлечения НК из растительной ткани. После щелочной инкубации пробы тщательно охлаждают до 0° и центрифугируют. Осадок (белки, углеводы и др. примеси) промывают охлажденным 0,5 н. раствором КОН, затем отбрасывают, а щелочные гидролизаты (экстракт НК) объединяют.

К объединенному центрифугату осторожно по капле при постоянном помешивании добавляют рассчитанное количество охлажденной 1,2 н. HClO_4 до конечной концентрации 0,2 н. При этом выпадает осадок, содержащий ДНК, перхлорат калия и белки. В растворе находятся продукты щелочной деградации РНК.

После 10 минутного стояния на холоду осадок отделяют центрифугированием при 0° и дважды промывают небольшим количеством 0,2 н. HClO_4 . Центрифугаты, содержащие всю РНК ткани, объединяют, гидролизуют на кипящей водяной бане 15 мин и после фильтрации через стеклянный фильтр № 4 используют для спектрофотометрического определения РНК. В гидролизате РНК должна отсутствовать ДНК (тест на дезоксирибозу).

Осадок ДНК заливают 10–15 мл 0,5 н. HClO_4 и гидролизуют 30 мин на кипящей бане. Для гидролиза ДНК хлорную кислоту берут в таком количестве, чтобы гидролизат содержал примерно 0,05–0,1 мг ДНК в 1 мл.

Описанные выше операции основаны на том, что HClO_4 при нагревании гидролизует НК и осаждает значительную часть белков, мешающих спектрофотометрированию. Действие HClO_4 примерно такое же, как и ТХУ, однако предпочтение отдается первой потому, что она обладает меньшим поглощением в УФ.

Гидролизом устраняется гипохромизм и нивелируется оптическая плотность НК, обусловленная структурным состоянием их молекул и особенно состоянием азотистых оснований. Часть белка остается в гидролизатах, поэтому содержание НК определяется по разности поглощения гидролизата при 270 нм (область НК) и при 290 нм (область белков).

Для определения концентрации НК измеряют оптическую плотность гидролизата в нескольких параллельных пробах при 270 и 290 нм и сравнивают относительно контрольного раствора.

Концентрация фосфора НК (С) вычисляется по формуле:

$$C_{нк} = \frac{E_{270} - C_{290}}{190}, \text{ где}$$

С – концентрация нуклеинового фосфора (в мг на 1 мл),

Е – оптическая плотность гидролизата при соответствующей длине волны,
190 – удельная экстинция.

Для перевода концентрации нуклеинового фосфора в концентрацию НК необходимо ввести пересчетный коэффициент: для ДНК – 10,1, для РНК – 10,5, для суммы НК – 10,3.

Содержание НК, например ДНК (в мг на 1 г исследуемой ткани) вычисляют по формуле:

$$C_{днк} = \frac{C \cdot 10,1 \cdot V}{n}, \text{ где}$$

С_{днк} – количество ДНК (в мг на 1 г ткани),

С – концентрация нуклеинового фосфора (в мг на 1 мл),

10,1 – пересчетный коэффициент,

V – общий объем гидролизата ДНК (в мл),

Н – навеска исследуемого материала (в г).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ПЕНТОЗАМ

Для определения нуклеиновых кислот широко используются цветные реакции на рибозу и дезоксирибозу. Наличие специфических реакций на эти пентозы исключают необходимость предварительного разделения ДНК и РНК. Для количественных определений составляются калибровочные кривые.

Определение ДНК реакцией с дифениламином по Дише

Реактивы

- 1) ледяная уксусная кислота, хч;
- 2) H₂SO₄;
- 3) дифениламин, дважды перекристаллизованный из 70%-ного этанола; дифениламиноый реактив получают растворением 1 г дифениламина в 100 мл ледяной уксусной кислоты с 2,75 мл H₂SO₄;
- 4) препарат ДНК.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят исходный раствор ДНК следующим образом. Берут 90–100 мг ДНК и растворяют в 50 мл 0,01 н. NaOH. Концентрацию ДНК определяют спектрофотометрически и рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{ДНК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,1}{0,19}, \text{ где}$$

$C_{\text{ДНК}}$ – концентрация ДНК в растворе (в мкг на 1 мл),

$E_{270} - E_{290}$ – разность экстинций при определенных длинах волн,

10,1 – коэффициент пересчета,

0,19 – удельная экстинция.

Из исходного раствора готовят разведения с концентрациями ДНК 50, 100, 150, 200, 300, 400, и 500 мкг в 1 мл.

К 1 мл раствора ДНК каждого разведения добавляют 2 мл дифениламинового реактива. Полученную смесь кипятят на водяной бане 10 мин. После кипячения раствор ДНК дает синюю окраску, стабильную в течение нескольких часов. Максимум поглощения раствора лежит в области 595 мкм. По результатам фотометрирования строят стандартную кривую.

Определение РНК орциновой реакцией

Реактивы

1) препарат РНК;

2) орциновый реактив – 100 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл концентрированной HCl и добавляют 3,5 мл 6%-ного раствора орцина в этиловом спирте.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят исходный раствор РНК (5-10 мг РНК в 50 мл 0,05 н. NaOH). Концентрацию РНК в исходном растворе определяют спектрофотометрически и рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{РНК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,5}{0,19}, \text{ где}$$

$C_{\text{РНК}}$ – концентрация РНК в растворе (в мкг на 1 мл),

$E_{270} - E_{290}$ – разность экстинций при определенных длинах волн,

10,1 – коэффициент пересчета,

0,19 – удельная экстинция.

Из исходного раствора готовят разбавленные растворы с концентрациями РНК, равными 5, 10, 20, 30, 40 мкг на 1 мл.

К 1 объему раствора РНК во всех разведениях прибавляют по 2 объема орцинового реактива. Реакционную смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин и затем охлаждают водопроводной водой. На спектрофотометре измеряют поглощение при 665 нм против контрольной пробы.

Раствор РНК, содержащий 40 мкг в 1 мл, дает экстинцию 0,18. Экстинция пропорциональна концентрации РНК в пределах 10-100 мкг на 1 мл

Орциновая реакция мало специфична, т.к. не только рибоза, но также дезоксирибоза, метилпентоза дает зеленое окрашивание. Все эти вещества могут встречаться в тканевых экстрактах, предназначенных для определения РНК.

Определение РНК по реакции с флороглюцином

При определении по рибозе в присутствии ДНК орциновый реактив неприменим, так как орцин реагирует с обеими пентозами. В этом случае рибоза определяется с флороглюцином.

Реактивы

- 1) препарат РНК;
- 2) 0,1%-ный раствор FeCl_3 в смеси концентрированных растворов HCl и CH_3COOH (1:6 по объему);
- 3) 0,25%-ный раствор флороглюцина, который готовят на смеси 1 части концентрированной HCl , 1 части воды и 2 частей ледяной уксусной кислоты.

Ход работы

Исследуемый раствор в количестве 1 мл (0,25 – 2,0 мг РНК) нагревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане с 8 мл раствора FeCl_3 . Смесь охлаждают и к ней добавляют 1 мл 0,25%-ного раствора флороглюцина.

Смесь оставляют при комнатной температуре в течение 20 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане 4 мин (точно) и оставляют при комнатной температуре на 16-24 ч.

Измерения на ФЭК-56 производят со светофильтром № 8. Концентрацию РНК определяют по калибровочной кривой. Метод чувствителен в интервале от 50 до 200 мкг на 1 мл рибозы.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ГИПЕРХРОМНОМУ ЭФФЕКТУ

Вторичная структура молекул НК представляет собой двуцепную спираль, в которой две комплементарные друг другу цепи или участки полинуклеотидной цепи тесно сближены и удерживаются за счет водородных связей и гидрофобного взаимодействия специфических пар азотистых оснований.

Разрыв этих связей и разобщение комплементарных цепей как явление денатурации сопровождается потерей упорядоченной спиральной структуры и изменением ряда свойств – характеристической вязкости, коэффициента седиментации, коэффициента молярной экстинкции и т.д.

Особенно хорошо состояние вторичной структуры отражает прирост молярной экстинкции при тепловой денатурации НК (гиперхромный эффект). Величина гиперхромного эффекта характеризует степень сохранности структуры в молекуле ДНК, соотношение спирализованных и неспирализованных участков в молекуле РНК. Причем температура денатурации ДНК, характеризующая прочность вторичной структуры, хорошо коррелирует с содержанием в молекуле ГЦ-пар.

Реактивы

- 1) 0,01 М NaCl ;
- 2) чистые препараты ДНК;

3) 0,1 · SSC (0.15M NaCl в 0,015M цитрате натрия, pH 7,0).

Измерение гиперхромного эффекта ДНК

Препарат ДНК растворяют в 0,1 * SSC (из расчета 10-20 мкг ДНК в 1 мл). Раствор помещают в сантиметровую кварцевую кювету с герметичной крышкой для предотвращения испарения. На спектрофотометре определяют экстинкции (E_{260} нм) при температурах от 25 до 100° с интервалом не более 5° и выдержкой при определенной температуре в течение 5 – 10 мин. Обогрев и термостатирование кювет осуществляется с помощью ультратермостата U-10.

По результатам измерений строят кривую гиперхромного эффекта или кривую плавления спирали. Для этого по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора при измеряемой температуре (t°) к оптической плотности при 25°, а по оси абсцисс – температуру. Точку «плавления» ($T_{пл}$), или температуру денатурации ДНК, находят по кривой плавления. Она соответствует середине зоны подъема относительной экстинкции.

Зависимость между точкой плавления и содержанием ГЦ-пар в ДНК определяют по формуле:

$$T_{пл} = 69,3 : 0,4 \cdot (Г + Ц).$$

Содержание ГЦ-пар в молярных процентах равно:

$$R = \frac{T_{пл} - 69,3}{0,4}, \text{ где}$$

R – содержание ГЦ– пар (в моль %),
0,4 и 69,3 – постоянные коэффициенты.

Для построения кривой плавления необходимо найти относительную адсорбцию, которую вычисляют как отношение величин оптической плотности раствора ДНК при измеряемой температуре к оптической плотности при 25°.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ДНК МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Реактивы

- 1). 60–72% HClO_4 ;
- 2) изопропиловый спирт;
- 3) концентрированная HCl ;
- 4) препараты ДНК.

Гидролиз препаратов ДНК

Для гидролиза берут около 3 мг ДНК, помещают в пробирку и смачивают до полного увлажнения 60-72% HClO_4 . На 1 мг ДНК берут до 0,1 мл HClO_4 . Пробирку запаивают и нуклеиновая кислота гидролизуются 1 ч на кипящей водяной бане.

Разделение азотистых оснований

К образовавшемуся на дне пробирки после гидролиза осадку добавляют 1–2 капли воды и осадок тщательно растирают стеклянной палочкой до получения равномерной суспензии.

Разделение азотистых оснований ДНК получают при использовании кислого растворителя Уайта, состоящего из изопропилового спирта, соляной кислоты и воды в соотношении 170:41:39. При этом азотистые основания от линии старта располагаются в следующей последовательности: гуанин, аденин, цитозин, 5-метилцитозин, тимин. Тимин идет почти вплотную с фронтом растворителя. Предварительную промывку бумаги необходимо вести этим же растворителем в течение 2-3 суток.

Гидролизат в количестве 0,02-0,03 мл, содержащий 0,5–0,8 мг ДНК (из расчета его количества до гидролиза), наносят микропипеткой на линию старта «точкой» или полосой не шире 0,5–0,8 см.

После подсушивания бумажной полосы в токе теплого воздуха проводят повторное нанесение гидролизата на обратной стороне бумаги. Для насыщения воздуха парами растворителя на дно камеры ставят кювету с растворителем. Разделение азотистых оснований проходит при комнатной температуре в плотно закрытой камере в течение 18–24 ч.

Элюция и спектрофотометрия

Слегка подсушенные хроматограммы просматривают на ультрамикроскопе и отмечают простым карандашом пятна оснований. Элюцию пятен проводят 5 мл 0,1 н. HCl в течение ночи при 37°. Для элюции гуанина используют 1 н. HCl. Спектрофотометрию элюатов проводят в УФ-области при следующих длинах волн:

<i>Азотистое основание</i>	<i>Длина волны (в нм)</i>
Гуанин	250 и 290
Аденин	260 и 290
Цитозин	276 и 290
5-метилцитозин	280 и 300
Тимин	260 и 290

Для расчета количества оснований разность между поглощением при указанных длинах волн умножают на соответствующие коэффициенты, которые составляют: для гуанина – 0,714, аденина – 0,399, цитозина – 0,940, 5-метилцитозина – 0,893 и тимина – 0,743. Количество всех оснований (в микромолях) суммируют и от этой суммы (100%) определяют содержание отдельных оснований в процентах. Соотношение оснований в молярных процентах должно отвечать правилам Е. Чаргаффа:

$$\frac{A + G}{C + 5MC + T} = 1; \quad \frac{A + C + 5MC}{G + T} = 1$$

$$\frac{A}{T} = 1 \quad \frac{G}{C} = 1$$

Однако при использовании избытка HClO_4 для гидролиза ДНК содержание пиримидинов, особенно тимина, может быть занижено за счет его разрушения при гидролизе.

Нуклеотидный состав ДНК может быть определен по Делю. Для этого очищенную ДНК растворяют в 0,1 н. CH_3COOH (25-50 $\gamma/\text{мл}$). Измеряют оптическую плотность раствора при 260 и 280 нм против 0,1 н. CH_3COOH и содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК рассчитывают по эмпирической формуле

$$A = 168,6 - 87,4 \cdot E_{260}/E_{280}, \text{ где}$$

A – количество ГЦ-пар (в моль %).

Параллельно можно определить температуру плавления $T_{пл}$ и плавучую плотность по следующим формулам:

$$T_{пл} = 138,4 - 35,8 \cdot E_{260}/E_{280}$$

и

$$\rho = 1,825 - 0,086 \cdot E_{260}/E_{280}$$

Электорофорез нуклеиновых кислот

Выделение тотального препарата нуклеиновых кислот

Ход работы

Растительный материал (20–30 г) гомогенизируют на холоду (0–4°C) путем растирания в ступке с кварцевым песком в 20–30 мл экстрагента. Для подавления активности РНКаз используют бентонит (белую глину). Экстракцию нуклеиновых кислот осуществляют 3,5 объемами экстрагента по отношению к объему гомогената на холоду в течение 30 мин. Извлеченные из растительных тканей и растворенные в экстрагенте нуклеиновые кислоты очищают от белков депротеинизацией 80%-ным фенолом и хлороформом в отношении 1:1. Депротеинизацию проводят в течение 1 ч при постоянном перемешивании на качалке. Полученную суспензию расслаивают центрифугированием при 2500g в течение 40 мин при 2°C. Верхнюю водную фазу, содержащую нуклеиновые кислоты, декантируют и подвергают депротеинизации еще 2 раза. Нуклеиновые кислоты осаждают 2,5 объемами охлажденного до -10°C 96%-ного этанола в течение 18ч. Осадок нуклеиновых кислот многократно промывают охлажденным 70%-ным этанолом с последующим центрифугированием при 3000 об.мин в течение 15 мин при 2°C. Осадок хранят в 50%-ном этаноле при -10°C.

Теоретические основы электрофореза

Под электрофорезом обычно понимают движение заряженных частиц под влиянием электрического поля.

Метод электрофореза позволяет разделять белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты и другие макромолекулы с М.М. более 10000. Используется в биологии, медицине, судебной химии и т.п. Метод

электрофореза дает четкое разделение веществ и имеет высокую чувствительность (улавливает вещества, содержание которых около 10^{-12} г).

Молекулярным ситом являются гели – полиакриламидные (ПААГ), агарозные или крахмальные. Они характеризуются химической стабильностью, инертностью, прозрачностью. Разные концентрации гелей дают возможность получать гели с разной величиной пор.

Различают: 1) однородную систему геля, 2) диск-электрофорез с разным размером пор и pH в различных частях геля. В верхней части – крупнопористый концентрирующий гель. В нижней части – мелкопористый, разделяющий гель.

Структура полиакриламидного геля (ПААГ)

Полиакриламид является полимером акриламида (АА) и метилен-бис-акриламида (МБАА). Два мономера хорошо полимеризуются в присутствии тетраметилэтилендиаминового инициатора и персульфата калия или аммония как катализатора. В результате образуется пространственная сетка, пористость которой зависит от концентрации мономера, поэтому его разрешающую способность можно менять в зависимости от целей работ. Концентрация мономера в пределах от 2 до 30 % дает возможность получения геля с пористостью в границах от 400 до 1 Å°. Следовательно, выбрав определенную концентрацию АА, можно получить гель с порами нужного размера. Для разделения нуклеиновых кислот используют 2,5 % гель. АА и МБАА разлагаются светом, поэтому их растворы нужно хранить в темной склянке в холодильнике. АА токсичен !!!

Реактивы

- 1) 15% АА и 0,75% МБАА (7,5 г АА и 0,75 г МБАА растворить в 50 мл дист. воды, хранить в темной склянке в холодильнике).
 - 2) десятикратный трис-фосфатный буфер (43,61 г триса, 46,81 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,72 г ЭДТА растворить в 1 л дист. воды, pH довести до 7,8 концентрированной HCL).
 - 3) ТЕМЕД ($\text{N,N,N}',\text{N}'$ - тетраметил-этилен-диамин).
 - 4) персульфат аммония.
 - 5) 0,3% бромфеноловый синий на 30%-ной сахарозе (7,5 г сахарозы и 75 мг бромфенолового синего растворить в 25 мл воды).
 - 6) 7%-ная уксусная кислота.
 - 7) глицерин.
 - 8) 0,2%-ный метиленовый синий, приготовленный на 0,4 М уксусной кислоте.
- Все растворы хранить в холодильнике.

Ход работы

Электрофорез проводится в трубках в 2,5%-ном ПААГ по U.E. Loening (1967). Используют прибор фирмы «Реанал» (тип 69).

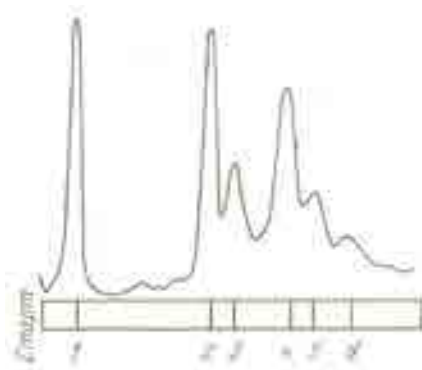
Приготовленные растворы вынуть из холодильника, нагреть до температуры лаборатории. Трубки обработать хромпиком, прокипятить в дистилляте, промыть и высушить. Приготовить раствор ПААГ из расчета 4-5 мл на одну трубку. Для приготовления 15 мл геля потребуется 2,5 мл раствора

АА и МБАА, 1,5 мл десятикратного буфера, 1 мл глицерина, 0,02 мл ТЕМЕДа и 15 мг персульфата аммония. Раствор геля тщательно перемешать на магнитной мешалке, поместить в колбу Бунзена и провести дегазацию. Залить раствор геля в трубки до определенной метки (1 см до края). Для образования ровной поверхности геля осторожно наложить на него воду. Оставить на полимеризацию, лучше на ночь.

После завершения процесса полимеризации стряхнуть с поверхности гелей воду и ввинтить трубки в прибор. В верхний резервуар налить разбавленный в 10 раз буфер. На каждую трубку через буфер наносится по 20-30 мкг суммарного препарата нуклеиновых кислот и 0,03 мл бромфенолового синего. Для расчета используют: оптическая плотность раствора нуклеиновых кислот при 260 нм, равная 22 соответствует концентрации 1000 у\мл. Залить разбавленный в 10 раз буфер в нижний резервуар и поместить прибор в холодильник. Электроды присоединить к УИПу, верхний электрод – положительный, нижний – отрицательный. Предварительный электрофорез проводится при силе тока 2 мА на трубку в течение 30 мин. Основной электрофорез проводится при 5 мА на трубку 2-3 ч. О месте положения нуклеиновой фракции дает информацию положение диска красителя свидетеля – бромфенолового синего. По окончании электрофореза вынуть из трубок гель, используя длинную иглу (обводить гель иглой под водой). Изъятые гели фиксируют 15 мин в 7%-ной уксусной кислоте и окрашивают 1 ч 0,2%-ным метиленовым синим, приготовленным на 0,4 М уксусной кислоте. Затем гели отмываются дистиллированной водой. Отмытые дистиллятом гели денситометрируют.

Рис.1. Денситограмма нуклеиновых кислот, выделенных из листьев пшеницы: 1 – ДНК, 2 – 25 S РНК, 3 – 23S РНК, 4 – 18S РНК, 5 – 16S РНК, 6 – 13S РНК.

25S и 18S РНК являются цитоплазматическими рибосомными РНК. 23S и 16S РНК являются хлоропластными рибосомными РНК. 13S РНК – продукт гидролиза 23S рРНК.



РАЗДЕЛ 4

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Органические кислоты растений разнообразны по своему строению, и некоторые из них широко распространены в различных органах. Ряд кислот под влиянием ферментов находится во взаимных превращениях (цикл трикарбоновых кислот; взаимное превращение щавелевой, глиоксидовой и гликолевой кислот).

Органические кислоты являются продуктами превращения углеводов; при синтезе белков они образуют углеродные скелеты аминокислот. Количественное содержание органических кислот в растениях подвергается суточным и сезонным изменениям. Установлено, что различные виды и сорта растений имеют различие и по содержанию в них отдельных органических кислот.

Яблочная, лимонная, винная, щавелевая и другие кислоты находятся в растениях не только в свободном состоянии, но и в виде солей, главным образом калия, натрия и кальция. При титровании нейтральные соли почти не учитывают, а титруют почти исключительно свободные кислоты и кислые соли. О содержании в растениях солей можно судить по щелочности золы, полученной при сжигании растительных материалов: соли органических кислот при сжигании плодов образуют карбонаты калия и кальция, обладающие в растворе щелочной реакцией.

Растворы солей органических кислот в смеси со свободными кислотами являются буферами. Свободные кислоты, кислые и нейтральные соли их находятся в подвижном равновесии, определяемом концентрацией водородных ионов в растворе. В плодах и ягодах преобладают свободные кислоты, а в листьях они содержатся главным образом в форме солей.

Большой практический интерес имеют лимонная, яблочная, винная, янтарная, щавелевая кислоты. Извлечение их из растений основано на хорошей растворимости в воде, спирте, ацетоне и эфире. Наиболее удобным способом для выделения органических кислот является экстракция растительных веществ, подкисленных минеральными кислотами, смесью ацетона с диэтиловым эфиром, так как в последнем не растворяются сахара, минеральные кислоты и другие вещества, что очень существенно для анализа.

Качественное и количественное определение органических кислот основано не только на использовании их химических свойств, но и на неодинаковой их подвижности при хроматографировании на колонках, бумаге и в тонких слоях. Определение некоторых органических кислот основывается на применении комплексонов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРУЕМЫХ КИСЛОТ (ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ)

Определение основано на титровании определенных объемов экстракта, полученного из известной навески раствором 0,1 н щелочи в присутствии

индикатора. Результаты титрования выражают в процентах для одной из главных органических кислот, входящих в состав объекта.

Реактивы

- 1) 0,1 н раствор щелочи известного титра;
- 2) индикатор – раствор 1 г фенолфталеина или β-метилумбелиферона в 100 см³ 96°-ного этанола.

Ход работы

Из средней пробы свежих размельченных плодов или других органов отвешивают пробы (25 г±0,01 г или более) и готовят вытяжки без применения нейтрализаторов и осадителей.

Навеску количественно переносят в фарфоровую ступку, смывая туда же из чашки остатки навески дистиллированной водой, и тщательно растирают с 2-3 г стеклянного песка до однородной кашицеобразной массы (небольшие кусочки тканей, например, кожицы плодов томатов, слив и т.д., должны быть растерты). Растертую массу количественно переносят в коническую колбу на 250 мл, заливают 150-200 мл горячей дистиллированной воды и нагревают в течение часа на водяной бане при 75-80°С. Через час колбу снимают с бани, переносят содержимое ее в мерную колбу на 250 мл (удобно переносить при помощи воронки со срезанным концом), ополаскивая несколько раз колбу, в которой производилось извлечение сахаров на бане. После охлаждения вытяжки объем ее доводят до метки и, перемешав тщательно содержимое, фильтруют вытяжку в любую другую колбу.

Затем пипеткой берут пробы вытяжки по 20-50 мл в конические колбы и титруют раствором 0,1 н щелочи в присутствии 4-5 капель фенолфталеина до розового окрашивания, применяя точные бюретки.

Улавливание переходов окраски у слабоокрашенных жидкостей очень облегчается, если сравнивать ее с рядом стоящей колбой с таким же количеством вытяжки и фенолфталеина (титрование со «свидетелем»).

Окрашенные вытяжки удобно титровать с 15 каплями флюоресцирующего индикатора (1% спиртовой раствор β-метилумбелиферона). Если этого индикатора нет, то можно титровать в присутствии тимолфталеина.

Титрование с флюоресцирующим индикатором необходимо проводить на темном фоне (подложив под колбу темную бумагу), при дневном освещении, до появления заметной флюоресценции раствора.

Для вычисления кислотности количество щелочи, пошедшее на титрование пробы, переводят точно в 0,1 н раствор, пользуясь коэффициентом нормальности (поправкой к титру). Кислотность выражают в процентах для одной из кислот, преобладающих в объекте (яблочной, лимонной, винной).

Общую кислотность на 100 г щелочи вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot n},$$

a – количество 0,1 н щелочи, мл;

V – общий объем вытяжки, мл;

V_1 – объем вытяжки, взятой для титрования, мл;
 n – масса навески, г.

Если результат хотят выразить для какой-либо из главных органических кислот, то умножают на определенный коэффициент. 1 мл 0,1 н раствора щелочи соответствует: 7,5 мг винной; 6,4 мг лимонной; 6,7 мг яблочной и 4,5 мг щавелевой кислот. Нередко кислотность выражают в миллиграмм-эквивалентах (мг-экв). 1 мл раствора 0,1 н щелочи соответствует 0,1 мг-экв, или 1 мг-экв любой кислоты. Для пересчета в проценты достаточно умножить число миллиграмм-эквивалентов на массу (г) 1 мг-экв кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Лимонная кислота является одной из наиболее распространенных органических кислот в растениях. Определение лимонной кислоты ведут с помощью перманганата до образования пентабромацетона, мало растворимого в воде и хорошо растворимого в спирте и эфире. Пентабромацетон определяют объемным методом.

Реактивы

- 1) 20% раствор H_2SO_4 ;
- 2) 30% KBr;
- 3) 5% $KMnO_4$;
- 4) насыщенный раствор закисного сернокислого железа (40 г соли в 100 мл подкисленной H_2SO_4 воде);
- 5) 0,1 н H_2SO_4 ;
- 6) 0,1 н NaOH;
- 7) 4% раствор фосфорновольфрамной кислоты;
- 8) метилоранж (0,05 г индикатора в 100 мл воды, хранить в темной склянке);
- 9) метилрот (0,01 г индикатора в 30 мл 96% этилового спирта и разбавляют дистиллированной водой до 100 мл).

Ход работы

Приготовление вытяжки из сухих листьев и плодов. Навеску 5-10 г (в зависимости от содержания лимонной кислоты) тщательно растирают в ступке со стеклом и небольшими дозами воды; переносят в мерный цилиндр на 250 мл и доводят водой до 100 мл. Затем прибавляют 15 мл 20% серной кислоты, оставляют на 15-30 мин и доводят водой до 250 мл.

Смесь хорошо встряхивают и оставляют на 2 часа. Во время настаивания неоднократно взбалтывают, после этого фильтруют через сухой фильтр в сухую посуду (можно центрифугировать). Добиваются получения прозрачного фильтра, применяя при необходимости осаждение фосфорновольфрамной кислотой 4-5 мл. Вольфрамво-кислый натрий растворяют в кипящей воде и в этот раствор прибавляют половинное по весу количество фосфорной кислоты. При выпаривании раствора получают кристаллы вольфрамной кислоты.

Приготовление вытяжек из свежего материала. Берут навески свежего материала 50-100 г, тщательно растирают в ступке, переносят в колбу на 500

мл, приливают на 100 г материала 300 мл воды, подкисленной 10 мл H_2SO_4 и нагревают 1 час на кипящей бане. Затем вытяжку с навеской переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят до метки, отфильтровывают часть вытяжки и берут объем 50-100 мл. Взятый объем фильтрата выпаривают на водяной бане до 30-50 мл (с целью повышения содержания органических кислот и создания условий, необходимых для освобождения вытяжки от веществ, мешающих определению).

Переносят подкисленный раствор в мерную колбу на 100 мл, осаждают различные примеси добавлением 5 мл 4% фосфорновольфрамовой кислоты и дают постоять 2-3 ч. Доводят объем до 100 мл и берут пробы для определения.

Окисление. Из прозрачного фильтрата пипеткой берут 50 мл жидкости в стакан на 200 мл и добавляют 5 мл 30% раствора KBr , 10 мл разведенной серной кислоты (1:1), после перемешивания быстро добавляют 20 мл 5% раствора KMnO_4 . Смесь оставляют под тягой на 10 минут, периодически взбалтывают, осаждая пентабромацетон при температуре 20-30°C без предварительного нагревания. Если появившийся вначале бурый осадок двуокиси марганца исчезнет, то определение следует считать испорченным и его надо повторить с прибавлением большего количества раствора KMnO_4 .

Избыток окисления восстанавливают до полного обесцвечивания прибавлением 20 мл насыщенного раствора закисного сернокислого железа или соли Мора.

Для ускорения осаждения пентабромацетона смесь ставят в холодную воду или в лед. На этом этапе определение можно прервать до утра. За это время мутный раствор постепенно осветляется, а осадок на дне колбы уплотняется.

Количество лимонной кислоты в процентах (x) вычисляется по формуле

$$x = \frac{a \cdot 0,483 \cdot K \cdot 100}{n}, \text{ где}$$

a – количество мл 0,1 н щелочи, связанной в реакции с пентабромацетоном;
0,483 – количество мг лимонной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н щелочи;
K – коэффициент разбавления (отношение объема экстракта к объему, взятому для окисления);
n – навеска материала, г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Щавелевая кислота (COOH-COOH) часто встречается в растениях в виде нерастворимого щавелевокислого кальция. Метод основан на осаждении щавелевой кислоты в виде щавелевокислого кальция, нерастворимого в холодной воде.

Реактивы

- 1) 10% серная кислота;
- 2) 1% AgNO_3 ;
- 3) 0,1 н KMnO_4 ;
- 4) 0,1 н H_2SO_4 ;

5) 0,1 н NaOH;

6) реактив для осаждения щавелевой кислоты. Смесь равных объемов раствора CaCl_2 (25 г соли растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе на 500 мл и доливают до метки 50% уксусной кислотой) и раствора уксуснокислого натрия (330 г в 300 мл H_2O). Оба раствора смешивают и реактив выдерживают 48 ч при температуре 3-7°C градусов, затем фильтруют.

Ход работы

Для определения всей щавелевой кислоты (свободной и связанной в виде кальциевой соли) навеску сухих листьев в 5-10 г растирают со стеклянным песком, с 5 мл 10% H_2SO_4 и небольшим количеством спирта. Затем переносят в мерную колбу и доливают водой до 250-500 мл, встряхивают и оставляют на несколько часов или на ночь. Содержимое колбы затем отфильтровывают и берут на определение 50 мл. Прибавляют до щелочной реакции аммиак и 1-2 г борной кислоты (последнюю прибавляют для затруднения осаждения солей винной кислоты, ее оптических изомеров).

Затем прибавляют 10 мл реактива для осаждения щавелевой кислоты и оставляют на 48 часов при температуре не выше 7°C. Выделившийся осадок щавелевокислого кальция отфильтровывают и промывают водой до отрицательной реакции (отсутствие осадка от прибавления нескольких капель 1% раствора AgNO_3).

В дальнейшем щавелевую кислоту определяют по одному из следующих способов:

1) осадок смывают с фильтра водой из промывалки в колбу и сразу же приливают горячую 10% H_2SO_4 через тот же фильтр, чтобы растворить следы оксалата. Осадок в колбе при перемешивании переходит в раствор, в случае медленного растворения осадка колбу с жидкостью надо нагреть. Фильтр промывают горячей водой и раствор титруют 0,1 н раствором KMnO_4 до появления розовой окраски.

Зная, сколько мл KMnO_4 идет на титрование взятой пробы и зная титр KMnO_4 по щавелевой кислоте, узнают количество кислоты в граммах. Содержание щавелевой кислоты в процентах находят по формуле

$$x = \frac{500 \cdot 100 \cdot a}{50 \cdot b}, \text{ где}$$

a – щавелевая кислота в пробе вытяжки;

50 – объем пробы;

b – навеска исследуемого материала;

500 – объем вытяжки.

2) Осадок щавелевокислого кальция вместе с фильтром переносят в колбу, растворяют в точном объеме титрованной 0,1 н H_2SO_4 , а избыток кислоты оттитровывают 0,1 н раствором NaOH. 1 мл 0,1 н соответствует 4,5 мг щавелевой кислоты.

Содержание щавелевой кислоты выражают в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯБЛОЧНОЙ И ЛИМОННОЙ КИСЛОТ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРИЛОНА Б

Яблочная кислота ($\text{COOH-CHON-CH}_2\text{COOH}$), как и лимонная, широко распространена в растениях, особенно ее левый стереоизомер. В ягодах и плодах она накапливается в значительных количествах в свободном виде. В листьях ряда культурных растений она содержится в форме солей.

Метод основан на извлечении кислот из растительных объектов и определении общего содержания яблочной и лимонной кислот, отдельно только лимонной, а по разности содержания – яблочной кислоты. Метод является более чувствительным и производительным, чем классические методы.

Реактивы

- 1) титрованный 0,02 н раствор трилона Б;
- 2) 0,02 н раствор сернокислого магния;
- 3) 0,1 н раствор HCl ;
- 4) 20% раствор уксуснокислого свинца;
- 5) 1% раствор Na_2CO_3 ;
- 6) хромоген черный ЕТ-00 (индикатор);
- 7) 20% растворы бромистого калия, закисного сернокислого железа;
- 8) 5% раствор перманганата калия;
- 8) растворы 0,1 н щелочи и 0,1 н H_2SO_4 ;
- 9) ледяная уксусная кислота;
- 10) 70°-ный этанол;
- 11) 5% раствор KMnO_4 .

Ход работы

Экстракция. Отвешивают $3-6 \pm 0,01$ г размельченной средней пробы свежих плодов или вегетативных органов (содержащих около 50 мг органических кислот) в сосуд размельчителя тканей и после прибавления 1 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 70°-ного этанола дополнительно размельчают навеску и получают вытяжку. После 3-минутного извлечения содержимое сосуда настаивают 15 мин, после центрифугирования вытяжку сливают в мерную колбу на 50 мл: осадок в пробирке 2 раза (10 и 5 мл) промывают 70°-ным этанолом, после центрифугирования сливают в мерную колбу и доводят до метки 70°-ным этанолом. Полученный экстракт используют для определения лимонной и яблочной кислот.

Определение лимонной кислоты. Из полученной вытяжки отбирают пипеткой 10 мл и выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане почти досуха, затем прибавляют 3 мл перегнанной воды и переливают раствор в широкую пробирку (или колбочку на 50 мл), остаток смывают порциями воды 3 и 2 мл. К раствору кислот добавляют 2 мл раствора H_2SO_4 (1:9 по объему), 2 мл 20% раствора бромистого калия и 4 мл 5% KMnO_4 . Смесь оставляют на 10 мин в вытяжном шкафу, периодически взбалтывая, а затем охлаждают. В результате реакции раствор приобретает коричневую окраску (если он обесцвечивается, то

добавляют раствор перманганата калия). Избыток окислителя удаляют прибавлением 20% раствора закисного сернокислого железа до обесцвечивания (3-5 мл). Смесь с образовавшимся пентабромацетоном охлаждают в холодильнике (или бане со льдом) и затем осадок отфильтровывают через стаканчик с пористым дном. Осадок бромиды промывают до нейтральной реакции по метилоранжу и далее содержание пентабромацетона определяют объемным методом.

1 мл 0,1 н раствора щелочи соответствует 0,483 мг лимонной кислоты.

Определение суммарного содержания яблочной и лимонной кислот. Из мерной колбы берут 20 мл спиртовой вытяжки в стакан, прибавляют 1-2 мл 20% уксуснокислого свинца и оставляют после перемешивания на 30 мин для осаждения свинцовых солей (яблочной и лимонной, нерастворимых в 70°-ном этаноле). Затем центрифугируют и промывают осадок 70°-ным этанолом. К промытому осадку в пробирке приливают 10 мл 1% раствора Na_2CO_3 для разложения свинцовых солей органических кислот и образования осадка карбоната свинца, после этого на центрифуге отделяют карбонат свинца и после промывки приливают 10 мл 0,1 н HCl .

Получение комплексного соединения и титрование. Солянокислый раствор переливают в колбу на 50 мл для титрования, добавляют в нее 3 мл аммиачного буферного раствора и точно 5 мл

0,1 н раствора трилона Б, 50 мг хромогена черного ЕТ-00 (индикатор) и титруют 0,02 н раствором сернокислого магния до темно-красной окраски. Одновременно в другую колбу приливают те же реактивы, но без опытной вытяжки, и так же титруют.

Вычисление результатов. Содержание яблочной и лимонной кислот в изучаемом материале (%) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(a - a_1) \cdot T \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot n}, \text{ где}$$

a – количество 0,02 н раствора сернокислого магния, пошедшего на титрование взятого раствора (5 мл) трилона Б, мл;

a_1 – количество 0,02 н раствора сернокислого магния, пошедшего на титрование избытка трилона Б (в опытной пробе), мл;

T – титр сернокислого магния, выраженный в лимонной кислоте (1 мл – 0,064 мг), мг;

V – общий объем вытяжки, полученной из навески, мл;

V_1 – объем вытяжки, взятой для осаждения кислот, мл;

n – масса навески, г.

Содержание яблочной кислоты (%) вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{67 \cdot (A - B)}{64}, \text{ где}$$

x_1 – содержание яблочной кислоты в изучаемом материале, %;

A – сумма яблочной и лимонной кислот в изучаемом материале, %;

B – содержание лимонной кислоты, %;

67 – грамм-эквивалент яблочной кислоты;

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Янтарная кислота ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) в некоторых проростках и незрелых плодах содержится в значительных количествах.

Метод основан на извлечении органических кислот и переводе их в бариевые соли. Янтарную кислоту после окисления перманганатом отделяют от других органических кислот (лимонной, яблочной) и титруют.

Реактивы

- 1) раствор H_2SO_4 (1:4);
- 2) безводный Na_2SO_4 ;
- 3) едкий барий;
- 4) 10% раствор хлористого бария;
- 5) 5% раствор перманганата калия;
- 6) 20% раствор сульфита;
- 7) 0,1 н раствор щелочи;
- 8) диэтиловый эфир и 96°-ный этанол.

Ход работы

Извлечение кислот. Проводят из сухого или свежего растительного материала так же, как при определении лимонной и яблочной кислот. Навески 10 г растирают с 4 мл раствора серной кислоты (1:4), затем обезвоживают, 5 г безводного Na_2SO_4 и органические кислоты извлекают сухим диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета (можно заменить это извлечение встряхиванием с эфиром, так как янтарная кислота хорошо растворяется в нем).

Из эфирного экстракта органические кислоты переводят в водную среду (как указано в методе определения яблочной кислоты). Остатки эфира удаляют выпариванием. Объем жидкости доводят водой до 100 или 200 мл.

Получение бариевых солей органических кислот. Берут 50 или 100 мл охлажденной вытяжки в круглодонную колбу на 200 мл, нейтрализуют 1 н раствором едкого бария и добавляют 1 мл 10% раствора хлористого бария. Затем колбу нагревают 10 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Содержимое колбы переносят в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане до сиропообразного состояния. Остаток после выпаривания растворяют в 20 мл воды, добавляют 80 мл 95°-ного этанола и после перемешивания дают постоять 1-2 ч.

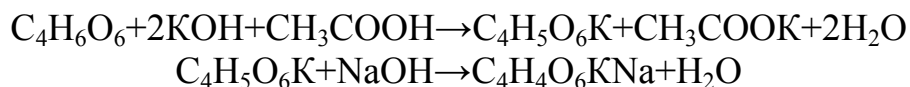
Отделение органических кислот. По истечении указанного времени осадок отсасывают и промывают этанолом. После этого его смывают с фильтра струей воды в колбу и, прибавив в общей сложности около 70 мл воды, отгоняют спирт. Затем, нагревая колбу, постепенно прибавляют 5% раствор перманганата калия до сохранения устойчивого красного цвета. Избыток перманганата и осадок перекиси марганца удаляют прибавлением 3% перекиси водорода или прибавлением сульфита после подкисления реактивной смеси серной кислотой.

Янтарную кислоту извлекают этиловым эфиром в аппарате Сокслета в течение 8 ч из сухого порошка, полученного после выпаривания водного раствора до 10-15 мл, с последующим смешиванием с 5 г безводного сернокислого натрия. После извлечения эфир отгоняют, приливают 20 мл воды и титруют янтарную кислоту 0,1 н щелочью (1 мл 0,1 н щелочи соответствует 5,9 мг янтарной кислоты).

Щавелевая, янтарная, яблочная и лимонная кислоты могут быть определены из одной и той же вытяжки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИННОЙ КИСЛОТЫ

Винная кислота (COOH-(CH)OH-(CH)OH-COOH) в незначительных количествах широко распространена в растениях, а в больших количествах она содержится в растениях семейства виноградных, гераниевых и бобовых. Их четырех стереоизомеров винной кислоты в растениях обычно встречается правовращающая форма. Хороший метод определения винной кислоты основан на осаждении винной кислоты в присутствии уксусной кислоты в виде труднорастворимой кислой виннокалиевой соли, которую оттитровывают щелочью:



Этот метод позволяет определить количество винной кислоты в присутствии других органических кислот.

Реактивы

- 1) 1 н раствор H_2SO_4 ;
- 2) 1 н раствор KOH;
- 3) 5% раствор фосфорновольфрамовой кислоты;
- 4) 96°-ный этанол;
- 5) 30% уксусная кислота;
- 6) 0,1 н раствор NaOH, титр которого точно установлен.

Ход работы

Извлечение винной кислоты. Экстракт из высушенных или свежих плодов или других растительных объектов готовят и очищают. Обычно винная кислота встречается, кроме листьев и ягод винограда, в небольших количествах, поэтому в вытяжке (водной) предварительно определяют примерное содержание органических кислот титрованием 0,1 н раствором щелочи и выражают количество винной кислоты в миллиграммах (1 мл 0,1 н щелочи соответствует 7,5 мг винной кислоты).

Объем пробы фильтрата после осаждения 5% раствором фосфорновольфрамовой кислоты (см. определение лимонной кислоты) составляют так, чтобы в нем содержалось не менее 100 мг винной кислоты, и выпаривают в химическом стакане на 150 мл до 20 мл.

Осаждение винной кислоты. К охлажденной вытяжке приливают (до нейтрализации по фенолфталеину) 1 н раствор KOH и еще избыток в 3 капли.

Затем добавляют 4 мл 80% уксусной кислоты и в течение 2 мин приливают 80 мл 95°-ного этанола при постоянном перемешивании. Раствор энергично перемешивают стеклянной палочкой для ускорения выпадения осадка. При замедленном осаждении трут палочкой о стенку стакана. Стакан с выпавшим осадком из белых кристаллов кислой виннокалиевой соли помещают на ночь в холод. Наутро этанол сливают декантацией, а осадок переносят в тигель Гуча или стаканчик с пористым дном с 80°-ным охлажденным этанолом, применяя отсасывание. Осадок промывают до исчезновения кислой реакции в промывном 96°-ном этаноле (по фенолфталеину).

Трехкратного промывания по 15 мл обычно бывает достаточно. Необходимо полностью отмыть осадок от следов кислоты. Затем осадок из тигля вместе с асбестом переносят обратно в тот же стакан на 150 мл при помощи 100 мл горячей воды. Для лучшего растворения осадка содержимое тщательно взбалтывают, затем стакан с раствором нагревают почти до кипения и полностью растворившийся кислый виннокислый калий оттитровывают 0,1 н щелочью с фенолфталеином (1 мл 0,1 н раствора КОН, пошедшего на титрование этой соли, соответствует 15 мг винной кислоты).

Содержание винной кислоты (%) вычисляется по формуле

$$x = \frac{0,015 \cdot a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot n}, \text{ где}$$

0,015 – количество винной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора NaOH (при титровании кислого виннокислого калия 1 мл того же раствора соответствует 15 мг винной кислоты, так как прибавляемая щелочь вытесняет из титруемой соли только один атом водорода);

a – количество 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование кислого виннокислого калия, мл;

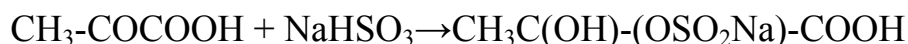
V – объем вытяжки, мл;

V₁ – объем пробы, взятой для анализа для осаждения винной кислоты, мл;

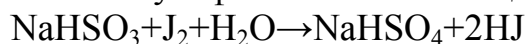
n – масса навески, г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Пировиноградная кислота (CH₃-CO-COOH) в кислой среде реагирует с кислыми сернистокислыми солями (KHSO₃ или NaHSO₃), давая бисульфитное соединение:



Избыток прибавленного бисульфита связывают иодом:



Соединение пировиноградной кислоты с бисульфитом разлагают и бисульфит оттитровывают иодом.

Реактивы и аппаратура

- 1) 1% раствор бисульфита натрия (или калия, хранят 2-3 дня);
- 2) 0,1 и 0,01 н растворы иода;

- 3) двууглекислый натрий;
- 4) 1% раствор крахмала;
- 5) 5-10% раствор фосфорновольфрамовой кислоты;
- 6) микробюретка (или бюретка) с делениями 0,025 мл.

Ход работы

В коническую колбу наливают 20-25 мл вытяжки и осаждают белки прибавлением нескольких капель раствора фосфорновольфрамовой кислоты. К 5-10 мл вытяжки, из которой осажден белок фосфорновольфрамовой кислотой, добавляют 3 мл

1% раствора бисульфита натрия; содержимое колбы хорошо перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем избыток бисульфита удаляют сначала 0,1 н раствором, а затем 0,01 н раствором иода в присутствии 1 мл раствора крахмала.

Соединение пировиноградной кислоты с бисульфитом разрушают добавлением 1 г сухого бикарбоната натрия и выделившийся бисульфит оттитровывают 0,01 н раствором иода (1 мл 0,01 н раствора иода соответствует 0,44 мг пировиноградной кислоты).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ИОННОГО ОБМЕНА И ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Метод количественного и качественного определения основан на экстракции органических кислот, очистке их на катионите КУ-1, превращении в бариевые соли, разделении бариевых солей в растворе спирта и хроматографировании на бумаге органических кислот.

Реактивы и аппаратура

- 1) 0,1 н раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$;
- 2) этиловый спирт и эфир;
- 3) 7% раствор HCl ;
- 4) смеси растворов I и II для подвижных фаз;
- 5) хроматографическая бумага (ленинградская №4, «медленная» или №2, «быстрая»);
- 6) ионообменная колонка для разделения органических кислот.

Ход работы

Приготовление смеси растворов I и II для подвижных фаз. *Раствор I.* В течение 30 мин взбалтывают смесь н-бутанола, муравьиной кислоты и воды (18:2:9) и используют ее верхний слой, если не надо разделять и количественно определять лимонную и яблочную кислоты, или в том случае, когда одна из них отсутствует. Эта смесь мало летуча, окружающая температура не оказывает существенного влияния на разделение смеси винной, лимонной (или яблочной), малоновой, аконитовой, янтарной и фумаровой кислот.

Раствор II. Серный эфир, вода и муравьиная кислота в объемах 18:9:5. Верхний слой этой смеси хорошо разделяет яблочную и лимонную кислоты при их одновременном присутствии.

Ионообменная колонка и работа с ней. Для аналитических работ с органическими кислотами растений удобна специальная колонка, которую наполняют ионообменной смолой КУ-1. Оптимальными размерами частиц смолы считают 0,3-0,1 мм. Более мелкие частицы затрудняют продвижение растворов через колонку. Около 15-20 г ионообменной смолы растирают в ступке и просеивают через сито до необходимых размеров частиц, насыпают в коническую колбу на 250-300 мл, приливают 200 мл дистиллированной воды и ставят для набухания на 3 ч, часто взбалтывая. Набухший катионит многократно промывают дистиллированной водой до полной прозрачности. Затем на дно колонки кладут немного стеклянной ваты, катионит переносят порциями вместе с водой, трамбуя каждую порцию стеклянной палочкой с резиновым наконечником, и сверху катионита помещают слой стеклянной ваты. После этого через колонку пропускают 7% раствор HCl со скоростью истечения 1,5-2,5 мл в минуту до тех пор, пока не уравниются концентрации кислоты в фильтрате и в исходном растворе. Обычно для заполнения колонки, содержащей 15 г катионита, достаточно 120-150 мл кислоты. После заполнения колонки катионит промывают водой до полного исчезновения HCl в фильтрате. Если катионит отмыт от избытка HCl, то 75-100 мл промывной воды должны окрашиваться от 1-2 капель раствора 0,1 н щелочи с фенолфталеином – промытая колонка готова для работы.

По использовании 3/4 обменной емкости колонки смолу в ней надо заменять.

Подготовка материала. Навеску $3-5 \pm 0,01$ г сухого измельченного растительного материала заливают дистиллированной водой (1:30, 1:50) в колбе на 250 мл. Затем колбу ставят в термостат при 60°C на один час и время от времени содержимое колбы перемешивают. Через час экстракт отфильтровывают на воронке Бюхнера в колбу Бунзена. После этого осадок экстрагируют таким же образом еще 2 раза. Объединенный экстракт ставят в холодильник, если хотят продолжить анализ на следующий день. Объединенный экстракт фильтруют в случае надобности непосредственно в колонку, заполненную смолой КУ-1, установив над ней маленькую воронку с фильтром. Оптимальная скорость пропускания экстракта через колонку 1,5-2,5 мл в минуту. После того как через колонку пропущен весь экстракт, ее трижды промывают водой порциями по 75 мл. Затем экстракт и промывные воды объединяют и нейтрализуют 0,1 н $\text{Ba}(\text{OH})_2$ в присутствии фенолфталеина до розового окрашивания. Рассчитывают общее содержание кислот в материале. Измеряют объем нейтрализованного экстракта.

Выделение кислот. Титрование раствора кислот баритом позволяет: 1) определить общее содержание кислот; 2) разделить кислоты на группы, используя различную растворимость их бариевых солей в растворах спирта, так как бариевые соли ди- и трикарбоновых кислот осаждаются 60% спиртом на 90-95%.

При титровании водного раствора кислот баритом может выпасть осадок бариевых солей – щавелевой, фосфорной и серной кислот, если они были в растворе. Для полного выпадения этих солей экстракт нагревают почти до кипения, отстаивают до следующего дня и осадок фильтруют или центрифугируют. Из прозрачного фильтрата, объем которого известен, берут 50-100 мл, снова пропускают через колонку с катионитом и затем отмывают водой. Полученный раствор вместе с промывными водами нейтрализуют 0,1 н $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и определяют содержание фракции органических кислот, пересчитывая на весь объем.

По разности между количеством барита, использованного при определении общей кислотности, и фракции органических кислот высчитывают содержание кислот, бариевые соли которых выпадают в осадок при нейтрализации экстракта. Остаточную часть фильтрата (раствор бариевых солей органических кислот) сгущают в вакууме на кипящей водяной бане в фарфоровой чашке до общего объема 25-30 мл. Затем сгущенную жидкость переносят в мерный цилиндр с притертой пробкой, доводят до 37 мл водой, а затем доливают до 100 мл 96% спиртом.

Если на титрование экстракта пошло более 100 мл 0,1 н раствора барита, что указывает на высокую концентрацию кислот в экстракте, то этот раствор солей сгущают до 74 мл и доводят спиртом до 200 мл. В цилиндре создается 60% спиртовой раствор органических кислот, в котором выпадает осадок бариевых солей ди- и трикарбонновых кислот. Его отфильтровывают на другой день через небольшую воронку Бюхнера, но лучше отцентрифугировать. Прозрачный центрифугат сливают, осадок заливают 20-25 мл 60% спирта, растирают палочкой и снова отцентрифугируют. Операцию повторяют 2-3 раза, каждый раз сливая промытый спирт. Наконец, осадок в центрифужной пробирке заливают горячей водой, взмучивают и количественно переносят в коническую колбу. Нагревают раствор и добавляют воды до полного растворения осадка. Если в растворе остается незначительная муть, то его фильтруют, пропускают через катионит и отмывают водой. Затем определяют объединенный объем полученного фильтрата. Часть раствора нейтрализуют 0,02 н щелочью по фенолфталеину для определения общего количества ди- и трикарбонновых кислот. Оставшийся раствор сгущают в вакууме или на кипящей водяной бане до 5% концентрации по яблочной кислоте. Сгущенный раствор используют для хроматографии.

Качественная хроматография нелетучих кислот. Хроматографическую бумагу №4 режут на полоски. Затем, отступив 2,5 см от узкой стороны полоски, проводят карандашом линию и на ней ставят точки на расстоянии 1,5 см от длинных сторон листа и 3 см одна от другой. В местах точек наносят капилляром или микропипеткой 5-6 капель одного из растворов кислот-«свидетелей», подсушивая феном или комнатным вентилятором места после нанесения каждой капли.

«Свидетелей» (яблочная, лимонная и другие кислоты) готовят заранее в концентрации 3-4% в 50% этиловом спирте. Затем на одну из

свободных точек наносят таким же образом раствор изучаемых кислот, полученный из осадка бариевых солей.

После нанесения проб полоску бумаги подвешивают в камере, затем наливают смесь растворителей I через стеклянную трубку, доходящую до дна камеры (подвижная фаза), так, чтобы ее уровень был на 1 см ниже стартовой линии на хроматограмме с нанесенными кислотами. Спустя 24 ч хроматограмму вынимают из камеры и подсушивают в вытяжном шкафу феном в течение 15-20 мин. Затем оставляют хроматограмму на ночь при комнатной температуре и на следующий день (около двух часов) сушат при 70°C, чтобы удалить следы муравьиной кислоты, мешающей проявлению. Затем проявляют водным (или спиртовым) 0,05% раствором бромфенол-синего.

Для выяснения *качественного* состава кислот определяют R_f кислот; для этого измеряют расстояние между линией нанесения кислот – «стартом» и границей подъема растворителя, а также расстояние между линией старта и верхней границей пятна кислоты, а затем делят вторую величину на первую.

Определив R_f для каждой кислоты, сопоставляют его с R_f кислоты-«свидетеля». Совпадение величины R_f «свидетеля» и определяемой кислоты растения в значительной мере может служить одним из показателей их идентичности.

Для *количественного* определения нелетучих органических кислот наносят исследуемые растворы так, чтобы общее количество кислот на старте всех точек составило 15-20 мг. Таким путем изготавливают 2 хроматограммы, которые помещают затем в камеру, и осторожно наливают одну из смесей для разделения. При разделении смеси кислот смесью растворителей II окружающая температура воздуха должна быть 12-14°C (но не выше 18°C). Через 24 ч после начала разделения бумагу вынимают из камеры (камеру сразу же прикрывают во избежание испарения эфира), подвешивают в вытяжном шкафу на штативе, подсушивают феном 15-20 мин и снова помещают в камеру еще на 24-26 ч. Затем ее подсушивают в тяге феном и оставляют на воздухе до следующего дня. Для удаления следов муравьиной кислоты сушат еще 2 ч при 60-80°C. Для выявления мест расположения органических кислот на хроматограмме ее кладут на чистое стекло, затем тонким капилляром или микропипеткой набирают проявитель (бромфенол синий) и мелкими каплями наносят его редким пунктиром по длине хроматограммы. Начиная от места расположения кислот пунктир становится желтым, а в промежутках между ними остается голубым. Если муравьиная кислота полностью не удалена, то пунктир на всем протяжении будет желтым, и в этом случае сушку следует продолжить.

Для точного установления каждой зоны точки проявителя наносят чаще и место расположения кислот очерчивают карандашом, чтобы затем их вырезать для элюирования. Если между двумя зонами расстояние оказалось малым (5-30 мм), то линию раздела проводят посередине участка голубого пунктира. Так получается несколько отграниченных зон, соответствующих набору кислот в изучаемом растворе.

Элюирование органических кислот. Зоны расположения на бумаге отдельных кислот разрезают на узкие короткие ленточки. Соответствующие зоны с одновременно полученных хроматограмм объединяют и экстрагируют 3 раза водой (по 15 мл), медленно нагревая до кипения. Элюат каждый раз сливают в мерную колбочку на 50 мл, охлаждают, доливают до метки водой и перемешивают. Затем берут 25 мл раствора кислоты и титруют 0,02 н раствором щелочи из микробюретки в присутствии трех капель раствора фенолфталеина, защищая раствор от углекислоты воздуха.

Пример вычисления содержания ди- и трикарбоновых кислот Навеска $3 \pm 0,01$ г сухой цветной капусты. На титрование экстракта, пропущенного через катионит, пошло 47 мл 0,1 н раствора едкого барита (1 мл 0,1 н раствора едкого барита соответствует 6,7 мг яблочной кислоты). Общее содержание кислот в нашей навеске равно 314,74 мг (в пересчете на яблочную кислоту).

При вычислении *общего содержания* кислот общий объем раствора был 550 мл, а на титрование 50 мл раствора ди- и трикарбоновых кислот (после пропускания через колонку) пошло 4,76 мл 0,02 н едкого натра; следовательно, на весь объем раствора пошло 52,36 мл; 1 мл 0,02 н едкого натра соответствует 1,34 мг яблочной кислоты, следовательно, во всем растворе содержится 70,1 мг ди- и трикарбоновых кислот в пересчете на яблочную кислоту.

При вычислении *содержания отдельных кислот* для титрования элюатов (после выделения винной, лимонной и яблочной кислот) пошло 0,02 н едкого натра: соответственно 1 мл, 5,88 мл, 1,28 мл. Таким образом, всего на титрование пошло 8,16 мл 0,02 н едкого натра. Приняв указанную величину за 100, узнаем, что объем щелочи, пошедшей на титрование винной (x_1), лимонной (x_2) и яблочной (x_3) кислот составляет: $x_1=12,25\%$; $x_2=72,06\%$; $x_3=15,69\%$.

Затем вычисляют, какой объем 0,02 н едкого натра приходится на долю каждой кислоты, если на титрование всего количества ди- и трикарбоновых кислот пошло 52,36 мл. Так, рассчитываем количество щелочи (x), пошедшей на титрование винной кислоты:

$$x = \frac{52,36 \cdot 12,25}{100} = 6,41 \text{ мл}$$

Коэффициент пересчета для винной кислоты – 1,5; тогда $6,41 \cdot 1,5 = 9,61$ мг винной кислоты в 3 г навески, а в 100 г соответственно будет 320,5 мг, или 0,32% винной кислоты. Таким же образом делают расчет для лимонной и яблочной кислот. Коэффициенты пересчета на кислоты: яблочную 1,34; лимонную 1,28; янтарную 1,18. В нашем случае определено 1,61% лимонной и 0,37% яблочной кислот.

Зарядка (регенерация) ионообменной колонки. Установлено, что ионообменная емкость смолы КУ-1 соответствует 1,5 мг-экв поглощенного катиона.

В случае пропускания солей органических кислот 1 г катионита КУ-1 связывает 1,5 мг-экв бария. Атомный вес бария – 137,4; валентность бария – 2, следовательно, 1,5 мг-экв бария составляет:

$$\frac{137,4 \cdot 1,5}{2} = 103_{\text{мг}},$$

т. е. 1 г КУ-1 соответствует 103 мг бария, а 15 г КУ-1 – 1,545 г бария. В нашем случае 15 г КУ-1 (одной колонки) соответствует 1,55 г бария.

Пример вычисления. На титрование раствора свободных кислот пошло 37 мл раствора едкого барита с фактором, равным 1,23. Титр раствора составлял 10,7 мг/мл. Таким образом, получаем $37 \cdot 10,7 = 395,9$ мг бария – 0,40 г, т. е. 0,40 г связалось с катионитом. Учитывая, что зарядку колонки с ионитом рекомендуется производить после использования 75% ее обменной емкости, получим $1,55 \cdot 0,75 = 1,17$ г бария. Непоглощенного бария осталось $1,17 - 0,40 = 0,77$ г. После поглощения еще 0,8 г бария необходимо произвести регенерацию колонки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ

Пролин – важная белковая аминокислота, выполняющая у растений протекторную и осмопротекторную функции в условиях различных стрессов.

Метод основан на определении оптической плотности окрашенного раствора после взаимодействия пролина с нингидрином в присутствии сульфосалициловой кислоты.

Реактивы

1) 3%-ная сульфосалициловая кислота ($\text{HO}_3\text{S}(\text{HO})\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), для приготовления 1 л раствора: 34,96 г сульфосалициловой кислоты + 965,04 мл воды; 2) ледяная уксусная кислота; 3) 6 М фосфорная кислота, для приготовления 100 мл раствора: 55,34 мл концентрированной кислоты (85%, $\rho = 1,25$) + 44,66 мл воды; 4) толуол; 5) кислотный нингидрид: 1,25 г нингидрина нагреваются в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6 М фосфорной кислоты до полного растворения; реактив остается устойчивым 24 часа, хранить в холодильнике (при 4°C).

Ход работы

Навеску 0,5 г сухого растительного материала растирают с 10 мл 3% сульфосалициловой кислоты, гомогенат фильтруют. 2 мл фильтрата смешивают с 2 мл кислотного нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты и выдерживают в течение 1 часа на кипящей водяной бане, после этого пробирки с раствором охлаждают под струей холодной воды. К полученной смеси добавляют 4 мл толуола и энергично встряхивают в течение 15-20 сек. Смеси дают отстояться несколько минут. Для дальнейшего определения осторожно, не допуская смешивания, шприцом извлекают верхнюю фазу.

Спектральную поглотительную способность определяют на спектрофотометре в видимой области при 250 нм, в качестве используется толуол.

Концентрацию пролина определяют по стандартному калибровочному графику и пересчитывают на 100 г сухой массы.

Для построения калибровочного графика навеску пролина 10 мг помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки сульфосалициловой кислотой. В 10 мл такого раствора содержится 1 мг пролина. Из этого исходного раствора готовят растворы, содержащие 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 мг в 10 мл. Разбавление проводят сульфосалициловой кислотой. Далее берут по 2 мл каждого из приготовленных растворов и поступают с ними также как с гомогенатом из растительного материала по описанной выше схеме.

РАЗДЕЛ 5

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Все элементы, необходимые для роста и развития высших растений, принято делить на две основные группы: макро- и микроэлементы. К первой группе относятся С, Н, О, N, S, К, Mg, Ca, Cl и в ряде случаев Na. Вторая группа включает Fe, Mn, Си, Mo, Zn, В и др.

Содержание и состав зольных элементов зависит от видовой принадлежности растений, этапов онтогенеза, а также от условий их выращивания.

У большинства растений около 95% сухого вещества составляют С, Н, О, N; 4% – P, К, Ca, Mg, S, Cl, Na, Si, Al; 0,001% приходится на микроэлементы.

Ионы кальция влияют на структуру и проницаемость мембран, сборку цитоскелета, движение цитоплазмы, активность ферментов, секрецию, деление клеток и другие процессы. Кальций чаще всего выступает в роли балансного иона при создании физиологической уравновешенности ионного состава среды, так как его содержание в почве достаточно велико.

Магний необходим для фотосинтеза, дыхания, синтеза нуклеиновых кислот, белков и других процессов. Магний является кофактором почти всех ферментов, катализирующих перенос фосфатных групп.

Легкая подвижность магния объясняется тем, что около 70% этого катиона в растении связано с анионами органических и неорганических кислот. В семенах большая часть магния находится в составе фитина. Соотношение Ca/Mg имеет большое значение для жизнедеятельности растений и регулирует многие процессы обмена веществ.

Сера входит в состав многих биологически важных соединений растений, к ним относятся серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин), глутатион, кофермент А, липоевая кислота, ферредоксин и др. Сера присутствует в них в виде сульфгидрильных (-S-H) и дисульфидных (-S-S-) группировок. Функциональная роль серы связана с тем, что она включается как лиганд в большое число энзимов и металлпротеинов.

Калий – один из необходимых элементов минерального питания растений – является главным осмотически активным веществом, с его участием осуществляются процессы поступления, транспорта и испарения воды растением. Важное значение калий имеет для процесса открывания и закрывания устьиц. Он является одним из катионов-активаторов ферментативных систем. В отсутствие калия основным катионом, способным заменить его, является натрий. Иногда 2/3 необходимого растениям калия может быть без видимых нарушений заменено натрием. Степень такой заменимости различна и зависит от вида растения. Высокие концентрации ионов натрия могут нарушать структуру хлоропластов и оказывать вредное воздействие на некоторые процессы обмена веществ. Положительное влияние натрия на развитие растений проявляется при недостатке калия. Если же калия в среде достаточно, избыток натрия может быть токсичным.

Галофиты и многие морские растения поглощают натрий и хлор в значительных количествах. Хлор необходим для фотосинтетических реакций, участвующих в выделении кислорода.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛЫ В РАСТЕНИЯХ

Определение золы основано на сжигании растительного материала и последующем количественном определении остатка. Остаток, получаемый после сжигания и прокаливании органических веществ, называют золой. При сжигании углерод, водород, азот и частично кислород улетучиваются и остаются нелетучие окислы.

Реактивы

1) 95% C_2H_5OH ; 2) 25% HCl ; 3) 0,5% $FeCl_3$.

Ход работы

Навеску сухого размолотого растительного материала (листья, стебли, корни) в количестве 1–3 г помещают в прокаленный и доведенный до постоянного веса тигель, добавляют 1 мл 95% C_2H_5OH , поджигают спичкой в вытяжном шкафу. Когда пламя погаснет, тигель ставят в муфель и сжигают от 30 мин до 1 ч при небольшом нагреве, а затем при $t = 500^\circ C$. После сжигания материала тигель с золой охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Повторное прокалывание и взвешивание производят до установления постоянного веса. Перед прокалыванием на тигле нужно написать его номер, пользуясь для этого 0,5% раствором $FeCl_3$. Цвет золы чаще всего светло-серый, почти белый. Полученная таким образом зола называется «сырой», потому что она не свободна от небольших примесей глины, песка и частичек угля.

В охлажденный тигель добавляют несколько капель дистиллированной воды, 3 мл 25% HCl , переносят через воронку с бумажным фильтром в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Полученный солянокислый раствор используют для определения содержания кальция, магния, ионов сульфата.

Содержание золы (в %) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{H}, \text{ где}$$

a — вес сырой золы, г,

H — вес навески, взятой для озоления, г,

100 — для выражения в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛУТОРНЫХ ОКИСЛОВ ЖЕЛЕЗА И АЛЮМИНИЯ

Метод основан на том, что полуторные окислы (Fe_2O_3 и Al_2O_3) вместе с фосфорной кислотой осаждаются в форме основных уксуснокислых солей железа и алюминия и фосфорнокислых солей железа.

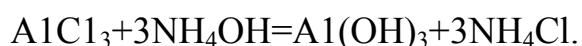
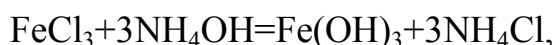
Реактивы

- 1) 10% NH_4OH ;
- 2) 10% уксуснокислый натрий;
- 3) метиловый красный (10 мг растворяют в 30 мл 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и прибавляют 20 мл H_2O);
- 4) 10% CH_3COOH .

Ход работы

Из мерной колбы на 100 мл с солянокислым раствором золы берут 50 мл раствора и помещают в химический стакан на 250 мл. Приливают одну каплю метилового красного и нейтрализуют 10% раствором аммиака, добавляя последний небольшими порциями из бюретки при постоянном помешивании содержимого стакана палочкой с резиновым наконечником до тех пор, пока жидкость в стакане не окрасится в слабо-желтый цвет. Затем жидкость подкисляют 10% уксусной кислотой до появления красной окраски, добавляют 10–15 мл 10% уксуснокислого натрия или аммония и жидкость кипятят 2–3 мин.

Выпавший осадок быстро отфильтровывают через неплотный беззольный фильтр («розовая обложка»), поддерживая жидкость в горячем состоянии. С этой целью стакан должен находиться все время на кипящей водяной бане.



Осадок выпадает не всегда, так как большинство растений бедно железом и алюминием. Осадок на фильтре промывают горячей водой, содержащей немного уксуснокислого натрия или аммония, до отсутствия кальция в промывных водах (проба на кальций). Фильтр с осадком высушивают при $t = 105^\circ$. После сжигания тигель охлаждают в эксикаторе, взвешивают и определяют вес сухого осадка.

Фильтрат и промывные воды собирают в химический стакан и подкисляют 10% уксусной кислотой до появления красной окраски. Этот раствор используют для определения содержания кальция.

Содержание полуторных окислов рассчитывают по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{H}, \text{ где}$$

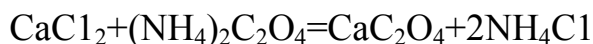
a — вес сухого осадка, г,

H — вес навески в анализируемой части раствора золы, г,

100 — для выражения в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В РАСТЕНИЯХ ОБЪЕМНЫМ МЕТОДОМ

Метод основан на осаждении кальция щавелевокислым аммонием в присутствии уксусной кислоты.



Реактивы

- 1) 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- 2) 1% и 10% H_2SO_4 ;
- 3) 1% CaCl_2 ;
- 4) 3% AgNO_3 ;
- 5) 0,05 н. KMnO_4 (1,5805 г соли растворяют примерно в 500 мл H_2O , кипятят в течение 30 мин и после охлаждения доводят объем до 1 литра).

Ход работы

Определение кальция проводят в фильтрате после осаждения полуторных окислов. Если после подкисления раствора объем жидкости больше 150–200 мл, ее сгущают выпариванием на водяной бане до 100 мл. стакан с фильтратом помещают на плитку и доводят до кипения. Одновременно в другом стакане доводят до кипения 5% раствор щавелевокислого аммония. Берут 15 мл кипящего раствора оксалата аммония и приливают к закипевшему в стакане анализируемому раствору. Осадитель следует приливать по каплям, помешивая жидкость в стакане палочкой. Это обеспечивает более полное взаимодействие обоих растворов. Иногда выпадение осадка оксалата кальция происходит не сразу. стакан с осадком накрывают часовым стеклом и помещают на 4 ч в теплый термостат.

По окончании этого срока необходимо убедиться в полном осаждении кальция. Каплю прозрачного раствора над осадком переносят чистой стеклянной палочкой на стекло и прибавляют осадитель. Если осаждение неполное, в стакан добавляют по каплям еще 5 мл нагретого до кипения осадителя, после чего вновь оставляют стакан в теплом термостате на 4 ч.

Промывание осадка. Готовят небольшую воронку с беззольным фильтром (синяя лента). Путем смачивания дистиллированной водой фильтр плотно подгоняется к стенкам воронки. Затем содержимое стакана фильтруют через эту воронку, пользуясь стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Тщательно собирают весь оксалат кальция со стенок стакана на дно и смывают его на фильтр многократным споласкиванием стакана небольшими порциями горячей воды, добиваясь полного переноса осадка из стакана на фильтр.

Дистиллированная вода должна содержать немного щавелевокислого аммония (несколько кристалликов на промывку). Это необходимо для того, чтобы избежать даже ничтожного растворения осадка. Осадок на фильтре промывают горячей водой до тех пор, пока промывные воды не перестанут обнаруживать реакцию на ионы хлора (муть от прибавления AgNO_3 , подкисленного азотной кислотой).

Когда ион хлора отмыт, дальнейшее промывание ведут холодной водой, не содержащей щавелевокислого аммония, до удаления последнего (отсутствие в промывных водах муты от прибавления к ним AgNO_3 , не подкисленного азотной кислотой), Промывные воды не выливать. В них определяют содержание магния.

Необходимо соблюдать осторожность при промывании осадка на фильтре. Перед тем как выливать из стакана промывные воды, необходимо убедиться в том, что они не содержат проскочившего через фильтр оксалата аммония. Для этого быстрым вращением стакана приводят в движение содержащуюся в нем жидкость. Если оксалат кальция есть, то его легко заметить по мути в центре водоворота.

Закончив промывание осадка, стакан, в котором производилось осаждение кальция, подставляют под воронку с фильтром. Одновременно подогревают 1% раствор серной кислоты, которым и растворяют оксалат кальция на фильтре. Серную кислоту необходимо приливать на фильтр небольшими порциями до полного растворения осадка. Затем в стакан дополнительно приливают 5 мл 10% H_2SO_4 , подогревают содержимое стакана на плитке до 80°C и титруют его 0,05 н. KMnO_4 до розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

1 мл израсходованного при титровании 0,05 н. перманганата соответствует 0,001 г Са.

Содержание кальция в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,001 \cdot a \cdot 2 \cdot 100}{H}, \text{ где}$$

a – объем 0,05 н. раствора перманганата, пошедшего на титрование, мл,

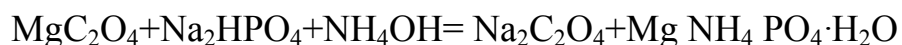
2 – коэффициент пересчета на всю золу,

H – навеска сухого вещества, г,

100 – для выражения в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАГНИЯ

Метод основан на осаждении магния раствором двухзамещенного фосфата натрия в присутствии аммиака. Осадок выпадает в виде крупных кристаллов магний-аммоний фосфата.



Реактивы

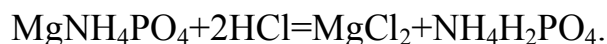
- 1) 10% HCl ;
- 2) 0,1 N. HCl ;
- 3) 10% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;
- 4) 10% NH_4OH ;
- 5) 3% AgNO_3 , подкисленный HNO_3 .

Ход работы

Определение магния лучше всего вести в фильтрате с промывными водами после осаждения кальция, т. к. из анализируемого раствора должны быть удалены полуторные окислы и осажден кальций. Фильтрат и жидкость после отмывания осадка оксалата кальция собирают и сгущают выпариванием. Объем жидкости не должен превышать 100–150 мл. Раствор подкисляют 10% HCl до покраснения лакмусовой бумажки и приливают для осаждения магния

15 мл 10% раствора двухзамещенного фосфата натрия. Затем жидкость в стакане нагревают до кипения и прибавляют 10% раствор NH_4OH в количестве, отвечающем 1/3 общего объема раствора в стакане. При этом выпадает осадок в виде крупных кристаллов магний-аммоний фосфата ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Если осадок получится не кристаллическим, а аморфным, то его следует растворить в HCl (1:5) и снова осадить. Стакан с осадком выдержать 5–6 ч на холоде. После этого осадок отфильтровывают (через плотный фильтр – «синяя обложка») и промывают 2,5% раствором аммиака, при этом осадок не переносят на фильтр, а сначала отмывают декантацией. Отмывание ведут до окончания реакции на хлор-ион с азотнокислым серебром. Осадок легко «выползает» через верх фильтра, поэтому не надо заполнять фильтр более чем на 2/3. Осадок промывают спиртом для удаления аммиака и подсушивают вместе с воронкой и фильтром около 1,5 ч при $t = 50\text{--}60^\circ$.

Подсушенный осадок с фильтром переносят в стакан, добавляют 20–40 мл дистиллированной воды, 2–3 капли метилового оранжевого и титруют 0,1 н. HCl до перехода окраски из желтой в розовую. Реакция титрования:



Каждый миллиметр 0,1 н. HCl , израсходованной на титрование, соответствует 1,206 мг Mg . Содержание магния вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 1,206 \cdot 100}{H}, \text{ где}$$

a – объем 0,1 н. HCl , израсходованной на титрование мл,

T – поправка к титру этой кислоты, 100 – для выражения в процентах,

H – навеска сухого материала в анализируемой части золы, г.

КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ В ОДНОЙ ПРОБЕ РАСТЕНИЙ

Принцип метода основан на образовании устойчивых комплексов при взаимодействии ионов кальция и магния с трилоном Б (двунатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Реактивы

- 1) индикаторы мурексид и хромоген черный – сухие смеси с NaCl (0,1:9,9);
- 2) 0,02 н. раствор трилона Б: 3,722 г сухой соли трилона Б растворить в мерной колбе на 1 литр;
- 3) хлоридно-аммиачный буфер: 25 мг NH_4Cl (хч) растворить в 100 мл дистиллированной воды, добавить 200 мл 20% NH_4OH и довести в мерной колбе до 1 литра;
- 4) 1 н. и 14% раствор NaOH ;
- 5) 1 н. раствор HCl .

Определение титра 0,02 н. трилона Б по раствору 0,01 н. MgSO_4

0,01 н. MgSO_4 готовят следующим образом: полученный из фиксаля 0,1 н. MgSO_4 разбавляют в 10 раз (10 мл 0,1 н. MgSO_4 довести до 100 мл в мерной колбе). К 15 мл 0,01 н. MgSO_4 добавляют хромоген черный, 5 мл хлоридно-аммиачного буфера и титруют трилоном Б до перехода из синей в фиолетовую окраску. Рассчитывают титр по формуле

$$X = \frac{a \cdot 15}{c}, \text{ где}$$

a – нормальность раствора MgSO_4 ,

c – объем раствора трилона Б, пошедшего на титрование, мл,

15 – объем раствора MgSO_4 , взятого на титрование, мл.

Ход работы

К 10 мл солянокислого раствора золы добавляют 1 мл 14% раствора NaOH , перемешивают содержимое круговыми движениями, вносят смесь мурексида с NaCl (30–50 мг) и снова хорошо перемешивают. Титруют из микробюретки раствором трилона Б до перехода розовой окраски в фиолетовую. Титруют медленно, энергично перемешивая раствор, учитывают количество трилона Б, пошедшее на титрование Ca .

Для выявления содержания Mg к этому же раствору, после определения Ca , добавляют 3 мл 1 н. HCl , 5 мл хлоридно-аммиачного буфера и перемешивают содержимое. Затем вносят смесь хромогена черного с NaCl и медленно титруют раствором трилона Б, энергично перемешивая содержимое, до перехода окраски из винно-красной в синюю.

Содержимое Ca или Mg (в мг/100 г сухого веса) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot T \cdot 100 \cdot \text{экв.вес}}{H}, \text{ где}$$

T – нормальность раствора трилона Б,

H – вес навески, г,

C – объем трилона Б, пошедшего на титрование, мл,

100 – пересчет на 100 г,

Эквивалентный вес Ca – 20,04,

Эквивалентный вес Mg – 12,16.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ КОБАЛЬТНИТРИТНЫМ МЕТОДОМ

Метод определения основан на реакции иона калия с кобальтнитритом натрия $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ с образованием двойной комплексной соли желтого цвета $\text{K}_2\text{NaCo}(\text{NO}_2)_6$, не растворимой в воде. Присутствие в растворе других ионов, кроме аммония, не мешает определению калия.

Реактивы

- 1) 0,1 н. HCl ;
- 2) 10% CH_3COOH ;
- 3) 0,01 н. KMnO_4 ;

4) разбавленная H_2SO_4 (на 7 частей дистиллированной воды взять 1 часть H_2SO_4);

5) кобальтнитритный реактив: а) азотнокислый кобальт (12,5 г этой соли растворяют в 25 мл H_2O и прибавляют 6,25 мл ледяной CH_3COOH , б) азотнокислый натрий (40 г соли растворяют при осторожном нагревании в 60 мл H_2O). За день до употребления 1 часть реактива «а» смешивают с тремя частями реактива «б» и смесь оставляют на 5 часов или на ночь. Выпавший осадок удаляют фильтрованием. Реактив хранится в холодильнике в течение 3 недель;

6) 0,01 н. щавелевая кислота.

Ход работы

В колбу с обратным холодильником на 100 мл помещают навеску сухого материала в 1 г и приливают 50 мл 0,01 н. HCl . Колбу с содержимым помещают на кипящую водяную баню на 20 мин, затем содержимое фильтруют через беззольный фильтр и доводят водой до 100 мл.

25 мл раствора помещают в фарфоровую чашку и сгущают выпариванием на водяной бане до объема 1–2 мл. Затем по каплям приливают 5 мл кобальтнитрита и снова выпаривают, помешивая стеклянной палочкой до сиропобразной консистенции. Чашку охлаждают, приливают 1,5 мл 10% уксусной кислоты, содержимое чашки тщательно растирают, затем приливают 5 мл дистиллированной воды и осадок фильтруют через шоттовскую воронку 4 при разрежении.

Осадок промывают дистиллированной водой, а затем раствором сернокислого натрия, в котором образуется труднорастворимый осадок. Отмывание его прекращают, когда стекающий фильтрат станет бесцветным.

В химический стакан наливают 125 мл дистиллированной воды, 50 мл перманганата и нагревают до 80° на кипящей водяной бане. Затем в раствор опускают воронку с осадком, осторожно помешивая стеклянной палочкой (2–3 мин), после чего в стакан добавляют 5–8 мл разбавленной серной кислоты. Продолжая нагревание, тщательно следят за растворением осадка; нагревают стакан до тех пор, пока не исчезнет желтый осадок. Жидкость в стакане должна все время оставаться фиолетовой, при обесцвечивании ее приливают 1–2 мл раствора перманганата калия (количество которого записывают), т. к. обесцвечивание раствора указывает на недостаток перманганата калия. После растворения осадка к горячему раствору приливают 0,01 н. раствор щавелевой кислоты до тех пор, пока черный осадок перекиси марганца, появляющийся при разрушении комплексной соли, не исчезнет и раствор не обесцветится.

Избыток щавелевой кислоты оттитровывают перманганатом калия до не исчезающей окраски.

Разница между количеством взятого для окисления перманганата калия и количеством оттитрованного избытка перманганата калия (по щавелевой кислоте) представляет собой количество раствора перманганата, затраченного на разрушение осадка, содержащего калий.

Вычисление результатов:

Количество калия = $(a - б) \cdot T \cdot 0,000856$, где

a – взятое для окисления количество 0,01 н. раствора перманганата калия, мл,
 $б$ – оттитрованный избыток перманганата калия (по щавелевой кислоте), мл,
 T – титр $KMnO_4$, 0,000856 г окиси калия или 0,000711 г калия соответствуют 1 мл 0,01 н. раствору $KMnO_4$.

Вычислить содержание калия в навеске (в процентах из расчета на сухую массу).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕМНИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Метод основан на осаждении кремниевой кислоты и определении ее количества весовым методом.

Реактивы

- 1) смесь HCl и HNO_3 (1 : 1);
- 2) 0,01 н. раствор роданистого аммония.

Ход работы

Охлажденный тигель взвешивают для определения количества золы. После взвешивания золу переносят в фарфоровую чашку, куда приливают 50 мл концентрированной HCl и HNO_3 (1:1). Содержимое тщательно перемешивают, накрывают стеклом и нагревают на водяной бане около часа. Затем стекло снимают и содержимое чашки выпаривают досуха. Остаток просушивают в сушильном шкафу при температуре не выше 120° (во избежание перевода кремниевой кислоты в растворимое состояние), растворяют в кипящей воде, подкисленной HCl , отфильтровывают через плотный фильтр в мерную колбу на 500 мл. Осадок на фильтре промывают горячей водой, подкисленной HCl , до исчезновения в промывных водах реакции на железо (проба с роданистым аммонием). Фильтр сжигают в предварительно взвешенном тигле, прокаливают до постоянного веса 2–3 ч и взвешивают.

Содержание кремниевой кислоты (в %) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{b}, \text{ где}$$

a — вес кремниевой кислоты, г,

b — вес навески, г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТРИЯ И КАЛИЯ В РАСТЕНИЯХ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

Пламенно-фотометрический метод анализа основан на измерении интенсивности излучения элементов в пламени. Анализируемый раствор распыляется, и образующийся туман вводится в пламя горелки. В пламени происходит поглощение энергии атомами. Возбужденный атом характеризуется переходом части электронов на более удаленные от ядра

орбиты. Для перехода затрачивается внешняя энергия, и электроны, совершающие этот переход, отличаются повышенным энергетическим потенциалом. Обратный переход атома в нормальное состояние сопровождается возвращением электронов на более близкие к ядру орбиты и выделением энергии, ранее затраченной на возбуждение. При этом энергия выделяется в виде излучения определенного спектра, линии которого присущи данному элементу. По этим спектрам можно различить исследуемые вещества, причем такой анализ может быть не только качественным, но и количественным, так как интенсивность излучения спектра зависит от концентрации изучаемого вещества.

Реактивы

- 1) раствор NaCl (0,2541 г в 100 мл дистиллированной воды);
- 2) раствор KCl (0,1908 г в 100 мл дистиллированной воды).

Построение калибровочного графика

При построении калибровочного графика для Na готовят серию образцовых растворов. Исходный образцовый раствор получают растворением химически чистого (и при необходимости перекристаллизованного) хлорида натрия (0,2541 г) в дистиллированной воде с доведением его объема до 100 мл. В 1 мл такого раствора содержится 1 мг Na₂O. Разведением готовят серию рабочих образцовых растворов, содержащих от 4 до 80 мг Na₂O в 1 литре. Для этого берут 7 мерных колб на 100 мл и приливают из бюретки последовательно 0; 0,4; 0,8; 1,2; 2,0; 4,0; 8,0 мл исходного образцового раствора, затем колбы доводят дистиллированной водой до метки. Просматривают подготовленные рабочие растворы на приборе в порядке сначала возрастания, а затем уменьшения концентрации. Записывают средние отсчеты по каждому раствору и строят график, откладывая по оси абсцисс концентрации, а по оси ординат – показания гальванометра (микроамперметра).

Для построения калибровочной кривой для калия отвешивают 0,1908 г, химически чистого хлористого калия, переносят в мерную колбу и доводят объем до 100 мл. В 1 мл того раствора содержится 1 мг K₂O. Из него готовят рабочие растворы, содержащие от 10 до 100 мг в 1 литре. Для этого в мерные колбочки на 100 мл берут последовательно 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 мл исходного образцового раствора. Колбы заливают дистиллированной водой и доводят до метки.

Ход работы

Определение содержания ионов натрия и калия проводят на пламенном фотометре в солянокислом растворе золы, на определение берут 10 мл раствора. Расчет количества натрия или калия (в мг на 100 г сухого вещества) проводят по формуле

$$X = \frac{B \cdot V}{H \cdot 10}, \text{ где}$$

B – показания по калибровочному графику,

V – объем разведения (100 мл),

Н – навеска, г,
10 – коэффициент пересчета.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО НАТРИЯ В РАСТЕНИЯХ

Ход работы

Навеску 10 – 20 мг сухого размолотого материала заливают холодной дистиллированной водой и оставляют на 48 ч, затем отфильтровывают через бумажный фильтр. Для определения содержания натрия объем фильтрата доводят до 10 мл и определяют на пламенном фотометре. Калибровочную кривую строят по растворам NaCl.

Расчет количества натрия в мг/100 г сухого вещества проводят по формуле

$$X = \frac{B \cdot V}{H \cdot 10}, \text{ где}$$

В – значение по калибровочному графику (мг/100 мл),

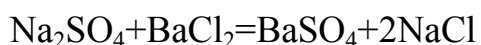
V – объем разведения (10 мл),

Н – навеска, г,

10 – коэффициент пересчета.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ СЕРНОЙ КИСЛОТЫ

Метод основан на осаждении сульфат-ионов хлористым барием в присутствии пикриновой кислоты для образования крупнозернистого осадка сульфата бария.



Реактивы

- 1) 10% HCl;
- 2) 10% BaCl₂·2H₂O;
- 3) 1% пикриновая кислота.

Ход работы

В химический стакан емкостью 200 мл наливают 50 мл солянокислого раствора золы, прибавляют 0,5 мл 10% HCl, 5 капель 1% пикриновой кислоты и нагревают раствор в стакане до кипения.

Одновременно в другом стакане доводят до кипения 10% раствор хлористого бария, берут 10 мл и приливают его в стакан с кипящим раствором, продолжая кипячение еще 2–3 мин. При этом выпадает осадок сульфата бария.

Чтобы добиться полноты осаждения сульфат-ионов и образования более крупных кристаллов сульфата бария, стакан после прибавления BaCl₂ накрывают часовым стеклом и ставят на 4 ч в теплый термостат.

Через 4 ч содержимое стакана фильтруют через плотный фильтр («синяя обложка»). Фильтр необходимо предварительно промыть кипящей

дистиллированной водой, подкисленной соляной кислотой (для удаления из фильтровальной бумаги следов сульфат-ионов).

Первую порцию фильтрата испытывают на полноту осаждения. Берут пробу в 5 мл, нагревают до кипения и приливают 1 мл кипящего раствора хлористого бария. При отсутствии мути осаждение сульфат-иона можно считать полным. В противном случае, т. е. при появлении мути, необходимо содержимое стакана (включая пробу, взятую для проверки полноты осаждения) вылить обратно в стакан с осадком, довести содержимое до кипения, прибавить 1–2 мл кипящего раствора $BaCl_2$ и вновь оставить на 4 ч в теплом месте. Когда весь осадок из стакана перенесен на фильтр, его многократно промывают горячей дистиллированной водой, подкисленной серной кислотой. Промывание продолжают до тех пор, пока в промывной жидкости не будет отсутствовать реакция на барий (с серной кислотой).

Фильтр с осадком подсушивают в сушильном шкафу и помещают в доведенный до постоянного веса тигель. Тигель переносят в муфель для озоления фильтра и прокаливания осадка. Прокаливают при температуре 500 – 600°.

Тигель с осадком охлаждают в эксикаторе и взвешивают на аналитических весах. Повторное прокаливание проводят до установления постоянного веса осадка. Умножая вес осадка сернокислого бария на величину 0,3429, получают весовое содержание ионов сульфита (А), а на величину 0,4114 – ионов сульфата (В). Содержание ионов сульфита или сульфата рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A(B) \cdot 100}{H}, \text{ где}$$

А – весовое содержание ионов сульфита, г,

В – весовое содержание ионов сульфата, г,

Н – вес навески в анализируемой части раствора, г,

100 – для выражения в %.

МИКРООПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Определение суммарной серы растительных объектов, входящей в состав соединений биологического происхождения, осуществляется путем ее перевода в форму сульфата с последующим его количественным определением.

Сухой растительный материал сжигают в смеси концентрированных хлорной и азотной кислот; азотную кислоту, мешающую определению, удаляют восстановлением, а серу осаждают в присутствии детергента Твин-80 в виде сульфата бария, который определяют нефелометрически.

Реактивы

- 1) 1% фенолфталеин в 50% спирте;
- 2) 20% NaOH;
- 3) H_2O_2 ;

- 4) смесь концентрированных хлорной и азотной кислот (1:1 по объему);
- 5) додециловый спирт;
- 6) 17% р-р HCl;
- 7) осадитель – 1,6% раствор BaCl₂·6H₂O в 4% водном растворе Твин-80.

Ход работы

Сухую пробу материала, содержащую 50 – 450 мкг серы (10 – 100 мг растительного материала при содержании серы около 0,5%), вносят в термостойкую пробирку для сжигания. Если проба влажная, ее нужно предварительно высушить на кипящей водяной бане после добавления 1 капли 20% NaOH и 1 капли H₂O₂.

К сухой пробе в пробирке добавляют 1 мл смеси хлорной и азотной кислот и содержимое медленно окисляют на песчаной бане.

Если вскоре после разогрева пробирок начинается сильное вскипание, в пробирку добавляют 1 каплю додецилового спирта (пеногаситель).

Когда жидкость в пробирке станет прозрачной, в нее бросают кусочек фильтровальной бумаги и сжигание продолжают; если бумага быстро обугливается и раствор чернеет, то пробирку выдерживают на песчаной бане до обесцвечивания содержимого и сжигание заканчивают. Если же почернения жидкости не происходит и выделяются бурые пары окислов азота, то бумагу добавляют небольшими порциями в пробирку до тех пор, пока прозрачная жидкость не почернеет, что свидетельствует о полном удалении азотной кислоты. Затем сжигание заканчивают, как сказано выше. После охлаждения пробирок их содержимое нейтрализуют по фенолфталеину раствором NaOH и подкисляют 10 каплями 17% соляной кислоты.

Объем жидкости в пробирке доводят водой до 6–7 мл; пробирки охлаждают в холодильнике в течение 15 мин. Прибавляют 2 мл холодного осадителя, доводят водой точно до 10 мл и ставят в холодильник для формирования осадка.

Через 30 мин содержимое пробирок снова хорошо перемешивают и определяют поглощение света суспензией сульфата бария на ФЭКе в кювете на 10 мм с красным светофильтром.

Определение концентрации серы сульфатов проводят по калибровочной кривой в пределах концентрации от 50 до 400 мг серы.

Содержание серы определяют по формуле

$$Kc = 10 \cdot E \cdot a; \quad Pc = \frac{E \cdot a}{B}, \quad \text{где}$$

Kc – количество серы в пробе, мкг,

E – экстинция,

a – пересчетный коэффициент, численно равный количеству серы сульфатов, дающему экстинцию, равную 1 мкг/мл,

Pc – процентное содержание серы в анализируемом образце,

B – сухая масса образца, мкг.

Если сера определяется в экстрактах, то

$$A = \frac{10 \cdot E \cdot a}{V_1}; \quad Пс = \frac{E \cdot a \cdot V}{V_1 \cdot V_2}, \text{ где}$$

A – концентрация серы в анализируемом образце, мкг/мл,

V₁ – объем пробы для определения серы, мл,

V₂ – объем параллельной пробы для определения сухого веса, мл,

B₂ – сухой вес параллельной пробы, мкг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ ХЛОРА ПО МЕТОДУ ШЕСТАКОВА И КАЧЕЕВА

Метод основан на взаимодействии хлора с азотнокислым серебром.

Реактивы

- 1) 0,02 н. AgNO₃;
- 2) 2% р-р железоаммонийных квасцов;
- 3) 0,02 н. р-р роданистого аммония.

Ход работы

Растительный материал (листья, корни, стебли) фиксируют в сушильном шкафу в течение 30 мин при 105°, а затем досушивают до постоянного веса при 60°.

Навеску растительного материала 20 мг заливают 5 мл бидистиллированной воды, настаивают в течение 24 ч при комнатной температуре, а затем отфильтровывают. Осадок на фильтре промывают 3 мл бидистиллированной воды. Затем подкисляют 2 каплями концентрированной HNO₃, добавляют в него 5 мл 0,02 н. AgNO₃ и 2 мл 2% раствора железоаммонийных квасцов и титруют 0,02 н. раствором роданистого аммония до появления розовой окраски.

Содержание ионов хлора (в мг-экв на 1 г сухой массы) определяют по формуле

$$X = \frac{(5 - A) \cdot 0,02}{B}, \text{ где}$$

A – количество роданистого аммония, пошедшего на титрование, мл,

B – навеска сухого вещества, г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО ХЛОРА В РАСТЕНИЯХ МЕРКУРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Реактивы

- 1) 0,02 н. раствор азотнокислой ртути (3,246 г Hg(NO₃)₂ растворяют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 0,3 мл конц. HNO₃, и доводят до 1 литра;
- 2) двойной индикатор: 0,5 г дифенилкарбазона, 0,5 г бромфенолового синего растворяют в 100 мл спирта-ректификата;
- 3) 0,1% водный раствор метилового красного;
- 4) 0,02 н. H₂SO₄ (приготовить из фиксанала 0,1 н. H₂SO₄).

Определение титра 0,02 н. $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ по раствору 0,01 н. NaCl

0,01 н. NaCl готовят следующим образом: 0,1 н. NaCl приготовить из фиксанала и затем разбавить в 10 раз (10 мл 0,1 н. NaCl довести до 100 мл в мерной колбе).

Определение титра $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ проводят при pH раствора, близкой к 5. Для этого 15 мл 0,01 н. NaCl с 2 каплями индикатора метилового оранжевого титруют 0,02 н. H_2SO_4 до перехода желтой окраски в оранжевую. Затем к содержимому добавляют 10 капель двойного индикатора и титруют 0,02 н. $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ до перехода окраски из красной в фиолетовую.

Расчет титра проводят по формуле

$$T = \frac{a \cdot 15}{c}, \text{ где}$$

a – нормальность раствора NaCl ,

c – объем раствора $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, пошедшего на титрование, мл,

15 – объем раствора NaCl , взятого на титрование, мл.

Ход работы

Навеску 20 мг сухого размолотого растительного материала заливают 5 мл дистиллированной воды, оставляют на 24 ч при комнатной температуре и затем отфильтровывают. Осадок на фильтре промывают водой и объем фильтрата доводят до 10 мл. Ко всему объему добавляют 2 капли индикатора и титруют 0,02 н. H_2SO_4 до появления оранжевой окраски. Затем в эту колбу прибавляют 10 капель двойного индикатора и титруют 0,02 н. $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ до перехода окраски из красной в фиолетовую.

Содержание хлора в мг/100 г сухого веса рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot T \cdot 100 \cdot 35,5}{H}, \text{ где}$$

C – объем $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, пошедшей на титрование, мл,

T – нормальность $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$,

100 – пересчет на 100 г почвы,

H – навеска, г,

35,5 – эквивалентный вес Cl .

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Атомные веса некоторых элементов

Название	Символ	Атомный вес	Название	Символ	Атомный вес
Азот	N	14,008	Натрий	Na	22,991
Барий	Ba	137,36	Никель	Ni	58,71
Бор	B	10,82	Олово	Sb	118,70
Бром	Br	79,916	Платина	Pt	195,09
Водород	H	1,008	Радий	Ra	226,05
Железо	Fe	55,85	Ртуть	Hg	200,61
Иод	I	126,91	Рубидий	Rb	85,48
Кадмий	Cd	112,41	Свинец	Pb	207,21
Калий	K	39,100	Сера	S	32,066
Кальций	Ca	40,08	Серебро	Ag	107,880
Кислород	O	16	Стронций	Sr	87,63
Кобальт	Co	58,94	Углерод	C	12,011
Кремний	Si	28,09	Уран	U	238,07
Литий	Li	6,940	Фосфор	P	30,975
Магний	Mg	24,32	Фтор	F	19,00
Марганец	Mn	54,94	Хлор	Cl	35,457
Медь	Cu	63,54	Хром	Cr	52,01
Молибден	Mo	95,95	Цезий	Cs	132,91
Мышьяк	As	74,91	Цинк	Zn	65,38

Таблица 2

Удельный вес растворов HCl различных концентраций при 20°C

Удельный вес	Содержание HCl, г		Удельный вес	Содержание HCl, г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,003	1	10,03	1,108	22	243,8
1,008	2	20,16	1,119	24	268,5
1,018	4	40,72	1,129	26	293,5
1,028	6	61,67	1,139	28	319,0
1,038	8	83,01	1,149	30	344,8
1,047	10	104,7	1,159	32	371,0
1,057	12	126,9	1,169	34	397,5
1,068	14	149,5	1,179	36	424,4
1,078	16	172,4	1,189	38	451,6
1,088	18	195,8	1,198	40	479,2

1,098	20	219,6			
-------	----	-------	--	--	--

Таблица 3

Удельный вес растворов H₂SO₄ различных концентраций при 20°C

Удель- ный вес	Содержание H ₂ SO ₄ , г		Удель- ный вес	Содержание H ₂ SO ₄ , г		Удель- ный вес	Содержание H ₂ SO ₄ , г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,005	1	10,05	1,252	34	425,5	1,576	67	1056
1,012	2	20,24	1,260	35	441,0	1,587	68	1079
1,018	3	30,55	1,268	36	456,6	1,599	69	1103
1,025	4	41,00	1,277	37	472,5	1,611	70	1127
1,032	5	51,58	1,286	38	488,5	1,622	71	1152
1,038	6	62,31	1,294	39	504,7	1,634	72	1176
1,045	7	73,17	1,303	40	521,1	1,646	73	1201
1,052	8	84,18	1,312	41	537,7	1,657	74	1226
1,059	9	95,32	1,321	42	554,6	1,669	75	1252
1,066	10	106,6	1,329	43	571,6	1,681	76	1278
1,073	11	118,0	1,338	44	588,9	1,693	77	1303
1,080	12	129,6	1,348	45	606,4	1,704	78	1329
1,087	13	141,4	1,357	46	624,2	1,716	79	1355
1,095	14	153,3	1,366	47	642,0	1,727	80	1382
1,102	15	165,3	1,376	48	660,5	1,738	81	1408
1,109	16	177,5	1,385	49	678,7	1,749	82	1434
1,117	17	189,9	1,395	50	697,5	1,759	83	1460
1,124	18	202,3	1,405	51	716,5	1,769	84	1486
1,132	19	215,1	1,415	52	735,8	1,779	85	1512
1,139	20	227,9	1,425	53	755,2	1,787	86	1537
1,147	21	240,9	1,435	54	774,9	1,795	87	1562
1,155	22	254,1	1,445	55	794,8	1,802	88	1586
1,163	23	267,4	1,456	56	815,2	1,809	89	1610
1,170	24	280,9	1,466	57	835,7	1,814	90	1633
1,178	25	294,6	1,477	58	856,7	1,819	91	1656
1,186	26	308,4	1,488	59	877,6	1,824	92	1678
1,194	27	322,4	1,498	60	898,8	1,828	93	1700
1,202	28	336,6	1,509	61	920,6	1,831	94	1721
1,210	29	351,0	1,520	62	942,4	1,833	95	1742
1,219	30	365,6	1,531	63	964,5	1,835	96	1762
1,227	31	380,3	1,542	64	986,9	1,836	97	1781
1,235	32	395,2	1,553	65	1010	1,836	98	1799
1,243	33	410,3	1,565	66	1033	1,834	99	1816

Таблица 4

Удельный вес растворов HNO_3 различных концентраций при 20°C

Удель- ный вес	Содержание HNO_3 , г		Удель- ный вес	Содержание HNO_3 , г		Удель- ный вес	Содержание HNO_3 , г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,004	1	10,04	1,207	34	410,4	1,400	67	938,3
1,009	2	20,18	1,214	35	424,9	1,405	68	955,3
1,015	3	30,44	1,221	36	439,4	1,409	69	972,3
1,020	4	40,80	1,227	37	454,0	1,413	70	989,4
1,026	5	51,28	1,234	38	468,7	1,418	71	1006
1,031	6	61,87	1,240	39	483,6	1,422	72	1024
1,037	7	72,58	1,246	40	498,5	1,426	73	1041
1,043	8	83,42	1,253	41	513,6	1,430	74	1058
1,049	9	94,37	1,259	42	528,8	1,434	75	1075
1,054	10	105,4	1,266	43	544,2	1,438	76	1093
1,060	11	116,6	1,272	44	559,6	1,441	77	1110
1,066	12	127,9	1,278	45	575,2	1,445	78	1127
1,072	13	139,4	1,285	46	591,0	1,449	79	1144
1,078	14	150,9	1,291	47	606,8	1,452	80	1162
1,084	15	162,6	1,298	48	622,8	1,456	81	1179
1,090	16	174,4	1,304	49	639,0	1,459	82	1196
1,096	17	186,4	1,310	50	655,0	1,462	83	1214
1,103	18	198,5	1,316	51	671,2	1,466	84	1231
1,109	19	210,7	1,322	52	687,4	1,469	85	1248
1,115	20	223,0	1,328	53	703,7	1,472	86	1266
1,121	21	235,5	1,334	54	720,1	1,475	87	1283
1,128	22	248,1	1,339	55	736,6	1,477	88	1300
1,134	23	260,8	1,345	56	753,1	1,480	89	1317
1,140	24	273,7	1,351	57	769,8	1,483	90	1334
1,147	25	286,7	1,356	58	786,5	1,485	91	1351
1,153	26	299,9	1,361	59	803,2	1,487	92	1368
1,160	27	313,2	1,367	60	820,0	1,489	93	1385
1,167	28	326,6	1,372	61	836,9	1,491	94	1402
1,173	29	340,3	1,377	62	853,7	1,493	95	1419
1,180	30	354,0	1,382	63	870,5	1,495	96	1435
1,187	31	367,9	1,387	64	887,4	1,497	97	1452
1,193	32	381,9	1,391	65	904,3	1,501	98	1471
1,200	33	396,1	1,396	66	921,3	1,506	99	1491

Таблица 5

Удельный вес растворов H_3PO_4 различных концентраций при 20°C

Удельный вес	Содержание H_3PO_4 , г		Удельный вес	Содержание H_3PO_4 , г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,004	1	10,04	1,254	40	501,6
1,009	2	20,18	1,293	45	581,9
1,020	4	40,80	1,335	50	667,5
1,031	6	61,85	1,379	55	758,5
1,042	8	83,36	1,426	60	855,6
1,053	10	105,3	1,475	65	958,8
1,065	12	127,8	1,526	70	1068
1,076	14	150,7	1,579	75	1184
1,089	16	174,1	1,633	80	1306
1,101	18	198,1	1,689	85	1436
1,113	20	222,7	1,746	90	1571
1,126	22	247,8	1,770	92	1628
1,140	24	273,5	1,794	94	1686
1,153	26	299,8	1,819	96	1746
1,167	28	326,6	1,844	98	1807
1,181	30	354,2	1,870	100	1870
1,216	35	425,6			

Таблица 6

Удельный вес растворов КОН различных концентраций при 15°C

Удель- ный вес	Содержание КОН, г		Удель- ный вес	Содержание КОН, г		Удель- ный вес	Содержание КОН, г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,007	0,9	9	1,162	18,6	216	1,370	36,9	506
1,014	1,7	17	1,171	19,5	228	1,383	37,8	522
1,022	2,6	26	1,180	20,5	242	1,397	38,9	543
1,029	3,5	36	1,190	21,4	255	1,410	39,9	563
1,037	4,5	46	1,200	22,4	269	1,424	40,9	582
1,045	5,6	58	1,210	23,3	282	1,438	42,1	605
1,052	6,4	67	1,220	24,2	295	1,453	43,4	631
1,060	7,4	78	1,231	25,1	309	1,468	44,6	655
1,067	8,2	88	1,241	26,1	324	1,483	45,8	679
1,075	9,2	99	1,252	27,0	338	1,498	47,1	706
1,083	10,1	109	1,263	28,0	353	1,514	48,3	731
1,091	10,9	119	1,274	28,9	368	1,530	49,4	756
1,100	12,0	132	1,285	29,8	385	1,546	50,6	779
1,108	12,9	143	1,297	30,7	398	1,563	51,9	811
1,116	13,8	153	1,308	31,8	416	1,580	53,2	840
1,125	14,8	167	1,320	32,7	432	1,597	54,5	870
1,134	15,7	178	1,332	33,7	449	1,615	55,9	900

1,142	16,5	188	1,345	34,9	469	1,634	57,5	940
1,152	17,6	203	1,357	35,9	487			

Таблица 7

Удельный вес растворов NaOH различных концентраций при 20°C

Удельный вес	Содержание NaOH, г		Удельный вес	Удельный вес	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
1,010	1	10,10	1,241	22	273,0
1,021	2	20,41	1,263	24	303,1
1,032	3	30,95	1,285	26	334,0
1,043	4	41,71	1,306	28	365,8
1,054	5	52,69	1,328	30	398,4
1,065	6	63,89	1,349	32	431,7
1,076	7	75,31	1,370	34	465,7
1,087	8	86,95	1,390	36	500,4
1,098	9	98,81	1,410	38	535,8
1,109	10	110,9	1,430	40	572,0
1,131	12	135,7	1,449	42	608,7
1,153	14	161,4	1,469	44	646,1
1,175	16	188,0	1,487	46	684,2
1,197	18	215,5	1,507	48	723,1
1,219	20	243,8	1,525	50	762,7

Таблица 8

Удельный вес растворов NH₃ различных концентраций при 20°C

Удельный вес	Содержание NH ₃ , г		Удельный вес	Содержание NH ₃ , г	
	в 100 г	в 1 л		в 100 г	в 1 л
0,994	1	9,94	0,936	16	149,8
0,990	2	19,79	0,930	18	167,3
0,981	4	39,24	0,923	20	184,6
0,973	6	58,38	0,916	22	201,6
0,965	8	77,21	0,910	24	218,4
0,958	10	95,75	0,904	26	235,0
0,950	12	114,0	0,898	28	251,4
0,943	14	132,0	0,892	30	267,6

Таблица 9

Удельный вес растворов сахарозы различной концентрации

Удельный вес	Вес, %	г/л	Удельный вес	Вес, %	г/л
1,002	1	10,02	1,208	46	555,6
1,006	2	20,12	1,213	47	570,2
1,010	3	30,30	1,219	48	584,9
1,014	4	40,56	1,224	49	599,8
1,018	5	50,89	1,230	50	614,8
1,022	6	61,31	1,235	51	629,9
1,026	7	71,81	1,241	52	645,1
1,030	8	82,40	1,246	53	660,5
1,034	9	93,06	1,252	54	676,0
1,038	10	103,8	1,258	55	691,6
1,042	11	114,7	1,263	56	707,4
1,046	12	125,6	1,269	57	723,3
1,051	13	136,6	1,275	58	739,4
1,055	14	147,7	1,281	59	755,6
1,059	15	158,9	1,286	60	771,9
1,064	16	170,2	1,292	61	788,3
1,068	17	181,5	1,298	62	804,9
1,072	18	193,0	1,304	63	821,7
1,076	19	204,5	1,310	64	838,6
1,081	20	216,2	1,316	65	855,6
1,085	21	227,9	1,322	66	872,8
1,090	22	239,8	1,329	67	890,1
1,094	23	251,7	1,335	68	907,6
1,099	24	263,8	1,341	69	925,2
1,104	25	275,9	1,347	70	943,0
1,108	26	288,1	1,354	71	961,0
1,113	27	300,5	1,360	72	979,0
1,118	28	312,9	1,366	73	997,3
1,122	29	325,4	1,372	74	1016
1,127	30	338,1	1,379	75	1034
1,132	31	350,8	1,385	76	1053
1,137	32	363,7	1,392	77	1072
1,142	33	376,7	1,398	78	1091
1,146	34	389,8	1,405	79	1110
1,151	35	402,9	1,412	80	1129
1,156	36	416,2	1,418	81	1149
1,161	37	429,7	1,425	82	1169
1,166	38	443,2	1,432	83	1188
1,171	39	456,8	1,439	84	1208
1,176	40	470,6	1,445	85	1229

1,182	41	484,5	1,452	86	1249
1,187	42	498,4	1,459	87	1269
1,192	43	512,6	1,466	88	1290
1,197	44	526,8	1,473	89	1311
1,202	45	541,4			

Таблица 10

Плотность некоторых органических жидкостей при комнатных температурах

Жидкость	Температура, °С		
	16°	20°	24°
Этанол	0,797	0,791	0,788
Метанол	0,799	0,795	0,792
Ацетон	0,796	0,792	0,787
Этиловый эфир	0,718	0,713	0,709
Бензол	0,882	0,879	0,876
Хлороформ	1,484	1,476	1,468
Уксусная кислота	1,062	1,058	1,054
Муравьиная кислота	1,225	1,221	1,217

Таблица 11

Боратный буфер (0,2 М), pH 7,4-9,0 (бура $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, относительная молекулярная масса 381,43; борная кислота H_3BO_3 , относительная молекулярная масса 61,84)

pH	Бура 0,05 М, мл	Борная кислота 0,2 М, мл	pH	Бура 0,05М, мл	Борная кислота 0,2М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Таблица 12

Боратный буфер (0,05 М), pH 3,0-5,8 (бура $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, относительная молекулярная масса 381,43; янтарная кислота $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$, относительная молекулярная масса 118,09)

pH	0,05 М растворы, мл		pH	0,05 М растворы, мл	
	буры	янтарной кислоты		буры	янтарной кислоты

3,0	1,4	98,6	4,6	30,0	70,0
3,2	3,5	96,5	4,8	33,5	66,5
3,4	6,0	94,0	5,0	36,8	63,2
3,6	9,5	90,5	5,2	39,5	60,5
3,8	13,7	86,3	5,4	42,2	57,8
4,0	17,8	82,2	5,6	44,3	55,7
4,2	22,2	77,8	5,8	46,0	54,0
4,4	26,2	73,8			

Таблица 13

Боратный буфер (0,05 М), pH 9,3-10,1 (бура $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, относительная молекулярная масса 381,43; натриевая щелочь NaOH , относительная молекулярная масса 40)

pH	Бура 0,05 М, мл	NaOH 0,2 М, мл	pH	Бура 0,05 М, мл	NaOH 0,2 М, мл
9,3	50	0,0	9,8	50	34,0
9,4	50	11,0	10,0	50	43,0
9,6	50	23,0	10,1	50	46,0

Примечание. Готовят смесь двух растворов и доводят водой до 200 мл.

Таблица 14

Фосфатный буфер 0,1 М

pH	0,2М раствор Na_2HPO_4 , мл	0,2М раствор NaH_2PO_4 , мл
5,8	8,0	92,0
6,0	12,3	87,7
6,2	18,5	81,5
6,4	26,5	73,5
6,6	37,5	62,5
6,8	49,0	51,0
7,0	61,0	39,0
7,2	72,0	28,0
7,4	81,0	19,0
7,6	87,0	13,0
7,8	91,5	8,5
8,0	94,7	5,3

Двузамещенный фосфат натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), относительная молекулярная масса 178,05; однозамещенный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), относительная молекулярная масса 138. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

Таблица 15

Фосфатный буфер (0,05 М), рН 5,8-8,0 (однозамещенный фосфат калия K_2HPO_4 , относительная молекулярная масса 136,09; калиевая щелочь, КОН, относительная молекулярная масса 56,89)

рН	0,2 М растворы, мл		рН	0,2 М растворы, мл	
	O_4	КОН или NaOH		K_2HPO_4	КОН или NaOH
5,8	5	0,36	7,0	5	2,91
6,0	5	0,56	7,2	5	3,47
6,2	5	0,81	7,4	5	3,91
6,4	5	1,16	7,6	5	4,24
6,6	5	1,64	7,8	5	4,45
6,8	5	2,24	8,0	5	4,61

Примечание. Готовят смесь двух растворов и доводят до 20 мл.

Таблица 16

Ацетатный буфер 0,2 М

рН	0,2М раствор ацетата натрия, мл	0,2М раствор уксусной кислоты, мл
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
5,0	5,90	4,10
5,2	7,00	3,00
5,4	7,90	2,10
5,6	8,60	1,40
5,8	9,10	0,90

Ацетат натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), относительная молекулярная масса 136,09.

Таблица 17

Трис-НСl-буфер (0,05 М), рН 7,2-9,1 (трис, относительная молекулярная масса 121,14; соляная кислота HCl, относительная молекулярная масса 36,461)

рН		0,2 М трис, мл	0,1 М HCl, мл	рН		0,2 М трис, мл	0,1 М HCl, мл
при 23°C	при 37°C			при 23°C	при 37°C		
9,10	8,95	25	5,0	8,05	7,90	25	27,5
8,92	8,78	25	7,5	7,96	7,82	25	30,0
8,74	8,60	25	10,0	7,87	7,73	25	32,5
8,62	8,48	25	12,5	7,77	7,63	25	35,0

8,50	8,37	25	15,0	7,66	7,52	25	37,0
8,40	8,27	25	17,5	7,54	7,40	25	40,0
8,32	8,18	25	20,0	7,36	7,22	25	42,5
8,23	8,10	25	22,5	7,20	7,05	25	45,0
8,14	8,00	25	25,0				

Таблица 18

Индикаторы

Название индикатора	Интервал рН	Окраска	Способ приготовления
Тимоловый синий	1,2-2,8	Красная-желтая	1) 0,1% в 20%-ном спирте 2) 100 мг+4,3 мл 0,05н раствора NaOH + вода (до 100 мл)
Метиловый оранжевый	3,1-4,4	Красная-оранжево-желтая	0,1% в воде
Бромфеноловый синий	3,0-4,6	Желтая-синяя	1) 0,1% в 20% спирте 2) 100 мг + 3 мл 0,05н раствора NaOH + вода (до 100 мл)
Метиловый красный	4,2-6,2	Красная-желтая	0,1% в 20% спирте
Бромтимоловый синий	6,0-7,6	Желтая-синяя	1) 0,05% в 20% спирте 2) 100 мг + 3,2 мл 0,05н раствора NaOH + вода (до 100 мл)
Феноловый красный	6,4-8,0	Желтая-красная	1) 0,1% в 20% спирте 2) 100 мг + 5,7 мл 0,05н раствора NaOH + вода до 100 мл
Фенолфталеин	8,2-10,0	Бесцветная-малиново-красная	0,1 в 20% спирте
Тимолфталеин	9,3-10,5	Бесцветная-синяя	0,1% в 90% спирте

Таблица 19

Определение глюкозы по Бертрану, мг

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
10	20,4	40	77,5	70	129,8

11	22,4	41	79,3	71	131,4
12	24,3	42	81,1	72	133,1
13	26,3	43	82,9	73	134,7
14	28,3	44	84,7	74	136,3
15	30,2	45	86,4	75	137,9
16	32,2	46	88,2	76	139,6
17	34,2	47	90,0	77	141,2
18	36,2	48	91,8	78	142,8
19	38,1	49	93,6	79	144,5
20	40,1	50	95,4	80	146,1
21	42,0	51	97,1	81	147,7
22	43,9	52	98,9	82	149,3
23	45,8	53	100,6	83	150,9
24	47,7	54	102,3	84	152,5
25	49,6	55	104,1	85	154,0
26	51,5	56	105,8	86	155,6
27	53,4	57	107,6	87	157,2
28	55,3	58	109,3	88	158,8
29	57,2	59	111,1	89	160,4
30	59,1	60	112,8	90	162,0
31	60,9	61	114,5	91	163,6
32	62,8	62	116,2	92	165,2
33	64,6	63	121,3	93	166,7
34	66,5	64	119,6	94	168,3
35	68,3	65	121,3	95	169,9
36	70,1	66	123,0	96	171,5
37	72,0	67	124,7	97	173,1
38	73,8	68	126,4	98	174,6
39	75,7	69	128,1	99	176,2
				100	177,8

Таблица 20

Определение инвертированного сахара по Бертрану, мг

Сахар	Медь	Сахар	Медь	Сахар	Медь
10	20,6	41	79,5	72	132,4
11	22,6	42	81,2	73	134,0
12	24,6	43	83,0	74	135,6
13	26,5	44	84,8	75	137,2
14	28,5	45	86,5	76	138,9
15	30,5	46	88,3	77	140,5
16	32,5	47	90,1	78	142,1
17	34,5	48	91,9	79	143,7

18	36,4	49	93,6	80	145,3
19	38,4	50	95,4	81	146,9
20	40,4	51	97,1	82	148,5
21	42,3	52	98,8	83	150,0
22	44,2	53	100,6	84	151,6
23	46,1	54	102,3	85	153,2
24	48,0	55	104,0	86	154,8
25	49,8	56	105,7	78	156,4
26	51,7	57	107,4	88	157,9
27	53,6	58	109,2	89	159,5
28	55,5	59	110,9	90	161,1
29	57,4	60	112,6	91	162,6
30	59,3	61	114,3	92	164,2
31	61,1	62	115,9	93	165,7
32	63,0	63	117,6	94	167,3
33	64,8	64	119,2	95	168,8
34	66,7	65	120,9	96	170,3
35	68,5	66	122,6	97	171,9
36	70,3	67	124,2	98	173,4
37	72,2	68	125,9	99	175,0
38	74,0	69	127,5	100	176,5
39	75,9	70	129,2		
40	77,7	71	130,8		

Таблица 21

Микрометод определения сахаров по меди, мг

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
0,10	0,55	1,90	4,15
0,20	0,80	2,00	4,30
0,30	1,00	2,25	5,00
0,40	1,15	2,50	5,30
0,50	1,35	2,75	5,95
0,60	1,60	3,00	6,20
0,70	1,80	3,50	7,10
0,80	2,00	4,00	8,00
0,90	2,20	4,50	9,00
1,00	2,40	5,00	9,95
1,10	2,60	5,50	10,80
1,20	2,80	6,00	11,90
1,30	3,00	6,50	12,80
1,40	3,20	7,00	13,90
1,50	3,40	7,50	14,90

1,60	3,60	8,00	15,90
1,70	3,80	8,50	16,90
1,80	4,00	9,00	17,80

Таблица 22

Определение фруктозы по меди, мг (по Кольтгофу)

Фруктоза	Медь	Фруктоза	Медь	Фруктоза	Медь
10	20,2	40	73,1	70	123,3
20	38,1	50	90,3	80	140,2
30	55,7	60	107,2	90	172,2

Таблица 23

Микрометод определения сахаров по Хагедорн-Иенсену

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,06	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Составы питательных смесей для водных и песчаных культур и изолированных тканей растений

Для приготовления растворов применяются химически чистые реактивы и бидистиллированная или очищенная на ионообменных смолах вода. Питательные растворы следует готовить более концентрированными – в 100 или 200 раз – и потом добавлять соответствующие количества в воду или песок. При этом соли, отмеченные цифрами 1 и 2, целесообразно растворять отдельно, так как в смеси они образуют осадок. Хранить исходные растворы нужно в темноте, потому что на свету образуется нерастворимый гидрат окиси железа и могут появиться водоросли. При изготовлении растворов необходимо учитывать форму соединения (безводную, кристаллизованную с водой) и вносить соответствующие поправки.

В большинстве рецептов рекомендуют определенные соли, а в некоторых же дают лишь ионные концентрации в мг-экв/л. Питательные смеси составляют из произвольно выбранных солей по главным компонентам, затем pH доводят до нужного значения.

Таблица 24

Составы питательных смесей для водных и песчаных культур и изолированных тканей растений

Среда Кнопа 1			
1		2	
Ca(NO ₃) ₂ безводный	1,00 г/л	KH ₂ PO ₄	0,25 г/л
или Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,44 г/л	MgSO ₄ безводный	0,25 г/л
KNO ₃	0,25 г/л	или MgSO ₄ 7H ₂ O	0,51 г/л
KCl	0,12 г/л		
FeCl ₃ , 5%-ный раствор	1 капля		
Среда Кнопа 11			
1% Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		8 мл/л	
5% KH ₂ PO ₄		4 мл/л	
10% KNO ₃		2мл/л	
1% MgSO ₄ ·7H ₂ O		2мл/л	
10% KCl		1мл/л	
0,8% Fe лимоннокислое		5 мл/л	
Среда Прянишникова			
NH ₄ NO ₃		0,240 г/л	
CaHPO ₄		0,172 г/л	
Продолжение табл. 24			
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0,025 г/л	
CaSO ₄ ·2H ₂ O		0,344 г/л	
или CaSO ₄ безводный		0,312 г/л	
MgSO ₄ безводный		0,060 г/л	
или MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,123 г/л	
KCl		0,160 г/л	

Среда Хоглэнда-Ариона 11			
Ca(NO ₃) ₂ безводный		0,82045 г/л	
KNO ₃		0,50555 г/л	
KH ₂ PO ₄		0,13609 г/л	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,24076 г/л	
Ca(NO ₃) ₂ безводный		0,65636 г/л	
KNO ₃		0,50555 г/л	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,24076 г/л	
NH ₄ H ₂ PO ₄		0,11503 г/л	
Среда Гельригеля			
1		2	
Ca(NO ₃) ₂ безводный	0,492 г/л	KH ₂ PO ₄	0,136 г/л
или Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,708 г/л	MgSO ₄ , безводн.	0,060 г/л
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,025 г/л	или MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,123 г/л
KCl	0,075 г/л		

Правила приготовления растворов щелочей и кислот

Правила приготовления растворов щелочей

1. Кусочки щелочи нельзя брать голыми руками, их можно брать пинцетом, щипцами, а если нужно взять руками, то обязательно в резиновых перчатках. Гранулированную щелочь (в виде маленьких лепешек) насыпают фарфоровой ложечкой.
2. Отвешиваемую щелочь нельзя класть на бумагу; ее можно взвешивать только в стеклянной или фарфоровой посуде.
3. Щелочь нельзя растворять в толстостенных бутылках, так как при растворении происходит сильное разогревание и бутылка может лопнуть.

Правила приготовления растворов кислот

Расчеты при приготовлении растворов кислот иные, чем при приготовлении солей и щелочей, так как концентрированные растворы кислот содержат воду. Нужно количество кислоты не отвешивают, а отмеряют мерным цилиндром.

1. Раствор нельзя готовить в толстостенной бутылки, так как при разбавлении кислот, особенно серной, происходит сильное разогревание. Растворы кислот готовят в колбах.
2. При разбавлении раствора нельзя лить воду в кислоту. В колбу наливают рассчитанное количество воды, а затем тонкой струей, постепенно, при

перемешивании добавляют нужное количество кислоты. Кислоту и воду отмеряют мерными цилиндрами. Операцию проводят в очках.

3. После того, как раствор остынет, его переливают в бутылку и наклеивают этикетку.

Общие правила работы с весами

1. Одно из главных правил – установка весов в правильном положении по уровню или отвесу. Для регулировки положения используют передние винтовые подпорки весов. Необходимо исключить их вибрацию.
2. Весы запрещается передвигать и тем более переносить с места на место.
3. Нуль на весах обязательно проверяют перед работой.
4. Ни в коем случае нельзя насыпать вещества на чашку весов! Взвешивать вещества разрешается на листе бумаги (лучше кальки), на часовом стекле, в стакане, бюксе и т.п. Разумеется, массу вещества определяют как результат разницы двух взвешиваний – пустой тары и с веществом.
5. Запрещается на чашки ставить грязные предметы.
6. Класть предметы на чашку можно только при арретированных весах.
7. Вещества и тару всегда взвешивают при той температуре, при которой находятся сами весы. Поэтому, если взвешиваемое тело было взято из сушильного шкафа, печи или холодильника, его следует выдержать рядом с весами 5-10 мин, чтобы оно приобрело температуру весов.
8. Если в одной работе требуется провести несколько взвешиваний, то следует пользоваться только одними и теми же весами (и одним разновесом). Перед началом работы следует проверить вертикальное положение стойки весов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 591 с.
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987.
3. Землянухин А.А. Практикум по биохимии. Воронеж: Изд-во Воронеж, ун-та, 1975.
4. Конарев В.Г., Тютюрев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений. Л.: Колос, 1970.
5. Космакова В.Е., Прозумещикова Л.Т. и др. Руководство для большого практикума по физиологии растений. Владивосток, 1977.
6. Макурина О.Н., Подковкин В.Г., Кленова Н.А. Практикум по биологической химии. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2000.
7. Методы биохимического анализа растений/Под ред. В. В. Полевого и Г. Б. Максимова. Л.: Изд-во ЛГУ, 1978. 192 с.
8. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.К. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
9. Полевой В.В., Максимов Г.Б. Методы биохимического анализа растений. Л.: Изд-во ЛГУ, 1978.

10. Практикум по биохимии: Учебное пособие. М.: Из-во МГУ, 1989.
11. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. Л.: Изд-во МГУ, 1989.
12. Физиологические и биохимические методы анализа растений: практикум/ Калининград: Изд-во Калинингр. ун-та, 2000. 59 с.
13. Фролов Ю.П. Современные методы биохимии. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2003.
14. Bates L. S., Waidren R. P., Tear J. D. Rapid determination of free proline for water stress studies//Plant and Soil. 1973. V. 39. N1. P. 205.
15. Loening U. E. The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyakrylamide-gel electrophoresis//Biochem. J.–1967.–102, N1.–P.251–257.

Учебное издание

Составители: **Маргарита Григорьевна Кусакина**
Василий Иванович Суворов
Лариса Алексеевна Чудинова

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ «БИОХИМИЯ»

Лабораторные работы

Редактор Л.В. Хлебникова
Корректор М.Н. Демидова
Компьютерная верстка В.И. Суворов

Подписано в печать 21.03.2012. Формат 60х84 1/16
Усл. печ. л. 8,60. Уч. –изд. л. 5,9. Тираж 50 экз.

Редакционно-издательский отдел
Пермского государственного национального
исследовательского университета
614990, Пермь, ул. Букирева,15

Типография Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, Пермь, ул. Букирева,15