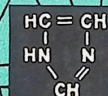


Б.П.Плешков

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ



ЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ ДЛЯ ВЫСШИХ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

Б. П. ПЛЕШКОВ,
профессор, доктор биологических наук

577.1
П-386

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

ИЗДАНИЕ ВТОРОЕ, ДОПОЛНЕННОЕ И ПЕРЕРАБОТАННОЕ

Допущено Главным управлением высшего и среднего сельскохозяйственного образования Министерства сельского хозяйства СССР в качестве учебного пособия для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по специальности «Агрохимия и почвоведение»



МОСКВА «КОЛОС» 1976

К

Значение биохимии и биохимических методов исследования в агрономической науке и практике особенно резко возрастает в настоящее время, когда на одно из первых мест поставлена задача повышения качества сельскохозяйственной продукции. Без знания основ биохимии и биохимических исследований нельзя оказывать влияние на формирование урожая и дать соответствующую оценку его качества. Биохимические методы все шире используются в агрохимии, растениеводстве и в селекционной работе при выведении новых сортов.

При составлении настоящего пособия использован опыт преподавания биохимии растений, а также методы научно-исследовательской работы, применяемые на кафедре агрономической и биологической химии Московской сельскохозяйственной академии имени К. А. Тимирязева.

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой ботаники и физиологии растений Горьковского сельскохозяйственного института доценту И. П. Елисееву и доценту М. С. Рубцовой за тщательный просмотр рукописи при рецензировании, а также научным сотрудникам ТСХА В. Ф. Волобуевой, В. В. Кидину, В. П. Князевой, Н. Е. Кузнецовой, Н. Н. Новикову, Н. Г. Ракипову, Г. А. Товмасьяну и З. Ц. Шебшелевой за проверку методик, изложенных в практикуме.

Плешков Б. П.

Практикум по биохимии растений. Изд. 2-е, доп.
П 38 и перераб. М., «Колос», 1976.

256 с. с ил. (Учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).

В пособии изложены теоретические основы и методы определения различных групп соединений в растениях, интенсивности некоторых процессов обмена веществ и активности ферментов, катализирующих эти процессы. Во второе издание (первое вышло в 1969 г.) включены новые методы исследования растительных белков. Заново написаны разделы по определению активности ферментов и содержанию витаминов, включен новый материал по определению фосфорсодержащих соединений в растениях.

П $\frac{40301-200}{035(01)-76}$ 225—76

581.4

АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА

Азот входит в состав многих соединений, играющих важнейшую биологическую роль в жизни растений,— белков, нуклеиновых кислот, хлорофилла, алкалоидов, фосфатидов и др.

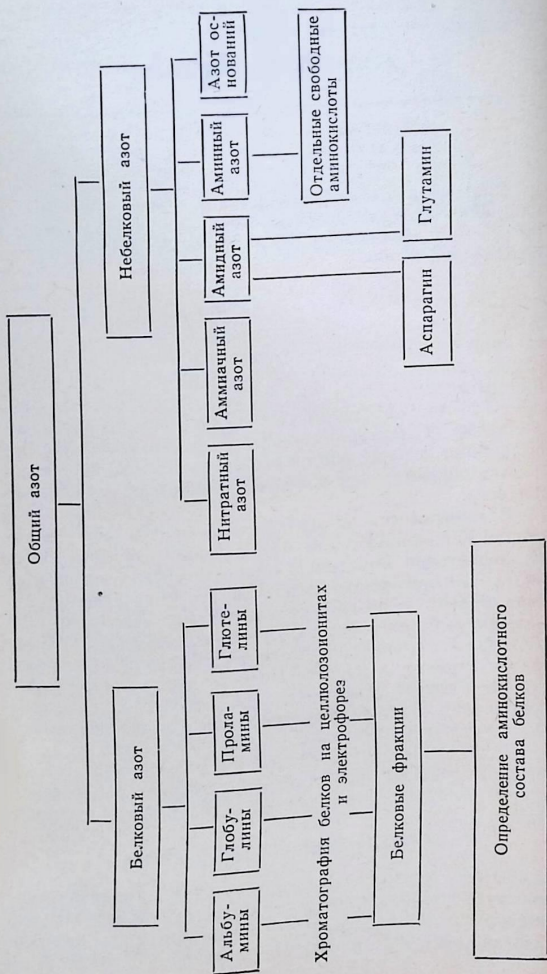
В зависимости от количества и состава этих соединений в значительной степени изменяется качество урожая, а следовательно, и питательная ценность растительных продуктов. Кроме того, содержание отдельных групп азотистых соединений в различных органах растений может указывать на интенсивность и направленность процессов азотного обмена. Поэтому при биохимическом исследовании и определении качества урожая большинства растений часто бывает необходимо определить количество и состав различных групп азотистых веществ.

В зависимости от поставленной задачи образцы растений анализируют с разной степенью дробности. Иногда достаточно определить только общее содержание азота или суммарное количество азота, входящего в состав белков и небелковых азотистых соединений (так называемый белковый азот и небелковый азот). В большинстве же случаев необходимо исследовать состав белковых веществ в растительных тканях, а также содержание и состав отдельных групп небелковых азотистых соединений. Важное значение имеет определение аминокислотного состава белков.

В настоящее время разработаны довольно точные методы таких исследований. На странице 4 приведена схема количественного определения различных форм азота.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА

Общее количество азота в растительных тканях колеблется в широких пределах. В свежих корнеплодах его содержится 0,1—0,2% сырого материала, в клубнях картофеля — 0,3—0,5, в листьях растений — 0,3—1,0, в се-



менах злаков — 1,5—3,5, в семенах бобовых культур — 3,0—6,0%.

Принцип метода. Для определения общего азота чаще всего пользуются микрометодом Кьельдаля. Этот метод довольно продолжителен, но отличается от других наибольшей точностью, и его принимают за стандарт.

Принцип метода состоит в том, что навеску анализируемого материала минерализуют в присутствии концентрированной серной кислоты, в результате чего все органические вещества окисляются, а выделяющийся аммиак связывается серной кислотой. Затем аммиак отгоняют со щелочью и по количеству выделившегося аммиака вычисляют количество азота в исследуемом материале.

Ход определения. Навеску растительного материала, содержащую 5—10 мг азота, переносят в колбу Кьельдаля емкостью 50—100 мл и приливают около 5 мл концентрированной H_2SO_4 (плотность 1,84). Для ускорения сжигания в колбу добавляют катализатор — 0,5 г смеси $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4:\text{Se}$ (100:10:1). Можно использовать и один металлический селен (0,05 г). После добавления катализатора содержимое колбы нагревают до кипения и слабо кипятят до полного обесцвечивания раствора.

По окончании сжигания колбу охлаждают, добавляют немного воды и содержимое количественно переносят в мерную колбу объемом 50 или 100 мл. Раствор в колбе доводят дистиллированной водой до метки.

Отгоняют аммиак в аппарате Кьельдаля, модифицированном для микроопределений (рис. 1). Аппарат состоит из парообразователя, колбы Кьельдаля, холодильника и приемника. До дна колбы проходит трубка с оттянутым, несколько изогнутым вниз концом, через которую в колбу вносят раствор щелочи.

Для отгона аммиака из мерной колбы берут 10 мл раствора и переносят в колбу Кьельдаля. Затем в приемник аппарата помещают 10 мл 2%-ного раствора борной кислоты, содержащей 10 мл/л индикатора Конвея. Этот реактив готовят следующим образом: 20 г борной кислоты растворяют в смеси 200 мл спирта и 700 мл воды и добавляют 10 мл смешанного индикатора, приготовленного растворением 0,033 г бромкрезола зеленого и 0,066 г метилового красного в 100 мл абсолютно спирта; после смешивания раствора борной кислоты

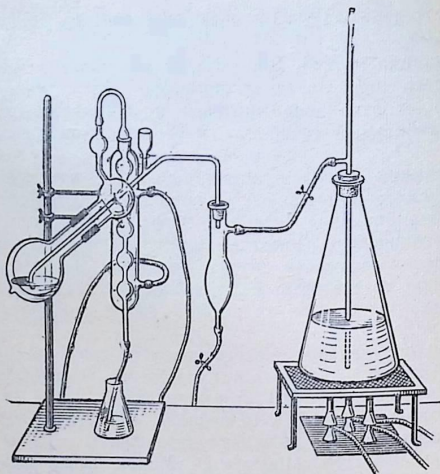


Рис. 1. Прибор для отгона аммиака при определении азота микрометодом Кьельдаля.

с индикатором к смеси добавляют несколько капель 0,05 н. NaOH , для окраски реактива в слабо-розовый цвет.

После подготовки приемника в колбу Кьельдаля вносят 5 мл 30—40%-ной NaOH и из предварительно нагретого парообразователя пускают пар. Начинает выделяться аммиак. Он отгоняется в приемник, где поглощается раствором борной кислоты с образованием бората аммония. Отгон аммиака длится 15—20 мин.

При титровании серной кислотой вместо индикатора Конвея можно использовать индикатор Гроака, который готовят смешиванием одного объема 0,4%-ного спиртового раствора метилового красного с одним объемом 0,2%-ного раствора метиленового голубого. В случае использования реактива титруют до изменения зеленой окраски в красно-фиолетовую.

Вычисление результатов. Каждый миллилитр точно 0,01 н. H_2SO_4 связывает аммиак в количестве, соответ-

ствующем 0,14 мг азота. Умножая число миллилитров связанной H_2SO_4 на поправку к ее титру и на этот коэффициент, узнают, сколько азота содержалось в объеме жидкости, взятом для отгона аммиака. Вычисление можно вести по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot T \cdot 0,14 \cdot 100 \cdot 100}{H \cdot 10},$$

где x — содержание азота, %;
 a — количество 0,01 н. H_2SO_4 , израсходованной на титрование, мл;
 T — поправка к титру 0,01 н. H_2SO_4 ;
 100 — коэффициент для перевода в проценты;
 H — навеска абсолютно сухого вещества, мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО АЗОТА

При определении азота, входящего в состав белковых веществ, белки отделяют от других азотистых соединений осаждением 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Затем осадок минерализуют с серной кислотой и определяют содержание азота по Кьельдалю.

Ход определения. Навеску хорошо измельченного растительного материала, содержащего около 5 мг белкового азота, переносят в стакан емкостью 100 мл, добавляют 25 мл воды и нагревают до кипения, помешивая стеклянной палочкой. При анализе материала, в котором много крахмала (семена злаков и зернобобовых культур, клубни картофеля), содержимое стакана нагревают до 40—50°C на водяной бане (при более высокой температуре крахмал клейстеризуется и последующее фильтрование затрудняется). После кратковременного нагревания осаждают белки, для чего в стакан при помешивании добавляют 5 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH). После отстаивания в течение 30—40 мин содержимое стакана фильтруют через беззольный фильтр. Стакан и осадок на фильтре промывают несколькими порциями 2%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем фильтр вместе с воронкой переносят в термостат и сушат в течение 1—2 ч при температуре 50—60°C. Когда бумага начнет легко отделяться от воронки, фильтр вместе с осадком переносят в колбу Кьельдаля,

наливают 5—7 мл концентрированной H_2SO_4 , добавляют катализатор и проводят сжигание.

Отгон аммиака и расчеты ведут так же, как и при определении общего азота. Результаты определений белкового азота выражают в процентах массы сухого вещества.

По количеству белкового азота можно вычислить содержание белков в растительном материале. Среднее содержание азота в белках составляет 16%, поэтому, умножая количество белкового азота на коэффициент 6,25 ($100 \div 16 = 6,25$), получают данные о суммарном содержании белков в растении. Однако установлено, что белки отдельных сельскохозяйственных культур различаются по содержанию в них азота, и поэтому коэффициенты пересчета азота на белок неодинаковы: по В. Г. Конареву, для зерна пшеницы и ячменя — 5,70; риса — 5,95; овса и ржи — 5,83; сои — 5,71; арахиса — 5,46; подсолнечника, льна и хлопчатника — 5,30.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА

Содержание азота, входящего в состав небелковых соединений, в зрелых семенах большинства растений составляет 5—15% общего азота, в листьях растений — 10—30, а в корнеплодах и клубнях картофеля — до 50%. Суммарное количество небелковых азотистых соединений определяют либо по разности между содержанием общего и белкового азота, либо минерализацией фильтрата, остающегося после осаждения белковых веществ. В последнем случае белки осаждают 5%-ной трихлоруксусной кислотой, как описано при определении белкового азота, фильтруют и фильтрат собирают в мерную колбу емкостью 100 мл. Раствор доводят дистиллированной водой до метки, берут 50 мл фильтрата и переносят в колбу Кьельдаля. Туда же добавляют 3—5 мл концентрированной H_2SO_4 , и содержимое очень слабо кипятят до полного испарения воды. После этого в колбу добавляют катализатор и минерализуют органическое вещество до полного обесцвечивания жидкости. Затем содержимое колбы переносят количественно в мерную колбу емкостью 50 мл. Для отгона аммиака берут две пробы по 10 мл раствора, а при малом количестве небелкового азота — по 20 мл. Отгоняют аммиак так же, как и при определении общего азота.

Вычисление результатов ведут так же, как и при определении общего азота (с учетом разбавления).

Оборудование и реактивы для определения форм азота: 1) прибор для отгона аммиака, водяная баня, колбы Кьельдаля для сжигания, микробюретка, стаканы, воронки, пипетки, колбы мерные на 50 и 100 мл, фильтры беззольные;

2) H_2SO_4 концентрированная, NaOH 30—40%-ный, трихлоруксусная кислота 50%-ная, борная кислота, спирт, бромкрезол зеленый, метиловый красный, метиленовый голубой, селен, K_2SO_4 , CuSO_4 .

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ ФЕНОЛОВЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода (по В. Н. Кудеярову). В основу метода положена фенолятгипохлоритная реакция. При взаимодействии аммиака, фенола и гипохлорита образуется индофенол голубого цвета. Развитие окраски идет в щелочной среде. При использовании в качестве катализатора реакции нитропруссиды натрия устойчивое окрашивание наступает через 30—40 мин. Содержание азота определяют по интенсивности окраски на фотоэлектроколориметре.

Ход определения. 10 мл раствора, содержащего от 0,01 до 0,10 мг азота, берут пипеткой в мерную колбу на 100 мл, разбавляют водой до объема 20—30 мл и осторожно нейтрализуют 1 н. NaOH по метиловому красному.

К нейтрализованному раствору немедленно приливают из бюретки 5 мл «комбинированного реактива» и несколько капель гипохлорита натрия.

Содержимое колбы перемешивают и оставляют в затемненном месте на 40 мин. Затем объем окрашенного раствора в колбе доводят до метки и колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром. Параллельно проводят определение в контрольной пробе смеси применявшихся реактивов, но вместо раствора берут 10 мл воды.

Содержание азота определяют по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика в колбы емкостью 50 мл берут 2, 4, 8, 10, 15 и 20 мл образцового раствора сернокислого аммония, содержащего 0,01 мг N в 1 мл. Такой раствор готовят путем растворения 2,3431 г химически чистого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 1 л бидистиллированной воды. Из этого раствора берут 20 мл

и снова доводят бидистиллированной водой до 1 л. Стандартную шкалу из образцовых растворов готовят подобным же образом, не исключая добавления того же количества метилового красного. На основании фотокolorиметрирования образцовых растворов строят калибровочный график и по графику определяют содержание азота в растворе.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, мерные колбы на 100 мл, пипетка, бюретка;

2) 1 н. NaOH, метиловый красный.

«Комбинированный реактив». 18 г NaOH заливают в стакане 20 мл расплавленного фенола и все это растворяют в 200—300 мл воды. В полученной жидкости после охлаждения растворяют 280 мг нитропруссид натрия. Раствор из стакана переносят в мерную колбу на 1 л и доводят водой до метки. Приготовленный реактив хранят в темной склянке не более месяца.

Гипохлорит натрия. Хлор, получаемый при взаимодействии концентрированной HCl с KMnO_4 , пропускают в течение 6 ч со скоростью 2—3 пузырька в секунду через 1 н. раствор NaOH. Гипохлорит хранят в темной склянке с притертой пробкой. Регулярно (через 1—3 месяца) определяют концентрацию реактива. Для этого в ряд колбочек с одинаковым количеством образцового раствора прибавляют по 5 мл «комбинированного реактива», затем добавляют гипохлорит в возрастающем количестве капель от 1 до 15. Через 40 мин определяют раствор с наиболее интенсивной окраской.

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО АЗОТА

В ряде случаев для массовых анализов, особенно при оценке селекционного материала, необходимо использовать более быстрые, чем метод Кьельдаля, способы определения содержания азота в растительных образцах. Наиболее точными являются модификации, разработанные на основе метода Кьельдаля. Один из них — метод ускоренного определения азота с использованием реактива Несслера был разработан З. В. Чмелевой и С. Л. Тютеревым.

Принцип метода. Растительный материал озоляют с серной кислотой, для ускорения минерализации исполь-

зуют перекись водорода. Раствор нейтрализуют щелочью и окрашивают реактивом Несслера. По интенсивности окраски определяют содержание азота в исследуемом образце.

Ход определения. На аналитических весах отвешивают 100 мг тонкоразмолотой муки и переносят в термостойкую пробирку диаметром около 2 см, высотой 20 см и емкостью 40 мл (с точной меткой). Вместо градуированных термостойких пробирок можно использовать колбы Кьельдаля емкостью 50—100 мл. Если вместо муки для анализа используют другой растительный материал, навеску берут с таким расчетом, чтобы в ней содержалось около 2 мг азота.

В пробирки приливают по 3 мл концентрированной серной кислоты и по 0,5 мл 30%-ной перекиси водорода и помещают в гнезда специального металлического блока, установленного на электроплитке (газовой горелке). Озоление растительного материала проводят при температуре около 400°C. Не следует допускать бурного кипения смеси. Для ускорения минерализации органических веществ через 1 ч после начала кипения в пробирки или колбы осторожно добавляют еще по 0,5 мл перекиси водорода. Нагревание продолжают до полного обесцвечивания содержимого пробирок.

После окончания озоления пробирки выдерживают еще 15—20 мин для окончания разложения перекиси водорода. Затем в охлажденные пробирки очень осторожно приливают воду примерно до половины объема. Содержимое пробирок вновь охлаждают, доводят водой до метки (40 мл), закрывают пробками и тщательно перемешивают. Если вместо мерных термостойких пробирок для сжигания использовали колбы Кьельдаля, после охлаждения в них добавляют по 15—20 мл воды и содержимое количественно переносят в мерные колбы емкостью 50 мл. Колбы Кьельдаля тщательно обмывают несколько раз небольшими объемами воды и сливают их в мерную колбу. Затем колбы доводят водой до метки, закрывают пробками и перемешивают.

После этого готовят растворы для колориметрирования. В мерные колбы емкостью 50 мл наливают примерно по 20 мл воды. Затем из пробирок, в которых проводилось сжигание, или из колб, в которые был перенесен раствор после сжигания, берут точно по 2—5 мл вытяжки (в зависимости от предполагаемого содержания

азота в исследуемых образцах) и переносят в мерные колбы. Содержание колб нейтрализуют 10%-ным раствором NaOH (обычно на 1 мл вытяжки расходуют около 1 мл 10%-ной щелочи). Конец нейтрализации определяют по посинению лакмусовой бумажки, на которую наносят из колбы каплю раствора стеклянной палочкой. Чтобы избежать появления опалесценции раствора, в колбы добавляют по 5 мл 50%-ного раствора сегнетовой соли и приливают по 2 мл реактива Несслера. Необходимо строго соблюдать порядок добавления реактивов. Колбы доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

В результате реакции между аммиаком и реактивом Несслера раствор окрашивается при малом содержании азота в желтый цвет, при более высоком — в оранжевый. Растворы должны быть совершенно прозрачными. Интенсивность окраски растворов определяют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром или на спектрофотометре при 410 нм.

Вычисление результатов. Содержание азота рассчитывают по калибровочной кривой, для построения которой используют образцовый раствор NH_4Cl . При приготовлении этого раствора 0,382 г химически чистого (х.ч) перекристаллизованного NH_4Cl растворяют в 1 л бидистиллированной воды и получают исходный раствор с содержанием 0,1 мг азота в 1 мл. Из этого раствора путем десятикратного разведения готовят образцовый раствор с содержанием 0,01 мг азота в 1 мл. Шкалу образцовых растворов готовят со следующими концентрациями (мг азота в колбе емкостью 50 мл): 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25. Для этого в мерные колбы берут 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 или 25 мл образцового раствора, добавляют немного воды, затем по 0,5 мл 50%-ного раствора сегнетовой соли и по 2 мл реактива Несслера. Содержимое колб доводят водой до метки (приготовление реактива Несслера см. ниже).

Пример. Навеска муки 0,100 г. После сжигания в пробирке из общего объема 40 мл берут 2 мл, что соответствует 0,005 г муки. Если сжигали в колбе Кьельдаля и затем переносили раствор в колбу емкостью 50 мл, то 2 мл соответствуют 0,004 г муки. По калибровочному графику нашли, что оптическая плотность испытуемого раствора, равная 0,505, соответствует концентрации 0,139 мг азота в колбе емкостью 50 мл.

Таким образом, общее содержание азота в муке равно:

$$\frac{0,139 \cdot 100}{0,005 \cdot 1000} = 2,78\%.$$

Умножая найденное количество азота на коэффициент 5,7 (для пшеницы), определяют содержание азота в воздушно-сухой муке: $2,78 \times 5,7 = 15,85\%$. Для перевода на абсолютно сухое вещество этот результат умножают на коэффициент влажности муки.

Авторы метода указывают, что опытный аналитик в течение рабочего дня может проанализировать 40—50 образцов в двух параллельных навесках.

Оборудование и реактивы: 1) термостойкие пробирки диаметром 2 см и высотой 20 см с точной меткой 40 мл, колбы Кельды-ля на 50 или 100 мл, штативы, электроплитки, фотоэлектроколориметр, или спектрофотометр, мерные колбы емкостью 1 л, 100 мл и 50 мл, градуированные пипетки;

2) H_2SO_4 концентрированная, перекись водорода 30%-ная, 50%-ный раствор сегнетовой соли, NH_4Cl , реактив Несслера, лакмусовая бумага.

Реактив Несслера. Холодный насыщенный раствор хлорной ртути $HgCl_2$ осторожно приливают при перемешивании к раствору 13 г KJ в 25 мл дистиллированной воды до появления небольшой мути. Выпадающую муть удаляют фильтрованием. К полученному прозрачному фильтрату прибавляют раствор едкого кали (55 г KOH в 150 мл воды), разбавляют водой до 250 мл и тщательно перемешивают. После этого добавляют по каплям при непрерывном помешивании насыщенный раствор $HgCl_2$ до появления слабого не исчезающего желтоватого осадка. Жидкости над осадком дают отстояться и прозрачный раствор сливают. Реактив хранят в темной склянке.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАЧНОГО АЗОТА

Аммиак является исходным и конечным соединением обмена органических азотистых веществ. Содержание его в растениях обычно незначительно и находится он главным образом в форме солей органических кислот.

Аммиачный азот — одна из наиболее подвижных изменчивых фракций азота, поэтому определяют его в свежем растительном материале. Для этого обычно ис-

пользуют фильтрат после осаждения белковых веществ или водную вытяжку тонкоизмельченного растительного материала.

Аммиак из раствора отгоняют при слабощелочной реакции в условиях возможно более низкой температуры. При таком способе отгонки амидный и аммиачный азот не гидролизуются. Количество аммиака учитывается при отгонке титрованием или колориметрически.

Ниже приведен микродиффузионный метод определения аммиака — метод Конвея.

Принцип метода. В замкнутом пространстве аммиак, выделяющийся при слабом подщелачивании испытуемого раствора (фильтрата после осаждения белковых веществ), улавливается титрованной кислотой. Реакция проводится в специальных стеклянных чашках Конвея с двумя отделениями. Крышки чашки пришлифованы к бортам (рис. 2). Метод очень удобен при массовых анализах растительных образцов, особенно в сравнительных исследованиях.

Ход определения. 5—10 мл испытуемого раствора вливают во внешнее отделение чашки, а во внутреннее — из микробюретки 1 мл 0,01 н. H_2SO_4 . К содержимому обоих отделений прибавляют по 3—5 капель смешанного индикатора, вследствие чего жидкость окрашивается в красный цвет. Чашку закрывают смазанной по шлифу вазелином крышкой так, чтобы оставалась небольшая щель для введения вытесняющих аммиак реактивов (по-

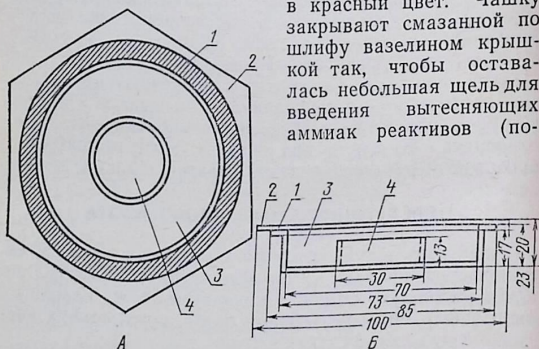


Рис. 2. Микродиффузионная чашка Конвея:

А — вид сверху; Б — разрез; 1 — поверхность шлифа чашки; 2 — крышка; 3 — внешнее отделение чашки; 4 — внутреннее отделение чашки (размеры указаны в мм).

таш, окись магния). Через щель пипеткой во внешнее отделение чашки вносят 1 мл насыщенного раствора поташа и чашку быстро полностью закрывают крышкой. В результате подщелачивания содержимое внешнего отделения приобретает зеленую окраску. Для перемешивания жидкости чашку осторожно вращают по поверхности стола и затем оставляют до полного окончания реакции вытеснения и последующего поглощения аммиака.

Длительность выдерживания чашки зависит от количества аммиака в испытуемом растворе, температуры и определяется опытным путем. Обычно при комнатной температуре чашки оставляют на ночь, а при температуре 35—40°C (чашки ставят в термостат) — на 1½—2 ч.

По окончании поглощения выделившегося аммиака титрованной кислотой во внутреннем отделении чашки неизрасходованную кислоту оттитровывают из микробюретки 0,01 н. NaOH до момента перехода розовой окраски жидкости через фиолетовую в ярко-зеленую.

Вычисление результатов проводят по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot T \cdot 0,14 \cdot 100}{H},$$

где x — содержание аммиачного азота, %;

a — количество 0,01 н. H_2SO_4 , израсходованной на связывание аммиака, мл;

T — поправка к титру 0,01 н. H_2SO_4 ;

100 — коэффициент для перевода в проценты;

0,14 — количество аммиачного азота, соответствующее 1 мл 0,01 н. H_2SO_4 , израсходованной на связывание аммиака;

H — навеска вещества в объеме раствора, взятого для определения.

Оборудование и реактивы: 1) чашки Конвея, пипетки, микробюретки;

2) 0,01 н. H_2SO_4 , 0,01 н. NaOH, насыщенный раствор поташа, вазелин или вакуумная смазка.

Комбинированный индикатор готовят смешиванием 0,1%-ных спиртовых растворов метилового красного и метиленблау в соотношении 4 : 1. Смесь хранят в темноте в течение длительного срока. При употреблении ее разбавляют спиртом и водой в соотношении 1 : 1 : 2. Полученный раствор красного цвета нейтрализуют 0,1 н. NaOH до появления коричневато-фиолетовой окраски.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТНОГО АЗОТА

Нитратов в растениях обычно очень мало. Эти вещества, как правило, уже в корнях восстанавливаются до аммиака.

Количество нитратного азота в тканях растений увеличивается при замедлении процесса редукции нитратов, а также при усиленном нитратном питании.

Нитраты полностью извлекаются из растений водой, поэтому для анализа можно использовать водную вытяжку. Учитывая высокую подвижность этой формы азота в растениях, содержание нитратов определяют в свежем растительном материале.

Для количественного определения часто используют колориметрический метод с применением дисульфифеноловой кислоты. Метод основан на образовании вследствие реакции нитратов с дисульфифеноловой кислотой нитрофенолов — соединений, дающих в нейтральной или слабощелочной среде характерное зеленовато-желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна количеству нитратов в испытуемом образце.

Ход определения. Объем водной вытяжки (соответствующий навеске около 50 мг сухого вещества) помещают в фарфоровую чашку и выпаривают досуха. При малом количестве нитратов навеску растительного материала увеличивают. Если при определении используют водные экстракты, не очищенные от органических веществ, вытяжку предварительно обрабатывают 30%-ным раствором H_2O_2 до полного их разрушения.

Осадок в фарфоровой чашке охлаждают и смачивают из пипетки 1 мл дисульфифеноловой кислоты. Осадок полностью растворяют при помешивании стеклянной палочкой. Через 5—10 мин после растворения в чашку приливают 5—10 мл воды и нейтрализуют, добавляя по каплям раствор 10%-ной щелочи. Реакцию среды проверяют по лакмусовой бумажке. Раствор из чашки количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл и колориметрируют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром.

Количество нитратов в используемом растворе определяют по калибровочной кривой, построенной по результатам колориметрирования стандартных растворов с концентрацией нитратного азота от 0,1 до 5 мг на 1 л с различием в концентрациях 0,5 мг на 1 л.

Образцовые растворы готовят из перекристаллизованного азотнокислого калия. Для приготовления раствора, содержащего 0,01 мг нитратов в 1 мл, навеску KNO_3 0,1631 г растворяют в дистиллированной воде и объем раствора в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 1 л.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, фарфоровые чашки, стеклянные палочки, пипетки, мерные колбы;

2) NaOH или KOH 10%-ный, дисульфифеноловая кислота, образцовый раствор нитрата.

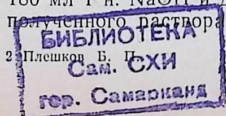
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА

Определение аминного азота необходимо при детальном анализе форм азотистых соединений, особенно при изучении активности протеолитических ферментов, и степени гидролитического расщепления белков под влиянием кислот и щелочей.

Для большинства методов необходимо большое количество материала. Поэтому значительный интерес представляет микрометод определения аминного азота медным способом, разработанный Войвудом и модифицированный Т. А. Глаголевой.

Принцип метода состоит в том, что аминокислоты реагируют с солями меди с образованием растворимого медного комплекса. Избыток меди удаляют из раствора, и содержание меди в растворе определяют либо йодометрически, либо с помощью диэтилдитиокарбамата натрия, который количественно разлагает медные соединения с аминокислотами, давая при этом желтое окрашивание. Оптическую плотность окрашенного раствора определяют колориметрически. Линейная зависимость между количеством большинства аминокислот сохраняется в пределах от 1 до 30 микрограммов (мкг) аминного азота.

Ход определения. К 1 мл испытуемого раствора, содержащего 10—60 мкг аминного азота, добавляют 2,5 мл Na_2HPO_4 (25,6 г Na_2HPO_4 растворяют в воде и доводят до 1 л) и 2,5 мл суспензии фосфорнокислой меди. Суспензию получают следующим образом. Сначала готовят раствор Na_3PO_4 , для чего растворяют 25,6 г Na_2HPO_4 в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 180 мл 1 н. NaOH и доводят водой до 1 л. К 1 объему полученного раствора Na_3PO_4 добавляют 1 объем рас-



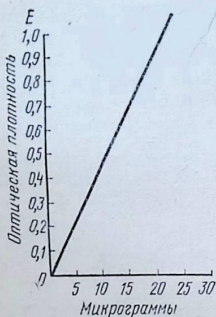


Рис. 3. Калибровочный график для определения аминокислот медным способом.

твора CuCl_2 (27,3 г CuCl_2 в 1 л) и смесь хорошо перемешивают. Затем приливают 4 объема 2,56%-ного раствора Na_2HPO_4 и нагревают с обратным холодильником в течение часа. Суспензию фосфорнокислой меди необходимо готовить не менее чем за 24 ч до употребления; срок хранения 1—2 месяца.

После добавления суспензии фосфорнокислой меди смесь в пробирке хорошо встряхивают и оставляют на 30 мин (за это время проходит реакция между медью и аминокислотами). Затем удаляют избыток меди. Для этого жидкость фильтруют через плот-

ный фильтр в чистую сухую пробирку или центрифугируют при 10 тыс. об/мин, что обеспечивает полное исключение из раствора следов осадка фосфорнокислой меди, которая может исказить результаты.

После удаления меди половину фильтрата или 3 мл центрифугата переносят в градуированную пробирку. Жидкость в пробирке доливают водой до 8 мл, прибавляют 0,1 мл 2%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия, доводят водой до 10 мл и хорошо перемешивают. При этом появляется желтое окрашивание.

После десятиминутного стояния соединение, дающее желтую окраску, экстрагируют 10 мл амилового или бутилового спирта. Смесь центрифугируют, и оптическую плотность полученного желтого раствора определяют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром. Параллельно определяют оптическую плотность контрольной пробы, к которой вместо испытуемого раствора была прилита вода.

Вычисление результатов. Содержание аминного азота определяют по найденной величине оптической плотности, используя калибровочную кривую (рис. 3). При расчетах величину оптической плотности контрольного раствора вычитают из величины оптической плотности опытного раствора.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга, фотоэлектроколориметр, колбы мерные емкостью 1 л и 500 мл, пипетки градуированные, пробирки градуированные;

2) CuCl_2 2,73%-ная, Na_2HPO_4 2,56%-ный, NaOH , диэтилдитиокарбамат натрия 2%-ный, амиловый или бутиловый спирт.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФОРМ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА В ОДНОЙ НАВЕСКЕ

Часто при проведении биохимических исследований бывает необходимо определить содержание в растениях всех основных форм небелкового азота (аммиачного, амидного, нитратного и аминного). Для этого удобно использовать методику, которая изложена ниже.

Навеску свежего растительного материала (5—7 г) помещают в фарфоровую ступку и тщательно растирают. Затем ступку смывают водой, переносят ее содержимое в стакан и проводят осаждение белкового азота 5%-ной трихлоруксусной кислотой, как описано выше (см. «Определение белкового азота»).

После осаждения белков раствор фильтруют в мерную колбу на 100 мл. Осадок промывают на фильтре несколькими порциями 2%-ной трихлоруксусной кислоты, количество раствора в колбе доводят водой до метки (колба № 1).

Из колбы № 1 отбирают 20 мл раствора для определения суммарного небелкового азота (см. «Определение небелкового азота»). Оставшийся в колбе № 1 фильтрат используют для определения содержания отдельных небелковых соединений азота.

Принцип метода определения форм небелкового азота основан на последовательном вытеснении азота различных небелковых соединений (аммиачного, амидного и нитратного) в замкнутом пространстве и улавливании выделяющегося азота (в форме NH_3) титрованной кислотой. Анализ про-

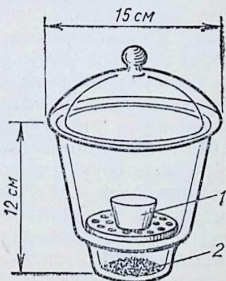


Рис. 4. Эксикатор для определения форм небелкового азота:

1 — приемник выделяющегося аммиака; 2 — испытуемый раствор.

водят в небольших эксикаторах с притертыми крышками (рис. 4).

Определение аммиачного азота. 20 мл раствора из колбы № 1 наливают в фарфоровую чашку и ставят на дно эксикатора. Сверху кладут специальную решетку с большими отверстиями, на нее устанавливают в качестве приемника выделяющегося аммиака фарфоровую чашечку, в которую из микробюретки наливают 10 мл титрованной 0,01 н. H_2SO_4 и 2—3 капли смешанного комбинированного индикатора (кислота в приемнике окрашивается в красный цвет).

Эксикатор закрывают смазанной по шлифу вазелином крышкой так, чтобы оставалась небольшая щель для введения вытесняющего аммиак реактива. Через оставленную щель и отверстие в решетке пипеткой в нижнюю чашку с испытуемым раствором осторожно вносят 10 мл насыщенного раствора поташа (K_2CO_3) или окиси магния. После этого эксикатор быстро полностью закрывают крышкой.

В результате подщелачивания испытуемого раствора (в нижней чашке) выделяется аммиачный азот, который поглощается кислотой в приемнике. Длительность реакции зависит от количества аммиачного азота в исследуемом растворе, температуры и определяется опытным путем. Обычно при комнатной температуре эксикаторы выдерживают 1—2 суток. Если по мере выделения аммиака жидкость в приемнике приобретает зеленый цвет (вся кислота связалась выделившимся аммиаком), добавляют еще 5—10 мл 0,01 н. H_2SO_4 .

По окончании поглощения выделяющегося аммиака кислотой приемник вынимают из эксикатора и неизрасходованную кислоту оттитровывают из микробюретки 0,01 н. NaOH до перехода розовой окраски жидкости через фиолетовую в ярко-зеленую.

Определение содержания амидного азота. После титрования в приемник наливают новую порцию (10 мл) 0,01 н. H_2SO_4 , добавляют смешанный индикатор и ставят приемник в эксикатор на прежнее место (нижнюю чашку с испытуемым раствором со дна эксикатора не вынимают).

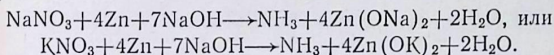
Закрыв эксикатор и оставив небольшую щель, как и в предыдущем случае, в нижнюю чашку с испытуемым раствором добавляют пипеткой 10 мл 40%-ной щелочи (NaOH). Затем эксикатор герметически закрывают и ос-

тавляют на 1—2 суток. Под действием щелочи происходит гидролиз амидов и выделение аммиака.

После окончания гидролиза амидного азота и связывания выделяющегося аммиака количество оставшейся кислоты в приемнике оттитровывают, как и в случае определения аммиачного азота 0,01 н. NaOH.

Определение нитратного азота. После определения содержания амидного азота в том же образце проводят определение количества нитратного азота. Для этого в приемник вновь наливают 10 мл 0,01 н. H_2SO_4 , а в нижнюю чашку в этом случае добавляют 0,1 г тонкопомолотого сплава Дебарда. Закрытые эксикаторы оставляют на 1—2 суток при комнатной температуре или на 8—10 ч при 50—60°C.

В результате взаимодействия сплава Дебарда с нитратами, содержащимися в испытуемом растворе, в щелочной среде нитраты восстанавливаются до аммиака, который выделяется в газообразной форме. Схематически эту реакцию можно представить следующим образом:



После окончания процесса восстановления нитратов и связывания аммиака оставшееся количество кислоты в приемнике оттитровывают 0,01 н. NaOH, как указано выше.

Определение аминного азота. Количество аминного азота в образце находят по разности между суммарным небелковым азотом (в %) и суммой аммиачного, амидного и нитратного азота в анализируемом образце (в %). Результат получается приблизительный.

Все описанные анализы необходимо вести в 2—3-кратной повторности.

Вычисление результатов количества всех форм небелкового азота ведут по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot T \cdot 0,14 \cdot 100 \cdot 100}{H \cdot 20},$$

где x — содержание определяемой формы небелкового азота, %;
 a — количество 0,01 н. H_2SO_4 , израсходованной на связывание выделившегося аммиака, мл;

T — поправка к титру 0,01 н. H_2SO_4 ;
100 — коэффициент для перевода в проценты;
100 и 20 — соответствующее разбавление.

Оборудование и реактивы: 1) эксикаторы, ступки фарфоровые, чашки фарфоровые и стеклянные, стаканы, мерные колбы емкостью 100 мл, микробюретка, пипетки, воронки, фильтры;

2) 0,01 н. H_2SO_4 , 0,01 н. $NaOH$, смешанный (комбинированный) индикатор, 40%-ная $NaOH$, насыщенный раствор K_2CO_3 , окись магния, сплав меди, цинка и алюминия в отношении 50 : 5 : 45 (сплав Дебарда).

ОСНОВЫ МЕТОДА РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Хроматографический метод, разработанный известным русским ученым М. С. Цветом, является одним из наиболее быстрых, точных и простых приемов анализа сложных смесей веществ. Сущность метода состоит в том, что при движении через пористую среду смесь веществ разделяется под действием различных факторов: 1) различная адсорбируемость компонентов смеси; 2) обмен между ионами раствора и ионами на поверхности адсорбента; 3) неодинаковая растворимость образующихся труднорастворимых осадков; 4) различное распределение компонентов между двумя несмешивающимися жидкими фазами и т. д. В соответствии с этим хроматографию обычно подразделяют на адсорбционную, ионообменную, осадочную, распределительную и др. В последнее время большое распространение получил метод распределительной хроматографии на бумаге, который сейчас очень широко используется в биохимии, физиологии, микробиологии, химии для определения самых разнообразных веществ.

Основными преимуществами хроматографического метода по сравнению с другими методами анализа являются следующие.

1. Относительная простота оборудования и проведения определений, особенно качественных. Этот метод может быть освоен и использован практически в любой лаборатории.

2. Хроматографией на бумаге можно определять почти все типы химических соединений, органические и неорганические, независимо от их растворимости в воде.

3. При хроматографических определениях достаточно иметь небольшое количество исследуемого вещества (обычно сотые и десятые доли миллиграмма).

4. Хроматографией на бумаге можно разделять близкие по строению соединения (например, очень близкие гомологи или структурные изомеры).

5. Быстрота проведения анализов. При разделениях сложных смесей веществ хроматографией на бумаге обычно затрачивают несколько дней, но при этом определяют до 20—30 соединений в многократной повторности.

Принцип метода распределительной хроматографии на бумаге основан на различии значений коэффициентов распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Одной жидкой *неподвижной* фазой обычно является вода, которая содержится в бумаге (20—22% ее массы), а другой жидкой *подвижной* фазой — насыщенный водой органический растворитель, не смешивающийся или частично смешивающийся с ней. В качестве второй жидкой фазы чаще всего используют насыщенные водой *n*-бутиловый спирт, фенол, крезол и различные смеси органических реактивов.

Коэффициент распределения (κ) данного вещества определяют по следующей формуле:

$$\kappa = \frac{\text{концентрация вещества в подвижной фазе}}{\text{концентрация вещества в неподвижной фазе}}.$$

При хроматографических определениях для подвижной фазы подбирают обычно такие органические растворители, у которых значения κ для данной смеси веществ различны.

Движение веществ при хроматографировании в процессе пропускания через бумагу органического растворителя объясняется следующим образом. Волокна целлюлозы имеют сильное сродство к воде, находящейся в небольшом количестве в органическом растворителе. Бумагу, содержащую 20% воды, можно представить как носителя стационарной, неподвижной водной фазы. Когда растворитель протекает через участок бумаги, на которой были нанесены разделяемые вещества, происходит распределение этих веществ между подвижной органической и стационарной водной фазами. При этом некоторая часть веществ переходит с бумаги в органическую фазу. Когда растворитель достигает участка бумаги, не

содержащего разделяемых веществ, снова происходит перераспределение вещества между водной и органическими фазами. На этот раз разделяемые вещества переходят из органической фазы в водную. При непрерывном движении растворителя через бумагу в результате такого перераспределения между двумя фазами происходит перенос разделяемых веществ от точки их нанесения на бумагу к точке, находящейся на некотором расстоянии в направлении движения растворителя. А так как коэффициенты распределения веществ между двумя фазами неодинаковы, то разделяемые вещества под действием подвижной фазы продвигутся на разное расстояние.

Зная величину коэффициента распределения, можно рассчитать расстояние, на которое продвинется данное вещество под действием определенного растворителя.

В практической работе наибольшее значение имеет коэффициент скорости движения данного соединения (R_F), представляющий собой отношение расстояния, пройденного данным веществом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя:

$$R_F = \frac{\text{скорость движения вещества}}{\text{скорость движения фронта растворителя}}.$$

Величину R_F для любого вещества можно легко определить, так как пути, пройденные данным веществом и фронтом растворителя, доступны непосредственному измерению на хроматограмме.

Существует два способа хроматографического разделения веществ на бумаге — *нисходящий* и *восходящий*. При нисходящем способе растворитель продвигается по бумаге сверху вниз, а при восходящем — снизу вверх. Для разделения одних соединений лучше использовать нисходящую хроматографию (аминокислоты), а для других — восходящую (органические кислоты).

Различают *одномерную* и *двумерную* хроматографию. При одномерной хроматографии растворитель пропускают по бумаге только в одном направлении, а при двумерной после пропускания растворителя в одном направлении бумагу высушивают и вновь пропускают другой растворитель в направлении, перпендикулярном движению первого растворителя (рис. 5).

В положении О был нанесен раствор трех веществ. После пропускания растворителя в первом направлении

одно из веществ (*A*) полностью отделилось, а два других (*B* и *B*) вследствие близких значений коэффициентов скорости движения (R_F) почти не разделились. Разделение их произошло после пропускания другого растворителя в перпендикулярном направлении.

Бумага. Хроматографическая бумага отличается от обычной фильтровальной большей чистотой, более равномерной толщиной и плотностью. Толщина бумаги влияет на скорость движения растворителя и на количество веществ, которое она может удерживать. Бумага должна пропускать растворитель с такой скоростью, при которой достигалось бы полное разделение веществ между подвижной и неподвижной фазами, и не допускалось интенсивное испарение растворителя из бумаги. Этим требованиям отвечают сорта бумаги, обеспечивающие скорость движения растворителя 1—2 см в час.

Для получения хороших хроматограмм необходимо использовать бумагу высокого качества. Если она недостаточно чистая или имеет различную плотность, пятна разделяемых веществ образуются не округлые и компактные, а размытые, с «хвостами», напоминающие по форме комету. При этом очень трудно или невозможно

идентифицировать и количественно определить разделяемые вещества.

Для хроматографического анализа пригодна

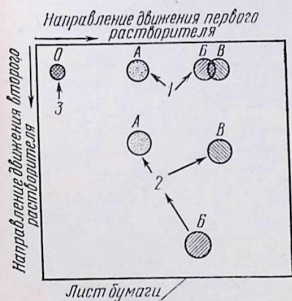


Рис. 5. Схема разделения веществ на двухмерной хроматограмме:

1 — положение веществ на хроматограмме после пропускания первого растворителя; 2 — то же, после пропускания второго растворителя; 3 — место нанесения образца.

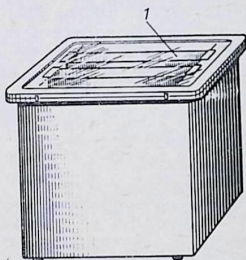


Рис. 6. Хроматографическая камера:

1 — ванночка для растворителя.

бумага фабрик «Ляльская» и «Маяк революции», а также «медленные» и «быстрые» сорта Ленинградской бумажной фабрики, которые имеют соответствующие номера. Из иностранных сортов наибольшее распространение получили Ватман № 1, 3ММ и № 4.

При точных количественных определениях недостаточно чистую хроматографическую бумагу в лаборатории дополнительно очищают от следов зольных элементов. Для этого через нее пропускают 0,1%-ный раствор 8-оксихинолина в н-бутиловом спирте, который связывает следы металлов и вымывает их из бумаги. После такой обработки бумагу сушат в течение 1—2 дней и используют для определений.

Камеры. При хроматографическом анализе используют герметически закрытые камеры, внутри которых создают атмосферу, насыщенную парами растворителя с поверхности бумаги. Их обычно изготавливают из нержавеющей стали или дерева. Деревянные камеры снаружи покрывают масляной краской, а изнутри пропитывают парафином (рис. 6). В камере сделано стеклянное окно для наблюдения за движением фронта растворителя.

Для качественных определений веществ можно использовать камеры и меньших размеров.

В верхней части камеры укрепляют 2—3 ванночки, лотка или кюветы из нержавеющей стали, стекла или пластика в виде трубок диаметром 3—5 см с продольной щелью шириной 1—1,5 см сверху. Длина трубок соответствует длине камер (рис. 7). При хроматографировании верхний край листа бумаги опускают в ванночку, перекидывают через стеклянную палочку, укрепляют его и наливают растворитель. На дно камеры ставят чашку или какой-либо широкий сосуд с растворителем для создания атмосферы, насыщенной парами растворителя.

В случае восходящей хроматографии на дно камеры помещают кювету с растворителем, а хроматограммы подвешивают в верхней части камеры на стеклянных палочках и закрепляют на них. Листы хроматографиче-

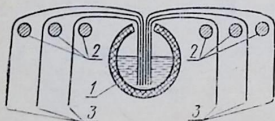


Рис. 7. Схема расположения хроматограмм в хроматографической камере (в разрезе):

1 — ванночка с растворителем;
2 — стеклянные палочки; 3 — листы бумаги.

ской бумаги должны быть погружены на 1—1,5 см в растворитель, содержащийся в кювете.

Растворители. Для разделения веществ важное значение имеет правильный выбор растворителя. Если известно значение R_F , можно теоретически выбрать необходимый растворитель. Однако коэффициенты распределения большинства веществ обычно неизвестны, подвижность разделяемых компонентов часто не согласуется со значениями их коэффициентов распределения, поэтому приходится подбирать растворитель эмпирически.

В настоящее время изучено много различных растворителей, пригодных для разделения смесей аминокислот, сахаров, органических кислот и других веществ хроматографией на бумаге. Составлены таблицы значений R_F , и для разделения смеси тех или иных веществ легко подобрать соответствующий растворитель. Однако необходимо помнить, что отдельные аминокислоты можно определять при различии их значений R_F не менее чем на 0,05, а сахара — на 0,1—0,2.

Растворители должны быть абсолютно чистыми, бесцветными или слабоокрашенными. Перед использованием их очищают перегонкой. Лучшие результаты дают растворители, которые частично смешиваются с водой.

Техника хроматографирования. Для нанесения растворов разделяемых веществ на бумагу используют градуированные микропипетки, а лист бумаги кладут на стекло. Диаметр пятна раствора не должен превышать 0,5—1,0 см, т. е. за один прием можно нанести не свыше 0,0020—0,0025 мл раствора. При большем объеме диаметр пятна увеличивается и качество хроматограммы ухудшается. Если необходимо использовать объем более 0,0025 мл (из-за низкой концентрации изучаемых веществ в растворе), раствор наносят в несколько приемов. При этом бумагу помещают в специальный штатив и каждую порцию раствора высушивают в токе теплого воздуха (под феном).

В последнее время промышленность выпускает специальные столики, приспособленные для нанесения веществ на листы хроматографической бумаги. Верхняя часть такого столика представляет собой лист стекла или пластика. У одного из краев крышки столика имеется по всей длине небольшая щель, через которую подается подогретый воздух, в результате чего испарение растворов значительно ускоряется. Устройство для по-

догрева воздуха и вентилятор смонтированы внутри столика (рис. 8).

Для лучшего разделения веществ, особенно аминокислот, растворы наносят на бумагу не в виде округлых пятен, а в виде полосок длиной 3 см и шириной не более 4—5 мм.

При выполнении одномерных хроматограмм на листе или на полоске бумаги, отступая на 5—6 см от верхнего края, простым карандашом проводят линию и на ней через каждые 3—4 см ставят точки или проводят полоски, указывающие места нанесения на бумагу разделяемых веществ. Выше точек ставят соответствующие обозначения. Затем бумагу кладут на стекло, в штатив или на специальный столик и наносят необходимые объемы растворов. Бумагу надо брать только за края чистыми сухими руками (лучше работать в резиновых медицинских перчатках).

При выполнении двумерной хроматограммы на лист бумаги размером 62×55 см раствор наносят в левом углу, отступая на 6—7 см от обеих сторон листа.

После нанесения веществ бумагу закрепляют в ванночке камеры, наливают растворитель и камеру закрывают. Если растворитель движется со скоростью 1,5—2 см в час, то при использовании полосы или листа бу-

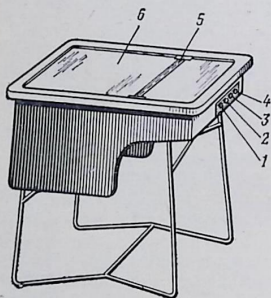


Рис. 8. Стол для нанесения хроматограмм:

1 — включение аппаратуры; 2 — мотор; 3 — вентиляция; 4 — свет; 5 — световая и вентиляционная щель; 6 — матовое стекло на поверхности стола.

маги длиной 50 см он дойдет до нижнего края листа через 25—35 ч. При анализе смеси соединений, в состав которой входят вещества с высокими значениями R_F , хроматограммы обычно вынимают из камер, когда фронт растворителя дойдет до нижнего края бумаги. Если же значения R_F разделяемых веществ не превышают 0,6—0,7, для лучшего разделения смеси необходимо пропускать растворитель еще 10—12 ч.

При выполнении одномерных хроматограмм для лучшего разделения аминокислот и сахаров предложен метод многократного пропускания растворителя. В этом случае растворитель пропускают по бумаге 5—7 раз, причем перед каждым пропусканием его удаляют с хроматограммы высушиванием.

Разделяют вещества всегда при строго определенной температуре, например аминокислоты при 20—22°C, органические кислоты — 14—15°C. Колебания температуры не должны превышать 2°C, в противном случае качество хроматограмм ухудшается. Для этого в лабораториях обычно оборудуются термостатированные хроматографические комнаты. При выполнении двумерных хроматограмм после пропускания растворителя в первом направлении его удаляют из бумаги высушиванием. Затем лист помещают в камеру и пропускают другой растворитель в направлении, перпендикулярном движению первого.

подавляющее большинство растворителей удаляют из бумаги высушиванием в токе воздуха при комнатной температуре или при 40—60°C в специальных сушильных шкафах большого размера, через которые непрерывно просасывается подогретый воздух. Если специальных шкафов нет, можно пользоваться обычным сушильным шкафом при включенной тяге. Время сушки при этом значительно увеличивается.

Некоторые малолетучие растворители удаляют из бумаги вымыванием эфиром или ацетоном.

Положение веществ на хроматограммах определяют после их обработки какими-либо реактивами, дающими цветные реакции с изучаемыми соединениями. Для обнаружения органических кислот используют различные индикаторы, для большинства сахаров — аммиачный нитрат серебра, для аминокислот — растворы нингидрина или изатина. После обработки бумаги реактивами на хроматограмме появляются окрашенные пятна соответствующих соединений.

При обработке реактивами хроматограмму тщательно и равномерно опрыскивают из пульверизатора или погружают хроматограмму в соответствующий раствор на 3—5 с.

Положение аминокислот и некоторых других соединений на хроматограммах можно установить и без обработки реактивами. В ультрафиолетовых лучах пятна

аминокислот отчетливо флуоресцируют. Такие наблюдения ведут на соответствующих приборах.

Для точной идентификации соединений на хроматограммах часто бывает недостаточно знания их R_F . Поэтому используют так называемый метод «метчиков», или «свидетелей», при котором наряду с неизвестными аминокислотами, сахарами, органическими кислотами и т. д. на хроматограммы наносят набор известных соединений. После хроматографирования и проявления хроматограммы визуально сопоставляют цвет и положение на хроматограмме пятен известных соединений и анализируемых веществ.

Количественный анализ. В настоящее время хроматография на бумаге широко используется не только для качественной идентификации различных соединений, но и для количественного анализа.

Простейшим полуколичественным методом является визуальное сравнение интенсивности окраски и площади пятна данного соединения с окраской и плотностью пятен «метчиков», которые наносили на ту же хроматограмму в известной концентрации. Однако точность такого метода не превышает 20—30%.

Модификацией этого метода является измерение плотности окраски пятен в проходящем свете специальными приборами — денситометрами. В этом случае точность метода повышается до 10—15%.

Наиболее точные методы количественного хроматографического анализа основаны на вымывании (элюировании) вещества из бумаги какими-либо растворителями и колориметрическом определении концентрации вещества в элюате. Точность этих методов для многих соединений составляет 3—6%.

Для определения положения на хроматограмме пятна вещества, которое должно быть элюировано, используют флуоресценцию, метод «метчиков» или опрыскивание хроматограмм очень слабым реактивом, дающим окраску с данным веществом. После установления положения пятна участок бумаги, равный его площади, вырезают, помещают в пробирку, содержащую растворитель, и экстрагируют вещество из бумаги. Затем, добавляя в пробирку соответствующий реактив, раствор окрашивают и по интенсивности окраски определяют концентрацию вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ R_F АМИНОКИСЛОТ

Величина R_F аминокислоты в данном растворителе, представляющая собой отношение скорости движения данной аминокислоты к скорости движения фронта растворителя, не является строго постоянной величиной и зависит от хроматографической бумаги, pH растворителя, температуры проявления, ряда сопутствующих веществ и др. Например, в растворителе м-крезоле, насыщенном водой, R_F аминокислоты валина при pH 4,0 равняется 0,41, а при pH 6,0—0,50; R_F аргинина при pH 8,0—0,10, а при pH 10,0—0,75; R_F лизина при pH 10,0—0,45, а при pH 11,0—0,10 и т. д. В растворителе н-пропиловом спирте (вода в соотношении 9:1) при повышении температуры проявления от 10 до 50°C значения R_F глицина, аланина, валина и ряда других аминокислот значительно увеличиваются. Поэтому перед началом определения аминокислот хроматографией на бумаге рекомендуется проверить значение R_F изучаемых аминокислот с использованием соответствующих растворителей, бумаги и методов работы.

Ход определения. Стандартные растворы готовят в концентрации ≈ 10 мг аминокислоты в 1 мл. Некоторые аминокислоты (тирозин, аспарагиновая кислота) в воде растворяются плохо, поэтому при их растворении добавляют по несколько капель HCl. На листы или полосы (шириной 15—20 см) хроматографической бумаги на расстоянии 2,5—3 см микропипеткой наносят такое количество раствора каждой аминокислоты, чтобы содержание любой из них в местах нанесения было не менее 15—20 мкг, а для триптофана, гистидина, тирозина, лизина и пролина не менее 20—30 мкг. После подсыхания пятен хроматограммы закрепляют в камере и приливают растворитель — смесь н-бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:1 или насыщенный водой фенол.

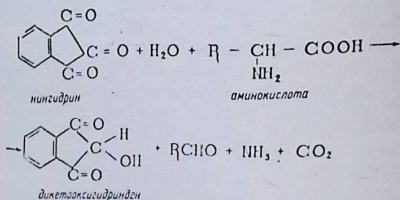
Для получения первого растворителя указанные реактивы в необходимых соотношениях тщательно перемешивают и, если смесь получается недостаточно прозрачной, добавляют еще несколько капель уксусной кислоты. Для приготовления насыщенного водой фенола к 300 г перегнанного фенола добавляют 105 мл воды и тщательно перемешивают. Если фенол растворяется медленно, смесь слегка подогревают, а затем охлаждают до ком-

натной температуры. На каждые 100 мл растворителя добавляют 50 мг KCN.

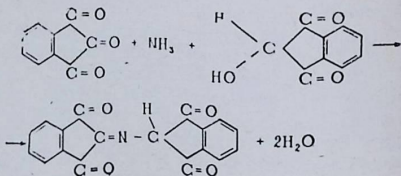
Обычно проводят нисходящую хроматографию. Хроматограммы выдерживают в камере с растворителем в течение 25—30 ч, за этот срок фронт растворителя продвигается почти до нижнего края листа бумаги.

После соответствующей экспозиции бумагу осторожно (в перчатках) вынимают из камеры, отмечают карандашом расстояние, пройденное фронтом растворителя, и помещают в вытяжной или в специальный сушильный шкаф. Растворитель бутанол — уксусная кислота — вода полностью испаряется за несколько часов, а фенол — за 1—2 дня.

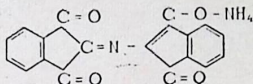
После удаления растворителя из бумаги ее опрыскивают из пульверизатора 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне или в бутиловом спирте, кладут в термостат на 5—10 мин при температуре 80—90°C или оставляют при комнатной температуре на 12—20 ч. При этом между аминокислотами и нингидрином идет реакция:



Аминокислоты окисляются и распадаются на альдегид, углекислоту и аммиак. Выделившийся аммиак конденсируется со второй молекулой нингидрина и с продуктом его восстановления — дикетооксигидринденом:



Аммиачная соль энольной формы образовавшегося соединения окрашена в интенсивный сине-фиолетовый цвет.



Интенсивность окраски пропорциональна содержанию аминокислот.

Для вычисления значения R_F окрашенные пятна аминокислот обводят простым карандашом, определяют центры пятен и расстояние их от места нанесения аминокислот, выраженное в миллиметрах, делят на расстояние, пройденное от этой же точки фронтом растворителя.

В таблице 1 приведены значения R_F различных аминокислот.

Таблица 1

Значения R_F аминокислот в различных растворителях при хроматографировании на бумаге Ватман № 1

Аминокислота	Растворитель		
	фенол—вода	бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 1)	м-крезол, насыщенный боратым буфером (pH 8,4)
Фенилаланин	0,87	0,66	0,78
Цистин	0,03	0,13	0,02
Лизин	0,82	0,16	0,08
Аргинин	0,90	0,18	0,19
Гистидин	0,69	0,17	0,33
Серин	0,36	0,32	0,04
Аспарагиновая кислота	0,15	0,33	0,00
Глицин	0,41	0,34	0,07
Треонин	0,47	0,36	0,09
Глутаминовая кислота	0,25	0,37	0,01
α -аланин	0,56	0,39	0,14
Тирозин	0,63	0,53	0,27
γ -аминомасляная кислота	0,80	0,60	—
β -аланин	0,70	0,40	—
Валин	0,76	0,56	0,42
Метионин	0,83	0,58	0,55
Триптофан	0,75	0,62	0,70
Пролин	0,89	0,50	0,65
Лейцин	0,87	0,72	0,66
Изолейцин	0,86	0,68	0,63

Оборудование и реактивы: 1) хроматографические камеры, шкаф для сушки хроматограмм, штатив или специальный столик для нанесения растворов аминокислот на бумагу, пульверизаторы для опрыскивания хроматограмм, хроматографическая бумага, микропипетки, колбы мерные, листы стекла, медицинские перчатки, пипетки;

2) набор аминокислот, нингидрин, ацетон, фенол, бутиловый спирт, уксусная кислота ледяная, цианистый калий.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

В состав белков входят 20 аминокислот и два амида — аспарагин и глутамин, однако в свободном состоянии в разных видах растений можно найти свыше 100 различных аминокислот. Содержание свободных аминокислот в растениях не постоянно и зависит от внешних факторов, общего состояния растения и от направленности в нем процессов обмена веществ. Увеличение общего содержания свободных аминокислот в растениях и накопление ненормально высокого количества отдельных аминокислот наблюдалось при недостаточном питании растений калием, серой, кальцием, магнием, некоторыми микроэлементами (цинком, медью, марганцем, железом). В отличие от влияния других элементов недостаток азота и молибдена приводит к снижению количества аминокислот и амидов в вегетативных органах растений.

Отдельные виды и семейства растений часто накапливают аминокислоты, свойственные только для данного вида, что определяет специфику их обмена веществ.

Содержание свободных аминокислот определяют обычно для более детального изучения питательной ценности кормов и пищевых продуктов, а также при изучении отдельных звеньев азотного обмена растений.

Принцип метода. Свободные аминокислоты экстрагируют из вегетативных органов растений спиртом, а из семян водой. Экстракты очищают и определяют в них содержание различных аминокислот хроматографией на бумаге.

Фиксация материала и экстракция аминокислот. Растительные ткани фиксируют любым из современных способов: обработкой кипящим спиртом, замораживанием жидким азотом или твердой углекислотой, а также используют лиофильную сушку (см. стр. 106).

Обычно навески свежих листьев или других вегетативных органов (по 5—10 г) фиксируют кипящим спиртом и тщательно растирают в ступке. Для лучшего измельчения суспензию из ступок переносят в стеклянный гомогенизатор (ступку споласкивают 80%-ным спиртом). В гомогенизаторе листья мацерируют в течение 5—10 мин, после чего остатки клеток отделяют центрифугированием при 2—3 тыс. об/мин в течение 5 мин. Центрифугат сливают, а осадок еще трижды экстрагируют и гомогенизируют с 80%-ным спиртом, отделяя спирт центрифугированием. В результате такой обработки в экстракты переходят все аминокислоты. Эти экстракты смешивают и удаляют из них спирт одним из трех способов: простым выпариванием в фарфоровых чашках на водяной бане с вентилятором; выпариванием в вакуум-эксикаторе при комнатной температуре или отгонкой спирта в вакууме.

Кроме аминокислот в спиртовой экстракт переходят сахара, пигменты, многие минеральные вещества и т. д. Поэтому перед хроматографированием экстракт необходимо очистить, так как эти соединения препятствуют удовлетворительному разделению аминокислот на хроматограммах. Для очистки экстракт пропускают через ионообменник.

Аминокислоты можно экстрагировать и водой. Для этого предварительно фиксированный материал измельчают и нагревают в стакане с водой на кипящей водяной бане в течение часа. Однако следует иметь в виду, что при экстракции водой вытяжки содержат значительно больше посторонних примесей, особенно минеральных веществ, которые мешают дальнейшему определению аминокислот. Поэтому водные вытяжки очищают более тщательно.

Ионообменники, или ионообменные смолы, являются синтетическими адсорбентами, способными к обменному поглощению катионов или анионов. В соответствии с этим все ионообменники делят на катиониты и аниониты. Для очистки экстрактов аминокислот используют отечественный катионит КУ-2, а также ионообменники иностранного производства Дауэкс-50, Зео-Карб-215, Зео-Карб-225 и др.

Ионообменники промывают водой, а перед использованием активируют. Для этого 5—10 г ионообменника встряхивают в течение 1—2 ч с 200—300 мл 2 н. HCl,



Рис. 9. Хроматографическая колонка:

1 — делительная воронка емкостью 200—250 мл; 2 — кран;
3 — колонка диаметром 1,0—1,5 см и длиной 20—25 см;
4 — решетчатая пластинка.

после чего на фильтре отмывают от кислоты дистиллированной водой до нейтральной реакции. В результате такой обработки катионит насыщается ионами водорода (H^+).

После этого ионообменник взбалтывают с водой и переносят в хроматографическую колонку (рис. 9), в нижнюю узкую часть которой вставлен небольшой тампон из стеклянной ваты. Длина колонки 20—25 см, диаметр 1—1,5 см. Необходимо строго следить, чтобы в колонке между частицами ионообменника не было воздуха, а во время работы над ионообменником в колонке был слой воды или раствора.

Растительную вытяжку с нейтральной или слабокислой реакцией пропускают через хроматографическую колонку, наполненную ионообменной смолой, со скоростью 1 мл в минуту. Скорость протекания жидкости через колонку можно регулировать, открывая краны. При пропускании раствора электронейтральные молекулы (сахара и др.) и анионы в колонке не задерживаются, а аминокислоты и катионы адсорбируются ионообменником. Колонку промывают 30—40 мл воды, которую отбрасывают, и приступают к вымыванию (элюированию) аминокислот. Для этого через колонку пропускают 50 мл 6 н. раствора NH_4OH со скоростью 1 мл в минуту. Затем колонку промывают 20—30 мл воды.

Раствор аминокислот выпаривают в вакууме или на бане (досуша), добавляют 15—20 мл воды и снова выпаривают для удаления следов аммиака. Такое выпаривание (лучше в вакууме) проводят трижды.

Описанный выше метод пригоден для экстракции свободных аминокислот из листьев, стеблей, соломы, корней различных растений. При работе с объектами, содержащими много белков (в том числе и растворимых в спирте), экстракцию аминокислот спиртом не применяют, так как белки резко искажают результаты коли-

чественного определения аминокислот. Поэтому из семян свободные аминокислоты экстрагируют водой.

Навески муки (по 5 г), полученные из семян, заливают в колбах 100 мл воды, добавляют по 2 капли толуола и взбалтывают в течение 1 ч. Смесь выдерживают в холодильнике 17—20 ч при температуре 4—5°C. Затем содержимое колб центрифугируют в течение 5—10 минут при 4 тыс. об/мин, жидкость над осадком сливают, а осадок экстрагируют еще 5—6 раз с последующим центрифугированием. При такой экстракции в раствор переходят все свободные аминокислоты. Экстракты смешивают и упаривают при температуре не более 50°C в вакууме или на водяной бане с вентилятором до объема 50 мл.

После охлаждения экстракт, содержащий аминокислоты, переносят в делительную воронку. Туда же для осаждения белков добавляют три объема хлороформа. Смесь встряхивают в течение 5 мин. После этого воронку со смесью выдерживают 16—20 ч в прохладном помещении. При такой обработке белки осаждаются, а чистый верхний слой отделяют и используют для анализов.

Для очистки от минеральных солей и других веществ раствор аминокислот пропускают через ионообменник, как описано выше.

Белки и другие примеси можно удалять из экстрактов также трихлоруксусной кислотой, так чтобы ее конечная концентрация в растворе была около 5%. Для этого на каждые 10 мл экстракта приливают по 1 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты. Лучшие результаты получают при осаждении белков хлороформом.

После удаления воды и следов аммиака сухой остаток аминокислот растворяют в 2 мл 10%-ного подкисленного соляной кислотой изопропилового спирта. В замороженном виде экстракты можно хранить в холодильнике в течение нескольких недель.

Хроматография аминокислот. До сих пор не предложено растворителей, которыми можно на одной хроматограмме достаточно хорошо разделить все аминокислоты, содержащиеся в растениях. Поэтому приходится пользоваться несколькими растворителями. По нашим данным, при проведении одновременной хроматографии на бумаге № 2 «медленная» и Ватман № 1 лучшие результаты получаются при использовании следующих

четырёх систем растворителей: 1) н-бутанол — муравьиная кислота — вода (75:15:10) при пятикратном пропускании для определения цистина и цистеина, аргинина, аспарагина, глутамина и цитруллина; аминокислоты разделяются лучше, если раствор первые два раза пропускают до конца листа бумаги, третий и четвертый — до половины, а пятый — снова до конца листа; 2) фенол, насыщенный фосфатным буфером (рН 12,0), при двукратном пропускании для определения аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, глицина, треонина и аланина; при использовании этого растворителя через бумагу предварительно пропускают фосфатный буфер (рН 12,0), затем ее высушивают и используют для хроматографии; 3) н-бутанол — уксусная кислота — вода (300:60:140) при трехкратном пропускании (первый и третий раз до конца хроматограммы, второй — до половины) для определения цистина, цистеина, орнитина, лизина, гистидина, аргинина, аланина, пролина, тирозина, γ -аминомасляной кислоты, фенилаланина, лейцина и изолейцина; 4) н-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1) при семикратном пропускании для определения цистина и цистеина, орнитина, треонина, глутаминовой кислоты, триптофана, валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина; первый и седьмой раз хроматограммы выдерживают в камере до вытекания растворителя, третий, четвертый и шестой раз пропускают растворитель до конца листа бумаги, второй и пятый раз — только до половины.

Иногда рекомендуют хроматографию аминокислот проводить с использованием только одного растворителя — смеси н-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 4:1:5 при многократном пропускании. Однако данные показывают, что при использовании одного растворителя получается худшее разделение аминокислот, чем при хроматографировании по вышеприведенной схеме.

Для удовлетворительной воспроизводимости и высокой точности результатов количественного определения аминокислот при выполнении одномерной хроматографии на каждый лист бумаги необходимо наносить, кроме испытуемых растворов, смеси известных аминокислот («метчиков»). Смеси «метчиков» готовят из такого расчета, чтобы концентрация каждой отдельной аминокислоты в смеси наиболее близко соответствовала концен-

трации данной аминокислоты в испытуемом растворе. Если примерная концентрация свободных аминокислот в исследуемых образцах растений неизвестна, предварительно хроматографируют испытуемые образцы и по этим данным готовят «метчики». Смеси составляют так, чтобы все аминокислоты в них хорошо отделялись одна от другой.

Таким образом, для полного количественного определения всех аминокислот в растительных образцах их необходимо хроматографировать в нескольких растворителях. На каждый лист бумаги наносят и смеси аминокислот-«метчиков» в строго определенной концентрации. Обычно на лист хроматографической бумаги размером 50×60 см наносят в виде четырех полос длиной по 3 см смеси исследуемых растворов и в виде двух полос смеси аминокислот — «метчиков».

После нанесения растворов аминокислот листы бумаги подвешивают в камеры, добавляют соответствующие растворители и пропускают их, как указано выше. После каждого пропускания растворители удаляют из бумаги высушиванием в специальном шкафу.

Для определения аминокислот применяют и двумерную хроматографию на бумаге. Особенно широко ее используют для открытия и идентификации новых аминокислот (рис. 10).

Количественное определение аминокислот. После получения хроматограмм количественно определять аминокислоты можно тремя методами: при помощи нингидриновой реакции с метилцеллосольвом (монометиловый эфир этиленгликоля); по интенсивности окраски медных производных аминокислот с нингидрином и по интенсивности оранжевой окраски, возникающей при взаимодействии иона кадмия с продуктом взаимодействия аминокислот и нингидрина.

При первом методе хроматограммы опрыскивают 0,02%-ным раствором нингидрина в ацетоне, нагревают в течение 5—7 мин при температуре 80°C . Слабоокрашенные пятна аминокислот обводят карандашом, вырезают из бумаги и кладут в пробирки. В эти же пробирки добавляют по 1 мл 0,1 н. КОН для удаления следов аммиака и содержимое пробирок высушивают в вакуум-эксикаторе в течение ночи. Затем в пробирки добавляют по 1 мл 0,2 н. цитратного буфера (рН 5,0), который дополнительно содержит 1,052 г лимонной кисло-

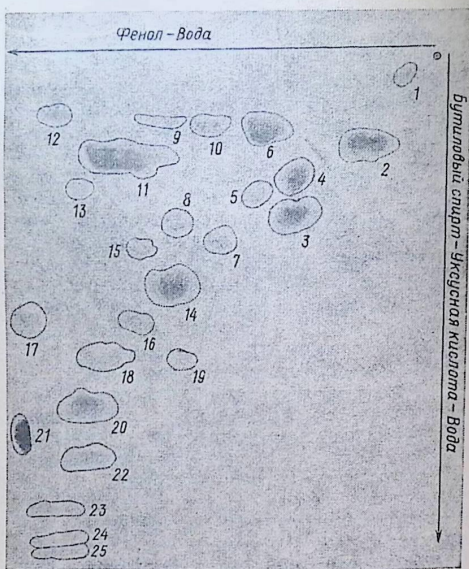


Рис. 10. Хроматограмма свободных аминокислот, выделенных из бобов фасоли. Обозначения аминокислот:
 1 — цистин; 2 — аспарагиновая кислота; 3 — глутаминовая кислота; 4 — серин;
 5 — глицин; 6 — аспаргин; 7 — треонин; 8 — гомосерин; 9 — лизин; 10 — аргинин;
 11 — глутамин; 12 — орнитин; 13 — цитруллин; 14 — α -аланин;
 15 — β -аланин; 16 — тирозин; 17 — пролин; 18 — триптофан; 19 — α -аминомасляная кислота;
 20 — γ -аминомасляная кислота; 21 — пипеколиновая кислота; 22 — валин; 23 — фенилаланин;
 24 — лейцин; 25 — изолейцин.

ты на каждые 100 мл буфера. Этот избыток кислоты необходим для нейтрализации внесенной ранее щелочи. Кроме того, в пробирки вливают по 0,4 мл 5%-ного раствора нингидрина в метилцеллосольве и 2 мл 0,0002 М раствора KCN в метилцеллосольве. Пробирки нагревают 30 мин на кипящей водяной бане, затем охлаждают в ледяной воде в течение 10 мин и пурпурно-фиолетовую жидкость количественно переносят в градуированные пробирки. Остатки пигмента экстрагируют из бумаги несколькими порциями (по 1,0—1,5 мл) 60%-ного изопро-

пилового спирта, и общий объем жидкости в градуированных пробирках доводят этим же спиртом до 10 мл.

Оптическую плотность растворов определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 570 нм, сравнивая с контролем. Контрольные растворы готовят, вырезая такие же куски бумаги из тех же хроматограмм и обрабатывая их таким же образом, как и окрашенные пятна аминокислот. Оптическая плотность контроля по сравнению с водой не должна превышать 0,12—0,16. Стандартные растворы аминокислот окрашивают так же и на основании определений оптической плотности для каждой аминокислоты строят калибровочные графики. По этим графикам определяют концентрации отдельных аминокислот в изучаемом растворе. При использовании этой методики относительные ошибки определений аминокислот составляют ± 5 —7%.

Количественное определение аминокислот по интенсивности окраски медных производных аминокислот с нингидрином проводят следующим образом. Хроматограммы обрабатывают 0,5%-ным раствором нингидрина в 95%-ном ацетоне, содержащим 1% уксусной кислоты. Для хроматограмм, у которых растворителем служил фенол в фосфатном буфере, концентрацию уксусной кислоты повышают до 3%. Обработанные хроматограммы выдерживают 16 ч над серной кислотой и глицерином при комнатной температуре. После этого окрашенные пятна аминокислот вырезают из хроматограмм и кладут в пробирки. В каждую пробирку наливают по 8 мл 75%-ного этилового спирта, насыщенного $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, и выдерживают в течение 1 ч в темноте. Затем растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре ФЭК-М против контроля. Если при хроматографии в качестве растворителя применяли бутиловый спирт, используют синий светофильтр, а если фенол в фосфатном буфере (рН 12,0), — более точные результаты получают с зеленым светофильтром. Оптическую плотность определяют по сравнению с контролем.

Для определения аминокислот по интенсивности окраски кадмиевых производных с продуктами взаимодействия аминокислот и нингидрина сухие хроматограммы обрабатывают проявителем, содержащим 100 мг уксуснокислого кадмия, 10 мл воды, 5 мл ледяной уксусной кислоты,

100 мл ацетона и 1 г перекристаллизованного нингидрина. Затем хроматограммы высушивают в течение 0,5—1 ч на воздухе и для максимального развития окраски помещают в эксикатор или темную камеру над концентрированной серной кислотой на 16—18 ч. После этого окрашенные пятна аминокислот, а также участки хроматограмм, равные по площади, но без аминокислот (контроль) вырезают, помещают в пробирки и заливают 4 мл метилового спирта. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют стоять в темноте в течение часа. Оптическую плотность окрашенных растворов определяют против контрольных элюатов на ФЭК-М с зеленым светофильтром № 2 (540—560 нм) или на ФЭК-н-57 со светофильтром № 4 (508 нм). Точность определения аминокислот составляет $\pm 5\text{--}10\%$.

По этой методике можно определять все аминокислоты, кроме пролина, так как при обработке хроматограмм обычным образом он дает с нингидрином желтую окраску.

Для определения пролина готовят нингидриновый реактив, содержащий 40 мл 6 М H_3PO_4 , 60 мл ледяной уксусной кислоты и 2,5 г нингидрина на каждые 100 мл смеси. Для растворения нингидрина эту смесь нагревают до 70°C на водяной бане. Хроматограммы обрабатывают 0,02%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Окрашенные пятна вырезают из хроматограмм, кладут в пробирки, добавляют по 1 мл 0,1 н. NaOH и содержимое их высушивают в вакууме в течение ночи. Затем в пробирки вливают по 1 мл уксусной кислоты и по 1 мл нингидринового реактива и нагревают на водяной бане при 100°C в течение 1 ч, добавляют по 1 мл уксусной кислоты и охлаждают до комнатной температуры. После этого розовую жидкость переносят в другие пробирки и остатки пигмента экстрагируют из бумаги ледяной уксусной кислотой. Общий объем жидкости доводят до определенного объема (5—10 мл в зависимости от содержания пролина в исследуемых образцах). Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при 515 нм или на фотоэлектроколориметре ФЭК-М при синем светофильтре, сравнивая с контролем. Для приготовления контрольных растворов используют кусочки бумаги, вырезанные из тех же участков хроматограмм, что и определяемые пятна пролина. После нагревания пробирок устойчивая розовая окраска сохраняется лишь в течение

часа, поэтому колориметрирование необходимо провести в это время. Относительные ошибки составляют $\pm 3-5\%$.

Содержание всех аминокислот выражают в процентах (или в мг%) массы растительного материала или в процентах азота каждой аминокислоты.

Оборудование и реактивы. Кроме оборудования и реактивов, указанных для определений аминокислот, дополнительно необходимо следующее: 1) спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, хроматографические колонки, гомогенизаторы, центрифуги, холодильник, прибор для отгонки спирта в вакууме, вакуум-эксикаторы, водяные бани, чашки фарфоровые, ступки, делительные воронки, колбы, стаканы, воронки, пробирки градуированные;

2) катиониты КУ-2, Дауэкс-50, Зео-Карб-215 или Зео-Карб-225, этиловый спирт 96, 80 и 75%-ный, изопропиловый спирт 10%-ный, 1 н. HCl, ацетон, глицерин, H₂SO₄ концентрированная, 0,1 н. KOH, 0,1 н. и 0,2 н. NaOH, 6 н. NH₄OH, хлороформ, метилцеллозольв, 6 М H₃PO₄, уксуснокислый кадмий, цитратный буфер pH 5,0 (200 мл 1 н. лимонной кислоты смешивают с 200 мл 1 н. NaOH и разбавляют водой до 1 л), фосфатный буфер pH 12,0 (500 мл 0,067 М Na₂HPO₄+500 мл 0,067 М NaOH).

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ РАСТЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА

Белки играют важную роль в питании человека и животных. Пищевая ценность того или иного продукта сельского хозяйства порой целиком определяется как общим количеством в нем белков, так и их качеством.

В зависимости от качественного состава белки одних видов растений по питательной ценности приближаются к белкам животного происхождения, а ценность белков других видов растений может быть весьма низкой. Для оценки качества белков существуют два основных показателя и соответственно разработаны два основных метода.

Первый метод состоит в определении отдельных белковых групп в общем белковом комплексе. При этом отдельные белковые группы или фракции (альбумины, глобулины, проламины, глютелины) извлекают различными растворителями и количественно учитывают. Содержание белковых фракций в растениях различно. Например, в семенах зернобобовых культур преобладают глобулины, в семенах злаков — проламины и глютелины, в семенах вегетативных органов ряда растений много

альбуминов, глобулинов и глютелинов. Даже в пределах одного и того же вида качественный состав белков подвергается заметным изменениям в зависимости от условий выращивания и других факторов.

Другой метод оценки качества белков основан на изучении их аминокислотного состава. Зеленые растения могут синтезировать все аминокислоты, тогда как организм человека и животного лишен этой способности. Аминокислоты, которые не могут синтезироваться в животном организме, получили название «незаменимых». В настоящее время установлено, что для человека незаменимыми являются 9 аминокислот: триптофан, фенилаланин, метионин, лизин, валин, треонин, изолейцин, лейцин и тистидин. Питание белком, не содержащим какой-либо из этих аминокислот, приводит к нарушениям обмена веществ и заболеваниям организма. При кормлении скота по рационам, не сбалансированным по аминокислотному составу или при недостатке в кормах даже какой-либо одной из незаменимых аминокислот наблюдается большой перерасход кормов и повышение стоимости продукции животноводства. Во многих исследованиях установлено, что отдельные белковые фракции резко различаются по аминокислотному составу. Таким образом, лишь установив аминокислотный и фракционный состав белков, можно говорить о пищевой или кормовой ценности продукта.

Принцип метода. Белки в чистом виде в растениях встречаются очень редко. В большинстве случаев они образуют сложные комплексы с углеводами, липидами, нуклеиновыми кислотами, витаминами и т. д. Поэтому прежде чем приступить к изучению белков, их необходимо выделить из тканей растений и освободить от сопровождающих химических веществ. Следует также учитывать, что белки не могут диффундировать через оболочки клеток в окружающий раствор. Поэтому при экстракции белков требуется возможно более полное разрушение клеток и их структур. Для этого используют различные типы гомогенизаторов, тщательное растирание в ступках с песком, обработку ультразвуком, промораживание растительных тканей и другие методы.

В зависимости от целей исследования из тканей растений выделяют все белковые вещества и получают препараты так называемых суммарных белков либо выделяют отдельные белковые фракции с различной сте-

пенью дробности. Полученные белковые препараты тщательно очищают и сушат.

Выделение суммарных белков. Для выделения всех белковых веществ используют щелочные растворы, в которых большинство белков довольно хорошо растворяется. Способы экстракции белков из вегетативных органов и из семян несколько различаются.

Для извлечения белков из свежего растительного материала навеску листьев, стеблей, клубней или других вегетативных органов (25—50 г, в зависимости от содержания белков) фиксируют жидким азотом и промораживают. Затем измельчают в гомогенизаторе или тщательно растирают в ступке с четырехкратным (по массе) количеством боратного буфера (рН 10,0), в который добавляют 0,2% бисульфита натрия и несколько капель октилового спирта. Бисульфит натрия добавляют для повышения растворимости белковых веществ, а октиловый спирт — для предотвращения вспенивания гомогената. Гомогенат промораживают в холодильнике и после оттаивания встряхивают на механической мешалке в течение 1—2 ч, затем центрифугируют в течение 5—10 мин при 3 тыс. об/мин. Жидкость над осадком сливают, а остатки клеток вновь гомогенизируют или растирают в ступке с прокаленным песком. Затем гомогенат снова встряхивают с буферным раствором в течение 20—30 мин и опять центрифугируют. Такую экстракцию повторяют 5—6 раз до исчезновения реакции на белок с реактивом Фолина (см. ниже). Общий объем экстракта доводят буферным раствором до 500 мл. Количество азота, перешедшего в экстракт, должно составлять не менее 90—95% общего содержания азота в растениях.

Для анализа берут 20 мл экстракта и определяют в нем содержание азота по Кьельдалю. Одновременно определяют общее содержание азота в исходных растительных образцах.

Затем проводят осаждение белков. Экстракт выливают в стакан емкостью 700—800 мл и доводят рН до 4,4—4,5, добавляя 10%-ную уксусную кислоту. Реакцию экстракта проверяют индикаторной бумажкой. Если ошибочно добавили много уксусной кислоты и реакция стала слишком кислой, доводят рН экстракта до 4,4—4,5 приливанием щелочи. Стаканы на водяной бане нагревают до 70°C, и осажденные белки отделяют цент-

рифугированием. В центрифужные пробирки с осадком белка добавляют 1%-ную уксусную кислоту, содержимое пробирок перемешивают, центрифугируют и жидкость над осадком сливают.

Для лучшей очистки белков их переосаждают. Для этого в центрифужные пробирки добавляют теплый раствор 0,2 н. NaOH и жидкость из пробирок с осадком переливают в стакан. Пробирки несколько раз промывают 0,2 н. NaOH, сливая раствор в тот же стакан. Жидкость в стакане нагревают при помешивании на водяной бане до 50°C до полного растворения белков. Нерастворившиеся частицы (остатки клеток) отделяют центрифугированием. Для переосаждения белков в стакан с раствором белка добавляют 50%-ную трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Осажденные белки отделяют центрифугированием. Для очистки белков продолжают промывать в центрифужных пробирках ацетоном (5—6 раз), горячим этиловым спиртом (1—2 раза) и эфиром (2—3 раза). (При центрифугировании с эфиром центрифугу крышкой не закрывать, так как выделяющиеся пары эфира могут ее вырвать). После каждого добавления реактива проводят центрифугирование, а жидкость над осадком сливают. Затем препараты белков высушивают при комнатной температуре и определяют общее содержание азота по Кьельдалю.

Полученные препараты белков — порошки белого или сероватого цвета, содержащие 14—16% азота массы абсолютно сухого вещества. Если в препаратах белков азота содержится меньше 14%, очевидно, очистка их была недостаточно тщательной.

При выделении суммарных белков из семян растений их как можно тоньше размалывают, так как от этого в значительной степени зависит полнота извлечения белков. Если семена содержат повышенное количество жира или много пигментов, то для удаления этих веществ муку экстрагируют петролейным эфиром и высушивают в вакуум-эксихаторе или под тягой при комнатной температуре.

Образцы муки весом 3—10 г (в зависимости от содержания белка) насыпают в коническую колбу, заливают 50—100 мл боратного буфера (pH 10,0), в который добавляют 0,2% бисульфита натрия. Колбу взбалтывают на механической мешалке в течение 1 ч и выдерживают 15—18 ч в холодильнике при 0°C. Далее содержи-

мое колбы центрифугируют в течение 5—10 мин при 3—4 тыс. об/мин, жидкость над осадком сливают в мерную колбу емкостью 500 мл. Осадок из пробирок переносят в коническую колбу, пробирки смывают буферным раствором, содержащим бисульфит, и в колбу добавляют этот же раствор до объема 50—60 мл. Колбу взбалтывают в течение 30—40 мин и снова центрифугируют. Раствор белков сливают в ту же мерную колбу. Такую экстракцию повторяют 4—5 раз до исчезновения реакции на белок с реактивом Фолина. Раствор в колбе доводят до 500 мл и из нее берут 20 мл для определения содержания общего азота. При анализах семян бобовых и масличных культур в экстракт должно переходить не менее 90—95% азота.

Осаждение и очистку выделенных из семян белков проводят таким же образом, как и белков из вегетативных органов растений. Белки, выделенные из семян, представляют собой порошки белого цвета с содержанием 14—18% азота.

Семена некоторых злаковых растений могут содержать значительное количество спирторастворимых белков, которые не экстрагируются боратым буфером. Для выделения этих белков остаток материала после экстракции боратым буфером обрабатывают небольшим количеством 70%-ного спирта, встряхивают в течение 1 ч и переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют около 10 мин при 4—5 тыс. об/мин и центрифугат сливают в сухой стакан. После этого осадок из центрифужной пробирки с помощью небольшого объема 70%-ного спирта переносят в ту же колбу, встряхивают 1 ч и вновь центрифугируют. Такую экстракцию повторяют 3—4 раза. После этого раствор спирторастворимого белка, который был собран в стакан, концентрируют. Для этого удаляют спирт путем его отгонки в вакууме в соответствующем приборе (см. рис. 25) при температуре 35—40°C или переносят в фарфоровую чашку и выпаривают при такой же температуре на водяной бане с вентилятором или феном. После концентрации раствора в него добавляют небольшое количество воды и оставляют в холодильнике на ночь. Если в исследуемом растворе содержались спирторастворимые белки, они выпадают в осадок. Для более полного осаждения в раствор добавляют ацетон до 90% насыщения. Осадок отделяют центрифугированием, промывают в центрифуге

жных пробирках несколько раз ацетоном и эфиром высушивают. Затем определяют массу осадка.

Выделение отдельных белковых фракций. Для более детального изучения белков не ограничиваются извлечением из растений лишь суммы всех белковых веществ, а проводят их фракционирование. Наиболее часто при этом пользуются неодинаковой растворимостью белковых фракций в разных растворителях (классический метод Осборна). Белки из растительных тканей последовательно экстрагируют водой (альбумины), слабыми растворами нейтральных солей (глобулины), спиртом (проламины) и щелочными растворами (глютелины). Работы по выделению и очистке белков лучше проводить в холодной комнате при температуре около 4°C .

Образцы растительного материала весом 25—50 г фиксируют жидким азотом, промораживают в холодильнике и гомогенизируют с 3—4-кратным количеством воды.

Затем для более полной экстракции белков гомогенат переносят в коническую колбу, взбалтывают в течение 1 ч на механической мешалке и ставят в холодильник при температуре 0°C на 15—18 ч.

При выделении белков из семян их тонко размалывают и в случае необходимости обезжиривают петролейным эфиром или ацетоном, после чего высушивают в вакуум-эксикаторе.

Для анализа берут образцы возможно более тонко размолотой муки весом 5—10 г, насыпают в коническую колбу, заливают 5—6-кратным количеством воды, взбалтывают на механической мешалке в течение 1 ч и ставят в холодильник при температуре 0°C на 15—18 ч.

Дальнейший ход анализа одинаков как при использовании в качестве исходного материала зеленых частей растений, так и семян. После выдерживания в холодильнике раствор белка отделяют центрифугированием, жидкость над осадком сливают в большой стакан, оставшуюся массу гомогенизируют примерно с 3-кратным (для муки с 5-кратным) количеством воды, наливают в коническую колбу и взбалтывают в течение 30—40 мин. После этого содержимое колбы вновь центрифугируют и раствор белков сливают в тот же стакан. Такую экстракцию водой с последующим центрифугированием повторяют 4—5 раз до исчезновения реакции на белок с реактивом Фолина.

После полной экстракции водорастворимых белков оставшуюся массу количественно переносят в коническую колбу, заливают 4—5-кратным объемом 1 М КСl и оставляют в холодильнике.

При обработке тканей растений водой в раствор переходят не только белки, но и другие растворимые в воде соединения, в том числе свободные аминокислоты, сахара, минеральные соли. Поэтому полученный экстракт можно рассматривать как слабосолевой раствор. В такой раствор могут переходить не только водорастворимые белки (альбумины), но и часть солерастворимых белков (глобулины). Их называют легкорастворимыми глобулинами, так как они переходят в раствор при очень низких концентрациях солей, которые содержатся в экстракте. Для разделения альбуминов и легкорастворимых глобулинов проводят диализ экстракта против дистиллированной воды. Для этого используют полупроницаемые материалы, чаще всего целлофан. Диализ проводят в специальных приборах-диализаторах (рис. 11). В сосуд диализатора наливают воду, а в целлофановый мешочек внутри диализатора — полученный раствор. На рисунке 11 изображен диализатор, в котором использована целлофановая трубка заводского изготовления. Простые мешочки можно легко приготовить и в лаборатории. В качестве антисептика в целлофановый мешочек добавляют тимол. Через диализатор в течение суток пропускают медленный ток водопроводной воды. Диализ проводят в холодной комнате или добавляют в сосуд куски льда. Через сутки водопроводную воду в диализаторе заменяют дистиллированной и продолжают диализ еще 10—12 ч. В процессе диализа низкомолекулярные вещества, в том числе и минеральные соли, выходят из целлофанового мешочка и вымываются водой, а внутри остаются толь-

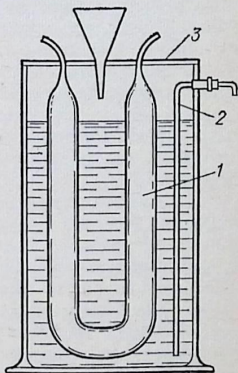


Рис. 11. Простейший диализатор:

1 — целлофановая трубка; 2 — стеклянная трубка с краном; 3 — крышка сосуда.

ко белки. Так как к концу диализа раствор в мешочке не содержит солей, солерастворимые белки выпадают в осадок, а в растворе остаются только альбумины.

Для отделения альбуминов от солерастворимых белков содержимое мешочка вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки, мешочек споласкивают 2—3 раза водой, которую выливают в те же пробирки. Растворимые белки отделяют от нерастворимых центрифугированием в течение 5—10 мин при 3—4 тыс. об/мин. Жидкость над осадком сливают в мерную колбу объемом 0,5 л, а осадок в центрифужных пробирках 2—3 раза промывают водой с последующим центрифугированием. Промывные воды сливают в мерную колбу. Раствор альбуминов в колбе доводят водой до метки и ставят в холодильник.

Осадок глобулинов в центрифужных пробирках растворяют в небольшом объеме 1 М КСl и переносят раствор в мерную колбу на 200—250 мл. Пробирки споласкивают 2—3 раза небольшими порциями хлористого калия, сливают в колбу, доводят до метки, и раствор глобулинов ставят в холодильник.

После этого приступают к экстракции солерастворимых белков. Растительную массу, в которую был добавлен 1 М КСl, взбалтывают на механической мешалке в течение 1 ч, центрифугируют, раствор белков сливают в мерную колбу, а оставшийся растительный материал снова обрабатывают раствором КСl. Экстракцию повторяют 4—5 раз до исчезновения реакции на белок. Раствор белков в мерной колбе доводят до метки. Полученная фракция представляет собой глобулины, экстрагируемые КСl.

В некоторых руководствах при определениях фракционного состава белков рекомендуют первую экстракцию растительного материала проводить не водой, а солевыми растворами (1 М КСl или NaCl). Полученный экстракт содержит альбумины и глобулины, которые разделяют путем диализа. Недостатком этого способа является то, что фракция легкорастворимых глобулинов не выделяется, а определяются все глобулины (суммарно).

После экстракции глобулинов выделяют растворимую в спирте фракцию — проламины. Для этого гомогенат обрабатывают теплым 80%-ным этиловым спиртом. После каждого добавления спирта содержимое колбы

взбалтывают в течение 1 ч, центрифугируют и раствор белков сливают в мерную колбу. Экстракцию белков спиртом проводят 3—4 раза. После окончания экстракции раствор белков в мерной колбе доводят спиртом до метки. Спиртовые экстракты белков хранить в холодильнике нельзя, так как на холоду белки из спирта выпадают в осадок. Их оставляют при комнатной температуре и возможно скорее анализируют.

Для выделения щелочнорастворимой фракции (глютелинов) растительный материал несколько раз экстрагируют 0,2 М боратым буфером (рН 10,0), содержащим 0,2% бисульфита натрия. Экстракцию проводят так же, как и при выделении других белковых фракций. Полнота извлечения отдельных белковых фракций в значительной степени зависит от продолжительности взаимодействия растительного материала с соответствующим растворителем. Поэтому после добавления каждого нового растворителя (хлористого калия, спирта и боратного буфера) растительный материал выдерживают в холодильнике не менее 16—18 ч.

При анализе некоторых растительных объектов (например, зеленой массы кукурузы и семян ряда злаков) не все щелочнорастворимые белки экстрагируются боратым буфером при рН 10,0. В таких случаях после обработки боратым буфером необходимо провести дополнительно экстракцию 0,2 н. NaOH (3—4 раза). Техника экстракции такая же, как и при использовании других растворителей.

Оставшийся растительный материал после извлечения всех белковых фракций количественно переносят в воронку с фильтром (центрифужные пробирки и колбу ополаскивают водой, промывные воды сливают на фильтр). Затем воронку с фильтром высушивают при температуре 50—60°C, переносят в колбу Кьельдаля, добавляют серную кислоту, катализатор и определяют количество нерастворимого азота.

Таким образом получают 6 белковых фракций: альбумины; легкорастворимые глобулины, которые экстрагируются водой и осаждаются при диализе; глобулины, экстрагируемые 1 М KCl; проламины; глютелины и нерастворимый азот. Все фракции (кроме последней) были собраны в мерные колбы. Для определения содержания белков в каждой фракции из всех колб берут по 20—50 мл раствора, переносят в колбы Кьельдаля, сжигают

с серной кислотой и определяют количество азота. Одновременно в исходном образце определяют содержание общего, белкового и небелкового азота, а также влажность материала. Результаты записывают по форме таблицы 2.

Таблица 2

Фракция	Содержание белковых фракций	
	% массы абсолютно сухого растительного материала	% общего содержания белков в растениях
Общий азот		—
Небелковый азот		—
Белковый азот		100
Альбумины		
Глобулины, экстрагируемые водой и осаждающиеся при диализе		
Глобулины, экстрагируемые 1 М KCl		
Проламины		
Глютелины		
Нерастворимый азот		

Очень часто при изучении белков не ограничиваются определением лишь общего содержания азота в каждой белковой фракции, а получают препараты соответствующих белков и затем используют их для определения аминокислотного состава.

Для получения препарата белков из соответствующей фракции (содержимое мерных колб (кроме спиртового экстракта) переносят в большие стаканы, подкисляют 10%-ной уксусной кислотой до pH 4,4—4,5 и нагревают на водяной бане до pH 4,4—4,5 и нагревают до 70°C. Осажденные белки отделяют центрифугированием и промывают водой, подкисленной уксусной кислотой. Затем белки растворяют в теплой 0,2 н. NaOH. Если белки растворяются плохо, раствор подогревают на водяной бане. После этого для лучшей очистки белки растворяют в 50%-ной трихлоруксусной кислоте до конечной концентрации 5%. Полученные осадки белков несколько раз промывают в центрифужных пробирках разбавленной уксусной кислотой, а затем ацетоном, спиртом и эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе. Осаждают и очищают все белковые фракции (кроме спиртовой) так же, как и препараты суммарных белков.

Проламины выделяют по следующей методике. Спиртовой экстракт из мерной колбы переливают в прибор для отгонки спирта в вакууме. Спирт отгоняют при температуре 35°C. После полного удаления спирта к оставшемуся раствору добавляют небольшое количество воды и оставляют в холодильнике на ночь. При этом основная масса белка выпадает в осадок. Для полного осаждения белков раствор насыщают ацетоном до 90%; реакцию раствора доводят до слабощелочной, добавляя несколько капель 1 н. NaOH. Содержимое колбы переносят в центрифужные пробирки, колбы споласкивают ацетоном и осадок белков отделяют центрифугированием при 3—4 тыс. об/мин в течение 5—10 мин. Затем белки в пробирках несколько раз промывают ацетоном и эфиром с последующим центрифугированием. Осадки белков высушивают в вакуум-эксикаторе или лиофилизацией (см. стр. 106).

Полученные препараты всех белковых фракций представляют собой белые или сероватые порошки с содержанием 14—18% азота. Эти препараты сохраняют для последующих анализов.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуги, гомогенизаторы, вакуум-эксикатор, прибор для отгонки спирта в вакууме, водяная баня, механическая мешалка, термостат, холодильник, диализатор, мерные колбы, стаканы, воронки, пипетки, ступки, конические колбы;

2) боратный буфер 0,2 М (рН 10,0), бисульфит натрия, уксусная кислота 10%-ная и 1%-ная, 0,1 н. и 0,2 н. NaOH, трихлоруксусная кислота 50%-ная, ацетон, этиловый спирт 96%-ный и 80%-ный, октиловый спирт, эфир, реактив Фолина, 1 М KCl, а также оборудование и реактивы, необходимые для определения азота по Кьельдалю.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЗЕИНА

В эндосперме кукурузы содержится спирторастворимый белок зеин, количество которого у обычной кукурузы достигает половины общего содержания белка. Характерным признаком зеина является почти полное отсутствие в нем незаменимой аминокислоты лизина и крайне низкое содержание триптофана. Поэтому белки зерна кукурузы отличаются низкой биологической ценностью.

В последнее время были получены мутанты кукурузы, в эндосперме зерна которых количество зеина резко

снижено, а количество других белковых фракций с более сбалансированным аминокислотным составом соответственно увеличено. Такое зерно имеет более высокую питательную ценность.

Зеин выделяют из эндосперма кукурузы спиртом, затем осаждают хлористым натрием, промывают и высушивают. Ниже описан метод выделения зеина, предложенный В. Г. Конаревым.

Зародыши зерна кукурузы отделяют от эндосперма, эндосперм тонко размалывают и муку просеивают через сито с ячейками диаметром 0,25 мм. Муку обезжиривают петролевым эфиром в течение 1 ч и удаляют остатки эфира, подсушивая муку на воздухе.

Затем муку 3 раза обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом, в котором зеин хорошо растворяется. Первый раз муку заливают пятью объемами спирта и перемешивают или встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого экстракт отделяют от осадка центрифугированием в течение 15 мин при 3—5 тыс. об/мин и сливают в стакан. Осадок вновь заливают пятью объемами спирта, повторяют экстракцию, экстракт отделяют от осадка центрифугированием и сливают его в тот же стакан. Третий раз экстракцию проводят тремя объемами 70%-ного спирта в течение часа при 60°C. Полученный экстракт охлаждают до 4°C и дальнейшую работу проводят на холоду. Для осаждения зеина в стакан с экстрактом приливают три объема 0,1 М хлористого натрия. Через 1 ч зеин полностью выпадает в осадок, который отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 3—5 тыс. об/мин. Затем осадок промывают несколько раз дистиллированной водой до полного удаления ионов хлора и высушивают в вакуум-эксихаторе над щелочью.

Полученный зеин представляет собой белый порошок, хорошо растворимый в 70%-ном спирте и 8 М мочеvine. Этот препарат используют для дальнейших исследований.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга с охлаждением, вакуумный насос, колба Бунзена, воронка Бюхнера, лабораторная мельница, сито с ячейками 0,25 мм, стаканы;

2) петролеальный эфир, 70%-ный спирт, 0,1 М NaCl, NaOH (твердый).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЛЕЙКОВИНЫ В ЗЕРНЕ

Клейковина — специфический комплекс белковых веществ, содержащихся в зерне некоторых злаков (главным образом в зерне пшеницы). Белки клейковины представляют собой вязкую, довольно упругую массу. Количество клейковины, отмываемой из определенной навески пшеничной муки или размолотого зерна, называют *выходом клейковины*. Различают выход сырой и сухой клейковины. Сырая клейковина обычно содержит примерно $\frac{2}{3}$ воды и $\frac{1}{3}$ сухого вещества.

Химический состав ее не постоянен, но основную массу (не менее 80%) составляют спирторастворимые и щелочерастворимые белки — глиадин и глютен. Содержащиеся в клейковине крахмал, жиры и сахара прочно связаны с белками.

Клейковина определяет хлебопекарные качества пшеницы. Так называемая «сила» муки зависит в основном от состояния белкового комплекса, и прежде всего от количества и качества клейковины. Содержание ее резко изменяется в зависимости от сортовых особенностей пшеницы и условий выращивания растений. Количество сырой клейковины в зерне пшеницы колеблется от 20 до 50%.

Поэтому определение клейковины в зерне имеет важное значение.

Принцип метода. Тесто, полученное из пшеничной муки, тщательно отмывают от крахмала и других веществ водой. Полученную массу сырой клейковины взвешивают. Для определения сухой клейковины сырую клейковину высушивают до постоянной массы и проводят соответствующие расчеты.

Ход определения. Тонко размолотое воздушно-сухое зерно перемешивают, берут навеску 25 г, помещают в фарфоровую чашку и приливают из бюретки 14 мл водопроводной (не дистиллированной) воды с температурой $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Пестиком или шпателем замешивают тесто в один комок до тех пор, пока оно не станет однородным. Приставшие к шпателю или фарфоровой чашке частицы очищают ножом и присоединяют к общему куску теста. Полученное тесто тщательно разминают руками, скатывают в виде шара, кладут в чашку, закрывают стеклом и оставляют на 20 мин для того, чтобы все частицы муки равномерно пропитались водой.

После этого тесто помещают в кристаллизатор в большую чашку, приливают около 1 л водопроводной воды с температурой $18 \pm 2^\circ\text{C}$ и начинают отмывать клейковину от крахмала и других веществ, опуская тесто в воду и разминая его пальцами. Отмывать необходимо очень осторожно, чтобы вместе с крахмалом удалялись частицы клейковины. Промывную воду мере накопления в ней крахмала меняют 3—4 раза, причем каждый раз процеживают через густое шелковое или капроновое сито для удаления случайно оторвавшихся кусочков клейковины. Их собирают с сита и присоединяют к общей массе клейковины.

Когда большая часть крахмала отмыта и клейковина, которая вначале была мягкой и рвущейся, становится более связной и упругой, разминание и промывание ее можно вести более энергично под слабой струей водопроводной воды ($18 \pm 2^\circ$) над густым ситом.

Клейковину отмывают до тех пор, пока промывная вода, стекающая при отжимании клейковины, не станет прозрачной. Полноту отмывки контролируют реакцией на крахмал раствором йода в йодистом калии.

Отмытую клейковину хорошо отжимают от излишней воды, помещая между ладонями и вытирая их время от времени сухим полотенцем. Затем клейковину закатывают ладонями в шарик, кладут на часовое стекло или бюкс и взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г. После первого взвешивания клейковину вновь промывают в течение 5 мин, затем тщательно отжимают и вновь взвешивают. Если разница между отмывку считают законченной, будет не более 0,1 г.

Содержание сырой клейковины вычисляют, умножая ее массу на 4 (так как была взята навеска 25 г).

Для массовых определений содержания клейковины в муке разработаны соответствующие приборы.

После выделения сырой клейковины часть ее используют для определения сухой клейковины, а часть для изучения некоторых ее свойств.

Для определения сухой клейковины в предварительный бюкс берут сырой клейковины на аналитических весах навеску при 105°C .

Определение гидратации клейковины. Одним из важных свойств клейковины является степень ее гидратации.

ции, т. е. способность клейковины набухать и удерживать воду. Степень гидратации выражают в процентах. Эта величина колеблется в очень широких пределах (от 120 до 340%), но в большинстве случаев составляет 160—240%. Как правило, клейковина из муки высших сортов имеет большую степень гидратации, чем из муки низших сортов или из целого зерна.

Степень гидратации клейковины (в %) вычисляют следующим образом:

$$\frac{(\% \text{ сырой клейковины} - \% \text{ сухой клейковины}) \cdot 100}{\% \text{ сухой клейковины}}$$

Например, если в пшенице содержалось 37% сырой и 12% сухой клейковины, то степень гидратации такой клейковины составит:

$$\frac{(37-12) \cdot 100}{12} = 208\%.$$

Определение клейковины в зерне ржи и ячменя. Клейковина ржи и ячменя по сравнению с клейковиной пшеницы менее связная, растекающаяся. Выделяют ее иным способом, который приведен ниже.

25 г тонко размолотой муки переносят в фарфоровую чашку и приливают 12 мл водопроводной воды, подогретой до 50°C. Пестиком или шпателем тщательно замешивают тесто, помещают его в термостат при температуре 40°C и оставляют на два часа для отлежки. После этого тесто отмывают водопроводной водой, нагретой до 45—50°C, на тонком сите для удаления крахмала. Ни в коем случае нельзя допускать потерь мелких частиц клейковины, которая значительно более жидкая и растекающаяся, чем клейковина пшеницы. После отмывания ход анализа такой же, как и при определении клейковины пшеницы.

Оборудование. Фарфоровые чашки, стеклянные кристаллизаторы, бюксы, часовые стекла, бюретка, эксикатор, сито капроновое или шелковое, шпатели.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКОВ

Белки, как амфотерные электролиты, содержат в своем составе кислые и основные группы и могут диссоциировать как кислоты или как основания.

При добавлении к раствору белка слабой кислоты диссоциация карбоксильных групп в белковых молекулах подавляется и в конечном счете в белке будет достигнуто равенство положительных и отрицательных зарядов. В зависимости от числа и природы основных и кислых групп в белке такое состояние наступает при разных концентрациях водородных ионов. Кислотность раствора, при которой в белках наблюдается равенство положительных и отрицательных зарядов, получила название *изоэлектрической точки* (ИЭТ). Для большинства растительных белков ИЭТ наблюдается в слабокислой среде. При изоэлектрической точке белки обладают наименьшей растворимостью, а их растворы — самой низкой вязкостью, белки не удерживаются в растворах и выпадают в осадок при очень слабых внешних воздействиях.

Ход определения. 0,2 г полученных ранее препаратов альбуминов и глобулинов или казеина растворяют при осторожном нагревании на водяной бане в 5 мл 0,5 н. CH_3COONa и доводят водой до 25 мл. Для определения изоэлектрической точки растворенного белка берут 8 пробирок и в каждую из них вносят по 1 мл раствора, добавляют воду и 0,01 н. или 0,1 н. раствор уксусной кислоты в количестве, указанном в таблице 3. Содержимое пробирок осторожно перемешивают. При значении pH, равном или очень близком к ИЭТ белка, он выпадает в осадок, что устанавливают по появлению небольшой мути в соответствующей пробирке.

Т а б л и ц а 3

Прибавлено миллилитров	Номер пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вода	8,4	7,75	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0
0,01 н. CH_3COOH	0,6	1,25	—	—	—	—	—	—
0,1 н. CH_3COOH	—	—	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Раствор белка	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pH	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8

Оборудование и реактивы: 1) градуированные пипетки, колбы мерные емкостью 25 мл, пробирки, штативы;

2) казеин, препараты белков, 0,1 н. CH_3COOH , 0,01 н. CH_3COOH , 0,5 н. CH_3COONa .

ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОИОНИТАХ

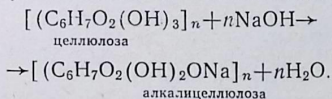
Белковые фракции, выделяемые из растений различными растворителями (водой, солевыми растворами, спиртом и щелочными растворами), не являются чистыми белками, а представляют собой сложные смеси. Разделение этих смесей и получение белков в чистом виде — очень сложная задача. Для этого необходимо использовать более тонкие методы, чем простая экстракция белков из растительных тканей.

В последние годы разработаны новые, очень эффективные и универсальные методы разделения белков, из которых наиболее важными следует считать ионообменную хроматографию и электрофорез в полиакриламидном геле.

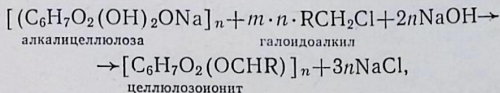
Метод ионообменной хроматографии белков с использованием нонитов на целлюлозной основе был предложен Петерсоном и Собером. Целлюлозоиониты обладают высокой разделяющей способностью, низкомолекулярные вещества на них почти не сорбируются, а белки на колонках не повреждаются и их выход часто достигает 100%. Целлюлозоиониты синтезируют путем химической модификации целлюлозы. Они имеют высокую емкость для белков и могут быть получены с любой желаемой ионообменной характеристикой.

По А. Я. Николаеву, синтез целлюлозоионитов осуществляется следующим образом.

При обработке целлюлозы концентрированной щелочью образуется алкоголь — алкалицеллюлоза:



При действии галоидоалкилов на алкалицеллюлозу в присутствии избытка щелочи образуется целлюлозоионит:



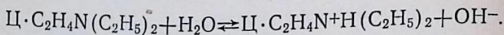
где $m=1,2$ или 3 , а n зависит от степени полимеризации целлюлозы и обычно равно $6000-10\,000$.

Адсорбционная емкость целлюлозоионита тем выше, чем больше он содержит ионогенных групп. Количество ионогенных групп в обычно применяемых целлюлозоионитах составляет 1—2 м.-экв. на 1 г сорбента, т. е. одна ионизирующая группа приходится приблизительно на 4—8 глюкозных остатков целлюлозы.

Все целлюлозоиониты являются слабыми кислотами или основаниями. Поэтому их соли, особенно со слабыми основаниями или кислотами, сильно гидролизуются. Поэтому при хроматографии низкомолекулярных веществ на колонках они передвигаются вдоль колонки почти с такой же скоростью, как и растворитель. Белки, как амфотерные соединения, также представляют собой слабые кислоты или основания, но они сорбируются на целлюлозоионитах значительно интенсивнее, так как вследствие большого числа зарядов на поверхности белковой молекулы между белками и целлюлозоионитом образуется много связей.

В настоящее время для хроматографии белков наиболее часто применяются следующие целлюлозоиониты.

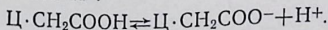
Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭЦ) получается при реакции целлюлозы с 2-хлортриэтиламинохлоргидратом в концентрированном растворе щелочи. В водной суспензии образуется гидрат, диссоциирующий с образованием гидроксила, который и является обменным ионом:



ДЭАЭЦ — наиболее универсальный слабощелочной анионит.

Триэтиламиноэтилцеллюлоза (ТЭАЭЦ). Ее получают из ДЭАЭЦ, нагревая последнюю с 10%-ным раствором бромистого этила в этиловом спирте. ТЭАЭЦ также слабощелочной анионит и по свойствам мало отличается от исходной ДЭАЭЦ.

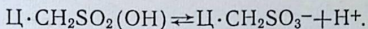
Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) получается при взаимодействии целлюлозы с монохлоруксусной кислотой в концентрированном растворе щелочи. КМЦ имеет обменный ион H^+ .



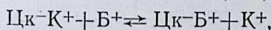
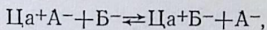
КМЦ — слабокислый катионит.

Сульфометилцеллюлозу (СМЦ) готовят следующим образом. Раствор метилendioхлорида в этиловом спирте

автоклавируют с сульфитом натрия и получают сульфированный продукт ($\text{ClCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$). Затем целлюлозу обрабатывают раствором $\text{ClCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$, в результате чего образуется сульфометилцеллюлоза, имеющая обменный ион H^+ .



Природу взаимодействия белков с целлюлозоионитами можно представить следующим образом (по А. Я. Николаеву). В сорбции белков основную роль играют электростатические силы, и взаимодействие белков с целлюлозоионитами выражается уравнениями ионного обмена:

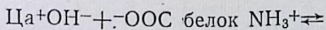


где Ца^+ и Цк^- — нерастворимые ионы целлюлозоанионита и целлюлозокатионита;

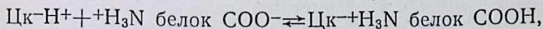
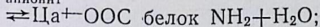
А^- и К^+ — их обменивающиеся ионы;

Б^- и Б^+ — анионная и катионная формы белка.

Особенность ионного обмена биполярных ионов, которыми являются белки, заключается в том, что один и тот же ион может сорбироваться как на катионите, так и на анионите. С учетом особенностей ионного обмена биполярных ионов сорбция белков на целлюлозоанионитах и целлюлозокатионитах может быть представлена следующими уравнениями:



анионит



катионит

где —ООС белок NH_3^+ — биполярный ион белка.

Сорбируемость белков на целлюлозоионитах наибольшая в бессолевой среде или в разбавленных буферных растворах, она не зависит от концентрации белка (до момента достижения сорбционной емкости весь белок сорбируется в растворе). На этом свойстве основан метод концентрирования белковых растворов. Соли вытесняют белки и в присутствии солей сорбция белков на целлюлозоионитах ослабляется.

Сорбируемость белков на целлюлозокатионитах выше в кислой среде, а на целлюлозоанионитах — в щелоч-

ной, т. е. в тех условиях, когда целлюлозонониты наименее диссоциированы.

В качестве растворителя для экстракции белков из растительного материала и последующей их хроматографии на целлюлозононитах чаще всего применяют воду, а также фосфатный, боратный и ацетатный буферы.

Сродство данного белка к ионообменнику можно снизить тремя способами: уменьшением рН раствора, что снижает анионные свойства белка; повышением рН раствора, т. е. подавлением ионизации основных групп адсорбента, что ведет к снижению его способности связывать анионы; повышением ионной силы буферного раствора. В связи с этим элюирование белков с колонок проводят повышением концентрации соли в элюирующем растворе или изменением рН раствора.

Хроматографическое фракционирование белков на ДЭАЭЦ. Диэтиламиноэтилцеллюлоза представляет собой слабощелочной анионит, поэтому сорбируемость белков на ней наибольшая в слабощелочной среде. В связи с этим для экстракции белков из растений при последующей хроматографии на ДЭАЭЦ лучше всего использовать слабощелочные буферные растворы, например фосфатный буфер с низкой ионной силой.

Все белки по растворимости в различных средах делятся на альбумины, глобулины, проламины и глютелины. Если использовать для экстракции слабый фосфатный буфер, в раствор будут переходить лишь альбумины и глобулины, а проламины и глютелины в этом реактиве растворяться не будут. Это следует иметь в виду при выборе объекта для хроматографического разделения белков на ДЭАЭЦ. Например, если взять семена пшеницы или кукурузы, в которых основную массу белков составляют проламины и глютелины, то под действием слабощелочного фосфатного буфера в раствор будет переходить лишь незначительная часть белков от общего их содержания в семенах. В этом случае следует применять другие методы и использовать для хроматографии другие ионообменники. Например, белки клейковины пшеницы были разделены на карбоксиметилцеллюлозе при использовании кислых растворителей.

При использовании ДЭАЭЦ наиболее подходящими объектами для хроматографического разделения белков будут семена бобовых культур, так как в них почти все белки представлены альбуминами и глобулинами.

Для хроматографии на ДЭАЭЦ экстракцию белков проводят следующим образом. В колбу помещают 3 г тонкоизмельченной муки из семян бобовых культур, приливают 100 мл 0,005 М фосфатного буфера (рН 7,4), добавляют несколько капель толуола. Содержимое колбы тщательно перемешивают и оставляют на ночь в холодильнике. Во взятой для анализа муке проводят определение содержания белкового азота по методу Кьельдаля.

После настаивания в холодильнике колбу ставят в механическую мешалку и взбалтывают в течение 2 ч. Затем содержимое колбы переливают в центрифужные пробирки и раствор белка отделяют от осадка центрифугированием. Раствор сливают в чистую колбу, которую ставят в холодильник, а осадок из центрифужных пробирок вновь переносят в колбу для повторной экстракции. Центрифужные пробирки споласкивают фосфатным буфером, который сливают в колбу. Содержимое колбы вновь взбалтывают на механической мешалке в течение 1—2 ч и снова центрифугируют. Такую экстракцию повторяют 4—5 раз.

Раствор, полученный после экстракции, кроме белков, содержит низкомолекулярные азотистые соединения, углеводы и растворимые соли. Чтобы освободиться от них, проводят диализ против фосфатного буфера. Для этого в сосуд диализатора наливают 0,005 М фосфатный буфер, а раствор из колбы сливают в целлофановый мешочек, который помещают в диализатор. Колбу тщательно ополаскивают фосфатным буфером и жидкость сливают в мешочек. Диализ проводят на холоде с добавлением тимола в течение 24—36 ч. За это время в сосуде диализатора несколько раз меняют раствор фосфатного буфера.

По окончании диализа раствор из целлофанового мешочка сливают в мерную колбу емкостью 500 мл (в случае большего объема берут колбу емкостью 1 л), мешочек ополаскивают небольшим количеством буфера, который также сливают в колбу. Раствор в колбе доводят фосфатным буфером до метки и берут из него 25—50 мл для определения содержания белков.

Зная, сколько белкового азота было в исходной муке и какое количество перешло в раствор в результате экстракции фосфатным буфером, вычисляют процент белков, растворимых в буфере. Для большинства бобовых

культур в раствор переходит не менее 80% общего содержания белков.

Колонки для хроматографирования готовят следующим образом. В стакан помещают 3—4 г хорошо измельченной этиламиноэтилцеллюлозы и тщательно перемешивают с 1%-ным раствором NaOH для перевода ионообменника в гидроксильную форму. Через 1 ч верхний слой жидкости вместе с неосевшими мелкими частицами целлюлозы сливают, в стакан добавляют дистиллированную воду и перемешивают. Воду сливают, вновь удаляя очень мелкие частицы целлюлозы.

Стеклнную хроматографическую колонку размером 20×1 см укрепляют в штативе, закрывают нижний кран и вливают из стакана часть суспензии целлюлозы в воде. Лишнюю жидкость осторожно сливают через кран и продолжают наполнение колонки небольшими порциями суспензии целлюлозы. Целлюлоза в колонке должна быть распределена равномерно; при набивке колонки и во время работы над поверхностью целлюлозы в колонке все время должен оставаться слой жидкости высотой 0,5—1 см.

Затем верхнюю часть колонки соединяют с резервуаром, в качестве которого может быть использована делительная воронка объемом 200 мл, и начинают промывать колонку (см. рис. 9). В резервуар наливают воду и открывают нижний кран настолько, чтобы скорость вытекания жидкости была около 1 мл в минуту. Колонку промывают водой почти до нейтральной реакции, после чего в резервуар вносят 0,005 М фосфатный буфер (рН 7,4) и промывают колонку до постоянной реакции вытекающей жидкости.

После промывания колонку соединяют с автоматическим коллектором фракций — прибором, позволяющим без участия экспериментатора собирать большое число фракций строго определенного объема (рис. 12). Коллектор регулируют по времени или по объему. В тех случаях, когда прибор устанавливают на определенное время, через которое происходит смена пробирок для фракций, необходимо отрегулировать скорость вытекания жидкости из колонки, чтобы в заданное время (обычно 8—12 мин) вытекало точно 5 мл жидкости. Если прибор устанавливают таким образом, что смена пробирок происходит после того, как в сифон наберется из колонки 5 мл жидкости, также регулируют скорость

вытекания жидкости (около 50 мл в 1 ч).

После подготовки колонки для анализа через нее пропускают такой объем раствора белков, выделенных из муки, чтобы в нем содержалось 30—50 мг белка (обычно 25—50 мл). Затем колонку промывают 0,005М фосфатным буфером для очистки ее от белков, которые не адсорбируются на диэтиламиноэтилцеллюлозе (щелочные белки). Во всех отбираемых фракциях (по 5 мл) определяют содержание белков по методу Лоури. Для этого метода необходимо приготовить следующие реактивы.

Реактив Фолина: 100 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 25 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 800 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ной фосфорной кислоты (H_3PO_4) и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь кипятят с обратным холодильником на сетке в течение 10 ч. Затем к смеси добавляют 150 г сернокислого лития, 50 мл воды и несколько капель бромной воды и снова кипятят в течение 15 мин без обратного холодильника для удаления избытка брома. После охлаждения раствор доводят до 1 л, фильтруют и хранят в темной склянке. Перед употреблением реактив разбавляют дистиллированной водой (1:1).

Растворы: А — 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH ; Б — 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и В — смесь из реактивов А и Б (50:1), которую готовят перед анализом.

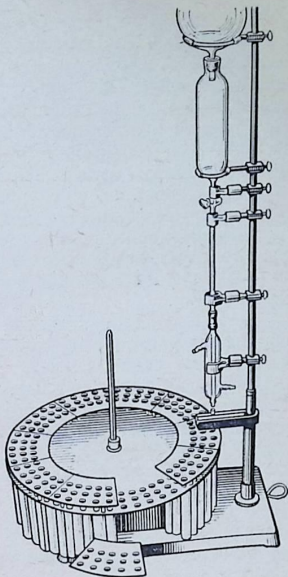


Рис. 12. Фракционный коллектор.

Определение содержания белков по методу Лоури. Из каждой фракции, получаемой после вытекания раствора из колонки, отбирают градуированной пипеткой 2 мл жидкости, переносят в пробирку и добавляют 1 мл реактива В. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку приливают 0,1 мл реактива Фолина. Через 30 мин желтая окраска жидкости переходит в синюю. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре.

Можно определять концентрацию белков спектрофотометрически при 280 нм (см. стр. 79).

Концентрацию белков рассчитывают по стандартному графику.

Для получения стандартного графика готовят образцовый раствор, в котором содержится известное количество белка (лучше всего белка той культуры, с которой проводят опыты). В 8 градуированных пробирок из микробюретки приливают столько стандартного раствора белка, чтобы в пробирках соответственно содержалось 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 мг белка. Объем раствора в каждой пробирке доводят водой до 2 мл и приливают по 1 мл реактива В. Через 10 мин в пробирки добавляют по 0,1 мл реактива Фолина и спустя 30 мин колориметрируют при красном светофильтре. На основании результатов определений оптической плотности стандартных растворов белка строят соответствующий график.

Промывание колонки фосфатным буфером проводят до тех пор, пока в отбираемых на коллекторе фракциях не останется даже следов белка (оптическая плотность растворов при определениях на фотоэлектроколориметре будет не выше 0,02). После этого начинают элюирование белков.

Для элюирования белков сначала через ионообменник пропускают растворы солей возрастающей концентрации, а затем щелочные растворы. Каждый последующий раствор начинают пропускать через колонку лишь после того, как под действием предыдущего раствора вытеснится весь белок и в жидкости, вытекающей из колонки, не будет следов белка.

При хроматографическом разделении белков семян бобовых культур на ДЭАЭЦ удовлетворительные результаты получают при элюировании белков из ионооб-

менника последовательным пропускаям следующих растворителей:

1) 0,01 M NaCl	в 0,005 M фосфатном буфере
2) 0,05 M NaCl	» 0,005 M » »
3) 0,10 M NaCl	» 0,005 M » »
4) 0,20 M NaCl	» 0,005 M » »
5) 0,30 M NaCl	» 0,005 M » »
6) 0,40 M NaCl	» 0,005 M » »
7) 0,40 M NaCl+0,10 M Na_2CO_3	» 0,005 M » »
8) 0,40 M NaCl+0,20 M Na_2CO_3	» 0,005 M » »
9) 0,40 M NaCl+0,30 M Na_2CO_3	» 0,005 M » »
10) 1%-ный NaOH	

При хроматографировании одного образца белков отбирают обычно несколько десятков — сотен фракций по 5 мл каждая; хроматографирование проводят в течение нескольких десятков часов.

Результаты хроматографического разделения белков выражают графически. На оси абсцисс отмечают номера фракций, а на оси ординат — их оптическую плотность при колориметрировании на фотоэлектроколориметре или абсолютное количество белка в каждой фракции, выраженное в микрограммах на 1 мл. На рисунке 13 изображена хроматограмма белков семян фасоли сорта Сакса на диэтиламиноэтилцеллюлозе.

Для определений содержания белков из каждой фракции объемом 5 мл было взято по 2 мл раствора. Оставшийся объем растворов сохраняют и в случае необходимости используют для дальнейших исследований (определений аминокислотного состава, изоэлектрической точки и т. д.).

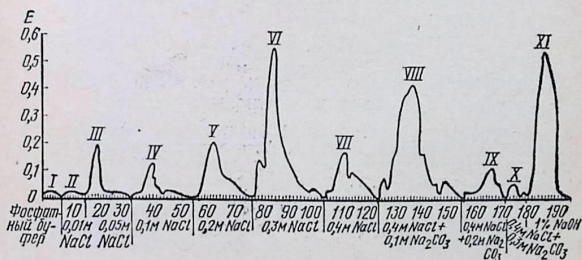


Рис. 13. Фракционирование белков семян фасоли сорта Сакса на диэтиламиноэтилцеллюлозе; I—XI белковые фракции, элюируемые различными растворами; 0—190 — номера пробирок.

Колонки, наполненные целлюлозоионитами, можно использовать для хроматографии белков неоднократно. Чтобы подготовить колонку для повторных анализов, после пропускания последнего растворителя (1%-ный NaOH) ее промывают водой до нейтральной реакции (скорость вытекания жидкости около 100 мл в час), а затем раствором фосфатного буфера до постоянной реакции.

Концентрацию буфера или NaCl и pH в буферном растворе, употребляемых для элюирования, можно изменять скачкообразно (ступенчатое элюирование) и постепенно (градиентное элюирование).

Описанный выше способ элюирования белков является ступенчатым. При таком способе возможно размывание белковых зон, но зато значительно различие интервалов перехода — главное условие успешного разделения белков.

При градиентном способе неизвестны интервалы перехода разделяемых белков. Сам процесс хроматографирования сводится к трем фазам.

Первая — фаза сорбции.

Вторая — фаза разделения. Белковые зоны перемещаются вдоль колонки с ускорением, причем пределом скорости является скорость протекания самого растворителя.

Третья — фаза пассивного переноса зон. Скорость перемещения зон равняется скорости протекания растворителя.

Способ создания градиента концентрации заключается в следующем. Два сообщающихся сосуда — смеситель и питающий сосуд — содержат растворы разной концентрации. Из смесителя раствор поступает в хроматографическую колонку. Убыль раствора в смесителе пополняется раствором из питающего сосуда.

Оборудование и реактивы: 1) фракционный коллектор, холодильник, механическая мешалка, фотоэлектроколориметр, диализатор, центрифуга, хроматографическая колонка, колбы мерные емкостью 500 мл и 1 л, колбы конические емкостью 100 и 250 мл, стаканы, пробирки градуированные, микробюретки, целлофан;

2) целлюлозоиониты (ДЭАЭЦ, ТЭАЭЦ, КМЦ), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , LiSO_4 , Na_2CO_3 , NaCl, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaOH 1%-ный, 0,005 М фосфатный буфер (pH 7,4).

Фосфатный буфер готовят следующим образом. Растворяют 0,890 г Na_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды и

0,680 г $\text{KН}_2\text{PO}_4$ в 1 л дистиллированной воды. После этого растворы смешивают в отношении 4:1 и проверяют рН буфера.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в полиакриламидном геле благодаря своей высокой чувствительности и хорошей разделяющей способности находит широкое применение в научных исследованиях. С помощью этого метода можно продемонстрировать многообразие белковых фракций, выделить индивидуальные белки, а в сочетании со специфическими реактивами получить зимограммы, показывающие изоферментный состав того или иного фермента. Таким образом, этот метод может быть применен для решения разнообразных теоретических и практических вопросов.

Высокая разрешающая способность метода электрофореза выгодно дополняется быстротой анализа и легкостью денситометрической расшифровки электрофореграмм благодаря большой прозрачности геля. Микроварианты метода дают возможность анализировать небольшие (50—100 мкг) образцы белков с минимальной затратой реактивов.

Метод горизонтального электрофореза дает возможность наблюдать одновременную картину разделения анионных и катионных белков, тогда как вертикальный микроэлектрофорез позволяет видеть отдельно либо анионные, либо катионные белки.

Электрофоретическим методом можно исследовать как очищенные препараты белков, так и неочищенные экстракты из тканей. Однако более целесообразно использовать лишь свежеполученные белковые экстракты или нативные препараты белков из разных органов растений. Если необходимо сохранить растительный материал для последующих электрофоретических исследований, его фиксируют жидким азотом или твердой углекислотой и высушивают лиофилизацией (см. стр. 106).

Принцип метода. Электрофорез — движение заряженных частиц в растворе под влиянием электрического поля. Движение частиц при электрофорезе зависит от размеров, формы, концентрации электрического заряда,

степени гидратации и степени диссоциации самих частиц, от вязкости, рН, температуры и ионной силы среды, от напряженности электрического поля, продолжительности электрофореза и длины пути, пройденного частицей.

Соотношение между электрофоретической подвижностью, скоростью передвижения, напряженностью поля, величиной рН и ионной силой одинаковы для свободного электрофореза и для электрофореза в носителе. В последнем случае на подвижность и четкость разделения влияют также адсорбция, неоднородность вещества носителя и его ионообменные свойства, электроосмос, капиллярный эффект, повышение температуры и разбавление. Полиакриламидный гель обладает тем преимуществом, что при использовании его в качестве носителя влияние адсорбции и электроосмоса исключается.

Для аналитического разделения растительных белков в настоящее время чаще всего применяют диск-электрофорез. Диск-электрофорез (от английского слова *discontinuous* — прерывистый) — метод разделения, в котором используется неоднородная («прерывистая») разделяющая система с полиакриламидным гелем в качестве носителя. При диск-электрофорезе используют пары буферов разного состава и с разными значениями рН, а носитель состоит из отдельных слоев геля, отличающихся друг от друга по размерам пор. Благодаря этому разделяемые вещества концентрируются сначала в очень узкой стартовой зоне, что имеет решающее значение для четкого разделения смеси.

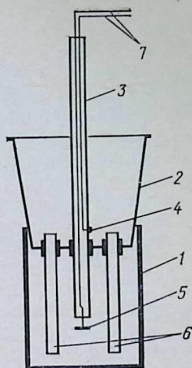
Высокая разделяющая способность диск-электрофореза основывается на двух физических явлениях:

- 1) эффекте концентрирования, в основе которого лежит выведенное Кольраушем соотношение, называемое регулирующей функцией; он состоит в том, что смеси перед разделением на компоненты концентрируются в четко ограниченной зоне;
- 2) эффекте молекулярного сита — отдельные молекулы разделяются при электрофорезе не только по их общему электрическому заряду, но также и по величине (что определяется молекулярной массой) и по форме молекул, которая зависит от третичной структуры белков.

При разделении растворимых компонентов смесь сначала концентрируется в узкой полосе крупнопористого

Рис. 14. Схема электрофоретической камеры:

1 — нижний электродный сосуд; 2 — верхний электродный сосуд; 3 — стеклянная трубка с платиновыми электродами; 4 — верхний электрод; 5 — нижний электрод; 6 — электрофоретические трубки; 7 — провода для соединения с источником питания.



полнакриламидного геля, а затем в мелкопористом геле ее компоненты распределяются по величине, форме и заряду молекул.

Аппаратура. Для вертикального микроэлектрофореза необходимы электродные сосуды, набор стеклянных трубок, подставка для трубок, источник питания и приспособление для охлаждения электрофоретической камеры.

В качестве нижнего электродного сосуда может служить цилиндрический химический стакан емкостью 1 л, верхний сосуд можно изготовить из полиэтиленовой банки (рис. 14). Для этого в дне банки просверливают отверстия: одно в центре и 9—12 — по окружности для установки электрофоретических трубок. В центральном отверстии с помощью резиновой муфты укрепляют длинную стеклянную трубку с нижним и верхним платиновыми электродами, которые припаивают к концам проводов с полихлорвиниловой изоляцией (места спаев тщательно изолируют). Платиновые электроды изготавливают в виде колец. Верхний электрод устанавливают на высоте 1 см от дна банки, нижний — на расстоянии 7 см от верхнего.

Электрофоретические трубки с внутренним диаметром 5 мм и длиной 75 мм укрепляют в отверстиях в дне верхнего сосуда при помощи отрезков резинового шланга.

Трубки точно подбирают по размерам, концы их слегка отшлифовывают. Перед работой трубки промывают хромовой смесью, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Подставка для трубок представляет собой полоску из плексигласа с высверленными отверстиями, диаметр которых несколько больше внешнего диаметра стеклянных трубок.

В качестве источников питания для электрофореза можно применять выпрямители типа УИП-1 или стабилизированные выпрямители, имеющие устройство для поддержания заданной силы тока.

Верхний и нижний электродные сосуды заполняют буферным раствором. В собранном виде верхний сосуд не должен пропускать буферный раствор, что необходимо для нормального протекания процесса электрофореза. Для лучшего охлаждения трубок электрофоретическую камеру помещают в холодильник или в сосуд, заполненный водой со льдом.

Реактивы. Гели для электрофореза готовят непосредственно в электрофоретических трубках путем смешивания нескольких запасных растворов, которые содержат необходимые реактивы и могут сохраняться в течение 3—4 месяцев при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. В зависимости от свойств подлежащих разделению белков готовят щелочной или кислый гель с различной концентрацией акриламида. Ниже приводится состав растворов для приготовления 7,5%-ного полиакриламидного геля.

Состав запасных растворов и электродного буфера для электрофореза в щелочном геле.

Раствор А_(щ) (рН 8,9) — 1 н. HCl 48 мл, трис-оксиметиламинометан 36,6 г, тетраметилэтилендиамин 0,23 мл, вода до 100 мл.

Раствор Б_(щ) (рН 6,7) — 1 н. HCl 48 мл, трис-оксиметиламинометан 5,98 г, тетраметилэтилендиамин 0,46 мл, вода до 100 мл.

Раствор В — акриламид 30 г, N,N'-метилен-бисакриламид 0,8 г, вода до 100 мл.

Раствор Г — акриламид 10 г, N,N'-метилен-бисакриламид 2,5 г, вода до 100 мл.

Раствор Д — рибофлавин 4 мг, вода до 100 мл.

Раствор Е — сахароза 40 г, вода до 100 мл.

Раствор персульфата аммония — ПСА_(щ) (свежеприготовленный) — аммоний надсерноокислый 0,14 г, вода до 100 мл.

Электродный буферный раствор (рН 8,3) — трис-оксиметиламинометан 6,0 г, глицин 28,8 г, вода до 1 л (перед использованием буфер разбавляют в 10 раз).

Индикатор — бромфеноловый синий 1 мг, вода до 100 мл.

Состав запасных растворов и электродного буфера для электрофореза в кислом геле.

Раствор А_к (рН 4,3)—1 н. КОН 48 мл, ледяная уксусная кислота 17,2 мл, тетраметилэтилендиамин 4,0 мл, вода до 100 мл.

Раствор Б_к (рН 6,8)—1 н. КОН 48 мл, ледяная уксусная кислота 2,87 мл, тетраметилэтилендиамин 0,46 мл, вода до 100 мл.

Растворы В, Г, Д, Е (как указано для щелочного геля).

Раствор персульфата аммония — ПСА_к (свежеприготовленный) — аммоний надсерноокислый 0,28 г, вода до 100 мл.

Электродный буферный раствор (рН 4,5) — β-аланин 31,2 г, ледяная уксусная кислота 8 мл, вода до 1 л (перед использованием буфер разбавляют в 10 раз).

Индикатор — метиловый зеленый 0,1 г, вода до 100 мл.

Все реактивы готовят на бидистиллированной воде.

Приготовление гелей. Подготовленные к работе электрофоретические трубки имеют два слоя геля: в верхнем (крупнопористом) происходит концентрирование разделяемых веществ, а в нижнем (мелкопористом) — их разделение.

Трубки снизу заклеивают лейкопластырем и устанавливают вертикально в отверстия на подставке. Затем готовят рабочий раствор для синтеза мелкопористого геля (табл. 4).

Таблица 4

Рабочие растворы для синтеза гелей

Гели для разделения в щелочной среде		Гели для разделения в кислой среде	
Мелкопористый (рН 8,9)	1 часть р-ра А _щ	Мелкопористый (рН 4,3)	1 часть р-ра А _к
	2 части р-ра В		2 части р-ра В
	1 часть воды		1 часть воды
	4 части р-ра ПСА _щ		4 части р-ра ПСА _к
Крупнопористый (рН 6,7)	1 часть р-ра Б _щ	Крупнопористый (рН 6,8)	1 часть р-ра Б _к
	2 части р-ра Г		2 части р-ра Г
	1 часть р-ра Д		1 часть р-ра Д
	4 части р-ра Е		4 части р-ра Е

Смесь осторожно перемешивают и быстро заливают в электрофоретические трубки. В каждую трубку наливают по 1 мл геля, затем капилляром наслаивают сверху слой воды 5—10 мм и оставляют стоять на 30—40 мин. В течение этого времени происходит полимеризация геля. Конец полимеризации устанавливают по образованию хорошо видимой границы раздела между гелем и слоем воды. После полимеризации воду осторожно стряхивают и ополаскивают 0,1—0,2 мл раствора крупнопористого геля. Затем в каждую трубку приливают точно по 0,15 мл этого же геля и наслаивают на него воду. Трубки выставляют на солнечный или люминесцентный свет для фотополимеризации. Через 20—30 мин образуется заметно опалесцирующий верхний гель. Воду из трубок удаляют осторожным стряхиванием.

Ход анализа водо- и солерастворимых белков. Электрофоретические трубки присоединяют к верхнему электродному сосуду, вводя их в верхний сосуд на 1 см. Лейкопластырь с нижних концов трубок снимают. В нижний электродный сосуд наливают соответствующий электродный буферный раствор, разбавленный в 10 раз, и трубки полностью погружают в него. Чтобы на нижних концах трубок не осталось пузырьков воздуха, на них предварительно навешивают по капле буферного раствора. В установленные таким образом трубки вносят по 0,1—0,2 мл исследуемого раствора, содержащего около 0,1 мг белка. Для того чтобы внесенный раствор не перемешивался с буферным раствором в верхнем сосуде, в него перед внесением в трубки добавляют сахарозу до конечной концентрации 20—40%. Исследуемый раствор готовят на воде или трис-глициновом буфере (рН 8,3), который используют в качестве электродного буферного раствора.

Легкорастворимые белки можно извлекать из семян и вегетативных органов растений трис-глициновым или 0,005 М фосфатным (рН 7,4) буфером. Для очистки белков от низкомолекулярных веществ проводят их диализ против буферного раствора, которым они извлекались. Окисление фенольных веществ в экстрактах, полученных из вегетативных органов, предупреждают добавлением аскорбиновой кислоты (0,1—1%) и диэтилдитиокарбамата натрия (0,05%).

После внесения исследуемого раствора трубки осторожно заполняют электродным буфером. Затем налива-

ют буферный раствор в верхний электродный сосуд и приливают 1 мл соответствующего индикатора, чтобы следить за процессом разделения. Собранную электрофоретическую камеру помещают в холодильник.

При разделении белков в щелочном геле нижний электрод присоединяют к положительному, а в кислом геле — к отрицательному полюсу выпрямителя. В первые 15 мин пропускают ток силой 2 мА на трубку. После того как белки войдут в нижний гель, силу тока увеличивают до 4 мА. Напряжение обычно бывает 400—600 В. Опыт заканчивают, когда зона индикаторной краски достигнет 3 мм от нижнего конца гелей (для этого требуется около 1 ч). Буферные растворы из нижнего и верхнего электродных сосудов можно употреблять при последующем электрофорезе, но их нельзя смешивать друг с другом.

Гели извлекают из трубок шприцем и фиксируют, погружая на 30 мин в пробирки с 7%-ной трихлоруксусной кислотой, отмывают трижды по 10 мин в воде, а затем помещают в 1%-ный раствор красителя Амидо-Шварц 10-B в 7%-ной уксусной кислоте. Через 30 мин красящий раствор сливают и гели отмывают от избытка красителя 7%-ной уксусной кислотой, в которой они могут храниться длительное время.

Фотографирование. Отмытые электрофореграммы фотографируют в проходящем свете под слоем растворителя на черно-белую фотопленку КН-2 или цветную обратимую пленку ЦО-2 или ЛН-2, используя зеркальную фотокамеру «Зенит» с удлиненными кольцами.

Идентификация белков на электрофореграммах. Белковые зоны на электрофореграммах характеризуют на основании их относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Положение каждой зоны сравнивают с положением зоны краски-индикатора. Отсчет производят при помощи прозрачной линейки с точностью до 0,5 мм, начиная от старта (верхнего края мелкопористого геля) и до середины соответствующей зоны. ОЭП рассчитывают по формуле:

$$\text{ОЭП} = \frac{\text{расстояние от старта до середины зоны белка}}{\text{расстояние от старта до середины зоны краски-индикатора}}$$

Полученные данные выражают десятичной дробью. При достаточном навыке и правильном измерении подвижности зон воспроизводимость величины ОЭП хоро-

шая, ошибка составляет менее 1,5—2%. Идентичными могут быть признаны зоны, ОЭП которых отличается менее чем на 2%. Продвижение краски-индикатора на сравниваемых электрофореграммах должно быть одинаковым, отличаясь не более чем на 2 мм.

Отдельные полосы электрофореграммы обычно называют следующим образом: *главными* — наиболее интенсивно окрашенные, *средними* — с более слабой окраской и *минорными* — наименее окрашенные.

Полуколичественные определения содержания белков можно проводить путем денситометрических измерений интенсивности окраски отдельных белковых зон. На рисунке 15 представлены фотографии, схемы и денситограммы альбуминов, выделенных из зерна ячменя сорта Московский 121 и высоколизинового ячменя Хайпроли.

Электрофорез проламинов. Для изучения биохимических и генетических особенностей злаковых культур широкое распространение получил метод электрофоретического разделения проламинов, который показывает, что эта фракция белков имеет сложный компонентный состав. Так, например, при сравнительном изучении запасных белков пшеницы установлено, что каждый вид и сорт имеют характерный электрофоретический спектр глиадинов.

Проламины извлекают из семян 70%-ным этиловым спиртом после удаления водо- и солерастворимых белков. Для анализа используют свежеразмолотую навеску муки. Полученный спиртовой экстракт ставят на диализ против 0,1 М раствора уксусной кислоты. Диализ проводят при температуре 2—4°C в течение 32—36 ч. После диализа в белковый раствор добавляют акриламид и мочевины до конечной концентрации соответственно 6% и 12%. Подготовленные таким образом растворы белков сразу же используют для электрофоретического разделения.

Для электрофореза проламинов применяют 7,5%-ный кислый гель.

Состав запасных растворов для синтеза геля. *Раствор А* — акриламид 10 г, N,N'-метиленабисакриламид 0,27 г, мочевины 30 г, ледяная уксусная кислота 46,7 мл, вода до 100 мл.

Раствор Б — аммоний надсернохлорный 1,5, мочевины 30 г, вода до 100 мл.

Раствор В — тетраметилэтилендиамин.

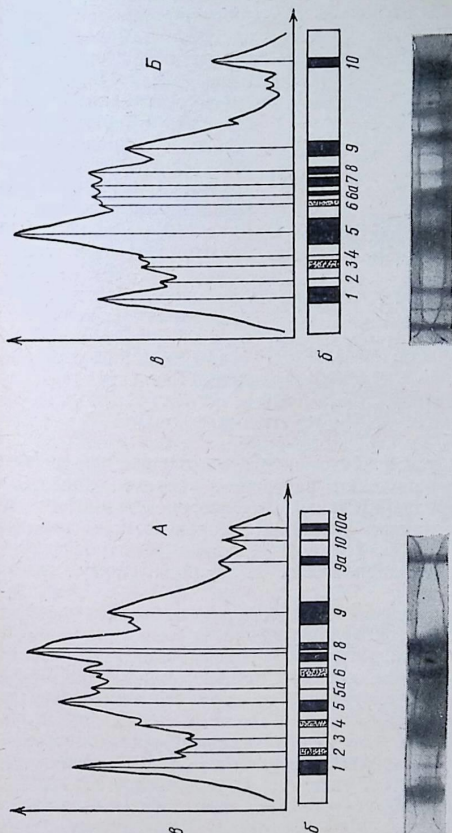


Рис. 15. Фотография (внизу), рисунки (б) и денситограммы (в) электрофоретических зон альбуминовых
 зерна ячменя сорта Московский 121 (А) и высоколизинового голозерного ячменя Хайпролин (Б):
 1-10а — зоны отдельных белковых компонентов.

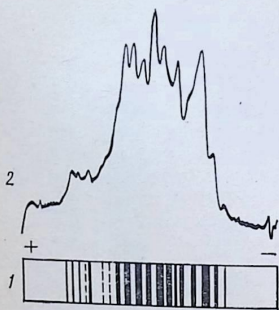


Рис. 16. Электрофореграмма (1) и денситограмма (2) глиадинов пшеницы сорта Московская 2453. Денситограмма получена на микрофотометре МФ-4.

Запасные растворы смешивают в следующем соотношении: 3 части раствора А, 1 часть раствора В и 0,02 части раствора В. Полученную смесь осторожно перемешивают и быстро заливают в подготовленные электрофоретические трубки по 1,2 мл. Сверху капилляром наслаивают по 5—10 мл воды. Гели синтезируют при температуре 50—60°C в течение часа. Затем трубки с гелями вставляют в верхний электродный сосуд. В нижний сосуд наливают электродный бу-

ферный раствор, так, чтобы в него погрузились только нижние концы электрофоретических трубок (на 1 см). В качестве электродного буфера используют 0,013 М раствор уксусной кислоты. Затем трубки и верхний сосуд также заполняют раствором уксусной кислоты и проводят предварительный электрофорез гелей для удаления персульфата аммония, который мешает разделению проламинов. Нижний электрод электрофоретической камеры подключают к отрицательному полюсу выпрямителя.

Предварительный электрофорез проводят при силе тока 3 мА на трубку в течение 2 ч до установления постоянного напряжения. Во время электрофореза необходимо обеспечить достаточное охлаждение, чтобы температура буферного раствора в нижнем сосуде была не выше 4—5°C.

После предварительного электрофореза буферный раствор в электродных сосудах меняют. В трубки вносят по 0,1—0,2 мл раствора, содержащего 0,2—0,25 мг белка. В течение первого часа электрофореза пропускают ток силой по 2 мА на трубку. Последующее разделение проводят при силе тока 4 мА на трубку и напряжении 300—400 В. Разделение глиадинов пшеницы длится 5—6 ч, зейна кукурузы — 4 ч.

По окончании электрофореза гели из трубок быстро извлекают с помощью шприца и фиксируют в 7%-ной трихлоруксусной кислоте. Белковые зоны проявляются в виде белых опалесцирующих дисков. Окрашивание проводят 1%-ным раствором Амидо-Шварц 10-В в 7%-ной уксусной кислоте. После отмытки избытка красителя столбики гелей можно фотографировать в проходящем свете или денситометрировать. Схема электрофоретического разделения глиадинов показана на рисунке 16.

Оборудование и реактивы: 1) электрофоретическая камера, электрофоретические трубки, подставки для электрофоретических трубок, выпрямитель тока, холодильник, термостат, лейкопластырь, целлофан, мерные колбы емкостью 100 мл, набор градуированных пипеток, капилляр, шприц, отрезки резиновой трубки, пробирки;

2) набор запасных растворов для электрофореза, электродный буферный раствор, сахараза, мочевины, акриламид, индикаторы (бромфеноловый синий и метиловый зеленый), Амидо-Шварц 10-В, трихлоруксусная кислота 7%-ная, уксусная кислота 7%-ная, уксусная кислота 0,013 M.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Концентрацию и содержание белков можно установить по методу Лоури (см. стр. 66). Однако, если белковые растворы чистые, более удобно, просто, быстро и с высокой точностью можно определять их содержание спектрофотометрическим методом. Этот метод позволяет определять содержание белков в растворах в видимой и ультрафиолетовой областях спектра света. В видимой области спектра поглощают свет только окрашенные белки, которые содержат в своем составе геминную группировку. Эти белки носят название хромопротеидов, и к ним относятся миоглобин, гемоглобин, цитохром, каталаза, пероксидаза и др. В ультрафиолетовой области спектра все белки имеют широкую полосу поглощения. Например, при длине волн 240—300 нм поглощение почти полностью определяется ароматическими аминокислотами (триптофаном, тирозином и фенилаланином), при 205 нм — пептидными связями. В таблице 5 показан «вклад» (или «доля») отдельных хромофоров «среднего» белка в общий спектр поглощения при различных длинах волн.

После очистки белков для количественного определения наиболее часто используют величину поглощения

**Доля поглощения отдельных хромофоров
в общем спектре «среднего» белка**

Хромофоры	205 нм	220 нм	250 нм	280 нм
	доля поглощения, %			
Пептидная группа	78,0	32,0	2,9	0
Аргинин	2,0	0,	0	0
Цистин	0,6	1,0	11,8	2,3
Цистеин	0,1	0,1	0	0
Метионин	0,6	0,8	0	0
Гистидин	2,4	7,1	0	0
Фенилаланин	6,5	3,7	9,4	0
Тирозин	4,3	20,0	15,0	31,9
Триптофан	5,5	36,0	61,0	65,7

при 280 нм, так как в этом случае белки имеют максимум поглощения, обусловленный содержанием в них ароматических аминокислот — триптофана и тирозина. На рисунке 17 показан спектр поглощения типичного белка — альбумина бычьей плазмы. Для количественного определения белков спектрофотометрическим методом предварительно строят калибровочный график с использованием раствора чистого белка с концентрацией от 0,05 до 2,00 мг/мл (рис. 18).

В настоящее время отечественная и зарубежная промышленность выпускает много различных спектро-

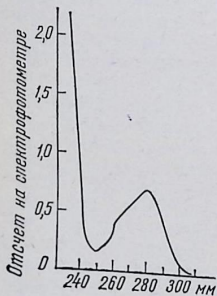


Рис. 17. Спектр поглощения альбумина бычьей плазмы при pH 7,5 (в нм).

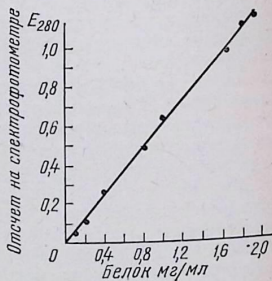


Рис. 18. Калибровочный график для определения концентрации белка в исследуемом растворе.

фотометров. В сельскохозяйственных вузах и агрохимических лабораториях чаще всего используют отечественные спектрофотометры СФ-4 и СФ-4А и спектрофотометры Венгерской Народной Республики «Спектромом-201» и «Спектромом-203». Описание работы на СФ-4А изложено в книге под редакцией А. И. Ермакова «Методы биохимического исследования растений» (М., «Колос», 1972).

В связи с тем, что в современные сельскохозяйственные лаборатории в большом количестве поступают спектрофотометры «Спектромом-203», ниже приводится краткое описание работы на этом приборе.

«Спектромом-203» работает от сети переменного тока и предназначен для измерения интенсивности пропускания (экстинкции) растворов веществ в области спектра от 190 до 1100 нм относительно эталона, пропускание которого принимается равным 100%, а экстинкция — равной нулю. Кроме того, этот спектрофотометр можно использовать для флюоресцентных и нефелометрических измерений.

Принцип работы прибора заключается в том, что на пути пучка света с определенной длиной волны, выходящего из монохроматора, помещают вначале эталон (контроль), а затем измеряемый образец. При помощи отсчетного потенциометра измеряют разность интенсивности пучков света, проходящих через образец и эталон.

Результат измерений получается в единицах пропускания (экстинкции).

Спектрофотометр (рис. 19) состоит из двух блоков, соединяющихся между собой электрическими кабелями, — выпрямителя и стабилизатора тока 1 — и собственно спектрофотометра 2. Основные узлы прибора — источники света, фотоэлементы, усилитель, отсчетные устройства и важнейшие составные части монохроматора — кварцевая призма, коллиматорное зеркало (зеркальный объектив) и щели — расположены внутри корпуса.

Работа оптической системы заключается в следующем: свет от источника при помощи системы зеркал через входную щель направляется на вогнутое (коллиматорное) зеркало, а после отражения — на кварцевую призму, которая разлагает его в спектр. Задняя зеркальная поверхность призмы направляет необходимый монохроматический пучок лучей обратно на коллиматорное

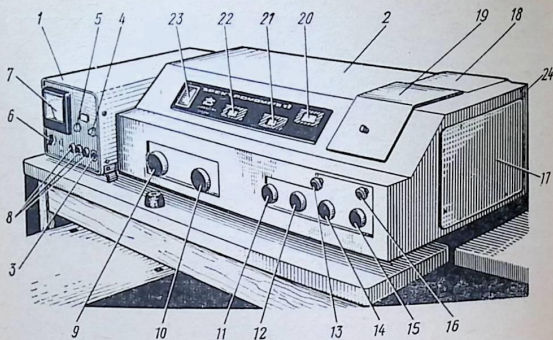


Рис. 19. Спектрофотометр «Спектромом-203»:

1 — стабилизатор; 2 — спектрофотометр; 3 — главный выключатель сетевого тока; 4 — индикаторная лампочка включения сетевого тока; 5 — индикаторная лампочка включения источника освещения; 6 — переключатель стабилизированного тока ламп; 7 — миллиамперметр; 8 — предохранители; 9 — ручка установки длины волны; 10 — ручка установки отсчетного потенциометра; 11 — ручка установки щели; 12 — потенциометр регулировки чувствительности; 13 — ручка протяжки кювет; 14 — переключатель операций; 15 — потенциометр регулировки тока; 16 — ручка переключения фотоэлементов; 17 — крышка камеры фотоэлементов; 18 — крышка корпуса источников света; 19 — крышка кюветной камеры; 20 — шкала щели; 21 — нулевой прибор (гальванометр); 22 — шкала пропускания и экстинкции; 23 — шкала длины волны; 24 — ручка переключения источника света.

зеркало. Монохроматический пучок света необходимой длины волны получают, поворачивая призму вокруг оси. Отраженный луч вогнутым зеркалом направляется через выходную щель на исследуемый образец, где часть потока света поглощается, а остальная попадает на фотоэлемент. В фотоэлементе индуцируется фототок, который усиливается, измеряется и на основании этого определяется изменение светового потока.

Перед тем как включать прибор в сеть, необходимо проверить положение некоторых переключателей на панели прибора: выключатель 3 должен стоять в положении «OFF»; переключатель 6 — в положении «О», переключатель операций 14 — в положении «OFF». После проверки и установки переключателей в исходное положение проводят подготовительные операции к пуску прибора в соответствии с изучаемым объектом. Прежде всего устанавливают в рабочее положение необходимый источник света рукояткой 24, находящейся на задней

стенке спектрофотометра ниже крышки корпуса источников света 18. Эта рукоятка имеет два фиксированных положения: при вдвинутом положении в рабочем состоянии находится водородная лампа, которую применяют для измерений в области спектра от 190 до 350 нм. Если измерения проводят в области спектра 320—1100 нм, используют вольфрамовую лампу накаливания, для чего движок 24 вытягивают из прибора. При этом приводится в движение поворотный стол с двумя смонтированными на нем лампами (водородной и вольфрамовой) и лампа накаливания устанавливается с помощью автоматического фиксатора точно против вогнутого зеркала.

Два фотоэлемента находятся в герметической камере и приводятся в рабочее положение рукояткой 16. Когда рукоятка не выдвинута, на пути луча света установлен сурьмяно-цезиевый фотоэлемент для измерений в области спектра от 190 до 650 нм, а при выдвинутой до упора ручке — кислородно-цезиевый фотоэлемент, воспринимающий лучи в области спектра от 500 до 1100 нм. В кюветной камере, слева, возле выходной щели монохроматора имеется оправа со светофильтрами, которые в определенных условиях могут быть помещены на пути светового пучка. Первый фильтр *UG* служит для поглощения рассеянного света в диапазоне длин волн от 320 до 400 нм, а второй фильтр *OG-5* выполняет аналогичную функцию при измерениях в области спектра выше 600 нм. Светофильтр *UG* рекомендуется применять при измерениях с использованием лампы накаливания в области спектра от 320 до 400 нм.

Установив необходимый источник света, поглотитель рассеянного света и детектор лучей (если это необходимо), приступают к запуску прибора. Для определения концентрации белков в растворах устанавливают водородную лампу, для чего движок 24 вдвигают внутрь прибора до срабатывания фиксатора, а рукоятку 16 внутрь до упора. Включают стабилизатор напряжения 1 при помощи сетевого разъема в сеть переменного тока. Выключатель 3 переводят в положение «0N», при этом загорается индикаторная лампочка 4 и стрелка миллиамперметра 7 отклоняется от нулевого значения. Через 3—5 мин стрелка миллиамперметра должна установиться в положении 300 мА. После этого переводят переключатель 6 в положение, включающее водородную лампу.

Включение водородной лампы происходит автоматически через 5—7 мин. За это время вращением рукоятки 9 по шкале 23 устанавливают длину волны 280 нм, вращением рукоятки 10 приводят шкалу пропускания и экстинкции 22 на 100%-ное пропускание (экстинкция E-0). Далее, поворачивая ручку 12, потенциометр регулировки чувствительности устанавливают в среднее положение (4 оборота рукоятки от какого-либо крайнего положения). Можно проводить измерения и при других положениях потенциометра, однако следует помнить, что при нахождении ручки в крайнем правом положении (по ходу часовой стрелки) на отсчетный потенциометр подается большее напряжение и поэтому увеличивается точность отсчета, но одновременно увеличивается ширина щели, следовательно, ухудшается монохроматичность света (чувствительность и ширина щели находятся в обратной зависимости). В момент автоматического включения водородной лампы зажигается индикаторная лампочка 5 (светящуюся водородную лампу легко наблюдать через жалюзи крышки 18). Открывают крышку кюветной камеры 19, при этом автоматически закрывается шторка камеры фотоэлементов. В таком положении прибор должен прогреться не менее 30 мин. За это время подготавливают растворитель и образцы для измерений, заполняют ими на $\frac{2}{3}$ высоты кварцевые кюветы. В гнездо № 1 кюветодержателя помещают кювету с растворителем изучаемого вещества — эталон, пропускание которого равно 100%, а экстинкция (E) равна 0 (в случае изучения светопоглощения белков растворителями, а следовательно, и эталонами, могут быть дистиллированная вода, растворы нейтральных солей, щелочи, спирт, буферные системы и т. д.). В гнезда № 2, 3, 4 ставят испытуемые растворы. Порядковый номер, нанесенный на боковую сторону кюветодержателя, соответствует порядковому номеру на ручке для протяжки кювет 13. Кюветодержатель устанавливают на столик кюветной камеры с таким расчетом, чтобы контрольная кювета точно находилась в положении № 1 (правильная установка кюветодержателя в рабочее положение включает перекрывание стенками кюветодержателя пути световому потоку). После этого приступают к измерениям.

При открытой крышке кюветной камеры 19 ручку переключателя операций 14 переводят в положение

«ON». Стрелка гальванометра 21 должна отклониться от центрального положения. Вращением ручки 15 переводят стрелку гальванометра 21 в центральное положение. Затем ручку переключателя операций 14 устанавливают в положение «СНЕК» и закрывают кюветную камеру крышкой 19. Стрелку гальванометра 21 устанавливают в центральное положение сначала грубо (изменением ширины щели), вращая ручку 11, а затем точно с помощью потенциометра регулировки чувствительности 12. Ручкой 13 передвигают исследуемый образец до срабатывания фиксатора (положение № 2). Переключатель операции 14 переводят в положение « $\times 1$ » и, поворачивая ручку 10, стрелку гальванометра 21 устанавливают в центральное положение шкалы. Отсчитывают и записывают показания шкалы 22 (на нижней шкале — пропускание в процентах, на верхней — экстинкция E). При измерении образца с пропусканием ниже 10% измерительный переключатель 14 устанавливают в положение « $\times 0,1$ ». В этом случае отсчитанную величину пропускания умножают на 0,1, а к величине экстинкции прибавляют единицу.

Если кюветодержатель заполнен не двумя кюветами, а четырьмя (один эталон, остальные — испытуемые), продолжают измерения, для чего ручкой протяжки кювет 13 помещают в поток света кювету № 3 (на рычажке положение № 3). Рукояткой 10 устанавливают величину экстинкции по гальванометру 2 и записывают в тетрадь показания шкалы 22. Закончив измерения экстинкции четвертой кюветы, открывают крышку кюветной камеры 19, переключатель операции 14 устанавливают в положение «ON». Затем извлекают кюветодержатель, кюветы (кроме контрольной № 1) промывают и заполняют новыми образцами. Тщательно вытирают внешние стенки кювет фильтровальной бумагой, помещают в кюветодержатель, а последний в кюветную камеру, и измерения повторяют.

При выполнении спектрального анализа для установления максимума поглощения веществом в определенном участке видимого или ультрафиолетового спектра после снятия экстинкции на одном из крайних значений волны при открытой крышке 19 и выключенном положении рукоятки операций 14 ручкой 9 устанавливают следующее значение длины волны, отличающееся от предыдущего на 5—10 нм. Затем выполняют опера-

ции по компенсации темнового тока и установлению экстинкции, как указано выше. Содержание белков рассчитывают по калибровочному графику.

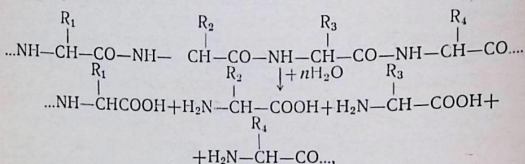
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Аминокислотный состав белков и главным образом содержание незаменимых аминокислот в белках — важнейший показатель их пищевой и кормовой ценности.

Определение аминокислотного состава белков можно проводить различными методами — химическими, микробиологическими, электрофоретическими, хроматографическими и др. В последнее время основными способами массовых анализов стали хроматографические методы, которые достаточно быстры, точны и доступны.

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Перед определением аминокислотного состава белки подвергают гидролизу, вследствие чего в них разрываются пептидные связи. Гидролиз идет по следующей схеме:



где R_1, R_2, R_3, R_4 — различные радикалы аминокислотных остатков.

В биохимической практике используют ферментативный, щелочной и кислотный гидролиз. Ферментативный гидролиз применяют обычно для разрешения специальных задач белковой химии, например при установлении строения белков. Щелочной гидролиз ведет к разрушению многих аминокислот и применяют его довольно редко. При изучении аминокислотного состава обычно используют кислотный гидролиз белков, для чего применяют соляную, серную и другие кислоты высокой концентрации. Наиболее часто белок гидролизуют 6 н. HCl

(219 г HCl на 1 л) в течение 20—24 ч при температуре 100—105°C. Чем шире отношение кислоты к белку, тем меньше потерь при гидролизе. На практике наиболее часто используют отношение кислоты к белку от 100:1 до 1000:1.

Наблюдения показывают, что при кипячении белков с 6 н. HCl в течение 24 ч освобождающийся в результате гидролиза триптофан полностью разрушается, серин и треонин — частично разлагаются, количество метионина, цистина и цистеина значительно уменьшается. Другие аминокислоты после гидролиза не изменяются. Следует также учитывать, что аспарагин и глутамин, которые входят в состав белковых молекул, дают соответственно аспарагиновую и глутаминовую кислоты и аммиак. По количеству аммиака в гидролизате устанавливают суммарное содержание аспарагина и глутамина в белках.

В связи с распадом триптофана под действием соляной кислоты его определяют без предварительного гидролиза белков или после щелочного гидролиза. При вычислениях содержания серина и треонина в белках вводят поправочные коэффициенты, соответствующие их распаду при гидролизе. Для предотвращения распада аминокислот, содержащих серу, материал перед гидролизом обрабатывают надмуравьиной кислотой, под действием которой цистин и цистеин превращаются в цистеиновую кислоту, а метионин — в метионинсульфон, не разрушающиеся при кислотном гидролизе.

При кислотном гидролизе белков в присутствии углеводов или даже при нагревании аминокислот с углеводами в кислой среде многие аминокислоты распадаются и, кроме того, значительная часть их затрачивается на образование темноокрашенных гуминовых веществ. Поэтому для гидролиза берут лишь хорошо очищенные от углеводов и других веществ белковые препараты; нельзя использовать исходный растительный материал (семена, листья, корни) без предварительного извлечения белков, так как при этом будут грубые ошибки в определениях всех аминокислот.

Иногда для уменьшения потерь аминокислот при гидролизе в присутствии углеводов рекомендуют увеличивать объем кислоты (до 10 000-кратного по отношению к навеске). Разумеется, при массовых анализах такие условия непригодны,

На точность определения аминокислот при гидролизе растительного материала без предварительного выделения белков и без их тщательной очистки влияют следующие причины.

1. Потери аминокислот при гидролизе в присутствии углеводов. Чем больше углеводов в растительном материале, тем больше потерь аминокислот при гидролизе.

2. Аминокислоты, не связанные в виде белков. Например, в семенах бобовых культур их содержится до 15%, еще больше в листьях растений, а в клубнях картофеля — до 30% общего количества аминокислот. После гидролиза эти аминокислоты будут находиться в том же растворе, где содержатся и аминокислоты, образовавшиеся в результате распада белков растительного материала. В результате полученная сумма аминокислот (как белковых, так и небелковых) не будет соответствовать аминокислотному составу белков данного растения.

3. Непротеиногенные аминокислоты, которые не участвуют в построении белковых молекул, а присутствуют в растениях лишь в свободном состоянии. Всего их известно свыше 100, из которых в сельскохозяйственных растениях наиболее часто встречаются γ -аминомасляная кислота, α -аминомасляная кислота, β -аланин, пипеколинная кислота, 4-оксипипеколинная кислота, 4-метилпролин, орнитин, цитруллин, γ -метилглютаминная кислота, γ -оксиглютаминная кислота, гомосерин, метилглицин, оксинорвалин, канаванин, ряд производных фенилаланина и тирозина и некоторые другие. При гидролизе растительных объектов без предварительного выделения чистых белков эти аминокислоты будут в значительной степени загрязнять фракцию протеиногенных аминокислот и существенно искажать результаты определений аминокислотного состава белков. Определить в той же вытяжке непротеиногенные аминокислоты очень трудно, а иногда и невозможно, так как существующие модели аминокислотных анализаторов рассчитаны главным образом на определение аминокислот, входящих в состав белков.

Таким образом, данные определений аминокислотного состава белков, полученные путем кислотного гидролиза исходного растительного материала без экстракции белков, нельзя считать достоверными.

В опытах установлено, что одни аминокислоты освобождаются из белков с большей скоростью, чем другие; температура, концентрация белков, объем кислоты и некоторые другие факторы оказывают частичное влияние на количественный выход отдельных аминокислот. Поэтому гидролиз белков необходимо проводить в строго определенных условиях и обязательно точно указывать их.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

Принцип метода. Чистые препараты белков, выделенные из растительного материала, гидролизуют соляной кислотой. После удаления соляной кислоты аминокислоты разделяют хроматографией на бумаге и определяют количественно реакцией с нингидрином.

Ход определения. На аналитических весах берут навески хорошо очищенных препаратов белка около 50 мг ($\pm 1-2$ мг). Одновременно в этих же препаратах определяют влажность и процент азота. Навески белка помещают в стеклянные ампулы и добавляют по 10 мл 6 н. HCl. Если белка недостаточно, навески можно взять по 20—25 мг, но величина их должна быть примерно одинаковой. Ампулы запаивают и ставят в термостат с терморегулятором на 24 ч. Температуру в термостате поддерживают в пределах 103—105°C. В течение этого времени содержимое ампул периодически тщательно встряхивают.

После окончания гидролиза ампулы охлаждают, вскрывают и содержимое количественно переносят в фарфоровые чашки, для чего ампулы несколько раз ополаскивают небольшими порциями дистиллированной воды. Чашки с гидролизатом ставят на водяную баню в вытяжной шкаф и содержимое выпаривают (с вентилятором) при температуре не более 50°C. После выпаривания соляной кислоты в чашки добавляют немного дистиллированной воды и снова выпаривают досуха. Эту операцию повторяют 3—4 раза.

Соляную кислоту можно удалять и при комнатной температуре, выпаривая ее в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора или едким кали. После удаления HCl в чашки добавляют воду и вновь упаривают досуха. Это повторяют 3—4 раза.

После полного удаления соляной кислоты чашки охлаждают и добавляют точно по 4 мл 10%-ного изопропилового спирта (если навеска была 20—25 мг, приливают по 2 мл). Содержимое чашек тщательно перемешивают стеклянными палочками для полного растворения аминокислот. После этого содержимое чашек переносят в маленькие центрифужные пробирки (мыть чашки нельзя) и центрифугируют в течение 5—10 мин при 3—4 тыс. об/мин для осаждения гуминовых веществ. Чистые растворы аминокислот сливают в сухие маленькие пробирки, плотно закрывают пробками, замораживают в холодильнике и сохраняют для количественных определений. В замороженном состоянии в холодильнике растворы можно хранить в течение 2—3 недель.

Количественное определение аминокислот в гидролизатах проводят таким же методом, как и при определении содержания свободных аминокислот в растениях (см. стр. 37). Объем раствора, наносимого на одну хроматограмму, должен составлять 0,1 мл. Хроматографию проводят в трехкратной повторности.

Как уже указывалось, в результате кислотного гидролиза аспарагина и глутамин превращаются в соответствующие дикарбоновые аминокислоты и аммиак. Для определения амидов в белках в тех же растворах аминокислот, полученных после удаления соляной кислоты и растворения в изопропиловом спирте, устанавливают содержание аммиака микродиффузионным методом (см. стр. 13). Расчеты проводят с учетом навески белка и разбавления (в 4 или 2 мл изопропилового спирта).

Результаты определений аминокислотного состава выражают в граммах аминокислот на 100 г белка или в процентах азота каждой аминокислоты от общего азота белка.

Определение триптофана. При кислотном гидролизе триптофан разрушается, поэтому его определяют без предварительного гидролиза белков. Можно использовать щелочной гидролиз, но это более сложный метод.

Образцы чистых белков 40—50 мг растворяют при слабом нагревании в 5 мл 0,2 н. NaOH. Если получаются окрашенные растворы, значит белки плохо очищены от пигментов, что может привести к ошибке при анализе. Для более полного освобождения белков от пигментов следует провести их дополнительную очистку эфиром. Реактив для определения триптофана готовят

следующим образом. К 8 мл 23,7 н. H_2SO_4 добавляют 1 мл 2 н. H_2SO_4 , содержащей 30 мг на 1 мл парадиметиламинобензальдегида, и смесь охлаждают до 25°C . К этой смеси прибавляют 1 мл полученного раствора белков, содержащее пробирки перемешивают и оставляют на 12 ч. Затем в пробирки добавляют по 0,1 мл 0,045%-ного раствора NaNO_2 и спустя 30 ч определяют оптическую плотность растворов по сравнению с контролями на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 600 нм. Для контроля вместо раствора белка используют воду. Аналогичным образом готовят стандартные растворы триптофана и после определения их оптической плотности строят калибровочный график. Концентрацию триптофана в изучаемых образцах белка находят по этому графику.

Оборудование и реактивы. Кроме оборудования и реактивов, указанных для определения свободных аминокислот (см. стр. 43), необходимо иметь следующее: 1) термостат с терморегулятором, стеклянные ампулы для гидролиза;

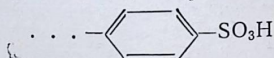
2) 6 н. HCl , 2 н. и 23,7 н. H_2SO_4 , NaNO_2 0,045%-ный, парадиметиламинобензальдегид.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА АМИНОКИСЛОТНЫХ АНАЛИЗАТОРАХ

В последние годы широкое распространение получил метод количественного определения аминокислот на автоматических аминокислотных анализаторах. При анализах аминокислотного состава белков этот метод стал основным. Главными преимуществами метода определения аминокислот на аминокислотных анализаторах по сравнению с методом хроматографии на бумаге являются более высокая точность и более высокая скорость выполнения анализов. В основе метода лежит ионообменная хроматография.

Принципы ионообменной хроматографии аминокислот. Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом обмене содержащихся в хроматографируемом растворе ионов на подвижные ионы адсорбента, называемого ионообменником. Ионообменники — твердые нерастворимые в воде и органических растворителях полиэлектролиты, содержащие группы, способные к ионизации и дающие с ионами противоположного заряда нерастворимые соли. Большинство ионообменников — высокомолекулярные соединения с сетчатой

или пространственной, структурой. В том случае, когда ионообменник содержит в функциональных группах ионы, способные к адсорбции катионов, его называют катионитом, а если ионообменник способен к обмену анионов,— анионитом. Для хроматографического разделения аминокислот используют сильнокислые органические ионообменники, получаемые на основе полимерных веществ — синтетических смол. В качестве фиксированных ионов в них чаще всего присутствуют группы SO_3^- . Наиболее широкое распространение получили сульфополистирольные катиониты, содержащие группировки



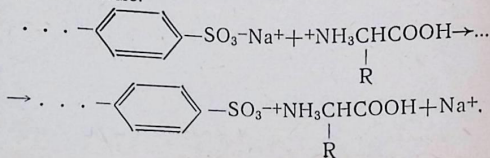
В молекуле катионита группировка — SO_3H легко диссоциирует на ион SO_3^- , который остается в «каркасе» молекулы, и ион H^+ , переходящий в раствор. При хроматографии аминокислот чаще всего используют катиониты дауэкс-50×8, амберлит JR-120, зео-карб-225, катиониты типа хромекс KB-51, KB-52, КГ-53 и др.

Перед хроматографией катионообменник переводят в Na^+ -форму. Для этого его многократно обрабатывают слабым раствором NaOH .

Известно, что аминокислоты являются амфотерными соединениями. В кислой среде диссоциация карбоксильных групп аминокислот подавляется и они представляют собой катионы.

Степень ионизации и величина общего заряда молекул отдельных аминокислот при данном значении pH зависит от дополнительных основных или кислотных групп в боковых цепях аминокислот.

При хроматографии аминокислот хроматографическую колонку заполняют катионообменником в Na^+ -форме и через колонку медленно пропускают раствор аминокислот в кислом Na -цитратном буфере. При этом происходит связывание аминокислот ионообменником по следующей схеме:



Если повышать рН пропускаемого через колонку раствора, заряд аминокислот изменяется и в том случае, когда суммарный заряд данной аминокислоты становится близким к нулю, происходит обратная десорбция аминокислоты с ионообменника в раствор с заменой на ионы Na^+ , содержащиеся в буфере. Установлено, что карбоксильные группы моноаминомонокарбоновых аминокислот почти полностью ионизируются при рН около 3, т. е. при таком значении рН суммарный заряд этих аминокислот равен нулю и они вытесняются в раствор.

В связи с тем, что для каждой аминокислоты нулевой суммарный заряд наблюдается при строго определенном значении рН, десорбция отдельных аминокислот в раствор при повышении рН элюирующего раствора идет в определенной последовательности.

При хроматографическом разделении аминокислот на ионообменниках, так же как и при хроматографии на бумаге, каждая аминокислота многократно переходит из неподвижной фазы, которой является ионообменник, в подвижную фазу — элюирующий раствор. Аминокислота передвигается вдоль колонки только тогда, когда она находится в элюирующем растворе. Так как скорости движения отдельных аминокислот различны, в процессе хроматографии каждая аминокислота концентрируется в определенных, движущихся вдоль ионообменника узко ограниченных зонах элюирующего раствора. В конечном счете это характеризует и последовательность выхода зон аминокислот в колонки. Очередность элюирования аминокислот с сульфополистирольных катионитов, как правило, следующая: цистеиновая кислота, метионинсульфоксид, оксипролин, аспарагиновая кислота, треонин серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, цистеин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, аммиак и аргинин.

Содержание каждой аминокислоты, вымываемой из колонки, количественно определяют измерением интенсивности окраски, возникающей при реакции аминокислоты с нингидрином.

Автоматические анализаторы аминокислот. Разработанная Штейном и Муром ионообменная хроматография аминокислот на колонках с сульфополистирольными катионитами легла в основу конструкции автоматических

жидкостных анализаторов аминокислот. В настоящее время выпускается более 20 марок аминокислотных анализаторов, из которых в лабораториях нашей страны наибольшее распространение получили аминокислотные анализаторы Hd-1200E и AAA-881 чехословацкого производства, а также KLA-3B японской фирмы «Хитачи».

Современный анализатор аминокислот — сложный электронный прибор, работающий в автоматическом режиме, всеми функциями которого управляют программаторы и компьютерные устройства. Несмотря на большое разнообразие конструкций существующих приборов, все они основаны на одинаковых принципах и в них использованы примерно идентичные основные узлы.

Принципиальная схема автоматического анализатора аминокислот представлена на рисунке 20. Прибор состоит из колонки 1, заполненной сульфополистирольным ионообменником, в верхней части которой имеется

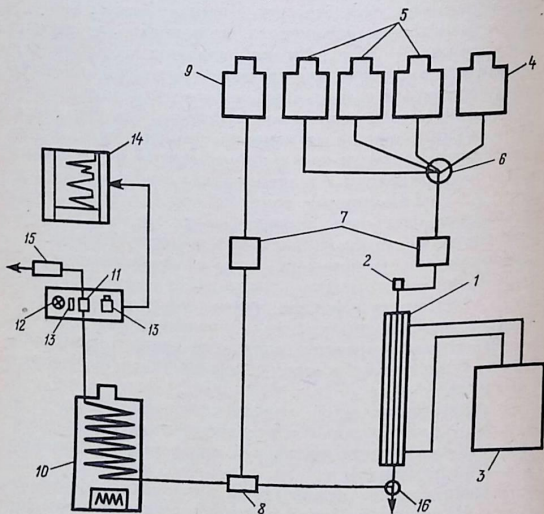


Рис. 20. Схема автоматического анализатора аминокислот Hd-1200E.

устройство для отбора проб 2. С помощью термостата 3 в колонке поддерживается определенная температура. Раствор NaOH и буферные растворы для элюирования аминокислот подаются из специальных емкостей 4 и 5 через клапаны 6.

После того как ионообменник в колонке переведен с помощью раствора NaOH в Na^+ -форму и забуферен цитратным буфером (рН 3,25), на вход колонки наносится раствор образца, содержащий определенное количество смеси аминокислот в Na-цитратном буфере при рН 2,2.

В этих условиях все аминокислоты заряжены положительно и они сорбируются ионообменником, однако прочность сорбции каждой аминокислоты различна и возрастает с увеличением основности аминокислоты. После внесения смеси аминокислот проводят элюирование аминокислот с ионообменника путем постепенного (ступенчатого) увеличения рН и ионной силы буферных растворов, которые подаются в колонку специальным насосом 7 с очень точной дозировкой раствора и высокой воспроизводимостью во времени.

При повышении рН элюирующих растворов положительные заряды молекул аминокислот постепенно нейтрализуются, ионные взаимодействия между аминокислотами и ионообменниками соответственно ослабевают и молекулы аминокислот десорбируются с частиц ионообменника. Первыми с колонки элюируются кислые аминокислоты, затем нейтральные и, наконец, основные.

В результате такого хроматографического разделения отдельные аминокислоты в строго определенном порядке выходят из колонки и попадают в смеситель 8. В смесителе растворы аминокислот смешиваются с нингидриновым реактивом в соотношении 2:1, который поступает из соответствующей емкости 9. Подача нингидринового реактива осуществляется отдельным насосом. Затем смесь поступает в реактор 10.

В реакторе при повышенной температуре аминокислоты взаимодействуют с нингидрином. Окрашенная нингидрином смесь из реактора поступает в фотометр 11 с проточными кюветами, и интенсивность окраски измеряют при 440 нм (при анализе пролина и оксипролина) и при 570 нм (всех остальных аминокислот). Фотоэлементы 13 фотометра связаны с электронным усилителем самописца 14, и прохождение окрашенной смеси через

проточные кюветы регистрируется на бумажной ленте самописца в виде пиков, причем площади пиков пропорциональны интенсивности окраски и, следовательно, содержанию отдельных аминокислот в растворе. Раствор после фотометра проходит через клапан сброса 15 и попадает в емкость сброса.

После каждого определения содержания аминокислот проводится подготовка хроматографической колонки к дальнейшей работе. Для этого через колонку пропускается 0,2 н. раствор NaOH, в результате чего ионообменник переходит в Na^+ -форму. Клапан подачи растворов 6 при этом переключается на емкость 4, а клапан 15 — на сброс. После регенерации колонка стабилизируется рабочим Na-цитратным буфером (рН 3,5) до установления ионного равновесия ионообменник $\rightleftharpoons$ буферный раствор. После этого колонка готова к следующему анализу и цикл определения содержания аминокислот в смеси повторяется.

Современные аминокислотные анализаторы имеют две хроматографические колонки — большую (для разделения кислых и нейтральных аминокислот) и малую (для разделения основных аминокислот). Это значительно ускоряет проведение анализов. Внешний вид такого анализатора чехословацкого производства марки Hd-1200E представлен на рисунке 21. Он широко используется для определения аминокислотного состава белков в биохимических и агрохимических лабораториях.

Аминокислотный анализатор Hd-1200E дает возможность проводить полный анализ гидролизатов аминокислот за 2—3 ч. При круглосуточной работе прибора на нем можно провести 8—10 анализов. Для разделения аминокислот используют сульфополистирольные катионообменники хромекс КГ-53, КВ-51 или КВ-52. При анализе на малой колонке размером 5,3×140 мм идет разделение основных аминокислот, а на большой колонке размером 6,8×560 мм — кислых и нейтральных аминокислот. Для этого через малую колонку после нанесения смеси аминокислот сразу пропускают Na-цитратный буфер с рН 5,28, в результате чего происходит быстрое элюирование с колонки почти одновременно всех кислых и нейтральных кислот одной сложной зоной, причем вся эта смесь аминокислот сливается через клапан сброса. После этого малая колонка подключается к фото-

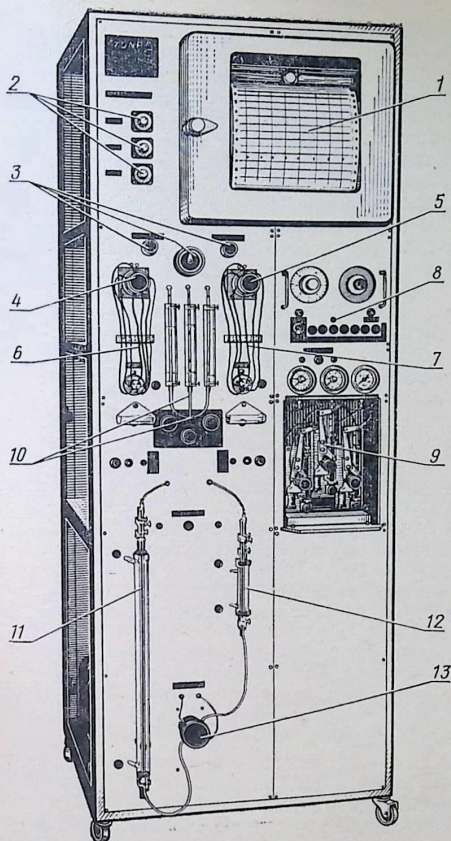


Рис. 21. Внешний вид автоматического анализатора аминокислот Hd-1200E:

1 — самописец; 2 — потенциометры для установки базовых линий самописца; 3 — клапаны пробоотборного устройства; 4 и 5 — переключатели пробоотборного устройства; 6 и 7 — пипетки отбора проб; 8 — сигнальная лампочка питания; 9 — блок насосов; 10 — расходомеры насосов; 11 — большая хроматографическая колонка; 12 — малая хроматографическая колонка; 13 — переключатель колонок на фотометр.

метру и определяют содержание в гидролизате лизина, гистидина, аммиака и аргинина. Большая колонка в это время регенерируется и стабилизируется. После подготовки колонки к анализу она подключается к фотометру и через нее последовательно пропускаются буферные растворы с рН 3,25; 4,25 и 5,28, в результате чего количественно определяют содержание в гидролизате кислых и нейтральных аминокислот. В это время готовят к анализу малую колонку. Ускорение анализа при работе на двух колонках достигается главным образом за счет того, что регенерация одной колонки в процессе работы идет в то время, когда на другой колонке происходит хроматография. Хроматограмма аминокислот на аминокислотном анализаторе Hd-1200E представлена на рисунке 22. На хроматограмме показана последовательность смены буферных растворов с различными значениями рН в процессе анализа и последовательность выхода аминокислот.

Автоматический анализатор Hd-1200E прост в эксплуатации. Подача анализируемых проб, регенерация и стабилизация колонок, а также элюирование аминокислот, их окрашивание и запись на ленте самописца осуществляются автоматически. Все условия анализа — температурный режим, скорость элюирования, последовательность смены буферных растворов при работе анализатора — остаются постоянными, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. Точность определения аминокислот на этом анализаторе обычно составляет $\pm 2-3\%$.

Ход анализа. Навеску хорошо очищенного препарата белка (10—50 мг) гидролизуют 6 н. HCl, как указано выше (см. стр. 89). После окончания гидролиза белков и удаления соляной кислоты сухой остаток растворяют в 2—4 мл свежеприготовленного 0,2 М цитратного буфера (рН 2,2). Для приготовления этого буфера 21,008 г лимонной кислоты $\cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 300—400 мл дистиллированной воды, прибавляют туда 8,3 г NaOH и 16 мл 37%-ной HCl (соляную кислоту необходимо перенести в стеклянной колбе). Объем раствора доводят водой в мерной колбе до 1 л. После приготовления буфера для консервации и предотвращения развития микроорганизмов в раствор добавляют 0,1 мл каприловой кислоты или 1 г фенола. Для лучшего смачивания ионообменника в хроматографической колонке в буфер добав-

ляют 25%-ный полиоксиэтиленлауриновый спирт (Брий-35). Его предварительно растворяют в горячей воде и приливают в количестве 1 мл на 1 л буфера. Следует подчеркнуть, что вода, буферы и все растворы, используемые при хроматографическом определении аминокислот, не должны содержать даже следов аммиака. Для проверки отсутствия аммиака в реактивах и буферных растворах во всех случаях необходимо проводить пробу с реактивом Несслера.

После растворения буферный раствор гидролизата белков фильтруют в маленькие сухие пробирки, плотно закрывают и помещают в холодильник. Хранить гидролизаты в холодильнике в замороженном состоянии можно в течение 1—2 недель. Для более длительного хранения гидролизаты предварительно стерилизуют в автоклаве 10—15 мин.

Перед хроматографическим разделением опытных образцов для получения стандартной хроматограммы проводят анализ стандартной смеси аминокислот. Стандартную смесь аминокислот готовят таким образом, чтобы в 1 л раствора содержание каждой аминокислоты составляло 1 миллимоль. Для приготовления такого раствора навеску каждой аминокислоты (в мг) берут в количестве, численно равном ее молекулярной массе. Кроме этого, в таком же количестве берут навеску хлористого аммония для получения стандартного пика аммиака. Аммиак в гидролизате образуется в результате распада амидов, содержащихся в белках. Приготовление стандартного раствора аминокислот следует проводить в соответствии с данными таблицы 6. Для хроматографического разделения аминокислот необходимы буферные растворы (рН 3,25; 4,25; 5,28), нингидриновый реактив и раствор NaOH. Способы приготовления их описаны ниже.

0,2 н. Na - цитратный буфер рН $3,25 \pm 0,01$. В 2 л бидистиллированной воды, полученной в помещении, не загрязненном аммиаком, растворяют 210 г лимонной кислоты $\cdot \text{H}_2\text{O}$, добавляют 82,5 г NaOH и 106 мл 37%-ной HCl и доводят объем раствора почти до 10 л. Соляную кислоту необходимо предварительно перегнать. Затем в буферный раствор для консервации добавляют 10 г кристаллического фенола или 1 мл каприловой кислоты, а для лучшего смачивания смолы — 40 мл 25%-ного раствора Брий-35. Раствор Брий-35 готовят путем растворе-

ния его в количестве 50 г в 200 мл горячей воды. После этого объем буферного раствора доводят водой точно до 10 л.

Т а б л и ц а 6

Стандартный раствор аминокислот

Аминокислота	Молекулярная масса	% N	В 1 мл раствора содержится	
			мг аминокислоты	мг N
Лизин	146,13	19,17	0,14613	0,02801
Гистидин	155,19	27,10	0,15519	0,04206
Аргинин	174,24	32,18	0,17424	0,05604
Аспарагиновая кислота	133,12	10,53	0,13312	0,01402
Треонин	119,12	11,75	0,11912	0,01400
Серин	105,09	13,33	0,10509	0,01401
Глутаминовая кислота	147,12	9,52	0,14712	0,01401
Пролин	115,12	12,17	0,11512	0,01401
Глицин	75,05	18,67	0,07505	0,01401
Аланин	89,12	15,73	0,08912	0,01402
Цистеин	121,15	11,56	0,12115	0,01389
Валин	117,09	11,96	0,11709	0,01401
Метионин	149,20	9,39	0,14920	0,01401
Изолейцин	131,20	10,60	0,13120	0,01401
Лейцин	131,20	10,60	0,13120	0,01401
Тирозин	181,19	7,74	0,18119	0,01403
Фенилаланин	165,19	8,48	0,16519	0,01403
Хлористый аммоний	53,49	25,16	0,53449	0,01401

0,2 н. На-цитратный буфер pH $4,25 \pm 0,02$. Растворяют 210 г лимонной кислоты $\cdot \text{H}_2\text{O}$ в 2 л бидистиллированной воды, добавляют 82,5 г NaOH, 47 мл 37%-ной перегнанной HCl и доводят объем раствора почти до 10 л. Затем в раствор добавляют 10 г фенола или 1 мл каприловой кислоты, 40 мл раствора Брий-35 и объем доводят до 10 л.

0,35 н. На-цитратный буфер pH $5,28 \pm 0,02$. В 2 л бидистиллированной воды растворяют 246 г лимонной кислоты, затем 144 г NaOH, добавляют 68 мл 37%-ной перегнанной HCl и доводят водой почти до 10 л. В раствор добавляют 10 г фенола или 1 мл каприловой кислоты, 40 мл Брий-35 и доводят до 10 л.

4 н. ацетатный буфер pH $5,5 \pm 0,03$. Этот буферный раствор необходим для приготовления нингидринового реактива. 328 г безводного CH_3COONa растворяют в 600 мл бидистиллированной воды; для лучше-

го растворения содержимое колбы нагревают до 50—60°C. После охлаждения до комнатной температуры добавляют 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до 1 л.

Все буферные растворы необходимо готовить очень тщательно. Лимонная кислота и ацетат натрия используются только химически чистые. Растворы не должны содержать даже следов аммиака (провести пробу с реактивом Несслера). Величины рН буферных растворов устанавливают очень точно на высокочувствительном потенциометре; рН доводят до нужного значения путем добавления в буфер небольшого количества кислоты или щелочи (в случае ацетатного буфера — ацетата натрия).

Нингидриновый реактив. 40 г нингидрина растворяют в 1500 мл свободного от перекисей метилцеллосольва. Если раствор мутноватый, его фильтруют через стеклянный фильтр-тигель № 1. После этого в раствор добавляют 500 мл 4 н. ацетатного буфера рН 5,5 и 760 мг хлористого олова. Раствор должен быть красно-коричневого цвета. Другого цвета раствор для анализов использовать нельзя. Через 24 ч нингидриновый реактив готов к употреблению. Хранить его необходимо в темной склянке.

Для очистки метилцеллосольва от перекиси настаивают его с твердой щелочью при периодическом встряхивании. Затем перегоняют с небольшим количеством сернокислого железа. Для анализов используют фракцию, кипящую при 115—125°C. Перед употреблением метилцеллосольв проверяют на отсутствие перекисей 10%-ным раствором йодистого калия. Для этого 10 г КJ растворяют в 100 мл 1 н. HCl. Берут две пробирки и в одну из них наливают 2 мл воды, а в другую — 2 мл метилцеллосольва. Затем в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора КJ и пробирки нагревают на водяной бане 1 мин при 100°C. Вода в пробирке окрашивается в светло-коричневый цвет, и если метилцеллосольв имеет такую же окраску, он пригоден для анализов.

0,2 н. раствор NaOH. В 2 л бидистиллированной воды растворяют 41 г едкого натра, прибавляют 5 г фенола или 0,5 мл каприловой кислоты и 20 мл раствора Брай-35. Объем доводят водой до 5 л.

После приготовления всех буферных растворов и нингидринового реактива колонки аминоканализатора заполняют ионообменником и стабилизируют их Na-цит-

ратным буфером рН 3,25. Затем устанавливают программу, вносят 0,1 мл стандартного раствора аминокислот, включают программное устройство и пускают прибор. После окончания анализа получают хроматограмму, аналогичную изображенной на рисунке 22.

Хроматографирование опытных растворов гидролизатов белков проводят в таких же условиях, как и стандартных растворов аминокислот. Если все условия анализов сохраняются постоянными, то и последовательность выхода аминокислот с колонок остается одной и той же.

Для хроматографического разделения опытных гидролизатов белков вносят такой объем раствора, который бы соответствовал 0,2—0,4 мг белка. Например, если для гидролиза было взято 10 мг белка и гидролизат был растворен в 5 мл цитратного буфера, то в каждом миллилитре такого раствора будет содержаться 2 мг белка. Очевидно, что в этом случае для хроматографического анализа следует взять 0,1—0,2 мл раствора, что соответствует 0,2—0,4 мг белка.

Вычисление результатов. Оптическая плотность окрашенных комплексов аминокислот с нингидрином записывается самописцем аминокислотного анализатора на диаграммной бумаге с логарифмической или линейной шкалой в виде отдельных пиков. Эти пики на бумаге обозначаются самописцем в виде точек и кружков, причем через каждые три точки самописец отмечает кружок (рис. 23). Величина площади каждого пика на диаграмме пропорциональна концентрации соответствующей аминокислоты в анализируемом растворе. Для количественного определения каждой аминокислоты прежде всего рассчитывают площадь пика, соответствующего данной аминокислоте. Расчет ведется с помощью специальной логарифмической линейки, прилагаемой к анализатору.

Для расчета площадей пиков вначале проводят основные (базовые) линии под пиками, соответствующими каждой группе аминокислот. Обычно проводят следующие базовые линии:

- 1) для основных аминокислот, выходящих с малой колонки, — лизина, гистидина, аммиака и аргинина;
- 2) для кислых аминокислот большой колонки, элюируемых буфером рН 3,25 — аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, цист(e)ина;

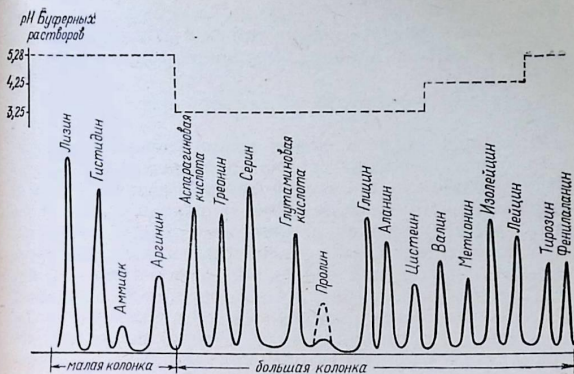


Рис. 22. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот на аминокислотном анализаторе Hd-1200E.

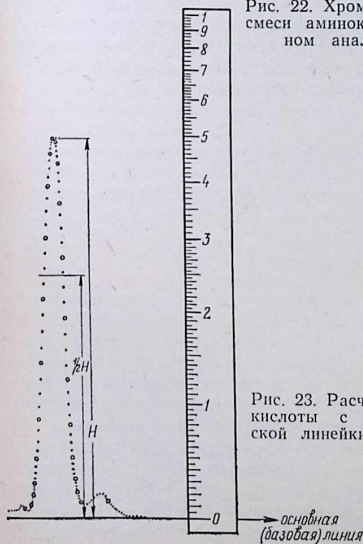


Рис. 23. Расчет площади пика аминокислоты с помощью логарифмической линейки (пояснения в тексте).

ратным буфером рН 3,25. Затем устанавливают программу, вносят 0,1 мл стандартного раствора аминокислот, включают программное устройство и пускают прибор. После окончания анализа получают хроматограмму, аналогичную изображенной на рисунке 22.

Хроматографирование опытных растворов гидролизатов белков проводят в таких же условиях, как и стандартных растворов аминокислот. Если все условия анализов сохраняются постоянными, то и последовательность выхода аминокислот с колонок остается одной и той же.

Для хроматографического разделения опытных гидролизатов белков вносят такой объем раствора, который бы соответствовал 0,2—0,4 мг белка. Например, если для гидролиза было взято 10 мг белка и гидролизат был растворен в 5 мл цитратного буфера, то в каждом миллилитре такого раствора будет содержаться 2 мг белка. Очевидно, что в этом случае для хроматографического анализа следует взять 0,1—0,2 мл раствора, что соответствует 0,2—0,4 мг белка.

Вычисление результатов. Оптическая плотность окрашенных комплексов аминокислот с нингидрином записывается самописцем аминоксизатора на диаграммной бумаге с логарифмической или линейной шкалой в виде отдельных пиков. Эти пики на бумаге обозначаются самописцем в виде точек и кружков, причем через каждые три точки самописец отмечает кружок (рис. 23). Величина площади каждого пика на диаграмме пропорциональна концентрации соответствующей аминокислоты в анализируемом растворе. Для количественного определения каждой аминокислоты прежде всего рассчитывают площадь пика, соответствующего данной аминокислоте. Расчет ведется с помощью специальной логарифмической линейки, прилагаемой к анализатору.

Для расчета площадей пиков вначале проводят основные (базовые) линии под пиками, соответствующими каждой группе аминокислот. Обычно проводят следующие базовые линии:

- 1) для основных аминокислот, выходящих с малой колонки, — лизина, гистидина, аммиака и аргинина;
- 2) для кислых аминокислот большой колонки, элюируемых буфером рН 3,25 — аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, цист(e)ина;

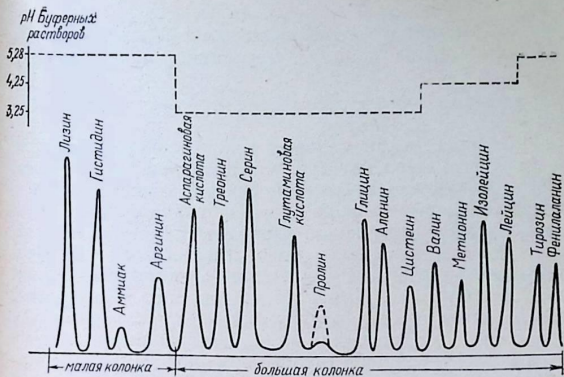


Рис. 22. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот на аминокислотном анализаторе Hd-1200E.

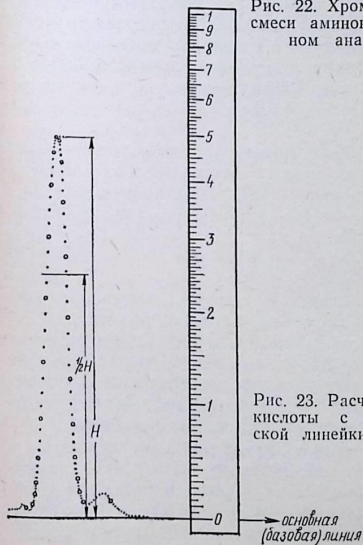


Рис. 23. Расчет площади пика аминокислоты с помощью логарифмической линейки (пояснения в тексте).

- 3) для пролина;
- 4) для аминокислот, элюируемых с большой колонки буфером рН 4,25,—валина, метионина, изолейцина и лейцина;
- 5) для аминокислот, элюируемых буфером рН 5,28,—тирозина и фенилаланина.

После проведения базовых линий логарифмическую линейку устанавливают так, чтобы нулевое деление на линейке совпадало с базовой линией данного пика, а верхняя ее часть проходила через вершину пика. При таком положении линейки проводят отсчет логарифмической высоты пика H и половины его высоты $1/2H$. Подсчитав кружки над половиной высоты пика, определяют ширину пика. Для расчета ширины W над линией, соответствующей половине высоты, считают общее количество кружков, затем из общего количества кружков вычитают единицу (чтобы получить общее количество промежутков между кружками). Остаток умножают на четыре, прибавляют количество точек, находящихся вверху от линии, обозначающей $1/2H$ до первых кружков, и к этому числу прибавляют относительное расстояние вверх от линии, обозначающей $1/2H$ до первой точки. Площадь пика определяют по формуле:

$$S = 1/2 H \times W.$$

На рисунке 23 показан пример вычисления площади пика. Логарифмическая высота этого пика $H = 0,494$, а половина высоты $1/2H = 0,247$. Расчеты показывают, что ширина этого пика $W = (8-1) \times 4 + 3 + 0,6 = 31,6$. Отсюда площадь пика равна:

$$S = 0,247 \times 31,6 = 7,81.$$

При анализах стандартной смеси аминокислот площадь пика аминокислоты на хроматограмме или $S_{ст}$ соответствует определенной концентрации этой аминокислоты в растворе, взятом для хроматографирования (см. табл. 6). Часто содержание аминокислот в белках выражают в количестве азота каждой аминокислоты в процентах от общего содержания азота в белке.

Для определения содержания N аминокислоты в процентах от N белка необходимо выполнить следующие расчеты. Прежде всего надо узнать S стандартного и S опытного растворов. Затем по таблице 6 находят, какое количество N содержится в стандартном раство-

ре данной аминокислоты (B мг N). После этого вычисляют содержание азота в аминокислоте, которая находится в опытном растворе (B мг N):

$$B_{\text{мгN}} = \frac{S_{\text{оп}} \cdot B}{S_{\text{ст}}},$$

где $S_{\text{оп}}$ — площадь пика опытного раствора;

$S_{\text{ст}}$ — площадь пика стандартного раствора.

Затем находят количество мг азота аминокислоты во всей навеске белка. Для этого полученный выше результат умножают на разведение κ , которое проводили после гидролиза. После этого вычисляют количество азота данной аминокислоты в 100 мг белка по следующей формуле:

$$E = \frac{B \times \kappa \times 100}{n},$$

где E — мг N аминокислоты в 100 мг белка;

B — мг N данной аминокислоты в опытном растворе;

κ — разбавление;

n — навеска белка.

Зная, сколько азота содержится в анализируемом белке ($ж$, мг), можно вычислить процентное содержание данной аминокислоты ($A\%$) от азота белка.

$$A\% = \frac{E \cdot 100}{ж}.$$

Общая формула для вычисления содержания азота данной аминокислоты в процентах от общего содержания азота в белке имеет следующий вид:

$$A\% = \frac{S_{\text{оп}} \cdot B \cdot \kappa \cdot 100 \cdot 100}{S_{\text{ст}} \cdot n \cdot ж},$$

где $S_{\text{оп}}$ — площадь пика данной аминокислоты на хроматограмме при анализе опытного раствора;

$S_{\text{ст}}$ — площадь пика соответствующей аминокислоты на хроматограмме при анализе стандартного раствора;

B — мг N данной аминокислоты в стандартном растворе;

κ — разбавление;

n — навеска белка, взятая для гидролиза, мг;

$ж$ — содержание N в анализируемом белке, %.

При определениях аминокислотного состава результаты анализов можно также выражать в г аминокислот на 100 г белка, в микромолях аминокислот, в мг на 100 г зерна, в процентах от суммы аминокислот и т. д.

Оборудование и реактивы: 1) аминокислотный анализатор, термостат с терморегулятором, потенциометр, стеклянные ампулы для гидролиза, приборы для перегонки соляной кислоты и метилцелло-сольва, бутылки емкостью до 10 л для приготовления растворов, колбы мерные емкостью 100, 200, 500 мл и 1 л, пробирки градуированные, пипетки и микропипетки, стаканы;

2) нингидрин, метилцелло-сольв, хлористое олово, йодистый калий, HCl 1 н. и концентрированная, NaOH, лимонная кислота, уксуснокислый натрий, уксусная кислота (ледяная), реактив Несслера, фенол, каприловая кислота, полиоксиэтиленлауриновый спирт (Брий-35), хлористый аммоний, сернокислое железо, набор аминокислот для приготовления стандартных растворов.

ВЫСУШИВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ЛИОФИЛИЗАЦИЕЙ

Метод лиофильной сушки (лиофилизация) в настоящее время нашел широкое применение для высушивания биохимических материалов. Высушивание биохимических материалов путем быстрого их замораживания жидким азотом или твердой углекислотой и последующего высушивания в замороженном состоянии (удаление влаги сублимацией под вакуумом) имеет ряд преимуществ перед другими видами фиксации, так как при этом удается хорошо сохранить биологические, химические и физические свойства исследуемых веществ. Даже очень лабильные белки, такие, как яичный альбумин, при высушивании этим способом не обнаруживают никаких признаков денатурации. Степень денатурации белков зависит от температуры, и успех высушивания в замороженном состоянии определяет низкая температура.

Принцип метода. Вода закипает при 100°C, если атмосферное давление равно 760 мм ртутного столба. При уменьшении давления точка кипения воды будет понижаться, и если его снизить до 4 мм ртутного столба, что ниже упругости паров воды при 0°C, то высушивание будет происходить в замороженном состоянии. Принцип метода лиофильной сушки состоит в том, что вода удаляется из того или иного замороженного материала путем превращения льда в пар, минуя жидкую фазу. Таким образом, лед исчезает из замороженного материала.

ла без повреждения белковых молекул. В связи с тем, что работу, проводят в глубоком вакууме, окисления веществ кислородом воздуха не происходит. В процессе высушивания образуются мелкокристаллические продукты, которые из-за очень большой поверхности легко растворяются. Например, если лиофилизируют белки, то они затем растворяются в течение нескольких секунд.

Ход определения. Прибор для лиофильной сушки изготавливают из стекла (рис. 24).

Перед высушиванием растительный материал фиксируют жидким азотом. Высушивают раствор, колбу с раствором погружают в смесь этилового спирта или ацетона с твердой углекислотой.

Материал помещают в колбу 2, которая затем при помощи шлифа на вакуумной смазке присоединяется к переходнику 1. Переходник 1 вставляется в конденсор 3 так, чтобы отверстие его совпало с отводной трубкой конденсора, соединяющейся с насосом. Содержимое колбы быстро замораживают, так как свойства конечного сухого материала заметно меняются в зависимости от скорости замораживания. Материал на дне колбы располагают тонким слоем, обеспечивающим большую поверхность испарения. После этого при помощи вакуумного насоса в приборе создают вакуум (5×10^{-2} мм ртутного столба). Затем поворотом переходника перекрывают отверстие и тем самым прекращают выход воздуха из прибора. Если в вакуумную систему введена холодная поверхность, температура которой ниже температуры высушивания, водяной пар, выделяемый вы-

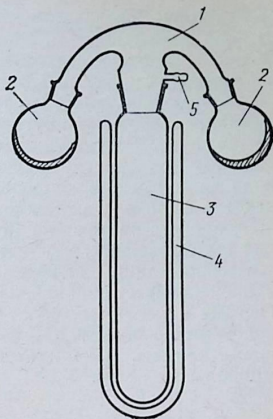


Рис. 24. Схема прибора для высушивания биологических материалов методом лиофилизации:

1 — переходник; 2 — колбы для высушиваемого материала; 3 — конденсор; 4 — сосуд Дьюара; 5 — отводная трубка для соединения с вакуумным насосом.

Сушиваемым материалом, будет конденсироваться в виде льда в конденсоре 3. Конденсор 3 погружают в сосуд Дьюара с жидким азотом или смесью спирта (ацетона) с твердой углекислотой. Если процесс высушивания идет нормально, то содержимое колбы 2 до конца высушивания не должно оттаять, поскольку с погружением конденсора 3 в охлаждающую смесь в силу большой разницы температур начинается интенсивная возгонка льда из колбы 2 и конденсация его в конденсоре. Это ведет к сильному охлаждению содержимого колбы 2, хотя процесс протекает при комнатной температуре. Конец высушивания наступает тогда, когда колба 2 снаружи освобождается от корки льда, образовавшейся на ней в процессе высушивания. По окончании высушивания в систему впускают воздух. Полученный сухой материал содержит не более 0,5% влаги и его можно длительное время хранить (в эксикаторе), не опасаясь разрушения микроорганизмами.

УГЛЕВОДЫ

Углеводы — главная составная часть растений. В большинстве сельскохозяйственных растений количество углеводов достигает 80—90% сухого вещества. В отдельных органах и тканях растений содержатся разные углеводы: в плодах и овощах моносахариды и сахароза, в семенах злаков и бобовых культур, а также в клубнях картофеля — крахмал, в древесине и соломе — целлюлозы, гемицеллюлозы, пентозаны.

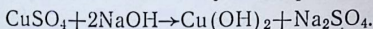
В плодах, ягодах и овощах преобладают растворимые углеводы, причем их состав у различных групп этих культур довольно резко различается. Например, в сахарной и столовой свекле, моркови и других корнеплодах преобладает сахароза, в томатах, огурцах, капусте — моносахариды, в арбузах и грушах — фруктоза. В ягодах (винограде, смородине, крыжовнике) почти нет сахарозы. Сладость разных растворимых сахаров различна. Например, если степень сладости сахарозы принять за 1, то сладость глюкозы будет равна 0,7, а фруктозы 1,5. Поэтому в зависимости от содержания и состава сахаров вкусовые качества плодов, ягод и овощей существенно различаются.

Для определения содержания и состава углеводов в растениях разработаны достаточно точные методы.

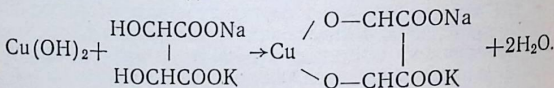
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДУЦИРУЮЩИХ САХАРОВ

Большинство химических методов определения редуцирующих сахаров основано на легкой их окисляемости и способности восстанавливать различные соединения. Восстанавливающими свойствами могут обладать и некоторые другие вещества в растительных вытяжках, поэтому необходимо возможно полно удалить их. Одним из наиболее распространенных методов определения редуцирующих сахаров является метод Бертрана.

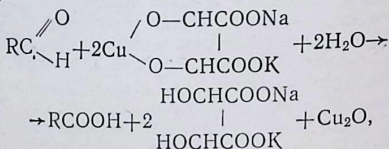
Принцип метода. Для анализа используют феллингову жидкость (смесь медного купороса с сегнетовой солью в щелочной среде). При смешивании медного купороса со щелочью идет следующая реакция:



В присутствии сегнетовой соли в щелочной среде гидрат окиси меди в осадок не выпадает, так как образуется комплексное соединение:



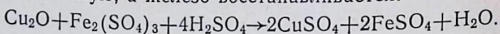
Феллингова жидкость окисляет альдегидные и кетонные группы. При взаимодействии раствора сахара с феллинговой жидкостью сахар окисляется и образуется закись меди:



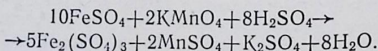
где $\text{RC} \begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \backslash \text{H} \end{array}$ — моносахарид;

RCOOH — кислота, образовавшаяся в результате окисления моносахарида.

По количеству образовавшейся закиси меди можно судить о содержании сахара в растворе. Количество закиси меди обычно определяют объемным методом. Для этого на закись меди действуют сернокислым окисным железом или железоаммиачными квасцами в кислом растворе. В результате реакции закисная медь переходит в окисную, а железо восстанавливается:



Количество образовавшегося двухвалентного железа определяют окислением его перманганатом в кислой среде:



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

Ход определения. Для определения сахаров, как и для большинства других биохимических анализов, используют свежий растительный материал. Если материал необходимо фиксировать, его замораживают жидким азотом или твердой углекислотой, а затем высушивают лиофилизацией (см. стр. 106). Удовлетворительные результаты дает также фиксация материала кипящим 96%-ным спиртом.

Фиксацию проб при высокой температуре в термостате или аппарате Коха нельзя считать удовлетворительной. В этих случаях при повышении температуры в начале высушивания происходит частичное ферментативное расщепление дисахаридов, полисахаридов, а также фосфорных эфиров сахаров. Последующее выдерживание материала при высокой температуре ведет к частичному разрушению фруктозы.

Навеску хорошо измельченного растительного материала, содержащего 10—200 мг сахаров, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют 70—80 мл горячей воды и для экстракции сахаров выдерживают колбу в течение 1 ч на водяной бане при температуре 80—90°C, периодически взбалтывая. После экстракции колбу охлаждают. Для осаждения белков и других примесей добавляют 5 мл 10%-ного раствора уксуснокислого свинца, перемешивают и доводят водой до метки. После этого жидкость фильтруют через фильтр в сухой стакан или колбу. Берут 50 мл фильтрата, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и добавляют 3—5 мл насыщенного раствора сульфата натрия для удаления избытка свинца. Раствор в колбе перемешивают и доводят водой до метки. После отстаивания раствор отфильтровывают. Фильтрат служит для определения сахаров.

Для определения редуцирующих сахаров 10 мл раствора вливают в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляют 10 мл 4%-ного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 10 мл щелочного раствора сегнетовой соли (200 г сегнетовой соли и 150 г NaOH растворяют в воде, раствор переносят в мерную колбу емкостью 1 л и доводят водой до метки). Колбу нагревают до кипения и кипятят ровно 3 мин. В результате взаимодействия редуцирующих са-

харов с феллинговой жидкостью выпадает красный осадок закиси меди. После отстаивания синюю жидкость при отсасывании фильтруют в колбу Бунзена через трубку Аллина с асбестовым фильтром. Колбу и фильтр промывают несколько раз горячей водой. Закончив промывание, трубку Аллина отсоединяют и колбу Бунзена тщательно ополаскивают, после чего трубку Аллина снова присоединяют к колбе. Затем осадок закиси меди растворяют, для чего в колбу и трубку Аллина приливают из пипетки 5 мл кислого раствора железоаммиачных квасцов: 86 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ и 200 г (108,7 мл) H_2SO_4 (плотность 1,84) растворяют в 1 л воды.

Вместо квасцов можно взять раствор сернокислого окисного железа, который готовят растворением в 1 л воды 50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ и 200 г H_2SO_4 (плотность 1,84).

После растворения осадка, что достигается осторожным перемешиванием его стеклянной палочкой, в колбу добавляют еще 5 мл раствора окисного железа, ополаскивают колбу, переносят раствор в трубку Аллина и раствор отфильтровывают. Затем колбу, где был осадок, и трубку Аллина споласкивают несколькими небольшими порциями горячей воды. Промывные воды собирают в колбу Бунзена.

При растворении и промывании осадка над ним все время должен находиться слой жидкости, чтобы закись меди не окислялась.

По окончании промывания трубку Аллина отсоединяют и теплый раствор титруют из микробюретки 0,01 н. раствором перманганата до слабого порозовения, не исчезающего в течение 20—30 с.

В связи с тем, что некоторые реактивы бывают недостаточно чистыми, необходимо проделать контрольное определение, для чего вместо изучаемого раствора сахаров берут 10 мл воды.

Вычисление результатов. Из приведенных выше уравнений следует, что два атома меди соответствуют двум атомам железа, а так как 10 атомов железа отвечают двум молекулам KMnO_4 , то 10 атомов меди также будут соответствовать двум молекулам KMnO_4 . Таким образом 10 атомов Cu (635,4 мг) отвечают двум молекулам KMnO_4 (316,08 мг). Отсюда 1 мг KMnO_4 соответствует 2,01 мг меди или 1 мл точно 0,01 н. раствора перманганата отвечает 0,636 мг меди.

Таблица 7

Пересчет количества меди на глюкозу при определении
редуцирующих сахаров методом Бертрана (в миллиграммах)

Меди	Глю- козы	Меди	Глю- козы	Меди	Глюкозы	Меди	Глюкозы
1,1	0,50	5,7	2,60	10,3	4,90	14,9	7,20
1,2	0,54	5,8	2,65	10,4	4,95	15,0	7,25
1,3	0,59	5,9	2,70	10,5	5,00	15,1	7,30
1,4	0,63	6,0	2,75	10,6	5,05	15,2	7,35
1,5	0,68	6,1	2,80	10,7	5,10	15,3	7,40
1,6	0,72	6,2	2,85	10,8	5,15	15,4	7,45
1,7	0,77	6,3	2,90	10,9	5,20	15,5	7,50
1,8	0,81	6,4	2,95	11,0	5,25	15,6	7,55
1,9	0,83	6,5	3,00	11,1	5,30	15,7	7,60
2,0	0,90	6,6	3,05	11,2	5,35	15,8	7,65
2,1	0,95	6,7	3,10	11,3	5,40	15,9	7,70
2,2	1,00	6,8	3,15	11,4	5,45	16,0	7,75
2,3	1,04	6,9	3,20	11,5	5,50	16,1	7,80
2,4	1,09	7,0	3,25	11,6	5,55	16,2	7,85
2,5	1,13	7,1	3,30	11,7	5,60	16,3	7,90
2,6	1,18	7,2	3,35	11,8	5,65	16,4	7,95
2,7	1,22	7,3	3,40	11,9	5,70	16,5	8,00
2,8	1,27	7,4	3,45	12,0	5,75	16,6	8,05
2,9	1,31	7,5	3,50	12,1	5,80	16,7	8,10
3,0	1,36	7,6	3,55	12,2	5,85	16,8	8,15
3,1	1,40	7,7	3,60	12,3	5,90	16,9	8,20
3,2	1,45	7,8	3,65	12,4	5,95	17,0	8,25
3,3	1,50	7,9	3,70	12,5	6,00	17,1	8,30
3,4	1,54	8,0	3,75	12,6	6,05	17,2	8,35
3,5	1,59	8,1	3,80	12,7	6,10	17,3	8,40
3,6	1,63	8,2	3,85	12,8	6,15	17,4	8,45
3,7	1,68	8,3	3,90	12,9	6,20	17,5	8,50
3,8	1,72	8,4	3,95	13,0	6,25	17,6	8,55
3,9	1,77	8,5	4,00	13,1	6,30	17,7	8,60
4,0	1,81	8,6	4,05	13,2	6,35	17,8	8,65
4,1	1,83	8,7	4,10	13,3	6,40	17,9	8,70
4,2	1,90	8,8	4,15	13,4	6,45	18,0	8,75
4,3	1,95	8,9	4,20	13,5	6,50	18,1	8,80
4,4	2,00	9,0	4,25	13,6	6,55	18,2	8,85
4,5	2,04	9,1	4,30	13,7	6,60	18,3	8,90
4,6	2,09	9,2	4,35	13,8	6,65	18,4	8,95
4,7	2,13	9,3	4,40	13,9	6,70	18,5	9,00
4,8	2,18	9,4	4,45	14,0	6,75	18,6	9,05
4,9	2,22	9,5	4,50	14,1	6,80	18,7	9,10
5,0	2,27	9,6	4,55	14,2	6,85	18,8	9,15
5,1	2,31	9,7	4,60	14,3	6,90	18,9	9,20
5,2	2,36	9,8	4,65	14,4	6,95	19,0	9,25
5,3	2,40	9,9	4,70	14,5	7,00	19,1	9,30
5,4	2,45	10,0	4,75	14,6	7,05	19,2	9,35
5,5	2,50	10,1	4,80	14,7	7,10	19,3	9,40
5,6	2,55	10,2	4,85	14,8	7,15	19,4	9,45

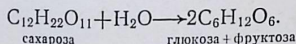
При расчетах содержания сахара в объеме раствора, взятого для анализа, число миллилитров 0,01 н. раствора перманганата, затраченного на титрование (за вычетом объема перманганата, израсходованного на контрольное определение), умножают на 0,636 и по количеству меди в таблице находят содержание глюкозы (табл. 7). Полученную массу сахара пересчитывают на массу сухого материала, взятого для анализа.

Оборудование и реактивы: 1) водяная баня, микробюретки, колба Бунзена, трубка Аллина, колбы мерные емкостью 100 мл и 1 л, колбы конические емкостью 100 мл, воронки, фильтры;

2) CuSO_4 4%-ный раствор, щелочной раствор сегнетовой соли, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, H_2SO_4 концентрированная, 0,01 н. KMnO_4 , Na_2SO_4 насыщенный раствор, уксуснокислый свинец 10%-ный раствор.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЗЫ

Сахароза не восстанавливает феллингову жидкость. Для определения по методу Бертрана сахарозу необходимо предварительно гидролизовать. Гидролиз проводится под действием кислоты и идет по следующей схеме:



Ход определения. Берут 25 мл раствора, освобожденного от белков и приготовленного для анализа редуцирующих сахаров, и переносят в мерную колбу емкостью 50 мл. Во вторую колбу емкостью 50 мл наливают 25 мл воды и опускают в нее термометр. Обе колбы помещают в водяную баню с температурой около 80°C. Когда температура в контрольной колбе достигнет 67—70°C, в колбу с анализируемым раствором прибавляют 1,5 мл HCl (плотность 1,19). При этом концентрация кислоты в колбе будет равна 2%. Гидролиз проводится в течение 6 мин при температуре 67—70°C.

По окончании гидролиза колбу с исследуемым раствором быстро охлаждают под краном и добавляют несколько капель метилового красного. Затем раствор в колбе нейтрализуют 4%-ным раствором NaOH . Щелочь приливают осторожно, по каплям, до перехода красной окраски индикатора в золотисто-желтую. После нейтрализации раствор в колбе доводят дистиллированной водой до метки и определяют содержание сахаров методом Бертрана. Результат представляет собой сумму

сахаров (редуцирующие сахара+сахароза). Для вычисления содержания сахарозы из суммарного количества сахаров вычитают содержание редуцирующих сахаров. В связи с тем, что при гидролизе сахарозы (молекулярная масса 342) образуются две молекулы гексоз (молекулярная масса $180 \times 2 = 360$), полученный результат содержания сахарозы умножают на 0,95 ($342 : 360 = 0,95$).

При вычислении результатов учитывают, что для определения суммы сахаров раствор был разбавлен в два раза (25 мл раствора доведено в колбе до 50 мл).

Оборудование и реактивы. Кроме оборудования и реактивов, указанных для определения редуцирующих сахаров, необходимо следующее: 1) колбы мерные емкостью 50 мл, термометр;

2) NaOH 4%-ный, HCl (плотность 1,19), метиловый красный.

УСКОРЕННЫЙ ПОЛУМИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ САХАРОВ

Для определения суммарного количества всех растворимых сахаров удобно использовать полумикрометод, предложенный Дюбойсом с сотрудниками.

Принцип метода. Растворимые сахара извлекают 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 при строго определенных условиях проведения анализа пропорциональна содержанию сахаров в растворе. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре. Метод отличается высокой чувствительностью и дает возможность определить до 10 мкг сахаров.

Ход определения. 1—2 г хорошо измельченного свежего растительного материала, содержащего 5—50 мг сахаров, взвешивают на аналитических весах, переносят в стакан или коническую колбу емкостью 50—100 мл и заливают 10 мл 96%-ного спирта. Если используют сухой растительный материал, навеску уменьшают. После этого колбы или стаканы помещают на водяную баню и содержимое их трижды доводят до кипения при помешивании стеклянной палочкой. Затем охлаждают и после осаждения растительного материала фильтруют через беззольный фильтр в фарфоровую чашку емкостью

50 мл. При фильтровании необходимо сливать лишь верхний прозрачный спиртовой раствор и избегать перенесения осадка на фильтр.

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

Спирт из фарфоровых чашек удаляют выпариванием при комнатной температуре или на слабо нагретой (до 35—40°C) водяной бане. Желательно использовать при этом 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 емкостью 50 мл. Чашку несколько раз ополаскивают небольшими порциями воды, сливают воду в мерную колбу, доводят водой до метки, закрывают пробкой, тщательно перемешивают и, если появляется небольшой осадок, дают ему отстояться. Затем проводят 10-кратное разбавление полученного раствора. Для этого 5 мл прозрачного раствора переносят в другую колбу емкостью 50 мл, доводят колбу водой до метки и содержимое перемешивают. При большом количестве сахаров проводят 20-кратное разбавление (5 мл разбавляют в колбе до 100 мл). При подготовке образцов для колориметрирования 1 мл раствора, содержащего от 10 до 70 мкг сахаров переносят в широкую пробирку диаметром 16—20 мм и добавляют 1 мл 5%-ного водного раствора фенола (50 г свежеперегнанного фенола растворяют в 1 л воды). После этого в пробирку приливают точно 5 мл химически чистой серной кислоты (плотность 1,84). Кислоту берут пипеткой с грушей и быстро вливают в жидкость, содержащуюся в пробирке (кислоту ни в коем случае нельзя разбрызгивать 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. Концентрацию сахаров устанавливают по калибровочному графику.

Калибровочный график готовят по сахарозе. 500 мг высушенной при 60°C сахарозы растворяют в колбе емкостью 500 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Затем берут 7 мерных колб емкостью по 100 мл и вносят в них соответственно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 мл раствора сахарозы. Колбы доводят водой до метки, из каждой берут по 10 мл в широкие пробирки и окрашивают фенолом и серной кислотой так, как указано выше. В каждой пробирке будет содержаться соответственно 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 мкг сахарозы. Содержимое пробирок колориметрируют и строят калибровочный график.

Точность этого метода определения сахаров составляет $\pm 2\%$.

Оборудование и реактивы: 1) колбы мерные на 500, 100 и 50 мл, стаканы или конические колбы емкостью 50—100 мл, фарфоровые чашки, воронки, фильтры, широкие пробирки диаметром 16—20 мм, пипетки, фотоэлектроколориметр или спектрофотометр;

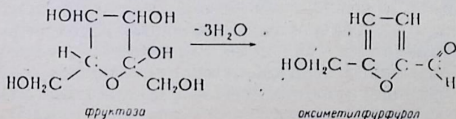
2) фенол 5%-ный раствор, H_2SO_4 концентрированная, 96%-ный и 80%-ный этиловый спирт, сахароза.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗЫ

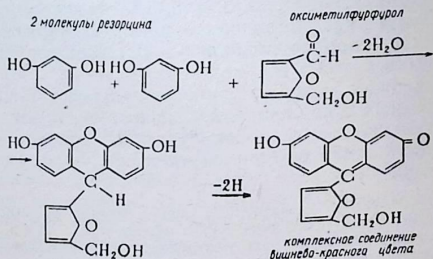
Фруктоза — наиболее сладкий сахар и при повышенном ее содержании ощущение сладкого вкуса усиливается. Некоторые плоды и ягоды содержат значительное количество фруктозы.

Ниже приведен один из методов ее определения. Метод лучше использовать при анализах тех объектов, в которых преобладают моносахариды.

Принцип метода. Фруктозу экстрагируют из растительного материала водой или спиртовым раствором и удаляют из раствора белки. При нагревании раствора с соляной кислотой или с другими сильными кислотами фруктоза превращается в оксиметилфурфурол:



Оксиметилфурфурол реагирует с двумя молекулами резорцина, внесенным в раствор. В результате этой реакции выделяются две молекулы воды и образуется комплексное соединение двух молекул резорцина с остатком молекулы оксиметилфурфурола, которое затем превращается в вещество, окрашенное в интенсивный вишнево-красный цвет. Реакция идет по следующей схеме.



Интенсивность окраски пропорциональна содержанию оксиметилфурфурола (и, следовательно, фруктозы) в растворе. Эта реакция называется реакцией Селиванова на фруктозу. С альдозами аналогичная реакция протекает крайне медленно. Содержание фруктозы вычисляют на основании измерения интенсивности окраски на фотоэлектрокolorиметре.

Ход определения. Навеску хорошо измельченных на терке или в ступке свежих плодов, ягод, овощей переносят в широкогорлую мерную колбу на 200 мл и приливают около 100 мл воды. Величина навески в зависимости от предполагаемого содержания фруктозы обычно составляет 5—20 г. Для определений можно брать и фиксированный растительный материал. Фиксацию следует проводить так, как указано при определении редуцирующих сахаров методом Бертрана.

Колбу с растительным материалом для экстракции фруктозы и других сахаров помещают в водяную баню и выдерживают при 80—90°C в течение 1 ч, периодически взбалтывая. После окончания экстракции колбу охлаждают и приливают в нее 5—6 мл раствора уксуснокислого свинца для осаждения различных примесей, ко-

которые могут присутствовать в растворе. Содержимое колбы тщательно перемешивают и доводят водой до метки. Затем жидкость фильтруют в сухой стакан или колбу. Берут 50 мл фильтрата, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и приливают около 5 мл насыщенного раствора сульфата натрия для удаления избытка свинца. Раствор в колбе перемешивают и доводят водой до метки. После отстаивания раствор фильтруют через плотный фильтр. При анализах слабощрашенных плодов и ягод с низким содержанием белков уксуснокислый свинец и сульфат натрия не добавляют и белки не осаждают.

Затем 5 мл фильтрата (содержание фруктозы в нем должно составлять от 0,01 до 0,5 мг) пипеткой вносят в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляют 5 мл спиртового раствора резорцина и 15 мл 30%-ного раствора HCl. Спиртовой раствор резорцина готовят растворением 100 мг резорцина в 100 мл 96%-ного этилового спирта. Для контроля в другую мерную колбу вместо экстракта наливают 5 мл воды и такие же количества растворов резорцина и HCl. После этого содержимое колб перемешивают и помещают на 20 мин в водяную баню при температуре 80°C. При этом идет реакция с образованием соединения вишнево-красного цвета.

Затем жидкость в колбах охлаждают и доводят водой до метки. Интенсивность окраски измеряют против контроля на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром при 540 нм.

При этом анализе необходимо учитывать следующее обстоятельство. Практически во всех растительных органах и тканях наряду с фруктозой присутствует сахароза, которая переходит в вытяжку, а при выдерживании в кислой среде при 80°C гидролизруется и дает равные количества глюкозы и фруктозы. Поэтому интенсивность развивающейся окраски зависит не только от концентрации свободной фруктозы в растворе, но и обусловлена количеством фруктозы, образовавшейся в результате гидролиза сахарозы. Поэтому во всех случаях в той же навеске растительного материала необходимо определить содержание сахарозы и при расчетах вычесть половину ее количества (соответствующую фруктозной части молекулы этого дисахарида) из общего количества фруктозы, которое было определено с резорциновым реактивом.

Для вычисления результатов строят калибровочный график по образцовому раствору фруктозы. Для этого 100 мг чистой сухой фруктозы растворяют в 100 мл насыщенного водного раствора бензойной кислоты (раствор можно длительное время хранить в холодильнике). Из этого раствора берут 10 мл и разбавляют в мерной колбе до 100 мл. Далее в мерные колбы емкостью 25 мл вносят 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 и 5,0 мл этого раствора, добавляют в колбы по 5 мл резорцинового реактива и по 15 мл 30%-ной HCl, выдерживают на водяной бане, доводят водой до метки и после измерения интенсивности окраски строят калибровочный график. При расчетах содержания фруктозы обязательно вычитают половину количества сахарозы, присутствующей в анализируемом образце. Следует отметить, что другие кетозы, которые могут присутствовать в растениях в незначительном количестве, также дают аналогичную реакцию с резорцином.

Оборудование и реактивы: 1) мерные колбы емкостью 200, 100 и 25 мл, водяная баня, стаканы, пипетки, воронки, фильтры;
2) этиловый спирт 96%-ный, уксуснокислый свинец 10%-ный, Na₂SO₄ насыщенный раствор, HCl 30%-ная, резорцин, бензойная кислота, фруктоза.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА САХАРОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Определение состава сахаров важно для характеристики физиолого-биохимических процессов в растениях. В свободном состоянии в растениях присутствуют различные моносахариды и олигосахариды — пентозы, гексозы, ди- и трисахариды, причем содержание и состав этих сахаров могут изменяться в зависимости от вида и возраста растений, времени суток, погодных условий и условий выращивания. Кроме этого, различные органы и ткани одного и того же растения часто также значительно различаются по составу сахаров.

Общепринятые классические 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. При использовании этих методов обычно определяют

лишь суммарное содержание отдельных групп растворимых сахаров, а определение состава и содержания отдельных сахаров обычными химическими методами крайне сложно и длительно, а иногда и невозможно. Преодолеть эти трудности можно путем использования хроматографических методов, среди которых наиболее быстрым и простым является метод хроматографии на бумаге.

Принцип метода. Сахара экстрагируют из свежего или из предварительно зафиксированного растительного материала 70—80%-ным кипящим спиртом, экстракт очищают от посторонних примесей, и растворимые сахара разделяют хроматографией на бумаге с использованием тех или иных растворителей. После хроматографирования идентификацию сахаров проводят путем обработки хроматограмм специфическими реактивами, дающими с сахарами цветные реакции.

Ход определения. Для определения сахаров хроматографическим методом лучше брать свежий растительный материал. В навеске для анализа должно содержаться около 100 мг сахаров. Таким образом, для листьев многих растений навеска будет составлять 5—10 г, а для плодов, овощей и ягод — 1—5 г.

Для анализа можно использовать и фиксированный материал, однако крайне необходимо строго соблюдать условия его фиксации. Раньше довольно широко был распространен способ фиксации растительного материала в сушильном шкафу при высокой температуре (110—120°C) в течение 10—15 мин с последующим досушиванием материала при 50—70°C. Однако проведенные исследования показали, что этот способ фиксации для определения сахаров непригоден, так как в процессе прогревания растительных тканей в них происходит резкое повышение активности гидролитических ферментов, приводящее к изменению соотношения различных форм углеводов в растениях.

Довольно надежным способом фиксации растительного материала является высушивание при замораживании лиофилизацией (см. стр. 106). Можно фиксировать растительные ткани путем их растирания в ступке с жидким азотом с последующим хранением в твердой углекислоте или в морозильных камерах при возможно более низкой температуре. Весьма распространенным и хорошим способом подготовки растительного материала

для анализов является фиксация 96%-ным кипящим спиртом (конечная концентрация спирта с учетом влажности материала должна быть не менее 70—80%). Спиртовые экстракты хранят в холодильнике.

Для экстракции углеводов навеску растительного материала помещают в стакан, заливают 5—6-кратным объемом кипящего 96%-ного этилового спирта и кипятят на водяной бане в течение 5 мин. Если материал содержит значительное количество кислот, то для их нейтрализации в стакан добавляют немного мела. После этого содержимое стакана переносят в гомогенизатор и тщательно измельчают. Если гомогенизатора нет, растительные ткани измельчают в ступке с чистым кварцевым песком.

Фиксация растительного материала одновременно является и первой экстракцией. Растертую ткань со спиртом переносят в стакан, дают отстояться и прозрачный верхний слой отфильтровывают в сухой стакан или колбу. Растительный материал по возможности не переносят на фильтр, а оставляют на дне стакана. После этого проводят вторую экстракцию. Добавляют в стакан 30—40 мл 80%-ного спирта, выдерживают на водяной бане в течение 30 мин, периодически помешивая содержимое стакана стеклянной палочкой, дают отстояться и вновь прозрачный верхний слой сливают на фильтр в ту же колбу. После третьей экстракции все содержимое стакана, включая осадок, переносят на фильтр, стакан ополаскивают спиртом и осадок на фильтре промывают небольшими порциями горячего 80%-ного спирта.

Если растительный материал не отстаивается или очень плохо фильтруется, фильтрование заменяют центрифугированием. Для этого измельченный материал из гомогенизатора или ступки переносят в центрифужные пробирки. Ступку или гомогенизатор промывают небольшими порциями 80%-ного спирта, который также сливают в центрифужные пробирки. Содержимое пробирок центрифугируют в течение 4—5 мин при 2—3 тыс. об/мин. Жидкость над осадком, в которую переходят сахара, сливают в чистую колбу, а осадок переносят в стакан. Центрифужные пробирки промывают небольшими порциями 80%-ного спирта, который также сливают в стакан. Количество жидкости в стакане доводят 80%-ным спиртом до объема примерно 50 мл и проводят дальнейшую экстракцию сахаров. Для этого

стакан ставят на водяную баню с температурой 70—80°C и, периодически перемешивая содержимое стакана, выдерживают в течение 30 мин. После этого стакан охлаждают и содержимое его переносят в центрифужные пробирки. После центрифугирования жидкость над осадком сливают, а осадок снова экстрагируют 80%-ным спиртом. Такую экстракцию повторяют три раза.

Объединенные спиртовые экстракты переносят в отгонную колбу прибора, предназначенного для отгонки спирта в вакууме (см. рис. 25). Вакуум создается с помощью водоструйного насоса. Спирт отгоняют при температуре 60°C до тех пор, пока объем жидкости в отгонной колбе не уменьшится до 8—10 мл.

Вместо отгонки спирта в вакууме можно удалять его выпариванием из фарфоровых чашек на водяной бане при температуре не выше 40—50°C. Выпаривание ускоряется при продувании воздуха над чашками вентилятором или феном.

Если исследуемый материал содержал много пигментов, их необходимо удалить из экстракта. Для этого экстракт обрабатывают петролевым эфиром. Отгонную колбу отсоединяют от прибора и жидкость сливают в делительную воронку емкостью около 100 мл. Колбу промывают 2—3 раза небольшими порциями горячей воды и сливают их также в делительную воронку. Общий объем вытяжки в делительной воронке должен составлять 25—30 мл. Затем колбу 2—3 раза споласкивают петролевым эфиром и сливают эфир в ту же делительную воронку. Если выпаривание спирта проводилось в чашках, необходимо также тщательно перенести их содержимое в делительную воронку. Смесь в воронке встряхивают в течение 5—10 мин и дают отстояться. После отстаивания воду сливают в чистую колбу. Слой эфира удаляют и экстракт снова обрабатывают петролевым эфиром в делительной воронке. Такую обработку повторяют 2—3 раза до полного удаления пигментов. Затем водный экстракт переносят в колбу и остатки петролевого эфира удаляют нагреванием на водяной бане под тягой при температуре 60°C.

Водный экстракт из растений, кроме сахаров, содержит много различных примесей — минеральных ионов, аминокислот, органических кислот и других веществ, которые могут препятствовать достаточно четкому разделению сахаров на хроматограммах. Поэтому необхо-

димо освободиться от этих примесей, что достигается с помощью ионообменников.

При пропускании растительных экстрактов через катиониты (КУ-2 или Дауэкс-50 в H^+ -форме) экстракт освобождается от неорганических катионов и аминокислот. При пропускании через колонки с анионитами (Дауэкс-1, АВ-17, ПЭ-9 и др.) задерживаются неорганические анионы, фосфорные эфиры сахаров, органические кислоты (способы приготовления колонок с ионообменниками указаны на стр. 191).

Сахара представляют собой нейтральные соединения, не вступают в ионный обмен и проходят через колонки*. Для освобождения от катионов полученный экстракт пропускают через подготовленную колонку размером 15×1 см, наполненную катионитом. Скорость протекания жидкости через колонку должна составлять около 1 мл в минуту. После пропускания экстракта колонку промывают 100 мл воды. Жидкость, вытекающую из колонки, собирают, переносят в фарфоровую чашку и упаривают в вакууме или на водяной бане с вентилятором при температуре $60^\circ C$ до объема 50 мл. Экстракт охлаждают и пропускают через колонку, наполненную анионитом. Колонку промывают водой, экстракт и промывные воды собирают, объединяют и упаривают в фарфоровой чашке в вакууме или на водяной бане с вентилятором при температуре $60^\circ C$ до объема 3—5 мл. Полученный экстракт переносят в мерную колбу или пробирку объемом 10 мл, чашку моют небольшими порциями теплой воды, сливая промывные воды в мерную колбу. Объем жидкости в колбе доводят водой до метки. Полученный раствор служит для хроматографических определений.

Кроме исследуемого раствора, для хроматографии готовят растворы сахаров — «свидетелей». Обычно в качестве «свидетелей» на хроматограмму наносят следующие сахара: рибозу, ксилозу, арабинозу, глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, рафинозу. Растворы этих сахаров готовят в 2%-ной концентрации.

Для хроматографии берут стандартный лист хроматографической бумаги (52×64 см) № 4 «медленная» Ле-

* Некоторые сильноосновные ионообменники обладают удерживающей способностью и в отношении сахаров, особенно если у последних имеется редуцирующая группа.

нинградской бумажной фабрики. Можно использовать и другие марки бумаги. Отступя 4—5 см от узкого края листа бумаги, проводят карандашом линию. На этой линии через каждые 3 см ставят точки, которые означают места, куда будут нанесены растворы сахаров. Нижнюю часть хроматограммы вырезают зубцами, что способствует более равномерному стеканию растворителя.

Хорошее разделение сахаров на хроматограммах достигается в том случае, когда количество каждого из исследуемых сахаров составляет 60—100 мкг. Поэтому если была взята навеска материала с суммарным содержанием около 100 мг сахаров, то из мерной колбы емкостью 10 мл наносят на хроматограмму в две точки объемы раствора сахаров, равные 0,02 и 0,05 мл. В остальные точки, отмеченные на хроматограмме, наносят по 0,004 мл 2%-ные растворы сахаров-«свидетелей», а в одну из точек — 0,004 мл раствора, содержащего все сахара-«свидетели». Растворы на хроматограмму наносят микропипетками в несколько приемов, подсушивая бумагу феном или небольшим подогревом. Удобно пользоваться специальными столиками для нанесения растворов на хроматограммы (см. рис. 8). Размеры пятен на хроматограмме не должны превышать 0,5 см.

Для хроматографического разделения сахаров предложено несколько систем растворителей. Наиболее часто используются следующие растворители: н-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода в соотношении 4:1:5; н-бутиловый спирт — этиловый спирт — вода — аммиак (40:10:49:1); фенол, насыщенный водой, с 1%-ным аммиаком; н-бутиловый спирт — пиридин — вода (6:4:3) и др.

При использовании растворителя, состоящего из смеси бутилового спирта, уксусной кислоты и воды, уксусную кислоту проверяют на содержание альдегидов (кислота, содержащая альдегиды, принимает розовую окраску в присутствии анилина). Если кислота содержит альдегиды, ее перегоняют и собирают фракцию с температурой кипения 117°C. Для приготовления растворителя берут 4 объема бутилового спирта, 1 объем уксусной кислоты и 5 объемов воды, наливают в делительную воронку и встряхивают 15—20 мин. После этого воронку укрепляют в штативе и растворитель отстаивают в течение 30—60 мин. Для хроматографии берут верхний слой, а нижний сливают и переносят в кювету или ванночку

на дно хроматографической камеры для насыщения ее парами растворителя.

При определении сахаров проводят нисходящую хроматографию. Бумагу укрепляют в кювете хроматографической камеры, в которую наливают растворитель, и камеру плотно закрывают.

Значения R_F сахаров в растворителе н-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (4:1:5) довольно небольшие; ниже приведены значения R_F для некоторых сахаров.

Рафиноза	0,05	Манноза	0,20
Лактоза	0,08	Арабиноза	0,22
Мальтоза	0,11	Фруктоза	0,23
Сахароза	0,14	Ксилоза	0,25
Галактоза	0,16	Рибоза	0,31
Глюкоза	0,18		

В связи с низкими значениями R_F при однократном пропускании растворителя до конца листа бумаги все сахара будут расположены в верхней трети хроматограммы и четкого разделения их не произойдет. Поэтому растворитель пропускают через бумагу несколько раз. Обычно рекомендуется пропускать растворитель до конца хроматограммы, для чего требуется примерно 24 ч. Затем хроматограмму высушивают под тягой в течение 1—2 ч и снова (дважды) пропускают растворитель через хроматограмму. При этом хорошо разделяются все сахара, за исключением трех пар: галактоза — глюкоза, арабиноза — фруктоза, фруктоза — ксилоза. Если в исследуемом растворе обнаруживаются пары этих сахаров, растворитель пропускают три раза по 40—48 ч. В этом случае хорошо разделяются все углеводы. Удовлетворительное разделение многих сахаров получают при использовании растворителя н-бутанол — пиридин — вода (1:1:1).

После разделения сахаров хроматограммы тщательно высушивают под тягой до полного удаления следов растворителя и приступают к определению положения сахаров на хроматограмме, для чего ее опрыскивают каким-либо реактивом, дающим с сахарами цветные реакции. Реактив должен быть универсальным, т. е. давать реакции со всеми сахарами, и достаточно чувствительным. Ниже приведены рецепты приготовления наиболее часто используемых реактивов.

Перманганатный реактив. 1 г KMnO_4 и 2 г Na_2CO_3 последовательно растворяют в воде, доводят объем раствора в мерной колбе до 100 мл и перемешивают. Хроматограмму опрыскивают реактивом из пульверизатора и сушат при комнатной температуре. На пурпурном фоне хроматограммы проявляются с различной скоростью желтые пятна сахаров. По мере высыхания пятна принимают серую окраску на коричневом фоне. Учитывая, что изменения в окраске наступают довольно быстро, положение пятен необходимо отмечать сразу.

Параанизидиновый реактив. Готовят 3%-ный раствор параанизида в 96%-ном этиловом спирте. К 100 мл раствора прибавляют 1,5 мл концентрированной HCl , смесь перемешивают и обрабатывают хроматограммы. После обработки реактивом хроматограмму помещают в термостат на 10 мин при температуре 120—150°C. Вместо выдерживания в термостате хроматограмму лучше прогладить горячим утюгом. Параанизидин образует с сахарами продукты желтого, коричневого и красного цвета на коричневом фоне.

Анилиндибензилминофосфатный реактив. Готовят 4%-ный раствор перегнанного анилина в 96%-ном этиловом спирте и 4%-ный раствор дифениламина в спирте такой же концентрации. Смешивают 5 объемов первого раствора с 5 объемами второго раствора и прибавляют один объем концентрированной ортофосфорной кислоты. Смесь наносят на хроматограмму и после легкого подсушивания ее на воздухе помещают в термостат на 10 мин при температуре 80°C. Сахара проявляются в виде голубовато-зеленых, синих и коричневых пятен на почти бесцветном фоне. Это один из лучших реактивов на сахара.

Кроме этих общих реактивов, имеются и специфические реактивы на отдельные группы сахаров и даже на отдельные сахара.

Анилинфосфатный реактив. Готовят *n*-бутиловый спирт с содержанием воды 12%. Затем на этом спирте приготавливают реактив, содержащий 0,075 М анилина (6,98 г в 1 л) и 0,15 М фосфорной кислоты (14,7 г в 1 л). Реактив хранят в темной склянке в холодильнике. После обработки хроматограммы этим реактивом, ее помещают на 5—10 мин в шкаф при 105°C. Альдогексозы на хроматограмме дают желто-коричневые

пятна, альдопентозы — розовые, красные и вишневые пятна. Дисахариды, которые содержат только альдогексозные остатки (мальтоза и лактоза), как и гексозы, окрашиваются в желто-коричневый цвет.

Нафторезорциновый реактив. Для его приготовления растворяют 100 мг нафторезорцина в смеси 20 мл 2 н. HCl и 80 мл 96%-ного этилового спирта. Реактив хранят в холодильнике. Реактив наносят на хроматограмму, затем ее слегка подсушивают на воздухе и осторожно прогревают в шкафу при 75—80°C. Кетозы на хроматограмме дают ярко-красные пятна, а альдозы — сине-фиолетовые.

Обычно хроматограммы равномерно опрыскивают из пульверизатора, но вместо этого можно быстро погружать ее на некоторое время в ванночку с проявляющим реактивом. После проявления сопоставляют расположение пятен сахаров-свидетелей с пятнами сахаров, содержащихся в исследуемом растворе, и определяют качественный состав сахаров.

Кроме качественного метода к настоящему времени разработано несколько методов количественного определения отдельных сахаров хроматографией на бумаге. Описание этих методов изложено в соответствующих руководствах по хроматографии.

Оборудование и реактивы: 1) хроматографические камеры, шкаф для сушки хроматограмм, хроматографические колонки, гомогенизатор, центрифуга, водяная баня, прибор для отгонки спирта в вакууме, вентилятор, фен, пульверизатор, делительные воронки, ступки, пипетки, микропипетки, мерные колбы емкостью 1 л, 100, 50 и 10 мл, фарфоровые чашки, конические колбы, стаканы, хроматографическая бумага;

2) этиловый спирт 96%-ный и 80%-ный, н-бутиловый спирт, уксусная кислота, петролейный эфир, катионит (КУ-2 или Дауэкс-50), анионит (Дауэкс-1 или АВ-16), анилин, дифениламин, ортофосфорная кислота, $KMnO_4$, Na_2CO_3 , соляная кислота концентрированная и 2 н., параанилин, нафторезорцин, набор сахаров (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, лактоза, рафиноза, галактоза, манноза, арабиноза, ксилоза, рибоза).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА

Крахмал — основной запасной полисахарид большинства растений. Он всегда содержится в зеленых листьях, где образуется в процессе фотосинтеза, но основными органами, в которых обычно накапливается наибольшее

количество крахмала, являются семена и клубни некоторых растений. Особенно много его в семенах риса (70—80%), кукурузы (65—75%), пшеницы (60—70%) и клубнях картофеля (12—22%).

Крахмал — смесь двух высокомолекулярных полисахаридов — амилозы и амилопектина, которые построены из остатков глюкозы. Амилоза с раствором йода в йодистом калии дает синее окрашивание, а амилопектин — фиолетовое. С горячей водой крахмал образует клейстер.

Химические методы определения крахмала основаны на изменении интенсивности окраски с йодом, определении количества образовавшейся глюкозы после кислотного гидролиза крахмала, определении количества образовавшейся глюкозы после ферментативного расщепления крахмала, а также на переводе крахмала в раствор, его осаждении в виде йод-крахмального комплекса, окислении этого комплекса и йодометрическом определении продуктов реакции.

Методы, основанные на изменении окраски крахмала с йодом, недостаточно точные, так как между амилозой и амилопектином существуют значительные различия в степени окрашивания йодом. Содержание амилозы и амилопектина в крахмале зависит от вида растения, его возраста, а также органа, из которого выделен крахмал. Например, в процессе созревания мозгового гороха содержание амилозы возрастает от 44 до 69% по мере увеличения размера горошин. Поэтому методы, основанные на измерении интенсивности окрашивания крахмала с йодом, следует рассматривать как приближенные и пригодные лишь для сравнительных определений.

Определение крахмала кислотным гидролизом, основанном на том, что растительный материал, содержащий крахмал, кипятят с раствором кислоты и определяют количество образовавшейся глюкозы, также нельзя считать удовлетворительным. При кислотном гидролизе растительного материала расщепляются не только крахмал, но и гемицеллюлозы и все низкомолекулярные полисахариды, которых в растениях может быть очень много. Поэтому при использовании этого метода прежде всего необходимо количественно выделить крахмал из растительного материала и лишь затем гидролизовать его и определять содержание глюкозы. В противном случае результат может оказаться ошибочным.

Ниже описан метод определения крахмала кислотным гидролизом после выделения препарата крахмала из растительного материала, а также объемный метод.

МЕТОД КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА

При извлечении крахмала необходимо, чтобы другие полисахариды не экстрагировались данным растворителем.

Ниже приведен метод, предложенный Пьючером, с некоторыми модификациями.

Принцип метода. Крахмал экстрагируют из растительного материала хлорной кислотой и осаждают его в виде йодного комплекса. Другие полисахариды, в том числе и гликоген, йодом не осаждаются. Затем йодный комплекс разлагают и крахмал гидролизуют до глюкозы. Глюкозу определяют методом Бертрана. По количеству найденной глюкозы вычисляют содержание крахмала. Точность метода составляет $\pm 2\%$.

Ход определения. В пробирку размером 200×25 мм помещают 200—500 мг (в зависимости от ожидаемого содержания крахмала) хорошо измельченного растительного материала, прибавляют 200 мг промытого и прокаленного кварцевого песка, 4 мл воды и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Не вынимая палочки, пробирку нагревают на кипящей водяной бане 30 мин для клейстеризации крахмала. Во время нагревания содержимое пробирки несколько раз перемешивают стеклянной палочкой.

По окончании клейстеризации пробирку охлаждают до комнатной температуры и помещают в водяную баню при температуре $22-25^{\circ}\text{C}$. Для экстракции крахмала к раствору в пробирку при непрерывном помешивании добавляют 3 мл 72%-ной хлорной кислоты. Затем содержимое пробирки примерно 1 мин растирают стеклянной палочкой о нижнюю часть стенки пробирки (вращательными движениями, нажимая на стенку). После этого пробирку ставят на несколько минут в водяную баню и снова растирают. Затем в пробирку добавляют около 15 мл воды, тщательно перемешивают и количественно переносят в центрифужную пробирку. Палочку и пробирку ополаскивают небольшими порциями воды, и промывные воды сливают в центрифужную пробирку. Центрифугируют до полного осаждения осадка. Жид-

кость над осадком осторожно сливают через небольшую воронку в мерную колбу на 50 мл, а к осадку в центрифужной пробирке добавляют 4 мл воды и 3 мл 72%-ной хлорной кислоты, смесь тщательно растирают и дважды экстрагируют, как указано выше. Затем добавляют небольшое количество воды и снова центрифугируют. Жидкость над осадком сливают в ту же мерную колбу на 50 мл. Экстракцию повторяют еще один раз. Мерную колбу доводят водой до метки, закрывают и тщательно перемешивают. Полученный крахмальный экстракт можно хранить в холодильнике в течение 48 ч.

Для осаждения крахмал-йодного комплекса берут 5 или 10 мл экстракта (в зависимости от ожидаемого количества крахмала) и переносят в центрифужную пробирку (если было взято 5 мл экстракта, к нему добавляют точно 5 мл воды). В пробирку приливают 5 мл 20%-ного раствора NaCl и 2 мл раствора йода в йодистом калии и смесь перемешивают.

Раствор йода в йодистом калии готовят следующим образом. 7,5 г йода и 7,5 г KI растирают в ступке с водой и количественно переносят в мерную колбу на 250 мл. Раствор в колбе доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через плотный фильтр при отсасывании.

После 20-минутного отстаивания жидкости в центрифужной пробирке смесь центрифугируют. В осадок выпадает крахмал-йодный комплекс. Жидкость над осадком сливают с особыми предосторожностями, чтобы не потерять осадок. Затем приступают к промыванию осадка. Для этого в пробирку приливают 5 мл спиртового раствора хлористого натрия и содержимое пробирки осторожно перемешивают.

Для приготовления спиртового раствора хлористого натрия берут 350 мл этилового спирта, 80 мл воды и 50 мл 20%-ного водного раствора хлористого натрия. Все это смешивают в мерной колбе на 500 мл и доводят водой до метки.

После кратковременного отстаивания пробирку с осадком и спиртовым раствором хлористого натрия центрифугируют и жидкость над осадком сливают.

Крахмал-йодный комплекс разлагается под действием 0,25 н. спиртового раствора NaOH. Этот раствор готовят смешиванием в мерной колбе емкостью 500 мл этилового спирта (350 мл), воды (100 мл) и 5 н. раствора

едкого натрия (25 мл). Смесь доводят до метки и фильтруют через плотный фильтр с отсасыванием.

Для разложения комплекса к плотному осадку в центрифужной пробирке добавляют 2 мл спиртового раствора едкого натрия и пробирку осторожно встряхивают, пока не исчезнет синяя окраска. Не следует перемешивать осадок стеклянной палочкой (комплекс растворяется через некоторое время). Освобождающийся крахмал отделяют центрифугированием, жидкость над осадком сливают, а осадок промывают, как указано выше (добавляют 5 мл спиртового раствора хлористого натрия и центрифугируют).

После этого крахмал гидролизуют соляной кислотой. К осадку крахмала в центрифужной пробирке добавляют 2 мл 0,7 н. соляной кислоты, пробирку закрывают стеклянной пробкой и нагревают 3 ч на интенсивно кипящей водяной бане. После окончания гидролиза пробирку охлаждают, добавляют в нее несколько капель 0,04%-ного раствора фенолового красного и содержимое нейтрализуют 0,5 н. едким натрием. В пробирку добавляют 3—5 мл воды и содержимое ее количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл. Стенки пробирки ополаскивают несколько раз небольшими порциями воды. Раствор в колбе доводят водой до метки и перемешивают.

Для определения глюкозы методом Бертрана из колбы берут 10 мл раствора.

Вычисление результатов. Сначала определяют количество глюкозы в 10 мл гидролизата крахмала. После этого процентное содержание крахмала в материале, взятом для анализа, может быть вычислено по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot b \cdot 10 \cdot 0,9 \cdot 100}{H \cdot 50 \cdot 25},$$

- где X — процентное содержание крахмала;
 a — количество глюкозы в 10 мл раствора, мг;
 b — объем хлорнокислого экстракта, взятого для осаждения крахмал-йодного комплекса, мл;
0,9 — коэффициент для пересчета глюкозы на крахмал;
 H — навеска растительного материала, мг.

Оборудование и реактивы. Кроме оборудования и реактивов, используемых для определения сахаров по Бертрону, необходимо

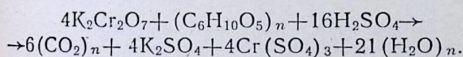
следующее: 1) центрифуги, колбы мерные емкостью 500, 50 и 25 мл, пробирки размером 200×25 мм, ступки;

2) хлорная кислота 72%-ная, 0,7 н. HCl, NaCl (спиртовой раствор), 0,25 н. NaOH (спиртовой раствор), 0,5 н. NaOH, раствор йода в йодистом калии, феноловый красный 0,04%-ный раствор.

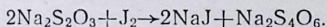
ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРАХМАЛА

Объемный метод — один из наиболее быстрых и достаточно точных способов определения крахмала, предложен Х. Починком. Метод пригоден для анализа всех растительных объектов.

Принцип метода. Крахмал переводят в раствор и осаждают в виде комплексного соединения крахмала с йодом. Затем окисляют крахмал в кислой среде бихроматом калия до углекислого газа и воды. Окисление идет по следующему уравнению:



Избыток бихромата калия разрушают йодистым калием, в результате чего выделяется йод, который затем оттитровывают гипосульфитом:



По количеству гипосульфита вычисляют содержание крахмала.

Ход определения. Навеску свежего растительного материала, содержащего 20—200 мг крахмала, переносят в фарфоровую ступку (зерна 200—300 мг, клубней картофеля около 1 г, свежих листьев растений 3 г). Если для анализа хотят использовать сухой растительный материал, для обезвоживания используют лиофильную сушку (см. стр. 106).

В ступку добавляют 5 мл 80%-ного раствора азотнокислого кальция и тщательно растирают навеску. После этого содержимое переносят в коническую колбу емкостью 150—200 мл, ступку несколько раз ополаскивают небольшими порциями 80%-ного раствора азотнокислого кальция. Общий объем раствора в колбе не должен превышать 30 мл. Колбу накрывают воронкой, ставят на газовую горелку или плитку и слабо кипятят в течение 3 мин. При этом крахмал переходит в раствор.

После охлаждения содержимое колбы переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, коническую колбу несколько раз ополаскивают и доводят раствор в мерной колбе до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр в сухой стакан или колбу.

Пипеткой берут 5 мл фильтрата (при анализе листьев с низким содержанием крахмала — 10 мл) и переносят в небольшую центрифужную пробирку. В эту же пробирку прибавляют 2 мл раствора йода в йодистом калии, перемешивают стеклянной палочкой, палочку ополаскивают небольшой порцией воды и пробирку оставляют на 30 мин. В результате реакции образуется нерастворимое соединение крахмала с йодом, которое выпадает в осадок.

Содержание йода в этом комплексе составляет около 15%.

Через 30 мин проводят центрифугирование в течение 5 мин при 4—5 тыс. об/мин. Прозрачный раствор из центрифужной пробирки сливают, а осадок йод-крахмального комплекса несколько раз промывают 5%-ным раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Каждый раз в пробирку добавляют по 5 мл этого раствора и содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой. После каждого промывания центрифугируют непродолжительное время для осаждения комплекса крахмала с йодом, а прозрачный раствор сливают. Такое промывание и центрифугирование повторяют 3—6 раз.

Промытый осадок комплекса крахмала с йодом переносят в коническую колбу емкостью 200 мл, центрифужную пробирку тщательно (несколько раз) промывают небольшими порциями воды (общий объем воды не должен превышать 3 мл). В колбу приливают 10 мл 0,25 н. раствора $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ в 85%-ной серной кислоте, содержимое колбы перемешивают и сразу же помещают на 15 мин на кипящую водяную баню. При этом крахмал окисляется бихроматом калия по уравнению, которое указано при изложении принципа метода.

После этого разрушают избыток бихромата. Колбу охлаждают и прибавляют в нее 5 мл 20%-ного раствора йодистого калия, который, реагируя с бихроматом, выделяет йод, и 120 мл воды. Выделившийся йод оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита. Титрование ведут до появления желтой окраски, затем в колбу при-

бавляют 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала и титруют до перехода сине-голубой окраски в очень слабо-голубую. При титровании раствор необходимо энергично взбалтывать. Расчеты показывают, что 1 мл точно 0,1 н. раствора гипосульфита соответствует 0,675 мг крахмала.

Вычисление результатов. При расчете необходимо знать, какое количество гипосульфита затрачивается на контрольное титрование для разрушения йода, выделившегося в результате реакции $K_2Cr_2O_7$ и КJ. Для этого в коническую колбу емкостью 200 мл прибавляют 120 мл воды, точно 10 мл 0,25 н. раствора $K_2Cr_2O_7$ и 5 мл 20%-ного раствора йодистого калия. Содержимое колбы тщательно перемешивают и титруют 0,1 н. раствором гипосульфита, как указано выше.

Содержание крахмала рассчитывают по следующей формуле.

$$X = \frac{0,675 \cdot v \cdot T \cdot (a - a_1)}{v_1 \cdot n},$$

где X — содержание крахмала, %;

a — количество 0,1 н. раствора гипосульфита, затраченного при контрольном титровании, мл;

a_1 — количество 0,1 н. раствора гипосульфита, затраченного при определении крахмала, мл;

v — объем, в котором растворена навеска исследуемого вещества (обычно 100 мл);

v_1 — объем раствора, взятого для осаждения крахмала (5 или 10 мл);

T — поправка к титру 0,1 н. гипосульфита;

n — навеска растительного материала, г.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга, водяная баня, ступки фарфоровые, колбы конические емкостью 100 и 200 мл, мерные колбы емкостью 100 мл, воронки, стаканы, пипетки, фильтры;

2) 80%-ный, 20%-ный и 5%-ный растворы $Ca(NO_3)_2$, 0,5%-ный раствор йода в йодистом калии, 20%-ный раствор йодистого калия, 0,25 н. раствор $K_2Cr_2O_7$ в H_2SO_4 , 0,1 н. раствор гипосульфита, 0,5%-ный раствор крахмала.

80%-ный раствор $Ca(NO_3)_2$ — 200 г $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ растворяют в воде и доводят до 250 мл.

0,5%-ный раствор йода в йодистом калии — 10 г КJ и 5 г J_2 растирают в ступке вначале без воды, а затем с 10 мл воды, количественно переносят в мерную колбу емкостью 1 л и доводят водой до метки.

0,25 н. раствор $K_2Cr_2O_7$ в H_2SO_4 — 12,3 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 250 мл воды в двухлитровой колбе и постепенно при охлаж-

дении и помешивании прибавляют в колбу 800 мл концентрированной H_2SO_4 , с плотностью 1,84; после охлаждения переносят в темную склянку с притертой пробкой.

СХЕМА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДОВ В РАСТЕНИЯХ

Иногда необходимо определить все формы углеводов, содержащиеся в данном растительном образце. В этом случае удобно пользоваться схемой анализа, предложенной А. Р. Кизелем.

Принцип метода. С физиолого-биохимической точки зрения все углеводы можно подразделить на несколько групп: 1) углеводы подвижные, легко мобилизуемые и легко подвергающиеся превращениям в растениях; 2) углеводы малоподвижные, мобилизуемые и используемые в обмене веществ лишь при отсутствии других углеводов; 3) углеводы неподвижные, которые в обычных условиях не используются.

Подвижные углеводы (моносахариды, дисахариды, трисахариды, декстрины, инулин, некоторые пектиновые вещества, крахмал) могут находиться в растениях как в растворенном, так и в нерастворенном состоянии. Кроме того, отдельные углеводы различаются по растворимости в разных растворителях (спирте, воде). Это позволяет их фракционировать.

При обработке растительного материала 82%-ным спиртом в раствор переходят кристаллизующиеся моно-, ди- и трисахариды, которые при фракционном определении углеводов относятся к I группе. Внутри этой группы сахара подразделяют на основании их химических свойств, а также способности к гидролизу под действием кислот.

Для более детального изучения состава этих углеводов используют хроматографическое разделение на бумаге, как указано на странице 120.

При последующем (после спирта) извлечении углеводов холодной водой в раствор переходят коллоидные полисахариды, растворимые в воде (декстрины, инулин и другие легкогидролизуемые полисахариды, слизи и часть пектиновых веществ). Это II группа углеводов. Здесь дифференциация осуществляется по степени гидролиза и по ряду других свойств.

К нерастворимым подвижным углеводам относятся главным образом крахмал, который может быть извлечен из растительного материала водой после предварительного ферментативного гидролиза (III группа углеводов).

К малоподвижным углеводам относятся гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Эта группа углеводов довольно разнообразная и трудно дифференцируемая. Поэтому обычно определяют содержание углеводов этого типа суммарно по их восстанавливающей способности после гидролиза материала 2%-ной HCl (IV группа углеводов).

После определения I—IV групп углеводов в растительном материале остаются неподвижные углеводы, представляющие собой скелетные вещества растений, к которым в основном относится целлюлоза (V группа).

Ход определения. Для определения всех групп углеводов лучше использовать свежий растительный материал. Если это по каким-либо причинам невозможно, материал необходимо зафиксировать. Лучший способ фиксации — обезвоживание лиофилизацией. Можно фиксировать растительный материал также жидким азотом с последующим хранением в замороженном состоянии в морозильных камерах при возможно более низкой температуре. Следует подчеркнуть, что способ фиксации растений в сушильном шкафу при 110—120°C с последующим досушиванием при 50—70°C для количественного определения углеводов непригоден, так как в период прогревания растительного материала активизируются гидролитические ферменты, разрушающие сложные углеводы, а также наблюдаются взаимные превращения сахаров. Поэтому при такой фиксации всегда получают искаженные результаты содержания отдельных углеводов в растениях.

Для определения всех групп углеводов берут две навески по 5 г сухого растительного материала, который тщательно растирают в ступке или гомогенизаторе. Если для анализа используют семена с большим количеством жира, навеску обезжиривают петroleйным или серным эфиром в аппарате Сокслета. В том случае, когда для анализов используют свежий или замороженный растительный материал, берут две точно одинаковые навески, в каждой из которых должно содержаться около 5 г сухого вещества.

Для извлечения углеводов I группы навески материала заливают 82%-ным спиртом (20 мл спирта на 1 г сухого вещества) и нагревают на водяной бане при температуре 70—80°C в течение 30 мин. При анализе свежего растительного материала спирт берут более высокой концентрации, чтобы конечная его концентрация (с учетом влажности материала) составляла 82%. После нагревания дают вытяжке немного отстояться и фильтруют через пористый стеклянный фильтр (№ 1 или № 2) при слабом отсасывании. Фильтрат собирают в колбу прибора для отгонки спирта в вакууме, а остаток с фильтра — в колбу, в которой проводилась экстракция. Экстракцию материала спиртом повторяют три раза.

После трех-четырех обработок материала 82%-ным спиртом сахара извлекаются полностью. Отгоняют спирт под вакуумом на водяной бане при температуре 40—45°C из обычной короткогорлой круглодонной колбы, к которой плотно подогнана пробка с двумя отверстиями. В одно отверстие вставлен капилляр, регулирующий кипение спирта, а в другое — отводная трубка к холодильнику. Схема прибора изображена на рисунке 25.

После отгонки спирта в отгонной колбе остается некоторое количество сиропообразной жидкости. Получившийся сироп растворяют теплой водой (4 раза по 15—20 мл) и количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Добавляют несколько миллилитров 10%-ного нейтрального уксуснокислого свинца (для осаждения белков). Избыток свинца осаждают сульфатом натрия,

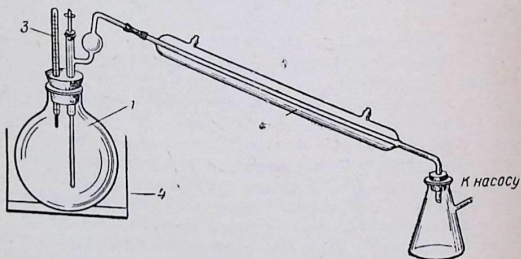


Рис. 25. Прибор для отгонки спирта в вакууме:
1 — круглодонная колба; 2 — холодильник; 3 — термометр; 4 — водяная баня.

как указано в методике определения сахаров (см. стр. III). Затем раствор фильтруют и в очищенном растворе проводят дифференцированное определение сахаров I группы, растворимых в спирте. Прежде всего определяют непосредственную восстанавливающую способность раствора (по Бертрону), показывающую наличие в нем свободных гексов и половину восстанавливающих дисахаридов типа мальтозы. Затем применяют гидролиз различной силы, устанавливают присутствие сахарозы и затем более трудно гидролизуемых дисахаридов типа мальтозы. На основании этих определений и соответствующих расчетов получают данные о количественном содержании свободных моносахаридов и дисахаридов различного типа.

Обычно в растворе проводят три отдельных определения.

1. В 20 мл вытяжки определяют восстанавливающие сахара по Бертрону (в случае малого количества сахаров определения проводят микрометодом).

2. В 20 мл вытяжки определяют восстанавливающие сахара после предварительного гидролиза 2%-ной HCl (20 мл раствора + 2,2 мл 20%-ной HCl в течение 6 мин на водяной бане при температуре 68—70°C (перед определением раствор нейтрализуют сухой содой). В данном случае в результате определения восстанавливающим сахарам (моносахариды + $\frac{1}{2}$ мальтозы) прибавляют сахарозу, которая в этих условиях разлагается на глюкозу и фруктозу.

3. В 20 мл вытяжки гидролизом с 25%-ной HCl в течение 3 ч на кипящей бане с последующей нейтрализацией содой определяют всю мальтозу, сахарозу и моносахариды. Гидролиз проводят в той же колбочке, в которой будут определять сахара по методу Бертрона. Чтобы концентрация кислоты не изменялась во время гидролиза, колба должна быть закрыта пробкой с обратным холодильником. Следует иметь в виду, что при таком гидролизе распадается 10% содержащейся в растворе фруктозы.

Вычисление результатов. Количество сахаров определяют следующим образом. Результат первого непосредственного определения — a , второго — b , третьего — v , поправка на распад фруктозы — K . Коэффициент K обычно равен 10% от $\frac{1}{2}$ суммы моносахаридов.

Содержание сахарозы = $(b - a) \cdot 0,95$.

Содержание мальтозы = $(a + K - b) \cdot 2 \cdot 0,95$.

Содержание моносахаридов = $a - (a + K - b)$.

Содержание всех сахаров выражается в процентах веса сухого материала взятых навесок, т. е.

$$X\% = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{H \cdot (100 - Y)},$$

где A — содержание углевода в навеске, мг;

H — навеска, мг;

Y — влажность материала.

При определении содержания углеводов II группы извлеченный спиртом материал освобождают от спирта, высушивая фильтр в сушильном шкафу при температуре 40—50°C. Затем материал с фильтром переносят в прежнюю колбу и экстрагируют 3—4 раза водой при температуре 45—50°C (по 15—20 мин). При этом в раствор переходят полисахариды, растворимые в воде, но не извлекаемые спиртом. Экстракты отфильтровывают через один и тот же стеклянный фильтр и сгущают на водяной бане до объема 20—25 мл.

К сгущенному экстракту добавляют такое количество 20%-ной HCl, чтобы конечная концентрация ее в растворе была 2%-ной, и затем гидролизуют полисахариды 3 ч на кипящей водяной бане. После гидролиза раствор нейтрализуют содой, добавляют 4%-ный раствор CuSO_4 и щелочной раствор сегнетовой соли и определяют сахара по методу Бертрана. Количество полисахаридов получают, умножая количество редуцирующих сахаров на 0,9.

При определении III группы углеводов (крахмал) материал после извлечения водой переносят в прежнюю колбу. Общий объем воды в колбе не должен превышать 60—100 мл. После этого производят оклейстеризование крахмала нагреванием на водяной бане в течение 30 мин при температуре 60°C. Затем прибавляют 2 мл разбавленной в 5 раз и профильтрованной слюны, несколько капель толуола и ставят в термостат на 24 ч при температуре 40°C. Слюна содержит α - и β -амилазы, расщепляющие крахмал до мальтозы. Окончание гидролиза крахмала проверяют йодной пробой (раствор йода в йодистом калии).

Когда весь крахмал будет разложен, раствор фильтруют через тот же стеклянный фильтр и промывают осадок водой. Необходимо следить, чтобы весь осадок

был тщательно перенесен на фильтр. Раствор сгущают на бане до объема 50 мл и проводят гидролиз мальтозы и декстринов 2%-ной HCl на кипящей бане в течение 3 ч. Затем соляную кислоту нейтрализуют содой или 10%-ным NaOH до нейтральной реакции на лакмус, добавляют уксуснокислый свинец, а затем Na_2SO_4 , фильтруют в мерную колбу на 100 мл, колбу доводят до метки и в 20 мл определяют глюкозу по методу Бертрана. Содержание крахмала вычисляют умножением количества глюкозы на 0,9.

Остаток материала после извлечения крахмала переносят с воронки в прежнюю колбу, воронку смывают определенным объемом воды (50—100 мл) и для установления углеводов IV группы (гемицеллюлозы) к содержимому колбы добавляют столько 20%-ной HCl , чтобы во всем объеме концентрация HCl равнялась 2%. Гемицеллюлозы гидролизуют нагреванием на кипящей водяной бане в течение 3 ч.

После окончания гидролиза раствор фильтруют через тот же стеклянный фильтр, осадок промывают, фильтрат сгущают на бане, кислоту нейтрализуют, добавляют уксуснокислый свинец и Na_2SO_4 в таких же объемах и концентрациях, как и при определениях сахаров по методу Бертрана. Затем экстракт фильтруют и раствор доводят до точного объема так же, как и при определении углеводов III группы.

В растворе определяют сахара и количество гемицеллюлоз рассчитывают умножением количества сахаров на 0,9.

При определении целлюлозы остаток материала после экстракции углеводов IV группы высушивают до воздушно-сухого состояния при температуре не более 50°C . Высушенный материал переносят в прежнюю колбу, заливают примерно 10 объемами (по весу) 80%-ной серной кислоты и оставляют на $2\frac{1}{2}$ ч при комнатной температуре. После настаивания с кислотой прибавляют 15 объемов воды на один объем взятой кислоты и гидролизуют целлюлозу в течение 5 ч на кипящей водяной бане. Клетчатка при этом расщепляется до глюкозы. Гидролизат фильтруют через прежний стеклянный фильтр, остаток промывают 3—4 раза водой. Раствор упаривают, доводят до точного объема, из которого при определении глюкозы берут 2 пробы по 10 мл. Перед определением их нейтрализуют сухой содой. Для

вычисления целлюлозы количество найденной глюкозы умножают на 0,9.

Содержание всех групп углеводов выражают в процентах от навески материала, взятого для анализа.

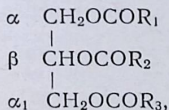
Оборудование и реактивы: 1) приборы для отгонки спирта в вакууме, ступки фарфоровые, стеклянные фильтры (№ 1 и № 2), стаканы, воронки, колбы конические (на 100 мл) с обратным холодильником, колбы мерные (на 50, 100, 200, 250 мл), трубки Аллина, колбы Бунзена, водяные бани, бюретки, фарфоровые чашки;

2) уксуснокислый свинец 10%-ный, Na_2SO_4 (насыщенный раствор), спирт 82%-ный, эфир серный и петролейный, CuSO_4 4%-ный, 0,1 н. KMnO_4 , 0,01 н. KMnO_4 , HCl 20%-ная, сода (в порошке), NaOH 10%-ный, толуол, H_2SO_4 80%-ная, щелочной раствор сегнетовой соли.

ЖИРЫ

Растительные жиры, или масла, — главный запасной продукт семян большинства растений. Жиры в семенах растений могут накапливаться в большом количестве — до 30—40% общей массы и до 50—60% массы ядра. Чистые растительные масла — бесцветные вещества; окраска природных масел обусловливается продуктами распада хлорофилла и каротиноидами.

Жиры представляют собой смесь триглицеридов — сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот и построены по следующей схеме:



где R_1 , R_2 и R_3 — остатки высших жирных кислот.

Всего в состав растительных жиров может входить до 50 различных жирных кислот, но в наибольшем количестве содержатся миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая и рицинолевая кислоты.

Насыщенные жирные кислоты — твердые (при комнатной температуре), а ненасыщенные — жидкие вещества.

Растительные жиры, кроме триглицеридов, всегда содержат в небольшом количестве и другие вещества: свободные жирные кислоты, моно- и диглицериды, фосфатиды, некоторые жирорастворимые витамины.

Растительные масла очень разнообразны по своим свойствам. Для общей их характеристики, а также для характеристики входящих в их состав жирных кислот принят ряд констант. Основными константами жиров являются кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное и перекисное число.

Простейшей задачей анализа растительных масел является определение их общего содержания в семенах или других органах растений и установление характерных констант данного масла.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОГО ЖИРА

Методы определения содержания жира чаще всего основаны на способности его растворяться в различных органических веществах. При количественных определениях проводят полную экстракцию жира из растительного материала каким-либо растворителем и учитывают количество экстрагированного жира. Так как под действием органических растворителей обычно извлекаются не только жиры, но и свободные жирные кислоты, пигменты, эфирные масла, а также другие липиды (лецитины, кефалины, стеролы и т. д.), то полученный препарат (в котором преобладают собственно жиры) часто называется сырым жиром.

Ниже описан метод определения сырого жира, предложенный Сокслетом.

Принцип метода. Растительный материал обезвоживают и извлекают жир каким-либо растворителем (этиловый эфир, петролейный эфир, бензин, бензол, хлороформ и др.). Чем ниже температура кипения растворителя, тем легче его удалить после экстракции жира. В лабораториях для экстракции жира чаще всего пользуются этиловым (серным) эфиром. Извлеченный сырой жир освобождают от растворителя и взвешивают.

Ход определения. Навеску 10—15 г (взятую с точностью до 0,005 г) растертого в ступке материала помещают в бумажный пакетик (патрон), который готовят следующим образом. Фильтровальную бумагу размером 10×12 см наворачивают на пробирку и нижнюю часть патрона заворачивают. Патрон снимают с пробирки и внутрь его вкладывают небольшой кусочек ваты (для прочности патрон можно связать ниткой).

Для удаления воды навеску сушат без доступа воздуха в вакуум-термостате или в токе углекислого газа или азота.

Сушить материал в обычном термостате на воздухе нельзя, так как многие растительные масла содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, которые при нагревании на воздухе присоединяют кисло-

Рис. 26. Аппарат Сокслета:

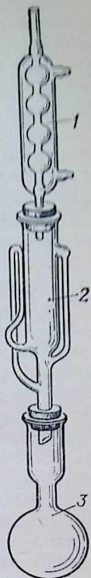
1 — холодильник; 2 — экстрактор; 3 — колба.

род по месту двойной связи, в связи с чем увеличивается масса масла и изменяется его качество.

Содержание жира обычно выражают в процентах на массу абсолютно сухого материала, поэтому параллельно берут другую навеску (1—2 г) для определения влажности. Сушат ее также в вакууме до постоянного веса.

Патрон с высушенной навеской помещают в экстрактор аппарата Сокслета (рис. 26). Аппарат состоит из колбы для растворителя, экстрактора и шарикового холодильника, соединенных между собой шлифами. Экстрактор представляет собой цилиндр, в который впаяны две трубки — одна для прохождения паров эфира из колбы в холодильник и вторая — сифон для сливания эфира вместе с экстрагированным жиром в колбу. Для особо точных работ рекомендуется использовать измененный аппарат Сокслета, в котором жир экстрагируют в вакууме.

Перед определением колбу высушивают до постоянного веса и взвешивают на аналитических весах. В высушенную до постоянного веса колбу наливают $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ ее объема сухого чистого эфира. Продажный эфир часто содержит примеси спирта, а иногда и ацетона, поэтому перед экстракцией жира эфир очищают от примесей. Для этого в делительную воронку емкостью 500 мл наливают 200 мл эфира и 50 мл воды. Смесь взбалтывают и через пробку выпускают пары эфира, затем через кран воронки сливают воду. Так повторяют 2—3 раза. Эту операцию лучше проводить в прохладном помещении и не нагревать воронку руками. При взбалтывании в воду переходят следы спирта и ацетона, которые могли содержаться в эфире. Для обезвоживания эфир переносят в темную склянку, добавляют хлористый кальций и оставляют на 1—2 дня. Затем эфир перегоняют и используют для анализов.



Подготовленный для определений аппарат Сокслета ставят в водяную баню с электрическим подогревом, пропускают через холодильник аппарата ток холодной воды и начинают экстракцию жира. Чтобы эфир в колбе не кипел слишком сильно, температура воды в бане должна быть не больше 45—50°C. Пары кипящего эфира поднимаются из колбы по трубке экстрактора в холодильник, затем конденсируются и эфир по каплям стекает в патрон, в результате чего содержащийся в растительном материале жир экстрагируется. Экстрактор постепенно заполняется эфиром, и когда уровень его поднимается несколько выше верхнего колена сифона, эфир вместе с извлеченным жиром стекает в колбу. Затем экстрактор вновь наполняется эфиром и извлекается новая порция жира. Подогревание эфира в колбе регулируют так, чтобы каждое сливание эфира из экстрактора в колбу проходило через 4—6 мин. Полное извлечение жира из материала зависит от его содержания. При малом количестве экстракция жира заканчивается через 5—6 ч, а при большом — через 10—15 ч. Конец экстракции устанавливают следующим образом. Отделяют экстрактор от колбы и на чистое часовое стекло берут несколько капель эфира, стекающего из экстрактора. После испарения эфира стекло должно быть абсолютно прозрачным. Если на часовом стекле остается налет, экстракцию продолжают.

По окончании извлечения жира колбу отделяют от экстрактора, присоединяют к холодильнику и отгоняют основную часть эфира. Окончательно высушивают колбу с жиром (до постоянной массы) в вакуум-термостате или в токе углекислого газа или азота при 60—70°C.

Вычисление результатов проводят по разности между массой колбы с жиром и массой пустой колбы с учетом влажности материала.

$$X = \frac{a \cdot 100}{H \cdot (100 - y)},$$

где X — содержание сырого жира в анализируемом веществе, %;

a — масса сырого жира, г;

H — масса материала, взятого для анализа, г;

y — процент влаги в анализируемом веществе.

Полученный препарат сырого жира может быть использован для дальнейших исследований. Он может

быть подвергнут фракционированию на отдельные группы соединений, относящихся к классу липидов (глицериды, жирные кислоты, лецитины, кефалины, стериды, инозитфосфатиды, фосфатидные кислоты и др.). Такое фракционирование проводится на основании различной растворимости этих соединений в органических растворителях, а также при использовании хроматографических методов. Суммарный препарат жира или отдельные компоненты, входящие в его состав, используют также для более детальной их химической характеристики: определения кислотного числа, йодного числа, числа омыления, перекисного числа, а также определения углерода, водорода, фосфора и азота.

Однако в тех случаях, когда нет необходимости давать детальную характеристику получаемых препаратов жиров, а достаточно знать лишь общее содержание жира в изучаемом материале, можно пользоваться методом определения жира по массе обезжиренного остатка, который был предложен С. В. Рушковским. Этот метод особенно удобен при массовых определениях.

Принцип метода. Из обезвоженной растительной навески жир экстрагируют эфиром и по массе оставшегося материала вычисляют количество сырого жира.

Ход определения. В высушенный до постоянной массы и предварительно обезжиренный пакетик из фильтровальной бумаги кладут около 1 г исследуемого материала. Пакетик и навеску взвешивают на аналитических весах. Пакетик закрывают, отмечают номер образца карандашом и высушивают в термостате при температуре 105°C до постоянной массы. После высушивания материал можно использовать для экстракции жира. Для этого пакет с образцом помещают в экстрактор аппарата Сокслета или аппарата Еременко. Аппарат Еременко состоит из колбы для растворителя, большого экстрактора шарообразной формы и холодильника. Его преимущество перед аппаратом Сокслета состоит в том, что в большом экстракторе можно одновременно анализировать 20—30 образцов.

Экстрагирование жира из образцов продолжают до постоянной массы, обычно 12—20 ч. После экстракции пакетик кладут в бюкс и удаляют эфир в сушильном шкафу при температуре 100—105°C. Пакетики взвешивают на аналитических весах.

Вычисление результатов. Массу сырого жира находят по разности между массой пакетиков с материалом до и после экстракции. Содержание сырого жира находят по следующей формуле:

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

где X — содержание сырого жира в анализируемом веществе, %;

a — масса сырого жира, г;

H — масса абсолютно сухого анализируемого материала, г.

Оборудование и реактивы: 1) аппарат Сокслета или аппарат Еременко, водяная баня с электрическим подогревом, вакуум-термостат, термостат, делительные воронки, эксикатор, прибор для отгонки эфира, аппарат Киппа для получения газов, часовое стекло, бюксы;

2) этиловый эфир, хлористый кальций.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА

Кислотное число, или кислотность, жира — количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

В жирах почти всегда имеются свободные жирные кислоты, причем в растительных жирах их концентрация обычно более высокая, чем в животных. Особенно много свободных жирных кислот в масле незрелых семян. При созревании их количество уменьшается и соответственно понижается кислотное число. Содержание свободных жирных кислот может увеличиваться при длительном хранении семян масличных культур или полученного из них масла и резко повышается при прорастании семян в результате гидролиза жиров. Таким образом, величина кислотного числа масла непостоянна.

Принцип метода. Масло нейтрализуют титрованным раствором КОН, в результате чего между едким кали и находящимися в масле свободными жирными кислотами идет следующая реакция: $\text{RCOOH} + \text{KOH} = \text{RCOOK} + \text{H}_2\text{O}$, где RCOOH — жирная кислота. По количеству раствора КОН, затраченного на нейтрализацию кислот, судят о величине кислотного числа.

Ход определения. В чистую сухую колбу на аналитических весах взвешивают 1 г масла, прибавляют 30 мл предварительно нейтрализованной смеси эфира с 96%-ным спиртом и растворяют масло. Если масло растворяется плохо, смесь в колбе тщательно перемешивают и слабо нагревают в горячей воде при встряхивании.

После растворения жира в колбу добавляют несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. водным раствором КОН до появления ярко-розовой окраски. Если для исследования был взят темноокрашенный жир, в котором трудно наблюдать появление розовой окраски, вместо фенолфталеина берут 1%-ный раствор тимолфталеина и титруют до появления синей окраски.

Вычисление результатов. Величину кислотного числа вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot 5,61 \cdot T}{H},$$

где a — количество 0,1 н. раствора КОН, затраченное на титрование, мл;

T — поправка к титру КОН;

H — навеска масла, взятая для анализа, г.

Содержание жирных кислот в масле можно выразить не кислотным числом, а в процентах от массы масла. При обычном титровании масла для определения кислотного числа нельзя получить никаких данных о молекулярной массе жирных кислот, входящих в его состав, и, следовательно, нельзя прямо вычислить процентное содержание кислот. Поэтому условно расчеты ведут на свободную олеиновую кислоту (она наиболее часто встречается в жирах растений, произрастающих в нашей стране). Для этого кислотное число умножают на коэффициент 0,503, который получают из следующего уравнения:

$$\% \text{ свободных жирных кислот} = \frac{\text{кислотное число} \cdot 282,3 \cdot 100}{56,11 \cdot 1000}.$$

где 282,3 — молекулярная масса олеиновой кислоты;

56,11 — молекулярная масса КОН;

100 — пересчет на процентное содержание;

1000 — пересчет миллиграммов в граммы.

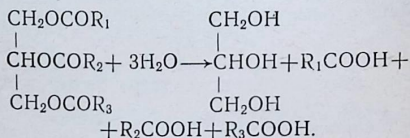
Оборудование и реактивы: 1) водяные бани, колбы конические емкостью 50—100 мл;

2) спирт, эфир, 0,1 н. КОН, фенолфталеин, тимолфталеин.

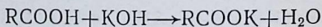
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ОМЫЛЕНИЯ

Числом омыления называется количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации всех свободных и связанных кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует среднюю величину молекулярной массы кислот, входящих в состав жира. Число омыления растительных масел может заметно изменяться. Как правило, кокосовое, пальмовое и некоторые другие масла имеют высокое число омыления, а масла крестоцветных растений и касторовое масло — низкое.

Принцип метода. Жир кипятят с избытком титрованного раствора едкого кали, в результате чего он гидролизуется.



Освободившиеся жирные кислоты реагируют с едким кали:



Избыток щелочи, которая не прореагировала с жирными кислотами, оттитровывают соляной кислотой: $\text{KOH} + \text{HCl} \longrightarrow \text{KCl} + \text{H}_2\text{O}$ и по количеству щелочи, затраченной на связывание всех кислот жира, рассчитывают величину числа омыления.

Ход определения. В чистую, сухую круглодонную колбу на аналитических весах взвешивают около 1 г жира и приливают в нее из бюретки точно 25 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого кали. Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят на сильно кипящей водяной бане в течение 2 ч. Одновременно проводят контрольное определение. Для этого в другую колбу вместо жира вносят 2 мл воды, приливают 25 мл 0,5 н. KOH и кипятят на бане. Омыление считается законченным, когда жидкость в колбе станет прозрачной. При омылении труднорастворяющихся веществ в колбу добавляют примерно равный объем какого-либо высококи-

пящего растворителя — толуола, пропилового, бутилового или амилового спирта.

По окончании омыления в колбу добавляют несколько капель индикатора фенолфталеина или тимолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до изменения окраски. Одновременно титруют содержимое контрольной колбы.

Вычисление результатов. Количество миллиграммов КОН, затраченное на нейтрализацию свободных и связанных кислот 1 г жира, равняется:

$$X = \frac{(a-b) \cdot T_1 \cdot 28,055 \cdot T_2}{H},$$

где X — число омыления;
 a — количество 0,5 н. HCl, израсходованное на титрование контроля, мл;
 b — количество 0,5 н. HCl, затраченное на титрование пробы, мл;
 T_1 — поправка к титру HCl;
28,055 — $1/2$ молекулярной массы КОН (56,11 : 2);
 T_2 — поправка к титру КОН;
 H — навеска жира, г.

На основании определений числа омыления и кислотного числа можно вычислить и так называемое число эфирности — количество миллиграммов едкого кали, которое необходимо для нейтрализации освобождающихся при омылении жирных кислот в 1 г жира. Число эфирности вычисляют по разности между числом омыления и кислотным числом.

На основании этих определений можно рассчитать и содержание глицерина, имея в виду, что на омыление одной молекулы триглицерида расходуется три молекулы КОН и выделяется одна молекула глицерина.

Оборудование и реактивы: 1) водяные бани, круглодонные колбы емкостью 100 мл с обратным холодильником;

2) 0,5 н. спиртовой раствор КОН, 0,5 н. HCl, фенолфталеин, тимолфталеин.

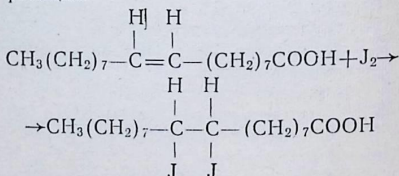
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА

Йодное число показывает, какое количество граммов йода может быть связано со 100 г жира. Йодное число — важная константа, так как оно характеризует степень

непредельности, ненасыщенности кислот, входящих в состав данного жира. Высокое йодное число указывает на большое количество непредельных кислот, что делает масло особенно ценным при использовании его для технических и пищевых целей. Высокими йодными числами характеризуются льняное и конопляное масло, а низкими — соевое масло, масло хлопчатника и других растений южных широт.

По величине йодного числа можно судить также о том, натуральное ли это масло или имеет примеси, а также об изменениях, которые могут происходить в масле при его хранении.

Принцип метода. Йод присоединяется к жирным кислотам по месту двойной связи. Например, при взаимодействии олеиновой кислоты с йодом происходит следующая реакция:



Однако при комнатной температуре йод реагирует с жирными кислотами, входящими в состав масла, очень медленно, а при нагревании присоединение йода идет неравномерно. Более интенсивно реагируют с жирными кислотами соединения йода с галоидами (хлором, бромом). Поэтому были предложены методы определения йодного числа, в которых йод заменяют его соединениями с галоидами. Гюбль предложил для определения йодного числа готовить раствор йода с сулемой; при взаимодействии этих веществ получается хлористый йод: $\text{HgCl}_2 + 2\text{J}_2 \rightarrow \text{HgJ}_2 + 2\text{JCl}$.

При определении йодного числа методом Гануса используют раствор бромистого йода. Однако при использовании этих методов надо иметь в виду, что по месту двойных связей, кроме йода, могут присоединяться и другие галоиды (хлор, бром), поэтому получаемые результаты могут не соответствовать теоретическим. При этих определениях необходимо предъявлять повышенные требования к соблюдению методики.

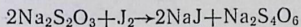
Ход определения (по Гюблю). На аналитических весах в коническую колбу емкостью около 300 мл берут навеску около 0,2 г высыхающего масла или 0,3—0,4 г слабовысыхающего. В колбу добавляют 10 мл хлороформа. Одновременно в другую колбу (для контрольного определения) приливают 10 мл хлороформа. Опытную колбу осторожно взбалтывают для растворения масла. Затем из бюретки в колбы приливают точно по 25 мл раствора Гюбля и плотно закрывают пробками, смоченными раствором йодистого калия, чтобы не было потери йода от улетучивания.

Раствор Гюбля получают смешиванием отдельно приготовленных спиртовых растворов сулемы и йода: 25 г йода растворяют в 500 мл 95%-ного спирта; 30 г сулемы растворяют в 500 мл 95%-ного спирта и профильтровывают. Оба раствора хранят отдельно в колбах с притертыми пробками и смешивают в равных объемах за 2 дня до определения йодного числа. К смеси прибавляют 25 мл HCl (плотность 1,19).

Закупоренные колбы осторожно встряхивают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 6—12 ч (чем больше в масле непредельных кислот, тем дольше выдерживают колбы). Если в процессе реакции будет заметно осветление темно-коричневой жидкости, в колбу добавляют еще точно отмеренное количество раствора Гюбля.

После окончания реакции в опытную и контрольную колбы вносят по 20 мл 10%-ного раствора KJ, предварительно ополоснув из промывалки пробку и горлышко колбы. Затем в колбы прибавляют по 100 мл воды и взбалтывают. Йодистый калий прибавляют для того, чтобы не выпал осадок йодистой ртути, а также для лучшего растворения йода в водной фазе. Если после взбалтывания выпадает красный осадок HgJ_2 , дополнительно прибавляют раствор йодистого калия для растворения осадка.

Прозрачные растворы в колбах титруют 0,1 н. раствором гипосульфита. При этом происходит связывание выделившегося йода:



Титрование ведут до появления желтой окраски. Затем в колбы прибавляют по 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют до исчезновения голубой

бу емкостью 150—200 мл. В другую колбу (контроль) наливают 2—3 мл воды. В обе колбы наливают по 10 мл хлороформа и растворяют жир. Затем в колбы добавляют по 20 мл ледяной уксусной кислоты и по 1 мл свежеприготовленного насыщенного раствора йодистого калия. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 3 мин.

Затем проводят титрование выделившегося йода 0,01 н. раствором гипосульфита. Титруют до появления желтой окраски, после чего в колбы прибавляют по 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют до исчезновения голубой окраски.

Вычисление результатов проводят по следующей формуле.

$$X = \frac{(a-b) \cdot T \cdot 0,001269 \cdot 100}{H},$$

где X — перекисное число;

a — количество 0,01 н. гипосульфита, израсходованное на титрование йода, выделившегося в результате реакции жира с йодистым калием, мл;

b — количество 0,01 н. гипосульфита, израсходованное в контрольном определении, мл;

T — поправка к титру раствора гипосульфита;

H — навеска жира.

Оборудование и реактивы: 1) конические колбы емкостью 150—200 мл, бюретки для титрования;

2) уксусная кислота ледяная, насыщенный раствор йодистого калия, хлороформ, крахмал 1%-ный раствор, гипосульфит 0,01 н. раствор.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Растительные масла различаются по составу жирных кислот, что определяет пищевую и техническую ценность масел. Состав жирных кислот данного масла непостоянен и может довольно сильно изменяться в зависимости от условий выращивания растений (прежде всего от влажности и температуры в течение вегетационного периода, а также от условий питания растений).

Поэтому во многих случаях необходимо не только определить общее количество ненасыщенных жирных кислот в масле (с чем можно судить по величине йодного числа), но и более детально охарактеризовать исследуемое масло. Для этого необходимо установить содержание отдельных жирных кислот.

Для определения состава жирных кислот существует несколько методов, но наиболее надежным и перспективным в настоящее время является газо-жидкостная хроматография, предложенная Джеймсом и Мартином. Этот метод включает несколько самостоятельных операций: подготовку образцов к анализу; экстракцию масел из растительного материала; омыление жиров с последующей очисткой и этерификацией образующихся жирных кислот до соответствующих сложных эфиров; заключительным этапом анализа является идентификация и количественное определение полученных эфиров с помощью газовой хроматографии.

Метод газо-жидкостной хроматографии широко используется для качественного и количественного определения соединений различных классов.

Принцип метода. Подготовка образцов к анализу сводится в основном к обезвоживанию и тщательному их измельчению. Экстрагируют растительные масла органическими растворителями (гексаном, петролейным или серным эфиром, спиртами) или их смесями, обуславливающими достаточно полное извлечение жиров из растительного материала.

Омыление жиров до глицерина и солей соответствующих жирных кислот проводят, как правило, в щелочной среде. Характер омыления в значительной степени зависит от природы жирных кислот, входящих в состав масел. Ненасыщенные кислоты требуют более мягких условий омыления, чем насыщенные, так как они в большей степени полимеризуются при разрыве двойных связей.

Полученные в процессе гидролиза кислоты жирного ряда могут быть непосредственно определены с помощью газо-жидкостной хроматографии, однако из-за малой летучести их количественное определение затруднительно. Поэтому жирные кислоты путем этерификации переводят в более летучие метиловые эфиры, используемые в дальнейшем для хроматографического анализа. Метиловые эфиры жирных кислот более эффективно раз-

деляются при меньшей температуре и в более короткий срок. Газо-хроматографический анализ эфиров жирных кислот сводится к разделению смеси на индивидуальные (отдельные) компоненты, идентификации и количественному их определению автоматическими регистраторами (детекторами).

Метод разделения смеси эфиров жирных кислот основан на различной скорости их прохождения (времени удерживания) через колонку, заполненную твердым инертным носителем, пропитанным нелетучей жидкостью. Сущность хроматографического процесса разделения веществ состоит в неодинаковом распределении отдельных компонентов вводимой смеси между двумя не смешивающимися фазами — неподвижной жидкой фазой, нанесенной на твердый носитель хроматографической колонки, и проходящей через колонку подвижной фазой — газом. Обладая большой поверхностью, жидкая фаза (в виде тонкой пленки на инертном носителе) удерживает более растворимые в ней компоненты смеси, в то время как более летучие вещества перемещаются газовым потоком в виде отдельных зон на выход колонки и количественно регистрируются автоматическим детектором.

О подвижности веществ в хроматографической колонке можно судить на основании коэффициента распределения (K), выражающего отношение concentra-

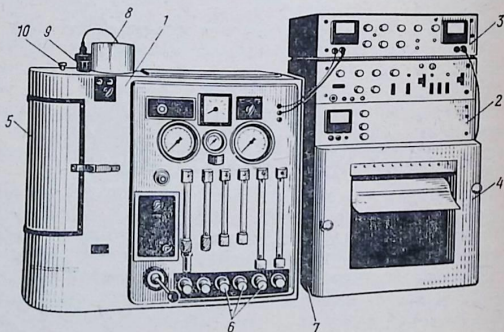


Рис. 27. Общий вид газового хроматографа.

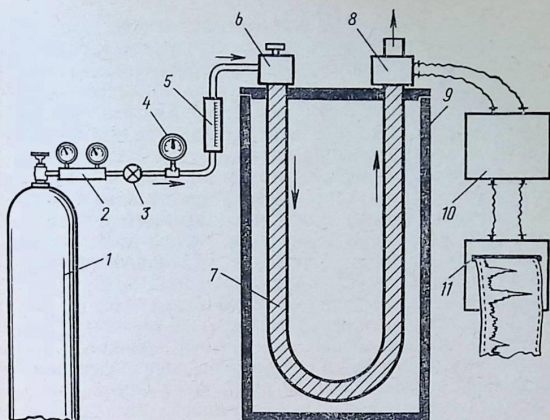


Рис. 28. Схема устройства газового хроматографа:

1 — баллон с газом-носителем; 2 — редуктор; 3 — вентиль рабочего давления; 4 — манометр рабочей сети; 5 — измеритель расхода газа-носителя; 6 — место ввода образца; 7 — хроматографическая колонка; 8 — детектор теплопроводности; 9 — термостат; 10 — блок усиления; 11 — самописец.

ции вещества в неподвижной жидкой фазе ($C_{ж}$) к его концентрации в подвижной газовой фазе ($C_{г}$)

$$K = \frac{C_{ж}}{C_{г}}.$$

Чем шире это отношение, тем менее подвижным является соединение, выход которого следует ожидать последним.

Описание прибора. Газовый хроматограф «ХРОМ-ЗЖКЗ» — лабораторный прибор, при помощи которого можно анализировать вещества методом газ-адсорбционной и газо-жидкостной хроматографии (рис. 27 и 28).

Смесь разделяется на сменных колонках различной длины из нержавеющей стали, находящихся в термостате. Инертный газ-носитель (гелий, азот, аргон и т. п.) из баллона высокого давления 1 (см. рис. 28) поступает через редуктор 2 и систему фильтров тонкой очистки в сеть прибора. Для плавной регулировки расхода газа

на пути его движения в хроматографическую колонку 7 устанавливается металлический игольчатый вентиль 3, позволяющий изменять давление в рабочей сети и скорость потока газа-носителя. Контроль за расходом газа производится с помощью ротаметра 5. Пройдя ротаметр, газ-носитель поступает в испаритель 6, в котором введенная методом инъекции проба при высокой температуре (150—400°C) переводится в газообразное состояние. Образующиеся пары смеси различных веществ захватываются газовым потоком подвижного носителя и поступают в хроматографическую колонку. В хроматографической колонке благодаря различной прочности связей между адсорбентом (твердым или жидким) и отдельными компонентами вводимой смеси идет разделение на отдельные зоны, состоящие из индивидуальных веществ. Каждая «зона» компонентов движется с помощью газа-носителя со строго определенной скоростью по колонке, вследствие чего происходит еще более четкое разделение анализируемых веществ. Для количественного определения элюируемых потоком газа соединений на выходе хроматографической колонки установлен детектор 8. Компонент, проходя через детектор, изменяет параметры его стабилизированного состояния, что проявляется, как правило, в изменении электросигнала, подаваемого на блок усиления 10 и самописец 11.

Детектор устроен таким образом, что чем выше концентрация данного соединения в газовом потоке, тем сильнее изменяется сигнал, снимаемый с детектора, и тем больше отклонение пера самописца от нулевой линии. Записанную таким образом хроматограмму дешифрируют, для чего измеряют площади или высоты пиков и сравнивают со стандартными образцами (метчиками). Следует отметить, что нормальная работа хроматографа и высокая воспроизводимость результатов могут быть достигнуты лишь при строго заданной скорости потока газа-носителя и рабочей температуре колонки. Поэтому основные узлы хроматографа (испаритель, колонки и детектор) помещены в термостат 9. Общий вид и основные детали хроматографа «ХРОМ-ЗЖКЗ» представлены на рисунке 27. Хроматограф состоит из 4 блоков — аналитического 1, блока управления 2, блока усилителей 3 и регистрирующего самописца 4. Основной рабочей частью прибора является аналитический блок, в котором помещены: термостат 5 с хроматографическими

колонками, вентили регулирования расхода газа-носителя 6, ротаметры 7, детектор теплопроводности 8 и пламенно-ионизационный 9, испаритель 10; позиционный датчик, позволяющий контролировать рабочую температуру колонки, испарителя и детектора и т. п.

Блок управления содержит источники питания и элементы управления чувствительностью детектора, температурного режима основных узлов хроматографа, установки нулевой линии самописца.

Ход определения. А. Г. Верецагиным предложена следующая методика определения состава жирных кислот в растительных маслах. В фарфоровую обезжиренную ступку помещают среднюю пробу растительного образца (1—3 г при общем содержании жира в навеске 0,4—0,6 г) и измельчают. После тщательного растирания анализируемого материала в ступку приливают 10—15 мл гексана (х. ч.) и растирают пестиком еще 5—7 мин.

Затем растительную массу переносят на стеклянный фильтр (№ 3 или № 4), соединенный с помощью шлифа с конической колбой емкостью 100—150 мл (рис. 29). В нижней части фильтра должен быть патрубок (отвод) для присоединения к водоструйному насосу. Растительные остатки со ступки сливают 3—4 раза гексаном (по 10—15 мл) и также переносят на фильтр при постоянном отсасывании.

После окончания экстракции липидов весь фильтрат для выпаривания гексана сливают в круглодонную колбу роторного испарителя. Если такого испарителя нет, растворитель можно удалять в колбах любой конструкции, предназначенных для выпаривания под вакуумом (см. рис. 25).

Чтобы ускорить выпаривание растворителя (гексана), колбу подогревают путем небольшого повышения температуры на водяной или песчаной бане.

Затем производят омыление выделенных жиров. Для этого после выпаривания растворителя из колбы берут 3—4 капли растительного масла и переносят в грушевидную колбу (рис. 30), приливают 20—25 мл этилового спирта (96%-ного) и бросают кусочек (0,5 г) металлического натрия. Металлический натрий заготавливают заранее, нарезаая кусочками; хранят его под бензолом. После того как весь натрий прореагирует, колбу помещают на водяную баню и присоединяют к ней обратный холодильник, подключенный к водопроводной системе.



Рис. 29.

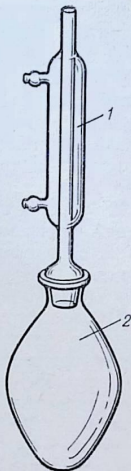


Рис. 30.

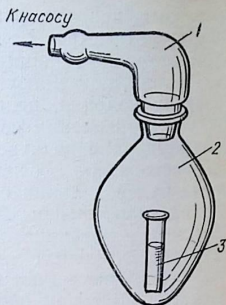


Рис. 31.

Рис. 29. Прибор для экстракции липидов:

1 — фильтр № 3; 2 — колба емкостью 150 мл.

Рис. 30. Прибор для омыления липидов:

1 — обратный холодильник; 2 — грушевидная колба.

Рис. 31. Прибор для выпаривания под вакуумом:

1 — переходный патрубок; 2 — грушевидная колба; 3 — пробирка.

Раствор доводят до кипения и кипятят 1 ч. После этого колбу отсоединяют от холодильника и, придерживая деревянным зажимом, переносят на песчаную баню для удаления этилового спирта. Полного испарения жидкости следует избегать. Поэтому при упаривании $\frac{2}{3}$ объема раствора к нему приливают 5—6 мл дистиллированной воды. Операцию повторяют несколько раз до полного удаления запаха спирта. В растворе остаются соли жирных кислот и глицерин. Неомыляемые липиды, находящиеся в водном растворе солей жирных кислот, экстрагируют. Для экстракции в колбу приливают 8—10 мл гексана, слегка взбалтывают и после разделения жидкостей верхний слой гексана осторожно сливают (отбрасывают), полностью сохраняя в колбе нижний водный раствор солей жирных кислот. Операцию повторяют 4—5 раз, после чего полученный прозрачный раствор подкисляют 3—4 каплями 10%-ной H_2SO_4 (реакцию

раствора проверяют по лакмусу). В результате реакций замещения, протекающих между солями и серной кислотой, образуются свободные жирные кислоты и Na_2SO_4 . Жирные кислоты выделяют многократной экстракцией гексаном (3—4 раза), добавляя его каждый раз к раствору по 10 мл.

Экстракт полученных жирных кислот собирают в грушевидную колбу емкостью 50—60 мл (рис. 31). Такая форма сосуда позволяет после упаривания растворителя собрать анализируемые кислоты на дне колбы в небольшом объеме. Выпаривание гексана, как и в предыдущем случае, проводят на роторном испарителе или под вакуумом, используя водоструйный насос.

Оставшиеся на дне и стенках колбы после удаления гексана капли жирных кислот смывают небольшими порциями (по 0,5—1 мл) гексана. Полученный раствор объемом 3—4 мл собирают в пробирку с плоским дном высотой 4—5 см и диаметром 1 см. Для удаления гексана пробирку с раствором жирных кислот осторожно с помощью пинцета помещают в колбу со шлифом (см. рис. 31) и при помощи стеклянного переходного патруб-ка присоединяют к водоструйному насосу. Откачивают воздух и выпаривают гексан.

Если необходимо приостановить анализ, в пробирку с остатками жирных кислот после удаления гексана добавляют 2—3 капли бензола (химически чистого) и помещают ее в холодильник. При кратковременной остановке анализа приливают 2—3 мл гексана.

Выделенные кислоты могут быть идентифицированы самостоятельно при высокой температуре (200—400°C) газо-жидкостной хроматографией. Однако из-за опасности химической деструкции их, как правило, переводят в метиловые эфиры.

Перед началом метилирования из пробирки с жирными кислотами тщательно удаляют растворитель (бензол или гексан). Выпаривание проводят, соблюдая осторожность, так как возможны толчки пара перегретого растворителя и выбрасывание всего содержимого пробирки.

После удаления растворителя проводят метилирование, используя в качестве катализатора ацетилхлорид. Для этого оставшиеся на дне пробирки органические кислоты растворяют в 2 мл метилового спирта, на внутреннюю стенку пробирки (держая ее от себя наклонно)

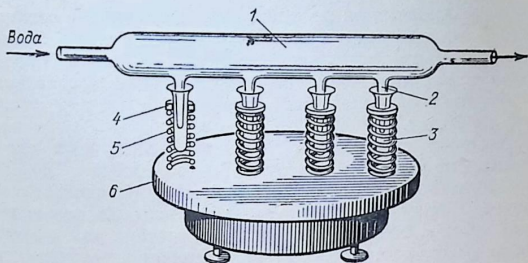


Рис. 32. Прибор для метилирования:

1 — микрохолодильник; 2 — отросток холодильника; 3 — пробирка; 4 — резиновое кольцо; 5 — прижимная пружина; 6 — электропечь с закрытой спиралью.

осторожно вносят 2—3 капли химически чистого ацетилхлорида и перемешивают. Затем пробирку присоединяют с помощью резинового кольца и пружины к отводу микрохолодильника, как указано на рисунке 32, и медленно нагревают над электроплиткой с закрытой спиралью. Кипение раствора должно быть слабым и спокойным в течение 1 ч. Для этого пробирки должны находиться на некотором расстоянии над поверхностью электроплитки, как указано на рисунке 32. После часового кипения остаток метанола выпаривают в вакууме, поместив пробирку, как и прежде, в грушевидную колбу и подсоединив ее с помощью переходного патрубка к водоструйному насосу (см. рис. 31). Затем в освобожденную от метанола пробирку для растворения примесей добавляют 2—3 капли дистиллированной воды (лучше из капельницы) и проводят экстракцию метиловых эфиров гексаном. Растворитель приливают небольшими порциями (по 0,5—1 мл) 3—4 раза, каждый раз слегка взбалтывая от руки содержимое пробирки. После разделения эмульсии гексан с растворенными в нем эфирами осторожно сливают в чистую сухую конусообразную пробирку диаметром около 1 см и высотой 3 см, оставляя каждый раз в предыдущей пробирке капли воды, которые затем отбрасывают. Воду в сухую пробирку, куда сливают гексановый раствор эфиров кислот, переносить нельзя. После окончания экстракции эфиров гексан вновь упаривают под вакуумом без нагревания, а

метилловые эфиры жирных кислот используют для хроматографического анализа.

Полученные метилловые эфиры жирных кислот разделяют газо-жидкостной хроматографией. При хроматографии в качестве твердых носителей (сорбентов) для нанесения жидкой фазы чаще всего используют различные сорта кизельгура (диатомовой земли)—Целит-545 или Хромосорбы, а также другие инертные материалы, обладающие низкой каталитической активностью. Перед тем как наносить жидкую фазу, твердый носитель отмывают концентрированной HCl , затем раствором KOH , раствором NH_4OH , промывают водой и тщательно высушивают. Неподвижной жидкой фазой, образующей пленку на поверхности инертного носителя, служат высококипящие силиконовые масла, поливинилацетат, поли-(диэтиленгликольсукцинат), поли-(этиленгликольадипат) и др. Жидкая фаза наносится в количестве 2—6% массы неподвижного твердого носителя. В качестве газа-носителя используют гелий, азот или аргон; расход газа, как правило, не превышает 50—100 $\text{см}^3/\text{мин}$. Хроматографические колонки обычно набивают носителем с нанесенной на него жидкой фазой при помощи вибратора и под давлением того газа, который используется в процессе разделения. Можно набивать колонку, создавая внутри нее вакуум.

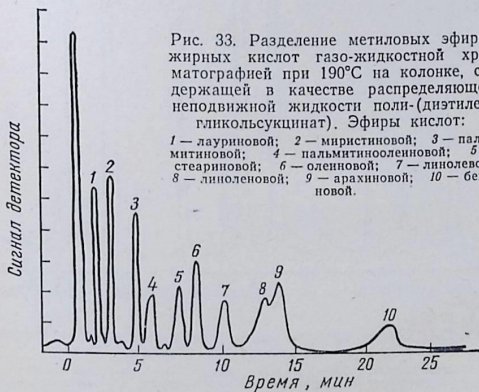


Рис. 33. Разделение метиловых эфиров жирных кислот газо-жидкостной хроматографией при 190°C на колонке, содержащей в качестве распределяющей неподвижной жидкости поли-(диэтиленгликольсукцинат). Эфиры кислот:

1 — лауриновой; 2 — миристиновой; 3 — пальмитиновой; 4 — пальмитиноолеиновой; 5 — стеариновой; 6 — олеиновой; 7 — линолевой; 8 — линоленовой; 9 — арахидиновой; 10 — бегеновой.

Метилловые эфиры жирных кислот разделяют на заполненной сорбентами хроматографической колонке при температуре 150—300°C. Пробу вводят в колонку с помощью шприца с максимальной быстротой; количество пробы обычно составляет до 5—10 мкл. Однако для каждого конкретного объекта и в зависимости от условий работы хроматографа оптимальный объем пробы определяют опытным путем. На рисунке 33 показана хроматограмма смеси метиловых эфиров жирных кислот на поли-(диэтиленгликольсукцинате).

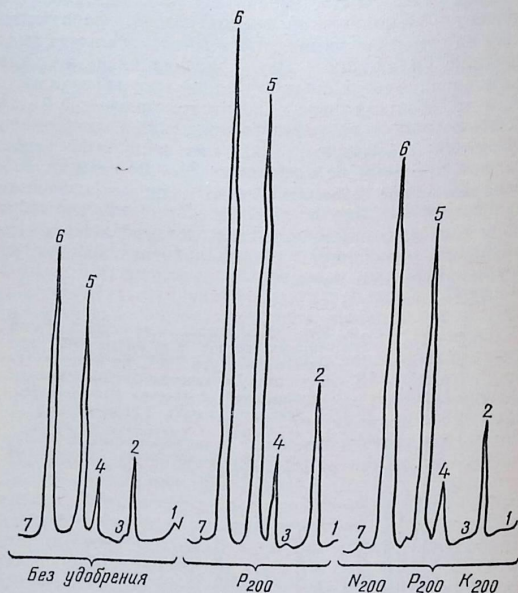


Рис. 34. Схема хроматограммы жирнокислотного состава масла подсолнечника. Кислоты:

1 — миристиновая; 2 — пальмитиновая; 3 — пальмитиноолеиновая;
4 — стеариновая; 5 — олеиновая; 6 — линолевая; 7 — линоленовая.

Качественный анализ на хроматографе проводят, используя метчики идентифицированных эфиров чистых кислот. Количество каждого компонента в данной пробе определяют следующим образом. На хроматограмме проводят базовую линию, соединяющую основания всех пиков. Затем измеряют высоту каждого пика и его ширину на половине высоты. После этого вычисляют площадь пика (чаще по площади треугольника, можно использовать и другие способы расчета площадей пиков). Сумма площадей всех пиков метиловых эфиров кислот принимается за 100%. Зная, сколько образца было введено в колонку хроматографа, можно рассчитать количество каждой кислоты, содержащейся в данном образце.

На рисунке 34 представлена схема хроматограммы кислот, содержащихся в масле подсолнечника, выращенного при различных условиях питания растений.

Оборудование и реактивы: 1) газовый хроматограф, прибор для экстракции липидов, прибор для выпаривания под вакуумом, прибор для омыления липидов, прибор для метилирования, водоструйный или масляный насос, фарфоровые ступки, электроплитка, пробирки, пипетки, шприцы;

2) гексан (химически чистый), спирт этиловый 96%-ный, спирт метиловый, натрий металлический, H_2SO_4 10%-ная, бензол, ацетилхлорид.

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Органические кислоты — промежуточные продукты обмена веществ. Они содержатся во всех растениях и образуются в результате многочисленных биохимических реакций, среди которых основными следует считать реакции цикла ди- и трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла. Многие органические кислоты являются исходными соединениями для биосинтеза аминокислот, сахаров, жиров, витаминов и некоторых других биологически активных соединений. Кислоты могут использоваться в качестве энергетического материала при дыхании растений.

Органические кислоты содержатся в растениях в свободном состоянии (плодах, ягодах) или в виде кислых и нейтральных солей (листьях, особенно бобовых культур — 15—25% сухого вещества). Однако в некоторых растениях (щавель, ревень, бегония, кактусы и другие суккуленты) много свободных кислот и в листьях, поэтому кислотность клеточного сока этих растений высокая.

Количество кислот в растении непостоянно и зависит от сортовых особенностей плодов и овощей, степени зрелости их, а также от условий выращивания растений. Большое влияние на кислотность растений оказывают формы минеральных удобрений. Например, при внесении нитратных форм азотных удобрений содержание кислот в растениях будет более высоким, чем при внесении аммиачных форм.

Разные растения различаются и по составу накапливаемых в них кислот. Например, в яблоках, рябине, барбарисе преобладает яблочная кислота; в лимонах и других цитрусовых — лимонная, в винограде — винная кислота. Таким образом, определение количества и состава органических кислот в растениях имеет не только теоретический интерес, но и представляет важное практическое значение.

При определении содержания органических кислот или их солей различают: 1) общую кислотность, или общее содержание кислоты, понимая под этим количество анионов и недиссоциированных молекул кислоты; 2) концентрацию водородных ионов, часто обозначаемую «истинная кислотность»; 3) титруемую кислотность — концентрацию свободной кислоты.

Однако это справедливо только для одноосновных кислот. У двуосновных кислот часть общей кислотности, которую можно титровать щелочью, состоит из двух фракций: недиссоциированной кислоты и одновалентных кислотных ионов.

При анализах органические кислоты можно экстрагировать из свежих, замороженных или высушенных растительных тканей.

Однако следует иметь в виду, что высушивание при комнатной температуре ведет к потерям органических кислот вследствие дыхания, а высушивание в условиях повышенной температуры — к изменению в содержании органических кислот (потери летучих кислот или их эфиров, взаимные превращения кислот, взаимодействие их с углеводами и т. д.). Поэтому для определения органических кислот следует быстро фиксировать материал в термостате при 120—125°C в течение 15—20 мин, а затем досушивать при 50—60°C. Для тонких биохимических исследований лучше всего фиксировать материал жидким азотом с последующим высушиванием лиофилизацией (см. стр. 106).

Для экстракции кислот используют воду или органические растворители (чаще эфир). Однако чистый эфир не растворяет соли органических кислот. Поэтому для экстракции солей материал предварительно подкисляют минеральной кислотой. При этом соли органических кислот переходят в свободное состояние.

При экстракции водой из растительного материала, кроме кислот, извлекается много сопутствующих веществ — сахаров, пектиновых веществ, аминокислот, белков, которые перед количественным определением необходимо тщательно удалить из раствора. Удаляют эти вещества или экстракцией и осаждением, или при помощи катионо- и анионообменных смол. Эфир не извлекает углеводы, аминокислоты и белки, но растворяет жиры и липоиды.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ

Величину общей кислотности можно определить алкалиметрическим или ацидиметрическим титрованием с использованием соответствующих индикаторов или потенциометрически.

Принцип метода. Кислоты извлекаются из измельченного растительного материала в результате нагревания с водой при температуре 80—90°C в течение 30 мин. Извлеченные кислоты оттитровывают раствором щелочи.

Общее количество кислот обычно пересчитывают на яблочную кислоту, так как она преобладает во многих плодах и овощах.

Ход определения. Свежие плоды, овощи или листья растений тщательно измельчают на терке, в мясорубке или в ступке. Растительную массу перемешивают, берут навеску 20 г и переносят без потерь в широкогорлую колбу объемом 200 мл. В колбу приливают около 150 мл дистиллированной воды и выдерживают в течение 30 мин в водяной бане при температуре 80—90°C.

Затем колбу охлаждают водопроводной водой, доводят до метки и фильтруют в сухой стакан или колбу. Полученный фильтрат служит для определения общей кислотности. 50 мл фильтрата, содержащего кислоты, переносят в коническую колбу емкостью 100 мл. Затем в колбу добавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки 0,1 н. раствором NaOH до розового окрашивания. Вместо фенолфталеина в качестве индикатора можно использовать спиртовой раствор тимолфталеина. В этом случае титруют до появления синего окрашивания.

У слабо окрашенных растворов переход окраски легче уловить, если сравнивать окраску с рядом стоящей колбой с таким же количеством вытяжки из растений с добавлением такого же количества капель фенолфталеина или тимолфталеина. В том случае когда раствор сильно окрашен и переход окраски раствора при добавлении щелочи определить трудно, при титровании используют лакмусовую бумагу. Капли жидкости из колбы при титровании переносят на кусочек лакмусовой бумаги и наблюдают изменение окраски.

Вычисление результатов. При расчете необходимо учитывать количество щелочи, израсходованное на тит-

рование, и поправку к ее титру. Расчет можно вести по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 200 \cdot 10}{n \cdot 50},$$

где a — количество 0,1 н. NaOH, пошедшее на титрование, мл;

T — поправка к титру щелочи;

200 — общий объем вытяжки, мл;

50 — объем вытяжки, взятый для титрования, мл;

n — навеска материала, г;

10 — перевод в миллиэквиваленты кислот (1 мл 0,1 н. NaOH соответствует 0,1 м.-экв. кислоты);

X — количество кислот в растительном образце, м.-экв.

Часто содержание кислот выражают не в миллиэквивалентах на 1 г, а в процентах.

Для этого число миллиэквивалентов умножают на массу 1 м.-экв. кислоты (в граммах): 1 м.-экв. яблочной кислоты равен 67 мг (0,067 г), лимонной — 64 мг, винной — 65 мг, щавелевой — 45 мг.

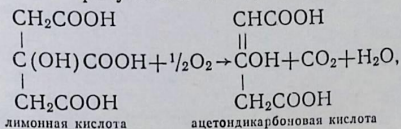
Обычно в зависимости от преобладания той или иной органической кислоты в изучаемом объекте для пересчета используют соответствующий коэффициент.

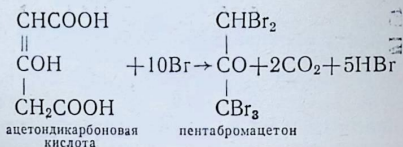
Оборудование и реактивы: 1) водяные бани, колбы мерные емкостью 200 мл, колбы конические емкостью 100—200 мл, воронки, пипетки, микробюретки, фильтры; 2) 0,1 н. NaOH, фенолфталеин или тимолфталеин, лакмусовая бумага.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Для определения лимонной кислоты лучшими являются методы, основанные на окислении лимонной кислоты до ацетона с последующим превращением его в пентабромацетон. Ниже приведена одна из модификаций этого метода (по Пьючеру).

Принцип метода. Лимонная кислота окисляется перманганатом в присутствии KBr до пентабромацетона:





Затем бром вытесняется из пентабромацетона под действием Na_2S , и образующийся бромид определяют йодометрически. По количеству брома вычисляют содержание лимонной кислоты в растворе.

Ход определения. Навеску тщательно измельченных свежих или высушенных плодов, ягод или листьев растений переносят в мерную колбу с широким горлом, приливают 150 мл воды и экстрагируют в течение 1 ч на горячей водяной бане. В зависимости от предполагаемого содержания лимонной кислоты величина навески сухого материала составляет 5—10 г, а свежего — до 50 г. Затем экстракт фильтруют в чистую сухую колбу емкостью 200 мл. При исследовании высушенного материала одной экстракции бывает недостаточно. Поэтому проводят 3—4 извлечения меньшими объемами воды по 30 мин и экстракты соединяют. Колбы доводят водой до метки. Обычно водный экстракт содержит большее или меньшее количество белковых веществ, которые необходимо выделить из раствора. Для осаждения белков берут 25 мл фильтрата, переносят в мерную колбу объемом 50 мл и прибавляют 5 мл 20%-ного раствора метафосфорной кислоты. Вместо метафосфорной кислоты можно добавить 5—10 мл 5%-ной фосфорновольфрамовой кислоты. Взбалтывают и оставляют колбу на 5 мин для осаждения белков. Жидкость доводят до метки и фильтруют в сухой стакан или колбу. 25 мл фильтрата переносят в мерную колбу объемом 50 мл и нейтрализуют избыток метафосфорной кислоты 1 н. NaOH . Раствор в колбе доводят водой до метки. Для анализа берут из колбы 10 мл раствора.

Приводимый метод позволяет определить 2,5—5,0 мг лимонной кислоты. Однако в процессе анализа проводят пятикратное разбавление. Поэтому величину навески растительного материала для анализа определяют таким образом, чтобы в 10 мл раствора содержалось 2,5—25 мг лимонной кислоты (с учетом всех разбавлений).

К 10 мл исходного раствора приливают 2 мл 18 н.

H_2SO_4 , 8 мл воды и слабо кипятят в течение 5 мин. После охлаждения добавляют 1 мл насыщенной бромной воды и оставляют на 5 мин. Затем смесь фильтруют через стеклянный фильтр-тигель Гуча № 4, который вставляют в длинногорлую коническую колбу емкостью 100 мл, имеющую метку на 35 мл. Фильтрацию проводят при слабом отсасывании. Фильтр промывают малыми порциями воды, пока количество фильтрата не будет равно примерно 35 мл. Затем отсоединяют фильтр и доводят водой точно до 35 мл.

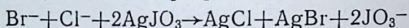
Колбу опускают в водяную баню с температурой 20°C (строго следить за температурой), добавляют 2 мл 1 М раствора KBr и 5 мл 1,5 н. раствора KMnO_4 и выдерживают колбу на бане в течение 10 мин. После этого колбу опускают в химический стакан емкостью около 1 л, в стакан наливают ледяную воду и охлаждают раствор в колбе до $8-10^\circ\text{C}$. После охлаждения в колбу добавляют при помешивании по каплям сильно охлажденный 3%-ный раствор H_2O_2 , пока раствор в колбе не обесцветится.

При этих условиях имеющаяся в растворе лимонная кислота превращается в пентабромацетон, который необходимо выделить из раствора. Для экстракции пентабромацетона используют чистый петролейный эфир с температурой кипения $40-60^\circ\text{C}$. Раствор из колбы переносят в делительную воронку емкостью 100—125 мл и ополаскивают колбу небольшими порциями петролейного эфира (общий объем эфира 25 мл). Эфир переносят в делительную воронку. Эфир с раствором интенсивно встряхивают и водный слой сливают. Затем петролейно-эфирный экстракт в делительной воронке несколько раз промывают небольшими порциями свободной от галогенов воды, сливая каждый раз промывные воды.

Промытый водой экстракт встряхивают в делительной воронке с двумя последовательными порциями (каждая по 3 мл) 4%-ного раствора $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и каждый раз сливают окрашенный раствор в мерную колбочку объемом 25 мл. Затем петролейный эфир в делительной воронке промывают 2—3 раза водой (по 2 мл) до полного удаления брома (промывная вода должна быть прозрачной). Промывные воды сливают в мерную колбочку, добавляют 2 мл 2 М H_3PO_4 и несколько тщательно промытых водой и кислотой зерен кварца или небольших кусочков битого стекла. Содержимое колбы

осторожно кипятят в течение 5 мин, затем охлаждают и добавляют из микробюретки точно 5 мл 0,0125 М раствора KCl. Для приготовления раствора KCl берут 0,9319 г высушенной соли, растворяют в 0,085 М H_3PO_4 и этим раствором доводят объем до 1 л. После добавления KCl раствор в колбе доливают водой до метки.

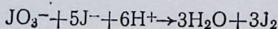
Титрометрическое определение основано на том, что в раствор переходит количество ионов JO_3^- , эквивалентное содержанию в растворе ионов Br^- и Cl^- . Для реакции используют йодат серебра:



Йодат серебра готовят следующим образом. В химическом стакане емкостью 2—3 л растворяют 23 г KJO_3 и объем раствора доводят водой примерно до 600 мл. В другом стакане растворяют 18 г AgNO_3 в 400 мл воды. Затем раствор AgNO_3 приливают по каплям в раствор KJO_3 при постоянном перемешивании жидкости в стакане. Смесь оставляют стоять на ночь в темноте. Прозрачную жидкость сливают, а осадок переносят в большой стеклянный фильтр-тигель № 4. Осадок на фильтре многократно промывают водой для удаления избытка KJO_3 . После 8—10 промываний от каждого фильтрата берут в пробирку 10 мл и смешивают с несколькими каплями 0,85 М H_3PO_4 и несколькими каплям 5%-ного раствора KJ. При этом появляется характерное для йода желтое окрашивание. Продолжают промывание до тех пор, пока интенсивность окрашивания в следующих друг за другом фильтратах не станет одинаковой. После этого осадок высушивают в вакуум-эксихаторе при комнатной температуре, растирают в порошок и хранят в эксихаторе в темной склянке.

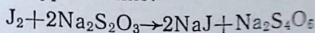
Дальнейший ход определения состоит в следующем. В коническую колбу с притертой пробкой емкостью 50 мл вносят около 0,25 г сухого йодата серебра и содержащее мерной колбочки (25 мл), не смывая остатка со стенок, переливают в коническую колбу. Колбу плотно закрывают и встряхивают в течение 5 мин. При этом идет реакция между ионами Br^- , Cl^- и AgJO_3 , которая приведена выше. Затем приступают к определению количества ионов йодата, перешедших в раствор.

Ионы йодата соединяются с ионами J^- по следующему уравнению:



Количество йодата как окислителя определяют йодометрически. Для этого раствор, содержащийся в конической колбе, фильтруют в чистую сухую колбу через фильтр, свободный от хлоридов. Берут пипеткой три порции фильтрата и переносят их в три конические колбочки емкостью по 50 мл. В каждую колбочку добавляют по две капли 0,085 М раствора H_3PO_4 и по 1 мл 10%-ного раствора КЖ. Растворы в колбочке взбалтывают в течение 5 мин. При этом выделяется свободный йод.

Количество йода определяют титрованием с гипосульфитом (тиосульфатом). Свободный йод связывается по следующему уравнению:



Для титрования используют 0,01 н. раствор гипосульфита. Титрование сначала ведут до появления желтой окраски, затем в колбы прибавляют по 0,5 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют до исчезновения голубой окраски.

Для проведения определений фильтры должны быть свободны от хлоридов. Для очистки фильтры промывают кипящей водой, не содержащей хлоридов, высушивают и хранят в закрытом сосуде.

«Холостые» определения необходимо проводить с каждым вновь приготовленным 4%-ным раствором Na_2S . При холостом определении в мерную колбу емкостью 25 мл наливают 6 мл раствора Na_2S , 5 мл воды, 2 мл 2 М H_3PO_4 и кладут несколько зерен кварца или кусочков битого стекла. Содержимое колбы кипятят в течение 5 мин, охлаждают и дальнейший анализ проводят так же, как указано выше. Значение холостого определения выводят на основании среднего из четырех отдельных титрований.

Вычисление результатов. Количество йодата, содержащегося в анализируемой пробе (25 мл), вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 100 \cdot 25}{6 \cdot v},$$

где X — количество миллимолей йодата;
 a — количество 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованного на титрование образца, мл;
 T — поправка к титру 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

100 — коэффициент для перевода 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в 1 н. раствор;

6 — количество атомов свободного йода, выделяющегося на каждый ион IO_3^- ;

v — объем вытяжки, взятой для титрования (5 мл).

Количество миллимолей йодата, содержащегося в хлостой пробе, вычисляют следующим образом.

$$X_1 = \frac{a_1 \cdot T \cdot 100 \cdot 25}{6 \cdot v_1},$$

где X_1 — количество миллимолей йодата;

a_1 — количество 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованное на титрование контроля, мл;

v_1 — объем вытяжки, взятой для титрования (5 мл).

Остальные обозначения те же, что и при расчете количества йодата в образцовом растворе.

Таким образом, в 25 мл раствора для титрования (в 10 мл раствора, взятого для анализа) содержится $X - X_1$ миллимолей йодата. Чтобы рассчитать количество лимонной кислоты, используют следующие формулы.

В 25 мл раствора содержится

$$\frac{X - X_1}{5q}$$

миллимолей или

$$\frac{(X - X_1) \cdot 38,424}{q} \text{ мг лимонной кислоты,}$$

где $X - X_1$ — количество миллимолей йодата;

q — эмпирически найденный коэффициент, равный 0,980, показывающий, какую долю теоретического количества лимонной кислоты можно обнаружить в растворе;

38,424 — коэффициент, представляющий собой $\frac{1}{5}$ молекулярной массы лимонной кислоты, который вводят потому, что 1 моль пентабромацетона дает 1 г-экв. брома.

Оборудование и реактивы: 1) водяная баня, колбы для фильтрования при разрежении емкостью 100 и 500 мл, стеклянные фильтры-тигли № 4, вакуум-эксикатор, колбы мерные емкостью 25, 50, 100, 200 мл и 1 л, колбы конические емкостью 25 и 50 мл, делительные воронки, микробюретки, стаканы емкостью 2, 3, 1 и 0,5 л, пипетки;

2) 18 н. H_2SO_4 , 1 М раствор KBr , H_3PO_4 2 М, 0,85 М и 0,085 М, а также 20%-ная, 0,1 н. и 0,01 н. $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$, H_2O_2 3%-ный раствор, 1,5 н. KMnO_4 , $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 4%-ный раствор, KCl , 0,0125 М раствор в 0,085 М H_3PO_4 , KJ или NaJ 10%-ный раствор, KJ (сухой), крахмал 1%-ный раствор, фосфорновольфрамовая кислота 5%-ный раствор, AgNO_3 (сухой), петролейный эфир, бромная вода (насыщенная).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Один из наиболее точных методов определения яблочной кислоты разработан Пьючером и Викери.

Принцип метода. Яблочную кислоту экстрагируют из растительного материала эфиром и затем в кислом растворе в присутствии бромистого калия переводят при помощи перманганата в бромпроизводное. Бромпроизводное яблочной кислоты можно перегнать с водяным паром; с 2,4-динитрофенилгидразином оно образует нерастворимый в воде осадок глиоксаль-2,4-динитрофенилозаона оранжево-желтого цвета. После подщелачивания раствор озаона в пиридине образует соединение голубого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству присутствующей яблочной кислоты. Интенсивность окраски раствора определяют на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре.

Ход определения. Навеску 2—10 г сухого, тщательно измельченного материала растирают в ступке в присутствии 4—5 мл 25%-ной H_2SO_4 и оставляют стоять на ночь.

Серную кислоту необходимо добавлять для того, чтобы соли органических кислот перевести в свободные кислоты. На следующий день влажную массу обезвоживают тщательным растиранием с порошком безводного сернокислого натрия и оставляют стоять на ночь. При определении яблочной кислоты в свежем растительном материале к навеске измельченной массы необходимо прибавить 4 н. H_2SO_4 и затем в ступке обезводить материал сернокислым натрием.

Определению яблочной кислоты могут мешать углеводы и некоторые аминокислоты, поэтому экстракцию кислоты необходимо проводить очищенным безводным эфиром, а не водой (способ очистки эфира описан при изложении методики определения содержания жира в растениях). Сухой порошок количественно переносят в бумажный патрон, который помещают в экстрактор аппарата Сокслета, и кислоты экстрагируют эфиром в те-

чение 36 ч. Эфирный экстракт переносят в делительную воронку и несколько раз взбалтывают с водой до перехода органических кислот в водную фазу. Общий объем водной фазы должен составлять около 100—150 мл.

Водную вытяжку переносят в широкий стакан емкостью около 200 мл и нагревают на водяной бане под тягой до полного удаления следов эфира. Затем раствор переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, ополаскивают небольшими порциями воды и нейтрализуют раствор 5 н. NaOH по фенолфталеину. После этого раствор доводят водой до метки. Раствор профильтровывают в чистую сухую колбу. Фильтрат используют для определения яблочной и других органических кислот.

Для определения яблочной кислоты необходимо взять 20 мл фильтрата. Указанный метод позволяет определить 0,2—2,0 мг яблочной кислоты, поэтому навеску для анализа берут с таким расчетом, чтобы в ней содержалось 2,0—20 мг кислоты.

К 20 мл раствора приливают 4 мл 20 н. H_2SO_4 . Раствор осторожно кипятят в течение 5 мин для удаления последних следов эфира и других летучих веществ. После охлаждения к раствору добавляют 1 мл насыщенной бромной воды. Через 5 мин смесь фильтруют при отсасывании в коническую колбу с длинным горлышком через стеклянный фильтр-тигель № 4. Объем колбы около 100 мл; колба должна иметь метку на 35 мл. Фильтр промывают небольшими порциями дистиллированной воды, пока объем жидкости в колбе не составит около 35 мл. Затем раствор в колбе доводят водой точно до 35 мл.

После этого в колбу приливают 2 мл 1 М раствора бромистого калия. Колбу помещают в водяную баню с температурой точно 20°C, выдерживают 10 мин, после чего к раствору приливают 5 мл 1,5 н. $KMnO_4$ и еще выдерживают в течение 5—10 мин, периодически перемешивая жидкость. В результате реакции выделяются пары брома, поэтому эту операцию необходимо проводить в вытяжном шкафу. Затем колбу помещают в химический стакан объемом около 1 л или в водяную баню, добавляют в стакан воду со льдом и охлаждают смесь до 5—10°C. После этого по каплям в колбу добавляют охлажденный раствор 3%-ной перекиси водорода до полного обесцвечивания раствора.

Избыток перекиси водорода удаляют, прибавляя по каплям 0,02 н. раствор перманганата до появления на короткое время слабо-розовой окраски.

В условиях опыта содержащаяся в пробе лимонная кислота превращается в пентабромацетон, который необходимо отделить от продуктов окисления яблочной кислоты. Пентабромацетон выпадает в виде белого мелкого осадка. Для удаления пентабромацетона раствор обрабатывают петролейным эфиром. После окончания окисления раствор переносят в делительную воронку объемом 100—150 мл, колбу ополаскивают несколькими небольшими порциями чистого петролейного эфира и сливают этот эфир в делительную воронку. Смесь взбалтывают 5—6 раз, добавляя каждый раз примерно по 5 мл петролейного эфира. Общий объем эфира в воронке должен составлять 50—60 мл. Делительную воронку энергично встряхивают и после отстаивания водную фазу количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Петролейный эфир промывают в делительной воронке 3—4 раза водой (по 3—5 мл) и промывные воды сливают в мерную колбу. Раствор в колбе доводят до метки, а оставшийся эфирный экстракт используют для количественного определения лимонной кислоты.

После удаления пентабромацетона из мерной колбы берут 50 мл раствора и переносят в отгонную колбу. К колбе присоединяют холодильник Либиха с длинной трубкой. В приемник наливают 10 мл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2,5 н. HCl и 20 мл воды. Конец трубки холодильника Либиха погружают в раствор 2,4-динитрофенилгидразина. Приемник для охлаждения ставят в наполненный холодной водой кристаллизатор.

Для приготовления раствора 2,4-динитрофенилгидразина в фарфоровую чашку помещают 5 г этого реактива и растворяют, добавляя небольшие порции соляной кислоты (200 мл HCl на 800 мл воды), смесь кипятят в чашке 2 мин, после охлаждения раствор разбавляют водой до 1 л и фильтруют.

Перегонку проводят на установке с водяным паром, схема которой показана на рисунке 35. Необходимо, чтобы все соединения колбы и холодильника были на шлифах. Перегонку ведут при сильном нагреве до тех пор, пока в колбе останется 5—10 мл жидкости. Воду

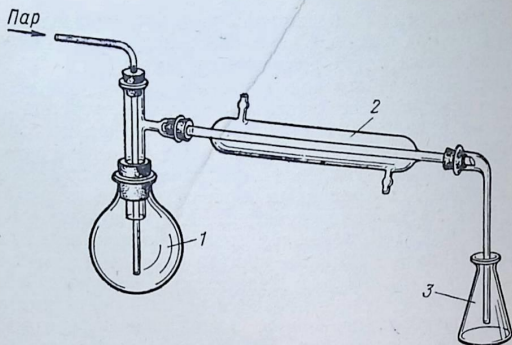


Рис. 35. Прибор для перегонки с водяным паром:
1 — круглодонная колба; 2 — холодильник; 3 — приемник.

через холодильник пропускают только первые 5—7 мин, затем ее закрывают, а перегонку продолжают. В приемнике образуется оранжево-желтый осадок озаона — продукта реакции 2,4-динитрофенилгидразина с окисленной яблочной кислотой.

После этого приемник с хлопьевидным оранжевым осадком отнимают от дистилляционной трубки, предварительно обмыв трубку из промывалки струей воды для того, чтобы следы осадка, прилипшего к трубке, были смыты в приемник. Приемник охлаждают водопроводной водой под краном.

Затем готовят прибор для фильтрования. Для этого берут трубку Аллина, наполняют ее на $\frac{1}{5}$ стеклянной ватой и асбестом и присоединяют к колбе Бунзена для фильтрования с отсасыванием. Осадок как можно более полно переносят в трубку Аллина и промывают приемник и трубку водой, пока промывные воды не будут окрасиваться. Затем осадок в трубке Аллина высушивают в термостате при температуре 105—110°C. Вместо трубки Аллина можно взять стеклянный тигель с пористым дном № 4.

После высушивания трубку Аллина присоединяют к прибору для отсасывания и осадок глиоксаль-2,4-динитрофенилозаона растворяют в кипящем пиридине. Для

этого в трубку Аллина наливают 5—8 мл кипящего пиридина и при помешивании стеклянной палочкой проводят растворение. Затем трубку Аллина промывают при отсасывании 3—4 порциями кипящего пиридина (по 3—4 мл) и полученный пиридиновый раствор количественно переносят в мерную колбу на 25 мл. Раствор в колбе охлаждают до 20°C, доливают пиридином до метки и перемешивают.

Затем 2 или 5 мл исследуемого пиридинового раствора (в зависимости от предполагаемого содержания яблочной кислоты) переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, приливают 50 мл воды и 5 мл 5 н. NaOH. При этом появляется голубая или синяя окраска, которая не исчезает в течение двух часов.

Раствор в колбе доливают водой до метки и колориметрируют, применяя светофильтр, пропускающий свет с длиной волны приблизительно 570 нм. Если окраска раствора слишком слабая, в колбу добавляют большее количество пиридинового раствора, а если слишком интенсивная — меньшее по сравнению с тем, какое указано выше. Результаты определений находят по калибровочной кривой, составленной со стандартным раствором яблочной кислоты.

Для приготовления стандартного раствора чистую, дважды перекристаллизованную яблочную кислоту высушивают в вакуум-эксикаторе над серной кислотой. Затем 200 мг яблочной кислоты растворяют в 100 мл 1 н. H₂SO₄. Из этого раствора берут точно 5 мл и переносят в мерную колбу на 100 мл; это соответствует 10 мг яблочной кислоты. Затем в колбу добавляют 2 мл 1 н. раствора KBr, охлаждают до 20—22°C и приливают 5 мл 1,5 н. раствора перманганата. После охлаждения содержимого колбы до 8—10°C реакционную смесь обесцвечивают 3%-ным раствором перманганата и проводят перегонку, как указано выше. Смесь перегоняют в колбу, содержащую 25 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Полученный оранжевый осадок озона отфильтровывают и промывают в трубке Аллина. Затем осадок растворяют в горячем пиридине, переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки пиридином. В 5 мерных колб емкостью по 100 мл берут 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мл пиридинового раствора, что соответствует 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 и 4,0 мг яблочной кислоты. Растворы в колбах окрашивают, добавляя по 5 мл 5 н. NaOH, доводят

до метки и колориметрируют. На основании определенных оптической плотности строят калибровочную кривую.

Вычисление результатов. Если определение проводят на колориметре, содержание яблочной кислоты вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K \cdot v \cdot a \cdot 100}{v_1 \cdot H},$$

где X — содержание яблочной кислоты в исследуемом материале, %;

K — концентрация яблочной кислоты в стандартном растворе;

v — толщина слоя стандартного раствора в колориметре;

v_1 — толщина слоя исследуемого раствора в колориметре;

a — разбавление;

H — навеска.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, аппарат Сокслета для экстракции, прибор для перегонки жидкости, водяная баня, колбы Бунзена для фильтрования с отсасыванием, трубки Аллина, фильтры-тигли № 4, делительные воронки, конические колбы емкостью 50, 100 и 200 мл, колбы мерные объемом 25, 50, 100 и 200 мл, ступки фарфоровые, стаканы емкостью 200 мл и 1 л, пипетки, кристаллизатор;

2) этиловый эфир, петролейный эфир, 2) н. и 20 н. H_2SO_4 , 1 М раствор КВг, бромная вода (насыщенная), H_2O_2 3%-ная, 5 н. $NaOH$, Na_2SO_4 безводный, пиридин, 2,5 н. HCl , 2,4-динитрофенилгидразин, H_3PO_4 20%-ная, 1,5 н. и 0,02 н. $KMnO_4$, яблочная кислота.

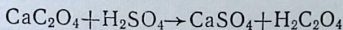
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

В отличие от других органических кислот в плодах и ягодах содержание щавелевой кислоты незначительно (сотые доли процента), однако в старых сухих листьях щавеля, шпината, черенках ревеня ее количество достигает 10—16%. Часто щавелевая кислота откладывается в тканях растений в виде кристаллов оксалата кальция, видимых под микроскопом.

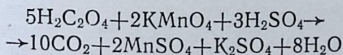
Способы определения щавелевой кислоты основаны на выделении ее из экстрактов в виде плохо растворимого оксалата кальция. Выделенный оксалат кальция идентифицируют по форме кристаллов, по цветным реакциям, а также определяют количественно титрованием с

перманганатом в кислой среде или газометрическим определением объема углекислого газа, образующегося при окислении перманганатом.

Принцип метода. Щавелевая кислота плохо растворяется в эфире, поэтому при ее определении применяют водную экстракцию. Из экстракта щавелевую кислоту осаждают в виде оксалата кальция, и ее количество определяют титрованием раствором перманганата в кислой среде (метод Бейкера). Под действием кислоты оксалат растворяется:



и освобождающуюся щавелевую кислоту оттитровывают перманганатом:



По количеству израсходованного перманганата вычисляют содержание щавелевой кислоты в растворе.

Ход определения. Навеску свежего измельченного растительного материала (30—50 г) гомогенизируют со 100 мл воды. Если для анализа берут сухой материал, то 5 г сухих листьев растирают в ступке с песком. Следует учитывать, что при высушивании растительного материала при температуре 100° происходят значительные потери оксалата. Лучше брать материал, высушенный лиофилизацией, так как высокая температура (100°C) ведет к значительным потерям оксалата. Затем суспензию переносят в химический стакан емкостью 600 мл, гомогенизатор ополаскивают несколько раз небольшими порциями воды. Доливают к каждому 10 объемам суспензии 2 объема 6 н. HCl и одну или две капли октилового или каприлового спирта для предотвращения вспенивания. Затем суспензию кипятят в течение 15 мин при помешивании и охлаждают. Остывшую суспензию количественно переносят в мерную колбу объемом 500 мл, доливают водой до метки, перемешивают и оставляют стоять в течение ночи. Если необходимо более длительный перерыв в работе, колбу ставят в холодильник.

В результате такой экстракции в раствор переходит свободная и связанная в виде солей щавелевая кислота. Если необходимо определить только свободную кислоту, экстракцию проводят без подкисления HCl. После отстаивания содержимое колбы перемешивают и от-

фильтровывают через сухой фильтр. Берут 25 мл фильтрата и переносят в центрифужную пробирку емкостью 50 мл. Для осаждения белков добавляют 5 мл фосфорновольфрамового реактива, который готовят следующим образом. Растворяют в воде 24 г вольфрамата натрия, приливают 40 мл фосфорной кислоты (плотность 1,75) и доливают водой до 1 л. Смесь в центрифужной пробирке перемешивают, оставляют стоять на 5 ч и центрифугируют в течение 10 мин при 3—4 тыс. об/мин.

После осаждения белков 20 мл прозрачного отстоявшегося раствора переносят в другую центрифужную пробирку емкостью 50 мл. В пробирку добавляют по каплям 18 н. NH_4OH , пока раствор не станет слабощелочным, что обнаруживается по выпадению незначительного осадка фосфорвольфрамата. После этого проводят осаждение оксалата кальция. Для этого в пробирку приливают 5 мл буферного раствора хлористого кальция, который готовят растворением 25 г безводного хлористого кальция в 500 мл смеси, состоящей из 250 мл ледяной уксусной кислоты и 250 мл воды; затем приливают этот раствор к 500 мл раствора ацетата натрия (330 г CH_3COONa растворяют в воде и доводят объем до 500 мл). После приготовления этот реактив выдерживают 2 суток при 4—7°C и фильтруют.

После добавления буферного раствора CaCl_2 смесь перемешивают стеклянной палочкой и оставляют стоять на ночь в холодильнике при температуре 5°C. При этом выпадает осадок щавелевокислого кальция CaC_2O_4 . Затем смесь центрифугируют в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Жидкость над осадком осторожно сливают, а осадок промывают 20 мл раствора для промывки, перемешивая тонкой стеклянной палочкой для растворения загрязняющих веществ. Раствор для промывки готовят, смешивая 5%-ную уксусную кислоту с небольшим количеством оксалата кальция, который оседает на дно. Перед употреблением раствор фильтруют через плотный фильтр и центрифугируют в течение 10 мин. Жидкость над осадком удаляют, а осадок растворяют в 1 мл 3,5 н. H_2SO_4 . Центрифужную пробирку ставят на кипящую водяную баню и титруют щавелевую кислоту 0,02 н. KMnO_4 до слабого порозовения, не исчезающего в течение минуты.

Вычисление результатов. 1 мл 0,02 н. KMnO_4 соответствует 0,9 мг безводной щавелевой кислоты. 20 мл осво-

божденного от белка экстракта, в котором определяли оксалат, соответствуют 2,0 г (2000 мг) растительной пробы. Отсюда процентное содержание щавелевой кислоты вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 0,9 \cdot 100}{2000},$$

где X — содержание щавелевой кислоты, %;

a — количество 0,02 н. KMnO_4 , израсходованного при титровании, мл;

T — поправка к титру KMnO_4 ;

100 — коэффициент для перевода в проценты.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга, холодильник, гомогенизатор, водяная баня, стакан емкостью 600 мл, колбы мерные емкостью 500 мл и 1 л, бюретки, воронки, фильтры, пипетки;

2) 6 н. HCl , 18 н. NH_4OH , 3,5 н. H_2SO_4 , 0,02 н. KMnO_4 , CaCl_2 безводный, уксусная кислота ледяная и 5%-ная, уксуснокислый натрий, каприловый или октиловый спирт.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Если необходимо определить лишь наличие тех или иных органических кислот в растительных образцах, удобно использовать быстрый метод их идентификации хроматографией на бумаге, который был предложен А. И. Ермаковым.

Принцип метода. Свободные кислоты экстрагируют смесью эфира и ацетона, а сумму свободных и связанных кислот такой же смесью с добавлением серной кислоты. Органические кислоты разделяют восходящей хроматографией на бумаге, а качественный состав их определяют, сравнивая расположения пятен на хроматограммах испытуемого растительного экстракта с расположением пятен известных органических кислот-свидетелей.

Ход определения. Для экстракции свободных органических кислот навеску хорошо измельченного сухого растительного материала (1—5 г, в зависимости от предполагаемого содержания кислот) помещают в коническую колбу емкостью 50 мл. В колбу приливают 10—15 мл смеси серного эфира и ацетона (2,5 : 7,5), закрывают пробкой и взбалтывают на аппарате для встряхивания в течение 30 мин. Для определения состава сво-

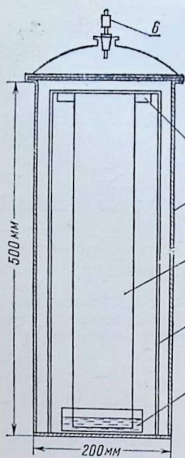


Рис. 36. Стекло́нная камера для восходящей хроматографии на бумаге:

1 — стенки камеры; 2 — подставка (стекло или пластик); 3 — держатель бумаги; 4 — чашки с растворителем; 5 — хроматографическая бумага; 6 — затвор Бунзена.

бодных и связанных в виде солей кислот на каждые 10 мл смеси эфира и ацетона добавляют по несколько капель 20%-ной серной кислоты. Под действием серной кислоты соли разрушаются и свободные кислоты переходят в раствор.

После окончания экстракции содержимое колбы отфильтровывают, переносят в фарфоровую чашку и выпаривают растворитель на водяной бане досуха. Сухой остаток в чашке растворяют в 1 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивая ее содержимое стеклянной палочкой. Полученный раствор, содержащий органические кислоты, переносят в небольшую пробирку, закрывают пробкой и затем используют для хроматографических определений.

Для разделения органических кислот используют восходящую хроматографию на бумаге. Для этого пользуются камерой, изготовленной из стекла или пластика, внутри которой имеется стеклянная подставка для закрепления бумаги (рис. 36). На дно камеры ставят кювету с растворителем. Верхняя часть камеры плотно закрывается крышкой, в которую вставлен затвор Бунзена. Для изготовления затвора Бунзена на стеклянную трубку диаметром 1—2 см надевают резиновую трубку длиной несколько сантиметров, на которой продольно бритвой делают разрез 0,5—1 см длиной. В другой конец резиновой трубки вставляют короткий отрезок стеклянной палочки. Затвор необходим для устранения в хроматографической камере излишнего давления паров летучих растворителей.

Для хроматографического разделения органических кислот используют бумагу «медленная» производства Ленинградской фабрики им. Володарского или другие

аналогичные марки. На полосу длиной 40—45 см и шириной около 15 см на расстоянии 4—5 см от конца полосы и 5—7 см от края микропипеткой наносят одну каплю водного опытного раствора органических кислот и просушивают. Затем в эту же точку наносят еще одну каплю раствора и вновь высушивают. Общий объем нанесенного опытного раствора должен составлять примерно 0,005 мл. Кроме опытного раствора, на эту же полосу бумаги также на расстоянии 4—5 см от конца полосы наносят капли растворов кислот-свидетелей. Расстояния между отдельными точками нанесения кислот-свидетелей, как и опытного раствора, должны быть не менее 1,5 см.

Набор органических кислот-свидетелей готовят в 5%-ной концентрации, растворяя их в 50%-ном спирте; фумаровую и винную кислоты — в 2%-ной, а аконитовую — в 0,5%-ной. На хроматограмму наносят каждую кислоту-свидетель по одной капле отдельно, а также смесь всех кислот в одну точку. Для приготовления смеси сливают вместе все растворы кислот по 0,2 мл, из смеси берут одну каплю и наносят на бумагу в качестве «свидетелей».

После этого приступают к хроматографированию. В качестве подвижной фазы для хроматографирования используют смесь н-бутилового спирта, муравьиной кислоты и воды. Для приготовления смеси берут 250 мл н-бутанола, 25 мл муравьиной кислоты и 297 мл воды. Все эти растворители переносят в склянку с притертой пробкой, многократно встряхивают в течение нескольких часов и дают отстояться в течение суток. После отстаивания смесь разделяется на два слоя: верхний слой — н-бутанол, насыщенный муравьиной кислотой, а нижний — раствор муравьиной кислоты, насыщенный бутанолом. В качестве растворителя при хроматографировании используют верхний слой.

При хроматографировании полосу бумаги с нанесенными на нее растворами органических кислот подвешивают в камере так, чтобы нижний конец хроматограммы доходил до кюветы. В кювету приливают растворитель в таком количестве, чтобы его поверхность была примерно на 2—3 см ниже пятен с нанесенными растворами кислот. Одновременно в камеру подвешивают полоску фильтровальной бумаги размером 30×5 см, предварительно смоченную раствором муравьиной кислоты, на-

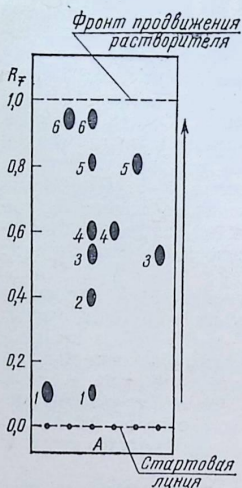


Рис. 37. Схема восходящей хроматограммы органических кислот на бумаге:

1 — щавелевая кислота; 2 — винная; 3 — лимонная; 4 — яблочная; 5 — пировиноградная; 6 — фумаровая кислота. А — смесь органических кислот.

сыщенной н-бутанолом. Это необходимо для наполнения камеры парами бутанола. После этого камеру плотно закрывают крышкой.

Хроматографию проводят в прохладной комнате при температуре 12—16°C. Разделение кислот продолжают в течение 18—24 ч и заканчивают тогда, когда фронт растворителя поднимется примерно на $\frac{3}{4}$ — $\frac{4}{5}$ длины полосы бумаги. После этого хроматограмму снимают, отмечают карандашом границу продвижения

фронта растворителя и высушивают ее в вытяжном шкафу.

Для выявления органических кислот в качестве проявляющего раствора чаще всего используют раствор бромфенолового синего pH 6,7. Для приготовления этого раствора 40 мг индикатора бромфенолового синего растворяют в 50 мл 95%-ного спирта и добавляют по каплям 0,1 н. NaOH до появления сине-фиолетового окрашивания, после чего доводят спиртом до 100 мл.

Хроматограмму обрабатывают этим раствором из пульверизатора. Органические кислоты окрашиваются в ярко-желтый цвет на голубовато-синем фоне. Совпадения расположения пятен кислот-свидетелей с пятнами анализируемого образца указывают на содержание определенных органических кислот во взятом образце.

Вместо бромфенолового синего можно брать и другие реактивы. Например, часто используют раствор, в состав которого входят 2 г глюкозы, 2 мл анилина, 20 мл воды, 20 мл спирта и 60 мл н-бутанола. После опрыскивания хроматограммы высушивают в течение 10 мин в сушильном шкафу при 115°C. После высушивания на

белом фоне появляются темно-коричневые пятна органических кислот.

Идентификацию органических кислот проводят по величине значений их R_F , которые зависят от типа бумаги, использованного растворителя, температуры. При хроматографировании в указанных выше условиях величины значений R_F для ряда органических кислот следующие:

щавелевая кислота	. . 0,09	молочная кислота	. 0,83
винная	» . . 0,41	пировиноградная	» . 0,84
лимонная	» . . 0,54	янтарная	» . 0,89
яблочная	» . . 0,64	фумаровая	» . 0,92
маленновая	» . . 0,78		

Следует отметить, что перед началом определений органических кислот в различных растительных объектах следует определить их значения R_F в данных условиях хроматографирования.

На рисунке 37 представлена схема хроматограммы органических кислот на бумаге.

Оборудование и реактивы: 1) хроматографические камеры, хроматографическая бумага, пульверизатор, микропипетки, конические колбы, мерные колбы на 100 мл, делительная воронка, фарфоровые чашки, воронки, фильтры;

2) н-бутиловый спирт, муравьиная кислота, этиловый спирт, 20%-ная H_2SO_4 , 0,1 н. $NaOH$, бромфеноловый синий, глюкоза, анилин, серный эфир, ацетон, набор органических кислот.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНООБМЕННИКОВ И ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

В растениях одновременно в значительном количестве может быть 5—6 и более органических кислот. Их разделение обычными химическими методами требует большой затраты времени. Более быстрыми являются методы, основанные на применении ионообменных смол и хроматографии на бумаге. Одним из лучших является метод, разработанный С. В. Солдатенковым и Т. А. Мазуровой.

Принцип метода. Кислоты экстрагируют из растительного материала водой, и экстракт очищают, пропуская его через ионообменник. Затем отделяют $Ca(OH)_2$ трикарбоновые кислоты титрованием экстракта

и добавлением спирта. Бариевые соли многоосновных кислот очень плохо растворяются в 60—75%-ном спирте и выпадают в осадок, а соответствующие соли одноосновных кислот (например, молочной и пировиноградной), образующихся при первичном окислении сахаров, остаются в растворе. Спирт удаляют, осадок растворяют в воде, пропускают через катионит и в полученном растворе проводят качественное или количественное определение кислот методом хроматографии на бумаге.

Ход определения. Если для анализа используют высушенный растительный материал, его тщательно растирают в ступке и просеивают через сито. Навеску 3—10 г переносят в широкогорлую колбу емкостью 200 мл, приливают 150 мл горячей воды, помещают в водяную баню и экстрагируют при периодическом взбалтывании в течение 1—2 ч при температуре 60°C. Если используют свежие листья или плоды растений, навеска должна составлять 10—50 г. Навеску тщательно измельчают в ступке или гомогенизаторе, количественно переносят в широкогорлую мерную колбу емкостью 200 мл и проводят экстракцию кислот водой.

После окончания экстракции содержимое колбы охлаждают, доводят водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют в сухую колбу. Следует учитывать, что водные экстракты из свежих растительных тканей часто фильтруются очень медленно, поэтому их фильтруют на воронке Бюхнера в колбу Бунзена при разрежении или центрифугируют. Затем из фильтрата берут 100 мл и для удаления солей, аминокислот и некоторых других веществ пропускают через катионообменник.

Очистка кислот на ионообменниках. При определениях органических кислот чаще всего используют катиониты КУ-1, КУ-2 и анионит ЭДЭ-10П. При использовании катионитов из растворов удаляются катионы. КУ-2 позволяет удалять не только катионы из солей, но и аминокислоты из раствора. Анионит ЭДЭ-10П адсорбирует кислоты, а углеводы и другие неэлектролиты проходят через ионообменник.

В результате пропускания через катионит водного или спиртового экстракта из растительного материала в раствор переходят кислоты и неэлектролиты, главным образом сахара, которые иногда необходимо удалить из раствора. В таких случаях после катионита раствор пропускают через анионит. Анионит адсорбирует кислоты,

а сахара остаются в растворе. Адсорбированные кислоты затем элюируют из ионообменника.

Для аналитических работ с органическими кислотами растений очень удобна хроматографическая колонка, схема которой представлена на рисунке 38. Эта колонка вмещает около 15 г ионообменника.

Оптимальный размер частиц ионообменника 0,1—0,3 мм, более мелкие частицы затрудняют продвижение растворов через колонку. Для приготовления колонки ионообменную смолу растирают в ступке и просеивают через сито для получения частиц необходимых размеров. Затем около 20 г ионообменника (для каждой колонки) переносят в коническую колбу емкостью 0,5 л, приливают 200—250 мл воды и ставят на 3 ч для набухания, часто взбалтывая. Набухающий катионит многократно промывают дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод.

После этого заполняют колонку катионитом. Для этого на дно помещают небольшой кусочек стеклянной ваты и переносят небольшими порциями катионит вместе с водой, трамбуя каждую порцию стеклянной палочкой. После набивки колонки, что требует известного навыка, ионообменник переводят в соответствующую форму: катионит — в водородную, а анионит — в гидроксильную.

Для перевода катионитов КУ-1 или КУ-2 в H^+ -форму через колонку пропускают 7%-ный раствор соляной кислоты со скоростью 1,5—2,5 мл в минуту. Скорость протекания регулируется краном, расположенным в конце колонки. Если катионита в колонке содержится 15 г, для «зарядки» его (перевода катионита в H^+ -форму) обычно достаточно около 150 мл HCl .

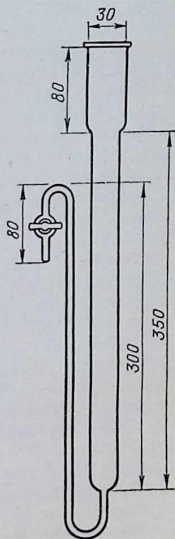


Рис. 38. Колонка для разделения органических кислот (размеры в мм).

После заполнения колонки катионитом и его «зарядки» катионит в колонке промывают дистиллированной водой до полного исчезновения HCl в фильтрате. Полноту отмывания катионита от соляной кислоты проверяют по реакции промывных вод с соответствующим индикатором. После промывания колонка с катионитом готова для работы.

После использования примерно $\frac{3}{4}$ обменной емкости катионита проводят новую его «зарядку». Обменная емкость катионитов КУ-1 и КУ-2 около 5 м.-эquiv. на 1 г.

Анионит ЭДЭ-10П или какой-либо другой подготавливают к работе так же, как и катионит. Для его «зарядки» используют 4%-ный раствор едкого натра, который пропускают через колонку до тех пор, пока в вытекающей из колонки жидкости концентрация NaOH не будет составлять 4%. Обычно для этого необходимо пропустить через колонку около 200 мл раствора NaOH . После «зарядки» анионита избыток щелочи из колонки удаляют, промывая водой до исчезновения розовой окраски промывных вод от прибавления фенолфталеина. Скорость пропускания всех растворов через колонку должна составлять 1,5—2,5 мл в минуту. Анионит адсорбирует кислоты. Органические кислоты с анионита элюируют 0,2 н. раствором серной кислоты.

Выделение органических кислот и разделение их бариевых солей. 100 мл полученного ранее фильтрата пропускают через колонку с катионитом. После этого колонку три раза промывают водой порциями по 75—80 мл. После пропускания через колонку экстракт и все промывные воды переносят в коническую колбу емкостью 500—600 мл, прибавляют несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют раствором 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ до появления розовой окраски. При нейтрализации раствора баритом определяют общее количество кислот, а также разделяют кислоты на группы по различной растворимости их бариевых солей в растворах спирта.

Общее количество кислот в миллиэквивалентах на 1 г растительного материала вычисляют следующим образом. 1 мл точно 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ соответствует 0,1 миллиэквивалента кислот. Для анализа из 200 мл фильтрата было взято 100 мл, т. е. половина навески. Умножив количество мл 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, израсходованного при титровании, на поправку к его титру и на 10 (для пере-

вода в м.-экв.), а затем, разделив это произведение на половину навески, получим общее количество миллиэквивалентов кислот в 1 г растительного образца. Для пересчета в проценты используют коэффициенты, указанные на странице 171.

После нейтрализации баритом в растворе остаются бариевые соли органических кислот, а выпадающий незначительный осадок бариевых солей серной, фосфорной и некоторых других кислот отфильтровывают. Фильтр промывают несколькими порциями теплой воды. Фильтрат и промывные воды используют для дальнейших анализов. Жидкость переносят в большой стакан и упаривают на водяной бане до объема 50—70 мл, после чего количественно переносят в фарфоровую чашку (стакан необходимо тщательно промыть и слить промывные воды в чашку) и выпаривают на водяной бане до объема 20—25 мл.

После этого жидкость из фарфоровой чашки количественно переносят в мерный цилиндр емкостью 100 мл. Фарфоровую чашку ополаскивают несколькими порциями теплой воды и доводят объем жидкости в цилиндре до 37 мл. Затем добавляют в цилиндр 96%-ный спирт до объема 100 мл. Таким образом получают 60%-ный спиртовой раствор. Жидкость в цилиндре тщательно перемешивают длинной стеклянной палочкой. Если на нейтрализацию кислот пошло более 100 мл 0,1 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$, т. е. в растительном экстракте содержалось повышенное количество кислот, берут цилиндр объемом 200 мл. Объем жидкости в цилиндре доводят до 74 мл и добавляют спирт до 200 мл.

Бариевые соли ди- и трикарбоновых кислот осаждают 60%-ным спиртом, а соли летучих кислот остаются в растворе. Цилиндр с осадком оставляют стоять на 12—18 ч.

На следующий день проводят фильтрование. Для этого берут высушенный до постоянного веса стеклянный фильтр-тигель, внутрь которого вкладывают диск плотной фильтровальной бумаги. Фильтр укрепляют в колбе Бунзена, и раствор фильтруют при отсасывании. Частицы осадка переносят на фильтр небольшими порциями 60%-ного спирта. Осадок на фильтре трижды промывают небольшими порциями 60%-ного спирта. Фильтр с осадком высушивают в термостате и определяют вес осадка, по которому можно ориентировочно судить о

суммарном содержании органических кислот. Так как содержание бария в большинстве ди- и трикарбоновых кислот варьирует в пределах 48—55%, а в среднем обычно составляет 52%, по весу осадка можно довольно точно рассчитать содержание в нем нелетучих ди- и трикарбоновых кислот и, соответственно, узнать их количество в анализируемом растительном материале.

Осадок растворяют в воде (если осадок растворяется плохо, его нагревают). Раствор после охлаждения пропускают через колонку, наполненную катионитом КУ-1, со скоростью около 2 мл в 1 мин. Затем катионит промывают 200 мл воды. Жидкость собирают в большой стакан и упаривают на водяной бане до небольшого объема. Из стакана жидкость количественно переносят в мерную колбочку и доводят водой до метки. Мерную колбочку берут такого объема, чтобы концентрация кислот в ней составляла 4—6%. Полученный раствор используют для хроматографических определений.

Прежде чем приступить к хроматографированию, берут небольшой, но точно отмеренный объем фильтрата и оттитровывают его 0,02 н. NaOH по фенолфталеину для определения общего количества ди- и трикарбоновых кислот. После титрования проводят соответствующие расчеты, учитывая поправку к титру щелочи, все разбавления и навеску растительного материала.

Количественная хроматография. Для количественного определения органических кислот используют восходящую хроматографию. Для этого берут камеры большого размера, которые обычно используют при хроматографическом разделении аминокислот (см. рис. 6). На дно такой камеры помещают кювету, в которую наливают растворитель, а хроматограммы подвешивают в верхней части камеры таким образом, чтобы нижний конец хроматографической бумаги был погружен в растворитель на 1—1,5 см. Используют хроматографическую бумагу № 4 «медленная» Ленинградской фабрики. Стандартный лист хроматографической бумаги (52×64 см) разрезают на две полосы шириной по 26 см и, отступя на 2,5 см от узкого края полосы, проводят карандашом линию. На всю эту линию микропипеткой наносят изучаемый раствор кислот. Ширина полоски не должна превышать 5 мм. Наносят раствор в несколько приемов, подсушивая бумагу вентилятором или феном. Всего на одну хроматограмму необходимо нанести 15—20 мг кис-

лот. Если изучаемый раствор имел концентрацию 4—6%, то надо взять 0,4—0,5 мл этого раствора.

При хроматографии кислот используют две системы растворителей: бутанол—муравьиная кислота—вода (18:2:9) и эфир—вода—муравьиная кислота (18:9:5).

Для приготовления 0,5 л первого растворителя в склянку объемом 1,5—2 л наливают 450 мл н-бутилового спирта, 50 мл муравьиной кислоты и 225 мл воды. Склянку закрывают и встряхивают 30—40 мин. Затем смесь оставляют до следующего дня для расслоения растворителя. Для хроматографии используют верхний слой, содержащий бутанол и муравьиную кислоту.

Второй растворитель готовят смешиванием 450 мл серного эфира, 225 мл воды и 125 мл муравьиной кислоты. Смесь тщательно взбалтывают и дают отстояться. Для анализов используют верхний слой, содержащий эфир и муравьиную кислоту.

При выборе растворителя для хроматографирования необходимо иметь в виду следующее. Если в качестве растворителя используют смесь бутилового спирта, муравьиной кислоты и воды, то в такой смеси лимонная и яблочная кислоты не разделяются, так как они имеют очень близкие значения R_F . Поэтому данный растворитель можно использовать, если в исследуемом материале одна из этих кислот отсутствует или нет необходимости разделять и количественно определять яблочную и лимонные кислоты. В противном случае в качестве растворителя берут смесь эфира, воды и муравьиной кислоты в соотношении 18:9:5. На разделение смеси кислот эфирным растворителем большое влияние оказывает температура. Она не должна быть выше 20°C в течение всего времени хроматографирования; наилучшие результаты получают при 12—14°C. Опыты показали, что расстояния между зонами лимонной и яблочной кислот на хроматограммах, выполненных при 12—14°C, составляют 15—20 мм, при 20°C — 5—10 мм, при 24°C яблочная и лимонная кислоты не разделяются.

Для хорошего разделения всех органических кислот лучше проводить хроматографию с использованием обеих растворителей: один лист бумаги с нанесенными органическими кислотами хроматографировать в системе бутанол—муравьиная кислота—вода, а другой лист в другой хроматографической камере в системе эфир—вода—муравьиная кислота.

После подсушивания лист хроматографической бумаги с нанесенными на него кислотами подвешивают в камере, на ее дно наливают растворитель, камеру плотно закрывают и проводят хроматографирование. Для лучшего разделения кислот хроматографирование ведут в течение 48—50 ч (в два приема). Первый раз хроматограмму выдерживают в камере 24 ч. Затем ее подвешивают под тягой, обдувая феном или вентилятором в течение 20—30 мин для удаления эфира. После этого хроматограмму вновь помещают в камеру и пропускают растворитель еще в течение 24 ч.

Закончив хроматографирование, бумагу подсушивают под тягой и оставляют на ночь. На следующий день хроматограмму сушат при температуре 60—80°C в течение 2—3 ч для удаления следов муравьиной кислоты.

После высушивания хроматограмму кладут на чистое стекло и выявляют на ней зоны расположения кислот. Для этого по длине хроматограммы, отступя на 10 мм от краев, микропипеткой наносят тонкой полосой проявитель (0,05%-ный спиртовой раствор бромфенолового синего). В зонах расположения кислот полоска нанесенного проявителя становится желтой, а в промежутках между ними остается голубой. Если муравьиная кислота полностью не удалена, полоска проявителя на всем протяжении будет желтой. В этом случае необходимо продолжить удаление муравьиной кислоты подсушиванием хроматограммы при температуре 60—80°C. Зоны расположения кислот на хроматограмме обводят карандашом.

Идентификация кислот проводится прежде всего сопоставлением полученной хроматограммы с качественной хроматограммой, на которую нанесена испытуемая смесь «свидетелей». Можно брать более широкий лист хроматографической бумаги и кислоты-свидетели наносить на эту же хроматограмму. Однако в связи с тем, что многие кислоты имеют близкие значения R_f , совпадение R_f изучаемой кислоты и кислоты-свидетеля еще не является полной гарантией их идентичности. Поэтому при работе с новыми образцами растительного материала, для которых неизвестен набор встречающихся в них органических кислот, необходимо, кроме кислот-свидетелей, применять для идентификации кислот специфические цветные реакции.

После определения зон расположения отдельных

кислот их вырезают из хроматограммы, разрезают на узкие короткие ленточки, переносят в небольшие колбы и экстрагируют три раза водой (по 15 мл). При экстракции содержимое колбочки осторожно нагревают до кипения и теплый раствор сливают в мерную колбу объемом 50 мл. После третьей экстракции содержимое колбы охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают. Берут 25 мл раствора кислоты, переносят в коническую колбу, прибавляют 3 капли фенолфталеина и титруют из микробюретки 0,02 н. NaOH до розового окрашивания.

Вычисление результатов. Поскольку соотношение кислот в изучаемом растворе, используемом для хроматографирования, не изменяется, количество миллилитров 0,02 н. раствора щелочи, израсходованной на титрование отдельных кислот, суммируют, а затем вычисляют в процентах долю щелочи для каждой кислоты. По вычисленному процентному выражению распределяют весь объем щелочи, израсходованной на нейтрализацию кислот, бариевые соли которых были осаждены 60%-ным спиртом.

Объем щелочи, вычисленный для каждой кислоты, умножают на соответствующий ей коэффициент для перевода щелочи в миллиграммы кислоты. При 0,02 н. растворе щелочи коэффициенты перевода будут следующими: для винной кислоты 1,50; яблочной — 1,34; лимонной — 1,28; янтарной — 1,18; фумаровой — 1,16; щавелевой — 0,94. Полученные для каждой кислоты значения пересчитывают на навеску материала и выражают в процентах.

Вычисление количества каждой из ди- и трикарбоновых кислот в изучаемом растительном материале В. С. Солдатенков рекомендует следующим образом.

1. Вначале суммируют объемы 0,02 н. раствора щелочи, израсходованной на нейтрализацию кислот каждой зоны. Исходя из полученного объема, вычисляют в процентах долю щелочи, приходящуюся на соответствующую кислоту.

2. При проведении всего анализа соотношение кислот в экстрактах и растворах не меняется. Поэтому объем 0,1 н. щелочи, необходимой для нейтрализации кислот, содержащихся во всем осадке бариевых солей, будет распределяться в тех же процентных соотношениях, какие были обнаружены при анализе хроматограммы.

Исходя из этих данных, проводят расчет объема щелочи, приходящейся на каждую кислоту.

3. Высчитанный объем 0,1 н. щелочи для каждой кислоты пересчитывают на соответствующую кислоту путем умножения на коэффициент. Для винной кислоты он равен 7,5; лимонной — 6,4; яблочной — 6,7; янтарной — 5,9; аконитовой — 5,8; малоновой — 5,2; гликолевой — 7,6; фумаровой — 5,8. Соответствующие коэффициенты высчитывают и для других кислот.

Пример расчета. На нейтрализацию извлеченных из хроматограммы кислот пошло следующее количество 0,02 н. щелочи: винной — 4,90 мл (22,53%), лимонной — 7,67 мл (35,27%), яблочной — 4,20 мл (19,31%), янтарной — 4,98 мл (28,89%), всего — 21,75 мл.

На нейтрализацию кислот, содержащихся во всем 60%-ном осадке бариевых солей, пошло 68 мл 0,01 н. щелочи. Из этого количества щелочи приходится: на винную кислоту — 22,53%, или $15,32 \text{ мл} \times 7,5 = 0,1149 \text{ г}$; лимонную — 35,27%, или $23,98 \text{ мл} \times 6,4 = 0,1535 \text{ г}$; яблочную — 19,31%, или $13,3 \text{ мл} \times 6,7 = 0,088 \text{ г}$; янтарную — 22,8%, или $15,57 \text{ мл} \times 5,9 = 0,0919 \text{ г}$. Количество каждой органической кислоты пересчитывают на навеску анализируемого материала.

При незначительном содержании ди- и трикарбоновых кислот в изучаемом материале часть кислот, выделенных из осадка бариевых солей, следует титровать 0,02 н. щелочью. Коэффициент пересчета при этом будет в пять раз меньше. Например, для винной кислоты 1,5 вместо 7,5. При разделении ди- и трикарбоновых кислот методом хроматографии на бумагу полнота извлечения кислот с хроматограмм достигает 98%. При аккуратной работе точность метода количественного определения органических кислот хроматографией на бумаге составляет $\pm 3-5\%$.

Оборудование и реактивы: 1) хроматографические камеры, шкаф для сушки хроматограмм, вентилятор, хроматографические колонки, водяная баня, гомогенизатор, центрифуга, листы стекла, микропипетки, микробюретка, фарфоровые чашки, ступки, колбы мерные емкостью 200, 100, 50 и 25 мл, стаканы емкостью 1 л, 200 и 100 мл, конические колбы емкостью 600, 100, 50 мл, цилиндры мерные емкостью 200 и 100 мл, колбы Бунзена, стеклянный фильтротигель, хроматографическая бумага, катионит КУ-1;

2) 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 0,1 н. и 0,02 н. NaOH , спирт 96%-ный и 60%-ный, фенолфталеин 1%-ный спиртовой раствор, бромфеноловый синий 0,05%-ный спиртовой раствор, бутиловый спирт, муравьиная кислота, серный эфир, HCl , набор органических кислот.

ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Фосфор в тканях растений содержится в виде неорганических фосфатов и различных органических соединений.

Минеральные фосфаты обеспечивают буферные свойства цитоплазмы клетки, поддерживают тургор ткани, служат транспортной формой, в виде которой фосфор поглощается и передвигается по растению, и источником образования органических фосфорсодержащих соединений. В значительном количестве они содержатся в вегетативных органах и незрелых семенах. Например, в черешках, стеблях и корнях картофеля на долю минеральных фосфатов может приходиться до 60% от общего содержания фосфора.

Органический фосфор встречается в растениях в кислоторастворимой и кислотонерастворимой формах. Кислотонерастворимые фосфорные соединения включают нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды, фосфолипиды. Их содержание связано с ростом и развитием организма. На долю органического кислотонерастворимого фосфора приходится 40—50% от общего его содержания в листьях картофеля, 20—48% — в листьях пшеницы, 18—30% — в клубнях картофеля.

Другую часть органического фосфора составляют кислоторастворимые фосфорные соединения: нуклеотиды, фосфорилированные сахара, различные фосфорные эфиры. На их долю в листьях растений приходится 10—30% общего содержания фосфора; в репродуктивных органах их содержится несколько больше.

В состав кислоторастворимого фосфора входят наиболее лабильные формы фосфорных соединений, среди которых особое значение имеют аденозин ди- и трифосфаты нуклеотидов, которые принимают участие в синтетических процессах, происходящих в растительном организме. В эту же фракцию входят фосфорные эфиры сахаров, принимающие участие в фотосинтезе, дыхании и синтезе сложных полисахаридов.

В зависимости от поставленной задачи можно определить только общее содержание фосфора в растениях или только суммарное количество фосфора, входящего в состав кислотонерастворимой и кислоторастворимой фракций. Иногда необходимо исследовать состав фосфорных фракций и содержание отдельных фосфорсодержащих соединений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА

Существует несколько методов определения фосфора. Ниже приводятся описания колориметрического метода по Фиске — Суббароу и двух его модификаций.

Принцип метода. Фосфор переводится в раствор путем сжигания материала со смесью серной и хлорной кислот. При обработке раствора, содержащего фосфор, молибденово-кислым аммонием в кислой среде образуется фосфорно-молибденовая кислота $H_7 [P(Mo_2O_7)_6]$. При взаимодействии с восстановителем — эйконогеном (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновой кислотой) она образует смесь комплексов, содержащих молибден в различных валентностях.

Смесь этих комплексов растворима в воде и называется молибденовой синью. Интенсивность синей окраски пропорциональна количеству фосфора, содержащемуся в растворе, и может быть измерена с помощью фотозлектроколориметра.

Модификации этого метода связаны с применением различных восстановителей (амидола, аскорбиновой кислоты и др.) при соответствующей кислотности среды. От восстановителя зависит скорость превращения фосфомолибденового комплекса в «синь», а также чувствительность метода.

Ход определения. Общий фосфор в отдельных фракциях или в навеске растительного материала определяют после сжигания центрифугатов или навески. Для этого определенный объем центрифугатов (см. ниже) или навеску сухого растительного материала (200 мг) помещают в колбу Кьельдаля объемом 50 мл, приливают 3 мл концентрированной H_2SO_4 и 3 мл 57%-ной $HClO_4$ (при определении общего фосфора нуклеиновых кислот серная кислота не добавляется) и сжигают при слабом нагревании, не допуская интенсивного кипения смеси. Сильный нагрев вначале и в стадии белых паров

может вызвать значительную потерю фосфора. Когда раствор станет коричневым или темно-желтым, его охлаждают, добавляют несколько капель хлорной кислоты и снова нагревают до появления белых паров. Охлаждение и добавление хлорной кислоты повторяют до тех пор, пока жидкость не будет слабо-желтой в горячем состоянии и бесцветной при охлаждении.

После обесцвечивания содержимого колбы горлышко колбы обмывают дистиллированной водой и продолжают сжигание до полного обесцвечивания. Затем колбу охлаждают, содержимое переносят, смывая дистиллированной водой в мерную колбу на 50 мл, перемешивают и доводят водой до метки. Для определения фосфора из полученного объема берут 2 мл и переносят в мерную колбу емкостью 10 мл. Нейтрализуют по фенолфталеину едким натром или аммиаком, для чего прибавляют 2 капли фенолфталеина и затем осторожно по каплям 10%-ный раствор NaOH или NH_4OH до розового окрашивания. Избыток щелочи устраняют прибавлением по каплям 1 н. раствора H_2SO_4 до обесцвечивания от одной капли. Края колбочки обмывают дистиллированной водой, приливают 1 мл 2,5%-ного молибденовокислого аммония и 0,4 мл 0,25%-ного эйконогена. После каждого прибавления смесь энергично перемешивают и через 30 мин стояния при комнатной температуре (или через 3 мин выдерживания в водяной бане при 37°C и последующем охлаждении) колориметрируют на фотоэлектроколориметре (ФЭК-М) с красным светофильтром.

Неорганический фосфор в отдельных фракциях (см. ниже) определяют без сжигания центрифугатов. 5 мл центрифугата помещают в мерную колбу на 10 мл, добавляют 1 мл 2,5%-ного молибденовокислого аммония и 0,4 мл 0,25%-ного эйконогена. Далее поступают, как описано выше.

Количество фосфора в пробе находят по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой. Готовят стандартный раствор однозамещенного фосфата калия, для чего 0,439 г KH_2PO_4 (перекристаллизованного, промытого и высушенного в течение 2 ч при температуре 100°C) растворяют в 1 л дистиллированной воды в присутствии 20 мл 0,1 н. H_2SO_4 . В 1 мл этого раствора содержится 0,1 мг фосфора. Стандартный раствор разбавляют в 4 раза (25 мл раствора фосфата в мерной

колбе на 100 мл доводят водой до метки). В 1 мл приготовленного рабочего раствора содержится 0,025 мг фосфора. В мерные колбы на 10 мл вносят следующие количества рабочего раствора: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,4 мл и т. д. Это соответствует 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 мг и т. д. внесенного фосфора, а концентрация фосфора (мг в 1 мл) будет 0,001; 0,002; 0,003; 0,004 и т. д. Содержимое колбочек нейтрализуют по фенолфталеину едким натром или аммиаком, прибавляют все необходимые реактивы, как указано выше, и после 30-минутной экспозиции при комнатной температуре (или 3-минутной при 37°C) измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре. В работе обычно используют кювету шириной 5 мм. При построении калибровочного графика на оси абсцисс откладывают содержание фосфора, а на оси ординат — экстинкцию растворов.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, водяная баня, мерные колбы на 1000, 100, 50, 10 мл, колбы Кьельдаля на 50 мл, градуированные пипетки;

2) H_2SO_4 концентрированная, 1 н. и 0,1 н. HClO_4 57%-ная, NaOH (или NH_4OH) 10%-ный, однозамещенный фосфорнокислый калий (KH_2PO_4), фенолфталеин 0,5%-ный спиртовой раствор, 2,5%-ный раствор молибденовокислого аммония в 3 н. H_2SO_4 , 0,2%-ный раствор эйконогена.

Приготовление раствора молибденовокислого аммония. 25 г чистого молибденового аммония растворяют примерно в 300 мл воды в мерной колбе на 1 л. Затем приливают 300 мл 10 н. H_2SO_4 , доводят дистиллированной водой до метки и фильтруют.

Приготовление раствора эйконогена. 15 г метабисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) растворяют в 35 мл воды, добавляют 0,5 г сульфита натрия (Na_2SO_3), перемешивают, доводят водой до 60 мл и фильтруют. 30 мл этой смеси переносят в колбу емкостью 50 мл, растворяют в ней 0,125 г эйконогена, помещают в водяную баню при 50°C и после охлаждения доводят водой до метки. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике не более двух недель.

Определение фосфора с применением амидола. В мерные колбы емкостью 10 мл вносят 2 мл раствора фосфата, полученного после сжигания. После нейтрализации 10%-ным раствором NaOH (или NH_4OH) по фенолфталеину добавляют 2 мл молибденовокислого аммония, 5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл раствора амидола.

Объем доводят до метки дистиллированной водой и колориметрируют после 30-минутной экспозиции при комнатной температуре.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, мерные колбы на 10 мл, пипетки;

2) 10%-ный NaOH (или NH_4OH), фенолфталеин 0,5%-ный спиртовой раствор, молибденовокислый аммоний 2,5%-ный в 3 н. H_2SO_4 , амидол.

Приготовление раствора амидола. Раствор готовят на 10%-ном метабисульфите калия ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$). В мерную колбу на 50 мл берут 5 г $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и растворяют приблизительно в 25 мл дистиллированной воды. Затем добавляют 100 мг амидола, встряхивают и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в темной склянке не более 10 дней.

Определение фосфора с применением аскорбиновой кислоты. Метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять от 0,3 до 6 мкг фосфора в 1 мл колориметрируемого раствора. Чувствительность метода повышается в присутствии ионов меди в инкубационной среде.

Для определения берут 0,1 мл экстракта, содержащего фосфор, добавляют 5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл 1%-ного молибдата аммония и 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси 6,1 мл. Через 10 мин раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре, используя кюветы шириной 10 мл.

Для построения калибровочной кривой берут образцовые растворы фосфата объемом от 0,05 до 0,5 мл. Объем ацетатного буфера изменяют от 5,45 до 5 мл в зависимости от взятого объема фосфата. Общий объем смеси (фосфат+реактивы) должен быть равен 6,5 мл.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, градуированные пипетки, пробирки;

2) 0,1 М ацетатный буфер pH 4, молибденовокислый аммоний 1%-ный, приготовленный на 0,05 н. H_2SO_4 , аскорбиновая кислота 1%-ная.

Раствор аскорбиновой кислоты готовят на 0,001М растворе сернокислой меди — $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (реактив нестойк, поэтому готовят небольшие порции в день определения). На 25 мл берут 0,06 г сернокислой меди, растворяют в 10—12 мл воды, добавляют 0,25 г аскорбиновой кислоты и объем доводят до метки.

Вычисление результатов. Результаты анализов вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot b \cdot v \cdot 100 \cdot z}{n},$$

- где X — количество фосфора (Р), мг %;
- a — количество фосфора в 1 мл исследуемого раствора, взятого для колориметрирования и найденного по калибровочной кривой, мг;
- b — объем раствора, подготовленного к колориметрированию, мл;
- v — число, показывающее, какую часть от объема сожженной жидкости составляет раствор, взятый для колориметрирования;
- z — число, показывающее, какую часть от общего объема экстракта, извлеченного из навески, составляет объем, взятый для сжигания;
- 100 — коэффициент для выражения результатов анализа в процентах;
- n — масса сухого вещества, г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Для фракционирования фосфорных соединений растительных тканей существует много способов. Все они основаны на последовательном выделении с помощью различных растворителей фосфорсодержащих веществ, гидролизе отдельных групп фосфорных соединений и определении содержания фосфора одним из колориметрических методов.

Наиболее распространенным является метод Шмидта и Тангаузера, описание которого приведено ниже.

Лучшие результаты получают при анализе свежего растительного материала. В случае необходимости фиксации растительный материал замораживают жидким азотом и высушивают лиофилизацией (см. стр. 106). Высушивать растения в термостате нельзя, так как в процессе тепловой фиксации органические фосфорные соединения распадаются с освобождением минерального фосфора.

Общая схема определения форм фосфорных соединений в растениях представлена на странице 207.

Извлечение кислоторастворимого фосфора. Извлечение кислоторастворимой фракции необходимо проводить в холодной комнате при 0, +2°C.

Тщательно измельченную навеску (0,1—0,4 г сухих вегетативных частей растений, 0,5—1 г семян или 2 г свежего материала) помещают в центрифужную пробирку на 50 мл, прибавляют 20 мл холодной 5%-ной хлорной кислоты и суспендируют на холоду в течение 20 мин. Затем центрифугируют при 4500 об/мин 15 мин. Операцию повторяют дважды. Центрифугаты сливают в мерную колбу на 50 мл и доводят водой до метки.

В состав полученной кислоторастворимой фракции входят неорганические фосфаты, легко гидролизующиеся фосфорсодержащие органические соединения (карбоксилфосфаты, лабильные пирофосфаты, аминфосфаты, глюкозо-1-фосфат) и устойчивые эфиры фосфорной кислоты (инозитгексафосфаты, гексозо-6-фосфаты и др.).

В полученном экстракте определяют общий кислоторастворимый фосфор (после сжигания), неорганический кислоторастворимый фосфор (без сжигания) и легкогидролизующийся кислоторастворимый фосфор, освобождающийся после 10-минутного кислотного гидролиза.

Определение общего кислоторастворимого фосфора. В колбу Кьельдаля на 50 мл вносят 10 мл кислотного экстракта и сжигают с 3 мл концентрированной H_2SO_4 и 2 мл 57%-ной $HClO_4$. Затем содержимое переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят дистиллированной водой до метки. В мерную колбу (или цилиндр с притертой пробкой) на 10 мл берут 2 мл полученного раствора и определяют содержание фосфора одним из методов, описанных выше.

Определение неорганического кислоторастворимого фосфора. Из исходного экстракта (после обработки материала $HClO_4$) берут 5 мл, переносят в мерную колбу емкостью 10 мл и добавляют необходимые для колориметрического определения фосфора реактивы.

Следует отметить, что при определении неорганического фосфора в экстракте из семян, содержащих много масла, после прибавления к пробе молибденовокислого аммония и восстановителя (эйконогена, амидола), помимо голубой окраски, образуется легкая, трудно оседающая муть. В этом случае контрольный раствор должен содержать экстракт+реактивы без добавления восстановителя.

Определение легкогидролизуемого кислоторастворимого фосфора. Берут 5 мл исходного кислотного экстракта, переносят в коническую колбу на 50 мл, добавляют 5 мл 2 н. раствора HCl . Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем колбу быстро охлаждают в ледяной воде. Отбирают 5 мл из полученного гидролизата в мерные колбочки объемом 10 мл и прибавляют реактивы, необходимые для колориметрического определения фосфора.

Разность между легкогидролизуемым фосфором и неорганическим фосфором будет соответствовать так называемому лабильному фосфору, в состав которого входят ди- и трифосфаты нуклеотидов, глюкозо-1-фосфат и некоторые другие соединения.

Разность между общим кислоторастворимым фосфором и легкогидролизуемым фосфором соответствует фосфору устойчивых эфиров (стабильному фосфору), в состав которого входят инозитгексафосфаты (фитин), триозофосфаты, гексозо-6-фосфаты и другие соединения.

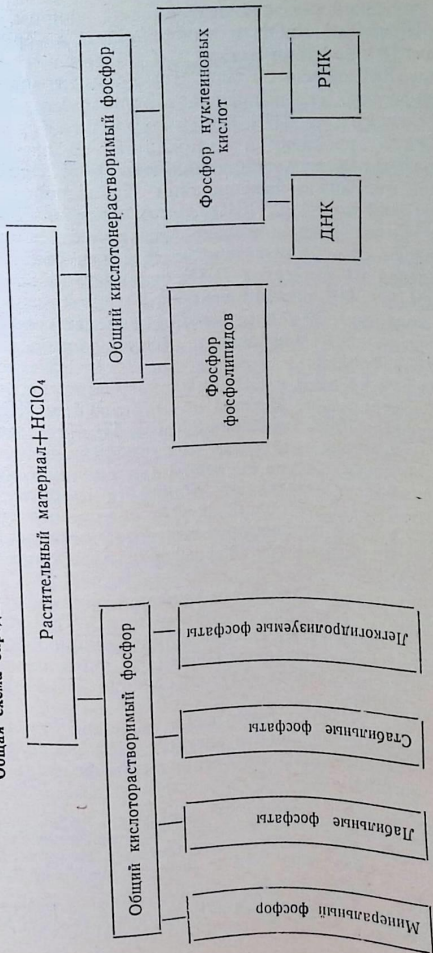
Разность между общим кислоторастворимым фосфором и неорганическим фосфором соответствует органическому кислоторастворимому фосфору.

Извлечение фракции фосфолипидов. Осадок после удаления кислоторастворимой фракции экстрагируют в центрифужной пробирке 5 мл 80%-ного этанола и многократно настаивают со смесью спирт—эфир (3:1) в течение 36 ч (одного дня и двух ночей) при комнатной температуре. После такой экстракции фосфолипиды переходят в раствор. Общий объем спирто-эфирного экстракта должен составлять 35 мл. Экстракт центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугат переносят в колбу Кьельдаля на 50 мл и путем слабого нагревания удаляют растворитель (спирт+эфир).

Остаток после удаления растворителя осторожно сжигают в 5 мл смеси серной и хлорной кислот (3:2), так как вначале содержимое колбы сильно пенится. После сжигания бесцветное содержимое переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора берут 2 мл в мерную колбу емкостью 10 мл и добавляют необходимые для определения фосфора реактивы.

Определение фосфора нуклеиновых кислот. Осадок после последовательного извлечения кислоторастворимо-

Общая схема определения отдельных фракций фосфорных соединений



го и липидного фосфора высушивают эфиром, растирают с 20 мл 1 н. NaOH и выдерживают в термостате в течение 18 ч при температуре 37°C. Затем центрифугируют при 4000 об/мин 20 мин. В гидролизате определяют общий фосфор. Дальнейшая работа проводится на холоду.

Осаждение ДНК. 5 мл гидролизата берут в центрифужную пробирку и охлаждают. В охлажденный центрифугат по каплям прибавляют 6 н. HCl до pH 6,6—6,8 при постоянном помешивании. После нейтрализации прибавляют 5 мл 1 н. HClO₄ для осаждения ДНК. Растворы кислот предварительно охлаждают. Гидролизат оставляют на холоду в течение 3 ч для более полного осаждения ДНК. Осадок ДНК отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин (до просветления жидкости). В надосадочной жидкости, содержащей компоненты РНК, определяют общий фосфор и неорганический фосфор.

Экстракция нуклеиновых кислот. Осадок ДНК экстрагируют дважды по 10 мл 0,5 н. HClO₄ при температуре 100°C в течение 20 мин. После каждой операции экстракт отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость объединяют и определяют общий и неорганический фосфор. Определяя общий фосфор щелочного гидролизата (P₁) и общий фосфор в растворе после осаждения ДНК (P₂), находят общий фосфор нуклеиновых кислот (P₁—P₂).

В щелочном гидролизате нуклеиновых кислот ДНК остается без изменения, в то время как РНК распадается до моонуклеотидов. Определяя общий фосфор в растворе после осаждения ДНК (P₂) и неорганический фосфор этого раствора (P₃), по разнице P₂—P₃ находят фосфор РНК.

Фосфор ДНК соответственно находят по разнице между общим фосфором в растворе (P₄) после экстракции компонентов ДНК и неорганическим фосфором этого раствора (P₅).

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга с охлаждением, холодильник, термостат, водяная баня, центрифужные пробирки, фарфоровые ступки, конические колбы емкостью 50 мл с обратным воздушным холодильником, мерные колбы на 50, 25, 10 мл, колбы Кьельдаля на 50 мл;

2) KClO₄ 5%-ная и 57%-ная, H₂SO₄ концентрированная, HCl 2 н. и 6 н., 0,5 н. и 1 н. HClO₄, 1 н. NaOH, этиловый спирт 96%-ный и 80%-ный, эфир.

ФЕРМЕНТЫ

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы, обладающие высокой специфичностью, т. е. ускоряющие течение определенных биохимических реакций и играющие важнейшую роль в процессах обмена веществ. Изучение ферментов и механизма их действия — одна из основных проблем биологической химии.

Активность ферментов в растениях непостоянна и зависит от вида и органа растений, времени суток, температуры и влажности, при которой выращиваются растения, условий питания и от ряда других факторов. В зависимости от изменения активности ферментов изменяется интенсивность и направленность биохимических процессов, что в конечном счете приводит к изменению величины урожая и химического состава растений.

При изучении действия ферментов и определении их активности обычно наблюдают при помощи качественных или количественных реакций за исчезновением вещества, на которое действует фермент (такие вещества называются субстратами) или за появлением продуктов реакции, образующихся в результате действия фермента. Обычно для получения препаратов используют вытяжки из растительных тканей, в которых ферменты находятся в растворенном состоянии. Для более детального изучения ферменты извлекают из тканей растений, очищают путем фракционирования экстрактов нейтральными солями или органическими растворителями, ионообменной хроматографией, гель-фильтрацией и другими методами. При сочетании различных методов очистки можно получить ферменты в кристаллическом состоянии. Однако такая работа выходит за рамки обычного студенческого практикума.

Важным методом изучения действия ферментов в живых неповрежденных тканях растений является их изучение методом вакуум-инфильтрации. Сущность этого

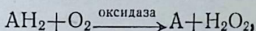
метода заключается в том, что в листья или другие органы растений под вакуумом (в вакуум-эксикаторе) вводят раствор вещества, на которое действует тот или иной фермент, и по количеству превращенного вещества судят об активности фермента. Этот метод дает возможность количественно определять в живых тканях интенсивность гидролитических и синтетических процессов.

В связи с высокой лабильностью ферментов и зависимостью их активности от многих факторов при работе с ферментами следует соблюдать ряд предосторожностей. Особенно осторожно необходимо проводить очистку ферментов. В связи с тем, что ферменты термолабильны, работу проводят в холодной комнате при температуре от 0° до $+4^{\circ}\text{C}$. Ферменты чувствительны к воздействию кислот и щелочей, поэтому необходимо строго следить за величиной pH. Химические реактивы, используемые в лабораториях, могут содержать примеси, которые подавляют активность ферментов. Поэтому жидкие реактивы (спирт, ацетон) перед работой перегоняют, а сухие — перекристаллизовывают. Дистиллированная вода может содержать ионы тяжелых металлов, которые ингибируют ферменты. Поэтому воду для работы с ферментами дважды перегоняют или пропускают через колонки, заполненные ионообменными смолами (катионитами и анионитами).

Для выражения активности ферментов приняты определенные величины, рекомендованные Комиссией по ферментам Международного биохимического союза. За стандартную единицу (Е) любого фермента принимается такое количество, которое катализировало превращение 1 микромоля данного субстрата за 1 мин при оптимальных условиях (обычно при 30°C , оптимальных для данного фермента значениях pH и концентрации субстрата). Если реакцию проводят не при 30°C , необходимо указать фактическую температуру реакции. Чистоту ферментного препарата характеризуют величиной удельной активности, которая выражается числом единиц фермента на 1 мг белка. Следовательно, при таких определениях необходимо проводить и определение белка. Концентрацию фермента в растворе выражают числом единиц активности, приходящихся на 1 мл раствора. Иногда используют и другие выражения единиц активности ферментов

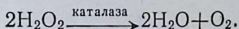
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

В процессе окисления ряда веществ в растениях под действием оксидаз образуется перекись водорода:



где AH_2 — восстановленный субстрат, A — окисленный субстрат.

Перекись водорода в повышенных концентрациях оказывает токсическое действие на цитоплазму клеток. Под действием фермента каталазы перекись водорода разлагается на воду и кислород:



Каталаза (Н. Ф. I. II. I. 6)* — двухкомпонентный фермент, состоящий из белка и простетической группы, содержащей железо.

Принцип метода. Метод газометрического определения активности каталазы основан на определении объема кислорода после прибавления к водному экстракту из растений, содержащему каталазу, перекиси водорода.

Аппаратура. Существует несколько модификаций простых приборов, используемых для газометрического определения активности каталазы. Ниже приведено описание прибора, используемого в биохимической лаборатории ВИР.

Как показано на рисунке 39, прибор состоит из двух, укрепленных на штативе бюреток объемом 50 или 100 мл, диаметром около 1 см. Одна из бюреток градуирована с точностью 0,1 мл. Бюретки соединены между собой с помощью тройника резиновыми трубками. Третий конец тройника соединен резиновой трубкой со стеклянной грушей 3. В приборе создана система трех сообщающихся сосудов. Градуированная бюретка служит для измерения выделяющегося в результате реакции кислорода, а вторая бюретка используется для точной установки уровня жидкости при измерениях. Градуированная бюретка в верхней части закрыта резиновой пробкой с тройником. Тройник соединяется с помощью резиновой трубки также с реакционным сосудом 1, а на свободном конце тройника короткий отрезок каучуковой

* Здесь и далее цифры ферментов даны в соответствии с номенклатурой ферментов (Н. Ф.), рекомендованной Международным биохимическим союзом.

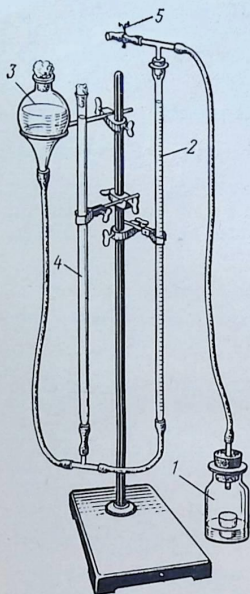


Рис. 39. Прибор для газометрического определения каталазы:

1 — реакционный сосуд со стаканчиком для перекиси водорода; 2 — измерительная бюретка; 3 — стеклянная груша; 4 — стеклянная трубка; 5 — зажим для соединения прибора с атмосферой.

трубки снабжен винтовым зажимом 5 для соединения прибора с атмосферой. В реакционном сосуде находится маленький стаканчик объемом около 10 мл, в который при анализах наливают перекись водорода. Стеклянную грушу и измерительную часть прибора заполняют не водой, а 5%-ной H_2SO_4 (для уменьшения растворимости газов).

Ход определения. Свежую навеску нарезанных кусочками листьев или клубней ($10 \pm 0,01$ г) растирают в ступке со стеклянным песком. Предварительно в ступку добавляют 0,5 $CaCO_3$. Добавление мела необходимо для создания слабощелочной реакции, опти-

мальной для действия каталазы. Затем в ступку добавляют 10 мл воды и вновь тщательно растирают до однородной массы. После этого полученную массу количественно переносят в колбу емкостью 200 мл, доводят водой до метки и настаивают при периодическом взбалтывании 3—4 ч. В течение этого срока идет экстракция фермента из растительного материала. После настаивания суспензию фильтруют в сухой стакан или колбу.

В том случае, когда определяют активность фермента в семенах, навеску свежеразмолотых семян ($1 \pm 0,01$ г) переносят в фарфоровую ступку, добавляют 0,5 г $CaCO_3$, 10 мл воды и немного стеклянного песка. Содержимое ступки тщательно растирают и переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Мерную колбу доводят водой до метки. После 3—4 ч настаивания проводят фильтрование или центрифугирование, как указано выше. Прозрачные

вытяжки пригодны для определения активности каталазы.

В реакционный сосуд прибора наливают 10 мл вытяжки. Затем туда же добавляют 10 мл воды. В сосуд осторожно пинцетом ставят маленький стаканчик и наливают в него 5 мл 3%-ной перекиси водорода. Реакционный сосуд закрывают пробкой с трубкой, которая соединена с остальной частью прибора, и ставят его на водяную баню с температурой 20°C. Регулируют уровень жидкости в приборе и устанавливают его на нулевой отметке градуированной бюретки. Затем закрывают винтовой зажим 5 и опускают стеклянную грушу 3 в нижнее положение. После этого опрокидывают стеклянный стаканчик с перекисью водорода (встряхивают реакционный сосуд) и начинают отсчет времени. Объем выделяющегося кислорода определяют через 2, 5 и 10 мин после начала реакции. Для этого за 10 с до отсчета поднимают стеклянную грушу до соответствующего уровня.

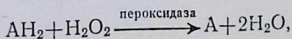
Активность каталазы выражают в миллилитрах кислорода, который выделяется под действием фермента из 1 г семян или свежего растительного материала за 2, 5 и 10 мин (учитывают навеску и разбавление).

Оборудование и реактивы: 1) прибор для газометрического определения каталазы, водяная баня, колбы мерные емкостью 100 и 200 мл, ступки, воронки, стаканы;

2) углекислый кальций, перекись водорода 3%-ная, серная кислота 5%-ная.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза (Н. Ф. I.11.1.7) играет большую роль в окислительно-восстановительных процессах. Она катализирует окисление различных полифенолов, находящихся в растениях в свободном или связанном состоянии, а также ароматических аминов. Реакция окисления идет по следующей схеме:



где AH_2 — донор водорода, A — окисленный донор.

Принцип метода. Метод определения активности пероксидазы, предложенный А. Н. Бояркиным, основан на

определении скорости реакции окисления бензидина под действием фермента, содержащегося в растениях, до образования продукта окисления синего цвета определенной концентрации, заранее устанавливаемой на фотоэлектроколориметре.

Ход определения. Навеску листьев растений или корнеплодов (200—500 мг) растирают в ступке с ацетатным буфером рН 4,7 и с помощью буфера переносят в мерную колбу емкостью 50 мл. После 10 мин настаивания с периодическим помешиванием, в результате чего пероксидаза переходит в раствор, вытяжку центрифугируют при 3000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость используют для определения активности фермента.

В две кюветы фотоэлектроколориметра шириной 2 см наливают по 2 мл ферментного раствора, 2 мл раствора бензидина в ацетатном буфере и 2 мл воды. Измерения производят на ФЭК при красном светофильтре. Вначале устанавливают стрелку гальванометра на нуле, а затем поворотом правого барабана для отсчета переводят стрелку гальванометра в крайнее правое положение (экстинкция $E=0,125$ или $0,250$). После этого в контрольную (левую) кювету наливают 2 мл воды, а в правую (опытную) 2 мл 3%-ной перекиси водорода. Сразу же после начала вливания перекиси водорода включают секундомер. При этом под действием пероксидазы происходит реакция окисления бензидина с образованием соединения синего цвета и стрелка гальванометра начинает отклоняться от края шкалы к нулевому делению. Секундомер останавливают, когда стрелка гальванометра достигнет нулевого деления. Желательно для определения активности фермента брать такую навеску растительного материала, чтобы стрелка достигала нулевого деления через 20—50 с.

Вычисление результатов. Активность фермента A вычисляют по скорости реакции в условных единицах и выражают на 1 г растительного материала. Для этого пользуются следующей формулой:

$$A = \frac{E(a \cdot b)}{n \cdot c \cdot t},$$

где A — активность фермента на 1 г навески;

E — экстинкция (0,125 или 0,250);

a — объем вытяжки (50 мл);

- b — степень разведения вытяжки в реакционной смеси (в кювете);
 n — навеска растительного материала, г;
 c — толщина слоя жидкости в кювете (2 см);
 t — время, с.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектрокслориметр, центрифуга, секундомер, колбы мерные емкостью 50 мл, пипетки, воронки, фильтры, ступки;

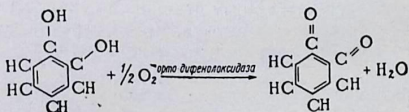
2) перекись водорода 3%-ная, ацетатный буфер pH 4,7, раствор бензидина в ацетатном буфере.

Для приготовления ацетатного буфера к 2,3 мл ледяной уксусной кислоты в мерной колбе на 200 мл приливают немного воды и добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия. Смесь перемешивают и доводят водой до метки.

Раствор бензидина на ацетатном буфере. В мерную колбу емкостью 200 мл наливают примерно 100 мл воды, прибавляют 2,3 мл ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. После этого колбу нагревают на водяной бане при 60°C, постоянно взбалтывая. После растворения бензидина в колбу добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия, охлаждают и доводят водой до метки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОРТО-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

Орто-дифенолоксидаза (Н. Ф. 1.10.3.1), или полифенолоксидаза, — окислительно-восстановительный фермент, принимающий участие в дыхании растений. Под действием этого фермента катализируется окисление орто-дифенолов в соответствующие орто-хиноны по следующей схеме:



Фермент характеризуется довольно высокой специфичностью. В присутствии молекулярного кислорода он катализирует окисление не только различных дифе-

нолов, но и разнообразных полифенолов, а также монофенолов и некоторых других соединений.

Принцип метода. Определение активности орто-дифенолоксидазы, предложенное А. Н. Бояркиным, основано на измерении активности фермента по скорости окисления диметил-*n*-фенилендиамина с образованием соединения, окрашенного в сине-фиолетовый цвет.

Ход определения. Навеску растительного материала от 0,5 до 1 г (взвешивают на аналитических весах с точностью 0,001 г) растирают в фарфоровой ступке в присутствии фосфатного буфера (рН 7,4). Растертую массу переносят в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят тем же буфером до метки. Содержимое колбы перемешивают и через некоторое время центрифугируют при 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость используют для определения активности фермента.

В две кюветы электрофотоколориметра шириной 2 см наливают по 2 мл ферментной вытяжки, 2 мл воды и 2 мл раствора диметил-*n*-парафенилендиамина. Измерения производят на ФЭК при оранжевом или красном светофильтре.

Кюветы ставят в фотоэлектроколориметр, устанавливают стрелку гальванометра на нулевую отметку и затем поворотом правого барабана переводят стрелку гальванометра в правое положение (экстинкция $E=0,125$). После этого в контрольную (левую) кювету наливают 2 мл 0,01 н. щавелевой кислоты, а в правую (опытную) кювету — 2 мл 1%-ного раствора пирокатехина в 0,01 н. щавелевой кислоте. Одновременно с добавлением этого раствора включают секундомер. Под действием орто-дифенолоксидазы диметил-*n*-фенилендиамин окисляется с образованием соединения сине-фиолетового цвета, в результате чего стрелка гальванометра движется к нулевому делению со скоростью, зависящей от активности фермента. Когда стрелка достигает нулевого деления, секундомер останавливают и записывают время.

Вычисление результатов. Активность фермента A выражают на 1 г растительного материала и вычисляют по следующей формуле:

$$A = \frac{E \cdot a \cdot b}{n \cdot c \cdot t},$$

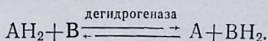
где A — активность фермента на 1 г;
 E — экстинкция (0,125);
 a — объем вытяжки (50 мл);
 b — степень разбавления вытяжки в кювете;
 n — навеска растительного материала, г;
 c — толщина жидкости в кювете, см;
 t — время, с.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, центрифуга, секундомер, ступки фарфоровые, колбы мерные емкостью 50 мл, воронки;

2) фосфатный буфер pH 7,4, 0,02%-ный раствор диметил-*n*-фенилендиамина, 0,01 н, щавелевая кислота, 1%-ный раствор пирокатехина в 0,01 н. щавелевой кислоте (растворяют 1 г пирокатехина в 100 мл 0,01 н. щавелевой кислоты).

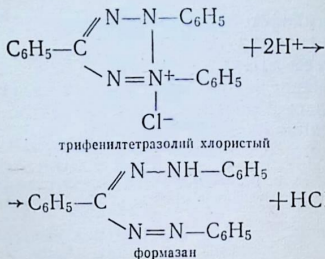
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ

Дегидрогеназы — окислительно-восстановительные ферменты, участвующие в процессе дыхания растений. Общая схема действия дегидрогеназ следующая:



Восстановленное вещество AH_2 , которое служит донором водорода, под действием дегидрогеназ передает его веществу B . Вещество A окисляется, а вещество B восстанавливается. Дегидрогеназа функционирует в этой системе как промежуточный переносчик водорода. Для определения активности дегидрогеназ разработаны различные методы. Ниже изложен колориметрический метод определения дегидрогеназ, предложенный А. Ф. Сысоевым и Т. С. Красной.

Принцип метода. Дегидрогеназы экстрагируют из растительного материала фосфатным буфером. Метод определения их активности основан на способности дегидрогеназ отщеплять водород от различных субстратов (органических кислот, спиртов, углеводов и т. д.) и восстанавливать бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый до формазана, окрашенного в красный цвет. По интенсивности окраски образовавшегося формазана судят об активности дегидрогеназ. Схему восстановления 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого под действием водорода, отщепляемого от субстратов, можно изобразить следующим образом.



Ход определения. Навеску растительного материала около 1 г (взвешивают на аналитических весах) помещают в предварительно охлажденную в холодильнике фарфоровую ступку, добавляют немного толченого стекла, 5 мл специально приготовленного фосфатного буфера pH 7,8 (реактив 11)* и тщательно растирают. Полученную суспензию переносят в пробирку и ставят ее в стакан со льдом.

В две пробирки (опытную и контрольную) наливают по 1 мл полученной суспензии. В опытную пробирку добавляют 0,2 мл субстратной смеси (реактив 13), а в контрольную пробирку—0,2 мл раствора для контроля (реактив 14), который готовят смешиванием равных объемов 1%-ного раствора 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого и фосфатного буфера pH 7,8. В качестве доноров водорода при приготовлении субстратной смеси используют органические кислоты (яблочную, лимонную, янтарную, молочную, глутаминовую), спирт, глюкозу и т. д. в концентрации 0,2 М, которые перед определением смешивают с равным объемом 1%-ного раствора 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ).

Если определяют активность дегидрогеназ в зеленых частях растений (листьях, стеблях), суспензия после растирания с фосфатным буфером получается окрашенной. В этом случае ставят второй контроль. Для этого берут третью пробирку, наливают в нее 1 мл полученной суспензии и 0,2 мл фосфатного буфера. Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

* Здесь и далее номер в скобках означает название реактива; см. «Оборудование и реактивы» на странице 220.

После этого пробирки помещают в вакуум-эксикатор и откачивают вакуумным насосом воздух до давления 10—12 мм ртутного столба. Затем вакуум-эксикатор накрывают черным светонепроницаемым чехлом и оставляют для инкубации на 1,5 ч при температуре 20—22°C. Если активность дегидрогеназ низкая, время инкубации увеличивают. В результате действия дегидрогеназ, содержащихся в растительном материале, образуется окрашенный формазан. После окончания инкубации впускают воздух в вакуум-эксикатор и вынимают из него пробирки.

Образовавшийся формазан нерастворим в воде, но хорошо растворяется в органических растворителях. Авторами метода предложен специальный растворитель для формазана, который готовят смешиванием 95 мл этилового спирта и 5 мл 98%-ной уксусной кислоты. Для растворения формазана во все пробирки приливают по 5 мл этого растворителя и содержимое пробирок тщательно перемешивают. Затем растворы фильтруют через маленькие бумажные фильтры в сухие пробирки. После этого во всех трех полученных растворах измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре в кюветах толщиной 1 см при зеленом светофильтре.

Вычисление результатов. Из показаний оптической плотности опытной пробы вычитают показания плотности контрольной пробы. При использовании окрашенного материала и двух контролей вычитают также оптическую плотность второго контроля. Активность дегидрогеназ выражают условно в единицах экстинкции или в микрограммах восстановленного под действием дегидрогеназ тетразолия хлористого. В последнем случае активность определяют по калибровочному графику.

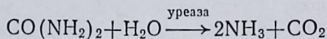
Для построения калибровочного графика берут 5 пробирок и вносят в каждую пробирку по 1 мл специально приготовленного раствора аскорбиновой кислоты для восстановления ТТХ (реактив 16). Затем в каждую пробирку прибавляют по 0,2 мл раствора ТТХ с содержанием в этом объеме 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мг ТТХ. Для этого используют предварительно приготовленные растворы трифенилтетразолия хлористого различной концентрации (от 0,1 до 0,5%). Содержимое пробирок нагревают до кипения и оставляют в темном месте на 20 мин. При этом идет восстановление трифенилтетразолия до формазана. После этого в каждую пробирку добавляют по

5 мл специального растворителя для формазана (реактив 15). Содержимое пробирок тщательно перемешивают, фильтруют в сухие пробирки и измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре в кювете толщиной 1 см. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс содержание взятого для определений трифенилтетразолия, а на оси ординат — оптическую плотность растворов.

Оборудование и реактивы: 1) Фотоэлектроколориметр. 2) Вакуум-эксикатор. 3) Вакуумный насос. 4) Холодильник. 5) Ступки фарфоровые. 6) Пробирки. 7) Колбы мерные емкостью 100 мл. 8) Воронки. 9) Фильтры. 10) Стаканы. 11) Специально приготовленный фосфатный буфер, pH 7,8 (2%-ный раствор K_2HPO_4 , содержащий 0,1% желатина и 0,2% $MgCl_2$, доводят 2%-ным раствором K_2HPO_4 до pH 7,8). 12) 1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого. 13) Субстратная смесь В качестве доноров водорода для дегидрогеназ используют 0,2 М растворы органических кислот — яблочной, лимонной, янтарной, молочной и др., которые предварительно нейтрализуют щелочью (KOH или NaOH) по фенолфталеину, этиловый спирт, глюкозу или другие моносахариды. Перед определением смешивают равные объемы этих веществ и 1%-ного раствора ТТХ. 14) Раствор для контроля, который готовят путем смешивания равных объемов 1%-ного раствора ТТХ и фосфатного буфера, pH 7,8. 15) Растворитель для формазана (к 95 мл 96%-ного этилового спирта прибавляют 5 мл 98%-ной уксусной кислоты). 16) Раствор аскорбиновой кислоты для восстановления ТТХ, pH 8,8 (готовят 5%-ный раствор аскорбиновой кислоты в 3%-ном растворе K_2HPO_4 , содержащем 0,1% желатина и 0,2% $MgCl_2$). 17) Растворы ТТХ в концентрации от 0,1 до 0,5%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Уреаза, или карбамид-амидогидролаза (Н. Ф. 3.5. 1.5), — фермент, широко распространенный в растениях. Он катализирует гидролитическое расщепление мочевины на аммиак и углекислый газ по следующей схеме:



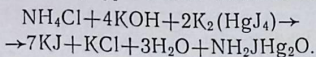
Принцип метода. Определение активности уреазы основано на учете количества аммиака, образовавшегося в единицу времени под действием препарата фермента, выделенного из растений. Количество аммиака определяют колориметрически с реактивом Несслера.

Ход определения. Для приготовления препарата фермента 3—5 г свежемолотой соевой муки (или муки

других бобовых) тщательно растирают в фарфоровой ступке в смеси из 48 мл воды и 2 мл 0,1 н. HCl. Смесь взбалтывают 1 ч, а затем центрифугируют 30 мин при 5—7 тыс. об/мин. Полученный прозрачный раствор используют в качестве препарата уреазы.

В коническую колбу на 50 мл вносят 10 мл препарата уреазы и 5 мл 0,1 М раствора мочевины в $1/15$ М фосфатном буфере pH 7,0 и инкубируют 30 мин при 37°C. После этого уреазу инактивируют, для чего в колбу добавляют 5 мл 2 н. HCl.

Затем определяют содержание аммиака с реактивом Несслера, который представляет собой щелочной раствор йодистой ртутно-калиевой соли $K_2(HgJ_4)$. Для этого 5—10 мл вытяжки переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, горлышко колбы обмывают водой, добавляют 2,5 мл 25%-ного раствора сегнетовой соли и осторожно нейтрализуют 1 н. NaOH, используя в качестве индикатора лакмусовую бумагу. Добавление сегнетовой соли необходимо для предотвращения выпадения в осадок солей кальция и магния, находящихся в растворе. Затем общий объем жидкости доводят водой примерно до 40 мл и прибавляют 2 мл реактива Несслера. Образуется йодистый меркураммоний желтого цвета.



Колбу доводят водой до метки, несколько раз перемешивают и через 15 мин определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре в кюветках толщиной 2 см при синем или зеленом светофильтре.

Параллельно ведут контрольное определение содержания аммиачного азота в ферментном препарате. Для этого к 10 мл ферментного препарата сразу же добавляют 5 мл 2 н. HCl, а затем приливают 5 мл 0,1 М раствора мочевины в $1/15$ М фосфатном буфере pH 7,0. Инкубацию и дальнейшую обработку контрольных проб проводят так же, как в опытных.

Вычисление результатов. Количество аммиака, образовавшегося под действием уреазы, определяют по разности между содержанием аммиака в опытной и контрольной колбах.

Содержание аммиака определяют по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика в колбу емкостью 50 мл берут по 1; 2; 4; 8; 10; 15 и 20 мл

образцового раствора хлористого аммония, содержащего 0,01 мг NH_3 в 1 мл, приливают воду и сегнетовую соль, окрашивают реактивом Несслера и колориметрируют, как указано выше. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс содержание аммиака, а на оси ординат — оптическую плотность.

Активность уреазы выражают в мкг образовавшегося аммиака (или в мкг гидролизованной мочевины) на 1 г навески за 1 мин.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, прибор для взбалтывания, центрифуга, термостат, ступки фарфоровые, колбы конические емкостью 50 мл, пипетки градуированные;

2) 0,1 н. и 2 н. HCl , 1 н. NaOH , 0,1 М раствор мочевины в $1/15$ М фосфатном буфере, 25%-ный раствор сегетовой соли, реактив Несслера, образцовый раствор хлористого аммония.

Реактив Несслера. В 15 мл дистиллированной воды растворяют 10 г йодистого калия, добавляют 15 г HgJ_2 , тщательно перемешивают и туда же приливают 80 мл 50%-ного раствора KOH . Перемешивают и общий объем доводят водой (не содержащей углекислоты) до 500 мл. Оставляют в темноте на сутки, после чего фильтруют через стеклянную вату. Раствор должен быть прозрачным. Хранят раствор в темной склянке.

Образцовый раствор хлористого аммония. 1,5735 г химически чистого NH_4Cl растворяют в 1 л бидистиллированной воды. Берут 20 мл раствора и снова доводят бидистиллированной водой до 1 л; 1 мл этого раствора содержит 0,01 мг NH_3 .

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Ферментативный гидролиз α -1,4-глюкозидных связей в крахмале, гликогене и родственных им поли- и олигосахаридах осуществляется группой ферментов, получивших название амилаз.

В настоящее время известны три вида амилаз, различающихся по распространению в природе, по ряду свойств и главным образом по конечным продуктам ферментативного действия.

α -амилаза (Н. Ф. 3.2.1.1) гидролизует внутренние α -1,4-глюкозидные связи в субстратах, приводя в конечном итоге к образованию мальтозы, мальтотриозы, не-

которого количества глюкозы и различных низкомолекулярных продуктов с разветвленной цепью.

β -амилаза (Н. Ф. 3.2.1.2) и глюкоамилаза (Н. Ф. 3.2.1.3) в отличие от α -амилазы гидролизуют наружные нередуцирующие концы цепей полисахаридов, последовательно отщепляя соответственно мальтозные и глюкозные остатки. Действие β -амилаз и глюкоамилаз прекращается, как правило, вблизи первой точки ветвления полисахарида, образованного α -1,6-глюкозидной связью. Поэтому, помимо мальтозы и глюкозы, под действием β - и глюкоамилаз образуются декстрины высокой молекулярной массы.

Принцип метода основан на извлечении амилаз из растений раствором хлористого натрия и определении колориметрическим путем негидролизованного крахмала.

Ход определения. Навеску муки 3 г (листьев или проростков — 5 г) растирают с песком в фарфоровой ступке с 1%-ным раствором NaCl и переносят в стакан. Соотношение между навеской растительного материала и NaCl должно быть от 1:5 до 1:10. Стакан с раствором ставят в холодильник на 1—1,5 ч при помешивании палочкой для выделения белков. После этого центрифугируют при 4—5 тыс. об/мин 10 мин. Полученная прозрачная жидкость используется в качестве ферментного препарата для определения активности амилаз.

Определение суммарной активности амилаз. В 2 сухие пробирки вносят по 3 мл 0,2 н. ацетатного буфера pH 5,5 и по 3 мл 2%-ного раствора крахмала. Смесь нагревают до 40°C, приливают точно 0,2—1 мл ферментного препарата и перемешивают. В контрольную пробирку наливают 0,2—1 мл воды. Пробирки ставят в термостат при 40°C на 30 мин. За это время под действием амилаз крахмал гидролизует. Закончив инкубацию, в каждую пробирку вносят по 2 мл 1 н. раствора HCl для прекращения действия фермента. Затем из каждой пробирки берут по 0,5 мл смеси и вносят в мерные колбочки на 50 мл, в которые предварительно прилито 30—40 мл воды, 1 мл 0,1 н. HCl и 5 капель 0,3%-ного раствора йода в 3%-ном растворе йодистого калия. Колбы доводят до метки водой, тщательно перемешивают и затем колориметрируют на спектрофотометре при 595 нм (на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре).

Вычисление результатов проводят по следующей формуле.

$$A = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot C,$$

где A — активность амилазы в 1 мг гидролизованного крахмала за 1 ч одним миллилитром ферментного раствора (так как время инкубации составляло 30 мин, полученный результат умножают на 2, а количество взятого для анализа ферментного раствора приводят к 1 мл; необходимо учесть все разбавления);

E_k — оптическая плотность контрольного раствора;

E_o — оптическая плотность опытного раствора;

C — количество внесенного крахмала в мг (3 мл 2%-ного раствора крахмала = 60 мг).

Для вычисления удельной активности определяют содержание белка в ферментном растворе (в мг) и полученную активность A выражают в мг гидролизованного крахмала на 1 мг белка за 1 ч (или за 1 минуту).

Определение активности α -амилазы. В оставшуюся часть фильтрата (5—8 мл) добавляют на кончике шпателя сухого уксуснокислого кальция и ставят на водяную баню при 70°C, выдерживают 15 мин, затем быстро охлаждают. β -амилаза при таких условиях инактивируется практически полностью. Далее этот раствор используют для определения α -амилазной активности по методике, описанной выше.

Вычисление результатов активности α -амилазы проводят так же, как и суммарной активности амилаз.

Активность β -амилазы определяют по разности между суммарной активностью и активностью α -амилазы.

Оборудование и реактивы: 1)

роколориметр, термостат, водяная баня, стаканы, колбы мерные емкостью 50 мл, пробирки;

шпатель, пипетки,

2) 1%-ный раствор NaCl, 0,2 н. ацетатный буфер pH 5,5 (см. приложение, табл. 7), 2%-ный растворимый крахмал, 1 н. HCl, 0,1 н. HCl, 0,3%-ный раствор йода в 3%-ном растворе йодистого калия, уксуснокислый кальций (сухой).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Изоферменты — группы ферментов из одного и того же источника, обладающих одним типом субстратной специфичности, катализирующих одну и ту же химическую реакцию, но различающихся по ряду физико-химических свойств.

Изоферментный состав одного и того же фермента изменяется в зависимости от вида растений, отдельных органов одного и того же растения, от условий выращивания, а также в процессе прорастания и созревания семян.

Наиболее важными характерными свойствами, позволяющими различать изоферменты современными методами, являются суммарный электрический заряд и молекулярная масса. В настоящее время наибольшее распространение для изучения изоферментного состава растений получил метод электрофореза в полиакриламидном геле. Обнаруживаемую при этом картину расположения зон изоферментов на электрофореграмме называют изоферментным спектром.

Работа с изоферментами требует особенно тщательного соблюдения всех условий проведения электрофоретического анализа. Во время электрофореза гели в зависимости от напряженности поля в той или иной степени прогреваются, поэтому электрофорез термолabile ферментов проводят при низкой температуре и небольшой силе тока (например, при 4°C и 1—3 мА на одну электрофоретическую трубку). Для анализа используют либо неочищенные тканевые экстракты, либо очищенные препараты белков.

Принцип метода. Экстракт из растительных тканей подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле. Присутствие изоферментов амилаз в отдельных зонах на электрофореграммах определяют по исчезновению в этих зонах крахмала, предварительно введенного в состав геля и проявленного после окончания электрофореза раствором йода.

Ход определения. Рабочий раствор для приготовления разделяющего геля составляют так же, как и для электрофоретического разделения водорастворимых белков, но вместо воды в нижний мелкопористый гель вво-

дят одну часть 1%-ного раствора крахмала. Крахмал не препятствует электрофоретическому разделению белков. В верхний гель крахмал не вводят.

Приготовление гелей, подготовка и нанесение образца фермента и электрофорез проводят так же, как и при электрофоретическом разделении водорастворимых белков (см. стр. 69).

Для инкубации и окрашивания гелей используют два раствора: 1) 0,2 н. ацетатный буфер pH 5,5; 2) 0,3%-ный раствор йода в 3%-ном водном растворе KJ (перед употреблением разбавить в 6 раз).

По окончании электрофореза гели осторожно вынимают из трубочек с помощью шприца и помещают в пробирки с 1%-ным раствором крахмала в ацетатном буфере pH 5,5. Крахмал вводят в буфер для выявления амилаз в верхних зонах геля, где во время электрофореза часть крахмала может разрушиться.

Гели инкубируют в пробирках при температуре 37°C в течение 20—40 мин. Затем буферный раствор сливают, гель промывают водой и заливают раствором йода в йодистом калии. Крахмал окрашивается в течение 5—10 мин. После проявления неокрашенных зон амилаз раствор йода в йодистом калии сливают, а гель промывают и заливают водой. По количеству и размещению неокрашенных полос на геле судят об изоферментном составе амилаз данного образца. Вычисляют показатель относительной электрофоретической подвижности (ОЭП)

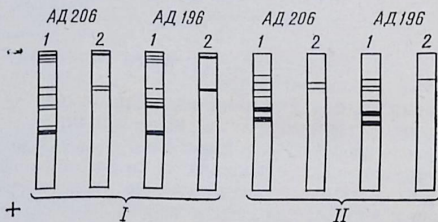


Рис. 40. Изоферментные спектры амилаз сухого зерна (I) и 3-суточных проростков (II) пшенично-ржаных амфидиплоидов (Triticale) сортов АД 206 и АД 196:

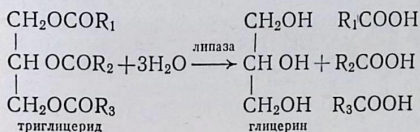
1 — суммарные амилазы; 2 — α -амилаза.

и проводят фотографирование или вычерчивают схему электрофореграммы. На рисунке 40 представлена схема электрофоретического разделения изоферментов амилаз зерна и проростков пшенично-ржаных амфидиплоидов.

Оборудование и реактивы. Кроме оборудования и реактивов, необходимых для электрофоретического разделения водорастворимых белков (см. стр. 79), необходимы следующие реактивы (1%-ный водный раствор крахмала, 1%-ный раствор крахмала в ацетатном буфере pH 5,5, 0,3%-ный раствор йода в 3%-ном водном растворе KJ (перед употреблением разбавить в 6 раз), 0,2 н. ацетатный буфер pH 5,5.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

Липаза (Н. Ф. 3.1.1.3) катализирует расщепление жиров (триглицеридов жирных кислот) на глицерин и жирные кислоты. Реакция идет по следующей схеме:



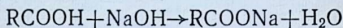
По существующей классификации ферментов липаза принадлежит к гидролазам, действующим на сложноэфирные связи.

В растениях липазы широко распространены. Особенно их много в семенах масличных культур. У каждого вида растений есть свои собственные липазы, значительно различающиеся по свойствам, однако в отличие от многих других ферментов специфичность липаз очень низка и любая липаза может расщеплять различные жиры.

В растениях присутствуют липазы, проявляющие свою активность при различных значениях pH, поэтому иногда различают кислую, нейтральную и щелочную липазы, которые проявляют свою максимальную активность соответственно в кислой, нейтральной или щелочной среде. В семенах масличных культур содержатся в основном кислые и щелочные липазы.

Принцип метода основан на определении количества жирных кислот, образующихся при действии липаз на

растительный жир. В качестве источника липаз используют семена масличных культур. Титрование образовавшихся кислот щелочью происходит по схеме.



Активность липаз определяют в слабокислой или щелочной среде.

Ход определения. Семена масличных культур размалывают или растирают в ступке (без песка). В небольшие ступки отвешивают две навески по $2,5 \pm 0,1$ г размолотых семян и тщательно растирают их с 1 мл чистого подсолнечного масла, которое добавляют в каждую ступку. Для определения активности кислых липаз в ступку приливают 5 мл ацетатного буфера pH 4,7, а для определения щелочных — 5 мл боратного буфера pH 8,5 и некоторое время растирают содержимое ступок.

После окончания растирания кашицу из ступок переносят в две конические колбы с притертыми пробками емкостью 100 мл. Остатки со ступки смывают в колбы 5 мл воды, добавляют по 5 капель толуола, закрывают пробками и тщательно перемешивают на автоматической мешалке. После этого колбы ставят в термостат при 30°C на 20—24 ч.

Для точного анализа активности липаз необходимо провести контрольные определения. Для контрольных проб берут по две навески растертых семян масличных культур и поступают с ними таким же образом, как указано выше, но перед тем как ставить в термостат, содержимое колб кипятят в течение 5—10 мин для инактивации ферментов.

После инкубации в термостате во все колбы приливают по 50 мл смеси этилового спирта с эфиром (4:1) и взбалтывают. После отстаивания титруют 0,1 н. спиртовым раствором NaOH в присутствии нескольких капель тимолфталейна.

Вычисление результатов. Активность кислых и щелочных липаз выражают в миллилитрах 0,1 н. NaOH, пошедшей на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз на 10 г семян. Расчеты проводят по следующей формуле:

$$X = \frac{(a \cdot T - b \cdot T) \cdot 10}{n},$$

- где X — активность липазы;
 a — количество 0,1 н. NaOH, израсходованное для титрования опытного образца, мл;
 T — поправка к титру 0,1 н. NaOH;
 b — количество 0,1 н. NaOH, израсходованное для титрования контрольного (предварительно прокипяченного) образца, мл;
 n — навеска семян, г.

Оборудование и реактивы: 1) автоматическая мешалка, термостат, ступки фарфоровые, конические колбы с притертыми пробками емкостью 100 мл, пипетки;

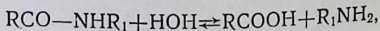
2) ацетатный буфер pH 4,7 (смешивают по 1 объему 1 н. уксусной кислоты и 1 н. уксуснокислого натрия и добавляют 2 объема воды), 0,2 М боратный буфер pH 8,5, 0,1 н. NaOH, этиловый спирт, эфир, подсолнечное масло, толуол, 1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина.

Чистое подсолнечное масло. 300 г подсолнечного масла взбалтывают в делительной воронке с 2%-ным водным раствором щелочи и дают отстояться. Щелочной раствор сливают. Масло промывают в воронке несколько раз дистиллированной водой (до отрицательной реакции с фенолфталеином). Затем отстаивают и сушат, пропуская через колонку с хлористым кальцием.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Пептидазы (Н.Ф.3.4), или пептид-гидролазы, или протеолитические ферменты, — группа ферментов, катализирующих расщепление пептидных связей в белках или пептидах.

Расщепление этих связей идет с участием воды по следующей схеме:



где R и R_1 — остатки аминокислот или пептидов.

Субстратами пептидаз являются белки и пептиды, которые расщепляются на пептиды меньшей молекулярной массы или до свободных аминокислот.

Несмотря на то, что отдельные протеолитические ферменты получены в кристаллическом виде и хорошо изучены, в целом эта группа ферментов исследована еще

недостаточно. Поэтому при обычных биохимических исследованиях наиболее просто определять лишь суммарную активность протеолитических ферментов.

Отдельные группы протеолитических ферментов проявляют максимальную активность при различной кислотности среды, поэтому их активность следует определять при различных значениях рН. Ниже приведен один из распространенных способов определения суммарной активности протеолитических ферментов, в основу которого положен метод Ансена.

Принцип метода. Ферментным препаратом, выделенным из растительного материала, действуют на раствор стандартного белка (казеина или гемоглобина), затем неразложившийся белок осаждают, а в фильтрате определяют количество разложившегося белка по колориметрической реакции Фолина или на спектрофотометре. Принимается, что количество разложившегося белка пропорционально содержанию в растворе тирозина. Полученные значения оптической плотности переводят по стандартной кривой в микромоли тирозина и рассчитывают протеолитическую активность ферментного препарата на 1 мг белка или на 1 г навески за 1 ч.

Ход определения. Навеску взвешивают на аналитических весах: при анализе свежего растительного материала 5 г, а семян — 1 г. Свежий растительный материал растирают в ступке с жидким азотом, а сухой — с песком и переносят в коническую колбу. Ступку смывают водой. Общий объем воды, добавляемой к навеске, должен составить 50 мл. После этого суспензию настаивают в течение часа в холодильнике при периодическом помешивании.

После настаивания суспензию фильтруют в сухой стакан или колбу через складчатый фильтр или осадок отделяют центрифугированием. В качестве ферментного препарата используют фильтрат или надсадочную жидкость.

Приготовление субстратов. В качестве субстратов используют 2%-ные растворы казеина и гемоглобина при различных значениях рН.

2%-ный раствор казеина рН 8,0. 2 г казеина заливают 100 мл $\frac{1}{5}$ М фосфатного буфера рН 8,0 и нагревают на водяной бане до полного растворения. Проверяют рН раствора и доводят его точно до 8,0. Раствор казеина можно хранить в холодильнике не более трех суток.

2%-ный раствор гемоглобина рН 3,0 готовят путем растирания в ступке 2,0 г гемоглобина с небольшим количеством воды. Содержимое ступки переносят в мерную колбу на 100 мл, подкисляют 0,3 н. HCl до рН 3,0 и доводят водой до метки. Полученный раствор неустойчив, его следует готовить ежедневно.

Для приготовления растворов гемоглобина с рН 6,0 и 8,0 растворяют в 100 мл $1/15$ М фосфатного буфера с соответствующим значением рН 2,2 г гемоглобина, затем в раствор добавляют 36 г мочевины и оставляют при комнатной температуре. После этого растворы доводят до нужного значения рН 1 н. NaOH или 1 н. HCl .

При анализе активности протеолитических ферментов в пробирку наливают 2 мл субстрата (казеина или гемоглобина с определенным значением рН), помещают ее в водяную баню при 30°C и через 1—2 мин добавляют 2 мл ферментного препарата. Содержимое пробирки перемешивают и выдерживают на водяной бане или в термостате ровно 30 мин при 30°C . За это время под действием протеолитических ферментов частично гидролизуются внесенный в пробирку казеин или гемоглобин. После этого для прекращения действия ферментов в пробирку добавляют 4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты, встряхивают и оставляют пробирку на водяной бане еще на 30 мин. После этого содержимое пробирки фильтруют через плотный фильтр (фильтрат должен быть совершенно прозрачным) и устанавливают оптическую плотность на спектрофотометре при 280 нм. Если определения проводят на фотоэлектроколориметре, к 1 мл фильтрата добавляют 5 мл 0,5 М Na_2CO_3 , перемешивают, быстро приливают 1 мл реактива Фолина (см. стр. 65) и еще раз перемешивают. Через 20 мин после стабилизации сине-фиолетовой окраски определяют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (670 нм) при толщине кюветы 10 мм.

Одновременно проводят контрольное определение. Для этого в пробирку вносят 2 мл соответствующего раствора казеина или гемоглобина, пробирку помещают на водяную баню при 30°C . Через 1—2 мин добавляют 2 мл ферментного препарата и 4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем выдерживают на водяной бане и дальнейшие операции проводят, как и в опытном варианте.

Вычисление результатов. При спектрофотометрических определениях вычисляют разность $E_o - E_k$, где E_o — оптическая плотность опытного образца, E_k — оптическая плотность контрольного образца. Протеолитическую активность препарата выражают в единицах протеолитической активности на 1 мг белка, содержащегося в ферментном препарате (для этого необходимо определить содержание белка в нем) или на 1 г навески растительного материала за 1 ч.

Пример расчета. Допустим, что оптическая плотность опытного образца составляет 0,400, а контрольного — 0,250, т. е. разность составляет 0,150. Навеска материала 1 г. Разбавление 50 мл. Для анализа взято 2 мл ферментного препарата, что соответствует навеске 0,04 г. Для пересчета протеолитической активности на 1 г необходимо 0,150 разделить на 0,04, что дает 3,75 за 30 мин, а для перевода на 1 ч результат умножают на 2. Таким образом, условная протеолитическая активность исходного материала составляет 7,50 единиц.

Общая формула для расчета:

$$ПА = \frac{(E_o - E_k) \cdot 2}{n},$$

где ПА — протеолитическая активность (в условных единицах);

2 — коэффициент для пересчета на 1 ч;

n — навеска материала, соответствующая количеству ферментного препарата, взятого для определения (или содержанию белка в препарате), г.

При фотоэлектроколориметрическом определении за единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое за 1 ч при 30°C катализует гидролиз такого количества казеина или гемоглобина, которое содержит 1 мкмоль тирозина (181,2 мг).

Содержание тирозина определяют по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой 181,2 мг чистого тирозина растворяют в 1 л 0,2 н. HCl. Разведения готовят в 5—10 раз. Реакцию с реактивом Фолина проводят, как описано выше (в качестве контроля берут 1 мл воды). На основании определений оптической плотности растворов тирозина различной концентрации строят калибровочную кривую.

Общая формула для расчета следующая:

$$ПА = \frac{(E_o - E_k) \cdot 2}{TЭ \cdot n},$$

где ПА — протеолитическая активность (в условных единицах);

E_o — оптическая плотность опытного раствора;

E_k — оптическая плотность контроля;

ТЭ — тирозиновый эквивалент (оптическая плотность раствора, содержащего 1 микромоль тирозина в 1 мл);

2 — коэффициент для пересчета с 30 мин на 1 ч;

n — навеска материала, соответствующая количеству ферментного препарата, взятого для определения (или содержанию белка в препарате); при расчете навески необходимо учесть все разбавления.

Тирозиновый эквивалент, соответствующий 1 мкмоль тирозина в 1 мл, ориентировочно составляет 1,5—1,7 E.

Оборудование и реактивы: 1) спектрофотометр, фотозлектроколориметр, центрифуга, холодильник, водяная баня, колбы мерные емкостью 50 мл, 100 мл и 1 л, конические колбы емкостью 100 мл, воронки, градуированные пипетки, пробирки;

2) казеин, гемоглобин, жидкий азот, реактив Фолина (приготовление см. стр. 65), 1 н. NaOH, 1 н. и 0,3 н. HCl, 5%-ная трихлоруксусная кислота, 0,5 М Na_2CO_3 , $\frac{1}{5}$ М фосфатный буфер pH 8,0 (9,077 г/л KH_2PO_4 и 23,283 г/л $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$); для приготовления буфера смешивают 5,5 мл первого раствора и 94,5 мл второго раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗ

Щелочная (Н.Ф.3.1.3.1) и кислая (Н.Ф.3.1.3.2) фосфатазы, или фосфомоноэстеразы, участвуют в гидролизе ортофосфорнокислых эфиров различных спиртов и фенолов. В отличие от некоторых других фосфатаз (5-нуклеотидазы, фосфоамидазы, аденозинтрифосфатазы и др.), гидролизующих строго определенные субстраты, кислая и щелочная фосфатазы обладают широкой специфичностью.

Оптимум действия щелочной фосфатазы проявляется при значениях pH от 8,9 до 9,6, а кислой от 4,5 до 5,3.

Принцип метода. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз основано на количественном учете

неорганического фосфора, образующегося при расщеплении органических фосфорных соединений в строго определенных условиях под действием этих ферментов.

Ход определения. При определении активности ксил-фосфатазы используют боратный или гликоколевый буферный раствор pH 5,3, а щелочной фосфатазы — боратный буфер pH 9,0. Берут 3—5 г растительной ткани (листья, стебли, корни, семена или другие изучаемые части растений), растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством стеклянного песка и 5—10 мл боратного или гликоколевого буфера. После этого суспензию из ступки переносят в мерную колбу на 25 мл. Ступку смывают несколько раз небольшими порциями того же буфера, общий объем в колбе доводят до 25 мл и содержимое колбы тщательно перемешивают. Для получения прозрачного раствора суспензию переносят из колбы в центрифужные пробирки и центрифугируют 5—10 минут при 3000 об/мин. Надосадочная жидкость служит в качестве исходного ферментного препарата для определения активности фосфатаз.

В мерную пробирку наливают 2 мл буфера с соответствующим значением pH, 0,2 мл 0,001 M раствора $MgCl_2$ и 1 мл субстрата — глицерофосфата натрия с концентрацией 5 мг в 1 мл.

Затем в пробирку вносят точно 2,5 мл ферментного препарата. Содержимое пробирки перемешивают, интенсивно встряхивая, и инкубируют в термостате в течение 2 ч при температуре 35°C. После инкубации для прекращения ферментативной реакции и осаждения белков в смесь (пробирку) добавляют 3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Общий объем смеси доводят дистиллированной водой до 10 мл и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют 10 мин при 5000 об/мин.

В осветленном растворе колориметрическим методом по Фiske и Суббароу определяют содержание фосфора (см. стр. 200). В зависимости от ожидаемого количества фосфора берут 3—5 мл прозрачного раствора.

Параллельно проводят «холостое» определение неорганического фосфора. Для этого в реакционную смесь сразу же после добавления препарата фермента приливают трихлоруксусную кислоту, чтобы предотвратить ферментативное расщепление фосфора.

Таким образом, в одном растительном образце оп-

ределяют неорганический фосфор дважды (каждый раз в 2—3-кратной повторности): первый раз — сразу после прекращения ферментативного расщепления органических фосфатов («холостое» определение), второй — после двухчасового действия фермента.

Количественная разница между вторым и первым определениями служит мерой активности фермента. Активность фермента выражают в мг неорганического фосфора (P_2O_5) на 1 г растительной ткани.

Пример расчета. Допустим, что для приготовления препарата фермента брали 5 г растительной ткани и после растирания в ступке доводили общий объем до 25 мл. Для инкубации брали 2,5 мл ферментного препарата, а для колориметрического определения P_2O_5 — 5 мл прозрачного раствора. Установили, что в этих 5 мл разность между вторым и первым определениями неорганического фосфата составляет 0,96 мг P_2O_5 . Следовательно, в общем объеме инкубационной смеси (10 мл), что соответствует 2,5 мл ферментного препарата, содержится $0,96 \times 2 = 1,92$ мг P_2O_5 , а в 5 мл ферментного препарата (которое соответствует 1 г сырой ткани) содержится X мг P_2O_5 .

$$X = \frac{5 \cdot 1,92}{2,5} = 3,84 \text{ мг.}$$

Активность щелочной фосфатазы равна 3,84 мг P_2O_5 на 1 г сырой ткани за 2 ч или 1,92 мг за 1 ч.

Оборудование и реактивы: 1) центрифуга, термостат, фотоэлектроколориметр, фарфоровая ступка, мерные пробирки, пипетки;

2) боратный буфер рН 9,0 и рН 5,3, 0,1 н, гликолевый буфер рН 9,0 0,001 М раствор $MgCl_2$, субстрат — раствор глицерофосфата натрия в концентрации 5 мг в 1 мл, трихлоруксусная кислота 10%-ная, образцовый раствор и реактивы для определения фосфора по методу Фiske и Суббароу.

Боратный буфер рН 9,0. Берут 85,6 мл 0,05 М раствора тетрабората натрия (12,367 г $H_3BO_3 + 100$ мл раствора NaOH в 1 л) и доводят до 100 мл 0,1 н. HCl.

Боратный буфер рН 5,3. Берут 0,05 М раствор тетрабората натрия и доводят 0,1 н. раствором HCl до рН 5,3.

Гликолевый буфер 0,1 н. рН 9,0. 12,4 мл 0,1 н. NaOH доводят до 100 мл 0,1 н. раствором гликоля (7,507 г гликоля + 5,85 г NaCl в 1 л).

ВИТАМИНЫ

Витамины — низкомолекулярные, биологически активные органические соединения разнообразной химической природы, необходимые для нормальной жизнедеятельности организмов.

Витамины тесно связаны с ферментами, и многие из них входят в состав активных групп двухкомпонентных ферментов.

Растения обладают способностью синтезировать все необходимые им витамины, человек получает их с продуктами питания, а животные — с кормами. Поэтому определение витаминов в растениях необходимо прежде всего для оценки пищевой и кормовой ценности растительных продуктов.

По сравнению с углеводами, белками или жирами витаминов в растениях значительно меньше, поэтому для точного их количественного определения необходима особая аккуратность в работе и строгое соблюдение методики анализов.

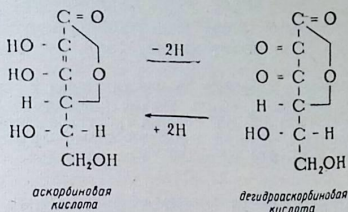
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)

Аскорбиновая кислота — антицинготный витамин. Количество аскорбиновой кислоты в растениях зависит от почвенно-климатических условий выращивания. Обычно овощи, плоды и ягоды, выращенные на севере, содержат значительно больше аскорбиновой кислоты, чем выращенные в южных районах.

Аскорбиновая кислота в организме принимает активное участие в окислительно-восстановительных процессах.

Связано это с тем, что она существует в двух формах — собственно аскорбиновой кислоты и легко обра-

зующейся из нее дегидроаскорбиновой кислоты. Взаимные превращения этих двух форм показаны ниже:



Аскорбиновая кислота хорошо растворяется в воде. В растворах она легко разрушается, особенно при нагревании в присутствии воздуха. Каталитические следы железа и меди усиливают интенсивность разрушения аскорбиновой кислоты.

Принцип метода. Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее редуцирующих свойствах, в частности, способности восстанавливать йодат калия до свободного йода, количество которого определяют по реакции с крахмалом.

Ход определения. Растительный материал размельчают на пластмассовой терке и берут для анализа 2—10 г. Навеску тщательно растирают в фарфоровой ступке, экстрагируют аскорбиновую кислоту водой и количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку несколько раз смывают водой. Затем раствор фильтруют через сухой фильтр в сухой стаканчик или колбу.

Отбирают в конические колбочки емкостью 100 мл 10 мл фильтрата, приливают 1 мл 2%-ной HCl, 0,5 мл 1%-ного раствора йодистого калия и 2 мл 0,5%-ного раствора крахмала. Смесь разбавляют водой примерно до 20 мл, перемешивают и титруют из микробюретки 0,01 н. раствором йодата калия до устойчивого синего окрашивания. Все операции по определению аскорбиновой кислоты следует проводить быстро (в течение 10 мин). Параллельно ведут контрольное титрование смеси применявшихся реактивов (вместо 10 мг фильтрата берут 10 мл воды).

Вычисление результатов проводят по разности количества 0,01 н. йодата калия, пошедшего на титрование опытного образца и контроля. 1 мл точно 0,01 н. йода-

та калия соответствует 0,8806 мг аскорбиновой кислоты. При расчетах учитывают поправку к титру йодата калия, навеску материала и разбавление. Если содержание аскорбиновой кислоты низкое, вместо 0,01 н. используют 0,001 н. йодат калия.

Оборудование и реактивы: 1) пластмассовая терка, ступка фарфоровая, микробюретка, колбы мерные емкостью 100 мл, колбы конические емкостью 100 мл, пипетки градуированные;

2) 2%-ная HCl , 1%-ный йодистый калий, 0,5%-ный растворимый крахмал, KJO_3 0,01 н. или 0,001 н. раствор.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИНА Р)

Витамин Р укрепляет стенки кровеносных сосудов и наряду с витамином С предохраняет от заболевания цингой.

К веществам, обладающим Р-витаминной активностью, относятся прежде всего рутин и гесперидин. Такой же активностью обладают катехины и танин чайного листа. В растениях эти соединения принимают участие в окислительно-восстановительных процессах.

Рутин — гликозид, состоящий из рамнозы, β -глюкозы и флавонона кверцетина.

В значительном количестве он содержится в листьях и других органах растений.

Ниже описан метод определения рутина в растениях — одного из соединений, обладающих высокой Р-витаминной активностью.

Принцип метода основан на способности рутина давать окрашенные растворы с цитратно-борной смесью. Интенсивность окраски в определенных пределах пропорциональна концентрации рутина. Оптическую плотность исследуемых окрашенных растворов, содержащих рутин, сравнивают с оптической плотностью стандартного раствора рутина.

Ход анализа. Навеску растительного материала (5 г листьев или 10 мг тонкоразмолотых семян гречихи) растирают в фарфоровой ступке и многократно экстрагируют горячим раствором метилового спирта до получения бесцветного экстракта. Экстракты сливают вместе, спирт отгоняют в специальном приборе под вакуумом (см. рис. 21) или выпаривают на водяной бане, подогретой до 35°C в токе воздуха. Остаток обрабатывают несколько раз малыми порциями этилового эфира для

удаления окрашенных пигментов. Эфирные вытяжки сливают через фильтр на маленькой воронке Бюхнера и отбрасывают. Рутин, содержащийся в осадке, растворяют в метиловом или абсолютном спирте при легком нагревании на водяной бане и фильтруют через тот же фильтр через воронку Бюхнера в чистый приемник. Общее количество фильтрата доводят сухим ацетоном до объема, при котором концентрация рутина будет соответствовать примерно 0,1 мг в 1 мл.

2 мл раствора рутина переносят в пробирку емкостью 10 мл с притертой пробкой, добавляют 8 мл цитратно-борной смеси и оставляют на 10 мин в темном месте. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине волны 420 нм в кюветах толщиной 1 см. Количество рутина определяют путем сравнения оптической плотности исследуемого раствора с оптической плотностью стандартного образца, содержащего 0,1 мг рутина в 1 мл. Для этого к 2 мл стандартного раствора приливают 8 мл цитратно-борной смеси и далее проводят определение, как описано выше.

Содержание рутина в образце вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot c \cdot v \cdot 100}{D_2 \cdot n \cdot 2},$$

где X — содержание рутина, мг на 100 г вещества;

D_1 — оптическая плотность образца;

D_2 — оптическая плотность стандарта;

c — содержание рутина в стандартном растворе;

v — разведение;

n — навеска растительного материала, г.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр спектрофотометр, ступки фарфоровые, колбы конические емкостью 100 мл, прибор для отгонки спирта в вакууме, баня водяная Бунзена, воронки Бюхнера, пробирки мерные градуированные 10 мл и 20 мл, пипетки градуированные, чашки фарфоровые.

2) метиловый спирт, этиловый спирт, сухой ацетон, борная смесь, стандартный раствор рутина.

Стандартный раствор рутина. 0,0250 г рутина растворяют в 10 мл горячего метилового спирта, доводят до 250 мл сухим ацетоном. Хранят в темной склянке с притертой пробкой при 5°C. Реактив годен 6 месяцев.

Цитратно-борная смесь. Реактив А: 10 г лимонной кислоты, предварительно высушенной в течение 2 ч при 60°C, растворяют в 100 мл сухого ацетона. Реактив Б: 0,8 г борной кислоты растворяют в 100 мл сухого ацетона. Перед употреблением реактивы А и Б смешивают в соотношении 1:1 и фильтруют.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА (ПРОВИТАМИНА А)

Каротин относится к группе каротиноидов — желтых и оранжево-красных пигментов, построенных из восьми остатков изопрена и имеющих общую формулу $C_{40}H_{56}$.

Известно по крайней мере 5 изомеров каротина, которые обозначают буквами греческого алфавита. Все они биологически активны, так как при их расщеплении с участием воды в организме человека и животных образуется витамин А. Наибольшей биологической активностью обладает β -каротин. При расщеплении молекулы β -каротина с присоединением воды образуются две молекулы витамина А ($C_{20}H_{29}OH$). Каротин нерастворим в воде, но растворяется в некоторых органических веществах (эфире, ацетоне, спирте).

Принцип метода. Каротин экстрагируют из растительного материала ацетоном, затем переводят в петролейный эфир и отделяют от других пигментов методом распределительной хроматографии на колонках с окисью алюминия. Количество каротина определяют колориметрически по интенсивности желтой окраски путем сравнения с раствором азобензола (или бихромата калия), стандартизированного по каротину.

Ход определения. 5—10 г измельченного свежего растительного материала растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком. Каротин распадается в кислой среде, поэтому при растирании добавляют немного Na_2CO_3 (все операции по экстракции и очистке каротина желательно проводить при рассеянном свете, в токе углекислого газа или азота).

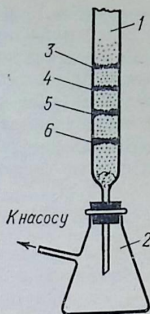
Каротин экстрагируют ацетоном, повторяя растирание навески и экстракцию ацетоном несколько раз (пока экстракт не станет бесцветным). Обычно используют пятикратное (по отношению к навеске) количество ацетона. Все ацетоновые экстракты сливают в стакан, а затем фильтруют при отсасывании. Фильтр промывают небольшим количеством ацетона и количест-

Рис. 41. Хроматографическое разделение каротиноидов на окиси алюминия:

1 — хроматографическая колонка; 2 — колба Бунзена; 3 — ликопин; 4 — α -каротин; 5 — β -каротин; 6 — γ -каротин.

венно переносят в делительную воронку.

Хроматографическое разделение экстрагированных пигментов на окиси алюминия проводят с использованием в качестве растворителя петролейного эфира. Поэтому необходимо, чтобы пигменты сконцентрировались в этом растворе. Для того чтобы перевести пигменты в петролейный эфир, в делительную воронку приливают 10—20 мл этого растворителя, добавляют для лучшего разделения несколько миллилитров воды и кристаллик хлористого натрия, воронку встряхивают и оставляют до полного разделения слоев. Нижний (водно-ацетоновый слой) сливают. Воду приливают несколько раз до полного удаления следов ацетона.



Для обезвоживания раствор пигментов в петролейном эфире пропускают через колонку, наполненную безводным Na_2SO_4 . Дальнейшее отделение каротина от сопутствующих пигментов проводят методом адсорбционной хроматографии на окиси алюминия. Для этого на дно хроматографической колонки (рис. 41) помещают ватный тампон толщиной около 1 см. Затем в колонку небольшими порциями вносят окись алюминия с влажностью 4%, слегка постукивая по колонке стеклянной палочкой и уплотняя адсорбент. Высоту слоя адсорбента доводят до 7—10 см. После этого в колонку кладут слой ваты и вносят безводный сульфат натрия слоем 0,5 см. Раствор каротина в петролейном эфире медленно (со скоростью 60 капель в минуту) пропускают через хроматографическую колонку при слабом разрежении. При этом надо следить, чтобы над поверхностью адсорбента все время был слой растворителя, так как каротин на воздухе окисляется. Затем через колонку пропускают чистый петролейный эфир до тех пор, пока весь каротин, отделяясь от двух пигментов, в виде желтой полосы не перейдет в приемник. Промывание колонки заканчивают, когда вытекающий растворитель станет

прозрачным. Раствор каротина переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят петролевым эфиром до метки.

Содержание каротина определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 440 нм, сравнивая со стандартным раствором азобензола или двуххромовокислого калия.

Вычисление результатов. Количество каротина вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot D_1 \cdot v \cdot 100}{D_2 \cdot n},$$

где X — содержание каротина, мг на 100 г;

a — количество мг каротина в 1 мл, которому соответствует стандартный раствор (обычно 0,00235 мг, если был взят азобензол и 0,00416 мг, если был взят бихромат калия);

D_1 — оптическая плотность исследуемого раствора;

D_2 — оптическая плотность стандарта;

v — объем раствора каротина, мл;

n — навеска растительного материала, г.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр или спектрофотометр, ступки фарфоровые, воронки делительные, колбы Бунзена, воронки Бюхнера, колонки хроматографические, колбы мерные емкостью 50 мл;

2) NaCO_3 , Na_2SO_4 безводный, Al_2O_3 с влажностью 4% (окись алюминия высушивают при 105°C и увлажняют по расчету, хранят в банке с притертой крышкой), петролейный эфир, стандартные растворы азобензола и бихромата калия.

Стандартный раствор бихромата калия. 720 мг $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ растворяют в воде и доводят объем до 100 мл. Оптическая плотность раствора соответствует содержанию 0,00416 мг каротина в 1 мл.

Стандартный раствор азобензола. 0,145 г перекристаллизованного из спирта азобензола растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта. Перед употреблением 10 мл раствора разбавляют 96%-ным спиртом до 100 мл. Оптическая плотность этого раствора соответствует плотности 0,00235 мг каротина в 1 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА PP)

Никотиновая кислота (витамин PP) содержится во всех органах растений и в значительном количестве накапливается в семенах. Превращаясь в амид, она

используется для образования большой группы окислительно-восстановительных ферментов, содержащих в своих активных группах НАД и НАДФ. Таким образом, при недостатке этого витамина задерживается образование многих ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные процессы в организмах. Биологической активностью обладает как свободная никотиновая кислота, так и ее амид.

В организме человека и животных никотиновая кислота не синтезируется. При недостатке в пище витамина РР развивается пеллагра.

Никотиновая кислота хорошо растворяется в воде и ряде других растворителей. Это довольно устойчивое соединение, не разрушается под действием высокой температуры и окислителей.

Принцип метода основан на способности никотиновой кислоты давать окрашенные соединения с бромистым роданом и метолом. В модификации Е. М. Степановой метод заключается в измерении интенсивности этой окраски по сравнению со стандартным раствором никотиновой кислоты.

Ход анализа. 2—10 г растительного материала (взвешивают на аналитических весах) растирают с небольшим количеством 2 н. H_2SO_4 и переносят количественно в мерную колбу на 50 мл. Колбу выдерживают на кипящей водяной бане полтора часа, периодически помешивая. При этом гидролизуются многие сложные углеводы и другие соединения. После окончания гидролиза колбу охлаждают, доводят водой до метки и фильтруют. Первые порции фильтрата отбрасывают. Затем отбирают 25 мл фильтрата в мерную колбу емкостью 50 мл и нейтрализуют в присутствии фенолфталеина 10 н. $NaOH$ до слабо-розового окрашивания. Избыток щелочи быстро устраняют 5 н. серной кислотой. В полученный раствор вносят 2 мл 80%-ного сернокислого цинка и несколько капель этилового спирта. Затем в раствор по каплям приливают 4 н. $NaOH$ до появления осадка и бледно-розовой окраски, перемешивают, оставляют на 10 мин, а затем доводят до объема 50 мл. Осадок отфильтровывают и фильтрат используют для анализа.

В конические колбы емкостью 50 мл для анализа пробкой (или широкогорлые пробирки того же объема) вносят в одну 5 мл испытуемого раствора, а в другую 5 мл стандартного раствора никотиновой кислоты, со-

державшего 0,005 мг вещества в 1 мл. Колбы нагревают на водяной бане 5 мин при 50°C, а затем под тягой при-
бавляют из бюретки по 2 мл роданобромидного реак-
тива. Содержимое перемешивают и вновь нагревают на
водяной бане 10 мин при 50°C. После быстрого охлаж-
дения колбы помещают на 10 мин в темноту, затем при-
ливают по 3 мл метола и вновь оставляют в темноте
в течение часа. Оптическую плотность исследуемого
раствора (D_1) и стандарта (D_2) определяют на фото-
электроколориметре при 440 нм в кюветах толщиной
1 см.

Параллельно проводят контрольное определение оп-
тической плотности аминокрасящих веществ в исходном
растворе (D_3) и реактивах (D_4). Для этого в первом
случае вместо роданобромидного реактива используют
2 мл воды, а во втором — заменяют водой раствор нико-
тиновой кислоты. Все остальные этапы анализа прово-
дятся, как описано выше.

Вычисление результатов проводят по следующей
формуле:

$$X = \frac{(D_1 - D_3) \cdot c \cdot v \cdot 100}{(D_2 - D_4) \cdot n},$$

где X — содержание никотиновой кислоты в образце;

D_1 — оптическая плотность исследуемого раствора;

D_2 — оптическая плотность стандартного раствора
никотиновой кислоты;

D_3 — оптическая плотность аминокрасящих веществ
в исходном растворе (для поправки на ами-
нореагирующие вещества);

D_4 — оптическая плотность для поправки на реак-
тивы;

c — содержание никотиновой кислоты в стандарт-
ном растворе, мг;

n — навеска растительного материала, г;

v — объем раствора (с учетом всех разбавле-
ний), мл.

Оборудование и реактивы: 1) фотоэлектроколориметр, водяная
баня, термометры, ступки фарфоровые, колбы мерные емкостью
50 мл, пипетки градуированные, бюретка, колбы конические ем-
костью 50 мл с притертыми пробками (или широкогорлые про-
бирки того же объема с притертыми пробками);

2) 2 н. и 5 н. H_2SO_4 , 4 н. и 10 н. $NaOH$, цинк сернистый
80 %-ный, роданобромидный реактив, метол перекристаллизированный,
стандартный раствор никотиновой кислоты.

Роданобромидный реактив. 4 мл брома и 100 мл воды встряхивают, декантируют смесь и охлаждают во льду. К охлажденной бромной воде приливают по каплям 10%-ный раствор роданистого калия (или аммония) до светло-желтого окрашивания. Раствор окончательно обесцвечивают 1%-ным раствором роданида. Затем небольшими порциями добавляют 20—50 мг углекислого кальция до прекращения выделения CO_2 и образования осадка. Раствор отфильтровывают и хранят в темной склянке с притертой пробкой на холоду. Годен только в день приготовления.

Метол перекристаллизированный. 100 г метола смешивают с 0,7 г бисульфита натрия, добавляют к 500 мл 0,1 н. H_2SO_4 , нагретой до кипения и при необходимости добавляют 100 г активированного угля. Смесь фильтруют через воронку Бюхнера в большой химический стакан, добавляют 0,3 г бисульфита натрия, 700 мл спирта и помещают на несколько часов в ледяную баню в темноте. Выпавшие кристаллы промывают 95%-ным спиртом и сушат на воздухе в темноте. Хранят в темной склянке с притертой пробкой. 8%-ный раствор метола на 0,5 н. HCl готовят в день анализа.

Стандартный раствор никотиновой кислоты. 0,500 г вещества растворяют в колбе на 500 мл в воде, подкисленной 5 мл 10 н. H_2SO_4 . При хранении в темной склянке с притертой пробкой на холоду раствор годен в течение 6 месяцев. В день анализа 5 мл раствора доводят до 1 литра. 1 мл раствора содержит 0,005 мг никотиновой кислоты.

ПРИЛОЖЕНИЯ
Индикаторы для измерения pH

Таблица 1

Индикатор	Пределы изменения pH	Изменение цвета		Раствор
		кислая среда	щелочная среда	
Тимоловый синий	1,2—2,8	Красный	Желтый	0,1 %-ный водный
Диметиловый желтый	2,9—4,1	»	»	0,1 %-ный в 90 %-ном спирте
Метиловый оранжевый	3,1—4,4	»	Оранжевый	0,1 %-ный водный
2,6-Динитрофенол	2,4—4,0	Бесцветный	Желтый	0,1 %-ный в 10 %-ном спирте
Бромфеноловый синий	3,0—4,6	Желтый	Синий	0,1 %-ный водный
Бромхлорфеноловый синий	3,0—4,6	»	Пурпурный	0,1 %-ный спиртовой
2,4-Динитрофенол	2,0—4,7	Бесцветный	Желтый	0,1 %-ный в 10 %-ном спирте
Конго красный	3,0—5,2	Фиолетовый	Красный	0,1 %-ный водный
Бромкрезоловый зеленый	3,8—5,4	»	Синий	То же
Метиловый красный	4,4—6,3	Красный	Желтый	0,1 %-ный водный или 0,2 %-ный спиртовой
Хлорфеноловый красный	4,8—6,4	Желтый	Красный	0,1 %-ный водный или 0,1 %-ный в 20 %-ном спирте
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	»	Синий	0,1 %-ный водный
Лакмус	5,0—8,0	Красный	»	То же
Нейтральный красный	6,8—8,0	»	Желтый	0,1 %-ный в 60 %-ном спирте
Феноловый красный	6,4—8,2	Желтый	Красный	0,1 %-ный водный
Тимоловый синий	8,0—9,6	»	Синий	0,1 %-ный водный или 0,1 %-ный в 20 %-ном спирте
Фенолфталеин	8,0—9,8	Бесцветный	Красно - фиолетовый	0,1 %-ный в 50 %-ном спирте
Тимолфталеин	9,3—10,5	»	Синий	0,1 %-ный в 80 %-ном спирте

Таблица 2

0,1 М Фосфатный буфер, pH 5,8—8,0
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$M = 178,05;$	0,2М раствор содержит	35,61 г в 1 л
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$M = 358,22;$	0,2М » »	71,64 г в 1 л
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$M = 138,0;$	0,2М » »	27,6 г в 1 л
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$M = 156,03;$	0,2М » »	31,21 г в 1 л

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

После приготовления раствор разбавляют водой до 200 мл.

Таблица 3

Фосфатная смесь Серенсена, pH 4,94—9,18

Для приготовления смеси растворяют в 1 л воды 11,976 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и в 1 л воды — 9,078 г KH_2PO_4 . Для получения приведенных значений pH растворы смешивают в указанных соотношениях (при расчете на 10 частей).

pH	Na_2HPO_4	KH_2PO_4	pH	Na_2HPO_4	KH_2PO_4
4,94	0,10	9,90	6,98	6,00	4,00
5,29	0,25	9,75	7,17	7,00	3,00
5,59	0,50	9,50	7,38	8,00	2,00
5,91	1,00	9,00	7,73	9,00	1,00
6,24	2,00	8,00	8,04	9,50	0,50
6,47	3,00	7,00	8,34	9,75	0,25
6,64	4,00	6,00	8,67	9,90	0,10
6,81	5,00	5,00	9,18	10,00	0,00

Таблица 4

Фосфатно-цитратный буфер, рН 2,2—8,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $M=178,05$; 0,2М раствор содержит 35,61 г в 1 л.
 Лимонная кислота $\cdot \text{H}_2\text{O}$ $M=210,14$; 0,1М раствор содержит 21,01 г в 1 л.

рН	0,2М Na_2HPO_4 , мл	0,1М лимонная кислота, мл	рН	0,2М Na_2HPO_4 , мл	0,1М лимонная кислота, мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Таблица 5

Цитратный буфер, рН 3,0—6,6

Лимонная кислота $\cdot \text{H}_2\text{O}$; $M=210,14$; 0,1М раствор содержит 21,01 г в 1 л.

$\text{Na}_3\text{=цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M=294,12$; 0,1 М раствор содержит 29,4 г в 1 л.

рН	0,1М лимон- ная кислота, мл	0,1М $\text{Na}_3\text{-цит-}$ рат, мл	рН	0,1М лимон- ная кислота, мл	0,1М $\text{Na}_3\text{-цит-}$ рат, мл
3,0	18,6	1,4	5,0	8,2	11,8
3,2	17,2	2,8	5,2	7,3	12,7
3,4	16,0	4,0	5,4	6,4	13,6
3,6	14,9	5,1	5,6	5,5	14,5
3,8	14,0	6,0	5,8	4,7	15,3
4,0	13,1	6,9	6,0	3,8	16,2
4,2	12,3	7,7	6,2	2,8	17,2
4,4	11,4	8,6	6,4	2,0	18,0
4,6	10,3	9,4	6,6	1,4	18,0
4,8	9,2	10,8			

Ацетатный буфер, рН 3,8—6,3

Для приготовления буферного раствора требуемого значения рН отмеряют указанный объем 1 н. раствора уксусной кислоты, прибавляют 50,0 мл 1 н. раствора едкого натра и разбавляют дистиллированной водой до 500 мл.

рН	Уксусная кислота 1н., мл	рН	Уксусная кислота 1н., мл	рН	Уксусная кислота 1н., мл
3,8	421,5	4,67	100,0	5,5	57,4
3,9	345,1	4,7	96,8	5,6	55,9
4,0	284,4	4,8	87,2	5,7	54,7
4,1	236,2	4,9	79,5	5,8	53,7
4,2	197,9	5,0	73,4	5,9	53,0
4,3	167,4	5,1	68,6	6,0	52,3
4,4	143,3	5,2	64,8	6,1	51,9
4,5	124,1	5,3	61,7	6,2	51,5
4,6	108,9	5,4	69,3	6,3	51,2

Т а б л и ц а 8

Универсальная буферная смесь

Приготавливают раствор смеси 0,04М фосфорной, 0,04М уксусной, 0,04М борной кислот. Для получения буферного раствора желаемого значения рН к 100 мл смеси приливают 0,2 н. раствор аОН в объеме, указанном в таблице.

NaOH, мл	рН	NaOH, мл	рН	NaOH, мл	рН	NaOH, мл	рН
0	1,81	25,0	4,10	50,0	6,80	75,0	9,62
2,5	1,89	27,5	4,35	52,5	7,00	77,5	9,91
5,0	1,98	30,0	4,56	55,0	7,24	80,0	10,38
7,5	2,09	32,5	4,78	57,5	7,54	82,5	10,88
10,0	2,21	35,0	5,02	60,0	7,96	85,0	11,20
12,5	2,36	37,5	5,33	62,5	8,36	87,5	11,40
15,0	2,56	40,0	5,72	65,0	8,69	90,0	11,58
17,5	2,87	42,5	6,09	67,5	8,95	92,5	11,70
20,0	3,29	45,0	6,37	70,0	9,15	95,0	11,82
22,5	3,78	47,5	6,59	72,5	9,37	100,0	11,98

Фосфатно-цитратные буферные системы с постоянной ионной силой,
(ионная сила системы 1,0 или 0,5 при различных значениях рН)

рН	Состав смеси (г на 1 л раствора)		Ионная сила буферной смеси μ	г KCl, добавляемые на 1 л буферной смеси для получения ионной силы	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	лимонная кис- лота $\cdot \text{H}_2\text{O}$		1,0 μ	0,5 μ
2,2	1,43	20,6	0,0108	74,5	37,2
2,4	4,44	19,7	0,0245	72,7	35,4
2,6	7,80	18,7	0,0410	71,5	34,2
2,8	11,35	17,7	0,0592	70,2	32,9
3,0	14,70	16,7	0,0771	68,7	31,4
3,2	17,70	15,8	0,0934	67,6	30,3
3,4	20,40	15,0	0,0112	66,2	28,9
3,6	21,5	14,2	0,128	64,9	27,6
3,8	25,4	13,6	0,142	64,0	26,7
4,0	27,6	12,9	0,157	62,8	25,5
4,2	29,7	12,3	0,179	61,7	24,4
4,4	31,6	11,7	0,190	60,4	23,1
4,6	33,4	12,1	0,210	58,9	21,6
4,8	35,3	10,7	0,232	57,2	19,9
5,0	36,9	10,2	0,256	55,5	18,2
5,2	38,4	9,75	0,278	53,8	16,5
5,4	40,0	9,29	0,302	52,1	14,8
5,6	41,5	8,72	0,321	50,6	13,3
5,8	43,3	8,32	0,336	49,5	12,2
6,0	45,2	7,74	0,344	48,4	11,6
6,2	47,5	7,12	0,358	47,9	10,6
6,4	49,6	6,47	0,371	46,9	9,62
6,6	52,1	5,72	0,385	45,8	8,50
6,8	55,4	4,79	0,392	44,5	7,23
7,0	58,9	3,70	0,427	42,7	5,44
7,2	62,3	2,74	0,457	40,4	3,10
7,4	65,0	1,91	0,488	38,2	0,488
7,6	67,2	1,35	0,516	36,0	
7,8	68,6	0,893	0,540	34,3	
8,0	69,6	0,589	0,559	32,9	

Гелевая система для диск-электрофореза

Принятые сокращения:

Трис — трис (оксиметил) аминокетан; ПСА — персульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; РФ — рибофлавин; Сах. — сахароза; Темед — N, N', N'', N'-тетраметилэтилендиамин; МБА — N, N'-метиленбискарбамид; ЭДА — этилен диакрилат; АсОН — ледяная уксусная кислота.

Система геля	Область применения	pH		Растворы разделяющего (нижнего) геля			Растворы концентрирующего (верхнего) геля			Электродный буферный раствор		Полоса			
		концентрирующий гель	разделяющий гель	№	составные части на 100 мл раствора	pH	соотношение растворов в смеси	№	составные части на 100 мл раствора	pH	соотношение частей на 1000 мл раствора	рН	вер-хний	ниж-ний	
pH 8,9; 7,5% (сред-непорис- тый гель)	Белки с молекулярной массой 10 ⁴ —10 ⁶ ; опти- мальное разделе- ние при мо- лекуляр- ной мас- се 3·10 ⁴ — —3·10 ⁵ (сыво- роточные белки)	8,3	9,5	1	1н.НСl 48 мл Трис 36,6 г Темед 0,23 мл	8,9	1 часть № 1 2 части № 2 1 часть Н ₂ O 4 части № 3	4	1МН ₃ РO ₄ 25,6 мл Трис 5,7 г Акрила-мид 10,0г МБА 2,5г	6,9	1 часть № 4 2 части № 5 1 часть № 6 4 части № 7	8,3	—	+	
				2	Акрил-амид 30,0 г МБА 0,8 г			5						Трис 6 г Глицин 28,8 г Использ-зуют 10%-ный водный раствор	
				3	ПСА 0,14 г			6 7	РФ 4 мг Сах. 40,0 г						

Реактивы, используемые для окрашивания белков при электрофорезе

Красители (название и синонимы)	Эмпирическая формула и молекулярная масса	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Фиксирующий раствор и продолжительность фиксации	Раствор красителя и продолжительность окрашивания	Примечание
Амидовый черный 10В (амидошварц) Нафталиновый черный 10В	$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_6\text{S}_2$ 572	620	В большинстве случаев 1% (или меньше) в 7%-ной уксусной кислоте; 0,5—2 ч Иногда 1% в смеси 7%-ная уксусная кислота + 30%-ный метанол (для усиления фиксации)	Перед употреблением раствор фильтруют При старении появляется осадок красителя и белковые помолы окрашиваются в почти черный цвет (вместо темно-синего)	
Кумаси бриллиантовый синий R 250 Кислотный синий 83	$\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}_2$ 742 (трифенилметановый краситель фуксинового ряда)	555	20%-ный водный раствор сульфосалициловой кислоты, 18 ч	0,25% в воде, не содержащей тяжелых металлов; 0,5—2 ч или 0,25% в смеси 9%-ная уксусная кислота + 45%-ный метанол; 30 мин Электрофоретическое обесцвечивание в 3,75%-ной уксусной кислоте	Между красителем и белком образуются электростатические и вандерваальсовы связи
Азокармин В	$\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{N}_3\text{S}_3\text{Cl}$ 697	525		0,5% в смеси 7%-ная уксусная кислота + 30%-ный метанол; 0,5—2 ч	

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I

АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА

Определение общего азота	3
Определение белкового азота	7
Определение небелкового азота	8
Определение азота колориметрическим феноловым методом	9
Ускоренный метод определения общего азота	10
Определение аммиачного азота	13
Определение нитратного азота	16
Определение аминного азота	17
Определение основных форм небелкового азота в одной навеске	19
Основы метода распределительной хроматографии на бумаге	22
Определение значений R_F аминокислот	31
Количественное определение свободных аминокислот	34
Выделение белков из растений и определение их фракционного состава	43
Выделение зеина	53
Определение содержания клейковины в зерне	55
Определение изоэлектрической точки белков	57
Хроматография белков на целлюлозононитах	59
Разделение белков электрофорезом в полиакриламидном геле	69
Спектрофотометрический метод определения белков	79
Определение аминокислотного состава белков	86
Гидролиз белков	86
Определение аминокислот хроматографией на бумаге	89
Определение аминокислот на аминокислотных анализаторах	91
Высушивание растительного материала лиофилизацией	106

Раздел II

УГЛЕВОДЫ

Определение редуцирующих сахаров	109
Определение сахарозы	114
Ускоренный полумикрометод определения сахаров	115
Определение фруктозы	117
Качественное определение состава сахаров методом хроматографии на бумаге	120
Определение крахмала	128
Метод кислотного гидролиза	130
Объемный метод определения крахмала	133
Схема количественного определения разных групп углеводов в растениях	136

Раздел III

ЖИРЫ

Определение сырого жира	144
Определение кислотного числа	148
Определение числа омыления	150
Определение йодного числа	151
Определение перекисного числа	155
Определение состава жирных кислот растительных масел методом газо-жидкостной хроматографии	155

Раздел IV

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Определение общей кислотности	170
Определение лимонной кислоты	171
Определение яблочной кислоты	177
Определение щавелевой кислоты	182
Качественное определение органических кислот методом хро- матографии на бумаге	185
Количественное определение органических кислот с исполь- зованием ионообменников и хроматографии на бумаге	189

Раздел V

ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Определение содержания общего фосфора	200
Определение отдельных фракций фосфорных соединений	204

Раздел VI

ФЕРМЕНТЫ

Основные принципы работы с ферментами	209
Определение активности каталазы	211
Определение активности пероксидазы	213
Определение активности орто-дифенолоксидазы	215
Определение активности дегидрогеназ	217
Определение активности уреазы	220
Определение активности амилолитических ферментов	222
Определение изоферментного состава амилолитических фер- ментов методом электрофореза в полиакриламидном геле	225
Определение активности липазы	227
Определение активности протеолитических ферментов	229
Определение активности фосфатаз	233

Раздел VII

ВИТАМИНЫ

Определение аскорбиновой кислоты (витамина С)	236
Определение рутина (витамина Р)	238
Определение каротина (провитамина А)	240
Определение никотиновой кислоты (витамина РР)	242

Приложения	246
----------------------	-----

Борис Павлович Плешков
ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

Редактор З. И. Уткина
Художественный редактор З. П. Зубрилина
Технический редактор А. Л. Янчова
Корректор Н. Ф. Крылова

Сдано в набор 15/III 1976 г. Подписано к печати 28/VI 1976 г. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага кн. журн. № 2. Усл.-печ. л. 13,44. Уч.-изд. л. 14,13
Изд. № 263. Тираж 15 000 экз.
Заказ № 2400. Цена 60 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Колос»,
103716, ГСП, Москва, К-31, ул. Дзержинского, д. 1/19.

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления издательств, полиграфии и книжной торговли, г. Смоленск, пр. им. Ю. Гагарина, 2.

