

Министерство образования
Российской Федерации

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Московский государственный университет леса

А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин, Г.Н. Федотов, Г.Л. Олиференко

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ХИМИИ

Учебное пособие

Допущено Учебно-методическим объединением по образованию в области лесного дела в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 260300 «Технология химической переработки древесины»



Издательство Московского государственного университета леса

Москва – 2016

УДК 573.6

6Л2 Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Федотов Г.Н., Олиференко Г.Л.
Теоретические и экспериментальные методы исследования в
химии. Учебное пособие. Изд. 2, доп. и перераб. – М.: МГУЛ,
2016. – 502 с.: ил. 124.

В учебном пособии представлены теоретические основы и основные методики экспериментов, выполняемых на практических занятиях студентами при изучении курсов общей химии, экологии, биотехнологии и экологических основ производств. Рекомендуется для углубленного изучения физико-химических дисциплин студентами всех форм обучения технических специальностей, в том числе по направлению «Химическая технология».

Рецензенты: д.х.н., профессор И.А. Ямсков, зав. лабораторией
физиологически активных биополимеров ИНЭОС
им. А.Н. Несмеянова РАН;

д.б.н., профессор А.И. Поздняков, зам. директора
по научной работе ВНИИ сельскохозяйственного
использования мелиорированных земель.

Кафедра химии и биотехнологии лесного комплекса

Авторы: Андрей Дмитриевич Неклюдов, д.х.н., профессор;
Андрей Николаевич Иванкин, д.х.н., профессор;
Геннадий Николаевич Федотов, к.х.н., доцент
.....Галина Львовна Олиференко, к.х.н., доцент

ISBN 5-8135-0213-1

© Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Федотов Г.Н., Олиференко Г.Л. 2016
© Московский государственный университет леса, 2016

Введение

При изучении точных наук, в первую очередь химии, экологии и биотехнологии, большое значение имеет лабораторный практикум по этим предметам. Известно, что правильно поставленный эксперимент позволяет не только проследить закономерности протекания химических процессов, но и запомнить свойства изучаемых студентами веществ. Кроме того, практические работы способствуют также выработке методологии не только химического, но и философского мышления. Действительно, как показывает практика, в ходе проведения лабораторных занятий по вышеуказанным предметам складываются определенные навыки восприятия определенных жизненных явлений, организации рабочих мест, сборки приборов, соблюдения правил техники безопасности.

Поскольку для ряда специальностей МГУ леса изучение химии ограничивается курсом общей химии, в предлагаемом учебном пособии, помимо общепринятых теоретических разделов и описания свойств химических веществ, включены также разделы по химической экологии и биотехнологии, без которых немислимо, на наш взгляд, современное образование.

Все разделы книги предусматривают глубокую проработку теоретического материала по вышеназванным дисциплинам, которая обуславливает полезные практические навыки, не только по химии, но и по тесно связанным с ней экологической химии и биотехнологии.

Практикум призван помочь студентам, аспирантам и начинающим исследователям в выполнении экспериментов и анализе полученных результатов. Разнообразные лабораторные и практические работы, представленные в данном издании, способствуют также, на наш взгляд, правильному выбору методик при решении конкретных задач химического, экологического и биотехнологического характера. Следует отметить, что в практикум включены методы, хорошо проверенные на практике.

При написании книги авторы использовали свой многолетний педагогический опыт проведения практических занятий и курсов лекций для студентов 1–5 курсов, аспирантов, соискателей и молодых специалистов. Практикум представляет собой набор не только лабораторных работ, но и кратких теоретических курсов, в ряде случаев претворяющих эти работы. Причем теоретические курсы, предшествующие отдельным главам, излагаются в кратком объеме, но достаточном для осмысления применения приведенных методов. В конце большинства глав приводятся контрольные вопросы, которые определяют уровень усвоения

слушателями и исполнителями представленного материала.

Считаем, что многие разделы данного учебного пособия могут оказаться полезными при подготовке не только к коллоквиумам, семинарам, но и к экзаменам при защите дипломных работ и последующем поступлении в аспирантуру, а также для специалистов, работающих в вышеназванных и смежных с ними областях.

Глава 1

ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВЕЩЕСТВ

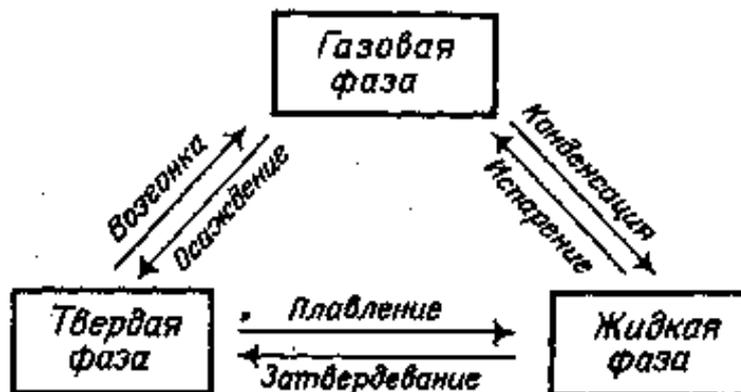
Кристаллизация

Кристаллизацией называется процесс образования кристаллической упорядоченной фазы (кристаллов) из раствора, расплава или газовой фазы.

Кристаллы – твердые тела, характеризующиеся периодическим закономерным расположением частиц (молекул, атомов, ионов) в пространстве.

Наиболее простым элементом кристаллической решетки является элементарная ячейка, которая описывается элементами симметрии и является характеристикой кристаллической формы того или иного вещества. К элементам симметрии относятся оси симметрии, плоскости симметрии и др. По совокупности элементов симметрии кристаллы подразделяются на шесть систем: триклинную, моноклинную, ромбическую, тетрагональную, гексагональную и кубическую. Однако на практике кристаллы часто называют по внешнему виду: листочки, иглы, призмы, кубики, палочки, параллелепипеды и т. п.

Кристаллизация – один из важнейших методов получения чистых веществ. Процесс очистки кристаллизацией из раствора называется перекристаллизацией, из расплава – зонной плавкой, из газовой фазы – возгонкой. Фазовые переходы между различными агрегатными состояниями приведены на схеме:



Перекристаллизация

Перекристаллизацией называется процесс очистки и разделения веществ, при котором вещество вначале растворяют при нагревании в подходящем растворителе, затем раствор охлаждают и вещества выкристаллизовываются в чистом виде.

Физические основы метода

Очистка веществ перекристаллизацией основана на разнице в растворимости целевого вещества и примесей в используемом растворителе. Оптимальным растворителем считается такой, в котором вещество имеет максимальную растворимость при температуре кипения и минимальную – на холоду (рис. 1.1). Существенным фактором при перекристаллизации является наличие центров кристаллизации, в отсутствие которых при охлаждении могут образовываться пересыщенные растворы. Такими центрами кристаллизации могут служить, например, кристаллы целевого вещества, или механические примеси. В некоторых случаях кристаллизацию инициируют путем испарения растворителя, тогда при охлаждении насыщенного раствора выпадает дополнительное количество кристаллов чистого вещества.

При проведении перекристаллизации очень важно правильно выбрать растворитель (см. табл. 1.1).

Растворитель должен иметь наиболее высокий температурный градиент растворимости.

Растворимость целевого вещества в выбранном растворителе должна заметно увеличиваться с ростом температуры.

Точка кипения растворителя должна быть ниже температуры плавления целевого вещества (в противном случае растворитель не следует нагревать до точки кипения), иначе вещество будет плавиться, а не растворяться в нагретом растворителе, и вместо кристаллизации при охлаждении будет наблюдаться застывание расплава.

Т а б л и ц а 1.1
Ряд полярности растворителей

Полярность	Растворители	Полярность	Растворители
Низкая полярность	Петролейный эфир	Умеренная полярность	Ацетон
Умеренная полярность	Диэтиловый эфир	Высокая полярность	Этанол Вода

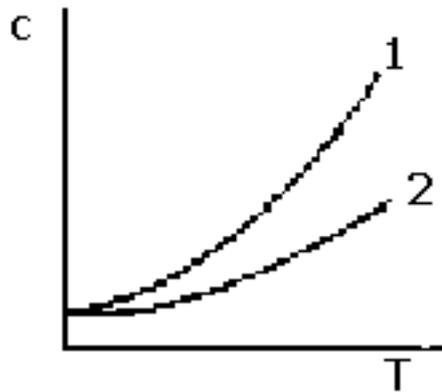


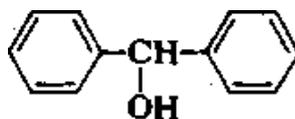
Рис. 1.1. Зависимость растворимости вещества в различных растворителях от температуры: 1 – растворимость вещества сильно зависит от температуры растворителя; 2 – растворимость вещества слабо зависит от температуры растворителя (для перекристаллизации следует использовать первый растворитель)

Температура кипения растворителя должна быть по возможности низкой, так как в этом случае кристаллы легче высушить.

Растворитель даже при температуре кипения должен быть инертным по отношению к целевому веществу.

Если предстоит перекристаллизовать неизвестное вещество, которое невозможно отнести к какому-либо определенному классу, приходится действовать эмпирическим путем. В тех случаях, когда формула вещества известна или его можно отнести к известному классу, действуют по определенной схеме. Прежде всего по структурной формуле вещества делают вывод о его гидрофильности или гидрофобности (неполярные группы: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ и др.; полярные группы: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ и др.), на этом основании выбирают наиболее подходящий растворитель (табл. 1.1).

Подобный подход может быть проиллюстрирован на примере дифенилкарбинола:



Наряду с двумя гидрофобными фенильными группами в молекуле дифенилкарбинола присутствует гидрофильная группа ОН–, в целом такая молекула обладает средней полярностью, поэтому ее перекристаллизовывают из растворителей высокой полярности. При наличии только фенильных групп вещество относилось бы к неполярным и его следовало кристаллизовать из неполярной смеси петролейный эфир – толуол.

Подобный подход применяют для общей оценки с тем, чтобы сократить число возможных вариантов смеси растворителей. При этом такие параметры растворителей, как дипольный момент, диэлектрическая проницаемость, сольватирующие свойства и др., не учитываются. Однако, в конечном счете, в основе всех рекомендаций лежат результаты эксперимента.

Для многих соединений вставлены таблицы растворимости в различных растворителях и при различных температурах.

Если не удастся добиться хорошей очистки при помощи одного растворителя, то положительного эффекта достигают, используя пару растворителей, в которых растворимость целевого вещества может быть выше или ниже:

петролейный эфир — диэтиловый эфир	этанол — ацетон
толуол — петролейный эфир	этанол — вода
хлороформ — петролейный эфир	метанол —
	диэтиловый эфир
хлороформ — четыреххлористый	метанол — дихлор-
углерод	метан
этанол — петролейный эфир	вода — ацетон
этанол — диэтиловый эфир	вода — уксусная
	кислота

Кроме того, известны специальные виды перекристаллизации.

Дробная кристаллизация. Возможность такого разделения объясняется неодинаковой растворимостью веществ при различных температурах. При некоторой определенной температуре раствор будет насыщенным в отношении одного и ненасыщенным в отношении другого вещества. Естественно, что в то время, когда первое вещество станет при охлаждении выпадать в осадок, второе еще будет полностью находиться в растворе.

Осаждение заменой одного растворителя другим. Этот способ применяется в том случае, когда вещество способно разлагаться при нагревании или изменять свой состав.

Способ заключается в том, что к концентрированному раствору вещества добавляют второй растворитель, в котором целевое вещество практически нерастворимо.

Далее выдерживают раствор при комнатной температуре или в холодильнике до завершения кристаллизации.

Приборы

Для проведения перекристаллизации чаще всего используют круглодонную колбу с обратным холодильником (рис. 1.2) или, в редких случаях, колбу Эрленмейера.

Для перекристаллизации микроколичеств или пробных экспериментов – обычные пробирки.

Для нагревания пользуются колбонагревателем или баней.

При подборе растворителя необходимо прежде всего обратиться к специальной литературе или использовать табличные данные; в крайнем случае проводят предварительные опыты.

Небольшую порцию вещества (30–50 мг) смешивают в пробирке с 5–10 каплями растворителя (необходимо испытать, по крайней мере, три растворителя различной полярности) и раствор доводят до кипения. Если вещество полностью не растворяется, добавляют растворитель до полного растворения пробы. При охлаждении раствора должно выпасть по возможности наибольшее количество кристаллического осадка. После завершения предварительных опытов приступают к проведению основного эксперимента. Вещество помещают в кругло-донную колбу подходящего объема и добавляют примерно 80% необходимого по теоретической или экспериментальной оценке количества растворителя, причем колба должна быть заполнена не более чем наполовину (см. рис. 1.2).

После добавления кипятильников (мелкие кусочки фаянса, капилляры) присоединяют обратный холодильник и раствор нагревают до кипения.

Через холодильник небольшими порциями прибавляют дополнительное количество растворителя до полного растворения вещества. В целях безопасности и точности работы рекомендуется добавлять растворитель через капельную воронку. Наличие нерастворимых примесей не должно смущать: их отделяют при последующем фильтровании.

В случае, если раствор непрозрачен или окрашен, добавляют активный уголь и затем горячий раствор фильтруют (необходимо перед добавлением угля содержимое колбы немного охладить, так как при добавлении угля в нагретый раствор может произойти резкое вскипание или вспенивание).

Когда вещество полностью растворится, нагрев отключают, и раствор медленно охлаждается до комнатной температуры. В большинстве случаев этого вполне достаточно, но иногда для повышения выхода кристаллического вещества раствор выдерживают в холодильнике.

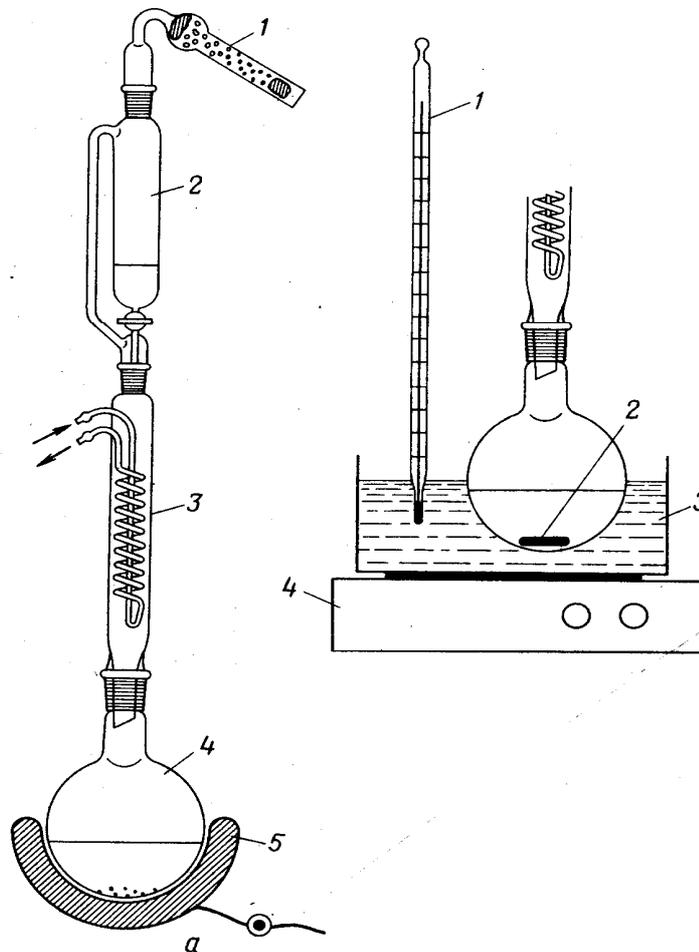


Рис. 1.2. Стандартная аппаратура для перекристаллизации: *а* – с колбонагревателем; 1 – хлоркальциевая трубка; 2 – капельная воронка с отводной трубкой для выравнивания давления; 3 – обратный холодильник Димрота; 4 – круглодонная колба с раствором; 5 – колбонагреватель; *б* – с водяной или масляной баней; 1 – термометр для бани; 2 – магнит; 3 – водяная или масляная баня; 4 – магнитная мешалка с нагревом

В затруднительных случаях решающее значение приобретает фактор времени. Это связано с тем, что скорость понижения температуры раствора влияет на размеры кристаллов. Если раствор охлаждается медленно, то образующиеся кристаллы постепенно растут и могут достигнуть иногда очень больших размеров, и, наоборот, при быстром охлаждении образуются мелкие кристаллы. При перекристаллизации стараются получать кристаллы промежуточных размеров.

Выращивание кристаллов часто требует терпения: этот процесс может длиться несколько дней, недель или даже месяцев. Однако в большинстве случаев хорошие выходы достигаются за несколько часов.

Выпавшее при кристаллизации вещество отделяют от маточного раствора путем фильтрования под вакуумом.

Маточный раствор сохраняют для последующей обработки (растворитель частично отгоняют в вакууме и повторяют стадию охлаждения, или полностью выпаривают раствор и повторяют кристаллизацию).

Исходные данные, результаты эксперимента и условия его проведения записывают в рабочем журнале.

При проведении кристаллизации иногда возникают затруднения, которые преодолевают при помощи специальных приемов. Если примеси нерастворимы на холоду или при нагревании, их отделяют фильтрованием. Если примеси хорошо растворимы, то при кристаллизации основного вещества они остаются в растворе.

При наличии окрашенных примесей или опалесценции к раствору добавляют гранулированный или активный порошкообразный уголь (1–2% в расчете на растворенное вещество) и нагревают раствор, не доводя до кипения, в течение 10–15 мин. Затем фильтруют нагретый раствор при нормальных условиях или под вакуумом, причем используют двойной слой фильтровальной бумаги или специальную бумагу, предназначенную для отделения активного угля. В случае неполярных растворителей вместо активного угля используют активированный оксид алюминия. При этом не следует применять большое количество адсорбента, так как могут происходить потери основного вещества за счет адсорбции. Опалесценцию обычно удается устранить с помощью кизельгура. Во всех указанных случаях перед внесением адсорбента раствор следует охладить до температуры ниже точки кипения (по крайней мере, на 10°C), чтобы избежать бурного вскипания.

Микрокристаллизация

Кристаллизация небольших количеств веществ (до 100 мг) обладает своей спецификой. Образец помещают в небольшую лабораторную или центрифужную пробирку, добавляют соответствующий растворитель и нагревают. После охлаждения до комнатной температуры пробирку помещают в ледяную баню и маточный раствор отбирают пипеткой, при этом кончик пипетки вводят под слой кристаллов (рис. 1.3). Аналогичным способом проводят и промывание кристаллов. Затем пробирку помещают в вакуум-эксикатор для высушивания вещества. Эти операции (отделение

маточника и промывание) можно проводить путем центрифугирования и декантации.

Отсутствие кристаллизации

Если кристаллы вообще не образуются, то раствор переохлаждают до температуры от $+4$ до -18°C в зависимости от температуры плавления вещества и растворителя. Затем медленно нагревают раствор и вносят затравочный кристалл (по возможности один) (см. также разд. «Маслообразование»).

Маслообразование

Если при перекристаллизации вместо кристаллов целевого вещества образуются капли «масла», это свидетельствует о наличии примесей, которые препятствуют кристаллизации, причем примеси могут растворяться в «масле» и затруднять дальнейшую очистку. Такое явление часто наблюдается при очистке низкоплавких веществ. В этом случае полезно:

- использовать большее количество растворителя и повторить очистку;
- добавить активный уголь, высушить над сульфатом магния, отфильтровать, растворитель выпарить в вакууме, остаток снова перекристаллизовать;

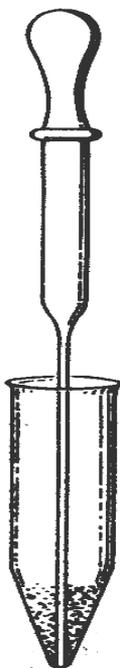


Рис. 1.3. Прибор для микрокристаллизации

- добавить кристалл того же или сходно кристаллизующегося вещества в раствор, а еще лучше – в пересыщенный раствор;
- потереть стеклянной палочкой по стенкам колбы или добавить кипятильник;
- отделить «масло» и перекристаллизовать из другого растворителя, в конце концов, несколько раз заменить растворитель;
- встряхивать некоторое время раствор при помощи специальной аппаратуры или обработать ультразвуком;
- провести осаждение вещества заменой одного растворителя другим.

При работе с легкоокисляющимися веществами используют стандартные приборы, которые продувают инертным газом, или специальную аппаратуру, например трубки Шленка.

Избыток растворителя (это ведет к снижению выхода или отсутствию кристаллизации). Рекомендации: уменьшить объем растворителя путем упаривания в роторном испарителе.

Кристаллизация плохо растворимых примесей вместе с целевым веществом. Рекомендации: растворять вещество не полностью и фильтровать раствор горячим; использовать другие растворители.

Слишком быстрое охлаждение (способствует соосаждению или адсорбции примесей).

Смешанная кристаллизация при наличии в растворе нескольких веществ.

Слишком длительное нагревание с обратным холодильником (вызывает химические изменения целевого вещества).

Недостаточный для полной кристаллизации период времени.

Загрязнение вакуумной смазкой раствора (препятствует кристаллизации).

Рекомендации: использовать небольшое количество смазки.

Оформление результатов

Наименование растворителей для перекристаллизации обычно указывают в описании работы или дают в скобках после данных о температуре плавления исследуемого вещества. Например: $T_{пл}$ 117 °С (этанол); $T_{пл}$ 145 °С (этанол – вода; 1:1).

Область применения

Очистка неорганических и главным образом органических веществ. Результаты очистки контролируют следующими методами: тонкослойной хроматографией, спектроскопией ЯМР, определением точки плавления.

Разделение веществ, имеющих различную растворимость, методом дробной кристаллизации.

Получение веществ в кристаллическом виде.

Фракционирование полимеров по молекулярной массе.

Возгонка

Процесс перехода вещества из твердого состояния непосредственно в газообразное, минуя жидкую фазу, называется возгонкой.

Физические основы метода

Фазовое состояние системы зависит определенным образом от основных параметров состояния – температуры, давления, объема. Фазовая диаграмма однокомпонентных систем обычно строится в координатах давление – температура (рис. 1.4). Если нагревать твердое вещество при атмосферном давлении $P_{\text{атм}}$ (точка A), то оно расплавится в точке B (температура плавления) и при дальнейшем нагревании до температуры кипения $T_{\text{кип}}$ (точка C) перейдет в газообразное состояние (прямая ABC). Если это вещество нагревать при рабочем давлении $p_э$, которое меньше давления в тройной точке T , то, минуя стадию плавления, оно перейдет в газообразное состояние (прямая DE).

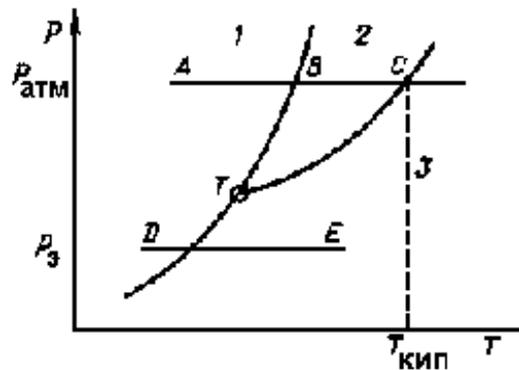


Рис. 1.4. Фазовая диаграмма: $p_{\text{атм}}$ – атмосферное давление; $p_э$ – давление в эксперименте; T – тройная точка; $T_{\text{кип}}$ – точка кипения; 1 – твердое вещество; 2 – жидкость; 3 – газообразное вещество

В принципе возгоняться способны практически все вещества, однако в большинстве случаев этот процесс идет лишь при крайне низком давлении. Из органических веществ только относительно немногие соединения способны возгоняться при нормальном давлении, например

камфора и некоторые соединения ароматического ряда (табл. 1.2). Условием применения возгонки как метода выделения и очистки, помимо высокого давления паров целевого соединения, является достаточно большое различие между давлением паров исследуемого вещества и примесей.

Принцип возгонки в вакууме используется также при лиофилизации, однако конечным продуктом в этом случае является не сублимат, а сухой остаток.

Т а б л и ц а 1.2

Свойства легковозгоняемых веществ

Соединение	$T_{кип}$ °С	$T_{пл}$ °С	Давление паров при температуре кипения		Соединение	$T_{кип}$ °С	$T_{пл}$ °С	Давление паров при температуре кипения	
			кПа	мм рт. ст.				кПа	мм рт. ст.
Камфора	204	179	49,32	370	Бензол	79	11	4,80	36
Йод	185	114	11,98	90	Нафталин	218	82	0,93	7
Антрацен	340	218	5,46	41	Бензойная кислота	132	122	0,80	6

Приборы

Для возгонки применяют *комплектные приборы на шлифах* (или самостоятельно изготовленный прибор) *из двух стеклянных пробирок с отводами* (рис. 1.5 и 1.6).

Для проведения предварительных опытов применяют *две пробирки различных размеров* (рис. 1.5) или *два часовых стекла* (рис. 1.6).

Порядок работы

Тонко измельченный образец вещества помещают во внешний сосуд (в лаборатории обычно работают с порциями вещества менее 1 г).

Включают вакуумный насос и подачу воды, создают вакуум в системе.

Медленно нагревают образец до появления первых кристалликов сублимата.

По завершении возгонки отключают нагрев, вакуум и охлаждение, соединяют охлаждаемую пробирку и счищают сублимат.

Иногда перед началом работы проверяют способность вещества к возгонке. Для этого образец нагревают в приборе для определения температуры плавления. Если вещество возгоняется легко, на верхней охлажденной части капилляра наблюдается появление сублимата.

Помимо возгонки в вакууме существует способ возгонки в токе инертного газа или воздуха.

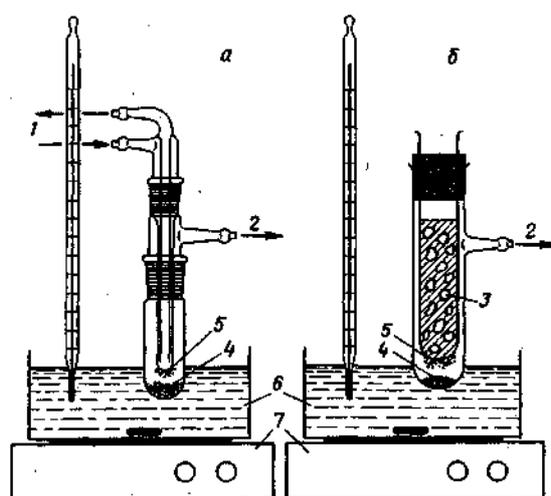


Рис. 1.5. Прибор для возгонки со шлифом (а) и без шлифа (б): 1 – подача холодной воды; 2 – к вакуумному насосу; 3 – пробирка со смесью льда и воды; 4 – образец; 5 – сублимат; 6 – баня с магнитом для перемешивания; 7 – магнитная мешалка

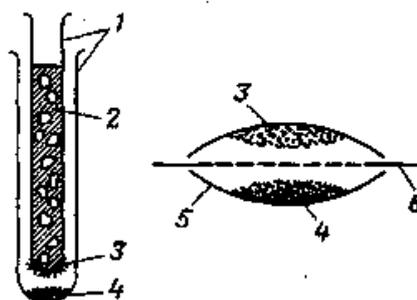


Рис. 1.6. Приборы для возгонки полумикроколичеств: 1 – пробирки; 2 – смесь льда и воды; 3 – сублимат; 4 – образец; 5 – часовое стекло; 6 – перфорированная пластинка

Источники ошибок

Охлаждаемая поверхность слишком мала для взятого количества образца.

Слишком большое расстояние между охлаждаемой поверхностью и образцом (оптимальное расстояние не более 1 см).

Слишком медленный нагрев. Вещество недостаточно измельчено.

Оформление результатов

Сведения об условиях возгонки вещества приводятся вместе с данными об определении температуры плавления, например: $t_{пл}^{1,3} = 87\text{ }^{\circ}\text{C}$ (возг.). Это означает, что вещество возгоняется при 87°C и давлении 1,3 кПа (примерно 10 мм рт. ст.).

Область применения

Возгонка является универсальным методом очистки небольших количеств вещества, содержащего нелетучие примеси. Если же вещества много, то предпочтительнее использовать перекристаллизацию или хроматографические методы. Возгонка позволяет получать вещества высокой степени чистоты.

Фильтрация и микрофильтрация

Фильтрацией называется разделение неоднородных систем жидкость – твердые частицы или газ – твердые частицы при помощи пористых фильтрующих материалов.

Микрофильтрацией называется фильтрация (разделение) суспензий на полупроницаемых мембранах.

Физические основы метода

Движущей силой процесса фильтрации является разность давления по обе стороны фильтрующего материала. В лаборатории чаще всего применяется обычное фильтрация, когда жидкость проходит через фильтр под давлением небольшого столба жидкости, находящегося над фильтром, или фильтрация под вакуумом, когда жидкость проходит через фильтр под давлением почти в 1 атм. Фильтрация под вакуумом характеризуется высокой скоростью и эффективностью. Фильтрация под давлением применяется реже, однако имеет определенные преимущества, так как позволяет проводить процесс в атмосфере инертного газа и использовать растворители с высокой летучестью.

В зависимости от размеров отделяемых частиц (табл. 1.3), а следовательно, и от способа фильтрования (рис. 1.7) применяют фильтры различной плотности. В случае микрофильтрации диаметр пор составляет 0,01 – 10 мкм. Микрофильтры, в отличие от мембранных фильтров, предназначены для ультрафильтрации и обратного осмоса.

Т а б л и ц а 1.3

Размеры частиц

Частицы	Размеры, мкм	Частицы	Размеры, мкм
Асбестовая пыль	< 5	Угольная пыль	1 – 70
Атмосферная пыль	< 10	Морская пыль	0,03 – 0,3
Бактерии	0,5 – 20	Металлическая пыль	0,01 – 60
Эритроциты	7,5	Вирусы	< 0,05
Красители	0,1 – 7		

Приборы

В лаборатории применяются три основных типа воронок (рис. 1.8): *воронки Бюхнера* для больших количеств веществ, *воронки Хирша* для небольших количеств веществ и *воронки со стеклянными пористыми фильтрами* (фильтр Шотта), достоинством которых являются незначительные потери вещества при фильтровании. Воронки с пористыми фильтрами маркируются в соответствии с сортом стекла пористой пластинки (G – иенское стекло, D – стекло типа дюран, В – кварцевое стекло).

Недостатком этих воронок является непрочность пористой пластинки, поэтому рекомендуется промывать их сразу после использования (так как присохшие частицы вещества существенно затрудняют промывание пористой пластинки). Промывание ведется в противотоке или под давлением.

Успешное фильтрование возможно лишь при правильном выборе плотности фильтра (табл. 1.3).

При работе с микроколичествами веществ применяют специальные воронки (рис. 1.9).

Для фильтрования горячих растворов применяют фильтры с подогревом; в простейших случаях стеклянную воронку помещают в обогреваемый кожух (рис. 1.10).

Для фильтрования растворов веществ, изменяющихся под действием воздуха, применяют прибор для фильтрования в атмосфере инертного газа (рис. 1.11).

Выбор фильтрующего материала зависит как от требований к чистоте раствора (важно, чтобы фильтр полностью задерживал нерастворимые частицы), так и от свойств самого фильтра.

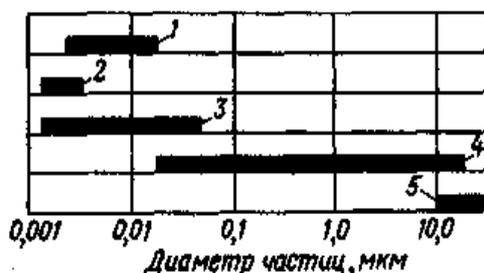


Рис. 1.7. Различные способы фильтрования в зависимости от размеров частиц: 1 – мембранная фильтрация, 2 – электродиализ, 3 – диализ, 4 – микрофильтрация, 5 – обычное фильтрование

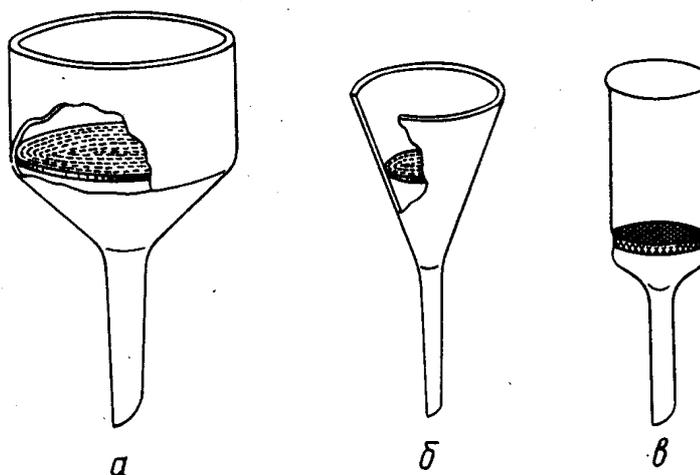


Рис. 1.8. Виды воронок для фильтрования: а – воронка Бюхнера; б – воронка Хирша; в – пористый фильтр (фильтр Шотта)

Круги фильтровальной бумаги должны соответствовать размерам фильтрующей поверхности воронки и полностью ее закрывать.

Складчатые фильтры могут быть изготовлены промышленным способом или самостоятельно из фильтровальной бумаги. Их целесообразно использовать тогда, когда целевым продуктом является фильтрат. Благодаря большой поверхности складчатых фильтров фильтрование протекает достаточно быстро.

Микрофильтры изготавливают из поликарбоната, политетрафторэтилена (тефлона) или других полимерных материалов. Поликарбонатные фильтры устойчивы к действию большинства органических кислот и растворителей, однако неустойчивы к действию оснований и галогенсодержащих углеводородов.

Т а б л и ц а 1.4

Области применения фильтров с различным диаметром пор

Номер фильтра	Максимальный размер пор, мкм	Область применения
0	200	Удерживание на фильтре наиболее крупных частиц (пыли, дыма), барботирование газов в слое жидкости
1	150	Удерживание на фильтре крупнодисперстных осадков, барботирование газов в слое жидкости
2	80	Препаративное фильтрование кристаллических осадков
3	40	Аналитическое и препаративное фильтрование тонкодисперсных осадков
4	14	Аналитическое фильтрование тонкодисперсных осадков
5	1,5	Микрофльтрация клеточных суспензий (стерилизующая фильтрация)

Порядок работы

В качестве примера рассмотрим фильтрование под вакуумом (рис. 1.12).

Колбу Бунзена с воронкой и фильтром присоединяют к склянке Вульфа (небольшая жестко закрепленная трехгорлая склянка).

Поверхность фильтровальной бумаги смачивают небольшим количеством растворителя, который используется для растворения целевого вещества.



Рис. 1.9. Воронка для фильтрования микроколичеств веществ

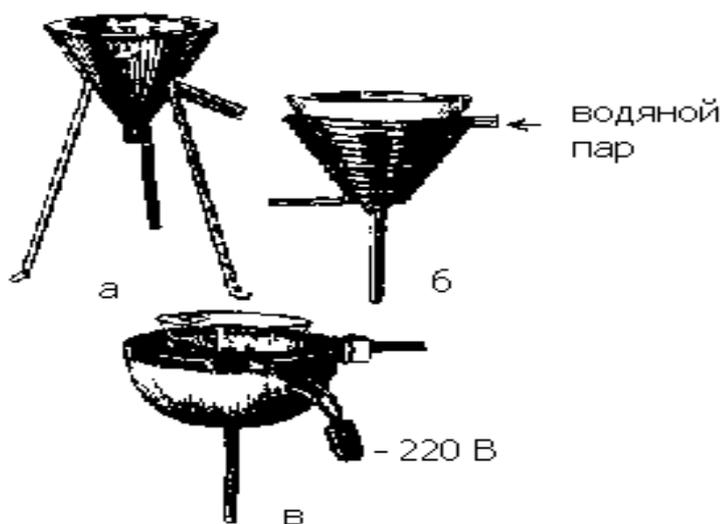


Рис. 1.10. Воронки для горячего фильтрования: *а* – воронка с рубашкой, обогреваемой горячей водой; *б* – воронка с металлической спиралью для нагрева; *в* – воронка с кожухом для электронагрева

Включают вакуум-насос и проверяют равномерность прилегания фильтра к фильтрующей пластинке.

Суспензию переливают в воронку, жидкость отсасывают, систему разгерметизируют (при помощи трехходового крана).

Вещество на фильтре заливают холодным растворителем, через некоторое время вновь включают насос (промывание осадка на фильтре). На этой стадии можно заменить высококипящий растворитель на

низкокипящий с близкими по растворимости свойствами, чтобы ускорить промывание осадка на фильтре.

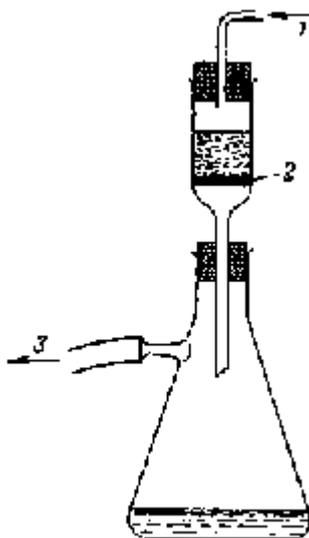


Рис. 1.11. Прибор для фильтрования в атмосфере инертного газа: 1 – подача инертного газа; 2 – пористый фильтр; 3 – к вакуумному насосу

Осадок на фильтре отжимают стеклянной пробкой для более полного удаления растворителя (остаток на фильтре все еще содержит не менее 5–20% растворителя).

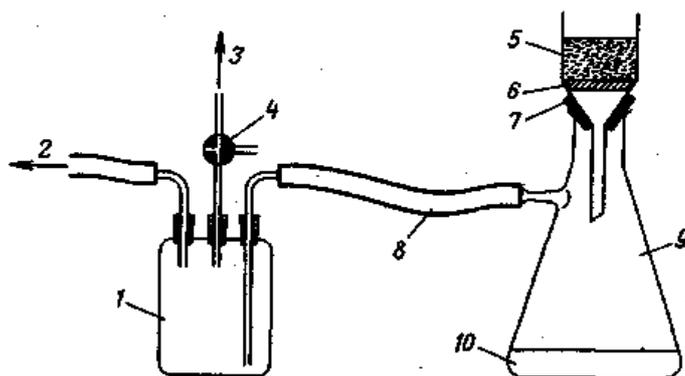


Рис. 1.12. Прибор с предохранительной склянкой для фильтрования под вакуумом: 1 – предохранительная склянка Вульфа; 2 – к вакуумному насосу; 3 – к манометру; 4 – трехходовой кран; 5 – воронка Бюхнера; 6 – фильтр; 7 – резиновая прокладка; 8 – соединительный шланг; 9 – колба Бунзена; 10 – фильтрат

Микрофльтрация проводится аналогичным образом. Иногда при этом рекомендуется поместить сверху на фильтр предфильтр из стекловолокна, чтобы уменьшить вероятность потери вещества. Для отделения тонких осадков, которые впоследствии можно потерять, применяют специальные сорбирующие материалы – кизельгель, целлюлозный порошок. При невозможности отделения тонких осадков фильтрованием следует применять центрифугирование.

Источники ошибок

Размер фильтра не соответствует размерам воронки (следует тщательно подгонять фильтр, иначе возможны потери вещества).

Фильтр не прилегает к краю воронки, т. е. при присасывании фильтра к поверхности воронки образуются складки.

Неправильно выбрана плотность фильтра (происходит забивание пор или существенное замедление процесса).

Область применения

Фильтрование: выделение и разделение веществ; гравиметрический анализ; очистка воды и воздуха.

Микрофльтрация: дегазация жидкости; концентрирование клеточных суспензий, стерилизующая фильтрация.

Перегонка

Перегонка – процесс разделения и очистки веществ, при котором жидкое или расплавленное вещество испаряется при нормальном давлении и вновь конденсируется в приемнике.

Физические основы метода

Давление пара над жидкостью возрастает при повышении температуры вследствие увеличения кинетической энергии молекул. Когда давление пара над жидкостью достигает значения атмосферного давления, жидкость закипает. Зависимость температуры кипения от давления описывается уравнением Клапейрона – Клаузиуса. Типичный график зависимости температуры кипения от состава жидкости приведен на рис. 1.13.

Точку кипения обычно указывают при нормальном атмосферном давлении (101,3 кПа, или 760 мм рт. ст., или 1 атм.). Если место проведения опыта находится не на уровне моря, то вводится так

называемая барометрическая поправка (коррекция). Как правило, очистку веществ осуществляют при помощи перегонки при атмосферном давлении. На рис. 1.14 приведен график изменения температуры в процессе перегонки. Некоторые смеси не удается разделить при помощи перегонки, даже если компоненты имеют различные температуры кипения. Это происходит в том случае, когда пар и жидкость имеют одинаковый состав. Такая смесь называется азеотропной смесью или азеотропом. Она ведет себя



при перегонке как гомогенное вещество и перегоняется при постоянной температуре.

Рис. 1.13. График зависимости температуры кипения от состава жидкости (кривая $t_{A t_B}$). $t_A t_B$ – кривая паров. I – область жидкой, II – паровой, III – гетерогенной пар/жидкость фазы

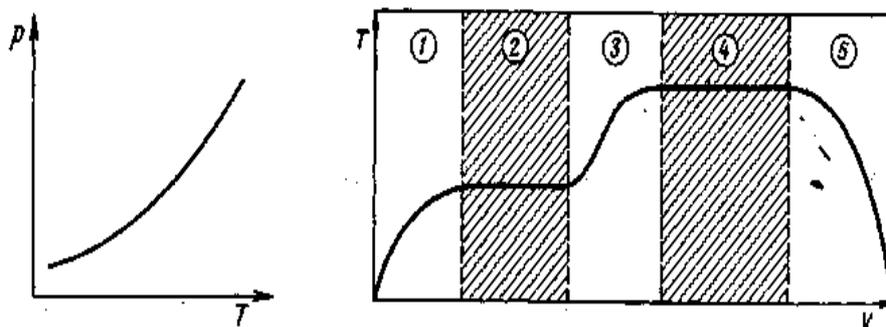


Рис. 1.14. Перегонка бинарной смеси: T – температура кипения; V – объем дистиллята; 1 – начальная фракция; 2 – фракция А; 3 – промежуточная фракция; 4 – фракция Б; 5 – конечная фракция

Рассмотрим, например, диаграмму кипения смеси этанол – вода (рис. 1.15). При содержании в жидкой фазе 50% этанола (1) доля этанола в газовой фазе существенно выше (2). Однако при содержании в жидкой фазе 99%

этанола в газовой фазе выше доля воды (4), хотя вода имеет более высокую температуру кипения. Только при концентрации этанола 96% (5) состав жидкой и газовой фаз одинаков. Следовательно, конденсат имеет тот же состав, что и перегоняемая жидкость; в этом случае разделение двух веществ с помощью перегонки невозможно. Независимо от того, при какой концентрации этанола начинается перегонка, заканчивается она в точке азеотропа (5). Поэтому с помощью перегонки нельзя получить безводный этанол. Вследствие этого обычно имеют дело не с абсолютным, а с 96%-ным этанолом.

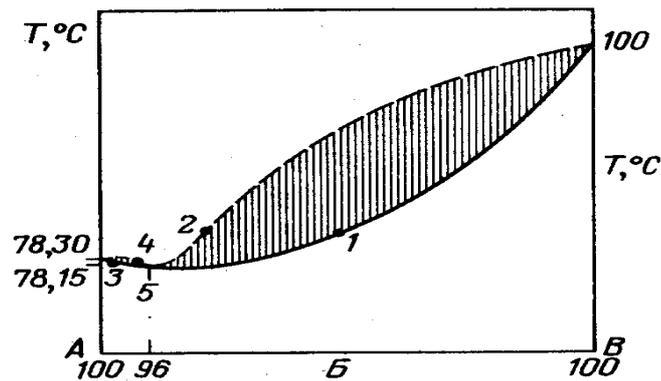


Рис. 1.15. Диаграмма кипения смеси этанол – вода (сплошная линия – жидкость; пунктирная линия – пар): А – этанол (100%); Б – смесь этанол – вода, %; В – вода (100%)

Приборы

Прибор для обычной перегонки (рис. 1.16) включает жидкостную (табл. 1.5) или электрическую бани, круглодонную колбу, термометр, холодильник с форштоссом и отводом и приемную колбу (комплект может включать отдельную колбу, насадку Кляйзена, холодильник и алонж).

Роторный испаритель (рис. 1.17) пригоден для перегонки небольших масс веществ от 50 мг до 5 г или для высококипящих жидкостей.

Двойная V-образная трубка (рис. 1.18) применяется для очистки микроколичеств веществ (10–500 мг).

Порядок работы

Перед началом обычной перегонки вещество высушивают, чтобы исключить образование азеотропа или гидролиз вещества при повышенной температуре. Осушитель перед перегонкой отфильтровывают.

Вещество помещают в круглодонную колбу (не более 2/3 объема), добавляют кипятивники (в случае нагревания колбы при помощи бани) или магнит (в случае магнитной мешалки). Каждый раз перед новым нагреванием колбы добавляют свежий кипятивник.

Т а б л и ц а 1.4

Состав и температура кипения бинарных и тройных азеотропов

Состав азеотропа	Температура кипения, °С	Температура кипения компонентов, °С	Состав, %	Состав азеотропа	Температура кипения, °С	Температура кипения компонентов, °С	Состав, %
Вода–дихлорметан	39	100 40	2 98	Этанол–бензол	68	78 80	32 68
Вода–хлороформ	56	100 61	3 97	Бензол–Вода	69	80 100	91 9
Вода–ацетон	56	100 56	12 88	Этанол–вода–толуол	74	78 100 111	37 12 51
Этанол–хлороформ	59	78 61	7 93	Этанол–вода	78	78 100	96 4
Этанол–бензол–вода	65	78 80 100	19 74 7	Толуол–вода	85	111 100	80 20

В табл. 1.4 приведены температуры кипения и состав азеотропных жидкостей

Включают подачу воды в холодильник и нагревают колбу. Регулируя нагрев, устанавливают определенную скорость перегонки (нормальная скорость перегонки 1–2 капли дистиллята в 1 с).

Перегонку прекращают, когда в колбе еще остается немного жидкости и температура кипения остатка на 2–3°С начинает превышать температуру кипения дистиллята.

Начальную, основную и более высококипящие фракции собирают в отдельные емкости и отмечают в рабочем журнале пределы температуры кипения каждой фракции.

При перегонке во влажной атмосфере на отвод холодильника (алонж) надевают хлоркальциевую трубку.

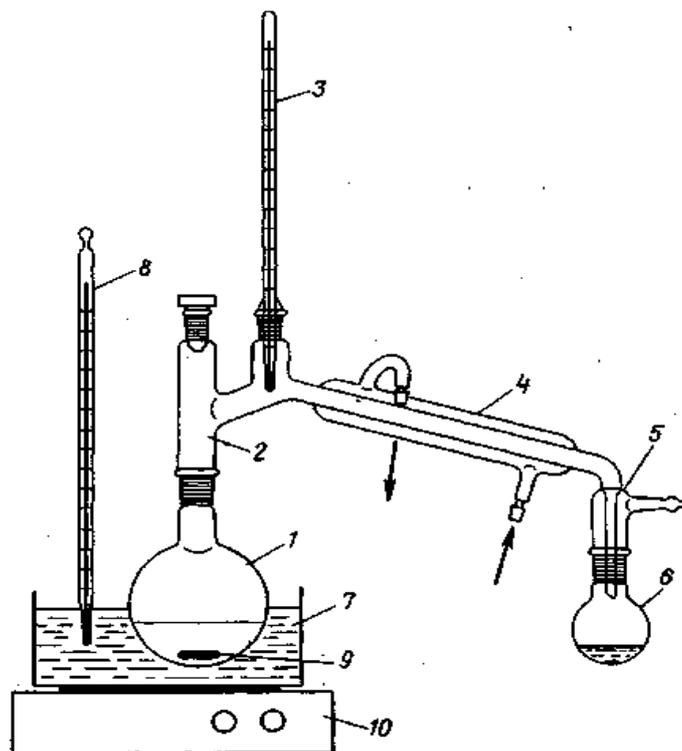


Рис. 1.16. Стандартный прибор для обычной перегонки:
1 – круглодонная колба; 2 – насадка Кляйзена; 3 – и 8 – термометры; 4 – холодильник; 5 – форштос; 6 – приемная колба; 7 – масляная или водяная баня; 9 – «кипелки» или магнит; 10 – плитка или магнитная мешалка

Т а б л и ц а 1.5
Общепринятые теплоносители для заполнения бань

Теплоноситель	Рабочий интервал температур бани, °С
Вода	0 — 95
Триэтиленгликоль	0 — 250
Силиконовое масло	0 — 350
Глицерин	-20 — 260
Сплав Вуда (50% Bi, 25% Pb, 12,5% Sn, 12,5% Cd)	70 — 350

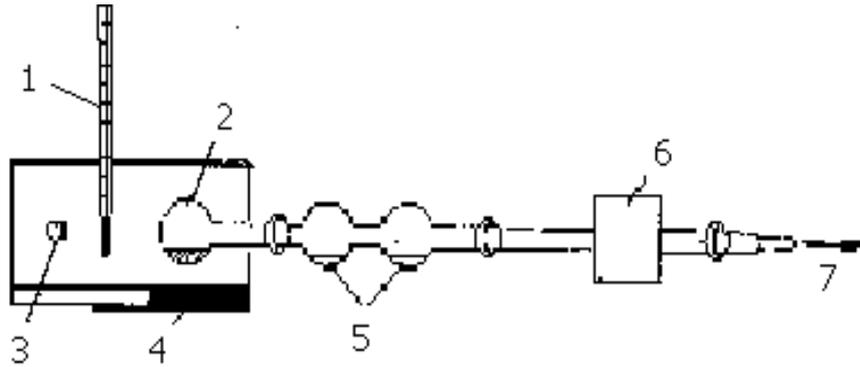


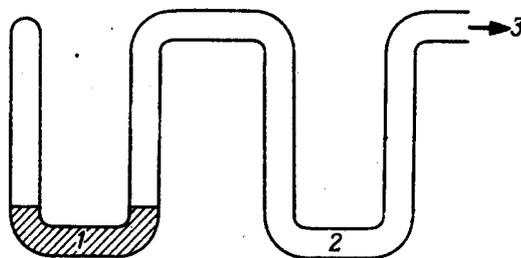
Рис. 1.17. Роторный испаритель: 1 – термометр; 2 – перегонная колба; 3 – регулятор температуры; 4 – нагревательный элемент; 5 – приемные колбы; 6 – мотор; 7 – к вакуумному насосу

Перегонка в роторном испарителе

Колбу заполняют жидкостью до уровня отводной трубки со сферическим шлифом (примерно 1/3 объема) и нагревают на воздушной бане. При этом колбу вращают или покачивают, чтобы избежать вскипания. В случае необходимости перегонку ведут при пониженном давлении. Вещества с высоким давлением пара лучше всего перегонять при нормальном давлении. Дистиллят собирают в круглодонные колбы.

Перегонка в двойной U-образной трубке

В первую петлю U-образной трубки помещают вещество, после чего конец трубки запаивают. Петлю с веществом охлаждают и в системе устанавливают вакуум. Охлаждают вторую (приемную) петлю; при нагревании первой петли вещество конденсируется в нижней части второй петли (см. рис. 1.18).



31

Рис. 1.18. U – образная трубка:
1 – вещество, 2 – дистиллят, 3 – к насосу

Перегонка азеотропа в приборе с ловушкой-сепаратором

Перед перегонкой к целевому веществу прибавляют растворитель, образующий с водой азеотроп. Азеотроп перегоняют в приборе с ловушкой-сепаратором (рис. 1.19), после чего перегоняют не содержащее влаги целевое вещество.

Источники ошибок

Вещество предварительно не высушено.

Шарик термометра расположен не точно против входа в холодильник и вследствие этого не полностью окружен парами вещества, что приводит к непрерывному определению температуры кипения.

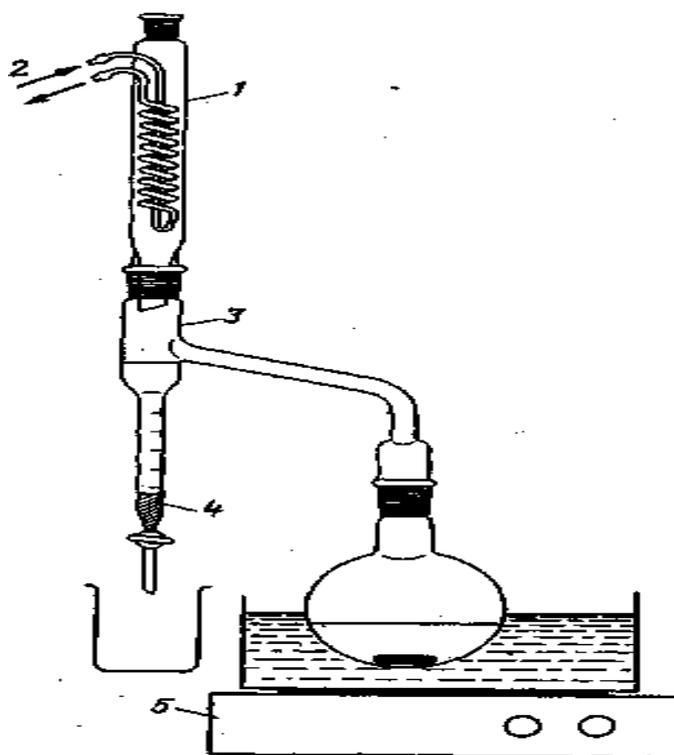


Рис. 1.19. Прибор для перегонки азеотропа с ловушкой сепаратором: 1 – обратный холодильник, 2 – подача холодной воды, 3 – ловушка-сепаратор, 4 – слой воды, 5 – магнитная мешалка.

Для высококипящих веществ используют не водяной, а воздушный холодильник.

Температура перегонки на 3–4°C отличается от истинной температуры кипения вещества. Это указывает на недостаточно чистое

вещество или на перегонку смеси, что требует дополнительной очистки методом ректификации или любым другим методом.

Оформление результатов

Необходимо указать способ перегонки и температуру кипения (или интервал температур кипения).

Область применения

Перегонка является важнейшим методом разделения и очистки жидких и способных перегоняться при нормальном давлении твердых веществ с температурой кипения примерно до 180°C.

Перегонка при пониженном давлении (вакуумная перегонка)

Физические основы метода

Зависимость между давлением пара и температурой кипения вещества описывается уравнением Клапейрона – Клаузиуса и представлена в виде соответствующей диаграммы на рис. 1.20. Уравнение Клапейрона –Клаузиуса

$$d \ln p / dT = \Delta H_0 / RT^2 .$$

Предположив, что мольная теплота испарения не зависит от температуры, после интегрирования получают следующее уравнение:

$$\ln p = (-\Delta H_0 / RT) + C .$$

где p – давление; ΔH_0 – мольная теплота испарения; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; C – константа.

Для оценки температуры кипения вещества при определенном давлении используют номограмму зависимости температуры от давления (рис. 1.21 и 1.22). Сначала в колонке B выбирают поперечный штрих, соответствующий температуре кипения вещества при нормальном давлении, и находят точку его пересечения с продольной линией, соответствующей номеру группы вещества (различные группы веществ приведены в табл. 1.6). Через найденную точку пересечения и точку на ординате A (давление), соответствующую предполагаемому рабочему давлению, проводят прямую и продолжают ее до пересечения с ординатой B (температура). Найденная точка

соответствует температуре кипения вещества при заданном рабочем давлении.

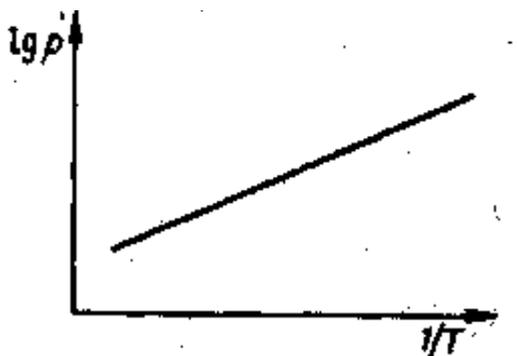


Рис. 1.20. Диаграмма давление пара — температура

Приборы

Прибор для перегонки в вакууме (рис. 1.23) аналогичен прибору для обычной перегонки. Дополнительными элементами в случае перегонки в вакууме являются капилляр, вакуумный насос, предохранительная склянка или охлаждаемая ловушка, манометр, насадка для отбора фракций.

Капилляр – тонкая стеклянная трубочка, укрепленная в горле перегонной колбы, применяется для равномерного кипения жидкости в вакууме. Очень тонкие капилляры вытягивают из обычной стеклянной трубки. Толщина капилляра должна быть такой, чтобы при продувании воздуха через ацетон или другой растворитель проходили лишь отдельные пузырьки.

Вакуумный насос. Наиболее простым и чаще всего используемым устройством для вакуумирования является водоструйный насос, который обеспечивает давление порядка 1,3–4,4 кПа (10–33 мм. рт. ст.) (слабый вакуум). Давление, создаваемое водоструйным насосом, соответствует давлению паров воды при температуре окружающей среды (табл. 1.7). Применение водоструйного насоса позволяет отказаться от использования ловушки с охлаждением и применять предохранительную склянку Вульфа. Недостатками водоструйного насоса являются большой расход воды и нестабильность создаваемого вакуума вследствие колебания давления в водяной сети. Применение ротационного масляного насоса (рис. 1.24) позволяет уменьшить давление с 400 до 0,133 Па ($3 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.) (средний вакуум). Давление, создаваемое масляным насосом,

соответствует давлению паров масла. В особых случаях применяют ртутный диффузионный насос, который позволяет уменьшить давление до $1,3 \cdot 10^{-6}$ Па (глубокий вакуум).

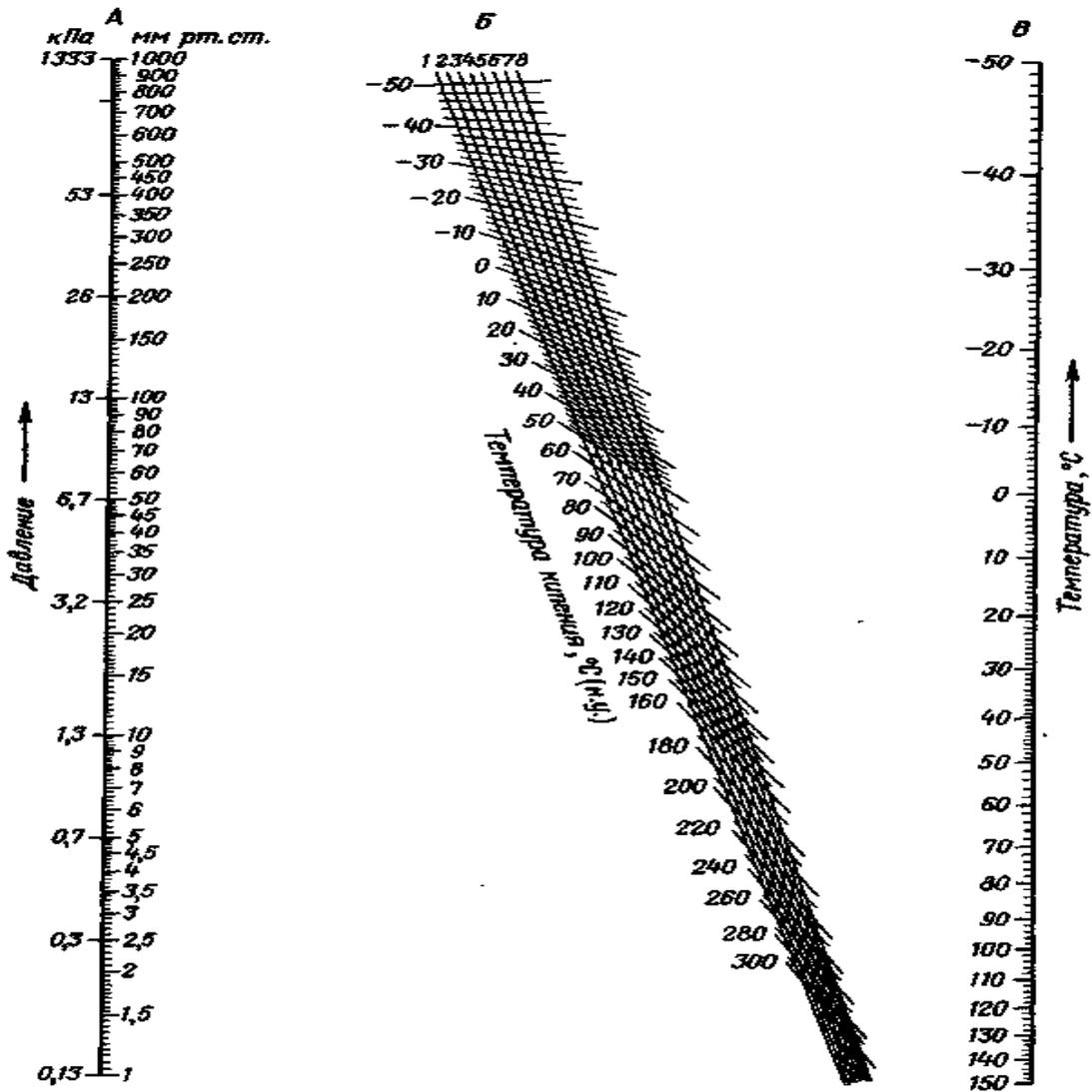


Рис. 1.21. Номограмма давление пара–температура (см. табл. 1.6): *A* – давление; *Б* – номер группы вещества; *В* – температура. Пример: температура кипения при нормальном давлении (101 кПа, или 760 мм рт. ст.) 200°C (колонка *Б*), рабочее давление 2,7 кПа, или 20 мм рт. ст. (колонка *А*). Для определения температуры кипения при этом давлении необходимо через соответствующие этим величинам точки в колонках *А* и *Б* провести прямую до колонки *В*; точка пересечения этой прямой, с колонкой *В* соответствует температуре кипения 90 °С при заданном давлении

Охлаждаемая ловушка. Обычно при работе с ротационным вакуумным насосом применяют одну или несколько ловушек, охлаждаемых жидким азотом или смесью ацетона с сухим льдом (рис. 1.25). Ловушка предохраняет масло в насосе от загрязнения и

разбавления летучими веществами, например растворителями, и одновременно предотвращает коррозию металлических частей насоса.

Роторный испаритель. Применяется для концентрирования раствора путем испарения в вакууме (рис. 1.26). Преимущество роторного испарителя заключается в том, что большая поверхность испарения повышает скорость выпаривания растворителя. Вращение колбы препятствует вскипанию жидкости, возможность поддержания низкой температуры кипения раствора исключает разложение растворенного вещества. Помимо этого имеется возможность непрерывного выпаривания больших объемов раствора: по мере отгонки растворителя новые порции раствора подают в перегонную колбу через специальную трубку.

Т а б л и ц а 1.6

Группы веществ (см. рис. 1.21 и 1.22)

Группа 1	Группа 3	Группа 5
Антрацен Антрахинон Фенантрен Трихлорэтилен	Ацетальдегид Ацетон Хлоранилин Сложные эфиры	Бензиловый спирт Метиламин Фенол Пропионовая кислота
Группа 2	Этиленоксид Муравьиная кислота Нафтол Нитробензол	Группа 6
Бензальдегид Бензонитрил Бензофенон Камфора Простые эфиры Галогеноуглеводороды Углеводороды Метилэтилкетон Хинолин	Группа 4	Уксусный ангидрид Изомасляная кислота Вода
	Уксусная кислота Ацетофенон Крезол Этиламин	Группа 7
		Бензойная кислота Масляная кислота Этиленгликоль Метанол
		Группа 8
		Амиловый спирт Этанол Изобутанол n-Пропанол

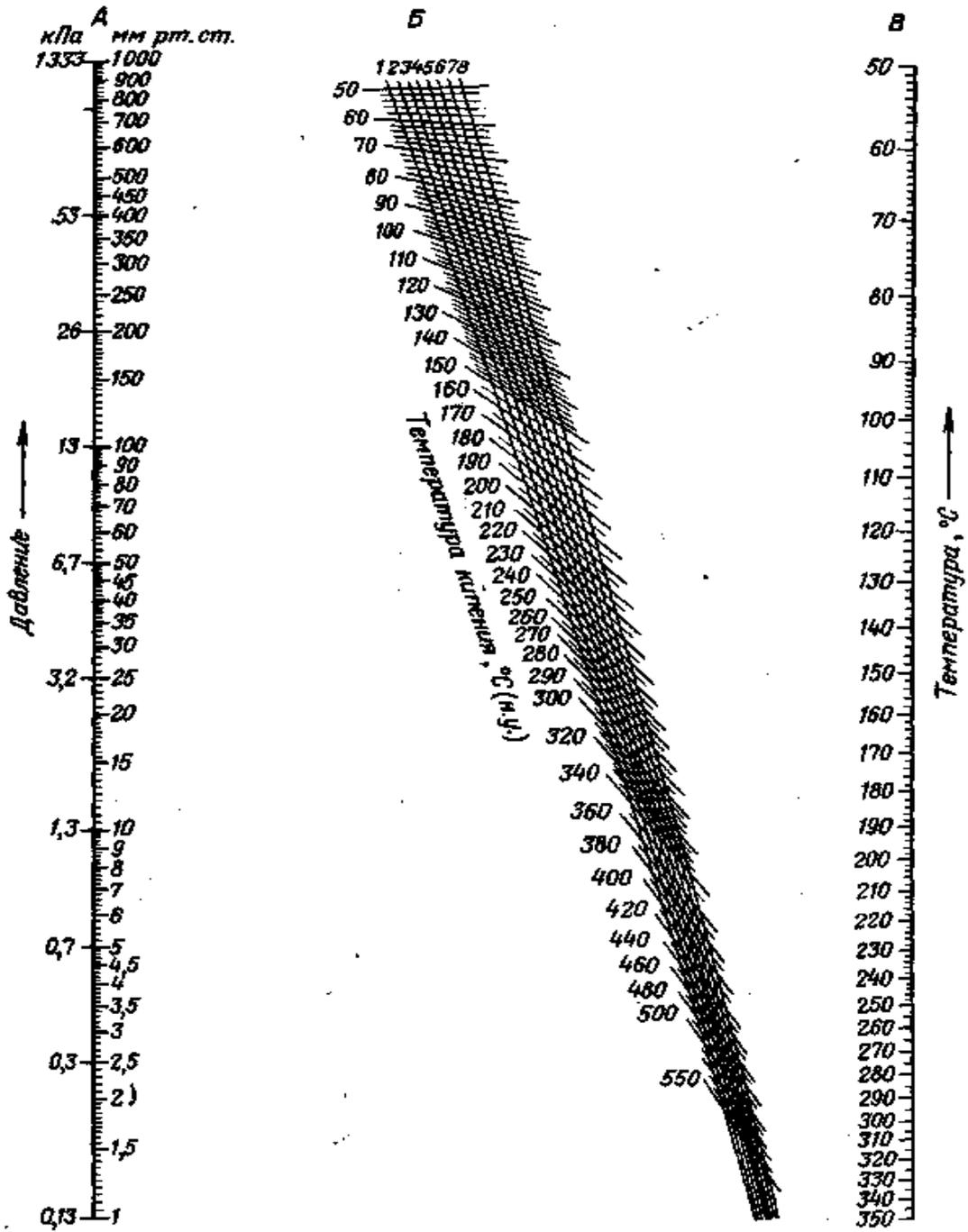


Рис. 1.22. Номограмма давление пара — температура для высококипящих веществ: А — давление; Б — номер группы вещества; В — температура. Пример: температура кипения 100°C (колонка В) при давлении 1,3 кПа, или 10 мм рт. ст. (колонка А) соответствует температуре кипения 220 °С при нормальном давлении (колонка 5)

Т а б л и ц а 1.7
Давление водяного пара при различных температурах

Температура, °С	Давление		Температура °С	Давление	
	Па	мм.рт.ст.		Па	мм.рт.ст.
0	532	4	20	2400	18
5	800	6	25	3200	24
10	1200	9	30	4266	32
15	1733	13	35	5600	42

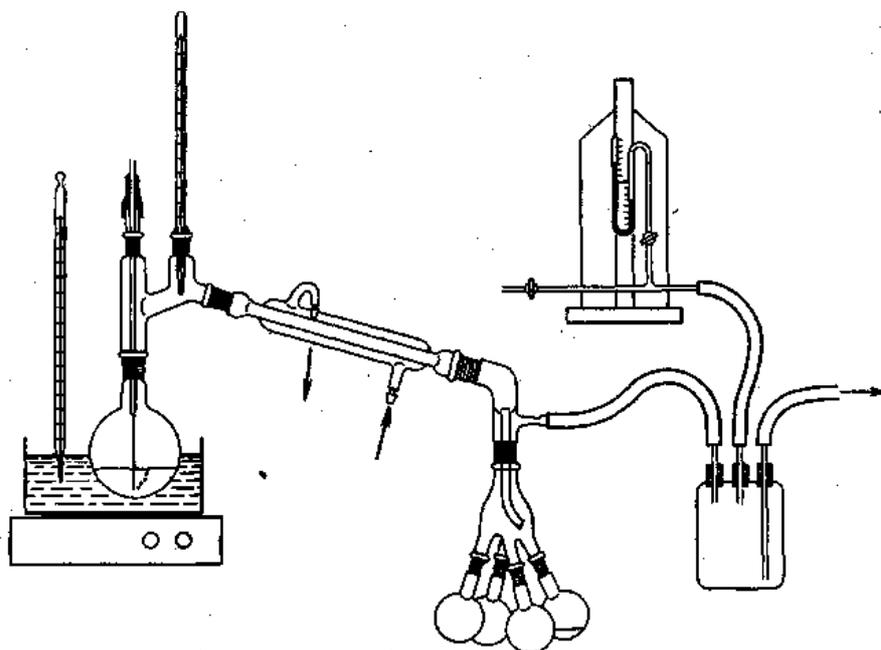


Рис. 1.23. Прибор для перегонки в вакууме

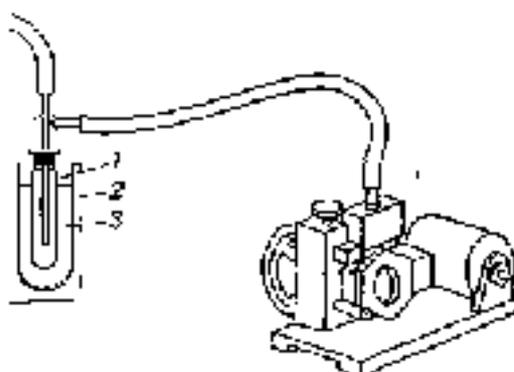


Рис. 1.24. Ротационный масляный насос с охлаждаемой ловушкой: 1 – охлаждаемая ловушка; 2 – сосуд Дьюара; 3 – хладагент

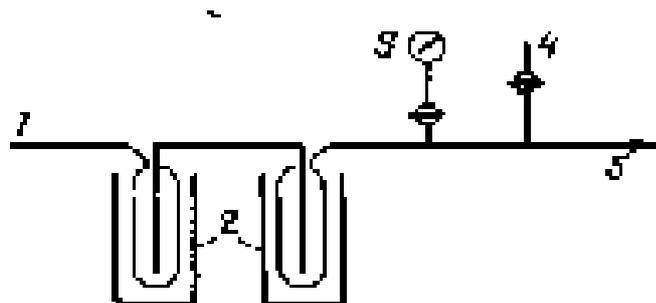


Рис. 1.25. Общая схема вакуумной системы: 1 – к прибору (для перегонки, лиофилизации и т. д.); 2 – охлаждаемая ловушка (жидкий азот, сухой лед с ацетоном); 3 – манометр Маклеода; 4 – кран сброса вакуума; 5 – к вакуумному; насосу

Манометр. Используется при проведении вакуумной перегонки для точной регистрации давления. Обычно в лаборатории применяют ртутные манометры, в которых разрежение определяют по перепаду высоты ртутного столбика в двух параллельных трубках (см. рис. 1.23). Вакуум с остаточным давлением менее 1–2 мм рт. ст. измеряют манометром Маклеода (рис. 1.27).

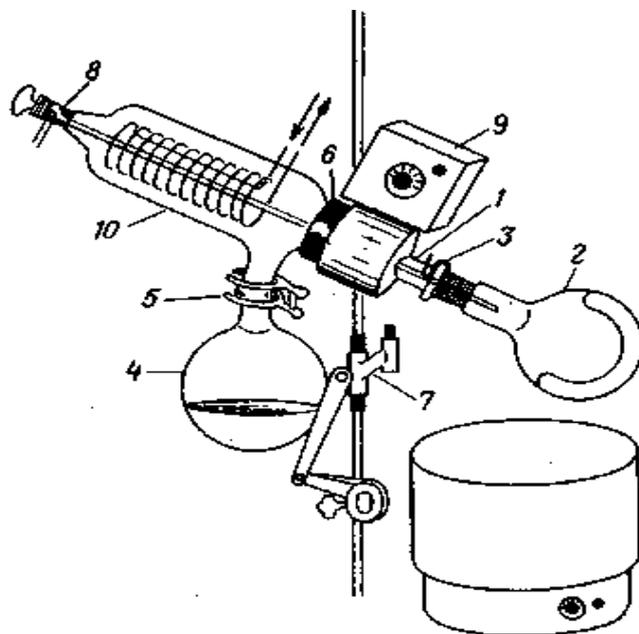


Рис. 1.26. Роторный испаритель: 1 – трубка с керном для перегонной колбы; 2 – перегонная колба; 3, 5 – соединительная муфта; 4 – приемная колба; 6 – уплотнитель; 7 – регулятор высоты; 8 – кран для сброса вакуума; 9 – мотор с регулятором; 10 – обратный холодильник

Для измерения манометр из нормального положения (резервный баллон расположен горизонтально и заполнен ртутью) переводят в положение измерения. Для этого манометр медленно поворачивают по часовой стрелке. При этом ртуть заполняет измерительный баллон и поднимается по капилляру

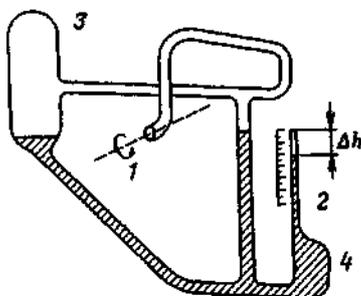


Рис. 1.27. Манометр Маклеода (в положении измерения): 1 – ось поворота; 2 – капилляр с нанесенной шкалой; 3 – резервный баллон; 4 – измерительный баллон

Насадка для отбора фракций. Применяется, когда при вакуумной перегонке необходимо собрать несколько фракций. Насадка Аншюца – Тиле – неограниченное число фракций (рис. 1.28), насадка «Паук» позволяет собрать 3–4 отдельные фракции (рис. 1.29).

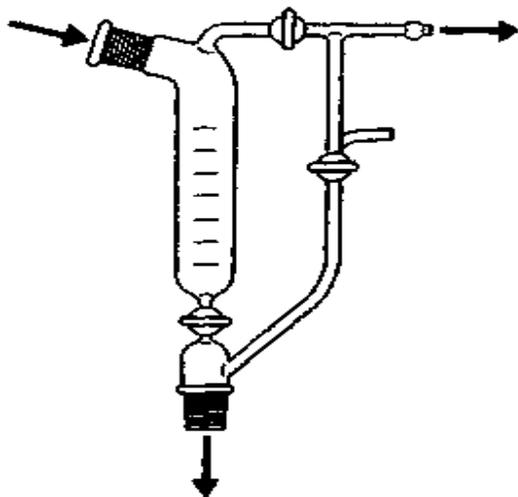


Рис. 1.28. Насадка Аншюца – Тиле

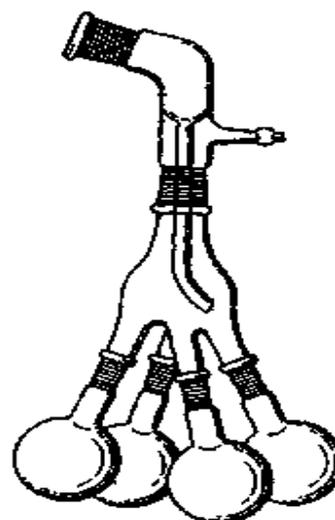


Рис. 1.29. Насадка для перегонки в вакууме

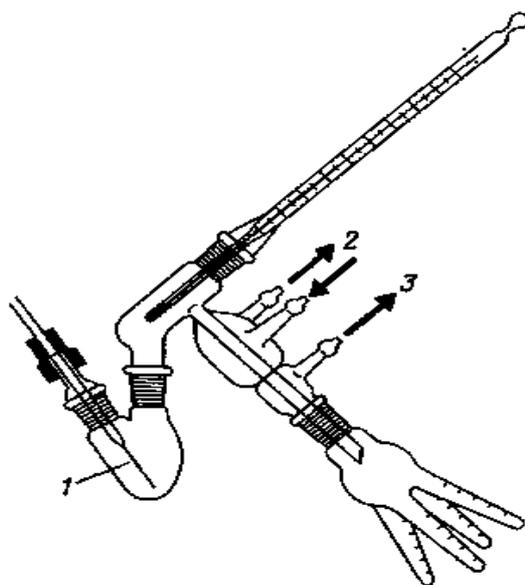


Рис. 1.30. Прибор для перегонки в вакууме небольших количеств веществ: 1 – капилляр; 2 – подача холодной воды; 3 – к вакуумному насосу

Перегонка небольших количеств (от 10 мг до 2 г) осуществляется в специальном приборе. Его применение позволяет уменьшить потери вещества при перегонке (рис. 1.30).

Порядок выполнения операций

(Надеть защитные очки!)

Перед началом работы проверяют надежность (герметичность) прибора.

Вещество помещают в колбу и вставляют керн с капилляром.

Систему вакуумируют, нагревают, убеждаются в стабильности вакуума на основании показаний манометра.

По окончании перегонки выключают нагрев, дают прибору остыть и медленно подают воздух в прибор.

При перегонке в атмосфере инертного газа прибор несколько раз вакуумируют, а затем заполняют его инертным газом (азотом, аргоном, диоксидом углерода).

Источники ошибок

Прибор негерметичен, так как шлифы загрязнены или неправильно смазаны (после нанесения смазки шлиф должен быть прозрачен).

Температура кипения вещества слишком низкая (температура кипения вещества при нормальном давлении должна быть не ниже 150°C).

Перегонка веществ с температурой кипения выше 150°C . Перегонка веществ, разлагающихся при простой, перегонке. Перегонка в атмосфере инертного газа.

Перегонка в противотоке (ректификация)

Ректификацией называется процесс перегонки, при котором часть конденсата находится в постоянном контакте с парами вещества, в результате чего между ними устанавливается равновесие. При этом удается разделить вещества с очень близкими температурами кипения.

Физические основы метода

Принцип противоточной перегонки наглядно показан на диаграмме кипения (рис. 1.31) на примере смеси циклогексан – толуол. По диаграмме можно определить температуру кипения смеси при любом соотношении обоих компонентов. Например, смесь, содержащая 25% циклогексана и 75% толуола (даны мольные проценты), имеет температуру кипения 100°C (точка *A*), в то время как пары этой смеси при той же температуре содержат 57% циклогексана (точка *B*).

Это максимальное разделение, которого можно достичь при помощи обычной перегонки. Для получения чистого циклогексана требуется многократное повторение перегонки. Если теперь сконденсировать пары в точке *B*, то получают жидкость состава *C*, которая кипит при 90°C . Если перегонять конденсат состава *C*, то в паровой фазе доля циклогексана составит 85% (точка *D*). Последовательное многократное повторение этого процесса (точки *E*, *F* и т. д.) осуществляется в ректификационной колонке. При равновесной дистилляции происходят только однократное испарение и конденсация вещества.

Эффективность таких колонок описывается числом теоретических тарелок и зависит от площади контакта между двумя фазами. Число теоретических тарелок примерно соответствует числу простых перегонок, необходимых для достижения того же эффекта разделения, который достигается перегонкой на ректификационной колонке. Условием высокой эффективности ректификации является более интенсивный массо- и

теплообмен, благодаря которому может достигаться равновесие между паровой и жидкой фазами. Число необходимых теоретических тарелок для получения дистиллята с предельным содержанием примесей 1% в зависимости от разности точек кипения компонентов можно определить по графику (рис. 1.31). График на рис. 1.31 иллюстрирует случай хорошего разделения компонентов смеси.

Для проведения процесса ректификации используется стандартный прибор для перегонки (см. рис. 1.16 и 1.23), однако между круглодонной колбой и насадкой помещают *ректификационную колонку* (рис. 1.35), необходимую для увеличения поверхности контакта паров с жидкостью.

В лабораториях чаще всего используют колонку Вигре (см. рис. 1.35). Она представляет собой елочный дефлегматор высотой 20–30 см, помещенный в стеклянную трубку («рубашку»). Пространство между обеими трубками вакуумировано, что способствует лучшей теплоизоляции колонки. Разделение в колонках ведут в адиабатических условиях, поэтому часто дополнительно «рубашку» изолируют такими материалами, как алюминиевая фольга или асбестовый шнур.

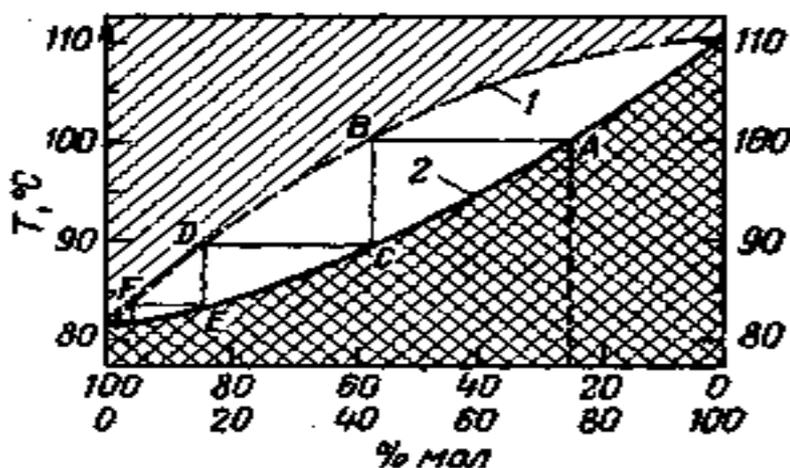


Рис. 1.31. Диаграмма кипения смеси циклогексан – толуол: 1 – паровая фаза; 2 – жидкая фаза; на оси абсцисс в верхней строке – содержание циклогексана в смеси; в нижней строке – содержание толуола в смеси

Колонка Вигре применяется при разности температур кипения 15–20°C. При меньшей разнице температур кипения используют колонки со специальными наполнителями или колонки специальной конструкции. Различные типы ректификационных колонок и наполнителей (таких, например, как кольца Рашига) изображены на рис. 1.35.

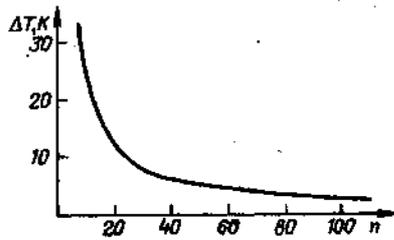


Рис. 1.32. График для определения числа теоретических тарелок n , необходимого для разделения веществ с разными ΔT

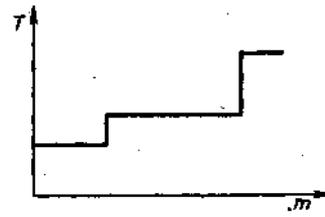


Рис. 1.33. Регистрация процесса ректификации хорошо разделяющейся трехкомпонентной смеси (m – объем дистиллята; ступени на графике соответствуют температуре кипения и получаемому объему каждого компонента смеси)

Для ректификации также используют *колонки специальной конструкции* (так называемые колонки с вращающейся обмоткой) (рис. 1.36), которые состоят из длинных, вертикально расположенных трубок, имеющих по всей длине ленточную обмотку из стали, платины или тефлона. Во время перегонки ленточная обмотка быстро вращается (до 3000 об/мин). Таким путем достигается перемешивание паров, что обеспечивает интенсивный массо- и теплообмен.

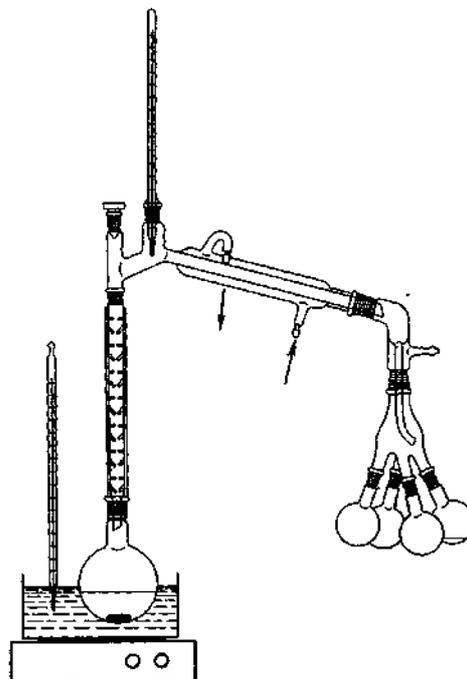


Рис. 1.34. Стандартный прибор для проведения процесса ректификации

Порядок работы

Колонку заполняют насадкой в вертикальном положении. Ректификацию проводят практически так же, как обычную перегонку. Во время перегонки нельзя допускать слишком сильного нагрева, чтобы избежать так называемого «захлебывания» колонки.

Источники ошибок

Неправильно выбран тип колонки.

Повышение температуры кипения из-за разгерметизации колонки.

Неудовлетворительная изоляция колонки.

Область применения

Разделение и очистка веществ с разницей в температурах кипения менее 40°C . Использование в тех случаях, когда обычная перегонка не приводит к удовлетворительным результатам.

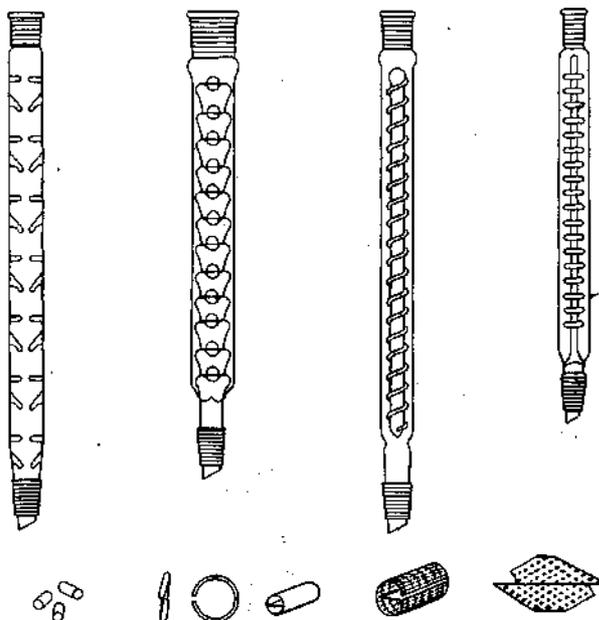


Рис. 1.35. Виды ректификационных колонок и насадок (кольца Рашига)

Перегонка с водяным паром

Процесс осуществляется путем пропускания водяного пара через нагретую суспензию (эмульсию) целевого вещества в воде и применяется для перегонки нерастворимых в воде и высококипящих веществ при нормальном давлении и температуре не выше 100°C.

Физические основы метода

Перегонка с водяным паром является особым случаем перегонки азеотропа. Метод основан на сложении давления паров компонентов. Общее давление p бинарной смеси представляет собой сумму давлений паров обоих компонентов – p_1 и p_2

$$p = p_1 + p_2.$$

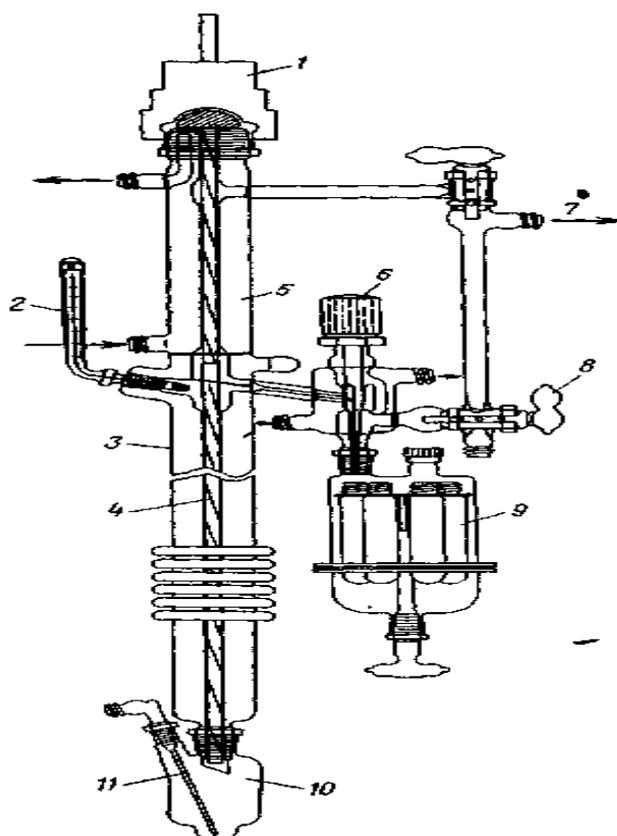
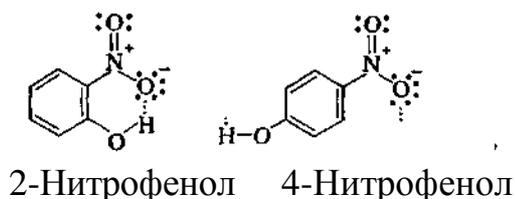


Рис. 1.36. Схема колонки с вращающейся обмоткой: 1 – мотор; 2 – термометр; 3 – вакуумированная рубашка; 4 – вращающаяся обмотка (тефлон); 5 – обратный холодильник; 6 – запирающий клапан; 7 – к вакуумному насосу; 8 – трехходовой кран; 9 – сменные приемник»; 10 – перегонная колба; 11 – капилляр

Смесь перегоняется при температуре, при которой суммарное давление обоих компонентов равно атмосферному. Температура кипения гетерогенной смеси лежит ниже температуры кипения отдельных компонентов, в то время как температура кипения гомогенной смеси находится между температурами кипения отдельных компонентов. Таким образом водонерастворимые или слабо растворимые в воде вещества становятся летучими при температурах ниже их температур кипения и могут быть выделены при помощи перегонки с водяным паром.

Эффективность метода можно продемонстрировать на примере разделения смеси 2- и 4-нитрофенолов, которые не удается разделить другими методами. Различное положение гидроксильных групп в обоих изомерах ведет к различиям в их свойствах.

Образование внутримолекулярной водородной связи в *орто*-изомере повышает его летучесть с водяным паром, тогда как образование межмолекулярных водородных связей в *пара*-изомере уменьшает его летучесть с водяным паром.



Отношение мольных долей компонентов дистиллята пропорционально отношению давления паров обоих компонентов:

$$n_1 / n_2 \approx p_1 / p_2 ,$$

где n_1 и n_2 – мольные доли компонентов 1 и 2.

На практике очистка веществ данным методом требует большего количества воды по сравнению с рассчитанным, так как равновесие предполагает полную несмешиваемость обоих компонентов, а этот случай встречается крайне редко.

Вещества, способные перегоняться с парами воды, принадлежат, как правило, к следующим классам: ароматические и алифатические углеводороды, галогенуглеводороды, спирты, альдегиды, кетоны, ненасыщенные соединения.

Приборы

Типичный прибор для перегонки с водяным паром (рис. 1.37) состоит из парогенератора с мерной трубкой, отводной трубки для подачи пара и собственно перегонного аппарата. Насадка Гопкина снижает вероятность переброса в холодильник твердых веществ или жидкой фазы.

Для перегонки полумикроколичеств веществ используется специальный прибор (рис. 1.38).

Порядок работы

Прежде всего определяют летучесть вещества с водяным паром. Для этого 0,5–1 мл (или г) образца нагревают до кипения с 2–3 мл воды в пробирке с охлаждаемым пальцем (или соединенной со второй пробиркой, охлаждаемой льдом). Помутнение конденсата свидетельствует о летучести вещества с водяным паром. Лучше же попытаться провести перегонку в приборе для полумикроколичеств (см. рис. 1.38).

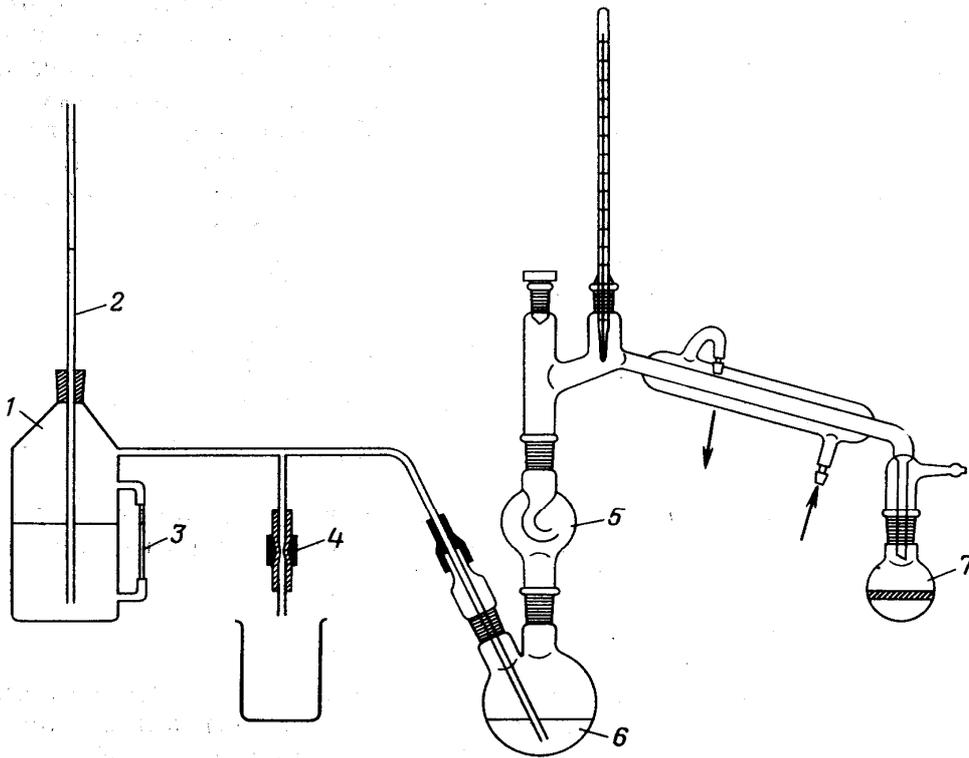


Рис. 1.37. Стандартный прибор для перегонки с водяным паром: 1 – парогенератор; 2 – трубка (для выравнивания давления); 3 – обводная трубка (для измерения уровня воды); 4 – шланг с зажимом; 5 – ловушка Гопкина; 6 – перегонная колба; 7 – приемная колба

Вещество помещают в колбу с водой (в соотношении 1:1), заполняя колбу примерно наполовину.

Нагревают парогенератор и колбу; по достижении постоянного потока пара прекращают нагрев колбы, так как тепла подводимого пара достаточно для перегонки.

По окончании перегонки отсоединяют парогенератор от колбы, предварительно отключив нагрев.

Дистиллят переносят в делительную воронку, разделяют верхний и нижний слой; если вещества смешиваются с водой или образуют стабильные эмульсии, то их выделяют методом экстракции, а суспензии отфильтровывают на воронке.

Органический слой, содержащий целевой продукт, высушивают, растворитель выпаривают в вакууме.

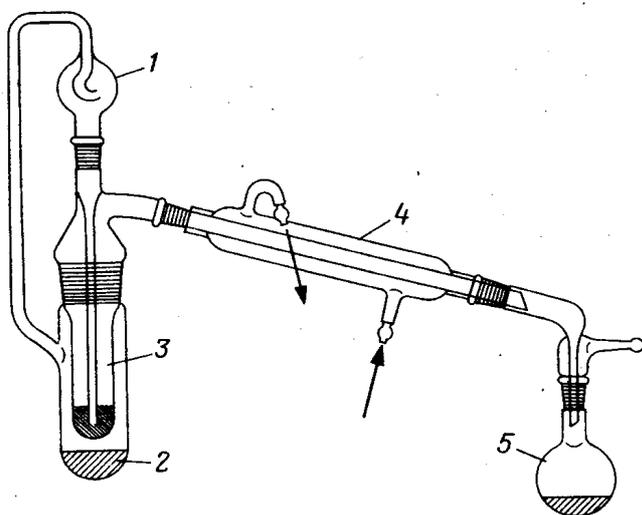


Рис. 1.38. Прибор для перегонки полумикроколичеств веществ с водяным паром: 1 – ловушка Гопкина; 2 – пробирка с водой; 3 – пробирка с веществом, 4 – холодильник; 5 – приемная колба

Область применения

Выделение, разделение и очистка веществ, плохо растворимых или нерастворимых в воде, но в то же время летучих с парами воды (особенно полезно в случае высококипящих и термолабильных веществ, например эфирных масел).

Избирательная перегонка из смесей веществ, летучих с парами воды.

Экстракция

Экстрагирование твердых веществ и жидкостей

Экстракцией называется процесс извлечения при помощи растворителя отдельных компонентов сложной смеси. При работе с твердыми образцами (тонкоизмельченным порошком) используют различную растворимость отдельных компонентов смеси, при экстракции из раствора — различное распределение компонентов смеси в двух несмешивающихся жидкостях

$$C_v / C_n = K,$$

где C_v — концентрация вещества в верхней (более легкой) фазе; C_n — концентрация вещества в нижней (более тяжелой) фазе; K — коэффициент распределения.

Согласно закону Нернста, отношение концентраций вещества, растворенного в двух несмешивающихся, но находящихся в равновесии жидких фазах, при постоянной температуре не зависит от их абсолютных количеств и, следовательно, является величиной постоянной (коэффициент распределения/ C). Этот закон соблюдается только в идеальных условиях (невысокие концентрации, одинаковое агрегатное состояние молекул веществ в обеих фазах). На практике он выполняется лишь с определенной степенью приближения.

Экстракция протекает без осложнений в том случае, когда целевое вещество хорошо растворяется в одном растворителе, а сопутствующие примеси растворяются преимущественно в другом растворителе. В зависимости от того, извлекается ли вещество из жидкой или из твердой фазы, различают и способы выполнения экстракции. Обычную экстракцию вещества из жидкой фазы используют, когда коэффициент распределения больше 100. В этом случае вещество практически целиком переходит в экстрагент в результате однократной экстракции. Здесь вполне подходит операция «встряхивание» (в делительной воронке или аппарате для встряхивания). Когда коэффициент распределения $K < 100$, простая экстракция уже недостаточно эффективна, в этом случае процесс проводят многократно, используя каждый раз чистый экстрагент. Если процесс экстракции необходимо повторить несколько раз, целесообразно использовать специальные приборы для непрерывной экстракции.

На практике чаще всего приходится иметь дело со смесями, компоненты которых имеют близкую растворимость (близкие коэффициенты распределения). Чем меньше различаются их коэффициенты распределения, тем труднее разделить эти вещества путем выполнения обычного «встряхивания», так как каждый раз будет

происходить лишь небольшое обогащение экстракта одним веществом по отношению к другому. Возможность разделения двух веществ определяется различием коэффициентов распределения. Мерой возможности разделения двух веществ служит фактор разделения

$$\beta = K_1 / K_2,$$

где β всегда больше 1.

Два вещества удовлетворительно разделяются встряхиванием только в том случае, если $\beta \geq 100$. Для разделения смесей с $\beta < 100$ необходимо многократное повторение операции.

При любом способе экстракции процесс распределения вещества протекает лишь на границе фаз, и, следовательно, для достижения равновесного состояния необходимо обеспечить максимальную площадь контакта. Для этого жидкие фазы встряхивают или пропускают через пористую пластинку, а твердые образцы перед экстракцией измельчают в тонкий порошок.

Большая площадь контакта двух фаз характерна для распределительной хроматографии. Однако этот метод применяют успешно лишь для разделения небольших количеств вещества.

Приборы

Экстрагирование твердых образцов

Экстрагирование проводят в *аппарате Сокслета* (рис. 1.39). Экстрагирование ведут легкокипящими растворителями (на пример, петролейным эфиром, дихлорметаном, четыреххлористым углеродом или ацетоном), которые нагревают в круглодонной колбе до кипения (электрическая баня, песчаная баня). Пары проходят через отводную трубку в холодильник Димрота, где конденсируются. Конденсат стекает во вкладыш – патрон из фильтровальной бумаги (в аппарате Сокслета) или на пористую пластинку (в трубке Тиле), где находится экстрагируемый образец. При омывании образца растворителем осуществляется собственно экстракция растворимых компонентов. При этом объем жидкости в аппарате Сокслета увеличивается до тех пор, пока верхний уровень не достигает перегиба сливной трубки, после чего жидкость сливается из насадки вместе с экстрагируемым веществом.

Необходимо, чтобы верхний уровень вкладыша (патрона) на несколько миллиметров превышал перегиб сливной трубки,

так как в противном случае возможно вымывание экстрагируемого материала при сливе. На практике экстрагирование проводят в периодическом режиме.

Экстракция плохо растворимых веществ проводится в аппарате Сокслета специальной конструкции – *аппарате для горячего экстрагирования* (см. рис. 1.39). От аппарата Сокслета он отличается наличием так называемой «рубашки», по которой поднимаются пары растворителя. Таким образом, образец все время омывается парами растворителя. Свойства выбранного растворителя определяют температуру, при которой происходит экстракция.

Непрерывное экстрагирование проводят в *трубке Тиле* (рис. 1.40). В ходе процесса через двухпозиционный кран отбирают пробу (например, для анализа или с целью сохранения термолабильных веществ).

Экстрагирование жидкостей

Экстрагирование проводят в *делительной воронке*. Воронку заполняют на 2/3 ее объема. При этом 1/3 объема жидкости составляет растворитель – экстрагент. Например, 200 мл раствора вещества (обычно в воде) и 100 мл растворителя – экстрагента, составляющие в сумме 300 мл, должны встряхиваться в делительной воронке объемом 500 мл.

При использовании легколетучих и легковоспламеняющихся растворителей диэтилового эфира, этилацетата, бензола вблизи места проведения работ не должны находиться горелки с открытым пламенем или включенные нагревательные приборы. Так как некоторые растворители к тому же токсичны или являются канцерогенами, работать необходимо при включенной вытяжной вентиляции в вытяжном шкафу.

Если коэффициент распределения целевого вещества $K < 20$, экстракцию проводят в непрерывном режиме методом барботаж. В этом случае целевое вещество может быть проэкстрагировано небольшим объемом растворителя. В зависимости от плотности используемых растворителей применяют *барботеры* различного типа (рис. 1.40 и 1.41). Растворитель непрерывно испаряется в круглодонной колбе (электрическая или песчаная баня) и конденсируется в холодильнике Димрота. Конденсат проходит через пористую пластинку, в виде мелких капелек барботирует через экстрагируемый раствор, обогащаясь растворимыми компонентами, и через сливную трубку вновь возвращается в колбу.

Порядок работы

Экстрагирование твердых образцов. Работа с аппаратом Сокслета несложна и требует только осторожного обращения с экстрактором при сборке и разборке аппарата.

Экстрагирование жидкостей. В простейшем случае экстрагирование из раствора проводят в делительной воронке.

Кран делительной воронки необходимо смазать несколькими каплями растворителя для экстракции или воды, но не смазкой. Смазку для шлифов в данном случае использовать не рекомендуется, так как она будет растворяться в органическом растворителе и тем самым загрязнять раствор целевого вещества.

После заполнения воронки верхнее горло закрывают пробкой и воронку легко встряхивают. При этом обычно в воронке возникает небольшое избыточное давление паров растворителя.

Для удаления паров растворителя воронку, переворачивают сливом вверх и медленно открывают кран, при этом второй рукой удерживают пробку. Кран закрывают, воронку встряхивают в течение 1 мин и вновь повторяют операцию удаления паров.

Для разделения фаз вставляют воронку в кольцо штатива, вытаскивают пробку и оставляют воронку в покое до полного расслоения фаз.

Нижнюю фазу осторожно сливают через кран, верхнюю фазу сливают через горло воронки.

Экстрагирование повторяют трижды. Затем объединенные органические экстракты не менее трех раз промывают водой, контролируя значение рН.

Органическую фазу высушивают, медленно пропуская через слой сульфата натрия или другого осушителя, помещенного в воронку для обычного фильтрования (рис. 1.42). Раствор вытекает из закрытой сверху делительной воронки в заполненный осушителем фильтр до тех пор, пока конец воронки не оказывается ниже уровня жидкости на фильтре; в этот момент раствор прекращает поступать на фильтр. Как только уровень жидкости на фильтре понизится, и воздух попадет в делительную воронку, раствор снова начинает вытекать на фильтр. Процесс повторяется периодически, пока вся жидкость не отфильтруется и одновременно не высушится. В конце процесса осушитель обязательно промывают чистым органическим растворителем во избежание довольно значительных потерь целевого вещества за счет адсорбции его осушителем.

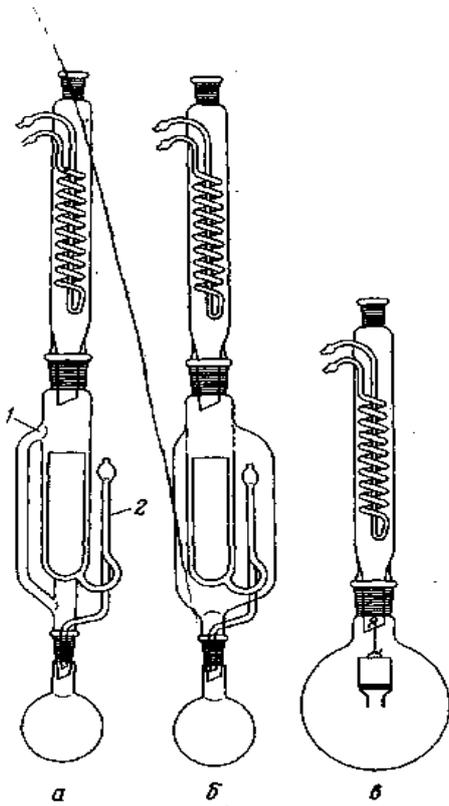


Рис. 1.39. Приборы для экстрагирования твердых веществ: *a* – аппарат Сокслета; *б* – аппарат для горячего экстрагирования; *в* – аппарат для экстрагирования небольших количеств веществ; 1 – обводная трубка; 2 – сливная трубка

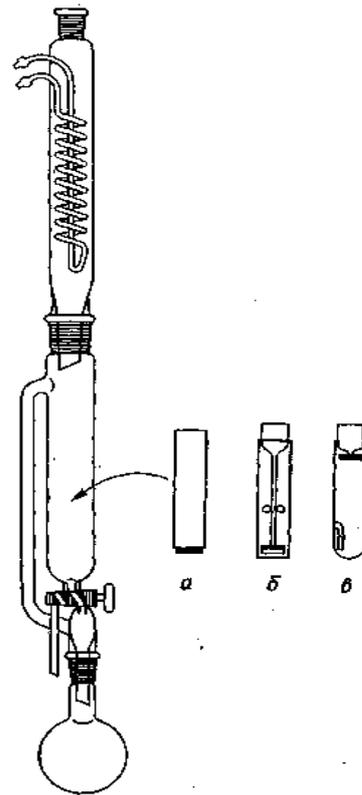


Рис. 1.40. Прибор для экстракции с трубкой Тиле и различными вкладышами: *a* – пористый стеклянный фильтр для твердых веществ; *б* – вкладыши для экстракции раствора более легким растворителем; *в* – вкладыши для экстракции раствора более тяжелым растворителем

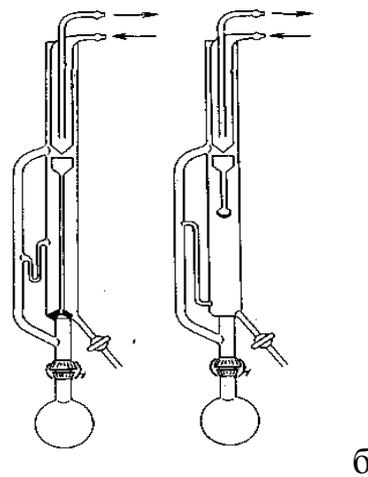


Рис. 1.41. Барботеры для экстрагирования: *a* – более легким растворителем; *б* – более тяжелым растворителем

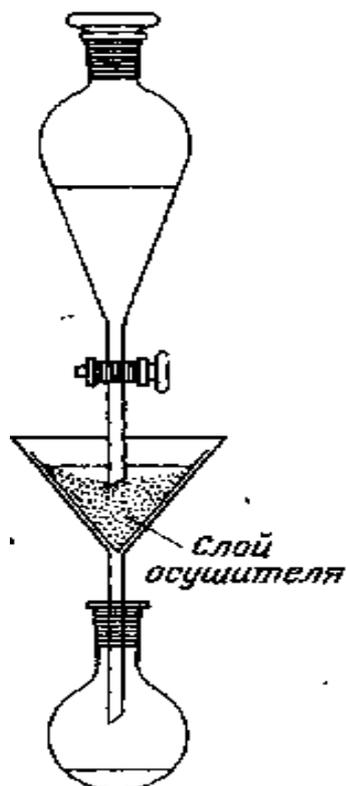


Рис. 1.42. Высушивание органических растворителей фильтрованием через слой осушителя

Растворитель выпаривают на роторном испарителе, остаток очищают путем перегонки, кристаллизации или хроматографии.

Источники ошибок

При экстрагировании

Высокие потери вещества в процессе встряхивания с растворителями. Рекомендации: многократное встряхивание с небольшими порциями растворителя эффективнее, чем однократная экстракция большим объемом растворителя.

Длительное расслоение при близкой плотности фаз. Рекомендации: если органическая фаза легче воды, в водную фазу добавляют хлорид натрия, если органическая фаза тяжелее воды, ее следует разбавить чистым растворителем.

Образование эмульсий. Рекомендации: делительную воронку осторожно покачивают, а затем ее выдерживают длительное время с целью лучшего расслоения; иногда фазы расслаиваются быстрее, если отфильтровать всю смесь.

Повышенное избыточное давление в делительной воронке. Возникает за счет выделения CO_2 , если водную кислотную фазу промыть содой или водную щелочную (карбонатсодержащий раствор) кислотой. Рекомендации: воронку осторожно встряхивают в перевернутом состоянии и с открытым краном (!); после полной нейтрализации кислоты (основания), убедившись в прекращении выделения CO_2 , кран закрывают и продолжают встряхивание.

При барботировании

При экстракции растворителем меньшей плотности уровень нижней фазы должен находиться ниже уровня сливной трубки, так как при нагревании фазы увеличиваются в объеме.

При экстракции растворителем большей плотности вначале вносят достаточный объем экстрагента, а затем прибавляют экстрагируемый раствор (рис. 1.42).

Область применения

Экстракция веществ из твердых органических и неорганических смесей.

Экстракция веществ из органических жидкостей водой (или наоборот) при обработке продуктов синтеза или при подготовке образцов для количественного анализа.

Мембранная фильтрация

Мембранная фильтрация – процесс селективного выделения веществ при помощи тонкоструктурированных мембран. С помощью давления или слабого вакуума можно проводить процесс в непрерывном (диафильтрация) или периодическом (ультрафильтрация) режимах.

Физические основы метода

При диафильтрации объем раствора остается постоянным вследствие непрерывной подачи растворителя, в то время как при ультрафильтрации объем раствора уменьшается и таким образом достигается концентрирование раствора. Для диафильтрации существует следующая зависимость между концентрацией и объемом:

$$\ln(C_o/C_k) = V_k/V_o,$$

где C_o – начальная концентрация, C_k – конечная концентрация, V_k – конечный объем, V_o – начальный объем.

В случае ультрафильтрации зависимость имеет следующий вид

$$C_k = (V_o / V_p)^n C_o ,$$

где V_p – объем после разбавления.

Мембранная фильтрация проводится под давлением, причем в большинстве случаев избыточное давление составляет 0,2–1,5 МПа. В процессе фильтрации раствор хорошо перемешивают, чтобы исключить вероятность возникновения концентрационной поляризации т.е. образования на поверхности фильтра вторичной мембраны – пограничного слоя с более высокой концентрацией анализируемых веществ. Образование вторичной мембраны влечет за собой изменение пределов пропускания и частичный прорыв целевого вещества.

Приборы

Для мембранной фильтрации используют приборы, рассчитанные на различные объемы рабочего раствора: ячейки с дисковыми мембранами и встроенными мешалками объемом 10 – 1000 мл (рис. 1.43 и рис. 1.44) и ячейки с мембранами в виде полых волокон, рассчитанных на объемы более 1 л (рис. 1.45). Для изготовления ячеек применяют инертные пластики (оргстекло, поликарбонат, тефлон и др.) и частично – нержавеющую сталь.

Мембранные фильтры представляют собой тонкие пленки с микропористым рабочим слоем, проницаемым для молекул определенных размеров. Мембраны имеют губчатую структуру с объемом пустот до 60 – 80% (рис. 1.46).

Мембраны толщиной 50 – 250 мкм изготавливают из производных целлюлозы, полиамида, поливинилхлорида, полисульфона и тефлона. Чаще всего они построены асимметрично и состоят из высокопористой подложки, которая несет на себе тонкий рабочий слой (50 – 150 нм). Удерживающая способность мембран характеризуется *номинальной отсекаемой молярной массой* (НОММ). На практике необходимо указывать размер глобулярных частиц, удерживаемых мембраной. Иногда эту величину ошибочно отождествляют с размерами пор мембраны. Номинальный размер означает, что на мембране удерживается лишь 90–98% вещества указанной молярной массы. Значение НОММ зависит не только от молярной массы, но и от формы и заряда молекул, а также от сорбционных свойств мембраны по отношению к целевому веществу. Приводимые в таблицах значения НОММ характеризуют главным образом

поведение сферических незаряженных молекул. Вещества равной или большей молярной массы, молекулы которых вытянуты в длину или имеют форму статистического клубка, т. е. являются менее компактными, могут пройти сквозь мембрану. В табл. 1.8 для ряда веществ приведены степени удерживания на мембране UM-10 (Fa. Amicon), $\text{НОММ} = 10^4 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$. Обычно этот параметр указывают просто числом – 10000. В лабораториях используют мембраны с минимальной НОММ порядка $10^3 - 10^6 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$. Обычные мембранные фильтры устойчивы при температурах $50-120^\circ\text{C}$, а также в кислых и основных средах при pH от 1 до 13 (табл. 1.9).

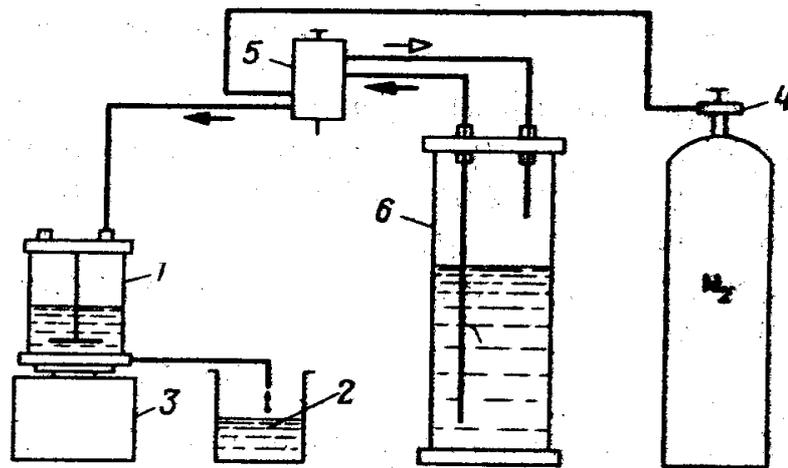


Рис 1.43. Схема прибора для мембранной фильтрации: 1 – ячейка для фильтрации, 2 – фильтрат, 3 – магнитная мешалка, 4 – редуктор баллона; 5 – переключатель режима работы, 6 – резервуар с растворителем

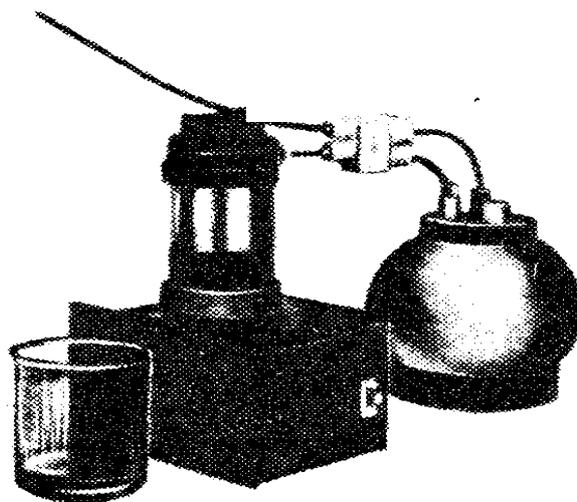


Рис. 1.44. Комплектный прибор для мембранной фильтрации

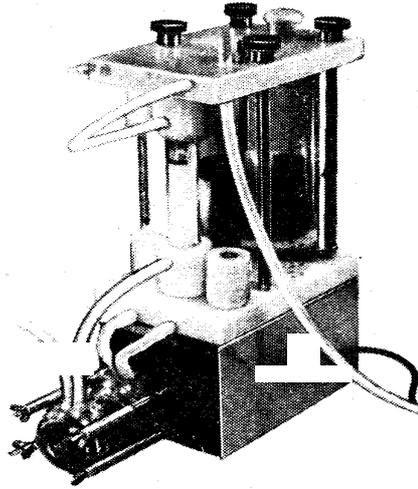


Рис. 1.45. Прибор для мембранной фильтрации на полых волокнах

В зависимости от условий эксплуатации мембраны можно использовать 10 – 20 раз без заметного изменения воспроизводимости результатов.

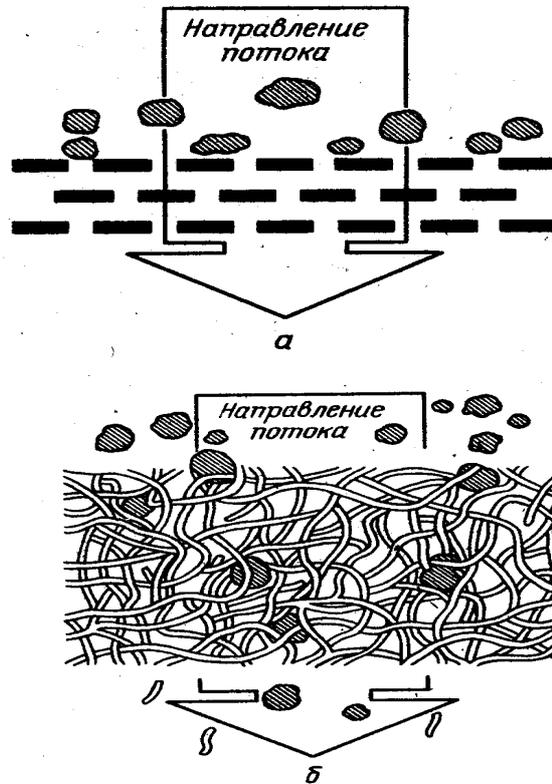


Рис.1.46. Мембранный (а) и обычный (б) фильтры

В большинстве случаев мембранная фильтрация проводится в водной среде; однако существуют мембраны для работы в органических растворителях.

Мембраны в виде полых волокон представляют собой пучки пористых капилляров с внутренним диаметром 0,2–1,0 мм. Они характеризуются большой рабочей поверхностью, что позволяет быстро обрабатывать большие объемы рабочих растворов (см. рис. 1.45). Раствор образца (рис. 1.47) при проведении диафильтрации помещают в стакан 1, дистиллированная вода или буфер подаются насосом в полые волокна 2 в указанном стрелками направлении (от цифры 3 к цифре 4).

При ультрафильтрации в полых волокнах циркулирует рабочий раствор, а в стакане собирается фильтрат. Дополнительные вводы 5 предназначены для отбора фильтрата. Для работы с небольшими объемами растворов применяются мембраны в форме конических вкладышей в центрифужные пробирки.

Т а б л и ц а 1.8

Степень удерживания веществ с различными молярными массами на мембране UM-Ю (Fa. Amicon), НОММ = 10⁴ при рабочем давлении 380 кПа

Вещество	Молярная масса, г·моль ⁻¹	Степень удерживания, %	Вещество	Молярная масса, г·моль ⁻¹	Степень удерживания, %
Аланин	89	0	Поливинил-пирролидон К 15	10000	80
Триптофан	204	0			
Сахароза	342	25			
Раффиноза	594	50	Декстран-Т 10	10000	90
Инулин	5000	60	Миоглобин	18000	95
			Химотрипсиноген	245000	98
			Альбумин	67000	98

С мембранными фильтрами следует обращаться крайне осторожно, так как рабочий слой легко повреждается. Рекомендации: использовать пинцеты с тупыми круглыми концами.

При использовании мембран следует руководствоваться рекомендациями фирмы-изготовителя. Общие рекомендации: мембрану следует не менее 1 ч выдерживать в дистиллированной воде, после чего несколько раз промыть водой в чашке Петри. Условия хранения: в 10%-м этаноле, который следует заменять каждые 2–4 недели.

Т а б л и ц а 1.9

Совместимость мембран различных типов с общепринятыми растворителями (*a* – нитроцеллюлоза; *б* – ацетилцеллюлоза; *в* – регенерированная целлюлоза; *г* – политетрафторэтилен)

Растворитель	Тип				Растворитель	Тип			
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	<i>г</i>		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	<i>г</i>
Ацетонитрил	-	-	+	+	Формальдегид	+	-	-	+
1М раствор аммиака	+	+	+	+	Глицерин	+	+	+	+
Бензол	+	+	+	+	Гексан	+	+	+	+
Изобутанол	-	-	+	+	Гидроксид натрия 6М	-	-	-	+
Хлороформ	+	-	+	+	Изопропанол	+	+	+	+
Дихлорметан	-	-	+	+	Азотная кислота 25%	-	-	+	+
Диэтиловый эфир	-	-	-	-	Растворы солей	+	+	+	+
Диметилформамид	-	-	+	+	Соляная кислота 25%	+	+	+	+
Уксусная кислота 10%	+	-	+	+	Четыреххлористый углерод	+	-	+	+
Уксусная кислота 100%	-	-	-	+	Тетрагидрофуран	-	-	+	-
Этилацетат	-	-	+	+	Толуол	+	+	+	+
Этанол	-	+	+	+	Пероксид водорода	+	+	+	+

Условные обозначения: + – совместима; - – несовместима.

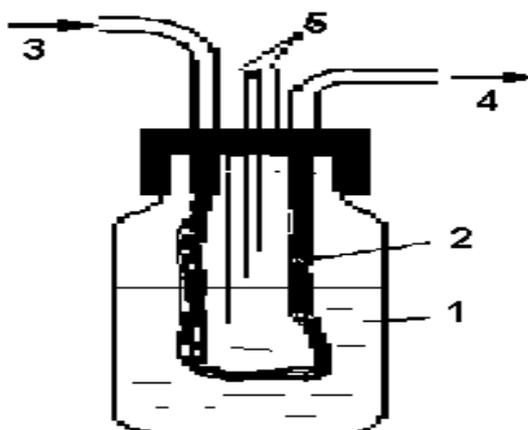


Рис 1. 47. Ячейка для фильтрации на полых волокнах: 1 – стаканчик; 2 – полые волокна; 3 и 4 – выходные трубки; 5 – дополнительные трубки

Для стерилизации мембраны выдерживают в 5%-м формалине или в 75%-м этаноле 24 ч, затем мембраны несколько раз промывают дистиллированной водой, после чего выдерживают в автоклаве при 120°C в течение 30 мин.

Мембраны сохраняют влажными, так как при высыхании они тотчас садятся.

Порядок работы

Приготавливают раствор вещества (рекомендуется 5–10%-ная концентрация), заполняют им ячейку для фильтрации, устанавливают предохранительный клапан.

Нагнетают давление в ячейке и включают магнитную мешалку.

Фильтрацию продолжают до достижения необходимой степени концентрирования или же до полного отсутствия в фильтрате низкомолекулярных компонентов.

Следует строго придерживаться следующего правила: при диафильтрации объем фильтрата должен по крайней мере в 10 раз превышать объем исходного раствора.

После окончания фильтрации отключают мешалку, снимают давление, концентрат отбирают пипеткой. При больших объемах рекомендуется отбирать целевой раствор в круглодонную колбу с помощью вакуумного насоса.

При количественной обработке необходимо определить содержание вещества в концентрате (путем взвешивания сухого остатка, рефрактометрически, спектрофотометрически).

Источники ошибок

Слишком низкая скорость фильтрации из-за высокой концентрации исходного раствора или из-за того, что НОММ мембраны не соответствует молекулярной массе целевого вещества.

Слишком низкое давление или вакуум.

Форма и заряд молекул целевого вещества отрицательно сказываются на проницаемости мембраны (формируется прочный пограничный слой).

Оформление результатов

В рабочем журнале указывают количество вещества в концентрате в г/л или %.

Пример: выход 4,5 г (82%, $M > 10^4$, мембранный фильтр XY).

Можно также указать размеры мембраны, объем раствора, объем фильтрата, продолжительность процесса.

Область применения

Очистка биополимеров и синтетических полимеров от примесей.

Обессоливание растворов и замена буфера.

Концентрирование (наиболее мягкий и энергосберегающий способ удаления растворителя).

Фракционирование макромолекул (каскадный фильтр).

Применение в клиниках: подготовка анализов, концентрирование плазмы, сыворотки, мочи, суспензий вирусов.

Холодная стерилизация (стерилизующая фильтрация): большинство бактерий задерживается на мембранах с диаметром пор 0,2 мкм.

По сравнению с диализом преимуществ мембранной фильтрации являются высокая скорость и эффективность процесса, недостатком — высокая стоимость аппаратуры.

Диализ и электродиализ

Диализом называется процесс разделения, основанный на диффузии веществ различной молекулярной массы через полупроницаемые мембраны.

Электродиализом называется разделение заряженных частиц при прохождении их через ионообменные мембраны под действием электрического поля.

Физические основы метода

Процесс разделения при диализе описывается законом диффузии Фика:

$$Dm / dt = -Ddc / dX,$$

где m – количество вещества, диффундирующего в единицу времени, t – время процесса, D – коэффициент диффузии, c – концентрация, X – расстояние

Коэффициент диффузии D зависит от площади мембраны и ее проницаемости для определенного вещества. Количество вещества, диффундирующее через мембрану в единицу времени, прямо

пропорционально площади мембраны и концентрационному градиенту (рис. 1.48 и 1.49).

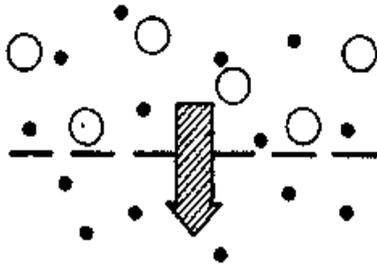


Рис.1.48. Схема разделения на полупроницаемых мембранах

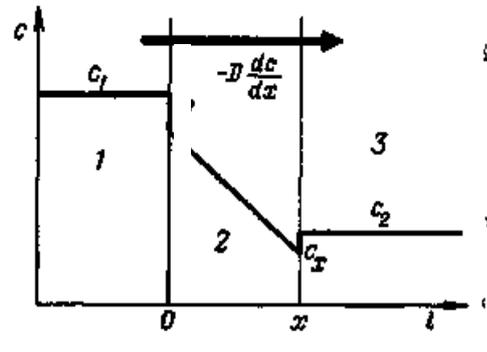


Рис.1.49. Распределение вещества при диализе. C_1 – концентрация в растворе образца, C_2 – концентрация в диализате; C_0 , C_x – концентрация в примембранном слое по обеим сторонам мембраны; x – толщина мембраны и примембранного слоя; 1 – образец; 2 – область мембраны; 3 – диализат

Приборы

В лаборатории диализ проводят в диализных мешках различных размеров, приготовленных из плоских мембран или диализных трубок.

Диализные трубки имеют следующие параметры:

Ширина, мм	10 – 75
Диаметр, мм	6, 16, 20, 30, 50
Длина, м	10, 25.

Простейший диализатор изображен на рис. 1.50, здесь перемешивание раствора осуществляется при помощи магнитной или механической мешалки. Более сложная установка приведена на рис. 1.51; здесь емкость диализных мешков составляет от 2 до 200 мл, а ёмкость камеры – до 10 л.

Мембраны для диализа представляют собой пленки из полимерных материалов, проницаемые для низкомолекулярных веществ (солей, аминокислот, сахаров и др.). Обычно это пленки из ацетилцеллюлозы (например, целлофан), изготовленные в виде трубочек диаметром от 3 до 50 мм и предназначенные для обессоливания веществ с молярной массой от 10^3 до $5 \cdot 10^4$ г·моль⁻¹.

Электродиализ проводят в проточном режиме в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1.52. Схема лабораторного прибора для

электродиализа приведена на рис. 1.53. Раствор образца помещают между двумя электродами, пространство между которыми разделено ионообменными мембранами двух типов. Мембраны, изготовленные из полимерных материалов (полиэферы, полиэтилен, поливинилхлорид), несут частицы сильного катионита (катионообменная мембрана) или сильного анионита (анионообменная мембрана). В отличие от ионообменных смол, применяемых в хроматографии, мембраны для электродиализа не нуждаются в регенерации. Мембраны хранят во влажном состоянии. При электродиализе процесс идет очень интенсивно, что позволяет за короткий срок обессолить большие объемы рабочего раствора.

Порядок работы

Диализную трубку необходимой длины завязывают с одной стороны узлом или перевязывают ниткой.

Перед началом диализа мешок выдерживают не менее 2 ч в воде, после чего тщательно промывают (стадия набухания пленки и удаления пластификатора).

Водный раствор целевого вещества заливают в диализный мешок и входное отверстие завязывают узлом или перевязывают ниткой.

При работе с небольшими объемами для увеличения рабочей площади рекомендуется оба конца трубки закрыть оплавленными стеклянными палочками.

Готовый мешок привязывают ниткой (длиной 5–10 см) к стеклянной палочке и подвешивают в стакане объемом 1–5 л (см. рис. 1.50).

Через некоторое время (от одного до нескольких часов) для увеличения эффективности и сокращения времени диализа заменяют воду в стакане.

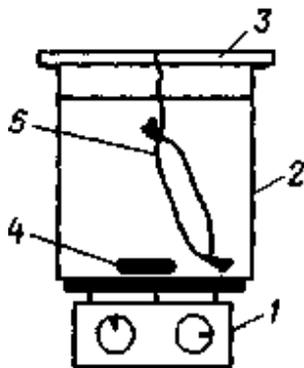


Рис. 1.50. Прибор для диализа (диализатор): 1 – магнитная мешалка; 2 – стакан с дистиллированной водой; 3 – стеклянная крышка; 4 – магнит; 5 – диализный мешок

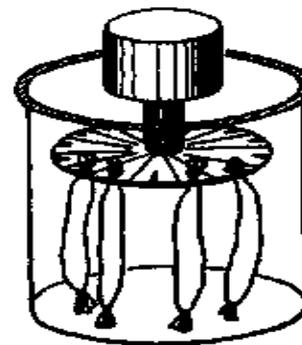


Рис. 1.51. Диализатор для одновременной обработки множества образцов (система медленно вращается при помощи моторчика)

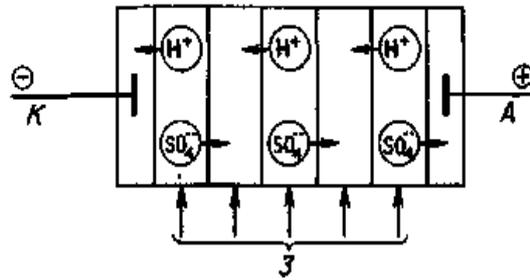


Рис.1.52. Схема непрерывного процесса электродиализа питьевой воды (с целью получения деионизованной воды). K – катод; A – анод; $к$ – катионообменная мембрана; $а$ – анионообменная мембрана. 1 – концентрированный раствор солей; 2 – деионизованная вода; 3 – питьевая вода.

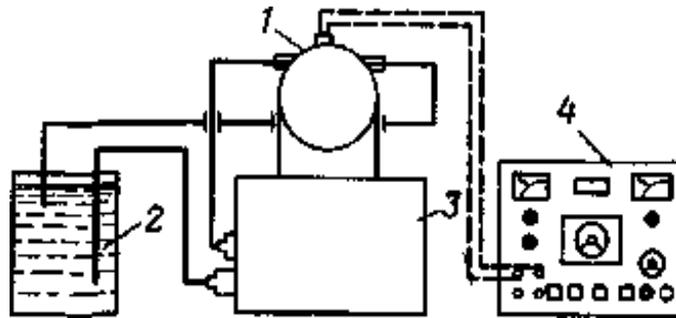


Рис. 1. 53. Схема лабораторного прибора для проточного электродиализа: 1 – пакет ячеек; 2 – рабочий раствор; 3 – насос; 4 – источник питания

Диализ ведут до исчезновения в диализате низкомолекулярных компонентов или до достижения необходимой степени чистки (общая продолжительность процесса составляет от нескольких часов до нескольких суток).

Для количественной оценки после окончания процесса содержание вещества в диализном мешке определяют взвешиванием, спектрофотометрически и т. д.

Источники ошибок

Повреждение мембраны (целостность мембраны проверяют с помощью красителей – конго красного, метиленового синего, иельского синего).

Неправильно выбраны диаметр трубки и пористость мембраны.

Плохое перемешивание.

Проницаемость мембраны сильно зависит не только от молекулярной массы, но и от формы и заряда молекул.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят данные о количестве вещества образце по завершении диализа в г/л и в % (по результатам взвешивания или определения концентрации в растворе), а также условия электродиализа.

Пример: выход 4,2 г (75%, $M > 2 \cdot 10^3$, диализ, ток 20 А, мембрана ХУ).

Область применения

Диализ: разделение низко- и высокомолекулярных веществ; обессоливание растворов полимеров; очистка полимеров (белков, синтетических полимеров и др.); изучение фармацевтических препаратов и биополимеров в процессе их получения.

Электродиализ: удаление солей и ионов металлов из растворов (например, из растворов белков, морской воды); коррекция рН-растворов; концентрирование растворов электролитов.

Лиофилизация

Лиофилизация – метод высушивания глубоко замороженных образцов путем возгонки (сублимации) воды в вакууме.

Физические основы метода

Принцип метода лиофильной сушки иллюстрирует фазовая диаграмма, приведенная на рис. 1.54. При температуре выше 273,16 К (0,01 °С) вода может существовать одновременно только в жидком и газообразном состояниях. Фазовый переход из жидкого состояния в газообразное называется испарением. При температуре ниже 273,16 К вода существует только в твердом и газообразном состоянии. Фазовый переход из твердого состояния в газообразное называется сублимацией. Отрезок 220 – 273 К на кривой (см. рис. 1.54) соответствует истинному давлению пара при сублимации. Все три фазовых состояния могут существовать одновременно только при 273,16 К, поэтому эту точку называют «тройной точкой» (кружок на рис. 1.54). Давление паров над поверхностью льда снижается при падении температуры и при 253 К (–20°С) составляет всего 100 Па. При

удалении паров воды из пространства над поверхностью льда или замороженного раствора происходит интенсивное испарение льда. Этот процесс сопровождается потерей части энергии льдом, в результате чего температура льда снижается, и на протяжении всего периода возгонки (сублимации) образец остается в глубоко замороженном состоянии. Температура образца при этом определяется давлением пара над льдом. Для осуществления лиофилизации весьма важно, чтобы на протяжении всего процесса в установке поддерживалось низкое давление.

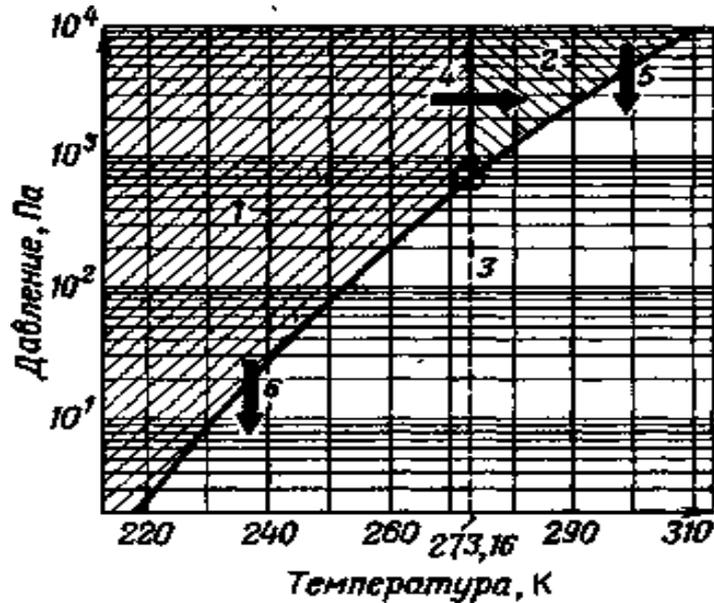


Рис. 1.54. Фазовая диаграмма системы лед – вода – водяной пар: 1 – твердая фаза; 2 – жидкая фаза; 3 – газообразная фаза; 4 – плавление; 5 – испарение; 6 – возгонка (сублимация)

Низкое давление поддерживают, при помощи ротационного масляного насоса. Однако этот процесс экономически нерентабелен, так как образующийся водяной пар занимает слишком большой объем. Наиболее эффективной ловушкой паров воды служит конденсатор льда, имеющий развитую, сильно охлаждаемую поверхность. В этом случае конденсация водяных паров идет эффективно и давление над образцом сохраняется достаточно низким. Вакуумный насос служит только для удаления небольших количеств воздуха из образца или воздуха, просачивающегося в систему за счет отдельных неплотностей. Для поддержания необходимого давления используют также масляный насос. Процесс высушивания протекает быстро, если парциальное давление неконденсируемого газа (воздушной смеси) не превышает 100 Па. При давлении выше 100 Па молекулы воды имеют ограниченную подвижность, процесс лиофилизации

затруднен. При давлении 1 Па процессы испарения воды из образца и ее конденсации в ловушке протекают равномерно.

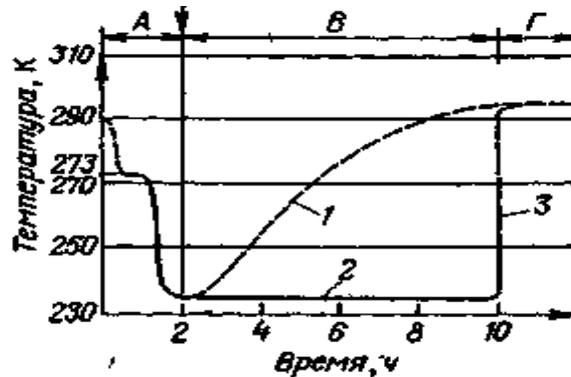


Рис. 1.55. Регистрация процесса лиофилизации: *А* — замораживание; *Б* — начало возгонки; *В* — возгонка; *Г* — окончание возгонки, подсушивание; 1 — изменение температуры в высушиваемом верхнем слое образца; 2 — изменение температуры в замороженном слое образца; 3 — изменение температуры по окончании возгонки

Скорость лиофильного высушивания зависит не только от давления паров, которое должно поддерживаться на минимальном уровне. Большое значение имеет компенсация энергии, затраченной на сублимацию льда. Это обеспечивается прямым контактом, обогревом путем облучения, конверсией. Процесс лиофилизации вещества подразделяется на три этапа: замораживание образца до температуры, определяемой остаточным давлением в системе; возгонка; подсушивание образца.

Основной процесс — возгонка начинается, как только в испарителе достигается рабочий вакуум (остаточное рабочее давление). Процесс заканчивается при полном испарении льда. Подсушивание образца необходимо только в том случае, если последний имеет слишком высокую остаточную влажность, нежелательную при последующем хранении. В этом случае образец высушивают с использованием диффузионного насоса (~ 10 Па) или над P_2O_5 в вакууме.

Приборы

Лиофилизацию проводят в специальных приборах (рис. 1.56), которые состоят из нескольких функциональных блоков.

Камера для образца. Образцы размещают в лотках, чашках и др. емкостях, стоящих на полке. Полку можно нагревать (нагреватель с плавной

регулировкой нагрева) или охлаждать. Камера имеет насадку («зонтик»), на которой можно разместить множество круглодонных колб. Эти колбы отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного вещества из колбы.

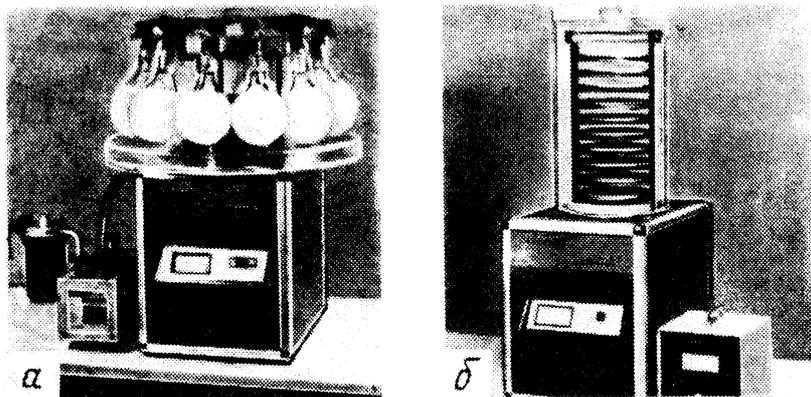


Рис 1.56. Приборы для проведения лиофилизации: *а* – высушивание в круглодонных колбах («зонтик»); *б* – высушивание в открытых сосудах (на обогреваемых полках)

Конденсатор (охлаждаемая ловушка). Наиболее эффективным конденсатором водяных паров является охлаждаемая извне поверхность. От степени охлаждения конденсатора зависит парциальное давление паров воды и, как следствие, остаточная влажность препарата. Емкость конденсатора определяется площадью охлаждаемой поверхности. В зависимости от конструкции ловушки объемы высушиваемых образцов варьируются от 50 до 200 мл.

Холодильный агрегат. Только в небольших лабораторных установках конденсатор (ловушку) замораживают охлаждающей смесью — жидким азотом или сухим льдом. На предприятиях применяют холодильные агрегаты, которые делают возможным непрерывное производство. Во многих случаях используются одноступенчатые холодильники (максимальное охлаждение до 230 К). Для более глубокого замораживания используют двухступенчатые агрегаты, способные поддерживать температуру ниже 200 К. Холодильные агрегаты должны иметь достаточно высокую производительность, чтобы при высокой скорости возгонки обеспечивать быструю конденсацию и замораживание водяных паров.

Вакуумный насос. Небольшое количество водяных паров не улавливается охлаждаемой ловушкой. Эти пары и всегда имеющиеся в системе сопутствующие газы должны удаляться ротационным насосом с достаточно высокой, производительностью (рис. 1.57). Большинство

установок снабжены дополнительным диффузионным масляным насосом, с помощью которого осуществляют досушивание (при отключенной ловушке) образца.

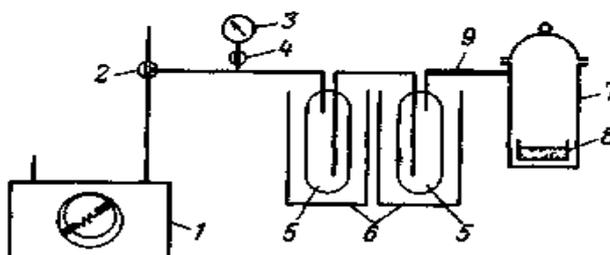


Рис 1.57. Схема установки для лиофилизации: 1 – ротационный насос (остаточное давление ~ 10 Па); 2 – трехходовой кран; 3 – манометр; 4 – кран манометра; 5 – ловушка; 6 – сосуд Дьюара; 7 – вакуум эксикатор или колба; 8 – чашка Петри (колба с образцом); 9 – широкий и короткий шланг (с внутренним диаметром 7 мм)

Подготовка образца

Способ замораживания и необходимая температура лиофилизации зависят от свойств высушиваемых веществ, а также от размера и формы сосуда для лиофилизации. Некоторые вещества могут быть высушены уже при 260 К, другие, с более высоким содержанием солей, при 230 К.

Образец может быть лиофилизован в круглодонных колбах или в открытых сосудах.

Колбы для лиофилизации отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного материала из колбы.

Перед замораживанием колбу с образцом прикрывают бумажной салфеткой, чтобы воспрепятствовать уносу высушенного вещества в конденсатор.

При лиофилизации фиксируют салфетку в керне упругой пружинкой и избыточный материал обрезают (рис. 1.58).

В случае использования лотков, чашек, стаканчиков, пробирок салфетка прикрепляется липкой лентой. Сосуд можно также закрыть термопластичной пленкой парафильм, в которой затем проделывают сеть тонких отверстий с помощью иглы.

Замораживание образца проводят в бане с хладоагентом (жидкий азот, ацетон – сухой лед) или непосредственно в камере.

Ампулы или чашки заполняют слоем раствора толщиной не более 2 см, после чего их устанавливают на полку камеры и там охлаждают до 240К.

Круглодонные колбы с образцом вращают на рамках или валках и одновременно охлаждают. При этом раствор равномерно распределяется тонким слоем по стенкам сосудов. О полном замораживании свидетельствует потрескивание слоя льда. Различные способы замораживания приведены на рис. 1.59.

Порядок выполнения операций

Устанавливают сосуды и чашки в камеру. После снижения давления до 100 Па круглодонные колбы закрепляют на насадке («зонтик»)

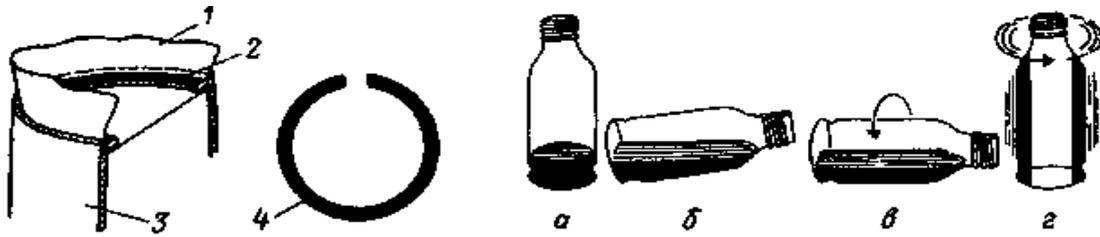


Рис. 1.58. Горло колбы для лиофилизации: 1 – бумажная салфетка; 2 – пружина; 3 – горло колбы в разрезе; 4 – пружина (вид сверху)

Рис. 1.59. Способы замораживания образца: *a* – замораживание в вертикальном сосуде; *б* – замораживание в слегка наклоненном сосуде; *в* – замораживание при медленном вращении; *г* – замораживание при сильном вращении

Круглодонные колбы с замороженными образцами присоединяют вращательным движением к кернам «зонтика», слегка прижимают (перед этим шлиф необходимо тщательно очистить и правильно смазать), а затем открывают кран на керне. Колбы удерживаются на керне самостоятельно лишь после вакуумирования. Перед тем как присоединить очередную колбу, необходимо убедиться, что в закрепленных колбах достигнута температура возгонки, по этому признаку судят и о глубине вакуума в системе.

Начало лиофилизации можно проконтролировать через некоторое время следующим образом: при помощи запорного крана отключают камеру-испаритель от ловушки. Через некоторое время (несколько секунд) определяют уровень давления в испарителе. В начале лиофилизации давление немного повышается, или при нормальном течении процесса несколько падает и после завершения сушки практически не изменяется.

По окончании лиофилизации систему (осторожно!) разгерметизируют и разбирают. Сосуд с образцом герметично закрывают или помещают в

эксикатор, поскольку тонкодисперсные лиофилизированные препараты часто бывают гигроскопичны и расплываются на воздухе.

При необходимости образец дополнительно высушивают в рабочей камере. Для этого перед включением диффузионного насоса камеру отключают от конденсатора. Менее эффективным, но более часто встречающимся приемом является подсушивание образца над P_2O_5 в вакуум-эксикаторе.

Особые случаи

Нерастворимые в воде твердые вещества методом лиофильного высушивания часто удается перевести в порошкообразное состояние. Этот прием чрезвычайно удобен при работе с ультрамикрочастицами вещества. Вначале вещество растворяют в минимальном объеме *n*-бутанола, затем добавляют 2–3-кратный объем воды и быстро замораживают. После лиофилизации вещество представляет собой тонкодисперсный порошок.

Область применения

Мягкое высушивание лабильных веществ с сохранением их свойств (структуры, ферментативной активности, бактериостатических свойств).

Работа с ультрамикрочастицами вещества.

Возможность длительного сохранения лиофильно высушенных образцов.

Применение в области клинических исследований: препараты ферментов, бумага и трубки для тестирования, плазма крови, препараты белков, антигены, антитела, гормональные препараты.

Применение в биохимии: белки и нуклеиновые кислоты.

Применение в химии: природные вещества и полимеры.

Применение в области гигиены и бактериологии: душистые вещества, антитоксины, антитела, сыворотки, препараты для определения группы крови, бактериальные культуры.

Применение в пищевой промышленности: сублимированные продукты, такие как чай, кофе, молоко, супы.

Контрольные вопросы к главе 1

1. Какие методы используются для получения чистых веществ?
2. Почему применяется множество экспериментальных приемов для очистки веществ, какие важнейшие свойства при этом используются?
3. Какие из перечисленных методов позволяют очищать вещества от микробных загрязнений? Какие от химических примесей?
4. Можно ли данные методы использовать в промышленности?

Глава 2

ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Приборы и реактивы. Штатив с кольцом и лапкой. Сетка асбестированная. Асбест – картон. Горелка. Треугольник фарфоровый. Щипцы тигельные. Песчаная баня. Водяная баня. Шкаф сушильный. Эксикатор. Холодильник Либиха. Соединительные резиновые трубки. Водоструйный насос. Колба Бунзена (на 500 мл). Воронка Бюхнера. Колба Вюрца (на 500 мл). Колба коническая (на 500 мл). Колба круглодонная (на 200 мл). Воронка стеклянная для фильтрования. Воронка с коротким широким концом. Капиллярные трубки. Стеклянные палочки. Стаканы (на 500, 250, 300, 200, 100 мл). Стакан высокий на 300–400 мл. Чашка фарфоровая. Ступка фарфоровая. Мензурки (на 10, 50, 100, 250 мл). Бюкс. Часовое стекло. Банка с пробкой. Фильтровальная бумага. Паяльная трубка. Чугунная плитка (20 x 15 см²). Молоток. Хлоркальциевая трубка с натронной известью. Вода загрязненная. Йод кристаллический. Нитрат свинца. Уголь – кусок. Гидрокарбонат натрия – технический. Гидроксид натрия (1 М раствор), вода дистиллированная.

Работа 1. Очистка веществ

В химической практике большое значение имеет чистота веществ, с которыми приходится работать, так как работа с загрязненными реактивами приводит к неверным результатам и неверным выводам.

Методы очистки веществ различны и зависят от свойств веществ и их применения. Наиболее распространенными методами являются: фильтрование, перекристаллизация, дистилляция, возгонка и высаливание.

Чистые вещества обладают присущими им характерными физическими и химическими свойствами. Поэтому чистоту вещества можно проверять как физическими, так и химическими методами. Физические методы связаны с определением плотности, температуры плавления, кипения, замерзания и других констант. Химические методы проверки основаны на химических реакциях и являются методами качественного и количественного анализа.

Опыт 1. Очистка природной воды

а) Очистка фильтрованием. В химический стакан или колбу налейте около 0,5 л водопроводной воды. Приготовьте складчатый бумажный фильтр, соответствующий размеру воронки (фильтр не должен

доходить до краев воронки на 5–6 мм). Воронку поместите в кольцо штатива. Под нее поставьте стакан так, чтобы конец воронки соприкасался со стенкой стакана и фильтрующая жидкость из воронки стекала по стенке стакана и не разбрызгивалась. Сливая жидкость на фильтр, наполняйте воронку водой на 3–5 мм ниже краев фильтра (рис. 2.1).

В профильтрованную воду бросьте 3–4 кристалла перманганата калия для окисления содержащихся в природной воде органических веществ, которые при этом разрушаются.

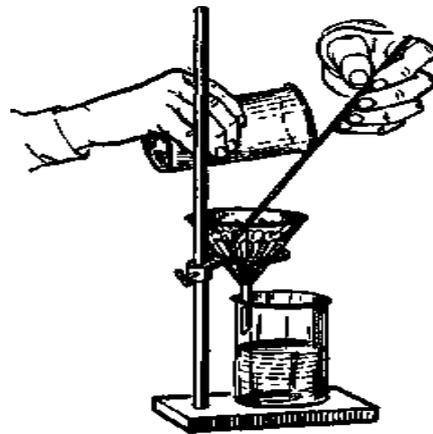


Рис. 2.1. Правильное проведение фильтрации

б) Очистка воды от растворенных веществ дистилляцией. Приготовьте холодильник Либиха и соедините его резиновой трубкой с водопроводным краном. Профильтрованный раствор перелейте из стакана в колбу Вюрца, бросьте в нее несколько капилляров для того, чтобы при кипении не было толчков жидкости. Колбу плотно закройте пробкой с термометром и укрепите на кольце штатива, подложив под нее асбестированную сетку, дополнительно покрытую листом асбеста, чтобы пламя горелки не проникало через сетку и не касалось стенок колбы. Соедините колбу с холодильником. На другой конец холодильника наденьте алонж и опустите его в колбу-приемник. Включите охлаждение и нагревайте воду в колбе до кипения. Перегнав приблизительно $3/4$ раствора, прекратите нагревание. Закройте водопроводный кран и отделите приемник от холодильника.

в) Удаление из воды газов кипячением. Перегнанная вода содержит некоторое количество растворенных газов из воздуха. Чтобы освободиться от них, воду следует прокипятить. Для этого колбу с полученным дистиллятом или заранее налитой в нее дистиллированной

водой поставьте на асбестовую сетку, помещенную на кольцо штатива, нагрейте до кипения и кипятите 10 – 15 минут. После этого закройте колбу пробкой с вставленной в нее хлоркальциевой трубкой, наполненной натронной известью и оставьте охлаждаться. После охлаждения закройте колбу притертой пробкой.

г) **Проверка чистоты полученной воды.** На два часовые стекла поместите по 5 – 10 капель воды, на одно стекло – очищенной, на другое – первоначально взятой. Оба стекла поставьте на водяную баню и выпарьте досуха. Сравните результаты выпаривания.

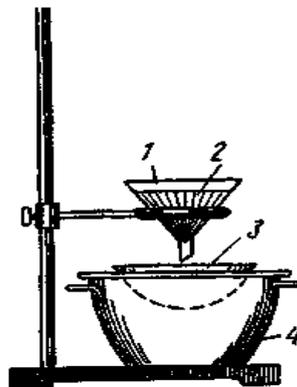


Рис. 2.2. Фильтрация раствора при перекристаллизации: 1 – воронка; 2 – складчатый фильтр; 3 – фарфоровая чашка; 4 – водяная баня, наполненная снегом, льдом или холодной водой

Опыт 2. Очистка гидрокарбоната натрия перекристаллизацией

В кольцо металлического штатива (рис. 2.2) вставьте воронку с коротким широким концом и вложите в нее складчатый бумажный фильтр. Под воронку поставьте фарфоровую чашку, помещенную в ступку со снегом или холодной водой.

Отмерьте мензуркой 100 мл дистиллированной воды и перелейте ее в стакан на 200 мл. Нагрейте воду до кипения и всыпьте в нее 12–13 г технического гидрокарбоната натрия NaHCO_3 , отвешенного на технических весах. Обратите внимание на загрязненность исходной сухой соли и ее насыщенного раствора до фильтрации.

Горячий насыщенный раствор профильтруйте через приготовленный складчатый фильтр в фарфоровую чашку. Фильтрат охладите при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Дайте

отстояться выпавшим кристаллам и отфильтруйте их на воронке Бюхнера, соединенной с водоструйным насосом (рис. 2.3)

Влажные кристаллы перенесите из воронки на фильтровальную бумагу и высушите их, отжимая между листами бумаги. Высушивание бумагой производите до тех пор, пока кристаллы не перестанут к ней прилипать. После этого поместите кристаллы на сухую фильтровальную бумагу и просушите их на воздухе.

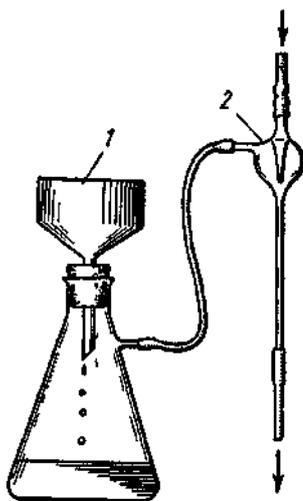


Рис. 2.3. Прибор для вакуумного фильтрования: 1 – воронка Бюхнера; 2 – водоструйный насос

Опыт 3. Получение карбоната натрия прокаливанием гидрокарбоната

Полученный в опыте 2 гидрокарбонат натрия поместите в тигель, поставьте его в треугольник на кольцо штатива и прокалите на слабом пламени горелки в течение 30–40 мин. Обратите внимание на «кипение» — выделение двуокси углерода CO_2 и воды.

Следите, чтобы не весь тигель раскалялся докрасна (а только его дно). Закончив прокалывание, перенесите тигель щипцами в эксикатор для охлаждения. Охлажденную сухую соль пересыпьте в банку с притертой пробкой. Полученный чистый препарат отвечает формуле Na_2CO_3 .

Опыт 4. Очистка йода возгонкой

Получите у лаборанта некоторое количество кристаллического йода. Пересыпьте его в высокий стакан, который поставьте на асбестированную сетку на кольце штатива. На стакан поставьте круглодонную колбу, наполовину заполненную холодной водой. Нагревание ведите осторожно на маленьком пламени, чтобы пары йода не выходили наружу, а, охлаждаясь, оседали на колбе. Когда возгонка окончится, прекратите нагревание и дайте стакану охладиться, не снимая с него колбу. После полного охлаждения поднимите колбу и осторожно кусочком сухой фильтровальной бумаги перенесите йод со дна колбы в приготовленный чистый бюкс с притертой крышкой. Осталось ли что-либо в стакане после возгонки йода?

Работа 2. Получение свинца из его соли путем последовательных реакций

а) Приготовление раствора нитрата свинца. Получите у лаборанта некоторое количество нитрата свинца (около 2 г). Поместите соль в стакан на 200 мл. Отмерьте мензуркой 100 мл дистиллированной воды, вылейте ее в стакан с солью и, перемешивая жидкость стеклянной палочкой, полностью растворите соль. Полученный раствор может оказаться слегка мутным вследствие гидролиза соли.

б) Осаждение гидроксида свинца. Отмерьте мензуркой 15 – 16 мл 1 М раствора едкого натра и осторожно на палочке прилейте к приготовленному раствору нитрата свинца. Раствор с осадком перемешайте и дайте ему отстояться.

в) Отделение осадка от раствора фильтрованием и промывание. Приготовьте фильтр с таким расчетом, чтобы края его не доходили до краев воронки на 5 – 6 мм, и плотно вложите его в воронку. Смочите фильтр дистиллированной водой и поместите воронку в кольцо штатива. Под воронку поставьте стакан или колбочку так, чтобы фильтрующаяся жидкость стекала по стенке стакана или колбочки. Отстоявшийся раствор осторожно, не взмучивая осадка, слейте в воронку по палочке. Палочку держите почти вертикально посреди воронки, касаясь ее концом фильтра в нижней части воронки. Эта предосторожность необходима для того, чтобы жидкость не разбрызгивалась. Соблюдайте и вторую предосторожность фильтрования – не заполняйте фильтр до краев на 3 мм. После сливания раствора палочку оставляйте в стакане. Удалив возможно полнее раствор с осадка, прилейте к последнему небольшое количество воды (15 – 20 мл) и размешайте палочкой. Дайте осадку отстояться и снова слейте жидкость на фильтр (такой метод фильтрования и промывания осадка называется декантацией). Промойте осадок в стакане два раза, после чего, прилив третью порцию воды, размешайте осадок палочкой и, не давая ему отстаиваться, во взмученном

состоянии вместе с жидкостью перенесите на фильтр. На фильтре осадок промойте еще раз из промывалки, стараясь смыть его с верхней части фильтра вниз.

г) Высушивание осадка и получение оксида свинца прокаливанием гидроксида. Когда вся жидкость профильтруется, покройте воронку фильтровальной бумагой, в которой сделайте палочкой несколько отверстий, и поставьте в сушильный шкаф для просушивания на 10 – 15 мин. Просушенный осадок выньте из воронки вместе с фильтром. Завернув края фильтра внутрь так, чтобы осадок не высыпался из него, после чего положите в приготовленный и заранее взвешенный тигель конусом вверх. После этого прокалите осадок до полного разложения гидроокиси и образования оксида свинца желтого цвета. Оставьте горелку и, не снимая тигель с конца штатива, дайте ему охладиться в течение 10 – 15 мин.

д) Получение свинца восстановлением его оксида углем. В куске угля сделайте углубление и поместите в него небольшое количество смеси оксида свинца с порошком угля. С помощью паяльной трубки направьте пламя горелки на уголь и сильно раскалите его в том месте, где находится окись свинца. Нагревание продолжайте до тех пор, пока не получится капля расплавленного свинца. Прекратив прокалывание, после охлаждения снимите полученный королек свинца с угля и рассмотрите его. Перенесите свинец на чугунную плитку (наковальню) и, ударив молотком по корольку, убедитесь, что свинец мягкий металл и легко куется. Напишите уравнение реакций получения гидроокиси свинца из нитрата, окиси свинца из гидроокиси и восстановления свинца из его окиси углем.

Атомно-молекулярная теория

Все работы данного раздела связаны с определением массы вещества и требуют взвешивания. В одной и той же работе при всех взвешиваниях следует пользоваться одними и теми же весами, одним и тем же разновесом и взвешивание производить с одинаковой точностью.

Работа 3. Определение качественного состава дигидрокарбоната меди (малахита) и процентного содержания в нем оксида меди

Приборы и реактивы. Прибор для разложения соли. Весы теххимические и разновес. Химический стакан. Дигидрокарбонат $(\text{CuOH})_2\text{CO}_3$. Сульфат меди (обезвоженный). Известковая вода (свежеприготовленная).

Соберите прибор по рис. 2.4. Сухую пробирку взвесьте на химических весах с точностью до 0,02 г. Насыпав в пробирку примерно

0,4 г дигидрокарбоната меди (малахита), вытрите ее стенки с внутренней стороны фильтровальной бумагой и взвесьте пробирку с солью с точностью до 0,02 г. Запишите результаты взвешиваний в журнал.

Пробирку закрепите горизонтально в штативе и закройте пробкой с отводной трубкой, в горизонтальную часть которой заранее поместите ровным тонким слоем прокаленный порошкообразный сульфат меди (II) CuSO_4 . Конец трубки опустите в стакан с известковой водой. Слабым пламенем горелки нагрейте всю пробирку, а затем нагрейте сильнее (прокалите) порошок дигидрокарбоната меди, пока весь порошок не изменит свой цвет (10–15 мин), после чего выньте трубку из стакана, а горелку отставьте.

Каков цвет оксида меди в пробирке после прокаливания дигидрокарбоната меди? Как изменился цвет безводного сульфата меди в трубке при переходе в кристаллогидрат? Какой продукт разложения дигидрокарбоната меди вызывает образование малорастворимого CaCO_3 в стакане с известковой водой? Какие вещества получились в результате прокаливания соли? Напишите уравнение реакции.

Когда пробирка остынет, отделите ее от трубки, взвесьте и запишите найденную массу. Проведите контрольный опыт: повторное прокаливание пробирки (не закрывая пробкой с отводной трубкой) в течении 5 мин, охлаждение и взвешивание. Результаты взвешивания не должны отличаться друг от друга более, чем на 0,02 – 0,03 г, в противном случае произведите прокаливание и взвешивание в третий раз.

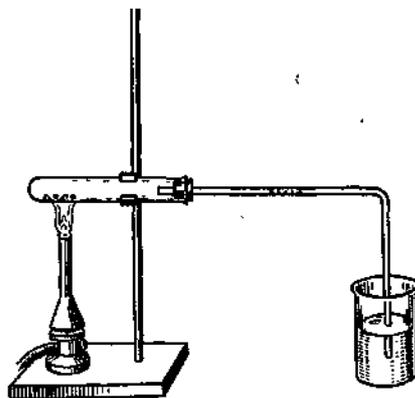


Рис. 2.4. Прибор для разложения малахита

Запись экспериментальных данных и расчет

Масса пустой пробирки..... m_1
 Масса пробирки с солью..... m_2
 Масса дигидрокарбоната меди..... $m_3 = m_2 - m_1$

Масса пробирки с веществом после
 прокаливания m_4
 Масса оксида меди $m_5 = m_4 - m_1$.

По полученным данным рассчитайте содержание оксида меди (%) в дигидроксокарбоната меди:

$$\% \text{CuO} = m_5 \cdot 100 / m_3.$$

По формуле дигидроксокарбоната меди $(\text{CuOH})_2\text{CO}_3$ вычислите теоретическое содержание в нем оксида меди (%) и сравните с экспериментально полученным результатом. Расхождение результата может зависеть от загрязнения взятой соли примесями и от неточности работы. Процент относительной ошибки определяется по формуле

$$(a - b / c) \cdot 100,$$

где a – теоретическое содержание окиси меди; b – практически полученное значение; c – масса вещества, взятого для определения.

Работа 4. Определение формулы кристаллогидрата сульфата меди

Приборы и реактивы. Технохимические весы и разновес. Эксикатор. Щипцы хирургические или тигельные. Тигель № 2. Треугольник фарфоровый. Сульфат меди (медный купорос кристаллический). Термометр. Ступка с пестиком. Шпатель. Песчаная баня.

Фарфоровый тигель поставьте в треугольник и прокалите 5–10 мин, после чего тигельными щипцами перенесите в эксикатор для охлаждения на 10–15 мин. По охлаждении тигля до комнатной температуры взвесьте его на технохимических весах.

Кристаллы сульфата меди разотрите в ступке до тонкого порошка и шпателем насыпьте в тигель на 1/4 его объема. Взвесьте тигель с кристаллогидратом и запишите в журнал результаты двух взвешиваний. Поставьте тигель с солью на песчаную баню, которую нагрейте горелкой или электроплиткой до 260 – 300°C. Поддерживайте эту температуру до полного обезвоживания кристаллогидрата, о чем можно судить по переходу голубой окраски соли в белую. Температуру проверяйте термометром, опущенным в песок. Когда соль полностью побелеет, снова перенесите тигель щипцами в эксикатор для охлаждения (на 8–10 мин). По охлаждении взвесьте и, записав результаты в журнал, повторите прокалывание (в течение 5 мин), охлаждение и взвешивание –

контрольный опыт. Расхождение двух взвешиваний не должно превышать 0,02 – 0,03 г, в противном случае прокаливание и другие операции необходимо провести в третий раз.

Запись экспериментальных данных и расчет

Масса тигля	m_1
Масса тигля с кристаллогидратом.....	m_2
Масса кристаллогидрата.....	$m_3 = m_2 - m_1$
Масса тигля с солью после прокаливания	m_4
Масса удаленной воды.....	$m_5 = m_2 - m_1$
Масса безводной соли.....	$m_6 = m_4 - m_1$

Рассчитайте количество воды в граммах и молях, приходящееся на 1 моль безводной соли, и напишите формулу исследованного вами кристаллогидрата.

Работа 5. Определение эквивалента металла методом вытеснения водорода

Приборы и реактивы. Прибор для определения эквивалента металла. Аналитические весы и разновес. Термометр. Барометр. Мензурка на 15–25 мл. Стаканчик химический на 50 мл. Фильтровальная бумага. Кусочек металла (х.ч.). Соляная кислота, 2М раствор.

Для работы можно пользоваться магниевой, лентой, порошком восстановленного железа, кусочком алюминия, цинка или другого активного металла.

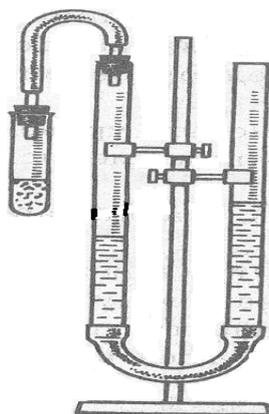


Рис. 2.5. Установка для определения эквивалента металла

Прибор для определения эквивалента металла методом вытеснения водорода из кислоты (рис. 2.5) состоит из пробирки (на 25–50 мл), бюретки (на 50–100 мл) и уравнительного сосуда – второй бюретки (на 50–100 мл).

Порядок выполнения работы

1. Взвешивают на аналитических весах кусочек металла: цинка, магния или алюминия (выбирают кусочек с массой в пределах 0,030 – 0,060 г). Записывают массу металла $m(Me)$.

2. Проверяют прибор на герметичность. Прибор (рис. 2.5) представляет собой сообщающийся сосуд из двух градуированных бюреток, соединённых каучуковой трубкой.

Градуированная часть каждой трубки рассчитана на объем 50 мл. Трубки наполовину заполняют водой. К одной из трубок присоединена пробирка. Реакция между кислотой и металлом происходит в пробирке. Выделяющийся водород поступает в градуированную трубку и вытесняет соответствующий объём воды. Отмечая уровень воды в одной из трубок до и после окончания реакции, находят объём выделившегося водорода. Правильное определение уровня жидкости предусматривает, что нижний уровень мениска воды в бюретке и нулевое деление должны совпадать и быть на уровне глаза (рис. 2.6).

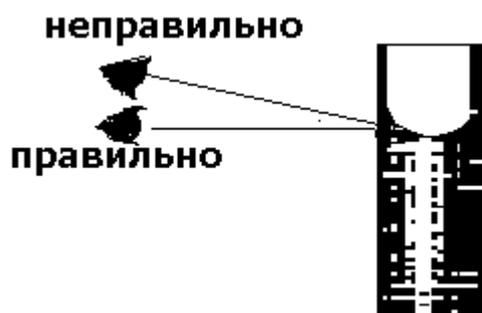
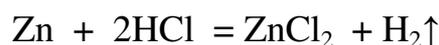


Рис. 2.6. Уровень мениска воды в бюретке и нулевое деление должны совпадать и быть на уровне глаза

Для проверки прибора на герметичность отсоединяют от штатива одну из трубок и поднимают или опускают её. Если прибор герметичен, то уровень воды в другой трубке после небольшого отклонения должен остаться без изменения. В случае нарушения герметичности проверяют все места соединения стекла с каучуком.

3. Отделяют пробирку от остальной части прибора и через воронку наливают в пробирку 3–5 мл раствора соляной кислоты с массовой долей около 10%. Пробирку с кислотой присоединяют на прежнее место. В градуированной трубке, к которой присоединена пробирка, отмечают уровень воды А, мл (с точностью до 0,2 мл).

4. Отделяют снова пробирку с кислотой от прибора. Держа её в наклонном положении, на край пробирки помещают кусочек взвешенного металла и осторожно, возможно плотнее, присоединяют к прибору. Затем смачивают металл кислотой и наблюдают течение реакции



По прошествии 5 мин после её окончания, уровни воды в стеклянных трубках выравнивают, устанавливая в одинаковое горизонтальное положение (сохраняя герметичность прибора), и отмечают вторично в той же трубке уровень воды Б, мл .

5. Записывают комнатную температуру, $t, ^\circ\text{C}$ и атмосферное давление $P_{\text{атм}}$, Па, или выраженное в $h_{\text{атм}}$, мм.рт.ст. Для перевода мм.рт.ст. в систему СИ пользуются формулой

$$P = \rho gh,$$

где P – давление, Па; $\rho = 13600 \text{ кг/м}^3$, плотность ртути; $g = 9,81 \text{ м/с}^2$; h – высота ртутного столба, м.

Расчёты

6. Определяют объём выделившегося водорода $V(\text{H}_2)$, мл, в условиях опыта.

$$V(\text{H}_2) = \text{Б} - \text{А}.$$

7. Определяют давление водорода $P(\text{H}_2)$ в течение опыта. Общее давление в трубке, содержащей водород, во время опыта поддерживалось на уровне атмосферного. Оно складывается из парциальных давлений водорода $P(\text{H}_2)$, воздуха и насыщенных водяных паров. Давлением воздуха пренебрегают. Давление водяных паров $P(\text{H}_2\text{O})$ при данной температуре t находят из табл. 2.1. Давление водорода $P(\text{H}_2)$ тогда равно

$$P(\text{H}_2) = P_{\text{атм}} - P(\text{H}_2\text{O}).$$

8. Приводят объём водорода $V(\text{H}_2)$ к нормальным условиям, для этого пользуются уравнением Клапейрона:

$$\frac{P(H_2) \cdot V(H_2)}{T} = \frac{P^0 V^0(H_2)}{T^0};$$

Здесь $P^0 = 101325$ Па; $T^0 = 273$ К. Из уравнения Клапейрона находят величину $V^0(H_2)$.

9. Определяют эквивалентную массу металла $M_{eq}(Me)$. Из опыта следует, что металл с массой $m(Me)$, вытесняет при T^0 водород объемом $V^0(H_2)$. Согласно закону эквивалентов, при тех же условиях металл с эквивалентной массой $M_{eq}(Me)$ вытеснит эквивалентный объем водорода $V_{eq}(H_2)$, равный 11,2 л для нормальных условий:

$$\frac{m(Me)}{M_{eq}(Me)} = \frac{V^0(H_2)}{V_{eq}(H_2)},$$

отсюда

$$M_{eq}(Me) = \frac{11,2 \cdot m(Me)}{V^0(H_2)}.$$

Т а б л и ц а 2.1

Давление насыщенного водяного пара
при различных температурах

Темпе- ратура, $t, ^\circ\text{C}$	Давление		Температура, $t, ^\circ\text{C}$	Давление	
	$P(\text{H}_2\text{O}),$ Па	$h(\text{H}_2\text{O}),$ мм.рт. ст.		$P(\text{H}_2\text{O}),$ Па	$h(\text{H}_2\text{O}),$ мм.рт.ст.
15	1704,9	12,79	22	2644,0	19,80
16	1817,0	13,63	23	2809,0	21,03
17	1937,0	14,52	24	2984,0	22,33
18	2064,0	15,47	25	3167,2	23,71
19	2197,0	16,47	26	3361,0	25,16
20	2337,8	17,52	27	3565,0	26,68
21	2466,0	18,63	28	3780,0	28,23

10. Проводят расчет эквивалентной массы металла вторым способом. Для этого по уравнению Клапейрона – Менделеева находят массу выделившегося водорода $m(\text{H}_2)$:

$$P(\text{H}_2) \cdot V^0(\text{H}_2) = \frac{m(\text{H}_2)}{M(\text{H}_2)} RT;$$

далее определяют эквивалентную массу из соотношения:

$$\frac{m(Me)}{m(H)} = \frac{M_{eq}(Me)}{M_{eq}(H)};$$

где $M_{eq}(H) = 1$ г/экв.

11. Находят ошибку опыта. Для этого уточняют у преподавателя название исследуемого металла и записывают уравнение химической реакции, имевшей место в опыте. По известной теперь относительной массе $A_r(Me)$ и валентности val , проявляемой металлом в ходе реакции, рассчитывают теоретическое значение эквивалентной массы металла по формуле:

$$M_{eq}^T(Me) = \frac{A_r(Me)}{val} .$$

Т а б л и ц а 2.2

Протокол эксперимента

Но- мер	Измеряемая величина	Значение измеряемой величины
1	Масса металла $m(Me)$, г.	0,04
2	Первоначальный уровень воды в бюретке А, мл.	
3	Уровень воды в бюретке после реакции выделения водорода Б, мл.	
4	Объём выделившегося водорода в условиях опыта $V(H_2)$, мл.	
5	Комнатная температура t , °С.	20
6	Атмосферное давление h , мм рт.ст.	750
7	Давление насыщенных паров воды при температуре t , $P(H_2O)$, Па.	
8	Давление водорода $P(H_2)$, Па.	
9	Объём водорода при нормальных условиях $V^0(H_2)$, л	
10	Относительная атомная масса металла $A_r(Me)$.	
11	Валентность металла val .	
12	Теоретическое значение эквивалентной массы металла $M_{eq}^T(Me)$, г/экв.	

13	Опытное значение эквивалентной массы металла $M_{eq}(Me)$, г/экв	
14	Погрешность (ошибка) опыта δ , %.	

Относительную ошибку определяемой эквивалентной массы находят по формуле:

$$\delta, \% = \frac{M_{eq}^T(Me) - M_{eq}(Me)}{M_{eq}^T(Me)} 100.$$

Хорошее совпадение теории и практики считается в том случае, если относительная ошибка не превышает величины 5 – 10%. Опытные и расчётные данные сводят в таблицу в лабораторном журнале.

Работа 6. Определение эквивалента меди по эквиваленту кислорода и вывод формулы оксида меди

Приборы и реактивы. Весы аналитические и разновес. Аппарат Киппа с двумя промывными склянками. Эксикатор. Щипцы тигельные. Тугоплавкая изогнутая трубка диаметром 10–8 мм. Штатив Бунзена с лапкой. Оксид меди прокаленный. Цинк гранулированный. Соляная кислота (1 : 1). Серная кислота (пл. 1,84 г/см³). Перманганат калия (6 М раствор).

Примечание. Для работы за несколько дней следует разложением чистой соли $(CuOH)_2CO_3$ приготовить оксид меди и просушить его в эксикаторе с серной кислотой.

Стеклянные трубки также надо заранее просушить в пламени горелки (чтобы удалить с поверхности стекла гигроскопическую влагу) и хранить в эксикаторе.

Для очистки и осушки водорода к аппарату Киппа должны быть присоединены две промывные склянki – одна с щелочным раствором перманганата, другая с концентрированной серной кислотой пл. 1,84 г/см³.

Соберите прибор по рис. 2.7. Изогнутую тугоплавкую трубку укрепите в штативе и прогрейте 1–2 мин в пламени горелки. Концы тигельных щипцов слегка нагрейте в пламени горелки и, взяв ими прокаленную трубку, поместите ее в эксикатор для охлаждения на 5–10 мин. (Если трубка заранее была высушена и хранилась в эксикаторе, то прогревать ее не нужно.)

Охлажденную трубку взвесьте на аналитических весах с точностью до 0,001 г (четвертым знаком можно пренебречь). Насыпьте в нее около 0,4–0,5 г полученного у лаборанта неизвестного оксида меди.

Стряхните порошок оксида меди в среднюю изогнутую часть трубки и кусочком ваты, прикрепленным к гибкой проволочке, вытрите внутреннюю поверхность трубки. Взвесьте трубку с оксидом меди, осторожно укрепите ее в штативе и присоедините к промывной склянке с серной кислотой, соединенной с аппаратом Киппа. Откройте кран аппарата Киппа и через 2–3 мин проверьте полноту вытеснения из системы воздуха. Для этого сухую пробирку наденьте вверх дном на свободный конец трубки с оксидом меди, наполните ее водородом и поднесите к пламени горелки. Если водород загорается спокойно без взрыва, значит, воздух из прибора вытеснен. Отрегулируйте краном аппарата Киппа равномерный, не сильный ток газа. Осторожно нагревайте пламенем горелки трубку, главным образом в том месте, где находится оксид меди. Старайтесь как можно меньше греть ту часть трубки, на которую надета резиновая трубка. Если загорится водород на конце трубки, ток водорода не прекращайте.

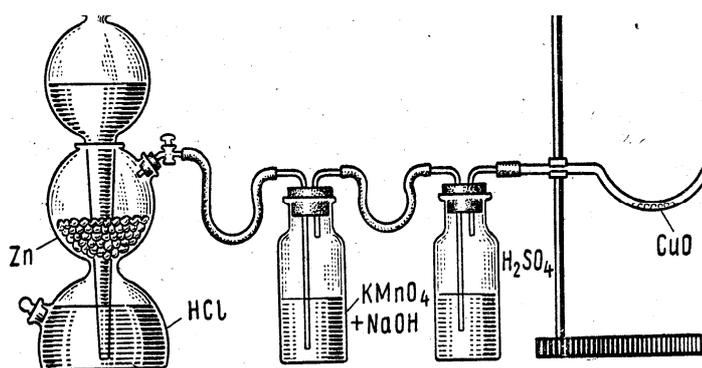


Рис. 2.7. Прибор для определения эквивалента меди

Когда восстановится весь оксид меди (полностью изменится его цвет), оставьте горелку и, не прекращая тока водорода, дайте трубке остыть. Отсоедините трубку от прибора, и взвесьте.

Снова присоедините трубку к аппарату Киппа, и, проверив чистоту выделяющегося водорода, как и в первом случае, со всеми предосторожностями пропустите ток водорода.

Нагревание трубки продолжайте 5 мин. Опять охладите трубку в токе водорода и снова взвесьте. Если расхождение с первым взвешиванием не превышает 0,001 г, восстановление считайте законченным.

Запись экспериментальных данных и расчет

Масса пробирки	m_1
Масса пробирки с оксидом меди	m_2
Масса оксида меди	$m_3 = m_2 - m_1$
Масса пробирки с восстановленной медью	m_4
Масса кислорода	$m_5 = m_2 - m_4$

Вычисление эквивалента меди. Пользуясь законом эквивалентов, вычислите эквивалент меди по эквиваленту кислорода.

Установление формулы оксида меди. По данным опыта вычислите процентное содержание меди и кислорода в данном случае и затем определите простейшую формулу оксида меди Cu_xO_y .

Работа 7. Определение эквивалента сложного вещества – карбоната кальция

В данной работе требуется определить эквивалент соли $CaCO_3$ по известному эквиваленту кислотного оксида CO_2 .

На химико-аналитических весах взвесьте 0,3–0,4 г мрамора с точностью до 0,001 г (взвешивание производить на часовом стекле).

При выполнении этой работы воспользуйтесь прибором для определения эквивалента металла (см. рис. 2.5). Вода в приборе должна быть заменена насыщенным раствором хлорида натрия, так как в растворе этой соли растворимость CO_2 меньше, чем в воде. Приведите прибор в рабочее состояние, для чего с помощью уравнительного сосуда при открытом зажиме установите жидкость в бюретке на нулевое деление, присоедините к измерительной бюретке колбочку и, закрыв пробки и зажим, тщательно проверьте прибор на герметичность, как указано в работе 5.

Отделив пробирку от прибора, налейте в нее 8–10 мл 2 М раствора соляной кислоты. Тщательно вытрите фильтровальной бумагой внутреннюю поверхность горла колбы и укрепите ее в штативе горизонтально. Взвешенный кусочек мрамора положите в горло колбы и осторожно, **при открытом зажиме** (почему?) плотно закройте колбу пробкой. Сохраняя уровень жидкости в бюретке на нулевом делении, снова закройте зажим. Опустите уравнительный сосуд и укрепите его в таком положении. Убедитесь, что прибор закрыт герметично, слегка наклоните штатив и опустите мрамор в кислоту. По окончании реакции и охлаждении колбы до комнатной температуры приведите газ к атмосферному давлению с помощью уравнительного сосуда и отметьте объем газа при данных условиях.

Результаты измерений запишите по следующей форме:

Запись экспериментальных данных

Масса мрамора со стеклом	m_1
Масса стекла	m_2
Масса мрамора	$m_3 = m_1 - m_2$
Объем выделившегося газа при данных условиях	V
Давление	P
Температура, °C	t

Применив уравнение Клапейрона – Менделеева $PV = (m/M)RT_t$, вычислите массу полученного газа. Используя закон эквивалентов

$$\mathcal{E}_1 / \mathcal{E}_2 = m_1 / m_2$$

вычислите эквивалентную массу карбоната кальция, зная, что эквивалент CO_2 в реакции нейтрализации, протекающей с образованием средней соли равен $1/2$ его молярной массы. Сложные вещества могут иметь переменный эквивалент, величина которого зависит от характера реакции.

Работа 8. Определение молярной массы диоксида углерода

Приборы и реактивы. Весы технические и разновес. Мерный цилиндр на 1000 мл. Прибор для получения диоксида углерода (аппарат Кипа с двумя склянками). Колба на 300–500 мл. Термометр. Барометр. Карандаш восковой. Мрамор. Соляная кислота (1:1; пл. $1,19 \text{ г/см}^3$). Серная кислота (пл. $1,84 \text{ г/см}^3$).

Определите молекулярную массу диоксида углерода, найдя экспериментально массу исследуемого газа в каком-либо точно измеренном объеме при определенных температуре и давлении. На основе полученных данных рассчитайте молекулярную массу тремя перечисленными ниже способами.

1. По закону Авогадро, согласно которому 1 моль любого газообразного вещества при 0°C и 760 мм рт. ст. занимает объем 22,4 л.

2. По формуле $M = 2D_H$ и $M = 29D_{\text{возд.}}$, где D_H – относительная плотность данного газа по водороду, $D_{\text{возд.}}$ – относительная плотность его по воздуху.

3. По формуле Клапейрона–Менделеева $PV = (m/M)RT$, где

P – давление газа (мм рт. ст.), равное барометрическому, V – его объем, R – газовая постоянная, равная 0,082 л·атм/К или 62400 мл·мм рт. ст./К. Прибор для определения молекулярной массы диоксида углерода представлен на рис. 2.8. Газ из аппарата Киппа 1 прежде чем поступить в колбу 4 емкостью 300–500 мл проходит через промывную склянку 2 с водой (чтобы очистить газ от примеси хлористого водорода), и склянку 3 с концентрированной серной кислотой (чтобы осушить газ).

Получите у лаборанта сухую колбу, плотно закройте ее пробкой и сделайте восковым карандашом отметку, на какую глубину входит пробка в горло колбы. Взвесьте колбу с пробкой на теххимических весах, результат взвешивания запишите в журнал. Наполните колбу диоксидом углерода, пропуская медленный ток газа из аппарата Киппа. Быстрое пропускание газа может вызвать завихрение его и унос из колбы 4. Пузырьки газа в промывных склянках должны проходить с такой скоростью, чтобы их можно было считать.

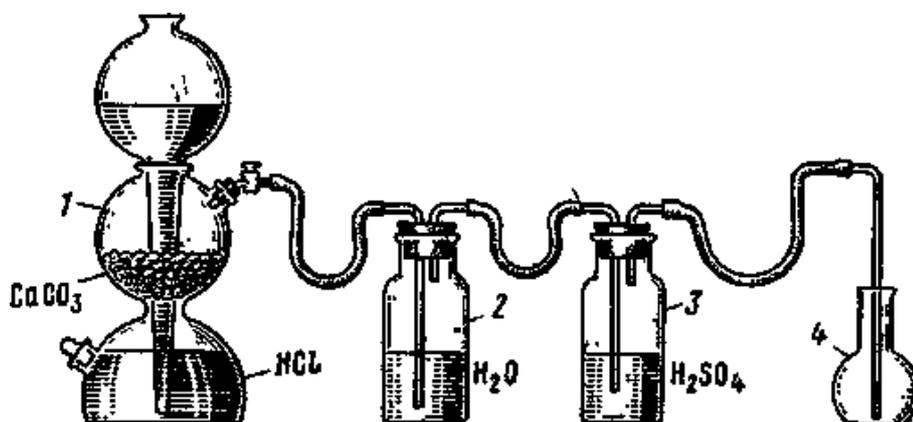


Рис. 2.8. Прибор для получения диоксида углерода: 1 – аппарат Киппа; 2, 3 – промывные склянки; 4 – колба для CO_2

Через 15–20 мин, не закрывая крана аппарата Киппа, медленно выньте отводную трубку из колбы и сразу закройте колбу пробкой до отмеченного уровня, держа колбу за горлышко двумя пальцами на весу в вертикальном положении. (Для чего нужна эта предосторожность?) После этого закройте кран аппарата Киппа. Взвесьте колбу с диоксидом углерода и запишите результат взвешивания.

Проведите контрольный опыт: в колбу дополнительно пропускайте газ из аппарата Киппа в течение 5 мин, с теми же предосторожностями закройте колбу пробкой и снова взвесьте, её. Результат второго взвешивания не должен отличаться от первого больше чем на 0,02 г, что укажет на полноту наполнения колбы газом.

Определите объем колбы V , для чего наполните ее водой комнатной температуры до метки на горле колбы и измерьте воду мерным цилиндром.

Зарисуйте прибор, укажите назначение каждой его части. В какую сторону была бы сделана ошибка при определении молекулярной массы диоксида углерода в отсутствие промывных склянок?

Напишите уравнение реакции получения оксида углерода (II). Запишите данные опыта и расчеты по следующей форме:

Запись экспериментальных данных и расчет

Масса колбы с пробкой и воздухом	m_1
Масса колбы с пробкой и оксидом углерода (II)	m_2
Объем газа в колбе	V
Температура, °C	t
Абсолютная температура, K	T
Атмосферное давление, мм рт. ст.	P
Объем газа в колбе при нормальных условиях (вычисляется по уравнению $P_0V_0/T_0 = PV/T$)	V_0
Масса воздуха в объеме колбы (вычислить, учитывая, что масса 1 л воздуха при нормальных условиях составляет 1,293 г)	m_3
Масса водорода в объеме колбы (вычислить, учитывая, что масса 1 л водорода при нормальных условиях составляет 0,089 г)	m_4
Масса колбы с пробкой без воздуха	$m_5 = m_1 - m_3$
Масса оксида углерода (II)	$m_6 = m_2 - m_5$
Относительная плотность оксида углерода (II): по воздуху	$D_{\text{возд}} = m_6/m_3$
по водороду	$D_{\text{H}} = m_6/m_4$

Вычислите молярную массу M_{CO_2} тремя способами, указанными в начале описания работы. Определите абсолютную и относительную ошибки опыта.

Контрольные вопросы и задачи

1. Ацетиленид лития имеет следующий состав: углерода 63,36%, лития 36,64%. Сколько ацетиленида лития можно получить нагреванием при высокой температуре 2 г лития и 10 г угля? Какое вещество и в каком количестве останется в избытке?

Ответ: углерод 6,57 г.

2. Определить эквивалент следующих элементов:

а) серебра, если известно, что при нагревании его оксида до полного разложения масса оксида уменьшилась на 6,9%;

б) свинца, если при нагревании 1,036 г его в токе кислорода получено 1,116 г оксида;

в) натрия и серы, если известно, что 2,3 г натрия непосредственно реагируют с 1,6 г серы и с 3,55 г хлора; эквивалент хлора принять равным 35,5 г (1 М).

Ответ: $E_{Ag} = 108$; $E_{Pb} = 103,6$; $E_{Na} = 23$; $E_S = 16$.

3. При восстановлении 2,32 г оксида вольфрама водородом выделилось 0,54 г воды. Определить эквивалент вольфрама в этом соединении.

Ответ: 30,66 г (0,17 М).

4. На основании соотношения атомной массы, эквивалента и валентности определить: а) атомную массу элемента, если его эквивалент равен 3, а окислительное число 4; б) окислительное число элемента, если его атомная масса 207,21, а эквивалент 51,80; в) эквивалент элемента, если его атомная масса 30,98, а окислительное число 5.

5. Написать формулы сульфидов олова, если атомная масса серы 32, эквивалент серы 16 г, атомная масса олова 118,70, а эквивалентные массы олова: а) 59,35 г; б) 29,69 г.

5. Определить степень окисления и эквивалент: а) ванадия в следующих соединениях: $Ca_2V_2O_7$; $V_2(SO_4)_3$; б) ниобия в следующих соединениях: $FeNb_2O_6$; NbO_2 .

6. Какие объемы займут при нормальных условиях: а) эквивалент водорода, эквивалент кислорода; б) 7 г азота, 4,25 г аммиака, 8,2 г гелия; в) $6,02 \cdot 10^{20}$ молекул хлора, $2 \cdot 10^{23}$ молекул оксида азота.

Ответ: а) 11,2 л, 5,6 л; б) 11,2 л, 7,5 л; в) 0,0224 л, 7,46 л.

8. При взаимодействии 9 г сульфида железа FeS с избытком соляной кислоты получено 2,24 л сероводорода (н. у.). Найти процент примеси в сульфиде железа. Считать, что сульфидов других металлов во взятом препарате нет.

Ответ: 1,33%.

9. Из 350 г галита (природного минерала, содержащего $NaCl$) по реакции



получено 14,7 л хлора ($t = 286^\circ C$, $P = 4 \text{ ат}$). Определить процентное содержание $NaCl$ в минерале. *Ответ:* 42,48%.

Скорость химических реакций.

Химическое равновесие

Работа 9. Влияние различных факторов на скорость химических реакций

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Микроколба. Кристаллизатор. Бумага миллиметровая. Сетка асбестированная. Метроном. Термостаты. Термометры на $100^\circ C$. Стеклянные палочки.

Пипетки капельные. Фильтровальная бумага. Шпатель. Лучина. Щипцы тигельные. Ступка с пестиком. Цинк (металлический, протравленный). Персульфат аммония (кристаллический). Йодид калия (кристаллический). Нитрат ртути (II) (кристаллический). Сульфит натрия (кристаллический). Карбонат кальция (мел). Алюминий (фольга и порошок). Йод (кристаллический). Растворы: иодата калия (0,02 н.), тиосульфата натрия (1 н.), серной кислоты (2 н.), уксусной кислоты (0,1 М), соляной кислоты (0,1 н., пл. $1,19 \text{ г/см}^3$), сульфата марганца (0,5 н.), нитрата серебра (0,1 М), крахмала.

Опыт 1. Влияние природы реагирующих веществ на скорость химической реакции

Соберите прибор, как указано на рис. 2.9. Налейте воды в стеклянный кристаллизатор или фарфоровую чашку и наполните доверху водой коническую пробирку. Закрыв отверстие пробирки пальцем, переверните ее вверх дном и опустите в чашку с водой. Под водой осторожно так, чтобы не проник воздух и не вылилась вода и, откройте пробирку. Микроколбу укрепите в штативе и налейте пипеткой на $3/4$ объема 0,1 М раствор уксусной кислоты. Возьмите 2–3 маленьких кусочка цинка, промойте их водой, вытрите фильтровальной бумагой и опустите в микроколбу с кислотой. Закройте колбу пробкой с отводной трубкой, конец которой опустите в чашку с водой и подведите под отверстие пробирки. По секундомеру или метроному отметьте время заполнения пробирки газом.

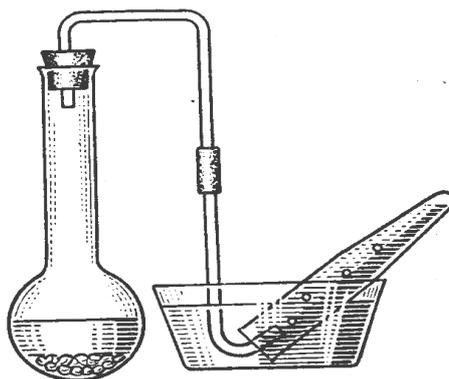


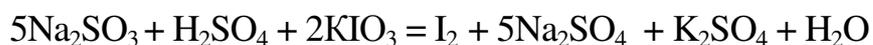
Рис. 2.9. Собираение газа под водой

По окончании опыта вылейте уксусную кислоту из микроколбы, промойте цинк и высушите его снова фильтровальной бумагой. Проведите аналогичный опыт с HCl, налив в микроколбу также на

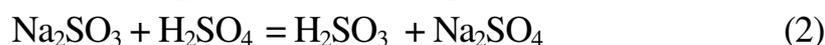
10% ее объема 0,1 М раствор соляной кислоты. Повторите первую часть опыта и отметьте время заполнения пробирки газом. Напишите уравнения реакций взаимодействия цинка с уксусной и соляной кислотой. Чем объяснить различную скорость реакций выделения водорода в первом и во втором случае?

Опыт 2. Влияние концентрации реагирующих веществ на скорость химической реакции

а) **Взаимодействие йодата калия с сульфитом натрия в кислой среде.** Химическая реакция, протекающая в данном опыте, может быть выражена суммарным уравнением



Однако указанная реакция протекает в несколько стадий, анализ которых позволяет применить к ней закон действия масс. Йодат калия KIO_3 и сульфит натрия Na_2SO_3 в водном растворе вступают в мгновенную обменную реакцию с серной кислотой с образованием йодноватой и сернистой кислот



которые взаимодействуют между собой по уравнению



С момента появления в растворе йодистоводородной кислоты параллельно протекают два процесса:



При этом реакция (5) идет значительно быстрее реакции (4). Поэтому свободный йод в растворе появляется только после полного окисления сернистой кислоты. С увеличением концентрации йодата калия пропорционально увеличивается концентрация йодноватой кислоты, а следовательно, и скорость реакции, протекающей с ее участием, в

результате которой выделяется свободный йод. Появление йода легко обнаруживается в присутствии крахмала (окрашивание раствора в синий цвет).

Считая началом реакции момент сливания растворов реагентов, а концом – момент выделения свободного йода (появление синей окраски), можно установить время течения процесса по секундомеру или метроному.

Изменяя концентрацию раствора одного из реагентов (в данном опыте – йодата калия), можно установить зависимость скорости реакции от концентрации реагирующих веществ при постоянной температуре.

Возьмите две чистые сухие конические пробирки и приготовьте в них равные объемы двух растворов йодата калия различной концентрации, добавив в одну из пробирок дистиллированную воду, как указано в табл. 2.3.

Т а б л и ц а 2.3

Экспериментальные данные

Номер пробирки	Количество капель			Общий объем	Условная концентрация моль/л	Время течения реакции (число ударов метронома) t	Скорость реакции в у.е.* $1/t$
	KIO ₃	вода	восстановительная смесь				
1	5	5	2	12	C		
2	10	0	2	12	2C		

* Здесь и далее время указано в условных единицах (у. е.).

Растворы перемешайте стеклянными палочками. Палочки из растворов не вынимайте. Пробирки поставьте в штатив.

В третьей пробирке приготовьте восстановительную смесь из сульфита натрия, серной кислоты и крахмала: два микрошпателя сульфита натрия, десять капель воды, десять капель свежеприготовленного крахмала и 2–3 капли 2 н. раствора серной кислоты. Смесь размешайте стеклянной палочкой. Включите метроном и внесите пипеткой две капли восстановительной смеси в пробирку № 1. Одновременно с этим начинайте отсчет ударов метронома или отмечайте время по секундомеру. Отсчет продолжайте до появления синей окраски в растворе. Повторите опыт с раствором в пробирке № 2. Запишите в таблицу все исходные данные и результаты опыта. Сопоставьте изменение скорости реакции с изменением концентрации йодата калия.

Запишите вывод о влиянии концентрации реагирующих веществ на скорость химической реакции.

б) Взаимодействие тиосульфата натрия с серной кислотой. Реакция между тиосульфатом натрия и серной кислотой может быть выражена общим уравнением:



Проделайте предварительно опыт качественно. Для этого внесите в пробирку 5–10 капель 1 н. раствора тиосульфата натрия и 3–5 капель 2 н. раствора серной кислоты. Выделяющаяся сера делает раствор мутным.

Для проведения опыта приготовьте в трех пробирках равные объемы растворов тиосульфата натрия различной концентрации, добавив в две пробирки воду, как указано в следующей табл. 2.4:

Т а б л и ц а 2.4
Экспериментальные данные

№ пробирки	Количество капель раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Количество капель воды	Количество капель H_2SO_4	Общий объем раствора (число капель)	Условная концентрация $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, моль/л	Время течения реакции (число ударов метронома), t	Скорость реакции в у. е., $1/t$
1	4	8	1	13	C		
2	8	4	1	13	2C		
3	12	—	1	13	3C		

Пробирки № 1 и 2 осторожно встряхните и поставьте в штатив. Включите метроном или секундомер. В пробирку № 1 добавьте одну каплю 2 н. раствора серной кислоты. По метроному или по секундомеру определите время с момента добавления кислоты до помутнения раствора.

Опыт повторите поочередно с пробирками № 2 и 3.

Все данные опыта занесите в таблицу. Сделайте вывод о зависимости скорости реакции от концентрации реагирующих веществ. Как согласуются ваши наблюдения с законом действия масс?

На миллиметровой бумаге начертите график зависимости скорости реакции от концентрации тиосульфата натрия. Для этого на оси абсцисс отложите в определенном масштабе относительные концентрации

тиосульфата натрия, а на оси ординат – отвечающие им скорости (в условных единицах).

Опыт 3. Влияние температуры на скорость химической реакции

Примечание (для лаборантов). Для опыта необходимо иметь три общих многогнездных электрических термостата с автоматическим обогревом. Термостаты заранее включаются лаборантом и регулируются на определенную постоянную температуру – комнатную в первом, на 10°C выше во втором и на 10°C выше второго в третьем.

При отсутствии автоматических термостатов их можно заменить стаканами на 300–400 мл. В таком случае в три стакана налить воды на $\frac{3}{4}$ объема. Стаканы покрыть картонными или деревянными крышками с тремя отверстиями, в одно из которых вставить термометр с делениями до $0,2^{\circ}\text{C}$. Два других отверстия предназначаются для пробирок. Один из стаканов (№ 1) оставить при комнатной температуре, два других до начала занятий нагреть так, чтобы вода в стакане № 2 была на 10°C выше комнатной, а в стакане № 3 – на 10°C выше, чем в стакане № 2. Температуру следует поддерживать постоянной, регулируя пламя горелки.

Проверьте температуру воды в трех термостатах: в одном из них она должна иметь комнатную температуру, во втором – на 10°C выше, в третьем – на 10°C выше, чем во втором. В одно из свободных отверстий в крышке каждого стакана вставьте коническую пробирку с 2 н. раствором серной кислоты и опущенной в нее пипеткой. В другое отверстие поместите пробирку с 10 каплями 1 н. раствора тиосульфата натрия. Через 10–15 мин включите метроном или секундомер. Не вынимая пробирку с тиосульфатом натрия из термостата № 1, добавьте в нее одну каплю 2 н. серной кислоты из пробирки, находящейся в том же термостате. По ударам метронома (или по секундомеру) отсчитайте время до появления заметной мути. Повторите опыт с растворами тиосульфата и серной кислоты в термостатах № 2 и 3, измеряя время течения реакции, как и в первом случае. Данные наблюдения запишите в табл. 2.5.

Т а б л и ц а 2.5

Номер наблюдения	Температура опыта	Время течения реакции (число ударов метронома), t	Скорость в усл. ед. , $1/t$

Сделайте вывод о зависимости скорости химической реакции от температуры. Какие значения принимает температурный коэффициент для большинства химических реакций?

Опыт 4. Влияние величины поверхности раздела реагирующих веществ на скорость химической реакции в гетерогенной системе

а) Взаимодействие нитрата ртути (II) с йодидом калия. Небольшое количество сухих кристаллов йодида калия KI и нитрата ртути (II) $Hg(NO_3)_2$ поместите отдельно в две сухие, чистые ступки и тщательно разотрите пестиком. Приготовьте две сухие конические пробирки. В одну из них положите по несколько крупных кристаллов указанных солей, в другую насыпьте приблизительно такое же количество солей, растертых в порошок. Для перемешивания реагирующих веществ обе пробирки несколько раз энергично встряхните, закрыв отверстие пальцем. Поставьте пробирки в штатив и наблюдайте появление кирпично-розовой окраски в реагирующей смеси вследствие образования HgI_2 . В каком случае скорость взаимодействия выше?

Отметьте влияние величины поверхности соприкосновения реагирующих веществ на скорость химического взаимодействия. Запишите уравнение реакции обмена между йодидом калия и нитратом ртути.

б) Взаимодействие карбоната кальция с соляной кислотой. Приготовьте два небольших приблизительно одинаковых кусочка мела. Один из них разотрите пестиком на кусочке бумаги и пере-сыпьте в коническую пробирку, второй целиком поместите в другую пробирку. В обе пробирки одновременно добавьте по 15 – 20 капель концентрированной соляной кислоты (пл. $1,19 \text{ г/см}^3$). Напишите уравнение реакции. Отметьте наблюдаемые явления и объясните их. Какой фактор в данном случае влияет на увеличение скорости реакции?

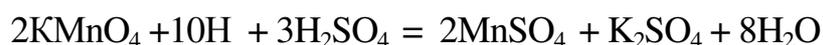
Работа 10. Катализ и его влияние на скорость химических реакций

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Микроколба. Фарфоровая чашечка маленькая. Фарфоровая пластинка с углублениями. Цинк гранулированный. Бертолетова соль. Диоксид свинца PbO_2 . Порошок аммония. Йод. Диоксид марганца. Диоксид кремния. Медь. Растворы: гидросульфита натрия $NaHSO_3$ (0,3 н.; насыщенный), щавелевой кислоты (насыщенный), перманганата калия (0,1 н.), серной кислоты (1 н.; 2 н.; 4 н.) нитрата натрия (0,5 н.), сульфата меди (0,5 н.), тиосульфата натрия (0,3 н.),

сульфата марганца (0,3 н.), азотной кислоты (0,5н.;2 н.), нитрата серебра (0,1 н.), пероксида водорода (30%-ный), индиго-кармина, хлорида железа III (0,5 н.), пероксодисульфата аммония (0,5 н.).

Опыт 1. Гомогенный катализ

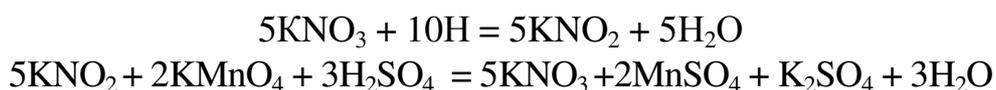
а) Каталитическое действие иона NO_3^- на восстановление перманганата калия водородом. Проследите ускорение реакции восстановления перманганата калия атомарным водородом в присутствии иона NO_3^- :



Внесите в три пробирки по 5–6 капель 0,1 н. раствора перманганата калия и по 3–4 капли 4 н. раствора серной кислоты. Обратите внимание на цвет раствора.

В первую пробирку добавьте одну каплю 0,5 н. раствора нитрата калия KNO_3 . В первую и вторую пробирки бросьте по кусочку цинка, третью оставьте в качестве эталона. В какой пробирке быстрее обесцветился раствор?

Каталитическое действие иона NO_3^- объясняется следующим образом. Написанная выше суммарная реакция идет очень медленно. Значительно быстрее протекают две сопряженные реакции: восстановление нитрата калия до нитрита атомарным водородом и окисление образовавшегося нитрита калия обратно в нитрат перманганатом в кислой среде

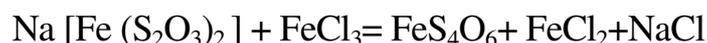


Таким образом, нитрат калия участвовал в образовании промежуточного продукта нитрита, но в конце реакции вновь регенерировался.

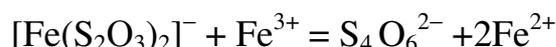
б) Каталитическое влияние иона меди (II) на взаимодействие хлорида железа (III) с дитиосульфат (III) феррат ионом. Смешайте в пробирке одну каплю раствора сульфата меди (II) с 15 каплями воды. В одно углубление фарфоровой (или стеклянной) пластинки поместите каплю приготовленного раствора, содержащего ионы Cu^{2+} , в другое – каплю дистиллированной воды (так называемый «холостой» опыт для сравнения). К каждой капле прибавьте по капле хлорида железа FeCl_3 и затем по капле 0,3 н. раствора тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Перемешайте растворы стеклянными палочками. В обоих ли углублениях появилось интенсивное фиолетовое окрашивание раствора вследствие образования комплексного иона железа (III) $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^-$ по уравнению



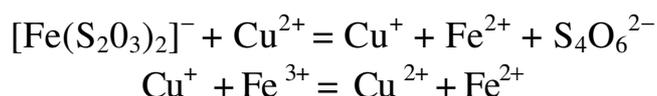
Медленное обесцвечивание фиолетового раствора в холостом опыте является следствием медленного окисления образовавшегося комплексного иона имеющимися в растворе ионами Fe^{3+} до бесцветного тетратионата железа (II) по уравнению



или в ионном виде:



Практически мгновенное обесцвечивание раствора в присутствии ионов меди (II) (даже следов) обусловлено двумя сопряженными реакциями:



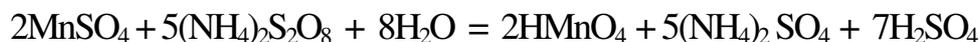
Просуммируйте уравнения двух последних реакций и убедитесь, что при этом получается исходное уравнение. Но окисление комплексного иона $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^-$ ионом Cu^{2+} и последующее обратное окисление образовавшегося иона Cu^+ до Cu^{2+} ионами Fe^{3+} протекает значительно быстрее, чем суммарная реакция.

в) Каталитическое ускорение окисления марганца (II) до марганца (VII). Окисление соединений марганца (II) до марганца (VII) в растворе легко наблюдать, так как ион Mn^{2+} практически бесцветный, а ион MnO_4^- (в котором марганец имеет степень окисления +7) окрашен в фиолетово-красный цвет.

Внесите в две пробирки по 3–4 капли сульфата марганца MnSO_4 или нитрата $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ (но не MnCl_2 , так как ионы хлора мешают проведению реакции) и подкислите таким же объемом 2 н. раствора азотной кислоты.

В одну из пробирок добавьте одну каплю раствора нитрата серебра AgNO_3 и в обе пробирки по одному микрошпателью кристаллического пероксодисульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Поместите обе пробирки в водяную баню. В какой пробирке быстрее изменилась окраска? Реакция протекала по уравнению



Азотная кислота на реакцию не расходовалась и добавлялась для создания определенной кислотности среды в начале реакции. В качестве промежуточных быстро протекающих процессов происходило восстановление иона серебра марганцем (II) и обратное окисление серебра пероксодисульфатом аммония. Какой ион являлся катализатором в данном процессе?

Опыт 2. Гетерогенный катализ

а) Каталитическое ускорение реакции разложения бертолетовой соли. В сухую цилиндрическую пробирку поместите один микрошпатель диоксида свинца PbO_2 , нагрейте пробирку, внесите в нее тлеющую лучинку и убедитесь, что лучинка не вспыхивает. Внесите в другую цилиндрическую пробирку 5–6 микрошпателей бертолетовой соли $KClO_3$, закрепите пробирку наклонно в штативе, расплавьте соль, нагревая пробирку пламенем горелки. Убедитесь, что поднесенная к пробирке тлеющая лучинка тоже не вспыхивает.

Внесите в пробирку с бертолетовой солью микрошпатель порошка диоксида свинца. Наблюдайте бурное выделение газа. Внесите в пробирку тлеющую лучинку и убедитесь, что выделяется кислород. Напишите уравнение реакции разложения бертолетовой соли. Чем является диоксид свинца в данной реакции?

б) Каталитическое действие воды (Опыт проводить под тягой!). Смешайте в фарфоровой чашечке два микрошпателя порошка алюминия и один микрошпатель кристаллического йода.

Протекает ли реакция между алюминием и йодом? На полученную смесь капните маленькую каплю воды. Наблюдайте бурную реакцию образования йодида алюминия, сопровождающуюся большим выделением тепла, за счет которого происходит возгонка непрореагировавшего йода – появляются пары фиолетового цвета.

в) Каталитическое действие диоксида свинца на разложение пероксида водорода. Возьмите в пробирку 5 – 8 капель пероксида водорода H_2O_2 . Выделяется ли из раствора газ? Внесите в раствор микрошпатель диоксида свинца PbO_2 и наблюдайте выделение кислорода. Напишите уравнение реакции разложения пероксида водорода на кислород и воду.

Опыт 3. Сравнение активности различных катализаторов

Проследите каталитическое действие нескольких катализаторов на скорость реакции разложения пероксида водорода по скорости

обесцвечивания индигокармина вследствие его окисления выделяющимся кислородом



Налейте в четыре пробирки по 10 капель раствора индигокармина. В первую пробирку прибавьте в качестве катализатора два микрошпателя диоксида марганца MnO_2 , во вторую – два микрошпателя диоксида кремния SiO_2 , в третью – 3–4 капли раствора хлорида железа FeCl_3 . Четвертую оставьте в качестве эталона. Приготовьте в четырех других пробирках по десять капель 30%-ного раствора пероксида водорода H_2O_2 и быстро перелейте их в каждую из пробирок с красителем. Заметьте время и, встряхнув каждую пробирку, проследите за обесцвечиванием красителя.

Запишите, через какой промежуток времени обесцвечивается краситель в каждой из четырех пробирок, и сделайте вывод о сравнительном каталитическом действии взятых катализаторов. Укажите, гомогенный или гетерогенный катализ имел место в каждом случае.

Опыт 4. Автокатализ

Автокатализом называют процесс изменения скорости химической реакции, при которой катализатор не вводится извне, а является одним из продуктов данной реакции.

а) Каталитическое действие диоксида азота на растворение меди в азотной кислоте. В трех пробирках приготовьте смеси растворов: 1) 10 капель воды + 1 капля 1 н. раствора NaNO_2 ; 2) 10 капель 2 н. HNO_3 + 1 капля воды; 3) 10 капель 2 н. HNO_3 + 1 капля 1 н. раствора NaNO_2 .

Бросьте в каждую пробирку по кусочку зачищенной медной проволоки или листовой меди. Во всех ли пробирках началась реакция? Что представляет собой бурый газ, выделяющийся там, где протекает реакция?

Добавьте в первую и третью пробирки по одной капле 1 н. H_2SO_4 . Началась ли реакция взаимодействия в первой пробирке? Изменилась ли интенсивность реакции в третьей пробирке?

Взаимодействие меди с азотной кислотой во второй и третьей пробирках протекает по уравнению



Малая скорость реакции в начале процесса во второй пробирке постепенно увеличивается по мере образования NO_2 .

Взаимодействие NaNO_2 с сильными кислотами приводит к образованию непрочной азотистой кислоты, распадающейся на воду и оксиды азота:



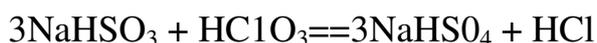
Объясните интенсивное протекание реакции с самого начала опыта в третьей пробирке.

б) Автокаталитическое ускорение взаимодействия бертолетовой соли с гидросульфитом натрия. Поместите в пробирку 2–3 микрошпателя кристаллического хлората калия KClO_3 (бертолетова соль) и 5–6 капель насыщенного раствора гидросульфита натрия NaHSO_3 . Осторожно встряхивайте пробирку и наблюдайте через несколько секунд выделение единичных пузырьков газа, а через 1–2 мин – бурную реакцию взаимодействия бертолетовой соли с гидросульфитом натрия.

Самоускорение реакции объясняется следующим образом. Вначале очень медленно протекает обменная реакция вытеснения HClO_3 из бертолетовой соли:

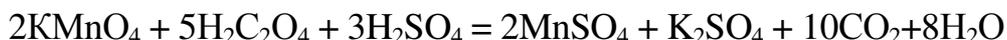


Образовавшаяся хлорноватая кислота взаимодействует с избытком гидросульфита натрия, окисляя его до гидросульфата:

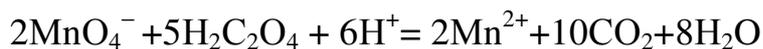


Образование NaHSO_4 повышает кислотность среды, что вызывает ускорение реакции, а повышение концентрации HClO_3 еще больше ускоряет процесс и т. д.

в) Автокаталитическое действие ионов Mn^{2+} на реакцию восстановления перманганата калия щавелевой кислотой. В две пробирки внесите по две капли растворов: перманганата калия, 2 н. серной кислоты и насыщенного раствора щавелевой кислоты $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. В одну из пробирок добавьте 2–4 капли раствора сульфата марганца MnSO_4 . В какой пробирке идет быстрее реакция



или в ионном виде:



Проследите в течение 2–3 мин за изменением скорости реакции в другой пробирке, в которую не добавляли сульфата марганца.

Почему в этой пробирке происходит самоускорение реакции? По какому признаку вы это определили?

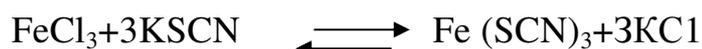
Работа 11. Химическое равновесие и его смещение

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Два стакана на 300 – 400 мл. Прибор для получения двуокиси азота. U-образная трубка. Нитрат свинца кристаллический. Хлорид железа (III) кристаллический. Роданид калия кристаллический. Хлорид калия кристаллический. Растворы: хлорида железа III (0,0025 н.), роданида калия (0,0025 н.).

Опыт 1. Влияние изменения концентрации на смещение равновесия

В четыре конические пробирки внесите по 5–10 капель разбавленных растворов хлорида железа FeCl_3 и роданида калия KSCN или аммония NH_4SCN . Легким встряхиванием пробирок размешайте растворы. Все пробирки поставьте в штатив. Одну пробирку с раствором сохраните в качестве контрольной для сравнения.

В растворе, имеет место обратимая реакция



Роданид железа $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ сообщает раствору красную окраску. По изменению интенсивности окраски можно судить об изменении концентрации $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, т. е. о смещении равновесия в ту или другую сторону.

В одну из пробирок микрошпателем добавьте маленький кристалл хлорида железа, в другую – кристалл роданида калия и в третью – несколько кристаллов (2–3 микрошпателя) хлорида калия. Растворы во всех пробирках размешайте энергичным встряхиванием или стеклянной палочкой и отметьте изменение интенсивности окраски в каждом случае. (Сравните с раствором в контрольной пробирке.)

Напишите выражение константы равновесия данного обратимого процесса.

В каком направлении смещается равновесие и как изменяется концентрация каждого компонента по сравнению с их концентрацией при

установлении первоначального равновесия в случае добавления:
а) хлорида железа, б) роданида калия, в) хлорида калия?

Опыт 2. Влияние изменение температуры на смещение равновесия

Реакция полимеризации двуокиси азота протекает по уравнению



Газ NO_2 темно-бурого цвета, N_2O_4 – бледно-желтый, почти бесцветный. Поэтому по изменению окраски газовой смеси можно судить об изменении концентрации ее компонентов, т. е. смещении равновесия в сторону прямой или обратной реакции.

U-образную трубку с двумя хорошо подобранными резиновыми пробками наполните диоксидом азота, который получите разложением нитрата свинца. Реакция протекает по уравнению



(Разложение проводить в вытяжном шкафу.) Оба конца U-образной трубки плотно закройте резиновыми пробками и, перевернув ее концами вниз, поместите одно колено трубки в стакан с горячей водой, другое – в стакан с ледяной водой (холодную и горячую воду приготовьте заранее).

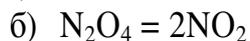
Наблюдайте уменьшение интенсивности бурой окраски в том колене, которое находится в холодной воде, и усиление в колене, находящемся в горячей воде. Выньте трубку из стаканов, и то колено, которое было в холодной, опустите в горячую воду, а колено из горячей воды – в холодную, через 2–3 мин выньте трубку из стаканов и отметьте изменение окраски в каждом колене. В каком направлении происходит смещение равновесия оксидов азота при нагревании и охлаждении? Объясните смещение равновесия на основании правила Вант-Гоффа и принципа Ле-Шателье.

Контрольные вопросы и задачи

1. Напишите математическое выражение закона действия масс для реакции



2. Напишите математическое выражение скорости гомогенных реакций:



3. Чему равна константа скорости химической реакции в уравнении $v = K([A][B])$? Каков физический смысл этой величины?

4. Напишите выражение для скорости прямой и обратной реакции каждого из следующих процессов:



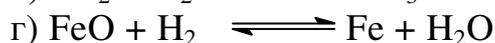
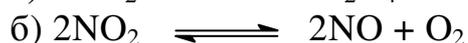
Вычислите, во сколько раз увеличатся или уменьшатся скорости этих реакций, если при неизменной температуре: а) уменьшить концентрацию каждого вещества в два раза; б) увеличить давление в три раза.

5. Что такое катализ? Роль катализатора?

6. Какой катализ называется гомогенным? Гетерогенным? Ответ проиллюстрируйте примерами.

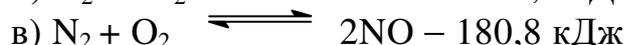
7. При производстве серной кислоты контактным способом в контактном аппарате, наполненном платинированным асбестом, получают SO_3 из SO_2 и кислорода. Какова роль платины в этом процессе? Гомогенный или гетерогенный катализ имеет место в данном случае?

8. Напишите выражение для константы равновесия для каждого из следующих процессов:



Как сместится равновесие в каждом из указанных случаев при увеличении давления?

9. В каком направлении сместится равновесие при повышении температуры в следующих реакциях:



Растворы

Работа 12. Общие свойства растворов

Приборы и реактивы. Пробирки. Колбы конические (на 200 *мл*). Мерные цилиндры на 10, 100 и 200 *мл*. Набор ареометров. Колбы мерные на 50 и 100 *мл*. Кристаллизатор. Стаканы (на 50 и 100 *мл*). Стекло часовое. Воронка. Палочка стеклянная. Бюретка (на 25 *мл*). Фарфоровая чашка. Водяная баня. Прибор для наблюдения осмоса. Прибор для определения температуры замерзания раствора. Секундомер. Термометры (на 100°C, от –10 до 0°C с ценой деления 0,01°). Сахар. Нитрат калия. Роданид калия. Сульфат натрия (безводный и кристаллический $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Нитрат аммония. Хлорид натрия. Сульфат калия-хрома (III) (хром-калиевые квасцы). Тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Ацетат натрия $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Хлорид бария $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Дихромат калия. Сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Спирт этиловый. Коллодий. Лед. Растворы: серной кислоты (10%-ный), ацетата кальция (насыщенный).

Опыт 1. Изменение объема при растворении

а) Растворение сахара в воде. В конической колбе на 200 *мл* приготовьте раствор 20 *г* сахара в 100 *мл* воды. Затем перелейте полученный раствор в мензурку и определите его объем. Отличается ли объем раствора от объема взятой воды?

б) Растворение спирта в воде. В один мерный цилиндр на 10 *мл* налейте 5 *мл* воды, в другой – 5 *мл* этилового спирта. В цилиндр с водой перелейте спирт из второго цилиндра, перемешайте смесь палочкой и снова отметьте уровень. Сравните объем полученного раствора с суммой первоначальных объемов воды и спирта.

в) Приготовление 5%-ного раствора дихромата калия растворением сухого вещества. Рассчитайте, сколько сухого дихромата калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и воды надо для приготовления 100 *г* 5%-ного раствора. Взвесьте необходимое количество соли на техномических весах (на часовом стекле). Отмерьте нужное количество воды мензуркой. Перенесите соль в стаканчик на 100 *мл*, затем обмойте туда же часовое стекло водой из мензурки и перелейте в стаканчик остаток воды. Размешайте раствор стеклянной палочкой и налейте в мерный цилиндр на 100 *мл* до $\frac{4}{5}$ его объема. Определите плотность приготовленного раствора ареометром (рис. 2.10). Найдите в табл. 2.6 по плотности процентную концентрацию приготовленного раствора и определите ее отклонение от заданной. Вычислите

молярность и нормальность приготовленного раствора дихромата калия.

г) **Приготовление 0,1 М и 0,1 н. раствора хлорида бария растворением кристаллогидрата.** Рассчитайте, сколько граммов хлорида бария $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ требуется для приготовления 50 мл 0,1 М или 0,1 н. раствора (по указанию преподавателя) BaCl_2 . Проверьте расчет у преподавателя.

Отвесьте необходимое количество соли на технохимических весах (на часовом стекле). Вставьте в мерную колбу на 50 мл воронку, пересыпьте в нее навеску соли и обмойте часовое стекло дистиллированной водой из промывалки. Перемешайте раствор до полного растворения соли, добавляя небольшими порциями воду из промывалки. Затем добавьте воду до метки на шейке мерной колбы (нижний уровень мениска жидкости должен касаться метки). Закройте колбу пробкой и перемешайте раствор, переворачивая колбу несколько раз вверх дном. Приготовленный раствор сдайте лаборанту.

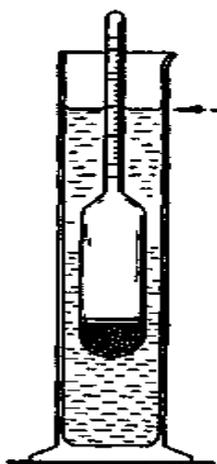


Рис. 2.10. Определение плотности жидкости ареометром

Т а б л и ц а 2.6

Плотность водных растворов $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Концентрация раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, %	Плотность, г/см^3	Концентрация раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, %	Плотность, г/см^3
1	1,0052	6	1,0408
2	1,0122	7	1,0481
3	1,0193	8	1,0554
4	1,0264	9	1,0628
5	1,0336	10	1,0703

д) Приготовление 1 М и 1 н. раствора серной кислоты разбавлением более концентрированного раствора. Налейте имеющуюся в лаборатории приблизительно 10%-ную серную кислоту в цилиндр, измерьте ее плотность ареометром и определите по таблицам точную процентную концентрацию. Рассчитайте, какой объем кислоты надо взять для приготовления 100 мл 1 М или 1 н. раствора. Проверьте свой расчет у преподавателя.

Отмерьте этот объем мензуркой. В мерную колбу на 100 мл до половины ее объема налейте дистиллированную воду. Введите умеренный объем серной кислоты через воронку и тщательно обмойте воронку водой из промывалки. Перемешайте жидкость в колбе, дожидаясь ее охлаждения до комнатной температуры и введите уровень жидкости до метки, добавляя по каплям воду из промывалки. Закройте колбу пробкой и перемешайте раствор, переворачивая колбу несколько раз вверх дном.

Снова измерьте плотность приготовленного раствора ареометром, определите по таблицам процентную концентрацию, пересчитайте ее на молярность или нормальность. Найдите расхождение полученной концентрации с заданной.

Приготовленный раствор сдайте лаборанту.

Опыт 3. Определение растворимости соли

Рассчитайте, сколько дихромата калия нужно для приготовления 50 мл насыщенного при комнатной температуре раствора. Возьмите это количество с избытком в 10%. Взвешивание производите на теххимических весах. В стакане на 100 мл растворите навеску соли в 50 мл воды, нагрейте раствор горелкой на асбестированной сетке до полного растворения соли и охладите до комнатной температуры.

Почему выпадают кристаллы соли?

Дайте раствору отстояться и слейте часть жидкости с кристаллов в другой стакан на 100 мл (следите, чтобы при переливании во второй стакан не попали кристаллы!), измерьте температуру раствора.

Вымытую водой бюретку на 25 мл сполосните два раза полученным раствором (зачем?), закрепите ее в штативе, наполните раствором и установите уровень раствора на нулевое деление. Небольшую фарфоровую чашку взвесьте на теххимических весах с точностью до 0,2 г. Налейте в нее точно 10 мл раствора из бюретки. Взвесьте чашку с раствором. Выпарите раствор досуха сначала на водяной бане, а затем в сушильном шкафу при 150°C (около 20 мин). Снова взвесьте чашку с сухой солью.

Из полученных данных рассчитайте: 1) массу соли, насыщающей при данной температуре 100 г воды, 2) массу соли, насыщающей при

данной температуре 100 г раствора, 3) массу соли, насыщающей при данной температуре 1 л раствора.

Что называется растворимостью (или коэффициентом растворимости) вещества?

Опыт 4. Приготовление пересыщенных растворов

а) Приготовление пересыщенного раствора тиосульфата натрия.

Наполните пробирку на 1/4 ее объема кристаллическим тиосульфатом натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и медленно нагрейте до расплавления.

Закрепите пробирку вертикально в штативе, закройте ее ваткой и дайте охладиться. По достижении комнатной температуры выньте пробирку из штатива и резко встряхните. Что наблюдается? Снова получите нагреванием прозрачный раствор, охладите и бросьте в пробирку кристаллик тиосульфата натрия. Что произошло с раствором?

б) Приготовление пересыщенного раствора сульфата меди.

Рассчитайте, сколько медного купороса $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ надо взять для приготовления 20 мл насыщенного при 50°C раствора.

Взвесьте это количество соли, растворите его в соответствующем количестве воды, нагрейте раствор до кипения и быстро отфильтруйте через складчатый фильтр в коническую колбу, находящуюся на водяной бане. Если жидкость в колбе начнет кристаллизоваться, растворите образовавшиеся кристаллы легким нагреванием. Охладите раствор до комнатной температуры (не перемешивая) и закристаллизуйте его, внося кристалл медного купороса.

Что такое коэффициент растворимости? Какие растворы называются насыщенными и пересыщенными?

в) Приготовление пересыщенного раствора ацетата натрия.

Разотрите в фарфоровой ступке кристаллический ацетат натрия $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, наполните этим порошком пробирку на 1/4 ее объема и добавьте две капли воды. Закрепите пробирку в штативе и нагревайте на водяной бане до полного растворения соли. Отставьте горелку, удалите водяную баню и охладите раствор на воздухе. Потрите по внутренней поверхности стенки пробирки стеклянной палочкой и наблюдайте кристаллизацию соли из пересыщенного раствора.

Опыт 5. Явление осмоса

(более подробное изложения материала см. в следующей главе)

Соберите прибор по рис. 2.11. Широкую часть трубки плотно затяните при помощи резинки целлофаном или пленкой коллодия. Налейте в трубку насыщенный раствор сахара и отметьте уровень карандашом на стекле.

Широкую часть трубки поместите в сосуд с водой и через 10–15 мин снова отметьте уровень раствора сахара.

Объясните изменение уровня раствора в трубке. Как осмотическое давление зависит от концентрации растворенного вещества и от температуры?

Опыт 6. Зависимость растворимости веществ от температуры

Поместите в пробирку 3 мл воды и 2 г сульфата калия-хрома (III) (хромо-калиевых квасцов) $K_2SO_4 \cdot Cr_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$. Перемешайте содержимое пробирки стеклянной палочкой. Растворяется ли соль? Нагрейте пробирку. Что наблюдается при нагревании и при последующем охлаждении пробирки?

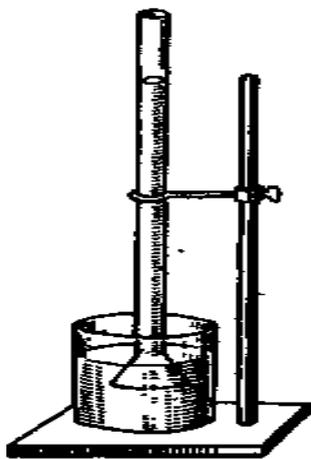


Рис. 2.11. Прибор для наблюдения осмоса

Аналогичный опыт проделайте с хлоридом натрия. Заметно ли различие в поведении двух солей?

Налейте в сухую пробирку 3 мл насыщенного раствора ацетата кальция. Нагрейте его, затем охладите пробирку под струей воды. Что наблюдается?

Опыт 7. Тепловой эффект растворения

Рассчитайте количества следующих солей, нужные для приготовления 50 мл децимолярных растворов: роданида калия, нитрата аммония, безводного сульфата натрия, декагидрата сульфата натрия $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ (глауберовой соли). Налейте в стаканчик на 100 мл 50 мл воды, измерьте температуру термометром. Затем всыпьте соль, размешайте ее стеклянной палочкой и снова определите температуру. Как изменилась температура?

Проделайте этот опыт со всеми названными солями. Пользуясь таблицами начертите кривые растворимости солей. Какова связь между тепловым эффектом растворения вещества и изменением его растворимости с температурой? Как можно это объяснить, применяя принцип Ле-Шателье?

Опыт 8. Определение температуры замерзания раствора

Соберите прибор по рис. 2.12 Пробирку закройте пробкой с термометром 3 (от -10°C с ценой деления $0,01^{\circ}$) и мешалкой 4. В стакан 5 поместите кусочки льда, немного воды и поваренную соль. Перемешайте эту охлаждающую смесь и добавляйте соль, пока температура смеси не понизится приблизительно до $-2, -4^{\circ}\text{C}$. Налейте в пробирку 1 дистиллированную воду до половины ее объема и записывайте показания термометра через каждые 10 сек.

Начертите кривую зависимости температуры от времени и по остановке кривой определите точку замерзания воды в условиях данного опыта.

После этого определите температуру замерзания двух растворов сахара в воде: 0,5-моляльного и 1-моляльного. Для этого взвесьте сухую пробирку 1 на технoхимических весах (рис. 2.12), затем налейте в нее воду до половины объема и снова взвесьте. Рассчитайте, какое количество сахара $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ надо добавить к данному количеству воды для приготовления 0,5-моляльного или 1-моляльного растворов.

Взвесьте сахар и всыпьте его в воду (сахар не должен попасть на стенки пробирки). Поместите пробирку в прибор и определите температуру замерзания раствора таким же способом, как это делалось при определении температуры замерзания воды.

Проделайте опыт сначала с 0,5-моляльным, потом с 1-моляльным раствором.

Начертите кривую зависимости температуры от времени. Как изменяется температура замерзания для раствора сахара по сравнению с чистой водой? Как зависит понижение температуры замерзания раствора от его концентрации? Как называется понижение температуры замерзания в одномоляльном растворе данного растворителя? Почему температура замерзания раствора ниже, чем температура замерзания чистого растворителя?

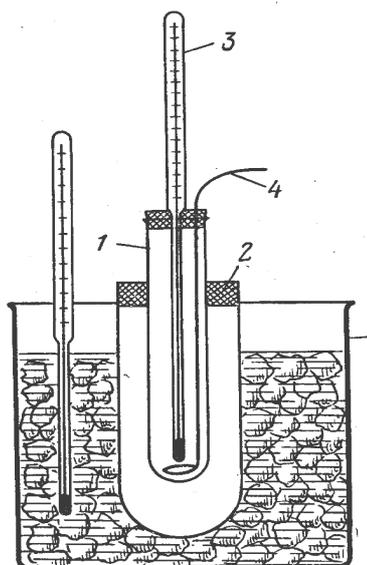


Рис. 2.12. Прибор для определения температуры замерзания раствора: 1 – пробирка с исследуемым раствором; 2 – пробирка-термостат; 3 – термометр; 4 – мешалка; 5 – стакан

Работа 13. Электролитическая диссоциация

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Прибор для определения электропроводности растворов. Стаканы на 50 мл. Сахар (порошок). Поваренная соль кристаллическая. Ацетат натрия. Хлорид аммония. Цинк гранулированный. Индикаторы: лакмусовая бумага, спиртовой раствор фенолфталеина, метиловый оранжевый. Спирт метиловый. Глюкоза. Оксид кальция. Оксид фосфора (V). Растворы: соляной кислоты (2 и 0,1 н.), серной кислоты (2 и 4 н., 1 : 1), уксусной кислоты (2 и 0,1 н., концентрированный), едкого натра (2 и 4 н.), хлорида железа III (0,5 н.), сульфата меди (II) (0,5 н.), хлорида магния (0,5 н.), сульфата натрия (0,5 н.), силиката натрия (0,5 н.), хлорида бария (0,5 н.), хлорида кальция (0,5 н.), нитрата серебра (0,1 н.), йодида калия (0,1 н.), карбоната натрия (0,5 н.), хлорида аммония (0,5 н.), перманганата калия (0,5 н.), сульфата калия (0,5 н.), хлорида алюминия (0,5 н.), хлорида цинка (0,5 н.), аммиака (0,1 н.), ацетата натрия (2 н.).

Опыт 1. Экспериментальные наблюдения электролитической диссоциации

а) **Электропроводность водных растворов кислот, солей и оснований.** Ламповый реостат (рис.2.13.) со свободными покрытыми изоляцией проводами 1 и 2 включите в сеть постоянного тока. Взяв в руки

изолированные провода соедините между собой их зачищенные концы. Если лампочка загорелась, то реостат исправлен.

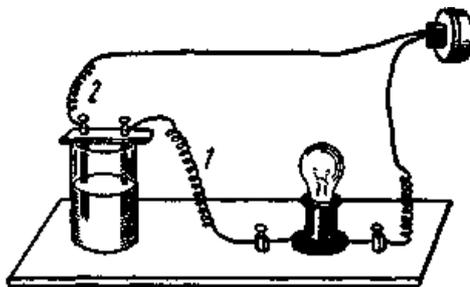


Рис. 2.13. Прибор для определения электропроводности раствора

Выньте вилку из штепселя. стакан емкостью 50 мл наполните на $\frac{1}{2}$ его объема дистиллированной водой и накройте крышкой с укрепленными в ней графитовыми электродами, которые должны быть частично погружены в воду, но не касаться дна стакана. Поставьте стакан на подставку прибора, присоедините зачищенные концы проводов к электродам, как указано на рис. 2.13, и снова включите прибор в сеть. Загорается ли лампочка? Проводит ли электрический ток дистиллированная вода?

Приподняв крышку с электродами, внесите в стакан с водой 4 – 5 микрошпателей мелко растертого сахара, размешайте стеклянной палочкой и опустите электроды в раствор. Загорелась ли лампочка? Является ли сахар электролитом?

Снова приподнимите крышку, внесите в тот же стакан 4 – 5 микрошпателей поваренной соли, размешайте и опустите электроды в раствор. Проводит ли раствор поваренной соли электрический ток?

Отключите прибор от электрической сети.

Выньте электроды, опустите их в стакан с дистиллированной водой, промойте и вытрите фильтровальной бумагой. В сухой чистый стакан насыпьте сухой поваренной соли, накройте крышкой с электродами так, чтобы электроды соприкасались с солью. Загорается ли лампочка? Объясните, почему водный раствор поваренной соли является проводником электрического тока, хотя дистиллированная вода и сухая соль в отдельности ток не проводят. К электролитам или к неэлектролитам относится поваренная соль? Напишите уравнение ее диссоциации.

Испытайте аналогичным образом электропроводность 0,1 н. растворов серной кислоты, гидроксида натрия NaOH, метилового спирта CH_3OH , сульфата меди (медного купороса), глюкозы, гидроксида аммония NH_4OH , уксусной кислоты CH_3COOH , наливая каждый из перечисленных растворов в отдельный стакан емкостью 50 мл на $\frac{1}{2}$ его объема. Промывайте электроды после каждого испытания дистиллированной

водой. Какие из испытанных вами веществ являются электролитами? Напишите уравнения диссоциации каждого из них.

По интенсивности загорания электрической лампочки отметите сильные и слабые электролиты. К сильным или слабым электролитам относятся гидроксид аммония и уксусная кислота? Слейте их в один стакан и снова опустите электроды. Изменилась ли яркость свечения лампочки? К сильным или слабым электролитам относится полученная при сливании растворов соль ацетат аммония $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$?

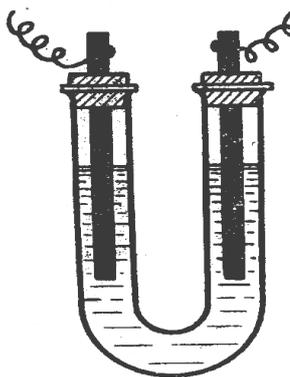


Рис. 2.14. Прибор для определения движения ионов

Сделайте общий вывод: сильными или слабыми электролитами являются кислоты? основания? соли? Чем измеряется сила электролита? Укажите условные значения степени и константы диссоциации для сильных, слабых и средней силы электролитов.

б) Наблюдение движения ионов в растворах электролитов. В прибор, показанный на рис. 2.14, налейте на высоту 2–3 см раствор перманганата калия KMnO_4 , затем осторожно, по стенке, чтобы растворы не перемешались, долейте раствор нитрата калия. Включите прибор в сеть постоянного тока и наблюдайте в одном колене прибора проникновение розового раствора в бесцветный слой раствора нитрата калия. Напишите уравнение диссоциации перманганата калия. Какой ион окрашивает раствор перманганата калия в фиолетово-красный цвет? Каков заряд этого иона, и к какому электроду он движется: к катоду или к аноду?

Аналогичный опыт можно проделать с растворами медного купороса $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, поверх которого налить раствор сульфата калия K_2SO_4 . Какой ион будет подниматься вверх? К катоду или к аноду он движется?

в) Сравнение химической активности соляной и уксусной кислот. Налейте в одну пробирку на $\frac{1}{3}$ ее объема 2 н. раствор уксусной кислоты, в другую – столько же 2 н. раствора соляной кислоты. В обе пробирки бросьте по кусочку цинка (по возможности одинакового размера). Какой газ

выделяется в пробирках? В какой пробирке процесс идет более энергично? Напишите уравнения протекающих реакций. От концентрации каких ионов в растворе зависит скорость выделения водорода?

Учитывая, что для опыта взяты растворы соляной и уксусной кислот одинаковой общей концентрации (2 н.), решите, в растворе какой из них концентрация ионов водорода выше, т. е. какая кислота сильнее. Сравните ваши выводы с табличными данными, характеризующими количественно степень диссоциации соляной и уксусной кислот.

Опыт 2. Определение изотонического коэффициента и кажущейся степени диссоциации хлорида натрия криоскопическим методом

Приготовьте в кристаллизаторе 1 около 250 г (рис. 2.15) охлаждающей смеси из воды, мелких кусочков льда и поваренной соли. В стакан 2 на 200 мл налейте 100 мл дистиллированной воды, поместите стакан в охлаждающую смесь и накройте крышкой с отверстием для термометра 3 и мешалки 4. Термометр с делениями на $0,1^{\circ}\text{C}$ прикрепите к кольцу штатива и опустите в стакан так, чтобы шарик с ртутью был погружен в воду.

Перемещая мешалку вверх и вниз, наблюдайте за понижением температуры воды в стакане.

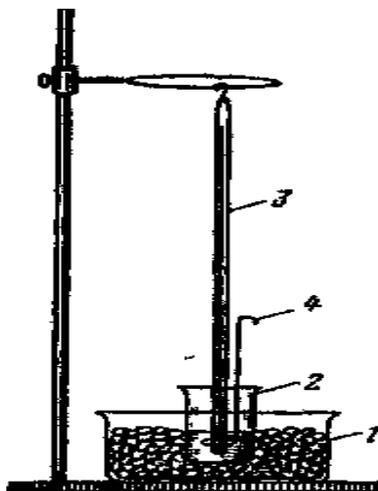


Рис. 2.15. Упрощенный криоскоп: 1 – кристаллизатор; 2 – стакан; 3 – термометр; 4 – мешалка

Отметьте температуру появления первых кристаллов льда (t_1), являющуюся температурой замерзания воды в условиях данного опыта.

Выньте стакан с водой из кристаллизатора, всыпьте в него 10 г предварительно высушенного хлорида натрия и перемешайте раствор до

полного растворения соли. После этого поместите стакан с раствором в охлаждающую смесь, опустите в него термометр и, перемешивая раствор мешалкой, снова следите за понижением температуры. Отметьте температуру, при которой появятся первые кристаллы льда, т. е. температуру замерзания раствора t_2

Запись экспериментальных данных

Масса хлорида натрия	m_1
Масса воды (растворителя)	m_2
Молярная концентрация раствора	C
Температура замерзания воды, °С	t_1
Температура замерзания раствора, °С	t_2
Наблюдаемая депрессия	$\Delta t = t_2 - t_1$

По закону Рауля вычислите депрессию $\Delta t_{\text{теор}}$ (понижение температуры замерзания раствора по сравнению с водой) неэлектролита с молярной концентрацией c , равной концентрации исследованного раствора хлорида натрия. Криоскопическая константа $K_{\text{кр}}$ равна $1,86^\circ\text{C}$. Определите изотонический коэффициент Вант-Гоффа

$$I = \Delta t_{\text{набл.}} / \Delta t_{\text{выч.}}$$

а также кажущуюся степень диссоциации α хлорида натрия. Почему коэффициент Вант-Гоффа для NaCl не равен 2? Что такое кажущаяся степень диссоциации?

Опыт 3. Смещение равновесия диссоциации слабого электролита

а) Влияние разбавления раствора на степень электролитической диссоциации. В стакан на 50 мл налейте 25 мл концентрированной уксусной кислоты, измеренной мензуркой, и накройте стакан крышкой с укрепленными в ней графитовыми электродами. Подключите электроды в электрическую сеть постоянного тока последовательно с ламповым реостатом (см. рис.2.13.). Хорошо ли проводит ток концентрированная уксусная кислота? Отлейте 5 мл кислоты из стакана обратно в мензурку, добавьте дистиллированной воды до 25 мл и вылейте полученный раствор во второй стакан емкостью 50 мл. Измерьте проводимость электрического тока через разбавленный в пять раз раствор уксусной кислоты. Разбавьте полученный раствор еще в 5 раз и повторите определение проводимости получаемых растворов. Наблюдайте усиление свечения лампочки при разбавлении растворов. В какую сторону сместилось равновесие диссоциации уксусной кислоты? Как зависит степень диссоциации от

разбавления раствора? Объясните наблюдаемое явление, написав выражение константы диссоциации уксусной кислоты.

б) Влияние добавления соли слабой кислоты на степень диссоциации этой кислоты. В две пробирки внесите по 5 – 7 капель 0,1 н. раствора уксусной кислоты. В каждую пробирку добавьте по одной капле метилового оранжевого. Как окрасился индикатор под влиянием ионов H^+ ? Одну пробирку с уксусной кислотой оставьте в качестве контрольной, в другую добавьте 2 – 3 микрошпателя сухой соли ацетата натрия CH_3COONa . Перемешайте раствор стеклянной палочкой и сравните цвет полученного раствора с цветом раствора в контрольной пробирке. Напишите уравнение диссоциации уксусной кислоты и выражение константы ее диссоциации. Объясните, как смещается равновесие диссоциации уксусной кислоты при добавлении к ней ацетатных ионов CH_3COO^- из соли. Как меняются при этом степень диссоциации уксусной кислоты и концентрация ионов H^+ .

Увеличится или уменьшится степень диссоциации уксусной кислоты от добавления к ней сильной кислоты?

в) Влияние добавления соли слабого основания на степень диссоциации этого основания. Внесите в две пробирки по 5–7 капель 0,1 н. раствора аммиака. В каждую пробирку прибавьте по одной капле фенолфталеина. Как окрашивается фенолфталеин под влиянием гидроксидных ионов OH^- , имеющихся в растворе?

Одну пробирку с раствором аммиака оставьте в качестве контрольной, в другую добавьте 2–3 шпателя хлорида аммония. Перемешайте раствор стеклянной палочкой и сравните цвет полученного раствора с окраской раствора в контрольной пробирке. На увеличение или уменьшение концентрации ионов OH^- указывает изменение окраски раствора? Напишите уравнение диссоциации гидроксида аммония NH_4OH . Объясните смещение равновесия диссоциации при добавлении к раствору хлорида аммония. Увеличилась или уменьшилась при этом степень диссоциации гидроксида аммония?

Опыт 4. Направление обменных ионных процессов в растворах электролитов

а) Образование малорастворимых веществ. В три пробирки внесите по 2–3 капли следующих растворов: в первую – хлорида железа $FeCl_3$, во вторую – силиката натрия Na_2SiO_3 , в третью – разбавленной серной кислоты H_2SO_4 . Добавьте в них по такому же количеству растворов: в первую пробирку – едкого натра, во вторую – соляной кислоты, в третью – хлорида бария. Наблю-

дайте в первом случае выпадение осадка гидроксида железа, во втором – метакремниевой кислоты, в третьем – сульфата бария.

Напишите в молекулярном и ионном виде уравнения протекающих реакций, направленных в сторону образования малорастворимых веществ.

б) Образование слабых кислот и оснований. В две пробирки внесите по 5–7 капель: в первую – раствора ацетата натрия NaCH_3COO , во вторую – хлорида аммония. Добавьте в первую пробирку несколько капель серной кислоты (1:1), перемешайте раствор стеклянной палочкой и слегка подогрейте.

Определите по запаху, что реакция протекала в сторону образования слабой уксусной кислоты. Напишите молекулярное и ионное уравнения реакций. Во вторую пробирку добавьте 4 н. раствора щелочи и подогрейте раствор. Определите по запаху выделение аммиака. Напишите молекулярное и ионное уравнения реакции, протекающей в сторону образования слабого основания NH_4OH , и уравнение его распада на аммиак и воду.

в) Реакции нейтрализации. Возьмите в две пробирки по 5 – 7 капель 2 н. раствора щелочи и добавьте по одной капле фенолфталеина. Под влиянием каких ионов фенолфталеин окрасился в красный цвет? В одну пробирку добавляйте по каплям 2 н. раствор соляной или серной кислоты, во вторую – 2 н. раствор уксусной кислоты до обесцвечивания раствора. Чем объясняется исчезновение гидроксид-ионов при добавлении кислоты? В каком случае обесцвечивание раствора наступило быстрее?

Напишите молекулярные и ионные уравнения реакций нейтрализации щелочи соляной и уксусной кислотами. Почему равновесие ионного процесса смещается в сторону образования воды при наличии в левой части равенства малодиссоциированных молекул уксусной кислоты?

г) Образование летучих продуктов реакций. Поместите в две пробирки по 5–7 капель раствора соды Na_2CO_3 . Проверьте наличие в растворе иона CO_2 , для чего в одну пробирку добавьте несколько капель хлорида кальция. Какое вещество выпало в осадок? Напишите ионное уравнение реакции.

Добавьте во вторую пробирку несколько капель серной кислоты (1:1) и наблюдайте выделение газа. Подогрейте слегка пробирку, дождитесь конца выделения газа и добавьте несколько капель раствора хлорида кальция. Почему не выпадает осадок CaCO_3 ? Напишите ионное уравнение реакции взаимодействия соды с серной кислотой.

Работа 14. Производство растворимости

Приборы и реактивы. (полумикрометод). Центрифуга. Конические пробирки. Сероводородная вода. Растворы азотной кислоты (2 н.), соляной кислоты (2 н.), уксусной кислоты (2 н.), хлорида натрия (0,5 н.), сульфата натрия (0,5 н.), карбоната натрия (0,5 н.), сульфата меди (0,5 н.), сульфата железа (II) (0,5 н.), сульфата магния (0,5 н.), нитрата свинца (0,5 н.), хромата калия (0,5 н.), хлорида аммония (2 н.), сульфида аммония (0,5 н.), сульфата марганца (0,5 н.), бертолетовой соли (насыщенный), хлорида калия (насыщенный), хлорида натрия (насыщенный).

Опыт 1. Условия выпадения осадка

Внесите в две пробирки по 2–3 капли раствора сульфата марганца (II). В одну из них добавьте такой же объем сероводородной воды, в другую – раствора сульфида аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. В каком случае выпал осадок? Напишите ионное уравнение реакции. В чем заключается условие выпадения осадка по правилу произведения растворимости?

Пользуясь этим правилом, объясните выпадение осадка сульфида марганца в одной из пробирок. Почему в другом случае осадок не выпал?

Опыт 2. Влияние одноименных ионов на выпадение осадка

В две пробирки внесите по 6–8 капель насыщенного раствора хлората калия KClO_3 . В одну пробирку добавьте 3–4 капли насыщенного раствора хлорида калия, в другую хлорида натрия. В каком случае появились блестящие кристаллики хлората калия? Напишите выражение произведения растворимости для хлората калия и объясните, пользуясь правилом произведения растворимости, выпадение осадка KClO_3 в одном случае и его отсутствие в другом. Увеличилась или уменьшилась при этом растворимость хлората калия?

Опыт 3. Зависимость последовательности выпадения осадков малорастворимых веществ от величины их произведения растворимости

В одной пробирке получите осадок сульфата свинца PbSO_4 . Взяв 2–3 капли раствора сульфата натрия, добавьте к ним столько же раствора нитрата свинца (II). В другой пробирке получите осадок хромата свинца PbCrO_4 из хромата калия и нитрата свинца. Заметьте цвет выпавших осадков. В третью пробирку внесите по 3 капли тех же растворов сульфата

натрия и хромата калия, перемешайте раствор и добавьте 2 капли нитрата свинца. Определите по цвету, какое вещество выпало в осадок в первую очередь: PbSO_4 или PbCrO_4 . Найдите величину произведения растворимости каждой из этих солей и объясните последовательность выпадения исследуемых вами солей свинца.

Опыт 4. Условия растворения осадков в результате химического взаимодействия

В двух пробирках получите гидроксид магния, внося в каждую по две капли растворов соли магния и едкого натра. Добавьте в первую пробирку 2 н. раствор соляной кислоты, по каплям, перемешивая содержимое пробирки встряхиванием, отсчитывая число капель, необходимых для полного растворения осадка. Во вторую пробирку добавьте 2 н. раствор хлорида аммония, также встряхивая пробирку и отсчитывая капли, до полного растворения осадка. Результаты отсчета запишите в журнал.

В чем заключается условие растворения осадков по правилу произведения растворимости? Пользуясь этим правилом, объясните растворение гидроксида магния в соляной кислоте и хлориде аммония. В каком случае растворение происходит легче? Почему?

Опыт 5. Влияние величины произведения растворимости электролита на его способность к химическому взаимодействию

В одну пробирку внесите две капли раствора сульфата железа (II), в другую – две капли раствора сульфата меди. В каждую пробирку добавьте по две капли раствора сульфида аммония. Наблюдайте выпадение осадков.

Напишите уравнения реакций получения сульфидов железа и меди. К осадкам сульфидов добавьте по 5–7 капель 2 н. раствора соляной кислоты. Какой из сульфидов растворяется? Объясните, применив правило произведения растворимости, почему один из полученных сульфидов переходит в раствор при взаимодействии с соляной кислотой; напишите ионное уравнение реакции. Почему второй сульфид в HCl не растворяется?

Опыт 6. Получение одних малорастворимых соединений из других

Внесите в пробирку две капли раствора нитрата свинца и три капли раствора сульфата натрия Na_2SO_4 . Осадок какого вещества образовался? Напишите ионное уравнение реакции.

Дайте осадку отстояться или отцентрифугируйте его. Отберите пипеткой жидкую фазу. К осадку добавьте 3–4 капли сульфида аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ и перемешайте стеклянной палочкой. Как изменился цвет осадка? Какое вещество образовалось?

Выпишите из таблиц величины произведений растворимости полученных малорастворимых солей и объясните, пользуясь правилом произведения растворимости, переход одного осадка в другой.

Работа 15. Водородный показатель pH. Индикаторы

Кислотно-основными индикаторами называют химические вещества, имеющие различную окраску при разных концентрациях ионов водорода и гидроксид-ионов, т. е. в кислой, нейтральной и щелочной средах. В большинстве случаев индикаторами являются слабые органические кислоты или основания, недиссоциированные молекулы которых имеют одну окраску, а ионы (анион или катион) – другую. Химический состав индикаторов обычно выражается сложной формулой (например, метиловый оранжевый представляет собой диметиламиноазобензолсульфо кислоту), поэтому равновесие между нейтральной молекулой и ионом удобно рассматривать, выражая состав индикатора так: HInd – кислотный индикатор и IndOH^- – основной индикатор.

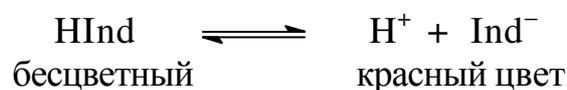
В водном растворе метилового оранжевого, являющегося сравнительно сильной кислотой, равновесие смещено вправо.



В связи с наличием в растворе небольшого количества недиссоциированных молекул индикатора HInd красного цвета и значительно большего количества анионов Ind^- желтого цвета раствор окрашен в желтый (слегка оранжевый) цвет. При добавлении ионов водорода (в кислой среде) равновесие смещается (принцип Ле-Шателье) влево и раствор приобретает красный цвет. При добавлении ионов OH^- (в щелочной среде), связывающих ионы H^+ в еще менее, чем

индикатор, диссоциированные молекулы воды, равновесие смещается вправо и раствор остается желтым.

Соответственно в растворе фенолфталеина, являющегося слабой кислотой, равновесие



смещено влево, поэтому в нейтральной и кислой среде раствор бесцветен, в щелочной среде окрашен в красный цвет.

Аналогичное смещение равновесий наблюдается при работе с основными индикаторами, присоединяющими ионы водорода:



Изменение окраски индикатора происходит постепенно, в определенном интервале значений рН, который *называется интервалом перехода индикатора*. Например, метиловый красный при рН < 4,4 имеет красную окраску, при рН > 6,2 – желтую, а в интервале перехода при рН от 4,4 до 6,2 – смешанную – оранжевую с постепенным уменьшением красного оттенка и увеличением желтого. Для каждого индикатора существует специфичный для него интервал перехода.

Универсальным индикатором называют смесь нескольких индикаторов с различными интервалами перехода. Бумага, пропитанная раствором универсального индикатора и затем высушенная, называется универсальной индикаторной бумагой. Обычно 10–20 небольших узких полосок универсальной индикаторной бумаги брошюруют в книжечку с обложкой. На внутренней стороне обложки помещают цветную шкалу, на которой показана окраска универсального индикатора при различных рН.

Приборы и реактивы. Штатив с полумикрооборудованием. рН-метр. Книжки с универсальной индикаторной бумагой. Растворы: соляной кислоты (0,1 н.), щелочи (0,1 н.), индикаторов: тимолового голубого, метилового оранжевого, метилового красного, лакмуса, фенолфталеина, тимолфталеина, ализаринового желтого, смешанного – метиловый оранжевый/индигокармин.

Приготовление смешанного индикатора: 1 г метилового оранжевого и 2,5 г индигокармина растворить в 1 л воды.

Опыт 1. Окраска кислотно-основных индикаторов в кислой и щелочной средах

Получите у преподавателя задание на определение окраски для каких-либо трех индикаторов в кислой и щелочной среде. Пронумеруйте три пробирки восковым карандашом и внесите в каждую по 20 капель 0,1 н. раствора соляной кислоты. Рассчитайте рН в растворе взятой кислоты, считая, что кислота диссоциирует полностью. В другие три пробирки под теми же номерами, но с индексом «а» внесите по 20 капель 0,1 н. раствора щелочи. Вычислите рН взятого раствора, также считая $\alpha = 1$.

Поместите пробирки в штатив попарно друг за другом: пробирка № 1 с кислотой, пробирка № 1а со щелочью; затем пробирка № 2 с кислотой, пробирка № 2а со щелочью; пробирка № 3 с кислотой, пробирка № 3а со щелочью. Если в задание включено более трех индикаторов, следует соответственно увеличить число пар пробирок.

Рассчитайте значение рН в 0,1 н. растворе соляной кислоты (сильнокислая среда) и в 0,1 н. растворе щелочи (сильнощелочная среда).

Внесите в каждую пару пробирок по одной капле одного из исследуемых индикаторов. Например, в обе пробирки № 1 и № 1а – метилового красного, в обе пробирки № 2 и № 2а – тимолфталейна и т. д. (лакмус следует брать по 10 капель, так как при меньшей концентрации изменение его окраски мало заметно). Какова окраска взятых вами индикаторов в сильнокислой и в сильнощелочной среде? Запишите свои наблюдения в табл. 2.7, проставив в ней рассчитанные значения рН.

Т а б л и ц а 2.7

Результаты наблюдений

Номер пары пробирок	Индикатор	Наблюдаемая окраска	
		в сильнокислой среде (рН < 7)	в сильнощелочной среде (рН > 7)

Составьте для исследованных вами индикаторов схемы изменения их окраски при различных значениях рН. Например:

Индикатор	Интервал перехода индикатора в значения рН	Окраска индикатора при значениях рН												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Метиловый красный	4,4 - 6,2													
Тимолфталеин	9,4 - 10,6													

Совпадают ли ваши наблюдения над окраской индикаторов со схемой, составленной вами?

Основываясь на ваших опытах интервала перехода и данных учебника, укажите, каким индикатором следует пользоваться для выявления нейтральной среды? В кислой или щелочной среде меняет свою окраску метиловый красный? Тимолфталеин? Какова окраска тимолфталеина в нейтральной среде?

Опыт 2. Определение рН раствора при помощи универсальной индикаторной бумаги

Получите у преподавателя раствор, рН которого вы должны определить. От книжки с универсальной индикаторной бумагой оторвите одну полоску и погрузите ее на несколько секунд в исследуемый раствор. Выньте полоску и сразу же сравните окраску сырой бумаги с цветной шкалой, помещенной на внутренней стороне обложки книжки. Шкала состоит из 10–12 разноцветных прямоугольников, демонстрирующих изменение цвета универсального индикатора при изменении рН от 1 до 12. Над каждым или под каждым прямоугольником указано значение рН, соответствующее данному цвету.

Сделайте вывод о значении рН исследуемого раствора. Укажите реакцию его среды и вычислите концентрацию водородного иона.

Опыт 3. Определение рН при помощи рН-метра или иономера

Инструментальный метод определения рН-растворов является одним из самых точных методов. С помощью рН-метра или иономера можно определять значение рН растворов от -2 до 14.

Концентрацию гидроксоний-анионов, а следовательно, и значение рН можно определить электрометрическим методом, который основан на измерении разности потенциалов между электродом, потенциал которого зависит от рН, и электродом сравнения.

Физические основы метода

Значение рН раствора определяют как десятичный логарифм концентрации гидроксоний-ионов, взятый с обратным знаком.

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}_3\text{O}^+].$$

Строго говоря, вместо значения концентрации следует использовать значение активности ионов, которая является термодинамической величиной и представляет собой эффективную концентрацию ионов в растворе. Произведение концентраций гидроксоний-ионов и гидроксид-ионов является постоянной величиной и равно $1 \cdot 10^{-14}$ моль²·л⁻²: $[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = K_w = 1 \cdot 10^{-14}$. Концентрация H_3O^+ (и соответственно значение рН) зависит от температуры; она возрастает с увеличением температуры. В 1 л чистой воды при 22°C содержится $1 \cdot 10^{-7}$ моль (1,9 мкг) H_3O^+ и $1 \cdot 10^{-7}$ моль (1,7 мкг) OH^- –ионов.

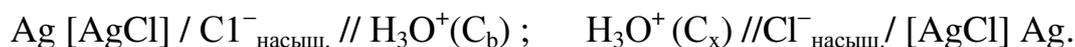
Колориметрический метод определения рН с применением индикаторов мы только что рассматривали. Однако широко распространенный электрометрический метод характеризуется более высокой точностью измерения (от +0,1 до +0,001 единиц рН), а также позволяет проводить измерения в мутных и окрашенных растворах.

При электрометрическом определении измеряют разность потенциалов между электродом сравнения с постоянным потенциалом и измерительным электродом, потенциал которого зависит от рН (рис. 2.16). В большинстве случаев для этого применяют комбинированный стеклянный электрод, содержащий оба электрода в одном блоке. Измерительный электрод расположен во внутренней трубке, электрод сравнения – во внешнем кожухе. Основной частью стеклянного электрода является тонкостенная стеклянная мембрана в форме шарика, внутрь которого заливается буфер с определенным значением рН – рН_б т. е. с известной концентрацией H_3O^+ –ионов (рис. 2.17). Шарик погружают в анализируемый раствор с неизвестным значением рН – рН_х. При этом по обе стороны мембраны происходит постоянный обмен H_3O^+ –ионов раствора с ионами Na^+ стекла. Если значения рН_б и рН_х различаются, то значения электрических потенциалов по обе стороны стеклянной мембраны различны. Возникающая разность потенциалов ΔE пропорциональна значению рН в диапазоне от 1,5 до 9,5 и описывается уравнением Нернста (при 25°C);

$$\Delta E = 0,059 (\text{pH}_b - \text{pH}_x),$$

где $pH_b = pH$ буферного раствора; $pH_x = pH$ исследуемого раствора.

Комбинированный стеклянный электрод состоит из двух электродов со следующей концентрационной цепью:



При $pH > 11$ наблюдается отклонение от уравнения Нернста, так как стеклянный электрод постепенно преобразуется в электрод, чувствительный к ионам Na^+ , причем отклонение происходит в щелочную область и может составлять около 0,2 единиц pH в области $pH 14$. В этом случае возникает так называемая «щелочная ошибка».

При проведении измерений в широком диапазоне pH следует учитывать характеристическую электродную величину, называемую «крутизной прямой, описывающей зависимость электродного потенциала (мВ) от pH ». При подготовке pH -метра к работе сначала проводят калибровку по стандартному буферу с низким значением pH , а затем при помощи регулятора крутизны устанавливают соответствующие показания прибора по стандартному буферу с большим значением pH .

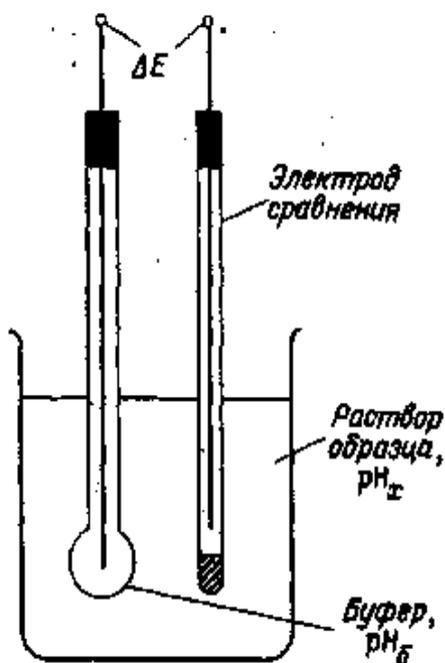


Рис.2.16. Схема ячейки для электрометрического измерения значения pH

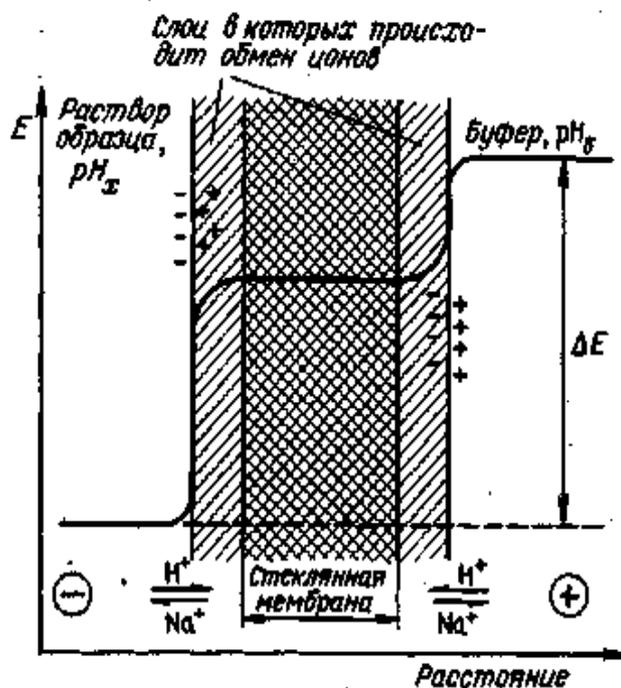


Рис. 2.17. Соотношение потенциалов на мембране стеклянного электрода

Приборы

Устройство для электрометрического измерения рН состоит из измерительного прибора (рН-метра) и комбинированного стеклянного электрода в виде объединенного блока, содержащего стеклянный электрод и электрод сравнения (рис.2.18). Стандартные приборы позволяют проводить измерения рН в области температур от 0 до 70°C.

Порядок выполнения операций

Калибровку прибора и измерение рекомендуется проводить при одной и той же температуре, так как изменение температуры существенно влияет как на величину электродного потенциала, так и на активность H_3O^+ -ионов. Приборы многих конструкций снабжены температурными компенсаторами.

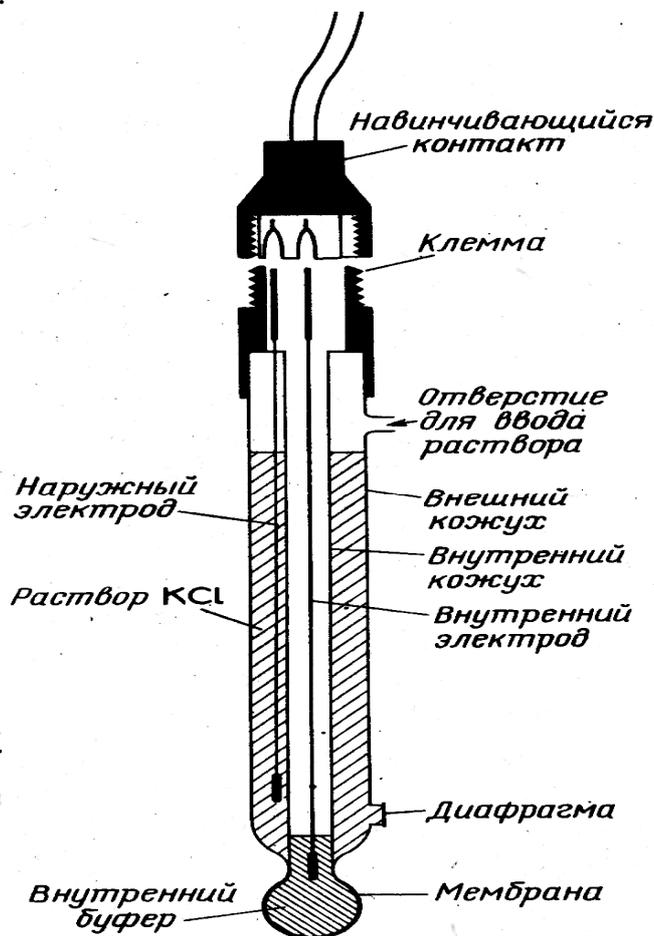


Рис.2.18. Комбинированный стеклянный электрод для измерения рН, состоящий из измерительного и сравнительного электродов

В области нейтральных значений рН требуется лишь незначительная компенсация, однако в области экстремальных значений наблюдается значительная зависимость значений рН от температуры.

Калибровка прибора

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «stand-by» или «null».

Включают прибор.

Определяют температуру буферного раствора и устанавливают ручку компенсатора температуры на соответствующее значение.

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «рН».

Устанавливают значение рН стандартного буфера на нуль-потенциометре. При этом учитывают время настройки.

При проведении измерений в широком диапазоне рН контролируют крутизну: регулятор крутизны устанавливают на 100%, затем плавно регулируют правильность показаний прибора по буферным растворам с низким и высоким значением рН.

Устанавливают переключатель в положение «stand-by» или «null».

После окончания калибровки электроды оставляют в буферном растворе.

Измерение рН

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «stand-by» или «null».

Включают прибор.

Устанавливают температуру раствора на температурном компенсаторе.

Промывают электрод (или электроды) дистиллированной водой и осторожно промокают фильтровальной бумагой (не обтирать!).

Погружают электрод в исследуемый раствор. Устанавливают переключатель диапазона рН в соответствующее положение.

Отсчет значений рН проводят через некоторое время после установления постоянного значения на шкале прибора.

Устанавливают переключатель в положение «stand-by» или «null» и выключают прибор.

Электрод вынимают из исследуемого раствора, промывают дистиллированной водой и погружают в 3 М раствор хлорида калия для хранения.

Хранение стеклянных электродов

Хранят электроды в том же растворе, который находится внутри стеклянной мембраны. Для этой цели используют 3 М раствор хлорида калия, в мембранах более старых конструкций – насыщенный раствор хлорида калия.

Измерение рН в неводных средах

При проведении измерений в неводных средах на обычном электроде сравнения возникает высокий диффузионный потенциал. В связи с этим электролит электрода сравнения заменяют на метанольный раствор хлорида калия.

При частых измерениях применяют солевой мостик: например, насыщенный раствор тетраэтиламмонийперхлората в смеси 50%-го диметилсульфоксида и 50%-ного метанола. При применении стеклянных электродов в неводных средах у них изменяется набухаемость мембраны, что вызывает необходимость проведения частой регенерации электродов в водных растворах.

Измерение значения рН с помощью стеклянного электрода проводят не сразу, а через некоторое время (чаще всего через 1 мин). При увеличении этого периода возможно более точное определение значения рН в неводных средах, так как значение рН устанавливается ассимптотически.

Источники ошибок

Большая инерция при установлении показаний или их полное отсутствие

Образование осадка хлорида серебра, что приводит к закупорке диафрагмы. Способ устранения: электрод погружают в концентрированный раствор аммиака, тщательно промывают и выдерживают в буферном растворе, рН 4 в течение 1 ч.

Образование осадка на электроде сравнения (КС1). Способ устранения: электрод погружают в теплую воду и, встряхивая, растворяют осадок или отсасывают электролит капилляром и затем заполняют электрод свежеприготовленным электролитом.

Образование осадка белка на диафрагме при измерении рН белковых растворов. Способ устранения: электрод погружают в раствор пепсина (5%-ный раствор пепсина в 0,1 М соляной кислоте НСl)

на 2 ч, а затем тщательно отмывают; эту операцию проводят периодически через каждые 2 недели.

Дрейф измеряемого значения рН

Накопление статического заряда на стеклянной мембране, например при обтирании ее фильтровальной бумагой. Способ устранения: промывают электрод и осторожно его промокают.

Зашкаливание (показания выходят за пределы шкалы)

Разрыв цепи между электродом и рН-метром.

Ознакомьтесь с инструкцией для работы на рН-метре, получите у преподавателя исследуемый раствор и определите его значение рН. Сравните полученные результаты с результатами определения рН тех же растворов, определенных при помощи индикаторов или универсальной индикаторной бумаги. Какие из данных точнее?

Работа 16. Гидролиз солей

Приборы и реактивы (Полумикрометод). Водяная баня. Ацетат натрия. Карбонат натрия. Хлорид калия. Хлорид алюминия. Сульфит натрия. Хлорид натрия. Ацетат аммония. Растворы: ацетата натрия (0,5 н.), карбоната натрия (0,5 н.), силиката натрия (0,5 н.), хлорида алюминия (0,5 н.), хлорида магния (0,5 н.), хлорида сурьмы (0,5 н.), сульфата алюминия (0,5 н.), карбоната аммония (0,5 н.), сульфида аммония (0,5 н.), лакмуса, фенолфталеина, ацетата аммония (0,5 н.). Универсальная индикаторная бумага.

Опыт 1. Внешнее проявление гидролиза солей

а) Реакция среды растворов различных средних солей. В шесть пробирок на 1/3 объема налейте нейтральный раствор лакмуса. Одну из пробирок оставьте в качестве контрольной, а в остальные добавьте по одному микрошпателью солей: в первую – ацетата натрия NaCH_3COO , во вторую – хлорида алюминия AlCl_3 , в третью – силиката натрия Na_2SiO_3 , в четвертую – карбоната аммония $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, в пятую – хлорида калия KCl .

Какой реакции среды следует ожидать в растворах указанных средних солей?

Размешайте раствор в каждой пробирке отдельной палочкой. Как изменилась окраска раствора лакмуса от добавления каждой соли? Какая реакция среды характеризуется полученным цветом лакмуса?

Оформите результаты своих наблюдений в виде табл. 2.8

Т а б л и ц а 2.8

Результаты наблюдений реакции среды

Номер опыта	Формула соли	Ожидаемая реакция среды	Окраска лакмуса	Фактическая реакция среды	Порядок pH в растворе (pH<7, pH>7, pH = 7)

В результате какого процесса могли появиться избыточные ионы H^+ или OH^- в водном растворе средних солей? Напишите в молекулярном и ионном виде уравнения гидролиза соответствующих солей. Укажите вид гидролиза: простая форма (слабый компонент одноосновен) или ступенчатая (для многоосновных слабых компонентов).

В случае ступенчатого гидролиза напишите уравнение реакции лишь для первой ступени, так как практически при данной концентрации раствора последующие ступени гидролиза протекают очень слабо. Сформулируйте определение процесса гидролиза сделайте общий вывод о реакции среды водных растворов солей, образованных:

- а) сильным основанием и слабой кислотой;
- б) слабым основанием и сильной кислотой;
- в) слабым основанием и слабой кислотой;
- г) сильным основанием и сильной кислотой.

б) Образование малорастворимых веществ в результате гидролиза солей. Внесите в пробирку 2–3 капли раствора хлорида сурьмы $SbCl_3$ и добавляйте по каплям дистиллированную воду; Наблюдайте выпадение белого осадка хлорида оксохлорида сурьмы $SbOCl$, образование которого при отсутствии других реагентов обусловлено взаимодействием соли с водой.

Механизм гидролиза разобран в оп. 4 в.

Опыт 2. Образование основных и кислых солей при ступенчатом гидролизе

а) Гидролиз ацетата алюминия. Внесите в пробирку по 7–8 капель растворов сульфата алюминия и ацетата натрия. Напишите молекулярное уравнение образования в растворе ацетата алюминия $Al(CH_3COO)_3$. Закрепите пробирку в штативе и опустите в водяную баню с горячей водой. Наблюдайте образование осадка основной соли алюминия $Al(OH)_2CH_3COO$. Продуктом какой степени гидролиза является образовавшаяся основная соль? Напишите молекулярные и ионные уравнения гидролиза по ступеням. На какой ступени степень гидролиза больше? Почему? Результатом гидролиза каких солей являются основные соли?

б) Гидролиз карбоната натрия (сода). Налейте в пробирку до $1/3$ ее объема нейтральный раствор лакмуса, внесите в нее 1–2 микрошпателя кристаллов соды Na_2CO_3 и размешайте раствор стеклянной палочкой. В какой цвет окрасился раствор лакмуса? Какие ионы обусловили изменение цвета лакмуса? В результате какого процесса эти ионы появились? Отсутствие выделения двуокиси углерода указывает на то, что непрочная угольная кислота при этом почти не образуется, следовательно, гидролиз протекал практически лишь по первой ступени, до образования гидрокарбоната натрия. Напишите в молекулярном и ионном виде уравнения реакции. В результате гидролиза каких солей образуются кислые соли?

Опыт 3. Особые случаи полного гидролиза

В две пробирки внесите по 6–8 капель раствора хлорида алюминия. В одну пробирку добавьте такой же объем раствора сульфида аммония, в другую – раствора карбоната натрия.

Наблюдайте в обеих пробирках выпадение осадка гидроксида алюминия, сопровождающееся в первом случае выделением газообразного сероводорода (отметьте запах), во втором – пузырьков диоксида углерода.

Напишите молекулярные и ионные уравнения реакций. Почему не получилось сульфида и карбоната алюминия? Почему хлорид алюминия (см. опыт 1) подвергается ступенчатому гидролизу, а сульфид алюминия – полному?

Опыт 4. Исследование факторов, влияющих на степень гидролиза солей

а) Влияние силы кислоты и основания, образующих соль, на степень ее гидролиза. В две пробирки налейте на $2/3$ объема дистил-

лированной воды. В одну пробирку внесите один микрошпатель сульфата натрия, в другую – карбоната натрия. По отсутствию выделения SO_2 и CO_2 убедитесь, что гидролиз протекает лишь по первой ступени. Напишите уравнения реакций.

В каждую пробирку добавьте по одной капле фенолфталеина. В растворе какой соли окраска фенолфталеина интенсивнее? В каком случае концентрация ионов OH^- более высокая и, следовательно, степень гидролиза больше? Объясните наблюдаемое явление, сравнив константы диссоциации угольной и сернистой кислот. Ион SO_3^{2-} или ион CO_3^{2-} сильнее связывает ионы H^+ и вызывает большее накопление ионов OH^- ?

Степень гидролиза какой соли, AlCl_3 или MgCl_2 , при одинаковых концентрациях и температуре должна быть больше? Напишите уравнение реакции по первой ступени и решите, в каком случае концентрация ионов H^+ должна быть выше. Проверьте свое заключение, определив при помощи индикаторной бумажки приближенное значение рН в растворах этих солей.

Сделайте общий вывод о влиянии силы кислоты и основания, образующих соль, на степень ее гидролиза.

б) Влияние температуры на степень гидролиза солей. Налейте в пробирку до половины ее объема дистиллированной воды и внесите в нее 2–3 микрошпателя ацетата натрия CH_3COONa . Напишите ионное уравнение гидролиза этой соли. Кислая или щелочная среда должна быть в растворе этой соли? Добавьте к раствору каплю фенолфталеина. Наблюдайте очень слабое порозовение раствора.

Половину полученного раствора отлейте в другую пробирку и оставьте для сравнения, а пробирку с оставшимся раствором укрепите в штативе и опустите в водяную баню с горячей водой. Как изменяется окраска раствора при нагревании?

Какой вывод об изменении концентрации ионов OH^- в растворе можно сделать на основании изменения окраски фенолфталеина? В каком направлении сместилось равновесие гидролиза?

Укажите причину увеличения степени гидролиза соли с повышением температуры раствора.

в) Влияние разбавления раствора на степень гидролиза солей. Внесите в пробирку 2–3 капли раствора хлорида сурьмы SbCl_3 . Добавляйте к раствору по каплям дистиллированную воду до выпадения белого осадка хлорида оксохлорида сурьмы SbOCl .

Напишите в молекулярном и ионном виде уравнения: а) гидролиза SbCl_3 по первой ступени, протекающего в достаточно концентрированном растворе с образованием растворимого в воде гидроксодихлорида сурьмы SbOHC1_2 ; б) второй ступени гидролиза, протекающей при

разбавлении раствора на холоду с образованием дигидроксохлорида сурьмы $\text{Sb}(\text{OH})_2\text{Cl}$, сопровождающейся отщеплением от образующейся основной соли молекулы воды и выпадением в осадок SbOCl .

Объясните влияние разбавления на увеличение степени гидролиза, для чего напишите выражение константы гидролиза хлорида сурьмы по первой ступени (для ионного уравнения). Проанализируйте, во сколько раз увеличится числитель и знаменатель при увеличении разбавления в два раза. Вызовет ли это смещение равновесия гидролиза? В сторону увеличения или уменьшения?

Содержимое пробирки сохраните для следующего опыта.

Напишите ионное уравнение первой ступени гидролиза карбоната аммония $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и выражение константы этого равновесия. Будет ли влиять разбавление на степень гидролиза карбоната аммония? Сделайте общий вывод: степень гидролиза каких солей не зависит от разбавления?

г) **Влияние изменения концентрации водородных ионов (или гидроксид-ионов) на гидролиз солей.** Проанализируйте составленное выше уравнение гидролиза хлорида сурьмы по второй ступени. Как будет влиять на смещение равновесия гидролиза добавление ионов H^+ ? Проверьте свой ответ, добавив в пробирку соляной кислоты. Что происходит с осадком SbOCl ? Можно ли таким же способом уменьшить гидролиз сульфида натрия? Какой реактив следует добавить к водному раствору сульфида натрия для подавления гидролиза этой соли?

Контрольный опыт

В две пробирки на половину их объема налейте нейтральный раствор лакмуса. В одну пробирку внесите микрошпатель хлорида натрия, в другую – ацетата аммония. Почему цвет лакмуса в обеих пробирках не изменился? Значит ли это, что ни одна из взятых солей не подвергается гидролизу?

Контрольные вопросы и задачи

1. Определить молярность и нормальность следующих растворов: а) 70%-ной серной кислоты пл. $1,6 \text{ г/см}^3$, б) 40%-ного раствора NaOH пл. $1,4 \text{ г/см}^3$, в) 20%-ного раствора H_3PO_4 пл. $1,1 \text{ г/см}^3$.

Ответ: а) 11,6 М, 28,2 н.; б) 14,4 М, 14,4 н.; в) 2,3 М, 6,8 н.

2. Укажите, какие из перечисленных ниже веществ относятся к электролитам, и напишите уравнения их электролитической диссоциации: HNO_3 , NaOH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, CH_3COOH , CH_3COCH_3 , Na_3PO_4 , $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

3. Из двух молей бинарного электролита распалось на ионы 0,2 моля по уравнению $AB = A^+ + B^-$. Подсчитайте, во сколько раз число частиц в данном растворе больше их числа в случае отсутствия диссоциации (изотонический коэффициент). Найдите степень диссоциации этого электролита.

Ответ: в 1,1 раза; 10%.

4. В 2 л раствора содержится 0,1 моля слабого бинарного электролита, в том числе 0,004 моля находится в виде ионов. Найдите константу диссоциации, степень диссоциации и изотонический коэффициент.

Ответ: $K = 8,3 \cdot 10^{-5}$, $a = 4\%$, $i = 1,04$.

5. Напишите уравнения ступенчатой диссоциации для H_3PO_4 и $Mg(OH)_2$.

6. Напишите выражения для констант диссоциации K_1 и K_2 угольной кислоты. Какая из этих величин меньше? Почему?

7. Напишите молекулярные и ионные уравнения реакций получения слабых оснований и кислот из растворов их солей: а) $Fe(OH)_2$; б) H_2S ; в) HCN ; г) $Cu(OH)_2$; д) CH_3COOH .

8. Напишите в ионном виде уравнения реакций образования труднорастворимых солей: а) PbI_2 ; б) $Ag_2Cr_2O_7$; в) $Ca_3(PO_4)_2$.

9. Какова реакция среды водных растворов: а) нитрата аммония, б) нитрата калия, в) цианида калия, г) цианида аммония, д) ацетата аммония? Чем объяснить реакцию среды в каждом случае? Напишите соответствующие уравнения реакций в ионном виде.

10. Какие из указанных ниже солей подвергаются гидролизу и какая форма гидролиза (простой, ступенчатый, полный) будет иметь место в каждом отдельном случае: а) $NaClO$; б) $NaCl$; в) K_3PO_4 ; г) Al_2S_3 ; д) $Fe(NO_3)_3$. Ответьте на вопрос, не составляя уравнений реакций.

11. Как отразится на равновесии гидролиза цианида натрия прибавление щелочи, кислоты или хлорида аммония?

12. Объясните различную степень гидролиза солей: а) $NaCN$; CH_3COONa ; в) NH_4CN .

13. Напишите в ионном виде уравнения первой ступени, гидролиза карбоната калия, фосфата натрия и сульфата аммония. В каком случае степень гидролиза наибольшая, в каком – наименьшая? Ответ мотивировать.

14. Напишите ионные и молекулярные уравнения ступенчатого гидролиза сульфата железа (III) и сульфида натрия. Как можно усилить гидролиз этих солей и как ослабить его?

15. При действии на раствор соли железа (III) карбонатом натрия в осадок выпадает не карбонат железа, а его гидроксид. Как это объяснить?

16. Попарно смешали растворы следующих веществ:

- | | |
|---|---|
| а) $\text{NaOH} + \text{CH}_3\text{COOH}$ | д) $\text{AgNO}_3 + \text{Na}_3\text{PO}_4$ |
| б) $\text{NaCl} + \text{CH}_3\text{COOH}$ | е) $\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ |
| в) $\text{NaCl} + \text{KOH}$ | ж) $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaOH}$ |
| г) $\text{MgCl}_2 + \text{KOH}$ | з) $\text{NaHSO}_4 + \text{NaOH}$ |

Между какими парами веществ возможны реакции обмена? Напишите ионные уравнения реакций.

17. Напишите уравнения ступенчатой диссоциации сероводородной кислоты. В каком направлении будут смещаться эти равновесия при добавлении Na_2S или NaOH ?

18. Что произойдет с ионным равновесием воды и степенью ее диссоциации при добавлении сильной кислоты или сильного основания? Как это отразится на концентрациях ионов H^+ и OH^- ? Может ли в водном растворе концентрация ионов H^+ или OH^- стать равной нулю? Почему?

19. Найдите концентрацию ионов H^+ и OH^- и укажите реакцию среды в растворах при: а) рН 7, б) рН 4, в) рН 9.

20. рН раствора одноосновной кислоты HA равен 3. Степень диссоциации 0,01. Найдите молярную концентрацию кислоты.

Ответ: 0,1 М.

21. Для 0,01 М раствора основания MeOH рН 10. Найдите степень и константу диссоциации основания.

Ответ: $\alpha = 1\%$, $K = 10^{-6}$

22. рН одного раствора равен 2, а другого 6. В каком растворе концентрация ионов H^+ больше и во сколько раз?

23. Объясните, пользуясь правилом произведения растворимости, растворение карбоната бария и сульфида цинка в соляной кислоте. Почему сульфид цинка не растворяется в уксусной кислоте?

24. Раствор хлорида кальция содержит 0,1 мг CaCl_2 в 1 мл. К данному раствору прибавили равные объемы:

- а) 0,01 М раствора Na_2SO_4 ($\text{IP}_{\text{CaSO}_4} = 6,1 \cdot 10^{-5}$);
- б) 0,01 М раствора Na_2CO_3 ($\text{IP}_{\text{CaCO}_3} = 4,8 \cdot 10^{-9}$);
- в) 0,01 М раствора $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ($\text{IP}_{\text{CaC}_2\text{O}_4} = 2,6 \cdot 10^{-9}$).

Установите расчетным путем, в каких случаях появится осадок. Считать, что все соли диссоциируют полностью.

25. Если к раствору, содержащему ионы Ba^{2+} и Ca^{2+} в одинаковой концентрации, прибавлять по каплям разбавленный раствор Na_2SO_4 , то какие осадки и в какой последовательности будут при этом образовываться?

26. Объясните, почему при действии на растворы солей железа (II) и марганца (II) сероводородом осадки сульфидов не выпадают, а при действии сернистым аммонием – выпадают.

27. Почему при действии сероводорода на раствор соли меди осаждается сульфид меди, а сульфид железа (II) при тех же условиях не осаждается?

Поверхностные явления. Дисперсные системы

Работа 17. Адсорбция

Приборы и реактивы. Микроколба с пробкой и газоотводной трубкой. Микропробирки. Воронка. Фильтровальная бумага. Порошок угля. Сульфид железа. Тальк. Пробирки, заполненные парами брома. Силикагель. Пермутит. Растворы: соляной кислоты (1 : 1), нитрата свинца (0,5 н., 0,01 н.), йодида калия (0,01 н.), крахмала, нейтрального лакмуса или фуксина, сульфата меди (0,5 н.), аммиака (25%-ный, 2 н.), гидрокарбоната кальция (0,01 н.), хлорида бария (0,5 н.), серной кислоты (0,5 н.). Хлорная вода.

Опыт 1. Адсорбция газов углем

а) Адсорбция сероводорода древесным углем. Соберите прибор так, как указано на рис. 2.19,а. Выньте пробку с газоотводной трубкой из микроколбы (или пробирки). Внесите в изгиб газоотводной трубки порошок прокаленного древесного угля и на время отложите трубку в сторону.

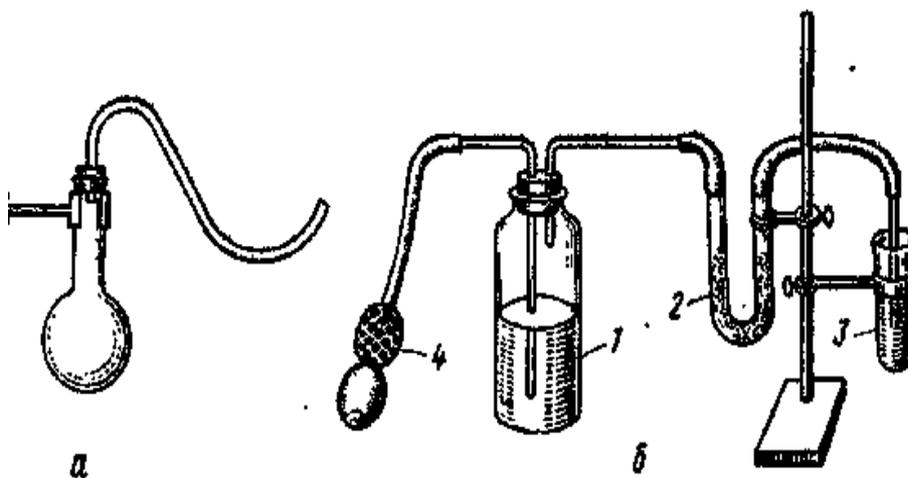


Рис. 2.19. Приборы для наблюдения адсорбции газов углем: 1 – склянка с хлорной водой; 2 – U-образная трубка с активированным углем; 3 – пробирка с раствором КД; 4 – резиновая груша

В микроколбочку поместите два микрошпателя мелко истолченного сульфида железа FeS и 10 – 15 капель разбавленной соляной кислоты (1:1). Отметьте по запаху выделение сероводорода. Поднесите к открытому отверстию микроколбы фильтровальную бумагу, смоченную раствором нитрата или ацетата свинца (II), и наблюдайте почернение из-за образования сульфида свинца PbS .

Закройте колбу пробкой с газоотводной трубкой, в изгиб которой помещен древесный уголь. Поднесите фильтровальную бумагу, смоченную солью свинца, к открытому концу газоотводной трубки.

Чернеет ли бумага? Дайте объяснение наблюдаемому явлению. В чем заключается сущность адсорбции?

б) Адсорбция брома активированным углем. Получите у лаборанта пробирку, наполненную парами брома и плотно закрытую резиновой пробкой. На лист бумаги насыпьте активированный уголь (3 – 4 шпателя). Откройте пробирку с бромом в вытяжном шкафу, быстро высыпьте в нее приготовленный активированный уголь. Закройте пробкой и встряхните несколько раз. Что происходит в пробирке? Объясните исчезновение брома, учитывая, что при комнатной температуре уголь не взаимодействует с бромом. Сохраните уголь с адсорбированным бромом для опыта 2.

в) Адсорбция хлора активированным углем. U-образную трубку 2 (рис. 2.19,б) заполните на $\frac{3}{4}$ высоты активированным углем и отложите на время в сторону. В пробирку 3 возьмите 7 – 8 капель раствора йодида калия, добавьте 2 – 3 капли крахмала и поместите в штатив для пробирок. В склянку 1 на $\frac{1}{2}$ ее объема налейте хлорной воды и закройте пробкой с двумя газоотводными трубками. На открытый конец длинной трубки, опущенной в хлорную воду, наденьте резиновую грушу 4 для нагнетания воздуха.

Для проведения первой части опыта короткую трубку соедините резиновой трубкой с прямой стеклянной трубкой, которую опустите в пробирку с раствором йодида калия. Нагнетая воздух при помощи резиновой груши в склянку с хлорной водой, наблюдайте появление синего окрашивания в пробирке с раствором KI . Напишите уравнение реакции взаимодействия KI с хлором, вытесняемым из хлорной воды при продувании через нее воздуха.

Возьмите другую пробирку с бесцветным раствором йодида калия, содержащим 2 – 3 капли крахмала, повторите опыт, поместив трубку с активированным углем между склянкой с хлорной водой и пробиркой с йодидом калия, как указано на рис 2.19 б. Появляется ли синее окрашивание раствора при продувании воздуха через хлорную воду. Какие адсорбенты, кроме угля, вы знаете? Сохраните уголь с адсорбированным хлором для опыта 2.

Опыт 2. Влияние температуры на адсорбцию

а) Десорбция хлора при нагревании. Пересыпьте активированный уголь с адсорбированным хлором (полученный в опыте 1) в пробирку и закрепите в лапке штатива (рис. 2.20).

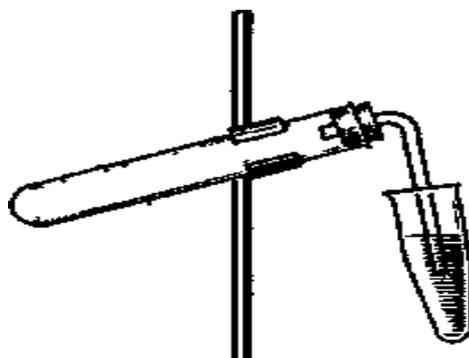


Рис. 2.20. Прибор для наблюдения десорбции хлора

Закройте пробирку пробкой с отводной трубкой и опустите трубку в пробирку с йодидом калия. Подогрейте активированный уголь пламенем горелки. Что происходит с раствором KI? Как влияет повышение температуры на адсорбцию хлора углем?

б) Десорбция брома (опыт проводить под тягой). Нагрейте пробирку с активированным углем, адсорбировавшим бром в опыте 1,б. Что представляет собой появившийся желтый газ?

Опыт 3. Адсорбция молекул из растворов углем

а) Адсорбция органических красителей. В стеклянную воронку вложите бумажный фильтр, закрепите воронку в лапке штатива и профильтруйте через нее 2 – 3 мл раствора лакмуса или фуксина. Изменился ли цвет раствора? Поместите на фильтровальную бумагу в воронке слой (1 см) активированного или прокаленного древесного угля и вновь профильтруйте раствор. Почему произошло обесцвечивание раствора?

б) Адсорбция сероводорода из раствора. В коническую пробирку поместите 5 – 10 капель дистиллированной воды. Всыпьте в раствор немного порошка угля и, закрыв пробирку, встряхивайте ее в течение 2 – 3 мин, после чего убедитесь в исчезновении запаха сероводорода.

Опыт 4. Адсорбция ионов из раствора

а) Адсорбция ионов Pb^{2+} углем. Внесите в пробирку 3 – 4 капли 0,01 н. раствора нитрата или ацетата свинца. Прибавьте к нему одну каплю 0,01 н. раствора йодида калия и наблюдайте выпадение обильного желтого осадка йодида свинца PbI_2 . Напишите ионное уравнение реакции.

В другую пробирку внесите 10 – 15 капель того же раствора соли свинца, прибавьте два микрошпателя мелко измельченного древесного угля и, закрыв пробирку, энергично встряхивайте ее в течение нескольких минут. Оберните узкий конец капельной пипетки ватой и отберите в чистую пробирку 3 – 4 капли прозрачного, свободного от угля раствора. Прибавьте к нему одну каплю 0,01 н. раствора йодида калия. Выпадает ли осадок йодида свинца в этом случае? Объясните резкое уменьшение количества ионов свинца Pb^{2+} после встряхивания с углем.

б) Адсорбция комплексного иона меди на силикагеле. Для получения комплексного иона меди $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ в пробирку с 2 – 4 каплями сульфата меди прилейте по каплям 2 н. раствор аммиака до полного растворения выпавшего в начале осадка основной соли меди $(CuOH)_2SO_4$. В полученный раствор, окрашенный ионами $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ в фиолетовый цвет, внесите 3 – 4 микрошпателя силикагеля и встряхните несколько раз. Что происходит с окраской раствора? Слейте посветлевший раствор и обратите внимание на окраску силикагеля, бесцветного в начале опыта.

Докажите отсутствие химического взаимодействия комплексного иона с силикагелем, для чего прилейте в пробирку соляной кислоты. Наблюдайте посветление силикагеля вследствие разрушения комплексного иона по уравнению



в) Адсорбция иона меди (II) на тальке. Поместите в пробирку одну каплю раствора сульфата меди и долейте дистиллированной воды до $\frac{2}{3}$ объема пробирки. Внесите в раствор 4–5 микрошпателей талька и энергично встряхните содержимое пробирки. Как изменяется окраска раствора?

Опыт 5. Ионообменная адсорбция

(подробно о принципах хроматографии см. следующую главу)

Возьмите в пробирку десять капель 0,01 н. раствора гидрокарбоната кальция $Ca(HCO_3)_2$, обуславливающего жесткость воды. Раствор прокипятите и наблюдайте выпадение белого осадка.

Другую пробирку заполните на половину ее объема пермутитом, синтетическим алюмосиликатом натрия, способным при соприкосновении с растворами солей поглощать катионы солей, посылая в раствор эквивалентное количество ионов натрия. Налейте в пробирку 0,01 М раствор гидрокарбоната кальция так, чтобы жидкость покрыла пермутит, и многократно встряхните пробирку с содержимым. Раствор отфильтруйте, поместите десять капель его в чистую пробирку и прокипятите. Сравните количество выпавшего осадка CaCO_3 в исходном растворе и после контакта с пермутитом. Напишите обменную ионную реакцию, протекающую при взаимодействии пермутита натрия с раствором гидрокарбоната кальция. В чем состоит отличие ионообменной адсорбции от адсорбции на угле, силикагеле и тальке?

Опыт 6. Адсорбция ионов свинца (II) осадком сульфата бария

В пробирку с 3–4 каплями нитрата свинца $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ добавьте десять капель дистиллированной воды и перемешайте раствор стеклянной палочкой. Перенесите 3–4 капли полученного раствора в чистую пробирку и добавьте такой же объем йодида калия. Выпадает желтый осадок йодида свинца.

Внесите в чистую пробирку пять капель 0,5 н. раствора хлорида бария BaCl_2 , добавьте десять капель 0,5 н. раствора серной кислоты и наблюдайте выпадение осадка белого цвета — малорастворимого сульфата бария. Отцентрифугируйте осадок BaSO_4 , удалите раствор и внесите в пробирку 3–4 капли 0,01 н. раствора нитрата свинца и десять капель дистиллированной воды.

Энергично перемешайте стеклянной палочкой осадок сульфата бария в растворе нитрата свинца. Дайте осадку отстояться, перенесите в чистую пробирку 3–4 капли раствора и добавьте такой же объем йодида калия. Выпадает ли желтый осадок PbI_2 ? Сравните количества этого осадка и того, который выпал из раствора, не соприкасавшегося с сульфатом бария. Почему уменьшилась концентрация ионов Pb^{2+} в растворе? (Преобразование BaSO_4 в PbSO_4 отпадает, так как PbSO_4 более растворим ($\text{PPbSO}_4 = 2 \cdot 10^{-8}$), чем BaSO_4 ($\text{PBaSO}_4 = 1,10^{-10}$)).

Работа 18. Коллоидные системы. Эмульсии. Суспензии

Приборы и реактивы. Фарфоровая ступка. Микрошпатель. Электрофоретический зонд Наумова. Беззольная фильтровальная бумага. Вискозиметр Оствальда–Пинкевича. Секундомер. Прибор для аэроэлектрофореза. Мел (порошок). Флуоресцеин. Бензол. Машинное (или растительное) масло. NaCl . Na_3PO_4 . Растворы: щелочи (20%-ный), мыла

(2%-ный), канифоли (насыщенный спиртовой) или серы, фенолфталеина, желатина (0,5%-ный, насыщенный), жидкого стекла (пл. 1,1– 6 г/см³), хлорида железа (III) (2%-ный), соляной кислоты (1:5); пл. = 1,19 г/см³), AgNO₃ (0,001 M, 0,05 M, 0,1 M), KI (0,05 M), KCl (0,1 M), Na₂CO₃ (10%-ный), аммиака (25%-ный), Na₂SO₃ (1%-ный), танина (0,1%-ный, свежеприготовленный). Золь йодида серебра, полученный: а) в избытке йодида калия; б) в избытке нитрата серебра.

Опыт 1. Получение суспензии мела в воде

В фарфоровой ступке тщательно разотрите кусочек мела до тонкого порошка. Внесите в пробирку один микрошпатель полученного порошка, прилейте 3–4 мл дистиллированной воды и несколько раз энергично встряхните пробирку. Отметьте равномерное распределение мела по всему объему раствора. Поставьте пробирку в штатив и наблюдайте через несколько минут расслоение полученной суспензии.

Какие системы называют суспензиями? Что является в данной суспензии дисперсионной средой и дисперсной фазой?

Опыт 2. Приготовление эмульсий бензола и масла в воде

Налейте в четыре пробирки до половины их объема воду. В первую добавьте 8–10 капель бензола, во вторую 8–10 капель масла (растительного или жидкого машинного), закройте пробирки пробками, несколько раз энергично встряхните и поставьте в штатив. В третью пробирку добавьте пять капель 2%-ного раствора мыла и 8–10 капель бензола, также энергично перемешайте содержимое пробирки и поставьте ее в штатив.

В четвертую пробирку насыпьте три микрошпателя буры Na₂B₄O₇ · 10H₂O, встряхните ее до полного растворения соли, добавьте 8–10 капель масла и после сильного взбалтывания (2–3 мин) поместите в штатив.

В каких пробирках эмульсия быстро расслаивается? Какой вывод можно сделать об устойчивости эмульсии в остальных- пробирках? Какую роль играют мыло и бура? Объясните их влияние на стабильность эмульсии.

Опыт 3. Получение золь методом конденсации

а) Образование золь при замене растворителя. Налейте в пробирку до 1/2 объема воды и добавьте в нее несколько капель 2%-ного спиртового раствора канифоли или насыщенного раствора серы в спирте.

Встряхните содержимое пробирки и дайте раствору постоять 2–3 мин. Что происходит? Запишите в тетрадь свои наблюдения и объясните их.

Повторите опыт со спиртовым раствором фенолфталеина. Запишите наблюдения и сделайте вывод о растворимости фенолфталеина в спирте и в воде.

Налейте в пробирку 1 мл спирта и добавьте из капельницы 5–10 капель 2%-ного водного раствора мыла. Что наблюдается?

Повторите опыт, добавляя в спирт по каплям насыщенный водный раствор поваренной соли. Запишите наблюдения. Сравните устойчивость полученных вами зольей.

б) Получение золя кремниевой кислоты путем реакции обмена. Налейте в пробирку до половины ее объема разбавленной (1:5) соляной кислоты и добавьте к ней при перемешивании 8–10 капель разбавленного жидкого стекла Na_2SiO_3 (пл. 1,16 г/см³). Полученный гидрозоль кремниевой кислоты сохраните для опыта 5. Напишите уравнение реакции образования кремниевой кислоты. Составьте схему строения коллоидных частиц, учитывая, что в ядро мицеллы входят молекулы SiO_2 и H_2O , а в адсорбционный слой – ионы SiO_3^{2-} .

в) Получение золя гидроксида железа (III) гидролизом соли. Нагрейте до кипения в маленьком стаканчике 10–20 мл дистиллированной воды. В кипящую воду медленно, по каплям, добавляйте 2%-ный раствор хлорида железа (III) до получения коллоидного раствора гидроксида железа цвета крепкого чая.

Напишите уравнение реакции гидролиза хлорида железа (III), учитывая, что высокая температура благоприятствует смещению равновесия этой реакции в сторону образования гидроксида.

Изобразите схематически строение коллоидных частиц, руководствуясь тем, что на поверхности коллоидных агрегатов адсорбируются из растворов ионы, близкие по природе к составу ядра мицелл, т. е. ионы Fe^{3+} . Полученный коллоидный раствор сохраните для опыта 6 б.

г) Получение золя йодида серебра с разноименными зарядами частиц. Налейте в пробирку 2–3 мл 0,05 М раствора йодида калия и из пипетки медленно добавьте 5–10 капель 0,05 М раствора нитрата серебра, все время сильно встряхивая раствор.

Запишите в тетрадь цвет золя йодида серебра и уравнение реакции в молекулярной и ионной форме.

Повторите опыт, налив в пробирку 1 мл 0,05 М раствора нитрата серебра и медленно добавляя при встряхивании 5–10 капель 0,05 М раствора йодида калия.

Изобразите схему строения коллоидных частиц золя йодида серебра, полученных в первом случае с избытком AgNO_3 , а во втором

случае с избытком KI, учитывая, что заряд коллоидных частиц определяется тем ионом, который имелся в избытке в начале образования коллоида. Сохраните растворы для опыта 5, б.

д) Получение золя серебра реакцией восстановления. Налейте в пробирку на 3/4 объема 0,001 M раствор нитрата серебра, добавьте к нему 2–3 капли 1%-ного раствора сульфита натрия и 2–3 капли свежеприготовленного, 1%-ного раствора танина. Нагрейте раствор и наблюдайте образование коллоидного раствора серебра. Запишите цвет раствора и уравнение реакции восстановления серебра сульфитом натрия.

Танин играет роль стабилизатора и способствует устойчивости золя (частично принимает участие в восстановлении серебра). Сохраните раствор для опытов 9 и 15.

Опыт 4. Получение золь методом диспергирования

а) Получение золя флуоресцеина. Налейте половину пробирки дистиллированной воды, добавьте 2 – 3 капли раствора соды и внесите маленькую крупинку флуоресцеина. Встряхните раствор и после растворения флуоресцеина обратите внимание на цвет полученного раствора в отраженном и проходящем свете (флуоресценция).

б) Получение золя гидроксида железа путем пептизации. Приготовьте осадок гидроксида железа (III) действием щелочи на раствор хлорида железа (III). Отметьте цвет осадка. Напишите молекулярное и ионное уравнение реакции. Отфильтруйте осадок. Перенесите 2 – 3 микрошпателя полученного осадка в пробирку с концентрированным раствором хлорида железа и нагрейте раствор до кипения. При кипячении наблюдайте изменение цвета раствора вследствие образования золя гидроксида железа (III).

Причиной образования коллоидного раствора является адсорбция твердыми частицами осадка $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ионов железа Fe^{3+} из раствора хлорида железа (III). Адсорбированные ионы сообщают частицам осадка одинаковые заряды, в результате чего частицы начинают отталкиваться друг от друга и, отрываясь от осадка, постепенно равномерно распределяются по всему объему жидкости, т.е. происходит процесс пептизации.

Опыт 5. Определение знака заряда коллоидных частиц

а) Определение знака заряда с помощью электрофоретического зонда. Наличие заряда у коллоидных частиц проявляется при прохождении через гель электрического тока – явления, называемого электрофорезом.

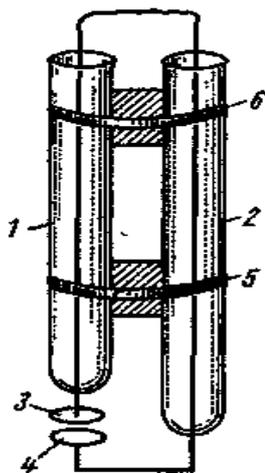


Рис. 2.21. Электрофоретический зонд Наумова:
 1, 2 – стеклянные трубки; 3, 4 – электроды;
 5, 6 – металлические хомутики крепления

Для определения знака заряда коллоидных частиц применяют электрофоретический зонд В.А. Наумова (рис.2.21), который состоит из двух стеклянных трубок 1 и 2 диаметром 5 – 6 мм и длиной 12 – 14 см. С одного конца трубки запаяны и в них вставлены платиновые проволоки, к которым снаружи припаяны медный 3 и цинковый 4 электроды в виде круглых пластинок диаметром 5 мм, расположенных горизонтально одна под другой.

Внутри стеклянных трубок к платиновым проволокам припаяны медные проволоки, которые выходят наружу через открытые концы трубок и сверху спаяны друг с другом. При погружении зонда в пробирку с коллоидным раствором зонд действует как короткозамкнутый гальванический элемент $\text{Cu}/\text{Cu}^{2+} \parallel \text{Zn}/\text{Zn}^{2+}$.

Налейте в цилиндр высотой 18–20 см и диаметром 4–5 см коллоидный раствор йодида серебра, полученный в избытке KI, и опустите в раствор электрофоретический зонд. Через 2–3 мин наблюдайте возле электрода, заряженного одинаково с коллоидными частицами, появление тонкой светлой полоски.

Повторите опыт с золев йодида серебра, полученным в избытке AgNO_3 . Определите знак заряда коллоидных частиц в обоих растворах.

б) Определение знака заряда коллоидных частиц методом капиллярного и капельного анализов. Опустите полоски фильтровальной бумаги в пробирки с коллоидными растворами йодида серебра, полученными в опыте 3, г в избытке KI и в избытке AgNO_3 , и оставьте их там на 1 ч.

Определение знака заряда коллоидных частиц основано на том, что некоторые вещества, например бумага, шелк, стекло, песок и др.,

при погружении в воду заряжаются отрицательно. Если коллоидные частицы в растворе заряжены также отрицательно, то они будут отталкиваться от фильтровальной бумаги и вместе с водой поднимутся вверх. Если же знак заряда коллоидных частиц положительный, то они притянутся к бумаге и осядут по ее краю. Какой заряд имеют коллоидные частицы в этом опыте?

Видоизмените опыт. Нанесите на фильтровальную бумагу по капле тех же растворов йодида серебра. Определите в каждом случае знак заряда частиц, исходя из того, что при положительном заряде частиц «капля золя» на бумаге расслаивается.

Растворы сохраните для опыта б, в.

Опыт 6. Коагуляция гидрозолей

а) Коагуляция золя при нагревании. Нагрейте до кипения золь кремниевой кислоты, полученный в опыте 3, б. Наблюдайте образование геля – студнеобразной массы, не выливающейся из пробирки при перевертывании ее вверх дном.

б) Коагуляция золь электролитами. Разделите на две пробирки коллоидный раствор гидроксида железа, полученный в опыте 3, в. В одну пробирку добавьте несколько капель раствора фосфата натрия, а в другую несколько капель раствора хлорида натрия. В каком случае коагуляция происходит быстрее? Объясните причину.

в) Взаимная коагуляция противоположно заряженных коллоидов. Смешайте в пробирке равные объемы золь йодида серебра (по 5–6 капель), полученных в опыте 3, г, в избытке KI и в избытке AgNO_3 . Встряхните пробирку и наблюдайте коагуляцию коллоидных растворов. Дайте объяснение происходящему явлению. Какое вещество составляет твердую фазу?

Опыт 7. Коагуляция аэрозоля путем электрофореза

Аэрозолями называются коллоидные растворы, в которых дисперсионной средой служит воздух. К аэрозолям относятся дымы и туманы. При пропускании электрического тока через аэрозоль в нем происходит коагуляция. На этом основано очищение производственных газов, выходящих в атмосферу, например через дымовые трубы, от вредных примесей.

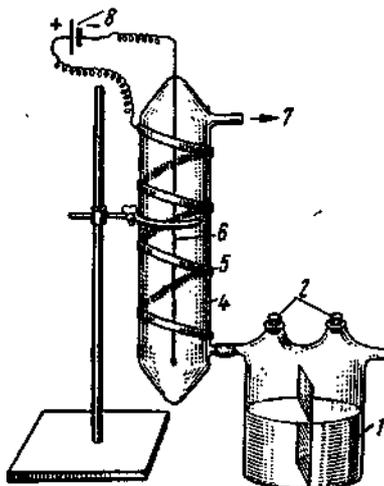


Рис. 2.22. Прибор для аэроэлектрофореза: 1 – сосуд с перегородкой; 2 – вводные отверстия; 3 – тубус для выхода газа, соединенный с нагнетающим насосом; 4 – широкая стеклянная трубка; 5 – положительный электрод (наружная обмотка из металлической фольги-ленты); 6 – отрицательный электрод (проволока); 7 – поток газа; 8 – источник тока

Осторожно налейте в одну половину сосуда 1 (рис. 2.22), который в нижней части разделен перегородкой, 10–15 мл концентрированного раствора аммиака, а в другую половину – столько же концентрированной соляной кислоты. Закройте пробками вводные отверстия 2 и нагнетайте в сосуд грушей воздух через тубус 3 до тех пор, пока из тубуса 7 трубки 4 не появится белый дым. Тогда на 30–40 сек, включите электрический ток от аккумулятора.

Наблюдайте прекращение выделения дыма и оседание на стенках трубки твердых частиц белого цвета. Что представляет собой дым? Напишите уравнение реакции его образования и объясните, почему электрический ток вызывает коагуляцию аэрозоля.

Опыт 8. Защитный коллоид

Налейте почти полную микропробирку дистиллированной воды, добавьте к ней 2–3 капли 0,1 н. раствора нитрата серебра и подкислите раствор 2–3 каплями 2 н. раствора азотной кислоты. Перемешайте раствор и разлейте поровну в две пробирки. В одну из пробирок прибавьте 10 капель 0,5%-ного раствора желатины и тщательно взболтайте. Затем в обе пробирки прилейте по две капли 0,1 н. раствора хлорида калия. Опишите наблюдаемые изменения в обеих пробирках и объясните различие в результатах.

Опыт 9. Измерение вязкости лиофильных и лиофобных коллоидных растворов

В широкий стакан с водой, имеющей комнатную температуру, поместите прибор для определения вязкости, называемый вискозиметром (рис. 2.23). В широкую трубку 1 вискозиметра введите мерной пипеткой 2 мл дистиллированной воды и с помощью груши, соединенной с трубкой 2, наберите воду до метки 3. Снимите грушу и по секундомеру замерьте время, необходимое для понижения уровня воды от метки 3 до метки 4. Повторите опыт 2–3 раза до получения близких результатов. Точно так же определите время истечения коллоидного раствора гидроксида железа и 0,5%-ного раствора желатина.

По скорости истечения жидкости рассчитайте относительную вязкость η золь, сравнивая время истечения воды, взятой в качестве стандартной жидкости, с временем истечения одинаковых объемов испытуемых жидкостей. Относительная вязкость η рассчитывается по формуле

$$\eta = \frac{d\tau}{d_{H_2O}\tau_{H_2O}},$$

где d и d_{H_2O} – плотности испытуемой жидкости и воды; τ и τ_{H_2O} – время истечения испытуемой жидкости и воды.

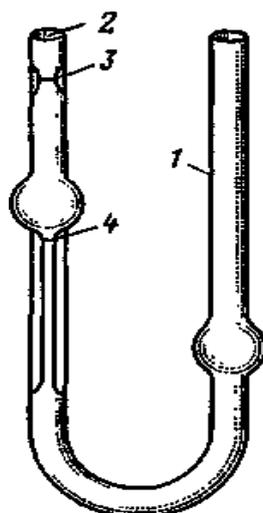


Рис. 2.23 Капиллярный вискозиметр

В этом опыте плотности испытуемых жидкостей и воды примите равными единице.

Вязкость является одной из существенных характеристик для многих технически важных жидкостей, например для различных видов топлив двигателей внутреннего сгорания, для смазочных масел и для большинства высокомолекулярных соединений, используемых для производства пластмасс.

Какой из исследованных вами растворов относится к гидрофильным коллоидным системам? Какой к гидрофобным?

Какое заключение можно сделать о сравнительной вязкости гидрофильных и гидрофобных коллоидных растворов (более подробную информацию об определении вязкости и с ее помощью молекулярной массы см. главу 4)

Контрольные вопросы и задачи

1. Какое место занимают коллоидные системы среди других дисперсных систем?
2. В чем сущность основных методов получения коллоидных систем?
3. Что такое пептизация и как ее можно объяснить?
4. Что представляют собой аэрозоли? Приведите примеры.
5. Какие факторы могут вызывать коагуляцию зольей? Что такое гель?
6. Что такое электрофорез? Чем он отличается от электролиза?
7. Что представляет собой мицелла?
8. Чем обуславливается заряд коллоидных частиц? Как определяют знак заряда?
9. Что такое защитный коллоид? От каких факторов зависит устойчивость коллоидных растворов?
10. Чем отличаются лиофильные коллоиды от лиофобных?

Комплексные соединения

Работа 19. Комплексные соединения

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Центрифуга. Стеклянные палочки. Фильтровальная бумага. Цинк. Хлорид кобальта кристаллический $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Спирт этиловый. Растворы: серной кислоты (2 н.), азотной кислоты (2 н.), едкого натра (2 н.), аммиака (25%-ный, 2 н.), нитрата серебра (0,5 н.), перманганата калия (0,5 н.), йодида калия (0,5 н., 0,1 н.), хлорида натрия (0,5 н.), сульфида натрия (1 н.), сульфата хрома (0,5 н.), хромо-калиевых квасцов (0,5 н.), алюмо-калиевых квасцов (0,5 н.),

гексагидрата сульфата аммония-железа (II) (соли Мора) (0,5 н.), хлорида бария (0,5 н.), нитрата висмута (0,5 н.), сульфата никеля (0,5 н.), нитрата ртути (II) (0,5 н.), роданида аммония (насыщенный), нитрата кобальта (0,5 н.), сульфата меди (0,5 н.), сульфида аммония, гексациано-(II)феррата калия $K_4[Fe(CN)_6]$ (0,15 н.).

Опыт 1. Образование соединений с комплексным анионом

а) Получение комплексного соединения висмута (тетроiodовисмутата калия). В пробирку с 3 – 4 каплями раствора нитрата висмута добавьте по каплям 0,5 н. раствор йодида калия до выделения темно-бурого осадка йодида висмута (III). Затем добавьте еще 2 – 3 капли раствора йодида калия до полного растворения выпавшего осадка с образованием комплексного соединения эмпирической формулы $KI \cdot BiI_3$. Каков цвет полученного раствора? Может ли эта окраска обуславливаться присутствием ионов K^+ , I^- , Bi^{3+} ? Какой из этих ионов должен быть комплексообразователем и по каким причинам? С какими лигандами он может образовывать в данном растворе комплексный ион? Напишите координационную формулу полученного соединения, уравнение его электролитической диссоциации, а также молекулярные и ионные уравнения реакций образования йодида висмута и взаимодействия йодида висмута с избытком йодида калия.

б) Получение комплексного тиосульфата серебра тиосульфатоаргентата натрия). В пробирку с 2 – 3 каплями нитрата серебра прибавляйте по каплям 1 н. раствор тиосульфата натрия $Na_2S_2O_3$ до выпадения осадка тиосульфата серебра. Добавьте еще несколько тиосульфата натрия до растворения осадка с образованием комплексного соединения. Напишите уравнение реакции образования тиосульфата серебра и получения комплексного соединения, а также его координационную формулу (координационное число иона серебра равно двум). Объясните, пользуясь правилом растворимости, растворение тиосульфата серебра в избытке тиосульфата натрия.

Опыт 2. Образование соединений с комплексным катионом

а) Получение аммиачного комплекса никеля. Получите осадок гидроксида никеля, добавляя в пробирку с раствором сульфата никеля (II) раствор едкого натра. Отцентрифугируйте осадок и удалите центрифугат капиллярной пипеткой или полосками фильтровальной бумаги. Прибавьте к осадку по каплям 25%-ный раствор аммиака до растворения гидроксида никеля вследствие образования комплексного основания. Сравните окраску ионов Ni^{2+} . Присутствие каких ионов сообщает окраску раствору?

Напишите уравнение реакции получения комплексного соединения и его координационную формулу, учитывая, что в этом соединении координационное число никеля равно 6. Какое основание является более сильным электролитом: гидроксид никеля или соответствующее комплексное основание? Почему?

Напишите уравнение реакции получения комплексного соединения и его координационную формулу, учитывая, что в этом соединении координационное число никеля равно 6. Какое основание является более сильным электролитом: гидроксид никеля или соответствующее комплексное основание? Почему?

б) Получение аквакомплексов кобальта. Внесите в одну пробирку 4 – 5 капель дистиллированной воды, в другую – столько же капель спирта. В каждую из колб добавьте по одному микрошпателью кристаллов хлорида кобальта и перемешайте растворы стеклянной палочкой. Отметьте различие в окраске. Напишите координационную формулу хлорида гексааквакобальта $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, содержащегося в водном растворе, учитывая, что все молекулы воды являются лигандами, а координационное число иона Co^{2+} равно 6. Как диссоциирует эта соль в растворе? Присутствие каких ионов обуславливает окраску водного раствора? Спирт дегидратирует аквакомплекс кобальта: последний теряет две молекулы воды без изменения координационного числа. Напишите уравнение дегидратации дихлорида гексааквакобальта в присутствии спирта. В каком направлении смещается равновесие процесса дегидратации аквакомплекса кобальта при добавлении воды?

Опыт 3. Образование соединения, содержащего комплексный катион и комплексный анион

Поместите в пробирку две капли раствора гексациано (II) феррата калия и четырьмя каплями раствора сульфата никеля до получения осадка гекса(II)феррата никеля. Прибавьте по каплям 25%-ный раствор аммиака до полного растворения осадка. Через 1 – 3 мин из полученного раствора начинает выпадать бледно-лиловые кристаллы соли $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]_2\text{Fe}(\text{CN})_6$. Напишите уравнение протекавших реакций.

Опыт 4. Комплексные соединения в химических реакциях

а) Реакции обмена тетрароданогидраргината аммония с солью кобальта. Приготовьте раствор тетрароданогидраргината аммония $(\text{NH}_4)_2[\text{Hg}(\text{SCN})_4]$, для чего в пробирку с 3 каплями раствора нитрата ртути (II) добавляйте насыщенный раствор роданида аммония до полного растворения выпадающего вначале осадка роданида ртути.

К полученному комплексному соединению прибавьте 4–5 капель раствора нитрата кобальта и встряхните пробирку для ускорения образования осадка тетрароданогидраргината кобальта. Отметьте цвет осадка и запишите уравнения реакций взаимодействия роданида ртути с избытком роданида аммония (в образующемся комплексном соединении координационное число ртути равно 4) и образования тетрароданогидраргината кобальта (в молекулярном и ионном виде).

б) Восстановление серебра из его комплексного аммиаката. Получите в пробирке осадок оксида серебра, добавив к 3–4 каплям раствора нитрата серебра столько же 2 н. раствора щелочи. Затем приливайте по каплям 2 н. раствор гидроксида аммония до растворения осадка с образованием комплексного гидроксида серебра $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$.

В пробирку с полученным комплексным соединением внесите кусочек цинка. Что наблюдается? Запишите уравнения реакций образования комплексного основания серебра и его взаимодействия с цинком. Разберите механизм вытеснения цинком серебра из его комплексного иона. Координационное число цинка равно 4.

в) Окисление гексациано (II) феррата калия до гексациано (III) феррата калия. Добавьте к 3–4 каплям подкисленного 2 н. серной кислотой раствора KMnO_4 5 капель раствора гексациано (II) феррата калия $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Обесцвечивание раствора происходит вследствие восстановления KMnO_4 до сульфата марганца (II). При этом комплексное соединение $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ окисляется до $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Напишите уравнение реакции. Докажите образование комплексного соединения железа (III), используя его окислительные свойства: добавив в полученный раствор 2–3 капли 0,1 н. раствора йодида калия.

Что наблюдается? Напишите уравнение реакции. Убедитесь, что $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ не взаимодействует с йодидом калия, по отсутствию йода при добавлении 2–3 капель йодида калия к такому же количеству гексациано-(II)феррата калия.

Опыт 5. Прочность комплексных ионов и разрушение комплексов

а) Сравнение прочности комплексных ионов. Получите в двух пробирках хлорид серебра из равных объемов растворов нитрата серебра и хлорида натрия. В первую пробирку добавьте 25%-ный раствор аммиака до полного растворения осадка, во вторую – 1 н. раствор тиосульфата натрия также до полного растворения осадка. В обе пробирки добавьте по две

капли 0,1 н. раствора йодида калия и слегка встряхните их. Из какого раствора выпадает осадок йодида серебра, не исчезающий при встряхивании?

Напишите уравнения реакций образования обоих комплексных соединений серебра (координационное число иона Ag^+ равно 2) и уравнения их электролитической диссоциации. Объясните образование осадка йодида серебра, пользуясь уравнением диссоциации соответствующего комплексного иона и правилом произведения растворимости. Какое из полученных комплексных соединений более прочно? Напишите выражения для констант нестойкости обоих комплексов и решите по результатам опыта, какая константа имеет меньшее значение. Проверьте свой вывод, пользуясь табличными данными.

б) Разрушение комплекса при осаждении комплекссообразователя. Получите в пробирке комплексное соединение меди, добавив к нескольким каплям раствора сульфата меди 2 н. раствор аммиака (по каплям) до растворения выпадающего вначале осадка сульфата гидроксомеди $(\text{CuOH})_2\text{SO}_4$. Отметьте цвет полученного комплексного соединения и напишите уравнение взаимодействия сульфата меди с аммиаком (координационное число меди равно 4).

Добавьте к полученному раствору 2–3 капли раствора сульфида аммония. Какое вещество выпадает в осадок? Напишите уравнение диссоциации комплексной соли меди и ее комплексного иона. В каком направлении смещается равновесие диссоциации комплексного иона при действии $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ и почему? Что происходит при этом с комплексным соединением? Напишите уравнение реакции взаимодействия комплексной соли меди с сульфидом аммония.

в) Разрушение комплекса при образовании более прочного комплексного иона. Получите в пробирке хлорид серебра и растворите его в 25%-ном растворе аммиака.

Напишите уравнение получения комплексного соединения серебра (координационное число иона серебра равно 2), его электролитической диссоциации и диссоциации комплексного иона.

К раствору комплексной соли добавьте 2 н. раствор азотной кислоты до выпадения белого осадка хлорида серебра. Напишите молекулярное и ионное уравнения реакции взаимодействия молекул аммиака с азотной кислотой.

Как влияет образование более прочного комплексного иона на равновесие диссоциации комплексного иона серебра? Почему при этом снова выпадает в осадок хлорид серебра?

г) Диссоциация двойных солей. Внесите в пробирку три капли сульфата хрома и добавьте две капли 2 н. раствора щелочи. Выпадающий осадок тригидроксида хрома амфотерен и растворится, если добавить еще несколько капель щелочи.

Сделайте такой же опыт с раствором сульфата калия-хрома (III) (хромо-калиевых квасцов) $K_2Cr_2(SO_4)_6 \cdot 12H_2O$, представляющих собой двойную соль $K_2SO_4 \cdot Cr_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$.

Выпадает ли в этом случае осадок? Растворяется ли он в избытке щелочи? Проверьте в новых порциях сульфата хрома и раствора квасцов наличие ионов SO_4^{2-} , добавляя раствор хлорида бария. Учитывая результаты опыта, напишите уравнение диссоциации хромо-калиевых квасцов в растворе. Из каких двух солей можно получить эти квасцы? Какие ионы образуются при диссоциации простых солей?

Исследуйте еще две двойные соли: алюмо-калиевые квасцы $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ и соль Мора $(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$. Присутствие ионов Al^{3+} обнаруживается щелочью, Fe^{2+} обнаруживается по появлению синего окрашивания раствора от добавления 2–3 капель раствора $K_3[Fe(CN)_6]$.

Проведите эти реакции сначала с простыми солями. Запишите уравнения электролитической диссоциации обеих двойных солей.

Сформулируйте общность и различие между двойными солями и комплексными соединениями.

Контрольные вопросы и задачи

1. Определите степень окисления и координационное число комплексообразователя в следующих комплексных соединениях и запишите их названия:

- | | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| а) $K [AuBr_4]$ | ж) $H [Co (CN)_4 (H_2O)_2]$ |
| б) $K_2 [Cd (CN)_4]$ | з) $[Pt (NH_3)_5 Cl] Cl_3$ |
| в) $Ca [ZrF_6]$ | и) $Na_2 [Fe (CN)_5 NO]$ |
| г) $Na_3 [Ag (SCN)_4]$ | к) $Ba [Cu (SCN) (CN)_3]$ |
| д) $[Pt (NH_3)_2 Cl_2]$ | л) $[Cr (NH_3)_4 H_2O \cdot Br] Cl_2$ |
| е) $K [Pt (NH_3) Cl_5]$ | м) $K_4 [Mo (CN)_8]$ |

2. Определите величину и знак заряда комплексных ионов и составьте формулы комплексных соединений с приведенным катионом или анионом:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| а) $[Bi^{3+}I_4]$ | ж) $[Co^{3+} (NH_3)_2 (NO_2)_4]$ |
| б) $[Cr^{3+} (NH_3)_5 Cl]$ | з) $[Pd^{2+} (NH_3)_2 H_2O \cdot Cl]$ |
| в) $[Pd^{2+} (NH_3)_2 (CN)_2]$ | и) $[Pt^{2+} (NH_3)_3 NO_2]$ |
| г) $[Fe^{3+}F_2]$ | к) $[Ni^{2+} (CN)_4]$ |
| д) $[Hg^{2+} (SCN)_4]$ | л) $[Fe^{3+} (CN)_6]$ |
| е) $[Cr^{3+} (H_2O)_4 Cl_2]$ | м) $[Cr^{3+} (C_2O_4)_2 (OH)_2]$ |

3. Напишите координационные формулы следующих комплексных соединений и дайте обоснование выбора комплексообразователя:

- | | |
|--|--|
| а) $3\text{NaF} \cdot \text{AlF}_3$ | ж) $2\text{NH}_4\text{Br} \cdot \text{CuBr}_2 \cdot 2\text{NH}_3$ |
| б) $\text{SiF}_4 \cdot \text{BaF}_2$ | з) $3\text{NaCl} \cdot \text{IrCl}_3$ |
| в) $2\text{Ca}(\text{CN})_2 \cdot \text{Fe}(\text{CN})_2$ | и) $3\text{KCN} \cdot \text{Fe}(\text{CN})_3$ |
| г) $2\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ | к) $\text{Cd}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{NH}_3$ |
| д) $\text{CoCl}_3 \cdot 4\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | л) $\text{KCl} \cdot \text{PtCl}_4 \cdot \text{NH}_3$ |
| е) $2\text{KNO}_3 \cdot \text{HNO}_3 \cdot \text{Au}(\text{NO}_3)_3$ | м) $\text{KCN} \cdot \text{Co}(\text{CN})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |

4. Вычислите заряды ионов-комплексобразователей в следующих комплексных ионах:

- | | |
|--|---|
| а) $[\text{SnF}_6]^{2-}$ | ж) $[\text{Pt}(\text{SO}_3)_4\text{F}]^{3+}$ |
| б) $[\text{Au}(\text{CN})_2\text{Br}_2]^-$ | з) $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]^{2+}$ |
| в) $[\text{AuCl}_4]^-$ | и) $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ |
| г) $[\text{Pt}(\text{OH})_2]^{2-}$ | к) $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2\text{Cl}_2]^{4+}$ |
| д) $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ | л) $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{3+}$ |
| е) $[\text{Co}(\text{CN})_4(\text{H}_2\text{O})_a]^-$ | м) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6(\text{SCN})]^+$ |

5. Напишите уравнения диссоциации в растворе следующих комплексных соединений, учитывая, что координационные числа ионов платины и палладия в степени окисления +2 равны 4:

- | | |
|---|--|
| а) $\text{PtCl}_2 \cdot 4\text{NH}_3$ | е) $\text{PdCl}_2 \cdot 2\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| б) $\text{PtCl}_2 \cdot 3\text{NH}_3$ | ж) $\text{Pd}(\text{NO}_2)_2 \cdot 2\text{NH}_3$ |
| в) $\text{PtCl}_2 \cdot 2\text{NH}_3$ | з) $\text{Pd}(\text{CN})_2 \cdot 2\text{NH}_3$ |
| г) $\text{PtCl}_2 \cdot \text{NH}_3 \cdot \text{KCl}$ | и) $\text{Pt}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{NaOH}$ |
| д) $\text{PtCl}_2 \cdot 2\text{KCl}$ | |

6. Напишите названия следующих комплексных соединений:

- | | |
|--|--|
| а) $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_3(\text{SCN})_2]$ | ж) $\text{Na}_2[\text{Pt}(\text{CN})_4\text{Cl}_2]$ |
| б) $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{SCN})_2]\text{Cl}_3$ | з) $\text{Na}_3[\text{V}(\text{SCN})_6]$ |
| в) $\text{H}_2[\text{PtCl}_4(\text{OH})_2]$ | и) $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_3$ |
| г) $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_3$ | к) $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}]\text{Cl}$ |
| д) $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_4(\text{SCN})_2]\text{SCN}$ | л) $\text{K}_2[\text{SbBr}_2\text{Cl}]$ |
| е) $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$ | м) $\text{Ca}[\text{Al}(\text{OH})_5\text{H}_2\text{O}]$ |

7. Из каких молекул первого порядка состоят указанные ниже комплексные соединения (высшего порядка)?

- | | |
|--|---|
| а) $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ | е) $\text{H}[\text{Co}(\text{CN})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ |
| б) $\text{K}_3[\text{Co}(\text{CN})_6]$ | ж) $\text{Ca}[\text{Al}(\text{OH})_5\text{H}_2\text{O}]$ |
| в) $\text{Ba}_3[\text{Co}(\text{OH})_6]$ | з) $\text{H}_2[\text{PtCl}_4]$ |
| г) $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6](\text{OH})_2$ | и) $\text{Cr}_5[\text{Hg}(\text{SCN})_2\text{Br}_2]_3$ |
| д) $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$ | к) $\text{Na}_2[\text{FeNO}(\text{CN})_5]$ |

8. Известно, что из раствора комплексной соли $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{NH}_3$ нитрат серебра осаждает весь хлор, а из раствора $\text{CoCl}_3 \cdot 5\text{NH}_3$ только $\frac{2}{3}$ хлора. Исходя из этого, напишите координационные формулы обоих соединений и уравнения их диссоциации.

9. Какое основание является более сильным: $\text{Cu}(\text{OH})_2$ или $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4](\text{OH})_2$? Почему?

10. Какая кислота сильнее: HCN или $\text{H}[\text{Ag}(\text{CN})_2]$? Почему?

11. Степень гидролиза какой соли больше: ZnCl_2 или $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_2$? KCN или $\text{K}[\text{Ag}(\text{CN})_2]$?

12. Какой комплексный ион должен иметь большее значение константы нестойкости: а) $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ или $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$; б) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ или $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4]^{3+}$ в) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ или $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2-}$?

13. Какой комплексообразователь должен давать более прочные комплексы при одинаковых лигандах: а) Pt^{3+} или Pt^{2+} ; б) Ca^{2+} или Zn^{2+} ; в) Mg^{2+} или Ni^{2+} ; г) Zn^{2+} или Cd^{2+} ?

14. Напишите уравнения диссоциации в растворе комплексных соединений кобальта в степени окисления +3 с координационным числом 6: а) $\text{CoBr}_3 \cdot 4\text{NH}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; б) $\text{CoCl}_3 \cdot 4\text{NH}_3$; в) $\text{CoCl}_3 \cdot 4\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, а также уравнения реакций этих соединений с раствором нитрата серебра.

Термохимия

Работа 20. Термохимия

Приборы и реактивы. Калориметр. Технохимические весы. Набор ареометров. Мензурки на 25 мл. Карбонат натрия безводный. Хлорид калия. Бромид калия. Растворы: гидроксида натрия (1 н.), соляной кислоты (1 н.).

Опыт 1. Определение теплового эффекта процесса растворения безводной соли

Опыт проводится в упрощенном калориметре (рис. 2.24). Внутренний сосуд калориметра закрывается пробкой с тремя отверстиями: в первое из них вставлен термометр, во второе – мешалка, третье предназначено для внесения соли. Воздушная прослойка между двумя сосудами обеспечивает теплоизоляцию внутреннего сосуда, в котором происходит растворение, от окружающей среды.

Во внутренний сосуд налейте 25 мл дистиллированной воды комнатной температуры, отмеренной мензуркой. Опустите в воду (не касаясь дна сосуда) термометр и закрепите его в зажиме штатива. На технических весах отвесьте на листке пергаментной бумаги 1–1,2 г безводного карбоната натрия Na_2CO_3 с точностью до 0,01 г.

Измерьте температуру воды в калориметре с точностью до $0,1^{\circ}\text{C}$ – начальную температуру опыта. Сделайте из листка пергаментной бумаги маленькую воронку, вставьте ее в свободное отверстие пробки, аккуратно высыпьте через нее отвешенную соль в сосуд с водой и закройте отверстие пробкой.

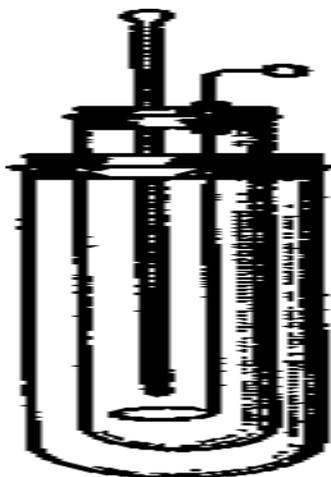


Рис. 2.24. Упрощенный калориметр для определения теплового эффекта реакции

Осторожно перемешивая раствор мешалкой, следите за изменением температуры в течение 5–7 мин. Записывайте показания термометра с точностью до $0,1^{\circ}$ первые 3 мин с интервалами в 0,5 мин, дальше через 1 мин по приведенной ниже форме (табл. 2.9).

Т а б л и ц а 2.9

Время от начала опыта, мин	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7
Температура, $^{\circ}\text{C}$	$t_{нач}$										

По полученным данным постройте кривую «температура – время», откладывая по оси абсцисс время в минутах, по оси ординат – температуру.

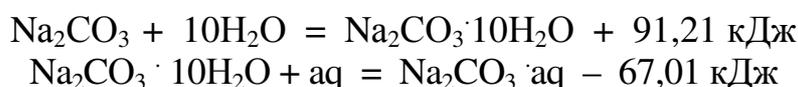
Определите по графику наивысшую температуру раствора $t_{\text{макс}}$ и вычислите разность температур: $\Delta t = (t_{\text{макс}} - t_{\text{нач}})$.

Зная общую массу раствора, равную сумме массы соли $m_{\text{соли}}$ и массы воды $m_{\text{H}_2\text{O}}$, приняв удельную теплоемкость раствора равной теплоемкости воды, т. е. 4,184 дж/г-град (1 кал/г-град), а его плотность равной единице, определите количество теплоты Q , выделяющейся при

растворении безводного карбоната натрия в пересчете на 1 моль безводной соли

$$Q = \frac{(m_{\text{соли}} + m_{\text{H}_2\text{O}}) \Delta t \cdot M_{\text{Na}_2\text{CO}_3} \cdot 4,184}{m_{\text{соли}} \cdot 1000} \text{ кДж/моль.}$$

Рассчитайте по закону Гесса теоретический тепловой эффект $Q_{\text{теор}}$ растворения безводного карбоната натрия и сравните его с тепловым эффектом Q , найденным опытным путем. Учтите, что при растворении безводной соли происходит ее гидратация и последующее растворение кристаллогидрата в воде. Процессы гидратации Na_2CO_3 и растворения получающегося десятиводного кристаллогидрата могут быть выражены следующими термохимическими уравнениями



Поэтому тепловой эффект процесса растворения $Q_{\text{теор}}$ равен алгебраической сумме теплоты гидратации безводной соли и теплоты растворения гидратированной соли.

Вычислите абсолютную и относительную ошибки опыта

$$\begin{aligned} \text{Абсолютная ошибка} &= Q_{\text{теор}} - Q. \\ \text{Относительная ошибка, \%} &= \frac{(Q_{\text{теор}} - Q) 100}{Q_{\text{теор}}}. \end{aligned}$$

Опыт 2. Определение теплоты реакции нейтрализации

В сухой внутренней сосуд калориметра (см. рис.2.24) налейте 25 мл 1 н. раствора гидроксида калия или натрия, точно отмеренного бюреткой или пипеткой. Опустите в раствор щелочи (не касаясь дна сосуда) термометр и измерьте температуру раствора с точностью до $0,1^\circ\text{C}$.

В небольшой стакан налейте 25 мл 1 н. раствора соляной кислоты и измерьте ее температуру (при хранении растворов щелочи и кислоты в одном помещении их температура должна быть одинакова).

Быстро, но осторожно, вылейте раствор соляной кислоты через стеклянную воронку во внутренний сосуд со щелочью и, перемешивая раствор мешалкой, наблюдайте за повышением температуры. Отметьте максимальную температуру раствора с точностью до $0,1^\circ$.

*Запись экспериментальных данных*Начальная температура, $t_{\text{нач}}$ Максимальная температура, t_{max}

$$\Delta t = t_{\text{max}} - t_{\text{нач.}}$$

По полученным экспериментальным данным сделайте следующие расчеты:

1. Определите количество теплоты Q (в Дж), выделившееся при нейтрализации 25 мл 1 н. раствора соляной кислоты щелочью, приняв плотность всех растворов равной единице, а теплоемкость равной теплоемкости воды, т. е. 4,184 Дж/г·град

$$Q = (T_{\text{щ}} - T_{\text{к}}) A \cdot 4,184 \text{ Дж/г} \cdot \text{град},$$

где $T_{\text{щ}}$ и $T_{\text{к}}$ – соответственно масса щелочи и масса кислоты (в г), равные их объемам (в мл), так как плотность растворов мы приняли равной 1 г/мл.

2. Составьте уравнение реакции нейтрализации и рассчитайте тепловой эффект нейтрализации 1 экв. кислоты (в кДж), учитывая, что 25 мл 1 н. раствора содержит 0,025 экв. кислоты

$$Q = q \cdot 0,025 \cdot 1000 \text{ кДж/экв},$$

3. Определите (в %) относительную ошибку опыта, если теоретическое значение теплового эффекта реакции нейтрализации 1 экв соляной кислоты сильной щелочью равно $\Delta H = -57,3 \text{ кДж/моль}$.

Контрольные вопросы и задачи

1. Что называется теплотой образования вещества? Теплотой разложения?

2. Какова зависимость между теплотой образования какого-либо химического соединения и теплотой его разложения?

3. Сформулируйте закон Гесса.

4. Как можно подсчитать тепловой эффект химической реакции, если известны теплоты образования исходных веществ и продуктов реакции?

5. Вычислите тепловой эффект реакции полного сгорания ацетилена C_2H_2 (стандартные теплоты образования см. приложение).

Ответ: $\Delta H = -2600,0 \text{ кДж}$ ($-621,22 \text{ ккал}$).

6. Вычислите тепловой эффект одной из реакций, протекающих в доменной печи $\text{Fe}_2\text{O}_3 + 3\text{CO} = 2\text{Fe} + 3\text{CO}_2 + \Delta H$. (стандартные теплоты образования см. приложение).

Ответ: $\Delta H = -27,29 \text{ кДж}$ ($-6,59 \text{ ккал}$).

7. Что такое теплота гидратации? Теплота растворения?

8. Теплота растворения какой соли больше: безводной CuSO_4 или $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$? Ответ мотивируйте.

9. Одинакова ли теплота нейтрализации: а) 1 эквивалента, б) 1 моля соляной, азотной и серной кислот сильной щелочью?

Окислительно-восстановительные процессы

Работа 21. Окислительно-восстановительные реакции

Приборы и реактивы. (Полумикрометод.) Газометр с хлором или прибор для получения хлора. Прибор для получения сероводорода. Гвоздь. Сульфид свинца. Диоксид марганца. Сурьма. Цинк. Сульфит натрия. Диоксид свинца. Нитрит калия. Сульфид железа. Нитрат свинца. Пероксид натрия. Карбонат натрия. Пероксодисульфат аммония или калия. Крахмальный клейстер. Спирты этиловый, метиловый, пропиловый. Сероводородная вода. Йодная вода. Растворы: серной кислоты (2 и 4 н., пл. $1,84 \text{ г/см}^3$), соляной кислоты (пл. $1,19 \text{ г/см}^3$), азотной кислоты (0,2 и 2 н.), едкого натра или калия (2 н.), гидроксида аммония (2 н.), уксусной кислоты (2 н.), сульфата меди (0,5 н.), сульфита натрия (0,5 н.), трихлорида сурьмы (0,5 н.), дихромата калия (0,5 н.), арсенита натрия (0,5 н.), гидрокарбоната натрия (0,5 н.), перманганата калия (0,05 н.), роданида аммония (0,01 н.), дихлорида олова (0,5 н.), нитрата ртути (0,5 н.), нитрата свинца (0,5 н.), нитрата серебра (0,1 н.), формальдегида (10%-ный), пероксида водорода (3%-ный), хлорида бария (0,5 н.), щавелевой кислоты, лакмуса.

Опыт 1. Электростатические и электродинамические химические реакции

В две пробирки внесите по 2–3 капли раствора серной кислоты. В одну из них добавьте столько же капель раствора хлорида бария, в другую бросьте кусочек цинка. Что представляет собой осадок, выпавший в первой пробирке? Какой газ выделяется во второй?

Возьмите в пробирку 2–3 капли 0,1 н. раствора соляной кислоты и одну каплю лакмуса. Отметив полученный цвет лакмуса, добавляйте по каплям раствор гидроксида натрия до возвращения к первоначальной окраске. В другую пробирку внесите 2–3 капли концентрированной соляной кислоты (пл. $1,19 \text{ г/см}^3$) и несколько кристаллов перманганата

калия KMnO_4 . Продуктами реакции являются хлор, хлорид марганца (II), хлорид калия и вода.

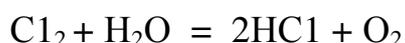
Возьмите в одну пробирку 1–2 микрошпателя растертого в порошок карбоната свинца PbCO_3 , в другую столько же нитрата свинца $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Поочередно, закрепив пробирки наклонно в штативе, нагревайте пламенем горелки до изменения цвета взятых веществ. В первой пробирке выделяется диоксид углерода CO_2 , во второй – диоксид азота NO_2 и кислород. В обоих случаях в пробирках остается оксид свинца PbO .

Напишите уравнения реакции для каждого из этих опытов. Укажите, какие из них относятся к окислительно-восстановительным. По какому признаку это определяется? Какие вещества являются окислителями? Восстановителями?

Опыт 2. Зависимость окислительно-восстановительных свойств элементов от их положения в периодической системе элементов Д. И. Менделеева

а) Изменение окислительно-восстановительных свойств элементов в малых периодах таблицы Д. И. Менделеева. Приготовьте три цилиндрические пробирки с дистиллированной водой (по 8–10 капель в каждой). В первую внесите 1–2 микрошпателя порошка магния, во вторую пропускайте в течение 1–2 мин медленный ток хлора (см. рис. 2.25), в третью опустите кусочек металлического натрия (величиной с рисовое зерно). Наблюдайте выделение водорода при комнатной температуре в третьей пробирке.

Две другие пробирки закрепите по очереди в штативе и, нагревая маленьким пламенем горелки, отметьте выделение водорода при действии на воду магния и выделение кислорода при действии хлора по схеме



Напишите уравнения всех трех реакций. Укажите окислитель и восстановитель. Как изменяются окислительные и восстановительные свойства у элементов второго периода периодической системы от I группы к VII? Как изменяются у этих же элементов величины электроотрицательности?

б) Изменение окислительных свойств элементов в подгруппе VIIA периодической системы. Приготовьте в штативе четыре пробирки: две с сероводородной водой, две с раствором бромид калия (по 3–5 капель в каждой). Прибавьте в одну из пробирок с сероводородной водой и в одну из пробирок с бромидом калия по несколько капель хлорной воды. Отметьте появление мути (элементарной серы) в

первой пробирке и желтой окраски (брома) во второй. Напишите уравнения реакций и укажите окислитель. В две оставшиеся пробирки добавьте йодной воды. Появились ли в них свободная сера и бром? Напишите уравнение соответствующей реакции.

У какого элемента окислительная способность выше – у хлора или у йода? Как зависит окислительная способность от величины сродства к электрону? Какой окислительной способностью должен обладать бром по сравнению с хлором и йодом? Как изменяется окислительная способность элементов подгруппы VIIA при переходе от хлора к йоду? От чего это зависит?

в) Взаимодействие магния с кислородом. Кусочек ленты магния длиной 5–6 см очистите от оксидной пленки наждачной бумагой, протрите фильтровальной бумагой и тигельными щипцами внесите в пламя горелки. Когда магний загорится, держите его над листком черной бумаги.

Какое вещество получено при горении магния?

Напишите уравнение реакции и укажите переход электронов. Окислителем или восстановителем является магний? Кислород?

г) Взаимодействие йода с алюминием. В фарфоровый тигель поместите по 2–3 микрошпателя мелко растертого йода и порошка алюминия. Тщательно перемешайте смесь стеклянной палочкой и внесите пипеткой 2–3 капли дистиллированной воды (катализатор). Отметьте явления, сопровождающие реакцию образования йодида алюминия. Напишите уравнение реакции и укажите окислитель и восстановитель. Окислителем или восстановителем являлись металл и неметалл?

Опыт 3. Простые вещества и элементарные ионы в качестве окислителей и восстановителей

а) Взаимодействие металлического железа с ионом водорода. В пробирку с 3–4 каплями раствора серной или соляной кислоты опустите несколько кусочков чистого железа. Отметьте выделение водорода. Укажите окислитель и восстановитель.

б) Взаимодействие металлического цинка с ионом меди Cu^{2+} . Кусочек металлического цинка опустите в раствор сульфата меди (5–6 капель). Как изменились поверхность цинка и цвет раствора? Составьте схему перехода электронов.

в) Взаимодействие брома с ионом S^{2-} . К 2–4 каплям бромной воды добавьте 1–2 капли органического растворителя (бензола, сероуглерода или хлороформа). Перемешайте стеклянной палочкой и отметьте полученную окраску органического растворителя.

Введите несколько капель сульфида натрия. Наблюдайте, как изменилась окраска растворителя. Что произошло с бромом?

г) **Взаимодействие хлора с сурьмой.** Наполните пробирку хлором из газометра (см. рис. 2.25), закройте ее, пробкой и укрепите вертикально в штативе. Микрошпателем возьмите из реактивной склянки немного порошка металлической сурьмы и, открыв пробку, высыпьте его в хлор. Каким эффектом характеризуется реакция сурьмы с хлором?

Напишите уравнения протекающих реакций, укажите окислитель и восстановитель.

Какие функции могут выполнять в окислительно-восстановительных реакциях свободные металлы? Свободные неметаллы? Элементарные ионы металлов? Элементарные ионы неметаллов?

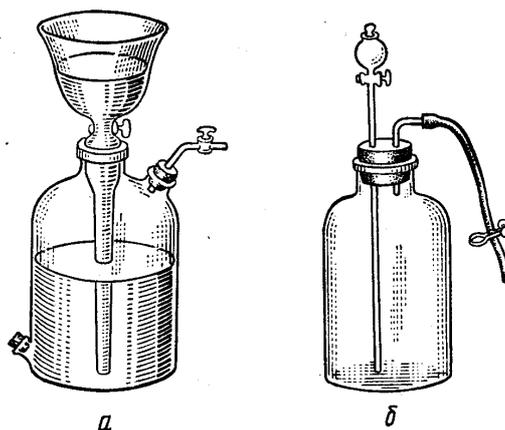


Рис. 2.25. Газометры

Опыт 4. Сложные ионы и молекулы в качестве окислителей и восстановителей.

Влияние pH среды на окислительно-восстановительный процесс

а) **Окисление дигидроксида марганца бромной водой.** Прибавьте в пробирку к 2–4 каплям сульфата марганца (II) такое же количество гидроксида натрия. Отметьте цвет осадка дигидроксида марганца. Полученную суспензию перенесите в тигель и слабым нагреванием испарите часть воды. К влажному осадку добавьте несколько капель бромной воды. Как изменился цвет осадка? Напишите в молекулярной форме уравнение реакции окисления дигидроксида

марганца до диоксида марганца MnO_2 , учитывая, что в реакции принимает участие гидроксид натрия.

б) Взаимодействие цинка с перманганатом калия в кислой и щелочной среде. В две пробирки, содержащие по 5–6 капель раствора перманганата калия $KMnO_4$ и по одному микрошпателю цинковой пыли, добавьте по 5–6 капель: в первую – раствора серной кислоты, во вторую – раствора щелочи. Содержимое пробирок тщательно размешайте стеклянными палочками и, дав избытку цинка осесть, отметьте изменение цвета раствора в каждой пробирке.

Напишите уравнения соответствующих реакций, учитывая, что фиолетовая окраска раствора характерна для иона MnO_4^- , зеленая – для иона MnO_4^{2-} , слабо-розовая, почти бесцветная, – для иона Mn^{2+} .

в) Взаимодействие перманганата калия с нитритом калия при различных величинах pH раствора. В три пробирки внесите по 3–4 капли раствора перманганата калия $KMnO_4$. В первую (чтобы получить pH раствора < 7) добавьте 2–3 капли раствора серной кислоты, во вторую ($pH > 7$) добавьте 2–3 капли раствора щелочи, в третьей пробирке pH равно 7.

Затем в каждую из пробирок внесите по два микрошпателя кристаллического нитрита калия KNO_2 и тщательно размешайте стеклянными палочками до полного растворения кристаллов. Через некоторое время отметьте изменение окраски растворов во всех трех пробирках. Напишите уравнения соответствующих реакций, учитывая, что фиолетовая окраска характерна для иона MnO_4^- , зеленая – для иона MnO_4^{2-} , слабо-розовая, почти бесцветная, – для иона Mn^{2+} , осадок бурого цвета характеризует диоксид марганца MnO_2 и тетрагидроксид $Mn(OH)_4$. Для каждой реакции составьте схему перехода электронов.

Примечание. В первой пробирке при $pH < 7$ могут выделяться газообразные оксиды азота, которые получаются как побочные продукты при взаимодействии нитрита калия с кислотой. В основном уравнении эта побочная реакция не учитывается.

Опыт 5. Окислительно-восстановительные свойства элемента в зависимости от его степени окисления

На основании экспериментальных данных, которые получите при проведении описанных ниже опытов, сделайте вывод: окислителями или восстановителями могут быть в химических реакциях атомы элементов с отрицательным окислительным числом?

Полностью окисленные (в высшей степени окисления)? В промежуточной степени окисления? Дайте теоретическое обоснование.

а) Действие серной кислоты и сероводорода на йодид калия. В две пробирки с раствором йодида калия KI (по три капли в каждой) прибавьте по 2–3 капли: в первую – концентрированной серной кислоты, во вторую – свежеприготовленной сероводородной воды. Как объяснить появление желтой окраски йода только в одной из пробирок? Напишите уравнение реакции, считая, что серная кислота восстанавливается до сероводорода.

б) Взаимодействие сульфита натрия с сероводородом. Следует ли ожидать протекания окислительно-восстановительного процесса, если к 3 каплям раствора сульфита натрия Na_2SO_3 , подкисленного 3 каплями серной кислоты, добавить несколько капель свежеприготовленного раствора сероводородной воды? Проверьте свое предположение опытом.

Напишите уравнение реакции, учитывая, что сера в обоих соединениях переходит в свободное состояние. Укажите окислитель и восстановитель.

в) Влияние степени окисления серы на характер взаимодействия ее с перманганатом калия. В три пробирки внесите по три капли растворов перманганата калия KMnO_4 и 0,1 н. серной кислоты. Отметив окраску полученного раствора, добавьте в первую пробирку свежеприготовленной сероводородной воды, во вторую – кристалл сульфита натрия Na_2SO_3 , а третью – несколько капель концентрированной серной кислоты (пл. $1,84 \text{ г/см}^3$). Размешайте содержимое всех пробирок стеклянными палочками и установите по изменению окраски, между какими веществами протекала реакция.

Напишите соответствующие уравнения реакций, учитывая, что практически бесцветным является ион Mn^{2+} , помутнение раствора в первой пробирке обусловлено выделением серы. В каждом случае укажите окислительное число серы и ее роль в данном окислительно-восстановительном процессе. Почему в одной из пробирок не протекало реакции.

Опыт 6. Влияние окислительно-восстановительных потенциалов на ход химического процесса

а) Сравнение восстановительных соединений олова (II) и железа (II). В две пробирки с 5 каплями раствора нитрата ртути $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ добавьте в каждую: в одну 2 – 3 капли раствора сульфата железа (II), в другую – столько же хлорида олова (II). Тщательно перемешайте растворы солей стеклянными палочками и отметьте изменение в каждой из пробирок. Полученный в одной из пробирок белый осадок представляет собой хлорид ртути (I) Hg_2Cl_2 , черный осадок в другой – порошок металлической ртути. Напишите уравнение реакции.

У какого иона Fe^{2+} или Sn^{2+} более сильная восстановительная способность?

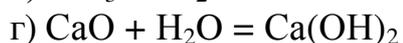
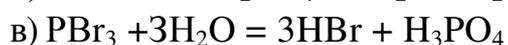
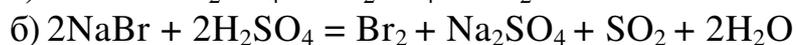
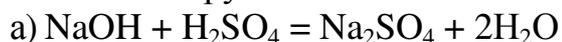
а) Восстановление перманганата калия метиловым спиртом. Возьмите в пробирку 5–6 капель перманганата калия KMnO_4 , 2–3 капли 2 н. соляной кислоты, 3–4 капли метилового спирта CH_3OH и опустите пробирку в стакан с горячей водой. Как меняется цвет раствора? Напишите уравнение реакции, учитывая, что перманганат калия переходит в сульфат марганца (II), а метиловый спирт окисляется в муравьиный альдегид (формальдегид) HCOH , который можно обнаружить по его характерному запаху. Продуктом окисления каких спиртов являются альдегиды?

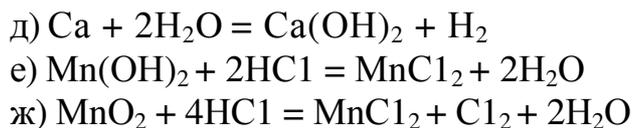
б) Восстановление бихромата калия пропиловым спиртом. В пробирку с раствором дихромата калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (5–7 капель), подкисленным 2–3 каплями концентрированной серной кислоты (пл. 1,84 г/см³), внесите 5–7 капель вторичного пропилового спирта $\text{CH}_3\text{—CH(OH)—CH}_3$. Нагревайте осторожно на пламени горелки до изменения оранжевого цвета раствора на зеленый, характерный для иона Cr^{3+} . Обратите внимание на запах образовавшегося диметилкетона (ацетона). Напишите уравнение реакции. Окисление каких спиртов сопровождается образованием кетонов?

в) Взаимодействие щавелевой кислоты с перманганатом калия. Внесите в пробирку 5–7 капель раствора щавелевой кислоты $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (двухосновная карбоновая кислота HOOC—COOH) и столько же раствора 2 н. соляной кислоты. Подогрейте раствор, опустив пробирку в стакан с горячей водой ($t = 70\text{--}80^\circ\text{C}$) на 4–5 мин. Выньте пробирку и прибавьте несколько капель раствора перманганата калия, встряхивая раствор после каждой капли до обесцвечивания перманганата. Окислителем или восстановителем является KMnO_4 , если известно, что практически бесцветным в кислых разбавленных растворах является ион Mn^{2+} ? Обратите внимание на выделение диоксида углерода CO_2 , являющегося вторым продуктом реакции. Сколько электронов отдает молекула щавелевой кислоты? Напишите уравнение реакции.

Контрольные вопросы и задачи

1. Какие из приведенных ниже уравнений реакций являются окислительно-восстановительными? Укажите в них окислитель и восстановитель. Ответ мотивируйте.





2. Пользуясь периодической системой Д.И. Менделеева, укажите, как будут изменяться восстановительные свойства атомов в группе галогенов и в группе щелочноземельных металлов.

3. Между какими из элементов Fe, S, Br, Na, Cs, I, Se, Ba могут протекать окислительно-восстановительные процессы? Напишите схему этих процессов. Окисляется или восстанавливается при этом каждый из элементов, превращаясь в ион?

4. Приведите электронные структуры: атома Ca и иона Ca^{2+} , Se и Se^{2-} , Al и Al^{3+} , Sn и Sn^{2+} . Укажите, какие процессы происходят при переходе этих атомов в ионы. Какие ионы получают конфигурации инертных газов и каких?

5. Как изменяется окислительное число окислителя в окислительно-восстановительном процессе?

6. Как изменяется окислительное число восстановителя в окислительно-восстановительном процессе?

7. Окисление или восстановление происходит при переходах: а) $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ для азота; б) $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \rightarrow \text{CrSO}_4$ для хрома; в) $\text{MnSO}_4 \rightarrow \text{KMnO}_4$ для марганца; г) $\text{KMnO}_4 \rightarrow \text{K}_2\text{MnO}_4$ для марганца?

8. Какие из перечисленных ниже веществ могут проявлять только окислительные свойства, только восстановительные, как окислительные, так и восстановительные?

- а) HClO_4 ; KCl_3 ; NaBr ; Fe;
 б) CaCl_2 ; FeCl_3 ; Cl_2 ; PH_3 ;
 в) TiO_2 ; Na_2S ; S; Cu.

9. Какие окислительные числа имеют в соединениях следующие элементы: хлор в Cl_2O ; кальций в CaO ; кремний в SiO_2 ?

10. Пользуясь таблицей стандартных окислительно-восстановительных потенциалов, укажите:

а) какой ион является более сильным окислителем при прочих равных условиях: Fe^{3+} или Fe^{2+} ? IO^- или IO_3^- ?

б) в каком направлении должна протекать при стандартных условиях реакция $2\text{Fe}^{3+} + 2\text{I}^- = \text{I}_2 + 2\text{Fe}^{2+}$?

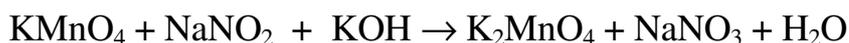
в) в чем можно окислить ион Cr^{3+} до CrO_4^{2-} ?

11. Взаимодействие перманганата калия с нитритом натрия протекает по схемам:

а) в кислой среде

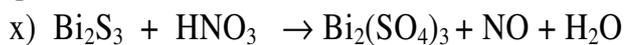
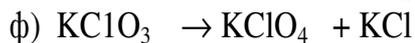
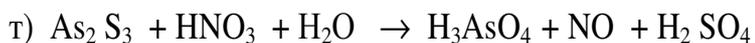
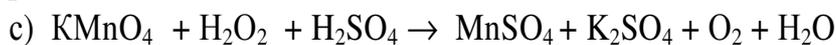
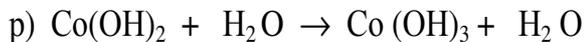
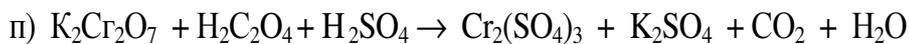
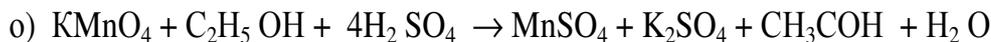
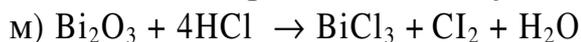
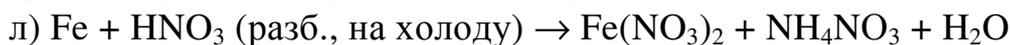
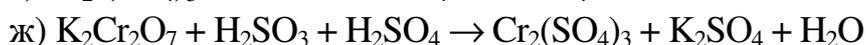
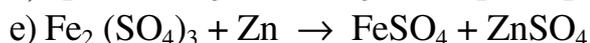
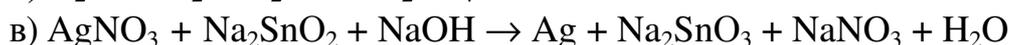
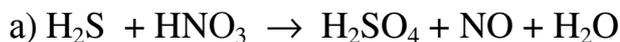


б) в щелочной среде



Подберите коэффициенты и вычислите эквиваленты перманганата калия и нитрата натрия в этих реакциях.

12. Вычислите молярный эквивалент сульфата титана (III) $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ в реакции. Подберите коэффициенты в следующих окислительно-восстановительных реакциях и укажите окислители и восстановители:



Электрохимические процессы

Работа 22. Гальванические элементы. Электролиз водных растворов

Приборы и реактивы (Полумикрометод.) Детали для сборки гальванического элемента. Микростаканчики. Подставка для прибора. Электролитный мостик. Медная, железная, цинковая и никелевая пластинки или проволоки. Цинковая, железная, оловянная, свинцовая и медная узкие полоски. Звонковый провод. Наждачная бумага. Батарея карманного электрического фонаря. П-образная трубка. Графитовые стержни (2 шт.). Никелевая пластинка. Фенолфталеин. Крахмальный клейстер (свежеприготовленный). Растворы: сульфата цинка (0,5 н., 1 М), сульфата железа (II) (0,5 в.), хлорида олова (II) (0,5 н.), нитрата или ацетата свинца (0,5 н.),

сульфата меди (0,5 н., 1 М), нитрата серебра (0,1 н.), серной кислоты (2 н., 4 н.), йодида калия (0,4 н.), сульфата натрия (0,5 н.), сульфата или хлорида титана (IV) (0,5 н.), едкого натра или калия (15%-ный), хлорида алюминия (1 М), сульфата никеля (1 М).

Электролитный мостик изготавливают следующим образом: П-образную трубку наполняют концентрированным горячим раствором хлорида калия, в который добавлен агар-агар; после охлаждения раствор становится студенистым – мостик пригоден для работы.

Опыт 1. Количественное определение различной электрической активности металлов

Установите опытным путем относительную активность шести металлов: меди, железа, олова, свинца, серебра и цинка. Для этого возьмите 6 пробирок, внесите в каждую из них по 12 – 15 капель одного из следующих растворов: соли меди (II), соли железа (II), соли свинца (II), соли серебра, соли олова (II), соли цинка. Во все растворы, за исключением раствора соли меди, опустите на 2 – 3 мин по узкой пластинке или проволочки металлической меди. В какой пробирке красная пластинка меди покрылась налетом другого металла? Что это за металл, оказавшийся менее активным, чем медь. Напишите в ионном виде уравнение реакции взаимодействия меди с ионом этого металла.

Выньте из пробирок медные полоски или проволочки и опустите во все растворы, за исключением раствора соли железа, железные полоски. Какие металлы вытесняются из растворов солей железом? Напишите уравнения реакций взаимодействия железа с ионами этих металлов. Укажите в каждом случае переход электронов и роль железа в протекающих реакциях. Какова восстановительная активность железа по сравнению с вытесненными металлами?

Проведите аналогичные опыты с полосками свинца, серебра, олова и цинка. Наблюдайте каждый раз, в каких пробирках происходит вытеснение металла из его соли. Напишите уравнение протекающих реакций с указанием направления перехода электронов. Результаты наблюдений запишите в нижеследующей форме (табл. 2.10).

Знаком «+» под соответствующими ионами металлов обозначьте вытеснение металлов из растворов соли при действии того или другого металла и знаком «-» тот случай, когда вытеснения не происходит.

Какой из исследованных металлов самый активный и вытеснил все остальные из их солей? Какой металл наименее активный? Расположите все остальные исследованные металлы между ними в порядке убывающей активности. Соответствует ли составленный вами ряд последовательности расположения металлов в ряду нормальных электродных потенциалов?

Принимая электронный потенциал водорода равный 0, поместите водород в полученный ряд активности. Какие из исследованных металлов могут вытеснить водород из разбавленных кислот?

Т а б л и ц а 2.10

Опускаемый металл	Ионы металлов в растворе					
	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Pb^{2+}	Ag^+	Sn^{2+}	Zn^{2+}
Cu Fe Pb Ag Sn Zn						

Опыт 2. Гальванические элементы

а) Изготовление медно-цинкового гальванического элемента. В один микростакан (рис. 2.26) налейте почти доверху 1 М раствор сульфата цинка и опустите в него цинковую пластинку, в другой налейте 1 М раствор сульфата меди и опустите медную пластинку. Оба элемента поставьте на подставку и соедините растворы электролитным мостиком, заполненным насыщенным раствором хлорида калия в смеси с агар-агаром. Звонковым проводом соедините опущенные пластинками с гальванометром. Наблюдайте отклонение стрелки гальванометра, указывающее на возникновение электрического тока, обусловленное различной величиной электродных потенциалов Zn/Zn^{2+} и Cu/Cu^{2+} . Выпишите нормальные электродные потенциалы цинкового и медного электродов и укажите направление движения электронов во внешней цепи. Напишите уравнение химических реакций, протекающих на электродах, и суммарное уравнение окислительно-восстановительного процесса, в результате которого возникает электрический ток в данном гальваническом элементе.

По вышеописанным значениям нормальных электродных потенциалов вычислите э.д.с. медно-цинкового гальванического элемента.

б) Изготовление цинково-никелевого гальванического элемента. Найдите по таблицам нормальные электродные потенциалы цинкового Zn/Zn^{2+} и никелевого Ni/Ni^{2+} электродов, а также электрода, который можно составить из них .

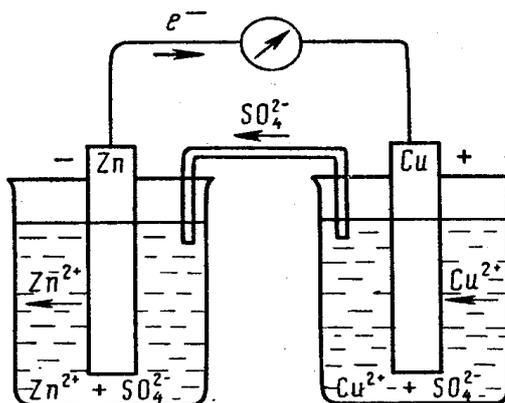


Рис. 2.26. Схема гальванического элемента

Объясните различную интенсивность выделения водорода в двух пробирках, учитывая, что цинк с медью образует микрогальванический полуэлемент. Напишите уравнение реакций, протекающих на каждом электроде. В каком направлении должны переходить электроны во внешней цепи? Проверьте ваше заключение опытом. Для этого заполните один из полумикро стаканчиков (см. рис. 2.26) 1 М раствором сульфата цинка и опустите в него полоску цинка. Другой стаканчик заполните 1 М раствором NiSO_4 и опустите в него полоску никеля. Соедините стаканчики электролитным мостиком. Соедините пластинки с гальванометром и отметьте направление тока. Вычислите э.д.с. цинково-никелевого гальванического элемента.

Опыт 3. Влияние образования микрогальванических элементов на течение химических процессов.

В две пробирки внесите по 5–6 капель раствора 2 н. серной кислоты. В одну из пробирок добавьте каплю раствора сульфата меди. В обе пробирки опустите по куску чистого цинка (без примесей). Наблюдайте более интенсивное выделение водорода в той пробирке, в которую был добавлен сульфат меди. Что появилось на поверхности цинка в присутствии CuSO_4 ?

Объясните различную интенсивность выделения водорода в двух пробирках, учитывая, что цинк с медью образует микрогальванический элемент – микрогальванопару. Каково направление перехода электронов в паре цинк – медь? Какой металл будет иметь отрицательный заряд и являться катодом для ионов водорода, имеющихся в растворе?

Это же явление можно наблюдать в опыте, поставленном следующим образом. Внесите в пробирку 5–6 капель 2 н. серной кислоты и кусочек

чистого цинка (без примесей). Наблюдается ли выделение водорода? Коснитесь цинка медной проволокой и наблюдайте интенсивное выделение водорода. Обратите внимание, на каком из металлов выделяется водород. Выньте медную проволоку из пробирки и убедитесь, что интенсивность выделения водорода снова уменьшилась. Объясните, какова роль меди, в присутствии которой водород выделяется интенсивнее.

Опыт 4. Электролиз водных растворов с нерастворимым анодом

Опыты по электролизу водных растворов как с нерастворимыми (инертными) электродами, так и с растворимым анодом проводят в приборе, изображенном на рис. 2.27. Электролизер *1* представляет собой стеклянную U-образную трубку высотой 5–6 см и диаметром 0,6 см. Electroдами *2* служат графитовые стержни (из карандаша) или проволоки из соответствующих металлов, вставленные в резиновые пробки. Пробки в электролизер вставляйте неплотно. Источником тока является батарейка *3* карманного электрического фонаря. Во всех опытах электролизер заполняется раствором электролита на $\frac{2}{3}$ своего объема. Электролизер и электроды перед каждым опытом тщательно промывают дистиллированной водой.

а) Электролиз хлорида олова (II). Налейте в электролизер раствор хлорида олова (II). Опустите в оба колена графитовые электроды и соедините их звонковым проводом (или медной проволокой) с электрической батарейкой. Через 1–2 мин наблюдайте на графитовом катоде появление блестящих кристалликов металлического олова. Напишите уравнение катодного процесса.

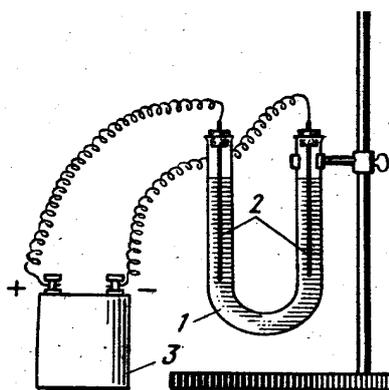


Рис. 2.27. Полумикроэлектролизер.
1 – U-образная трубка (электролизер);
2 – электроды; *3* – батарея

Окисление или восстановление ионов Sn^{2+} происходит на катоде? Докажите образование свободного хлора в анодном пространстве. Для этого после 4–5 мин пропускания тока выньте из электролизера графитовый анод, прибавьте в раствор по 3–4 капли раствора йодида калия и крахмала и наблюдайте появление синего окрашивания раствора. Напишите уравнение анодного процесса. Окисление или восстановление ионов Cl^- происходит на аноде? Почему изменилась окраска раствора в анодном пространстве при добавлении йодида калия и крахмала?

б) Электролиз йодида калия. Налейте в пробирку на $3/4$ ее объема раствор йодида калия и добавьте по 5–6 капель фенолфталеина и крахмального клейстера. Перемешайте раствор и перелейте в электролизер. Опустите в оба колена электролизера графитовые электроды и подключите их к электрической батарее. Почему на катоде не выделяется металлический калий? Появление каких ионов в процессе электролиза обусловило окрашивание в красный цвет раствора в катодном пространстве? Напишите уравнение катодного процесса. Что произошло с йодид-ионами на аноде? Чем обусловлено синее окрашивание раствора в анодном пространстве? Напишите уравнение анодного процесса.

Примечание. Для более полного удаления йода с графитового анода промойте его после опыта раствором гипосульфита, а затем дистиллированной водой.

в) Электролиз сульфата натрия. Налейте в коническую микропробирку до половины ее объема раствор сульфата натрия и примерно $1/4$ пробирки нейтрального раствора лакмуса. Раствор перемешайте, вылейте в электролизер и, опустив электроды, подключите прибор к электрической батарее. Наблюдайте на обоих электродах выделение газа и изменение окраски в обоих коленах электролизера. Какие ионы окрасили лакмус в катодном пространстве в синий цвет? В анодном пространстве в красный цвет?

Напишите уравнения катодного и анодного процессов, протекающих при электролизе водного раствора Na_2SO_4 . Какой газ выделялся на катоде? На аноде?

г) Изготовление полюсоопределителей. Присоедините к каждому электроду батарейки по кусочку звонкового провода. На фильтровальную бумагу нанесите 2–3 капли хлорида или сульфата натрия, добавьте 1–2 капли фенолфталеина и прижмите свободные концы звонкового провода к влажной фильтровальной бумаге на некотором расстоянии друг от друга. Наблюдайте появление красного окрашивания около одного из проводов.

На катод или анод батарейки указывает появление красной окраски? Напишите уравнение реакции, объясняющей действие данного полюсоопределятеля.

На другой листок фильтровальной бумаги нанесите три капли раствора йодида калия и одну каплю свежеприготовленного крахмала. Прижмите свободные концы звонкового провода к влажной фильтровальной бумаге и наблюдайте около одного провода появление синего (почти черного) окрашивания. У какого полюса оно появилось?

д) Катодное восстановление титана (IV). Налейте в электролизер бесцветный раствор сульфата или хлорида титана (IV), опустите графитовые электроды и присоедините их к электрической батарее. Наблюдайте в одном колене электролизера окрашивание раствора в фиолетовый цвет, характерный для иона Ti^{3+} . Окисление или восстановление претерпел титан? На катоде или на аноде это произошло? Проверьте свое предположение при помощи полюсоопределятеля и напишите уравнение электродного процесса.

Опыт 5. Электролиз водных растворов с растворимым анодом

а) Электролиз соли меди с медным анодом. Налейте в электролизер раствор сульфата меди. Опустите в одно колено электролизера графитовый электрод и соедините его с катодом электрической батарейки.

В другое колено опустите медный электрод, который будет служить анодом, и присоедините его к положительному полюсу батарейки. Через 2–3 мин наблюдайте на графитовом катоде появление красного налета меди и кажущиеся отсутствие какой-либо реакции на аноде. Выньте электроды и поменяйте их местами: медный анод сделайте катодом, а графитовый с имеющимся на нем налетом меди – анодом. Что произошло с налетом меди на графитовом аноде через несколько минут пропускания тока? Обратите внимание на то, что после полного растворения налета меди на аноде начал выделяться газ.

Напишите уравнение реакций, протекающих на катоде и на аноде: а) в начале опыта, б) после того, как электроды поменяли местами. Какой газ выделялся на графитовом аноде после исчезновения медного налета?

б) Электролиз солей никеля с никелевым анодом. Налейте в электролизер раствор сульфата никеля, опустите в него графитовые электроды и присоедините их к электрической батарейке. Какое вещество выделится на катоде через несколько минут электролиза? Выделяется ли газ на аноде? Напишите уравнения реакции катодного и анодного процессов с графитовыми электродами.

Выньте электроды и поменяйте их местами, вследствие чего анодом окажется никелированный графит. Наблюдайте на аноде постепенное растворение никеля и отсутствие выделения газа. Напишите уравнение анодного процесса, протекающего при электролизе с никелевым анодом (никелированным графитом).

Работа 23. Коррозия и защита металлов

Опыт 1. Химическая и электрохимическая коррозия

Приборы и реактивы. Маленький стаканчик или бюкс. Пинцет. Тигель с крышкой. Наждачная бумага. Тигельные щипцы Пробирки. Цинк гранулированный (х. ч). Олово. Натрий. Уротропин. Медная проволока. Йод кристаллический. Железная проволока. Цинк. Растворы сульфата железа (II) (0,5 н), гексациано(III)феррата калия (0,5 н), соляной кислоты (2 н), серной кислоты (0,2 н).

а) Коррозия натрия на воздухе. Получите у лаборанта на фильтровальную бумагу кусочек натрия (н е т р о г а т ь р у к а м и). Положите фильтровальную бумагу с натрием на стол и, придерживая пинцетом, разрежьте кусочек пополам. Обратите внимание на блестящую поверхность свежего среза металла. Один кусочек верните лаборанту, фильтровальную бумагу с другим кусочком поместите в сухой стакан и оставьте на 20 – 30 мин. Почему снова потускнела поверхность натрия в месте разреза металла? Напишите уравнение реакции химической коррозии натрия при взаимодействии с кислородом воздуха.

б) Коррозия меди при контакте с йодом. Положите в тигель несколько кристалликов йода. Медную проволоку очистите тонкой наждачной бумагой и прикрепите к ушку на крышку тигля. Накройте тигель крышкой так, чтобы ушко с медной проволокой находилось внутри тигля. Поставьте (п о д т я г о й) тигель на кольцо штатива и слегка нагрейте. Через 2 – 3 мин прекратите нагревание, дайте тиглю остыть и снимите с него крышку. Как изменилась поверхность медной проволоки? Напишите уравнение химической коррозии меди в среде йода, вызвавшей образование соли Cu_2I_2 на поверхности меди.

в) Электрохимическая коррозия оцинкованного и луженого железа. Внесите в пробирку 4 – 5 капель раствора соли железа (II) – FeSO_4 или соли Мора – $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, добавьте 1 – 2 капли гексациано(III)феррата калия – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и наблюдайте появление синего окрашивания раствора вследствие образования турбуленовой сини $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$.

Налейте в чистую пробирку на $\frac{3}{4}$ ее объема дистиллированной воды и добавьте по 4 – 5 капель раствора 2 н. серной кислоты и гексациано(III)феррата калия. Раствор перемешайте и отлейте половину его во вторую пробирку.

Две железные проволоочки очистите наждачной бумагой. Концом одной плотно обмотайте кусочек цинка, другой – кусочек олова. Опустите каждую проволочку в одну из пробирок с приготовленным раствором. Через несколько минут наблюдайте появление синего окрашивания раствора, в который погружена проволочка с оловом. Объясните образование ионов Fe^{2+} в этом растворе, учитывая, что железо и олово образуют гальваническую пару. На поверхности какого металла выделяется в этом случае водород? Почему не появилась синяя окраска в растворе, в который была опущена проволока с цинком? Дайте схему перехода электронов в гальванической паре железо – цинк. Ионы какого металла переходят в раствор в данном случае? Почему? Составьте схему электрохимической коррозии луженого и оцинкованного железа, сопровождающейся образованием микрогальванопар. В каком случае при местном разрушении защитного покрытия (цинка или олова) будет происходить коррозия железа под остающимся неизменным защитным покрытием? В каком случае будет разрушаться защитное покрытие при относительной неизменности железного изделия?

Опыт 2. Химические методы нанесения на металл защитных пленок

Приборы и реактивы. Термометр до 100°C . Стаканы химические на 100 и 200 мл. Железные пластинки (3 шт.). Фосфорный ангидрид. Фосфат марганца $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$. Фосфат железа (II). Минеральное масло. Вазелин. Гидроксид натрия. Нитрит натрия. Растворы: соляной кислоты (1 : 1), азотной кислоты (1:1, пл. $1,52 \text{ г/см}^3$), сульфата меди (0,1 н.), серной кислоты (4 н.).

а) Оксидирование железа. Оксидированием называют процесс химической обработки поверхности металла, при котором последняя покрывается слоем оксидной пленки или пленки, состоящей из основных солей, предохраняющих металл от коррозии.

Для оксидирования железа можно применять раствор, содержащий 600 г/л NaOH и 60 г/л NaNO_2 . Приготовьте 100 мл такого раствора, отвесив необходимые для этого количества NaOH и NaNO_2 на теххимических весах.

Железную пластинку, предварительно очищенную наждачной бумагой, закрепите на тонкой проволочке, промойте в холодной воде, а затем протравите в соляной кислоте (1 : 1), погрузив пластинку в стакан с травильным раствором на 2–3 мин. После травления пластинку снова

промойте в холодной воде. Налейте в химический стакан 50 мл приготовленного для оксидирования раствора, погрузите в него железную пластинку, нагрейте раствор до кипения. Через 3–5 мин после начала кипения железную пластинку выньте из раствора, отметьте цвет и качество поверхности и снова опустите в кипящий раствор. Повторите осмотр через 10 и 15 мин от начала кипения, отмечая изменения цвета поверхности.

Опишите качество полученной защитной пленки; объясните наблюдаемые явления. После окончания опыта пластинку зачистите наждачной бумагой.

б) Пассивирование железа. При обработке железа концентрированными серной или азотной кислотами на его поверхности образуется слой оксидной защитной пленки и поверхность медленнее разрушается под действием химических реагентов. Такой процесс называется пассивированием.

Железную пластинку (или железный гвоздь) очистите наждачной бумагой и опустите в пробирку с разбавленным раствором серной кислоты. Отметьте интенсивность выделения газообразного водорода. Налейте в другую пробирку 4–5 мл дымящей азотной кислоты (пл. $1,52 \text{ г/см}^3$), перенесите в нее железную пластинку из первой пробирки на 2–3 мин. Выньте пластинку из концентрированной азотной кислоты и снова поместите в первую пробирку с разбавленной серной кислотой.

Увеличилась или уменьшилась интенсивность выделения водорода? Напишите уравнение пассивации железа дымящей азотной кислотой, считая, что образовавшаяся на поверхности железного предмета оксидная пленка имеет состав Fe_2O_3 .

в) Фосфатирование железа. Фосфатирование является химическим процессом образования на поверхности стали и чугуна пленки нерастворимых в воде фосфорнокислых солей марганца и железа. Применяемый для этого препарат «Мажеф» получил название по начальным буквам его составных ионов — марганца, железа и кислотного остатка фосфорной кислоты.

Фосфатирование производится из раствора следующего состава, масс. %:

Фосфорный ангидрид P_2O_5	50
Фосфат марганца $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$	14
Фосфат железа $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	3
Минеральное масло.....	33

Две железные стальные пластинки тщательно до блеска зачистите наждачной бумагой, после чего промойте холодной водой, обезжирьте фильтровальной бумагой, смоченной ацетоном. Снова промойте холодной водой.

Приготовленный для фосфатирования раствор налейте в химический стакан емкостью 100–150 мл, нагрейте до 95–98°C при постоянном перемешивании во избежание разбрызгивания.

Погрузите на 20–25 мин в нагретый раствор приготовленные для фосфатирования пластинки. Затем выньте пластинки из раствора, промойте холодной проточной водой, высушите фильтровальной бумагой. Смажьте поверхность одной пластинки маслом (или вазелином), тщательно втерев его, после чего нанесите на обе пластинки по одной капле 0,1 н. раствора CuSO_4 . Отметьте время, проходящее с момента нанесения капли до появления красного пятна вытесненной меди на поверхности каждой пластинки. Опишите внешний вид фосфатированной поверхности. Какая фосфатная пленка – промасленная или непромасленная – лучше предохраняет железо от коррозии?

После окончания опыта пластинку зачистите наждачной бумагой.

Опыт 3. Электрохимическое оксидирование

Приборы и реактивы. Выпрямитель переменного тока. Амперметр постоянного тока до 10 А. Вольтметр до 25 В. Свинцовая пластинка (катод). Алюминиевая пластинка (анод). Электролизер на 300–400 мл. Мерный цилиндр на 100 мл. Термометр со шкалой до 100°C. Ацетон. Растворы: серной кислоты (20%-ный), азотной кислоты (50%-ный), анилинового красителя.

Получите искусственную оксидную пленку, хорошо защищающую поверхность металла от дальнейшей коррозии (и механических повреждений) путем электролитического анодного окисления (анодирования) металла. Схема анодирования представлена на рис. 2.28.

Алюминиевую пластинку (или деталь) обезжирьте фильтровальной бумагой, смоченной в ацетоне, после чего промойте холодной проточной водой. Смонтируйте электроды, закрепив их в контакты. Налейте в электролизер 20%-ный раствор H_2SO_4 так, чтобы электроды были погружены в электролит на глубину 6–7 см. Соедините электроды с источником постоянного тока и пропускайте ток напряжением 12–15 В в течение 20 мин при 18–25°C и анодной плотности $J_A = 2 \text{ А/дм}^2$.

После окончания процесса отключите электролизер от источника тока, снимите анодную пластинку, промойте холодной проточной водой. Охарактеризуйте внешний вид анодированной пластинки. Полученные сернокислотным способом анодные окисные пленки обычно имеют толщину 3–7 мкм, обладают достаточной твердостью, износоустойчивостью, беспористостью. Они хорошо окрашиваются и пропитываются пассиваторами.

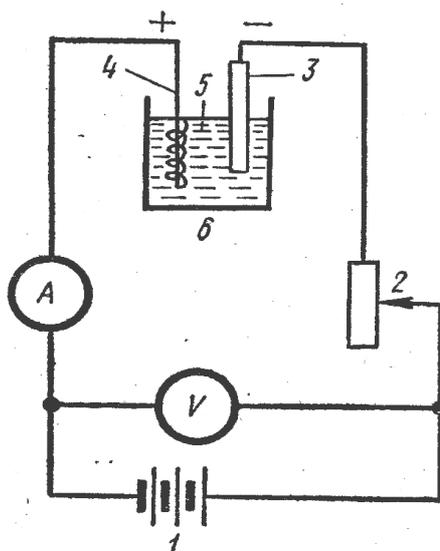


Рис. 2.28. Схема анодирования металлов: 1 – источник постоянного тока; 2 – реостат; 3 – свинцовая пластина (катод); 4 – алюминиевое изделие {анод}; 5 – электролит (20%-ный раствор H_2SO_4); 6 – электролизер; А – амперметр; V – вольтметр

Проверьте способность анодной окисной пленки фиксировать на себе краситель. Для этого используйте по указанию преподавателя водные растворы анилиновых красителей, применяемых для окрашивания анодированных изделий (табл. 2.11).

Опустите оксидированную пластинку по указанию лаборанта в ванну с раствором красителя на 5–10 мин, после чего промойте в холодной воде и высушите фильтровальной бумагой.

Отметьте качество полученной окрашенной пленки.

Удалите окрашенную пленку погружением в 50%-ный раствор HNO_3 (под тягой!). Промойте деталь в холодной проточной воде, высушите фильтровальной бумагой и верните лаборанту.

Опыт 4. Нанесение гальванических покрытий

Приборы и реактивы. Выпрямитель переменного тока. Амперметр на 0,5–10 А. Вольтметр на 1–8 В. Реостат на 90 Ом. Электролизер на 300–400 мл. Мерный цилиндр на 200–250 мл. Контакты металлические для крепления электродов (6 шт.). Пластика никелевая. Пластика цинковая. Пластика медная. Покрываемые латунные изделия или пластинки – 3 шт. Сульфат цинка $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Сульфат никеля $\text{Ni}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Сульфат натрия $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Сульфат алюминия

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$. Серная кислота (пл. $1,84 \text{ г/см}^3$). Хлорид натрия. Борная кислота.

Одним из широко применяемых методов борьбы с коррозией металлов является метод нанесения гальванических покрытий, который на практике осуществляется электролизом водных растворов солей с растворимыми анодами. При гальваническом методе нанесения металлических покрытий покрываемые изделия помещают в электролит, содержащий ионы осаждающегося металла, и соединяют с отрицательным полюсом источника постоянного тока. Покрываемое изделие, таким образом, является катодом. Анодом же служит пластина из того металла, которым покрывают изделие (рис. аналогичен рис. 2.28.)

а) Цинкование. Электролитную ванну наполните на $\frac{3}{4}$ ее объема электролитом следующего состава: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 215 г/л, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ – 30 г/л, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 80 г/л. Для процесса цинкования рекомендуется следующий режим работы: температура электролита $18 - 20^\circ\text{C}$, плотность тока J_k $1 - 2 \text{ А/дм}^2$, рН $3,8 - 4,4$. Сульфат аммония вводят в электролитную ванну для поддержания постоянного рН раствора, сульфат натрия – для увеличения электропроводности электролита.

Железную пластинку обезжирьте фильтровальной бумагой, смоченной ацетоном. Промойте подготовленную для покрытия железную пластинку в холодной проточной воде. Смонтируйте электроды, закрепив их в контакты так, чтобы анодом служила цинковая пластинка, а катодом – приготовленная железная. Погрузив электроды в ванночку с электролитом, включите постоянный ток и ведите электролиз $15 - 20$ мин. После окончания электролиза покрытую цинком пластинку промойте холодной проточной водой и высушите фильтровальной бумагой. Отметьте характер полученного покрытия. Составьте электронно-ионную схему процессов, происходящих на полюсах при электрическом цинковании.

б) Меднение. Проведите нанесение медного покрытия из электролита следующего состава: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 200 г/л, H_2SO_4 – 50 г/л. Режим работы: температура электролита $18 - 20^\circ\text{C}$, рН $1,1 - 1,5$. Серная кислота вводится в состав электролита для создания необходимого рН раствора и увеличения электропроводности. Растворимым анодом будет служить медная пластинка, катодом – пластинка или деталь из цветного металла или из жести, подвергаемая меднению.

Покрываемую пластинку (или деталь) обезжирьте фильтровальной бумагой, смоченной в ацетоне, затем промойте ее в холодной проточной воде. Смонтируйте электроды, закрепив их в контакты. Погрузив электроды в ванночку с заранее приготовленным электролитом, включите постоянный ток и ведите электролиз $15 - 20$ мин. После окончания электролиза покрытую медью деталь промойте холодной проточной водой, высушите фильтровальной бумагой. Отметьте характер полученного

покрытия. Составьте электронно–ионную схему процессов, происходящих на полюсах при электролитическом меднении.

Т а б л и ц а 2.11

Состав растворов для окрашивания анодированных изделий из алюминия и его сплавов

Цвет пленки	Состав раствора	Температура раствора, °С
Черный	Водный раствор, содержащий 0,5–1% анилинового черного для шерсти и 0,5% анилинового черного марки «ФФ»	80–90
Синий	1%-ный водный раствор анилинового голубого	20–25
Желтый	1%-ный водный раствор анилинового желтого	20 – 25
	2%-ный раствор анилинового красного	20 – 25
Красный (под «золото»)	Краситель оранжевый марки «2Ж» – 0,1 г/л, кислотный черный марки «М» – 0,01 г/л, сода кальцинированная – 0,05 г/л	60

в) Никелирование. Нанесите никелевое покрытие из электролита следующего состава: $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100 г/л, NaCl – 15 г/л, H_3PO_4 – 10 г/л. Режим работы: температура 25 – 30°C, pH 5,3 – 5,5, плотность тока 1 – 2 А/дм². Анодом будет служить никелевая пластинка, катодом – покрываемое изделие. В состав электролита входит хлорид натрия для увеличения электропроводности электролита и фосфорная кислота для поддержания постоянной кислотности раствора.

Получите у лаборанта пластинку или деталь для никелирования. Покрываемую деталь обезжирьте ацетоном и промойте в холодной воде. Смонтируйте электроды, закрепив их в контакты. Погрузив электроды в ванночку с заранее приготовленным электролитом, включите постоянный

ток и ведите электролиз 15 – 20 мин. После окончания электролиза покрытую никелем деталь промойте холодной проточной водой, высушите фильтровальной бумагой. Отметьте характер полученного покрытия. Составьте электронно-ионную схему процессов, происходящих на полюсах при электролитическом никелировании.

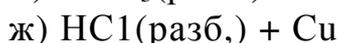
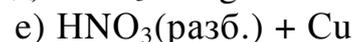
Опыт 5. Применение ингибиторов

а) Действие ингибитора на коррозию цинка. В две пробирки внесите по 5 – 7 капель 2 н. раствора соляной кислоты и по кусочку цинка, по возможности равного размера. Когда выделение водорода станет достаточно интенсивным (если реакция идет слабо, подогрейте пробирки), прибавьте в одну из пробирок микрошпатель порошка уротропина. Как изменилась интенсивность выделения водорода?

б) Действие ингибитора на коррозию железа. В три пробирки внесите по 5 – 7 капель 0,2 н. раствора серной кислоты и по одной капле гексациано(III)феррата калия $K_3[Fe(CN)_6]$. Последний является индикатором на ионы железа (III), при появлении которых в растворе образуется гексациано(III)феррат железа (III) синего цвета. Получите у лаборанта две железные проволоочки, протравленные предварительно соляной кислотой, и одну проволоку, покрытую ржавчиной. В первую пробирку добавьте микрошпатель уротропина. Опустите чистые железные проволоки в первую и вторую пробирки, а покрытую ржавчиной – в третью пробирку. Отметьте время появления и интенсивность синей окраски в каждой пробирке. Почему они различны? Какова роль уротропина? Ржавчины?

Контрольные вопросы и задачи

1. Какие из приведенных ниже реакций возможны? Напишите уравнения реакций в молекулярном и ионном виде и укажите стрелками переход электронов:



2. Химически чистый цинк почти не реагирует с соляной кислотой. При добавлении к кислоте нитрата свинца происходит энергичное выделение водорода. Объясните эти явления.

3. Составьте схемы гальванических элементов для определения нормальных электродных потенциалов электродов Al/Al^{3+} и Cu/Cu^{2+} в

паре с нормальным водородным электродом. Катодом или анодом являются электроды Al/Al^{3+} и Cu/Cu^{2+} в этих гальванических элементах?

4. Составьте схемы двух гальванических элементов, в одном из которых никель является катодом, а в другом – анодом. Напишите уравнения процессов, протекающих на никелевых электродах в первом и во втором случаях.

5. Дайте схему гальванического элемента, составленного из магниевой и железной пластинок, опущенных в растворы их сернокислых солей. Укажите направление движения электронов в цепи и ионов в растворе. Напишите уравнения катодного и анодного процессов и вычислите его э. д. с. при использовании 1 н. растворов солей.

Ответ: 1,94 В.

6. Напишите уравнения реакций катодного и анодного процессов, протекающих при электролизе перечисленных ниже водных растворов с графитовыми электродами: а) хлорида меди (II); б) гидроксида калия; в) нитрата свинца (II); г) серной кислоты.

7. Проходя через раствор электролита, ток силой 2 А за 44 мин выделяет 3,2 г металла. Определите эквивалент и электрохимический эквивалент этого металла.

Ответ: 56,16 г; 0,0006 г.

8. Вычислите электрохимические эквиваленты: а) железа в FeSO_4 ; б) Al в $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; в) хлора в хлориде любого металла.

Ответ: а) 0,0003 г; б) 0,000093 г; в) 0,00037 г.

9. Напишите уравнения электродных процессов, протекающих при электролизе: а) хлорида никеля с никелевым анодом; б) сульфата натрия с цинковым анодом.

10. Что такое коррозия металлов? Какие виды коррозии вы знаете?

11. Как будет протекать в кислой среде коррозия железа: а) покрытого медью; б) покрытого марганцем (в случае нарушения целостности покрытия)? Ответ мотивируйте.

12. В каком случае коррозия железа будет происходить быстрее: в случае луженого железа или оцинкованного? Приведите схему работы микрогальванопар.

13. Какие существуют методы защиты металлов от коррозии?

14. Какие химические способы защиты металлов от коррозии вам известны?

15. Какой процесс называется оксидированием? Приведите пример.

16. Какой процесс называется анодированием? Ответ иллюстрируйте примером.

17. Какие покрытия называются катодными? анодными?

18. Что такое гальванические покрытия? Как они наносятся на металл?

Глава 3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

В настоящее время уже ни у кого нет сомнений в необходимости использования хроматографических, электрофоретических и некоторых других методов как для исследовательских целей, так и для решения практических задач. Поскольку все вышеперечисленные методы тесно связаны с самыми разнообразными химическими, экологическими и биотехнологическими дисциплинами, было решено в целях избежания повторений представить наиболее распространенные виды хроматографии и электрофореза в специально посвященной им главе.

Основы процесса хроматографии

Хроматографией называется процесс разделения веществ, основанный на распределении компонентов смеси между неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазами. В зависимости от строения разделяемые вещества в различной степени удерживаются той и другой фазами и вследствие этого могут быть отделены друг от друга. Под действием диффузии молекулы разделяемых веществ пересекают поверхность раздела фаз и в зависимости от свойств удерживаются той или иной фазой.

При продвижении компонентов смеси в разделяющей среде такой процесс перехода между фазами осуществляется многократно, причем каждый раз достигается небольшой эффект разделения (или обогащения). Чем выше единичный эффект разделения (обогащения), тем лучше конечный результат. Чем чаще повторяется этот единичный процесс, тем выше эффект разделения, или, иными словами, выше «разрешающая способность» процесса.

В этой связи хроматографию сравнивают с фракционной перегонкой и пользуются понятием «теоретическая тарелка». Однако если при фракционной перегонке для оценки эффективности ректификационной колонки достаточно понятия «число теоретических тарелок», то в хроматографии для оценки эффективности системы предпочитают пользоваться понятием «высота, эквивалентная теоретической тарелке» (ВЭТТ). ВЭТТ соответствует расстоянию между двумя соседними теоретическими тарелками. Лабораторные установки для перегонки имеют обычно 10–50 теоретических тарелок. В тонкослойной хроматографии (ТСХ) – наиболее простом варианте хроматографии – используются

пластинки эффективностью несколько тысяч теоретических тарелок. Современная хроматография (в частности высокоэффективная жидкостная – ВЭЖХ) располагает высококачественными сорбентами, позволяющими готовить колонки эффективностью несколько десятков тысяч теоретических тарелок.

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы различают жидкостную и газовую хроматографию (табл. 3.1). В хроматографии пользуются принятыми в литературе названиями фаз – твердая и жидкая.

Т а б л и ц а 3.1

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	
	жидкая	газообразная
	жидкостная хроматография	газовая хроматография
Твердая	Твердо-жидкостная хроматография (ТЖХ) (адсорбционная, ионообменная, аффинная)	Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)
Жидкая	Жидко-жидкостная хроматография (ЖЖХ) (распределительная)	Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) (распределительная)

По механизму взаимодействия разделяемых веществ с неподвижной фазой жидкостная хроматография подразделяется на: адсорбционную; распределительную; ионообменную; аффинную; гель-хроматографию. Остановимся подробнее на некоторых из этих методов, имеющие, на наш взгляд, самое прямое отношение к химии, экологии и биотехнологии.

Распределительная хроматография

Как известно, распределительная хроматография основана на различии в распределении веществ между несмешивающимися жидкими фазами – подвижной и неподвижной, нанесенной на твердый носитель. В зависимости от состояния подвижной фазы процесс носит название жидко – жидкостная (ЖЖХ) и газо – жидкостная (ГЖХ) хроматография.

Процесс, происходящий при ЖЖХ, можно сравнить с распределением веществ между двумя несмешивающимися жидкостями в делительной воронке. Перемешивание двух фаз при многократном

встряхивании приводит к разделению веществ с различными коэффициентами распределения. При распределительной хроматографии смеси разделяются гораздо быстрее, чем, например, при противоточном распределении, что объясняется большей площадью контакта между подвижной и неподвижной фазами. Процесс разделения в распределительной хроматографии подчиняется закону распределения Нернста. Поэтому можно предсказать возможность разделения смеси веществ, зная коэффициенты распределения компонентов и фактор разделения.

Материалы – носители

В распределительной хроматографии большое значение имеет прочность удерживания неподвижной фазы на нерастворимом твердом носителе. Прочность удерживания определяется силами адгезии, адсорбцией, химическими связями.

Силы адгезии

Жидкая фаза удерживается на матрице силами адгезии. Рассчитанное количество летучей жидкости прибавляют к материалу – носителю, встряхивают и выдерживают длительное время. При этом летучий растворитель (вода, нитрометан, изооктан и др.) равномерно распределяется на матрице за счет поверхностной диффузии.

Нелетучую жидкость (полиэтиленгликоль, гексадекан) растворяют в низкокипящем растворителе, смешивают с материалом – носителем и удаляют летучий растворитель на роторном испарителе. Оба варианта широко применяются при подготовке колонок для газовой хроматографии.

Неподвижная фаза всегда понемногу растворяется в подвижной фазе и постепенно вымывается из колонки. Это так называемое «истощение колонки» влечет за собой снижение разрешающей способности.

Адсорбция

Материал – носитель обладает адсорбционными свойствами. Если в этом случае в качестве подвижной фазы используется смесь растворителей различной полярности (например, хлороформ – метанол или бутанол – вода), то в зависимости от их полярности поверхность носителя с течением времени обогащается одним из компонентов подвижной фазы. Например, силикагель всегда избирателен по отношению к более полярному компоненту. Таким образом, при

проведении жидкостной хроматографии смесью растворителей всегда наблюдаются процессы адсорбции и распределения.

Ковалентные связи

Возможность образования ковалентных связей между веществом подвижной фазы и веществом матрицы позволяет прививать неподвижную фазу непосредственно на поверхности матрицы. Широкое распространение получили силикагели с иммобилизованными углеводородными цепями, содержащими 2, 8 или 18 углеродных атомов. За счет иммобилизации углеводородных цепей на поверхности силикагеля она меняет полярность, т. е. поверхностный слой приобретает гидрофобные свойства, одновременно подавляются адсорбционные свойства. Поэтому в данном случае имеет место хроматография с обращенными фазами (ОФХ), занимающая промежуточное место между распределительной хроматографией и адсорбционной. Роль неподвижной жидкой фазы здесь выполняет химически связанный монодисперсный слой.

Общая схема хроматографической установки приведена на рис. 3.1.

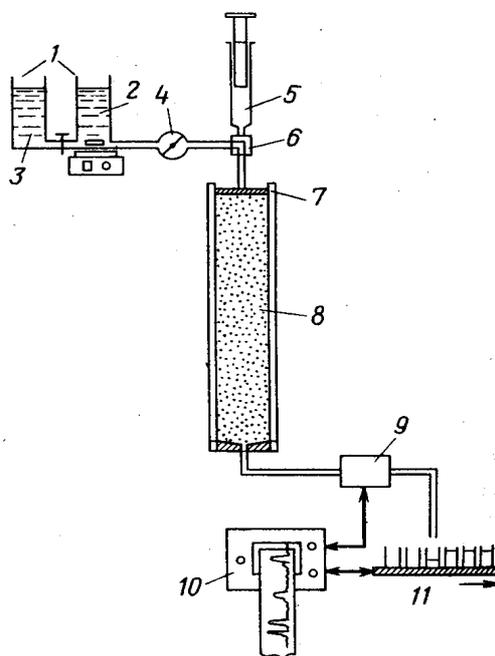


Рис.3.1. Общая схема хроматографической установки: 1 – резервуар; 2 – резервуар; 3 – резервуар; 4 – насос; 5 – пробирка; 6 – кран для переключения потока; 7 – адаптер; 8 – сорбент; 9 – детектор; 10 – самописец; 11 – коллектор фракций

Порядок выполнения операций

Порядок выполнения операций при распределительной хроматографии аналогичен порядку выполнения операций при других видах хроматографии, например, адсорбционной.

Элюирование проводят в изократическом режиме, т. е. при постоянном составе элюента. Градиентное элюирование в данном случае лишено смысла

Нанесение образца. При каждом нанесении пробы разделяемая смесь частично вытесняет жидкую неподвижную фазу, что отрицательно сказывается на работе колонки. Если в первом опыте колонку слегка перегрузить, то в следующем опыте состав элюента будет локально меняться за счет вытеснения неподвижной фазы. При этом компоненты образца могут выпасть в осадок, или может наблюдаться значительное увеличение ширины пиков.

В случае препаративного разделения следует использовать низкокипящую неподвижную фазу (или дополнить процесс разделения стадией очистки вещества от следов неподвижной фазы).

Разделение методом ОФХ (на иммобилизованной неподвижной фазе) имеет ряд особенностей, которые необходимо учитывать.

Область применения

При анализе всех классов веществ.

Аналитическое и препаративное разделение биополимеров и других сложных веществ.

В основе другого вида хроматографии – газовой, о которой речь будет идти несколько позже, лежат процессы распределения и адсорбции. Свойства подвижной фазы (газа-носителя) имеют второстепенное значение для процесса разделения. В жидкостной хроматографии процесс разделения в значительной степени определяется составом подвижной фазы. В качестве подвижной фазы используется множество веществ, поэтому для каждого специального случая можно подобрать подходящую систему разделения. ГЖХ применяют главным образом для аналитических целей, в то время как жидкостную хроматографию чаще используют для препаративных целей. По этой причине, а также вследствие возрастающего применения микроэлектроники жидкостная хроматография в настоящее время интенсивно развивается.

Для проведения жидкостной хроматографии используется установка, схема которой приведена на рис. 3.1.

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография основана на различной способности разделяемых ионов в растворе к ионному обмену с ионитом (неподвижная фаза), который представляет собой нерастворимую полимерную матрицу, несущую химически связанные ионогенные группы. Противоионы удерживаются на матрице за счет сил электростатического взаимодействия и могут обмениваться на ионы разделяемой смеси, присутствующие в подвижной фазе.

По химическому строению матрицы ионообменники подразделяются на следующие группы: синтетические смолы на основе полистирола или полиакриламида; сефадексы на основе сшитого полисахарида – декстрана; сефарозы – на основе полисахарида, выделенного из водорослей, агарозы; целлюлозные ионообменники на основе микрокристаллической или сшитой микросферической целлюлозы; неорганические иониты на основе поверхностно – модифицированных силикагелей.

Тип ионообменника, как известно, определяется природой функциональных ионогенных групп. Ионит является слабокислотным при наличии карбоксильных или оксифенильных групп; сильнокислотным при наличии сульфогрупп ($-\text{SO}_3^- \text{H}^+$); слабоосновным при наличии аминогрупп различной степени замещения; сильноосновным – при наличии групп четвертичных аммониевых оснований.

Разделение ионитов на сильные и слабые проводится по аналогии с делением на слабые и сильные кислоты и основания и отчасти отражает степень диссоциации ионогенных групп. Это свойство не следует путать с емкостью, которая для ионитов определяется абсолютным числом функциональных групп и их доступностью. Сильный ионит имеет полную емкость в большом диапазоне значений рН раствора, слабый ионит достигает полной емкости лишь в определенной области рН. Так, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) при $\text{pH} < 3$ уже не несет диссоциированных карбоксильных групп и полностью лишена ионообменных свойств. Полной емкости КМЦ достигает при $\text{pH} > 6$.

Ионообменную хроматографию проводят в водной среде. В качестве примера ионообменного процесса можно привести операцию умягчения воды, при которой ионы кальция и магния обмениваются на ионы натрия. Помимо обычного обмена ионов на ионитах можно проводить разделение заряженных частиц, прежде всего биополимеров (белки, нуклеиновые кислоты и др.), некоторые из которых обладают амфотерными свойствами. Именно эта область является главной для применения хроматографии, так как суммарный заряд таких молекул зависит от рН среды, хроматографию проводят в буферных растворах.

В большинстве случаев рН среды в процессе разделения поддерживают постоянным. Разделение различных типов ионов возможно при условии, что компоненты смеси по-разному взаимодействуют с заряженными группами ионита.

Если несколько повысить ионную силу электролита путем добавления нейтральных солей, например NaCl, то ионы элюента будут конкурировать с компонентами смеси. Вследствие этого один или несколько компонентов частично десорбируются и начнут медленно мигрировать по колонке в подвижной фазе. При повышении концентрации соли скорость миграции возрастает, одновременно десорбируются более прочно удерживаемые вещества. При некотором предельном значении ионной силы элюента все компоненты образца полностью десорбируются и мигрируют по колонке со скоростью движения подвижной фазы. Следовательно, важно найти оптимальное значение ионной силы, при котором достигается наибольшее разделение целевых компонентов смеси. В большинстве случаев при постоянной ионной силе буфера не удастся элюировать все компоненты смеси, присутствующей в образце. Поэтому общепринятым приемом в ионообменной хроматографии является элюирование в градиенте ионной силы.

Приборы

Схема прибора для проведения классической ионообменной хроматографии низкого давления приведена на рис. 3.1. При нанесении образца вся разделяемая смесь адсорбируется в верхней части колонки на отрезке 1 – 2 см. В большинстве случаев вполне достаточно колонки высотой 20 см. При разделении сложных смесей используют более высокие колонки. При работе на препаративном уровне размер колонки подбирают в соответствии с нагрузкой.

В отличие от других видов хроматографии при хроматографии на ионитах всегда используют элюент переменного состава. При этом ионную силу раствора изменяют ступеньчато (ступеньчатое элюирование) или плавно (градиентное элюирование). Линейный градиент ионной силы формируют при помощи *градиентного смесителя* (см. рис. 3.1). В начале процесса на колонку из смесителя подают элюент с низкой ионной силой. По мере изменения объема раствора в смесителе в последний из резервуара начинает поступать буфер с более высокой ионной силой, содержимое смесителя непрерывно перемешивается при помощи магнитной мешалки. Ионная сила элюента, подаваемого на колонку, постепенно возрастает. Оба сосуда, смеситель и резервуар, имеют одинаковую форму, вследствие чего формируется линейный градиент концентрации буфера. Процесс хроматографирования завершается при концентрации буфера, находящегося в резервуаре.

Крутизна градиента определяется разностью в ионной силе буферного раствора в резервуаре и смесителе, а также общим объемом элюента в системе.

Подготовка образца

Содержание солей в образце должно быть минимальным. В случае необходимости образец обессоливают при помощи гель-хроматографии или диализа. Возможно также нанесение образца в виде разбавленного раствора, так как при этом присутствующие в образце соли не препятствуют адсорбции всех компонентов смеси. При элюировании в изократическом режиме объем образца не должен превышать 1 – 5% от объема сорбента. При элюировании в градиентном режиме образец наносится в большом объеме растворителя при условии, что колонка имеет достаточно высокую емкость, позволяющую адсорбировать все компоненты смеси.

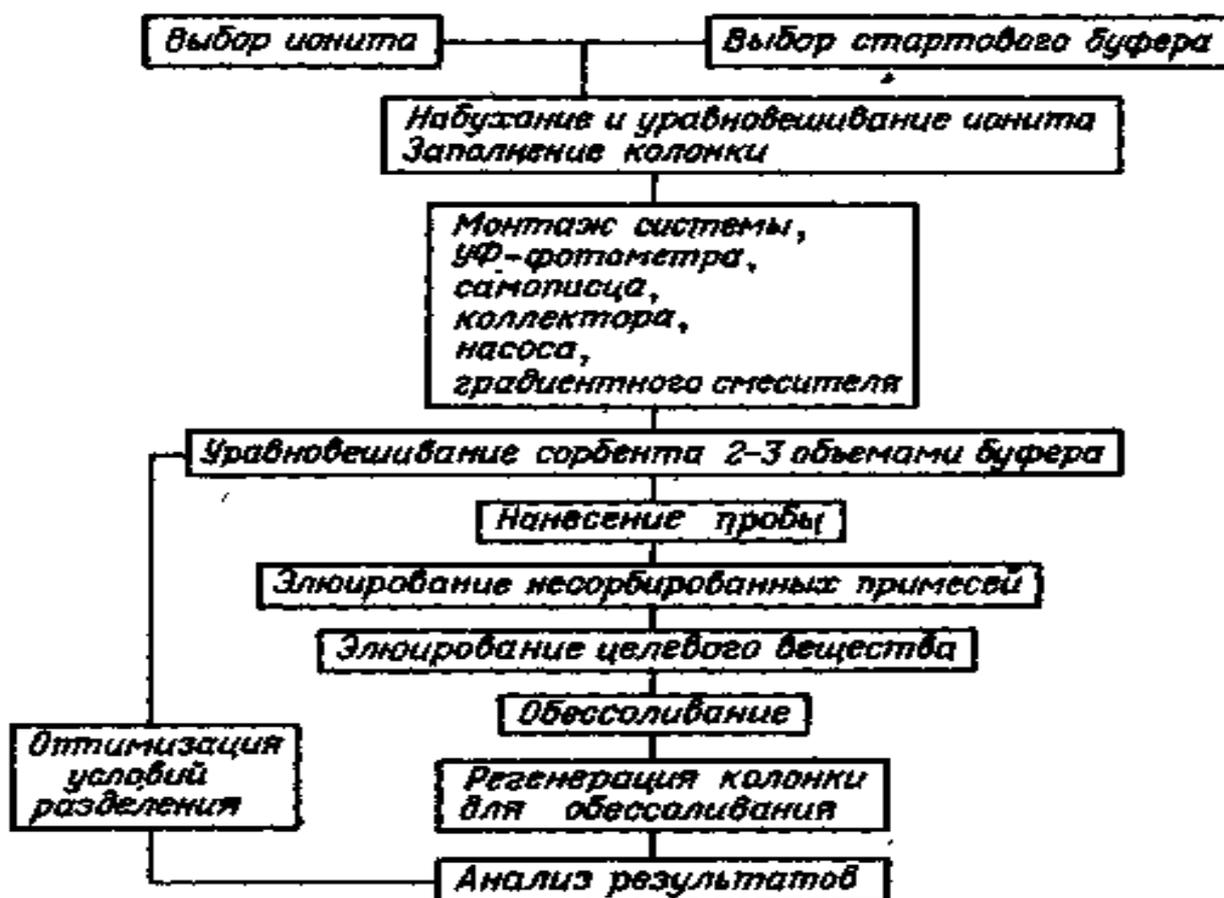


Рис. 3.2. Порядок выполнения операций в ионообменной хроматографии

Общая схема проведения ионообменной хроматографии приведена на рис. 3.2.

Оформление результатов

В наиболее простых случаях в рабочем журнале приводят хроматограмму, на которой штриховой линией отмечают форму градиента ионной силы (рис. 3.3).

На левой ординате откладывают измеряемый параметр (величина экстинкции или оптической плотности), на правой ординате – концентрацию соли в элюенте, на оси абсцисс – объем элюата или время удерживания

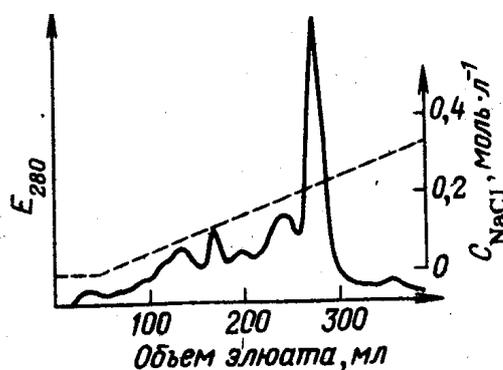


Рис.3.3. Хроматограмма разделения методом ионообменной хроматографии (способ регистрации – поглощение при 280 нм E_{280})

Далее в журнале приводят следующие данные: размеры колонки (диаметр, высота); данные об ионитах; данные о буферных растворах (порядок приготовления буферов приводится в экспериментальной части); в случае градиентного элюирования – объем буфера в смесителе и резервуаре; скорость подачи элюента; температура колонки (если не совпадает с комнатной); объем фракций (при препаративном разделении).

Например (см. рис. 3.3): образец – сыворотка крови; колонка – 1,6x15 см; ионит – ДЕАЕ – сефароза CL – 6В; буферный раствор – линейный градиент NaCl (0 – 0,5 M) в 0,05 M трис-HCl, pH 8,6; объем смесителя – 250 мл, объем резервуара – 250 мл; скорость подачи элюента – 38 мл/ч.

Область применения

В области анализа при помощи синтетических ионитов решаются следующие задачи:

- определение общего содержания солей в растворе (путем ионообмена и последующего определения концентрации ионов водорода);
- удаление посторонних ионов в неорганическом анализе, а в промышленных масштабах при очистке сточных вод, например таких, как Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , F^- , Cl^- и др.;
- анализ гидролизатов белков, олигонуклеотидов, полисахаридов;
- определение уровня загрязнения воды.

В препаративном масштабе при помощи синтетических ионитов решаются следующие задачи:

- деионизация и очистка воды (деминерализованную воду часто ошибочно называют дистиллированной);
- удаление ионогенных примесей, присутствующих в органических растворителях; очистка биополимеров, например отделение детергентов и амфолитов, присутствующих в белковых препаратах;
- замена противоионов в буферных растворах;
- получение препаратов радиоактивных изотопов;
- использование в качестве катализаторов многих технологических процессов – этерификации, омыления, дегидратации, гидратации, альдольной конденсации, полимеризации, инверсии сахаров, перегруппировки, алкилирования, циангидринного синтеза, образования ацетатов, нитрования, эпоксидирования.

Иониты на основе сефадекса и целлюлозы применяются для решения следующих задач:

- препаративного выделения белков, пептидов, олигонуклеотидов;
- выделения полисахаридов и липидов, несущих заряженные группы;
- иммобилизации ферментов.

Иониты на основе агарозы применяются в тех же целях, что и сефадексы, кроме того, на них можно фракционировать вещества с молекулярной массой до 10^6 г·моль⁻¹.

Модифицированные силикагели используются в режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для разделения всех классов заряженных веществ в аналитическом и препаративном масштабе.

В качестве примера использования ионообменной хроматографии приводятся данные анализа аминокислот в гидролизатах белков.

Аминокислотный анализ (АКА)

Аминокислотный анализ применяют для количественного определения отдельных аминокислот или смесей хроматографическими методами, сочетая в ряде случаев ионную хроматографию с ВЭЖХ.

Физические основы метода

Если образец не содержит свободных аминокислот, то прежде всего проводят гидролиз белков или пептидов до аминокислот. Общепринятыми условиями исчерпывающего гидролиза являются 6М HCl при 110°C в течение 24 ч. Некоторые наиболее важные условия гидролиза белков перечислены в табл. 3.2. Ферментативные методы гидролиза в этой главе не рассматриваются, так как практически не применяются для количественного аминокислотного анализа. Основной проблемой при гидролизе является необходимость его завершения при условии сохранения целостности структуры аминокислотных остатков, входящих в состав анализируемого белка. Так, например, необходимо учитывать, что в стандартных условиях гидролиза разрушаются триптофан, цистеин и в меньшей степени – серин.

Существует три основных метода для анализа белковых гидролизатов.

Ионообменная хроматография является самым распространенным методом разделения аминокислот. В качестве ионообменника используют сульфированный полистирол. Разделение аминокислот осуществляют при повышении pH элюирующего буфера с одновременным увеличением ионной силы. В связи с тем, что общего прямого метода детектирования аминокислот в элюате не существует, в большинстве случаев на выходе из колонки аминокислоты модифицируют в различные производные, которые затем анализируют.

Значительно реже модификацию проводят до ввода аминокислот в колонку, а лишь затем разделяют их методом газовой хроматографии.

Тонкослойная хроматография производных аминокислот на силикагеле или свободных аминокислот на целлюлозе, а также электрофорез являются наиболее простыми методами их фракционирования. Однако возможности этих методов при количественном определении весьма ограничены.

В настоящее время разработано несколько способов получения окрашенных или флуоресцирующих производных аминокислот.

Т а б л и ц а 3.2
Аминокислотный гидролиз: условия и реактивы

Реактивы для гидролиза (≈ 1 мл)	Продолжи- тельность, ч	Темпера- тура, °С	Примечания
6М хлороводородная кислота	24 – 72	110	Триптофан полностью разрушается. Серин разрушается при гидролизе. Цистин частично окисляется в цистиновую кислоту, его количественное определение возможно лишь после перевода его в цистиновую кислоту.
Хлороводородная кислота – пропионовая кислота	0,25	150 – 160	Используют смесь 1 мл 12 н. хлороводородной кислоты и 1 мл пропионовой кислоты
4М метансульфо-новая с добавкой 0,2% 3-(2-аминоэтил) ин-дола	18 – 20	115 – 125	После окончания гидролиза реакцию нейтрализуют раствором 1 н. едкого натра для получения нелетучих производных.
3М 4-толуолсульфо-кислота с добавкой 0,2% 3-(2-аминоэтил)- индола	18 – 20	115 – 125	Триптофан определяют почти количественно. Связи, включающие остатки изолейцина и валина гидролизуются только при 125°С
3М меркаптоэтан-сульфо-вая кислота	24 – 72	110	Триптофан частично разрушается

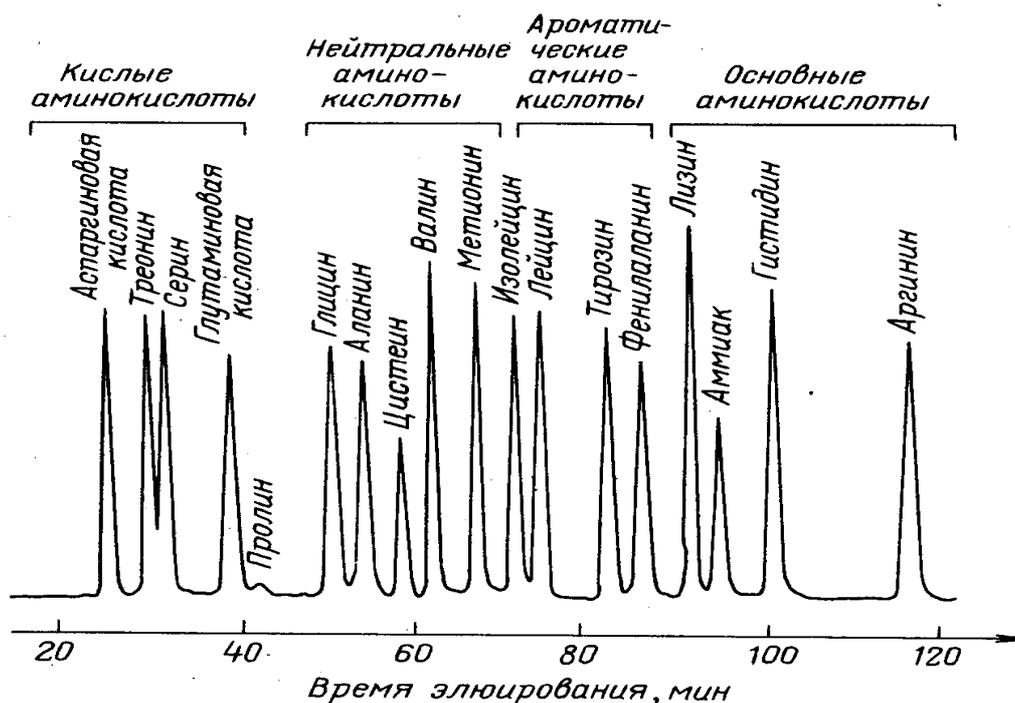


Рис. 3.4. Хроматограмма, полученная при аминокислотном анализе

Аминокислоты в элюате после ионообменной колонки детектируют по интенсивности окрашенных в фиолетовый цвет производных, которые получают после взаимодействия аминогрупп с нингидрином.

В первую очередь в реакцию с нингидрином вступают первичные аминогруппы с образованием интенсивно окрашенных продуктов реакции, которые детектируют при 570 нм. Вторичный амин – пролин образует продукт реакции с меньшей интенсивностью окраски, его детектируют при 440 нм. Одновременную регистрацию при двух длинах волн осуществляют с помощью двухканального самописца. Так как интенсивность окрашивания зависит от строения аминокислоты, необходимо проводить калибровку прибора с использованием стандартной смеси. Предел обнаружения – нмоль–пмоль. В зависимости от типа прибора и вида определяемых аминокислот продолжительность анализа составляет от 45 мин до 2 ч. На рис. 3.4 приведена хроматограмма разделения аминокислот гидролизата белка.

Флуорескамин (флуорам) или *o*-фталевый диальдегид взаимодействуют с первичной аминогруппой с образованием флуоресцирующих производных, которые детектируют с помощью флуориметра. Пролин вступает в реакцию только после окислительного декарбоксилирования *N*-хлорсукцинимидом до первичного амина. Предел обнаружения – пмоль.

Приборы

Гидролиз проводят в запаянных стеклянных ампулах в сушильном шкафу или термостате. Перед тем как запаять, ампулу с образцом обычно несколько раз вакуумируют. Кроме стеклянных ампул диаметром 0,5 – 1 см и длиной 20 – 25 см используют также сосуд многоразового использования, снабженный краном.

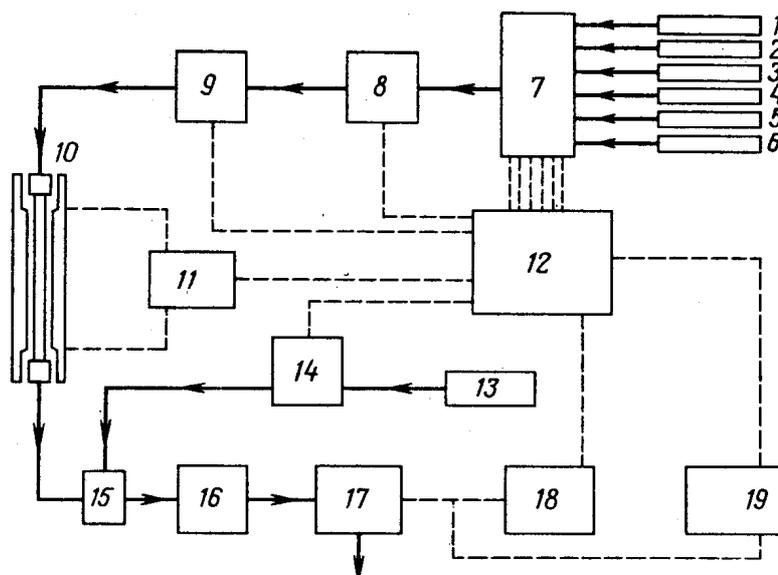


Рис.3.5. Блок схема аминокислотного анализатора (LKB, Bromma, Schweden)

Автоматический аминокислотный анализатор позволяет проводить анализ смеси аминокислот в белковых гидролизатах. Блок – схема аминокислотного анализатора представлена на рис. 3.5. Подача буферных растворов 1 – 6 (в более поздних моделях используют не 6, а 4 буферных раствора) на ионообменную колонку 10 осуществляется с помощью соленоидных клапанов и насоса через автоматическое устройство ввода образцов 7 – 9. Колонку заполняют специальной ионообменной смолой, которая должна обладать высокой разрешающей способностью и устойчивостью к давлению. Нингидрин (флуорескамин или *o*-фталевый диальдегид) подается специальным насосом 14 из резервуара 13 и смешивается с элюатом, вытекающим из колонки, в специальном блоке 15. Затем полученная смесь подается в реакционный сосуд 16 для получения производных с последующим детектированием с помощью фотометра или флуориметра 17 по поглощению или флуоресценции и регистрации на самописце 18.

Контроль за процессами осуществляется с помощью программирующего устройства 12. В блоке обработки информации 19

(обычно персональный компьютер) происходит анализ полученных результатов, а также сравнение интенсивности сигналов отдельных аминокислот со стандартной смесью и количественное определение каждой аминокислоты в данном гидролизате. Идентификацию каждой аминокислоты проводят по соответствующему времени удерживания. После анализа автоматически осуществляется регенерация сорбента в колонке.

Порядок выполнения операций

Гидролиз образца проводят следующим образом: берут точную навеску высушенного образца (1 – 5 мг) и растворяют в нескольких миллилитрах гидролизующей смеси; непосредственно для анализа обычно необходимо 10 мкмоль белкового гидролизата или аминокислотной смеси.

Гидролиз проводят в специальных ампулах в соответствии с рекомендациями, приведенными в табл. 3.2. Нижнюю часть ампулы с образцом погружают в охлаждающую смесь и замораживают. Ампулу вакуумируют. Длинный конец ампулы запаивают в струе пламени паяльной лампы (в крайнем случае применяют горелку Бунзена со специальной насадкой). При запаивании рекомендуется вращать ампулу в пламени до размягчения стекла, а затем осторожно растягивать до образования разрыва. Эту операцию проводят во избежание втягивания размягченного стекла внутрь вакуумированной ампулы. Острый стеклянный конец, образующийся в месте разрыва, оплавливают в пламени горелки. Далее проводят непосредственно гидролиз в соответствии с рекомендациями, изложенными в табл. 3.2.

По окончании гидролиза раствор выпаривают досуха на роторном испарителе, затем к остатку добавляют приблизительно 10 мл дистиллированной воды и снова выпаривают досуха; остаток растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора в мерной колбе до 10 мл. Из полученного раствора отбирают аликвотную часть на анализ (от 10 до 100 нмоль в расчете на каждую аминокислоту).

Для предотвращения окисления цистеина в процессе аминокислотного анализа его обычно превращают в цистеиновую кислоту. Для этого раствор белка или белкового гидролизата выпаривают перед проведением гидролиза досуха на роторном испарителе и к остатку последовательно добавляют 0,4 мл муравьиной кислоты, 0,2 мл этанола и 0,2 мл надмуравьиной кислоты (последнюю готовят заранее, инкубируя смесь 9,5 мл муравьиной кислоты с 0,5 мл 30%-ного пероксида водорода в течение 2 ч в холодильнике). Реакцию проводят в течение 24 ч при 0°C, затем реакционную смесь выпаривают досуха в вакууме, к остатку добавляют 20 мл дистиллированной воды и снова выпаривают досуха.

Полученный остаток подвергают гидролизу и определяют его аминокислотный состав.

Аффинная хроматография

Аффинная хроматография – метод разделения биологически активных веществ, основанный на их специфическом взаимодействии с лигандами, ковалентно связанными с нерастворимым носителем (матрицей). В качестве лигандов используют соединения, взаимодействие которых с разделяемыми соединениями основано на биологической функции последних.

Физические основы метода

Схематически механизм разделения в аффинной хроматографии представлен на рис. 3.6. Лиганд L фиксируется на матрице, целевое вещество S связывается лигандом и вследствие этого извлекается из раствора. На стадии элюирования комплекс разрушается и целевое вещество вновь переходит в раствор.

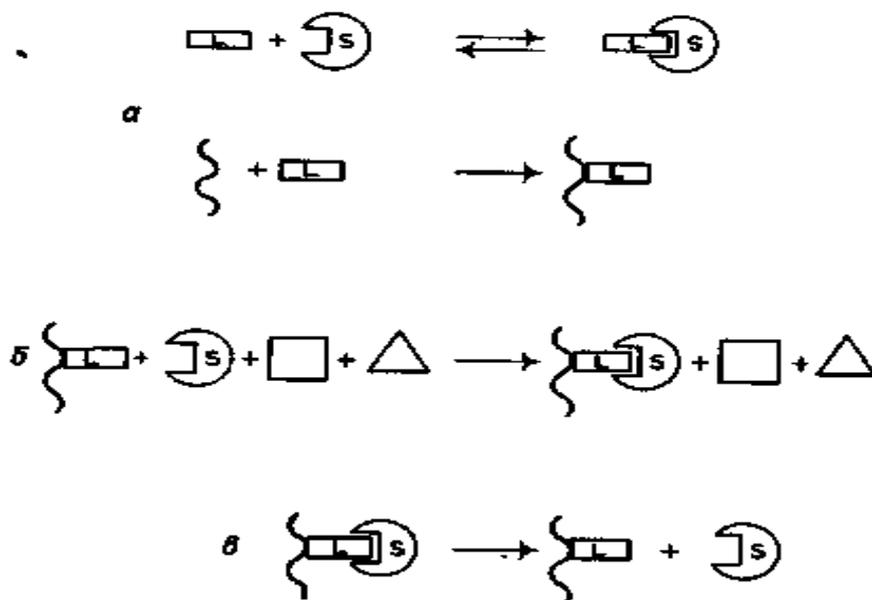


Рис. 3.6. Механизм разделения веществ в аффинной хроматографии: a – иммобилизация лиганда (ковалентно); $б$ – связывание целевого вещества (нековалентно) и удаление сопутствующих примесей; $в$ – десорбция целевого веществ

Разделение основано на равновесной реакции



где K – комплекс.

Взаимодействие (вещество – лиганд) должно быть специфическим и обратимым. Характеристикой обратимости процесса является константа диссоциации, причем в большинстве случаев можно использовать литературные данные.

Лиганд должен иметь реакционноспособные функциональные группы, при помощи которых осуществляется его связь с матрицей, при этом должна сохраняться биоспецифическая активность лиганда. Если лиганд имеет несколько таких групп, его иммобилизация должна проводиться с участием той из них, которая не входит в участок, взаимодействующий с целевым веществом. Активные центры многих биологически активных веществ (например, ферментов) часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших молекул лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Поэтому между матрицей и лигандом обычно встраивают дополнительный блок – «спейсер» (рис. 3.7).

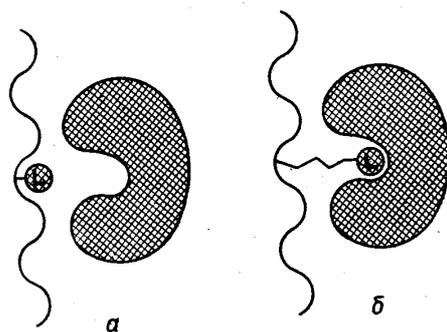


Рис. 3.7. Иллюстрация роли «спейсера»: *а* – лиганд фиксирован непосредственно на матрице и недоступен для целевого вещества; *б* – лиганд фиксирован через промежуточный «спейсер» и способен взаимодействовать с молекулой целевого вещества

В качестве матрицы используются гели агарозы или полиакриламида. Выпускаются материалы с различными реакционноспособными группами, предназначенными для взаимодействия с лигандом. Строение агарозы и схема реакции активации с помощью бромциана представлены на рис. 3.8,*а*. На рис. 3.8,*в* приведена структурная формула активированной молекулы, готовой для связывания с лигандом. Выбор типа геля определяется типами функциональных групп лиганда. В табл. 3.3 приведены сочетания функциональных групп лигандов и матриц, по которым проводят реакцию иммобилизации. Кроме того, известны матрицы,

на которых лиганды могут быть иммобилизованы только с помощью конденсирующих агентов (рис. 3.8,в и рис. 3.9). Аффинную хроматографию проводят в водных буферных растворах, подбирая оптимальные условия для каждого конкретного случая. Можно создать такие условия (значение рН раствора и концентрация соли), при которых взаимодействие целевого вещества с лигандом будет наиболее сильным.

Среди других методов выделения веществ аффинная хроматография занимает особое место, поскольку процесс идет специфически с использованием биологической активности целевого вещества. Эта особенность позволяет концентрировать целевые вещества из больших объемов раствора.

Материалы

Из гелей на основе агарозы часто применяется *сефароза 4В*. Благодаря крупным порам внутренняя поверхность гранул доступна как для молекул лигандов, так и для молекул целевых веществ. Матрица агарозы имеет незначительную неспецифическую сорбцию. Частицы сефарозы мало сжимаемы, вследствие чего обеспечиваются хорошие гидродинамические свойства колонки.

Сефароза CL (Pharmacia) представляет собой ковалентно сшитые молекулы агарозы, устойчивые в органических растворителях (что существенно, например, при последующей иммобилизации лиганда). Сорбент устойчив при повышенной температуре (например, в автоклаве) и в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин-гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В сшитая агароза обладает меньшей емкостью.

Аффи-гель (Affi-Gel, Bio Rad Lab.) – агарозный и полиакрил-амидный гель, модифицированный разнообразными функциональными группами.

По сравнению с агарозными гелями материалы на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную химическую и термоустойчивость.

Общая схема выполнения операций приведена в табл. 3.4.

Элюирование. Если целевое вещество слишком прочно связано с лигандом, рекомендуется прервать процесс элюирования в тот момент, когда элюент полностью вытеснен буферным раствором. Спустя некоторое время (от 20 мин до 2 ч) целевое вещество будет десорбировано и может быть элюировано с колонки. Заряженные вещества элюируют в градиенте ионной силы. При очень высоком

сродстве в состав буфера вводят анионы, разрушающие водородные связи ($\text{ClO}_4^- < \text{CF}_3\text{COO}^- < \text{SCN}^- < \text{CCl}_3\text{COO}^-$).

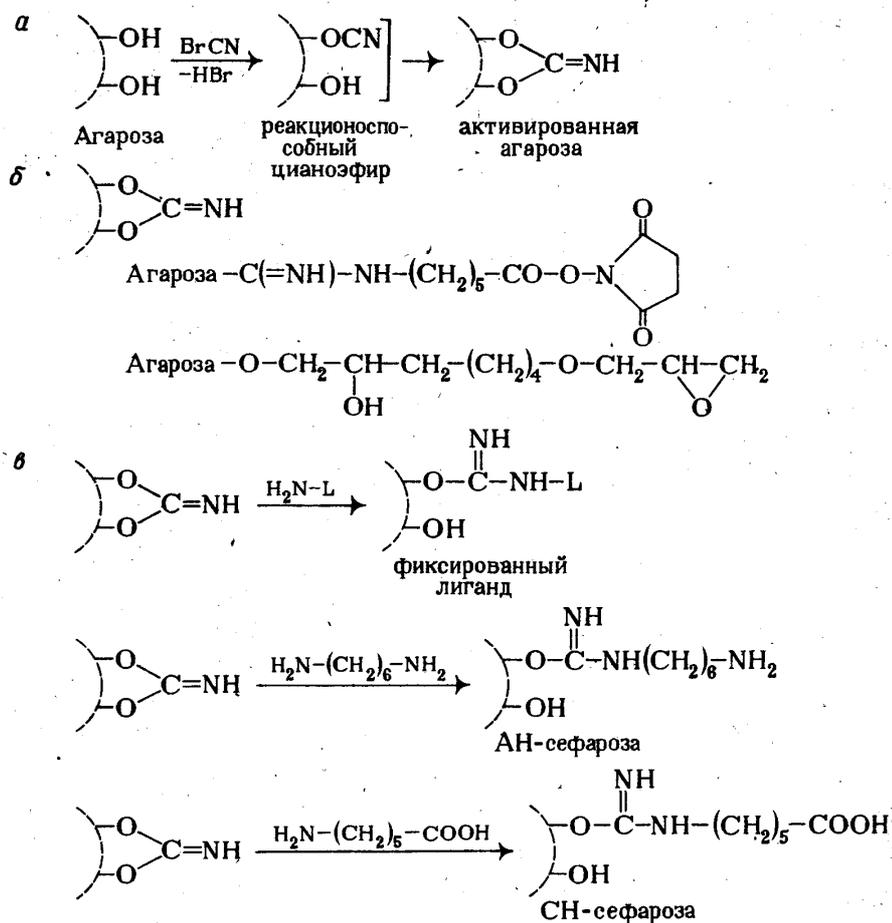


Рис.3.8. Активация молекулы агарозы и конденсация ее с лигандами: *a* – получение активированной молекулы агарозы; *б* – молекула агарозы, подготовленная для непосредственной конденсации с лигандом; *в* – конденсация активированной агарозы с лигандом или «спейсером», несущим амино- или карбоксигруппу

Выделение целевых веществ из элюата. Поскольку элюирование проводят в солевых буферах, фракции вначале обессоливают, например методом гель-хроматографии, а затем высушивают лиофильно.

Т а б л и ц а 3.3

Возможные сочетания функциональных групп лигандов и матриц

Лиганды	Функциональные группы модифицированного	
	лиганда	носителя
Белки, пептиды	Амино-	Карбокси-, имидокарбонатная, эпокси -
Аминокислоты	Карбокси-	Амино-
Полисахариды	Меркапто-	Пропил-тио, эпокси-
Полинуклеотиды	Гидрокси-	Эпокси-
Коферменты, кофакторы	Карбокси-	Амино-
	Амино-	Имидокарбонатная, пропил- тио,
	Амино-, карбокси-	Карбокси-, амино-, имидокарбонатная
Антибиотики, Стероиды	Меркапто- гидрокси-	Пропил-, тио-, эпокси-



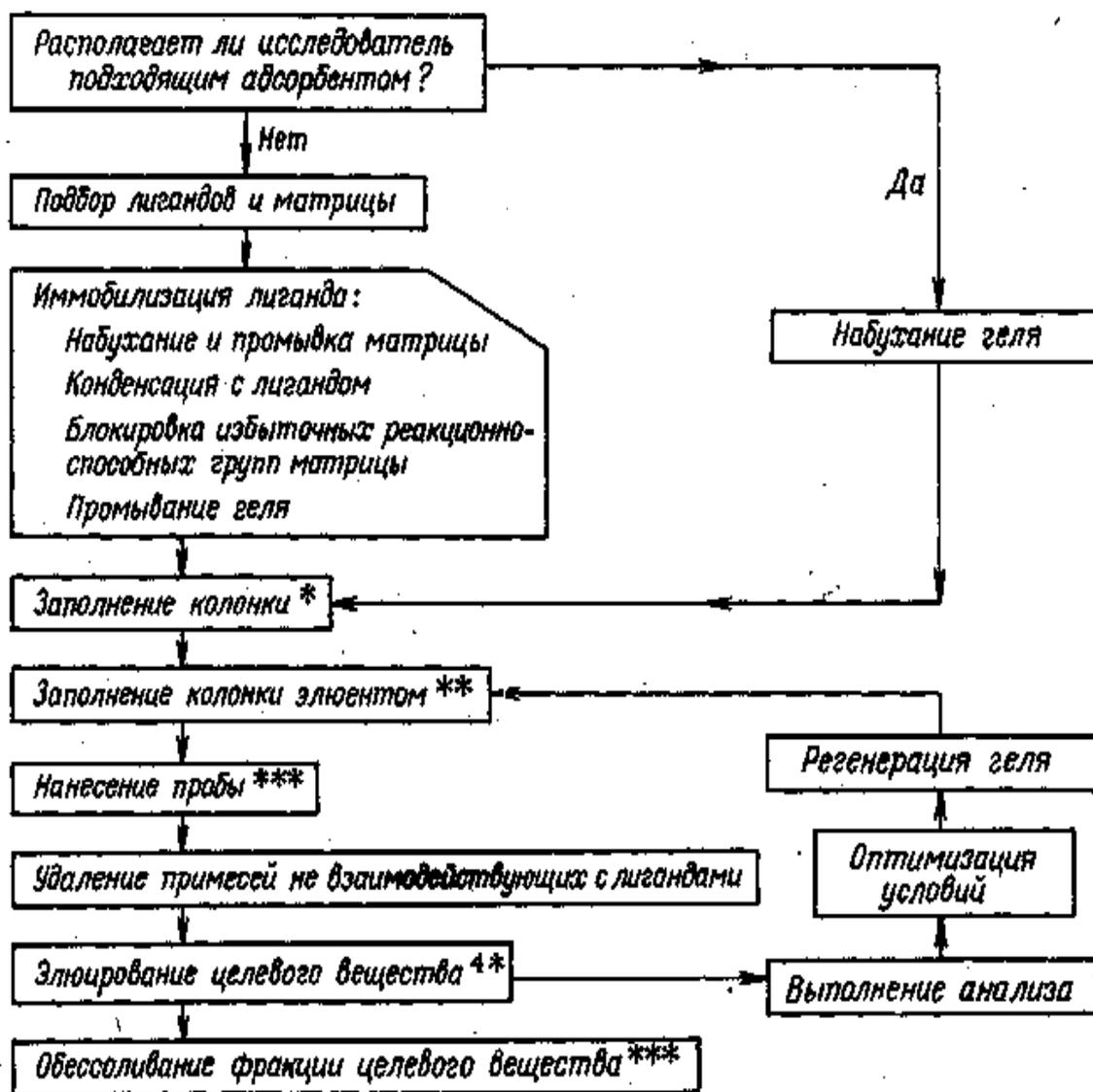
Рис. 3.9. Механизм конденсации лиганда и матрицы с образованием пептидной связи. R – молекула агарозы, R¹ или R² – лиганды, R³ – молекулы агарозы с аминогруппой

Регенерация сорбента. После завершения эксперимента сорбент промывают буферным раствором 0,1 М трис-НСl, рН 8,5 (10 объемов колонки), содержащим 0,5 моль·л⁻¹ NaCl, а затем стартовым буфером.

Хранение. Готовый гель хранят на холоду в присутствии консервантов (0,02%-ный мертиолят).

Т а б л и ц а 3.4

Порядок выполнения операций в аффинной хроматографии



* Колонка заполняют 2 – 10 мл влажного геля.

** Колонку промывают 3-х кратным объемом буфера до постоянного значения pH (процесс уравнивания).

*** Если проба растворена не в элюате, необходимо провести операцию замены буфера методом гель-фильтрации. Если анализируемые вещества прочно связаны с лигандом, объем пробы не столь важен. Вещества, слабо удерживаемые лигандом, следует наносить в небольшом объеме (примерно 5% от объема колонки).

4* Элюирование можно проводить в градиенте.

Область применения

Аффинная хроматография применяется для выделения следующих классов веществ: аналогов субстратов, ингибиторов, кофакторов (при этом роль лигандов играют ферменты); антигенов, вирусов, клеток (лиганды – антитела); полисахаридов, гликопротеинов, клеток (лиганды – лектины); гистонов, полимераз (лиганды – нуклеиновые кислоты); рецепторов, белков-переносчиков (гормоны, витамины); белков специфически взаимодействующих с мембраной клетки, лектинов (лиганды — клетки).

Гель – хроматография

Гель-хроматография (молекулярно-ситовая хроматография) – метод, основанный на различной способности молекул разного размера проникать в поры нейтрального геля, который служит неподвижной фазой.

Схематично принцип работы молекулярных сит представлен на рис. 3.10. В качестве неподвижной фазы используется пористый гель, имеющий поры определенного диаметра. Крупные молекулы не диффундируют в поры гранул и элюируются быстрее, молекулы небольшого размера удерживаются в порах гранул и элюируются позднее. На рис. 3.11. схематически изображено соотношение объемов подвижной и неподвижной фаз в колонке.

Общий объем колонки V складывается из объема растворителя между гранулами геля V_o , объема растворителя в гранулах геля (объема пор) V_n и объема матрицы V_m

$$V = V_o + V_n + V_m.$$

Молекулы, не проникающие в гранулы геля, элюируются в объеме V_o . Молекулы, свободно проникающие в гранулы, элюируются в объеме $V_o + V_n$. Молекулы, для которых доступна лишь часть пор гранул, элюируются в объеме $V_o < V_x < V_o + V_n$. Величина V_x не полностью отражает свойства того или иного вещества, так как в значительной степени зависит от общего объема V . По аналогии с распределительной хроматографией поведение вещества на колонке можно охарактеризовать коэффициентом распределения Kp

$$Kp = (V_x - V_o)/V_n ,$$

где K_p – соответствует доле неподвижной жидкой фазы, в которой находится данное вещество.

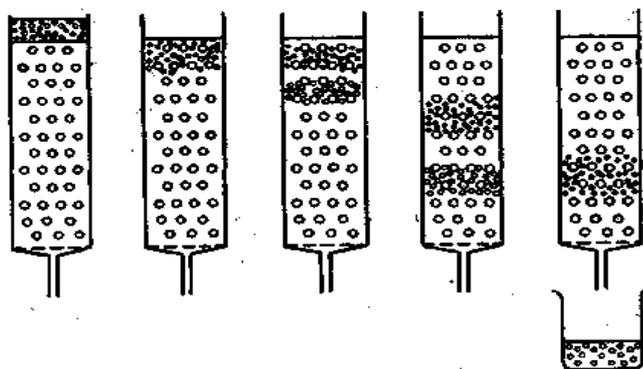


Рис. 3.10. Разделение методом гель-хроматографии

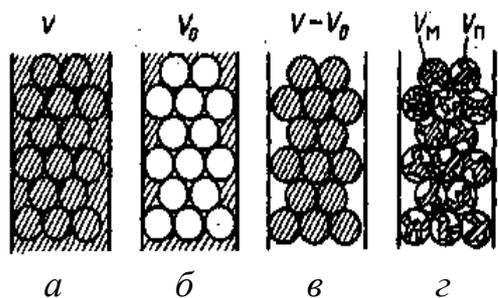


Рис. 3.11. Соотношение объемов в колонке с гелем: *a* – общий объем V ; *б* – объем подвижной фазы между гранулами геля V_0 ; *в* – объем неподвижной фазы $V - V_0$; *г* – объем матрицы V_m и общий объем пор матрицы V_n

На практике этим параметром пользоваться затруднительно поскольку нелегко определить точное значение V_n . Легче рассчитать величину $V - V_0$ (см. рис. 3.11,в). Эта разность превышает V_n на объем матрицы V_m и вместе с тем пропорциональна общему объему колонки V . Таким образом можно ввести константу K_x , также соответствующую доле неподвижной фазы, в которой находится данное вещество

$$K_x = (V_x - V_0) / (V - V_0).$$

Хотя K_x не идентична коэффициенту распределения, с ее помощью можно описать результаты эксперимента независимо от размеров колонки и, таким образом, сопоставить результаты многих опытов. Результаты экспериментов можно нормировать при помощи

величин V_x/V и V_x/V_o . Однако в отличие от K_x эти величины зависят от свойств геля.

Материалы

Хроматографические свойства геля определяются природой матрицы и прежде всего пористостью ее структуры, в то время как химическое строение каркаса имеет второстепенное значение. В зависимости от способности набухать в воде или в органических растворителях материалы для гель-хроматографии подразделяются на гидрофильные и органофильные (гидрофобные).

Гидрофильные гели

Декстриновые гели или сефадексы (Pharmacia). Представляют собой полисахаридные цепи, сшитые эпихлоргидрином. Вследствие наличия множества гидроксильных групп такая матрица хорошо удерживает воду. Степень набухания геля уменьшается по мере возрастания степени сшитости. По мере уменьшения размеров пор в объем элюирования попадают вещества с меньшей молекулярной массой.

В табл. 3.5 приведены свойства и указаны области применения различных сефадексов.

Чем меньше степень сшитости, тем мягче гель, и, следовательно, тем меньше рабочее давление в колонках, а значит, и скорость подачи элюента. Так, сефадекс G-10 выдерживает давление до 10^5 Па (например, ускоренный процесс обессоливания белков), а сефадекс G-200 выдерживает давление до $5 \cdot 10^3$ Па. Как и полиакриламидные гели, декстрановые гели применяются для выделения и очистки ферментов, так как их матрица не обладает денатурирующими свойствами (в отличие от полистирольных гелей и пористых стекол).

Полиакриламидные гели получают сополимеризацией акриламида и сшивающего агента N,N'-метилден-бис-акриламида. Полярные амидные группы ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) способствуют сольватации его в водной среде.

В зависимости от условий полимеризации (соотношения мономеров, концентрации) получают сферические гранулы полимера с различными диаметрами пор. При высокой концентрации сшивающего агента образуется высокопористый гель, обладающий вместе с тем высокой механической прочностью (макропористый гель). Такой материал выпускается фирмой Био-Рад под названием био-гель Р (Bio-Gel P). В табл. 3.6 приведены рабочие характеристики гелей этого типа.

Т а б л и ц а 3.5

Свойства сефадексов

Тип сефадекса	Размеры частиц в сухом состоянии, мкм	Область применения (молярная масса 10^{-3})		Объем матрицы (сухой гель), мл г^{-1}	Время набухания, ч	
		пептиды и глобулярные белки	декстран		при 20°C	при 90°C
G-10	40 – 120	0,7	0,7	2 – 3	3	1
G-15	40 – 120	1,5	1,5	2,5 – 3,5	3	1
G-25 крупный	100 – 300	1 – 5	0,1– 5	4 – 6	3	1
средний	50 – 100					
мелкий	20 – 80					
супермелкий	10 – 40					
G-50 крупный	100 – 300	1,5 – 30	0,5 – 10	9 – 11	3	1
средний	50 – 150					
мелкий	20 – 80					
супермелкий	10 – 40					
G-75	40 – 120	3 – 80	1 – 50	12 – 15	24	3
супермелкий	10 – 40	3 – 70				
G-100	40 – 120	4 – 150	1 – 100	15 – 20	72	5
супермелкий	10 – 40	4 – 100				
G-150	40 – 120	5 – 300	1 – 150	20 – 30	72	5
супермелкий	10 – 40	5 – 150		18 – 22		
G-200	40 – 120	5 – 600	1 – 200	30 – 40	72	5
супермелкий	10 – 40	5 – 250		20 – 25		

Агарозные гели получают из линейного полисахарида – агарозы, построенного из остатков молекул D-галактозы и 3,6-ангидро-галактозы. Гель образуется самопроизвольно при охлаждении горячего раствора агарозы. При этом происходит продольная агрегация цепей агарозы, вследствие чего образуется гель с очень большими порами. Так как структура геля формируется главным образом за счет водородных связей, область применения геля ограничена: при повышенной температуре или воздействии реагентов, разрушающих водородные связи (например, мочеви-

ны), структура геля нарушается. Другим недостатком этих гелей является чувствительность к микроорганизмам. Агарозные гели находят применение при разделении высокомолекулярных биополимеров и в качестве матриц для сорбентов в аффинной хроматографии. Гели выпускаются под торговыми названиями сефароза (Pharmacia) и био-гель А (Bio-Rad Lab.). Рабочие характеристики гелей агарозы приведены в табл. 3.7. Сравнительно новым является гель, основой которого служит каркас из полиакриламида, а промежуточное пространство заполнено гелем агарозы. Благодаря небольшим размерам гранул и их высокой механической прочности эти материалы можно использовать при более высокой скорости подачи элюента, чем принято для сефадексов и био-гелей. Этот тип геля выпускается под торговым названием ультрогель (Ultrogel, производства LKB). Сшитая эпихлоргидрином агароза выпускается под торговой маркой сефароза CL (Pharmacia). Маркировка и области применения гелей этого типа приведены на рис. 3.12.

Сефакрил (Sephacryl, Pharmacia) является сополимером декстрана, несущего аллильные группы, и N,N'-метилден-бис-акриламида. Гранулы геля обладают высокой механической прочностью, химически устойчивы (стабильны в области pH 3–11, выдерживают стерилизацию в автоклаве при pH 7 и температуре до 120°C); вследствие жесткой структуры устойчивы к действию органических растворителей. При переходе от воды к полярным органическим растворителям объем геля изменяется незначительно (табл. 3.8). Схематично перевод сефакрила из водной среды в органический растворитель и обратно изображен на рис. 3.13. Этот процесс осуществляется одинаково для всех хроматографических материалов. Маркировка и области применения сефакрила приведены на рис. 3.12.

Гидрогель (Hydrogele, Waters) – сильносшитый полимер, хорошо удерживающий воду, может быть использован при давлении до 2,5·10⁷ Па. В кислой или щелочной средах на гидрогеле возможна адсорбция заряженных веществ. Области применения гидрогеля указаны на рис. 3.12. Более подробная информация о свойствах гидрогеля в литературе отсутствует.

Органофильные гели

Производные декстрина – сефадекс LH-20 и сефадекс ДН-60. Это, в сущности, сефадексы G-25 и G-50, у которых гидроксильные группы этерифицированы (образуют простые эфиры) гидроксипропильной группой. Вследствие этого гели обладают как гидрофильными, так и липофильными свойствами. Из смеси полярных и неполярных растворителей (хлороформ–метанол, бутанол – вода) гель избирательно впитывает полярные компоненты, т. е. возникает положение, характерное для распределительной

хроматографии. Поэтому характер взаимодействия разделяемых веществ с сорбентом в значительной степени зависит от состава элюента.

Т а б л и ц а 3.6

Свойства био-гелей Р

Тип геля	Размер частиц в набухшем состоянии, мкм	Область применения (молярная масса 10^3) для пептидов и глобулярных белков	Объем матрицы в сухом состоянии, млг^{-1}
Р-2	150 – 300	0,1 – 1,8	3,5
	80 – 150		
Р-4	40 – 80, <40	0,8 – 4	5
	150 – 300		
Р-6	80 – 150	1 – 6	8
	40 – 80, <40		
Р-10	150 – 300	1,5 – 20	9
	80 – 150		
Р-30	40 – 80, <40	2,5 – 40	11
	150 – 300		
Р-60	80 – 150, <40	3 – 60	14
	150 – 300		
Р-100	80 – 150, <40	5 – 100	15
	150 – 300		
Р-150	80 – 150, <40	15 – 150	18
	150 – 300		
Р-200	80 – 150, <40	30 – 200	25
	150 – 300		
Р-300	80 – 150, <40	60 – 400	30

Регулируя состав элюента, можно либо подавить адсорбционные свойства геля, т. е. провести разделение в режиме гель-хроматографии,

либо разделять вещества с близкими молекулярными массами, т. е. работать в режиме распределительной или адсорбционной хроматографии.

Полистирольные гели используют для работы в режиме гель-хроматографии, а также для адсорбции (извлечения, отделения) неполярных веществ и детергентов. Эти материалы выпускают под торговыми названиями био-бедс S и био-бедс SM (Bio-Beads, Bio-Rad. Lab.). Являются сополимерами стирола и дивинилбензола; диаметр пор геля в значительной степени зависит от природы растворителя. Полистирольные гели сильно набухают в неполярных растворителях (толуол, четыреххлористый углерод), которые по этой причине часто используются в качестве элюентов.

Поскольку гель легко деформируется, удовлетворительные результаты достигаются лишь при небольших скоростях потока. Данные об области применения этих гелей приведены на рис. 3.12.

Т а б л и ц а 3.7
Свойства агарозных гелей сефарозы (Pharmacia)
и био-геля А (Bio-Rad Lab.)

Тип геля	Концентрация агарозы, %	Размеры частиц в набухшем состоянии, мкм	Область применения (молекулярная масса) для глобулярных белков
Сефароза 2В	2	60 – 200	$7 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^7$
Сефароза 4В	4	60 – 140	$6 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7$
Сефароза 6В	6	45 – 165	$10^4 - 10^6$
Био-гель А- 150m	1	150 – 300	$10^6 - > 1,5 \cdot 10^8$
		80 – 150	
Био-гель А-50m	2	150 – 300	$10^5 - 10^7$
		150 – 300	
Био-гель А- 15m	4	80 – 150	$4 \cdot 10^4 - 15 \cdot 10^6$
		40 – 80	
		150 – 300	
Био-гель А-5т	6	80 – 150	$10^4 - 5 \cdot 10^6$
		40 – 80	
		150 – 300	
Био-гель А-1,5m	3	80 – 150	$< 10^4 - 1,5 \cdot 10^6$
		40 – 80	
		150—300	
Био-гель А-0,5т	10	80—150	$< 10^4 - 5 \cdot 10^5$
		40—80	

Т а б л и ц а 3.8
Свойства сефакрилов (Pharmacia)

Тип сорбента	Размеры частиц во влажном состоянии, мкм	Область применения (молярная масса)		Объем набухшего в воде геля в 100 мл указанного растворителя			
		глобулярные белки	полисахариды	ДМФ	AcOEt	CHCl ₃	Гептан
S-200 супер мелкий	40–10 ⁵	5·10 ³ –2,5·10 ⁵	1·10 ³ –8·10 ⁴	100	70	70	65
S-300 супер-мелкий	40–10 ⁵	1·10 ⁴ –1,5·10 ⁶	1·10 ³ –4·10 ⁵	100	90	85	70

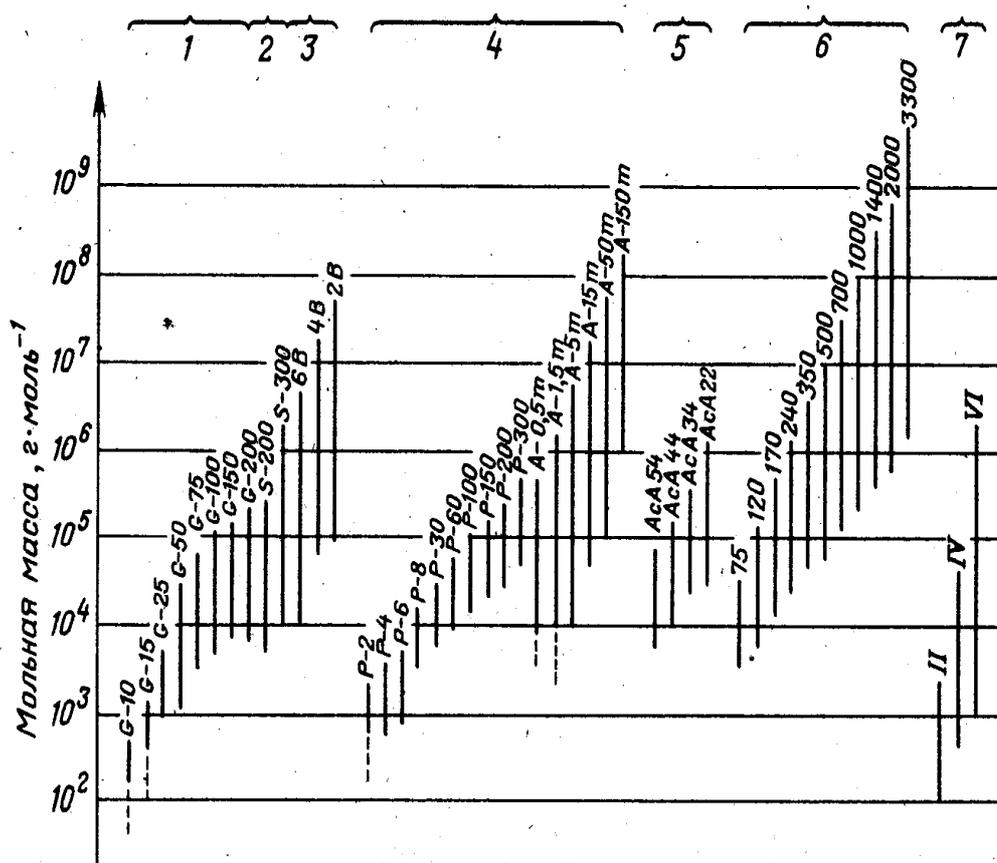


Рис. 3.12. Области применения гелей и пористых стекол в водной среде: 1 – сефакрил; 2 – сефадекс; 3 – сефароза GL (Pharmacia); 4 – био-гель (Bio-Rad); 5 – ультрагель (LKB); 6 – пористое стекло CPG (Serva); 7 – гидрогель (Waters)

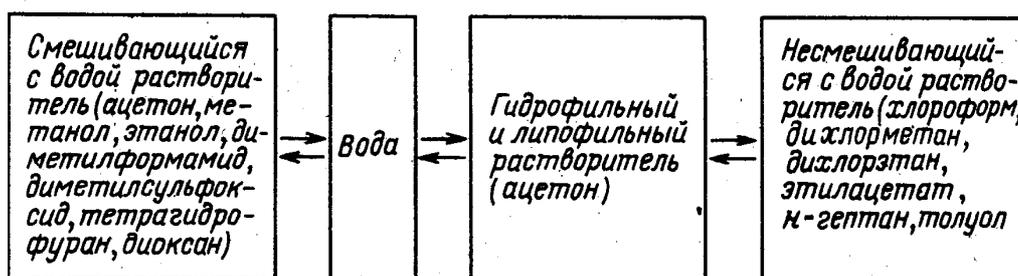


Рис.3.13. Схема перевода гелей из водного растворителя в неорганический и обратно

Био-бедс S применяются для разделения и определения молекулярных масс алканов, жиров, жирных кислот и полистиролов. Био-бедс SM-2 (идентичен амберлиту XAD-2, Amberlite XAD-2) – механически прочный макропористый гель, степень набухания которого в различных растворителях изменяется незначительно. Особенно удачно гель применяют при извлечении детергентов и других неполярных веществ из водных растворов.

Стирагель (Styragel, Waters) – сильносшитый макропористый полистирольный гель, вследствие высокой механической прочности применяется при работе в режиме ВЭЖХ. В качестве растворителей рекомендуется использовать тетрагидрофуран, диметилформамид, дихлорметан и ароматические углеводороды.

Гель поставляется в набухом состоянии; не рекомендуется высушивание геля, а также его контакт с полярными растворителями, например водой, метанолом. Данные об области применения геля приведены на рис. 3.14.

Пористые стекла (Controlled Pore Glasses, CPG Serva) стойки ко всем типам растворителей, применяются в жидкостной хроматографии при высоком давлении. Адсорбционные свойства, характерные для обыкновенных кремнеземов, у пористых стекол незначительны и могут быть сведены к минимуму при помощи дополнительной обработки. Тем не менее, для работы с легко денатурирующими белками их надо применять с известной долей осторожности. К тому же растворы белков с изоэлектрическими точками выше pH 7 заметно адсорбируются кислыми функциональными группами пористого стекла. Для исключения денатурации и адсорбции белков на пористом стекле рекомендуется: изменить ионную силу элюента; заменить тип соли или буфера; уменьшить значение pH; добавить в элюент 5%-ный этанол, 0,4%-ный полиэтиленгликоль 20000 или детергент (например, 0,1%-ный

додецилсульфат натрия); использовать модифицированное пористое стекло (амино- или глицерил-производные).

Области применения пористых стекол CPG-10 (Serva) и фрактосила (Fractosil, Merck) приведены на рис. 3.14.

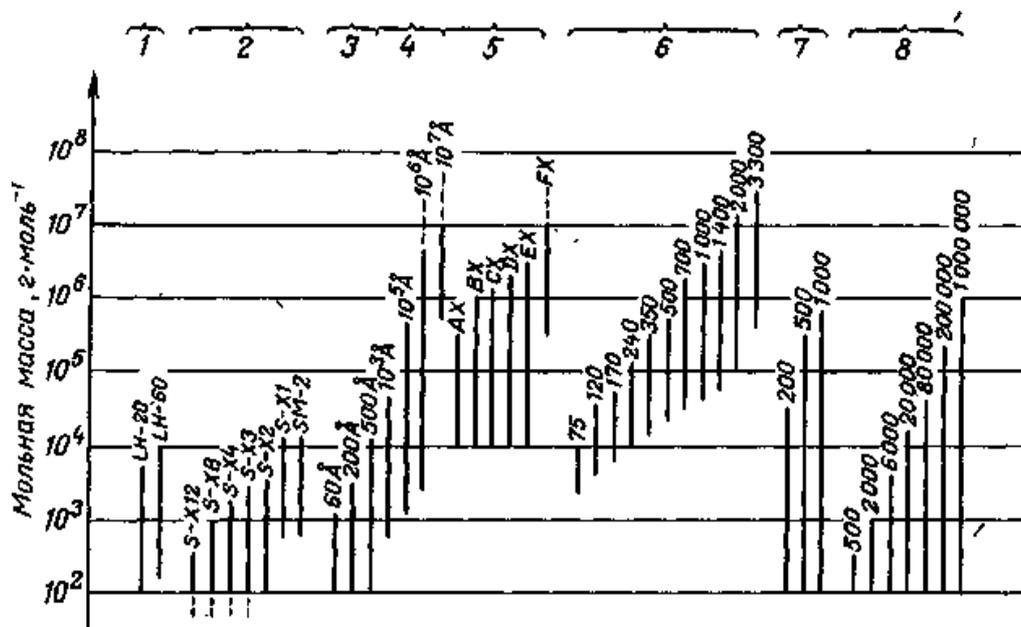


Рис. 3.14. Области применения гелей и пористых стекол в органических растворителях: 1 – сефадекс (Pharmacia); 2 – био-бедс (Bio-Rad); 3 – порагель (Poragel); 4 – стирагель (инактивированный); 5 – порасил (Waters); 6 – пористое стекло CPG-10 (Serva); 7 – фрактосил; 8 – фрактогель PVA (Merck)

Подготовка эксперимента

Выбор геля. При этом руководствуются данными о свойствах разделяемых веществ и характером решаемой задачи. В зависимости от растворимости целевого вещества в воде (см. рис. 3.12) или органическом растворителе (см. рис. 3.14) используют гель, рабочая область которого соответствует значению молекулярной массы целевого вещества. Если молекулярная масса целевого вещества неизвестна, выбор производится по данным о нижнем пределе исключения, так как в этом случае результат эксперимента служит основой для оптимизации процесса (рис. 3.15). Если же, несмотря на тщательность выбора геля, получают неудовлетворительные результаты, то с целью оптимизации рекомендуется: использовать более мелкую фракцию геля; использовать более длинную

колонку, уменьшить скорость подачи элюента; вести разделение в режиме рецикла.

Выбор размеров колонки в первую очередь зависит от количества разделяемой смеси. При разделении с высоким разрешением объем образца не должен превышать 1–2% рабочего объема геля. При хроматографии в препаративном масштабе качеством разделения пренебрегают ради высокой нагрузки. Колонки высотой более 1 м трудно упаковать равномерно из-за действия эффекта седиментации, поэтому рекомендуется соединять последовательно несколько более коротких колонок. Если образец растворен в большом объеме, увеличивают диаметр колонки. При этом облегчается упаковка колонки и становится возможным элюирование с высокой скоростью подачи элюента. На колонках размером 2,5x100 см предельная нагрузка составляет 1 г, на колонках 4x100 см – 10 г.

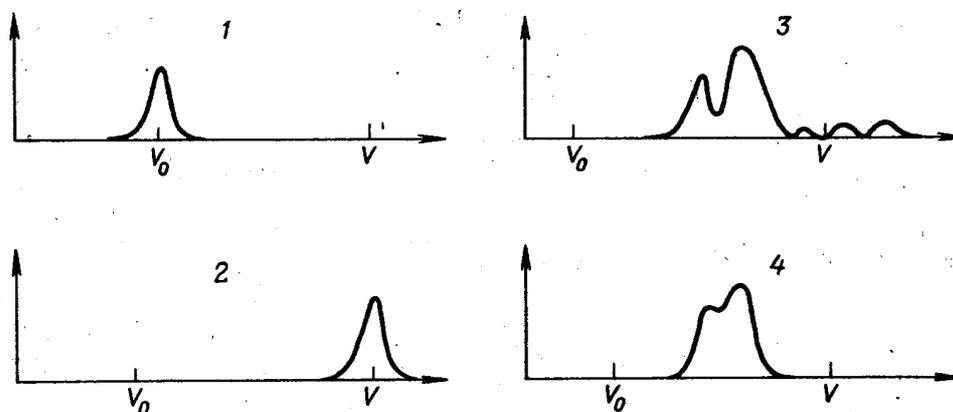


Рис. 3.15. Оптимизация условия разделения в гель-хроматографии: 1 – все компоненты анализируемой смеси элюируются с фронтом растворителя (рекомендуется использовать гель с большим диаметром пор); 2 – все компоненты анализируемой смеси элюируются в общем объеме V (рекомендуется использовать гель с меньшим диаметром пор); 3 – некоторые компоненты смеси элюируются в объеме, большем V , т. е. наблюдается заметная адсорбция на матрице (рекомендуется сменить элюент, использовать элюент, исключая адсорбцию); 4 – компоненты смеси неудовлетворительно разделяются (рекомендуется увеличить высоту колонки, соединить несколько колонок, работать в режиме рециркуляции)

Порядок выполнения операций

Заполнение колонок (см. предыдущий раздел).

Нанесение образца. Образец наносят при помощи шприца.

Элюирование. Скорость подачи элюента регулируют посредством изменения перепада гидростатического давления или задают при помощи насоса. Скорость потока поддерживают минимальной: в этих условиях

уменьшается расширение зон высокомолекулярных компонентов за счет продольной диффузии.

В гель-хроматографии эффективность разделения слабо зависит от типа элюента, тем не менее, иногда возникают следующие осложнения:

– адсорбция материала из-за наличия на матрице заряженных групп; адсорбцию можно исключить, если вести процесс в кислой среде (1% АсОН) в растворе с низкой ионной силой (0,02);

– адсорбция веществ с ароматическими группировками; адсорбцию можно исключить, добавив в элюент детергенты или 5 – 8 М раствор мочевины.

Хранение геля. Набухшие гели (в воде или буферном растворе) являются, хорошей питательной средой для микроорганизмов. При эксплуатации колонки вероятность размножения микроорганизмов незначительна, однако при длительном хранении заполненных колонок или набухшего геля рекомендуется принимать следующие меры предосторожности:

хранить упакованные колонки в холодной комнате или специальной камере (при -4°C);

добавить в элюент консерванты: 0,5%-ный раствор трихлорбутанола (действует в слабокислой среде), 0,005%-ный раствор тиомерзала (или мертиолята, Pharmacia), 0,002%-ный раствор хлоргексидина (не для агарозных гелей). Азид натрия вследствие его токсичности и канцерогенности применять не рекомендуется. Органические растворители не применяются в качестве консервантов готовых колонок, так как в их присутствии гель сильно сжимается (например, в присутствии этанола) или же консервант (например, толуол) с трудом вымывается из колонки. Перед началом работы следует полностью отмыть все консерванты, поскольку они мешают детектированию разделяемых веществ или затрудняют их последующую идентификацию.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограмму: на оси ординат указывают концентрацию вещества в элюате (в делениях шкалы самописца), поглощение в УФ-свете E_{264} или оптическую плотность D_{280} при определенных длинах волн; на оси абсцисс указывают время выхода (в часах или минутах), или же объем выхода (в миллилитрах или приведенных величинах V_x/V_o или K_x). Далее указывают: размеры колонки (диаметр, высота); тип элюента; скорость подачи элюента, $\text{мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ или $\text{мл}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$.

Пример оформления результатов (рис. 3.16): колонка – 2,6x85 см; элюент – 0,1 м трис-НС1/0,5М NaCl, pH 8; скорость потока – $2\text{ мл}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$.

В случае препаративного разделения в экспериментальной части приводят данные об объеме фракций и о последующей обработке фракций, содержащих целевое вещество.

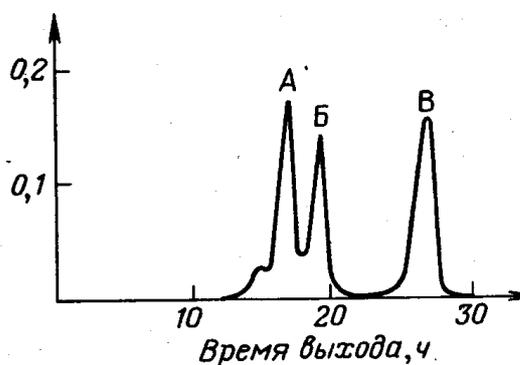


Рис. 3.16. Разделение на сефакиле S200 (супермелкий) смеси белков: IgG – пик А; трансферина – пик Б; α -химотрипсиногена – пик В

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Оба метода основаны на различии скоростей перемещения компонентов анализируемой смеси в плоском тонком слое сорбента при движении по нему растворителя (элюента). Растворитель перемещается по сорбенту под действием капиллярных или гравитационных сил.

Физические основы метода

Метод ТСХ представляет собой процесс разделения в тонком слое сорбента. Слой сорбента наносят на поддерживающую подложку (пластинку, пленку). Преимущество ТСХ заключается в том, что при небольших затратах можно быстро и эффективно проводить разделение различных сложных смесей. Пластинки для хроматографии производятся промышленным способом, а также их можно сделать самостоятельно.

Разделение в ТСХ осуществляется вследствие многократного пересечения молекулами веществ границы фаз Т – Ж или Ж – Ж, т. е. вследствие многократного процесса распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижной фазой служит либо сухой сорбент (адсорбционная хроматография), либо сорбент, покрытый жидкой фазой, например слоем воды (распределительная хроматография). Систему растворителей подбирают в соответствии со свойствами разделяемых веществ.

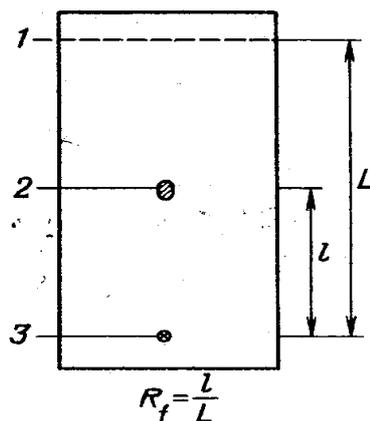


Рис. 3.17. Пластика ТСХ: 1 – фронт растворителя; 2 – пятно целевого вещества; 3 – стартовая точка; L – расстояние старт – фронт; l – расстояние старт – пятно целевого вещества

В качестве сорбентов используют многие материалы, но наиболее часто используемыми материалами являются силикагель и оксид алюминия.

Обычно на ТСХ-пластинках сорбенты закрепляют при помощи органических связующих материалов. Такой слой держится достаточно прочно, на нем можно даже делать пометки мягким карандашом. Результаты разделения хорошо воспроизводятся. Высокое качество пластинок гарантируется лишь при условии правильного хранения (так как слой сорбирует летучие вещества из воздуха). Для большинства экспериментов вполне подходят стандартные пластинки. Пластинки высшего качества (высокоэффективные ТСХ-пластинки или ВЭТСХ-пластинки) используются лишь при количественном анализе.

Следует запомнить, что полярные вещества следует разделять в полярных растворителях, неполярные – в менее полярных или неполярных растворителях.

В различных системах растворителей вещества обладают различной подвижностью. Количественно подвижность выражается величиной R_f , иначе называемой фактором удерживания (рис. 3.17).

R_f равно отношению расстояний от стартовой линии до середины пятна вещества и от стартовой линии до линии фронта растворителя. Значение R_f практически не зависит от длительности проявления, но зависит от множества других факторов (в том числе и от влажности воздуха) и, следовательно, может служить лишь предварительным ориентиром. Большинство химических соединений лишено окраски, и для

их обнаружения на пластине используют различные физические и химические методы:

Флуоресценция. Многие ароматические вещества имеют собственную флуоресценцию при 360 нм; при этой длине волны они обнаруживаются в виде желтых флуоресцирующих пятен на темном фоне.

Абсорбция. Большинство готовых ТСХ-пластин содержит люминофоры (такие пластинки помечены индексом Φ_{254} или F_{254}); при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм они светятся равномерным желто-зеленым фоном. Вещества, поглощающие в УФ-области, обнаруживаются в виде темных пятен на светлом фоне.

Химические реакции. Функциональные группы веществ способны вступать в реакции со специфическими реагентами с образованием хромофоров (аминогруппы белков и пептидов проявляются с помощью нингидрина).

Область применения

Разделение веществ на аналитическом (нг, мкг) и полупрепаративном уровне (мг, г) в органической и неорганической химии, биохимии, клинической химии, фармацевтике, при контроле продуктов питания.

Аналитическая ТСХ

Основы метода

ТСХ позволяет проводить анализ веществ в пределах 1 – 10 мкг, а на ВЭТСХ-пластинках – в пределах нескольких нанограмм. Стартовое пятно должно иметь минимальные размеры при оптимальной нагрузке, так как при проявлении пластинки пятна размываются вследствие броуновского движения молекул вещества. Если пробу предполагается хроматографировать на силикагеле или оксиде алюминия (адсорбционная хроматография), то образец следует растворять в наименее полярном растворителе, например гексане. В этом случае вещество сорбируется на носителе сразу после выхода из капилляра и формирует точечное стартовое пятно. Если образец растворяется в неполярном растворителе не полностью, то плохо растворимые компоненты смеси зарегистрировать не удастся и данные о составе смеси недостоверны.

Прежде чем начать проявление, необходимо полностью удалить с пластинки растворитель, в котором наносили пробу. Для этого при анализе термостабильных веществ используют фен или помещают

пластинку на короткое время в сушильный шкаф, а при анализе нестабильных веществ, пластинку высушивают в вакуум-эксикаторе. Последовательность операций при нанесении пробы показана на рис. 3.18.

При нанесении пробы рекомендуется:
 наносить минимальный объем (примерно 1 мкл);
 при хроматографии на силикагеле или оксиде алюминия растворять образец в наименее полярном растворителе;
 пробу наносить узким капилляром (внутренний диаметр не более 0,5 мм) или подавать ее небольшими порциями при помощи шприца;
 при разделении на ВЭТСХ-пластинках для точного дозирования пробы применять микродозаторы – аппликаторы, рассчитанные на несколько нанолитров.

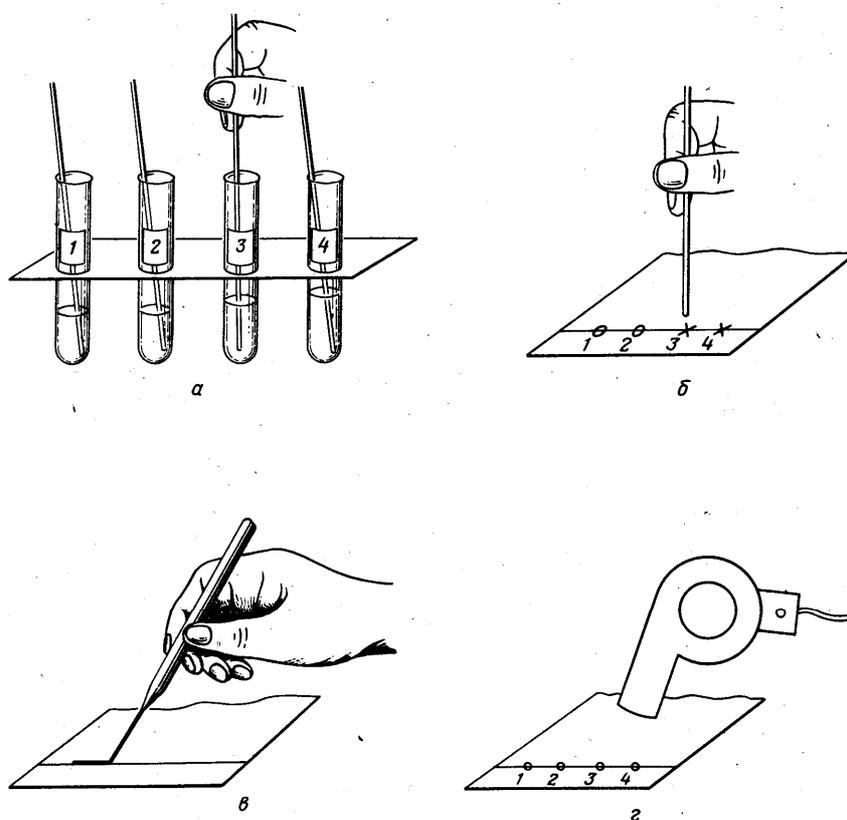


Рис. 3.18. Последовательность операций при нанесении пробы на пластинку для ТСХ: *а* – отбор пробы (для каждого образца необходим отдельный капилляр); *б* – нанесение в точку; *в* – нанесение полосой; *г* – высушивание стартовой зоны

В большинстве случаев вполне достаточно использовать обычные калиброванные капилляры на 1 – 5 мкл. Поскольку аппликаторы довольно дороги и их применение имеет смысл только при рутинных массовых анализах, были созданы новые типы пластинок, у которых функцию аппликатора выполняет «концентрирующая зона».

Пластинки с концентрирующей зоной состоят из двух зон: концентрирующей и рабочей. Первая состоит из синтетического диоксида кремния, обладающего слабыми адсорбционными свойствами; ширина зоны составляет около 25 мм, толщина слоя зоны – 0,15 мм; зона в виде полосы расположена вдоль нижнего края пластинки. Вторая зона имеет толщину слоя 0,25 мм. При нанесении пробы в концентрирующую зону образуются вытянутые эллипсообразные пятна, которые при переходе в рабочую (сильно адсорбирующую) зону концентрируются в виде очень узких полосок.

Непосредственно после концентрирования проводят хроматографическое разделение пробы.

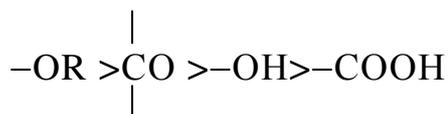
Применение таких пластинок позволяет: исключить экстракцию образца; исключить применение аппликаторов; упростить процедуру нанесения образца (форма стартового пятна не имеет значения); равномерно распределять нагрузку на пластинке (полупрепаративное разделение).

Выбор элюирующих систем

Выбор элюента служит предметом обсуждения только при работе на полярных сорбентах, таких как силикагель или оксид алюминия. В других случаях выбор элюента не составляет проблемы. В элюотропном ряду растворители располагаются в порядке возрастания элюирующих свойств.

При этом соблюдаются следующие закономерности:

- вещество характеризуется большим значением R_f в более полярных растворителях;
- менее полярное вещество характеризуется большим значением R_f , для веществ со сходными свойствами или соединений одного гомологического ряда R_f возрастает при увеличении числа неполярных групп ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$); R_f уменьшается при увеличении числа полярных групп или по мере увеличения полярности функциональных групп:



При элюировании в одном растворителе редко удается достичь удовлетворительного разделения. Более эффективными являются системы, составленные из двух или более растворителей.

Поскольку силикагель обладает сродством к полярным веществам, т.е. избирательно удерживает полярные компоненты (из системы растворителей), в рабочем слое наряду с адсорбцией наблюдается и эффект распределения. По мере продвижения элюирующей смеси по

пластинке изменяется ее состав, т. е. формируется градиент полярности растворителя.

Кроме того, при взаимодействии твердой и жидкой фазы в слое происходят очень сложные процессы, однако эти обстоятельства практически не влияют на конечные результаты, и разделение методом ТСХ дает хорошо воспроизводимые результаты.

Вещества с заряженными группами (амины, карбоновые кислоты) не удается разделить на силикагеле и оксиде алюминия, поскольку оба сорбента имеют собственные ионогенные группы (силикагель получают путем осаждения золя кремневой кислоты). Поэтому при составлении систем растворителей руководствуются общими правилами.

На силикагеле (слабокислотный сорбент) разделяют: соединения с кислотными свойствами в системах, содержащих кислоты (чаще органические – уксусную, муравьиную); соединения с основными свойствами – в системах, содержащих основания (аммиак).

На оксиде алюминия (слабоосновной сорбент) разделяют как соединения с кислотными свойствами в очень кислых системах, так и основные соединения, поскольку на силикагеле они, как правило, необратимо сорбируются.

Условия проведения эксперимента

Воспроизводимость результатов зависит от условий проявления. Разделение проводят в атмосфере, насыщенной парами элюента (в этом случае стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, которую незадолго до эксперимента пропитывают растворителем), или в отсутствие паров элюента. В последнем случае значение R_f больше, поскольку на фронте элюента происходит постепенное испарение растворителя за счет теплоты адсорбции. Поэтому процесс проявления занимает больше времени, а величины пробега разделяемых веществ несколько увеличиваются. Этот метод применяется в том случае, когда вещества в камере, насыщенной парами элюента, имеют очень низкие R_f . Относительно того, какой способ проявления считать оптимальным, мнения специалистов расходятся.

В ТСХ практически невозможно обеспечить абсолютную воспроизводимость условий проявления. Слой сорбента обязательно сорбирует пары воды, количество которых зависит от влажности среды. Следы воды особенно мешают при разделении липофильных веществ в неполярных растворителях.

Следовательно, сравнивать величины R_f , полученные в различных экспериментах некорректно и скорее всего нецелесообразно.

Материалы и приборы

Самыми распространенными являются *пластинки* размером 20x20, 10x20, 5x20 и 5x10 см. Пластины для ВЭТСХ выпускаются размером 10x10 и 20x10 см. На пластинках размером 20x10 см разделение проводят в поперечном направлении, они предназначены для одновременного анализа множества проб. Синтетические пленки со слоем сорбента выпускаются в виде пластинок квадратной формы и в виде рулонов шириной 20 см.

В зависимости от назначения (анализ или препаративное разделение) применяют пластинки со слоями сорбента различной толщины. Пленки для анализа имеют слой толщиной 0,1 и 0,3 мм, пленки для препаративных целей – 0,5 и 2 мм. Для обнаружения веществ, поглощающих в УФ-области спектра, в состав сорбента включают люминофоры.

Для нанесения образцов используют: тонкие капилляры (с внутренним диаметром 0,5 мм); микрошприцы объемом 5 – 10 мкл; дозирующие шприцы с фиксированным объемом; аппликаторы.

Элюирование проводят в *камерах*, изображенных на рис. 3.19. Они просты в изготовлении, дешевы и удобны в работе.

Для обнаружения анализируемых веществ используют пульверизаторы (рис. 3.20).

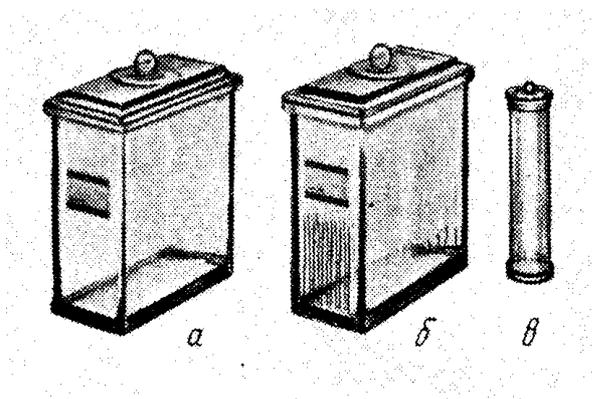


Рис. 3.19. Камеры для ТСХ. а – стандартная камера для пластинок размером 20x20 см; б – камера для пяти пластинок; в – камера для пластинок размером 5x20 см.

Порядок выполнения операций

Нанесение пробы и проявление пластинки. Для отбора необходимого объема пробы (1 – 5 мкл) капилляр погружают в раствор образца, который под действием капиллярных сил заполняет часть капилляра.

Избыток раствора отбирают при помощи фильтровальной бумаги; более точно необходимый объем можно отмерить с помощью шприца.

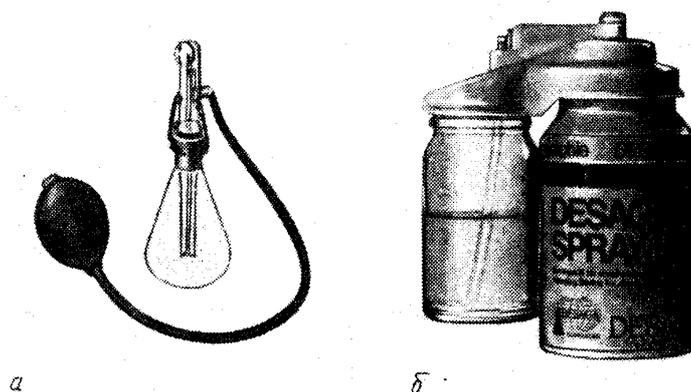


Рис. 3.20. Пульверизаторы для обнаружения зон целевых веществ в ТСХ: а – простейший лабораторный пульверизатор; б – пульверизатор фирмы Desaga GmbH (Германия)

Капилляром осторожно касаются слоя сорбента на стартовой линии, при контакте образуется круглое пятно, диаметр которого не должен превышать 2 мм.

Остаток раствора из капилляра отбирают фильтровальной бумагой.

В камеру, выложенную по стенкам фильтровальной бумагой, помещают элюент (высота слоя 1 см) и, покачивая камеру, смачивают листы бумаги. В случае легколетучих растворителей время насыщения составляет 10 – 15 мин:

В камеру помещают пластинку, причем стартовая линия не должна быть погружена в растворитель.

Если растворимость пробы недостаточно высокая, то ее растворяют в большем объеме, разбавленный раствор наносят порциями по 1 – 2 мкл, высушивая каждый раз стартовое пятно при помощи фена (см. рис. 3.18).

По достижении фронтом растворителя высоты 10 – 15 см пластинку извлекают, отмечают положение фронта и высушивают.

Обнаружение. Для обнаружения применяются разнообразные реагенты, образующие с анализируемыми веществами окрашенные продукты. Пластинку равномерно опрыскивают раствором реагента, а затем выдерживают при комнатной или повышенной температуре. Флакон с готовым к употреблению проявителем изображен на рис. 3.20. Опрыскивание хроматограмм проводят в хорошо вентилируемом шкафу. При этом исключается попадание токсичных или канцерогенных аэрозолей в дыхательные пути или на кожу. В вытяжном шкафу желательно иметь специальный бокс, в котором можно опрыскивать пластинку с расстояния 30 см, перемещая пульверизатор круговыми движениями. Бокс предохранит вытяжной шкаф от воздействия агрессивных реагентов (рис. 3.21).

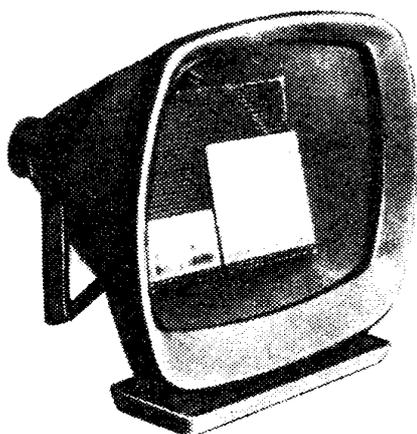


Рис. 3.21. Бокс для опрыскивания пластинок
(Desaga GmbH, Heidelberg)

При количественном анализе методом ТСХ необходимо обеспечивать равномерное распределение реагента по поверхности пластинки. Для этого готовые пластинки с надежно закрепленным слоем можно погружать в раствор реагента. Часто реакция окрашивания протекает лишь при повышенной температуре. При качественном анализе пластинку нагревают в сушильном шкафу; при количественном анализе нагрев проводят в строго контролируемых условиях, на специальных нагревателях. За изменением окраски следят визуально и по достижении оптимальной интенсивности прекращают нагрев.

Идентификация анализируемых веществ. Уже на основании собственной флуоресценции веществ в УФ-свете можно сделать предварительное заключение о классе веществ. Дополнительные сведения о типе функциональных групп получают при обработке

пластинки специфическими реагентами. Иногда связующие компоненты уменьшают интенсивность окраски. В этом случае рекомендуется использовать другой тип пластинок.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограммы, срисованные на кальку или фотокопированные. Далее записывают следующие сведения: тип сорбента, название фирмы-изготовителя; состав элюента (включая режим насыщения камеры); положение стартовой линии, положение пятен (по возможности тип и интенсивность окраски), положение фронта растворителя; способ обнаружения (тип реагента).

В научных публикациях результаты анализа методом ТСХ приводятся в следующем виде: вещество X гомогенно при ТСХ. ($R_f = 0,5$, хлороформ – метанол, $V:V = 7:3$, силикагель). $V:V$ означает, что растворитель смешивали в указанном объемном соотношении.

В экспериментальной части работы указывают тип пластинки и способ обнаружения пятен. Если условия проявления не указаны, то считают, что пластинку проявляли в камере, насыщенной парами элюента. Для регистрации окрашенных пятен удобно использовать поляроид-камеру. Подобное описание приемов снятия фотокопий с хроматограмм можно найти в доступной литературе.

Приборы

Для нанесения пробы необходимо иметь шприцы с регулируемым объемом от 100 нл до 1 мкл, или же располагать *аппликаторами*. В случае ВЭТСХ-пластинок при условии воспроизводимого нанесения точных объемов пробы можно обойтись и без аппликаторов.

Для оценки хроматограмм необходим *денситометр* (сканер) по возможности в блоке с ЭВМ. Обычно пластинку сканируют в продольном направлении (рис. 3.22,*a*) узким пучком света, вытянутым параллельно стартовой линии (длина щели) и сжатым в направлении сканирования (ширина щели). Длина волны источника света должна соответствовать области поглощения анализируемых веществ. По длине щель должна быть сопоставима с размерами сканируемых пятен с тем, чтобы не захватывать пятна соседних участков. Результаты сканирования более стабильны, если длина щели меньше диаметра пятна. Стартовые зоны должны быть компактными, а пробег – минимальным. Этим условиям вполне удовлетворяет разделение на ВЭТСХ-пластинках. Кроме того, стартовые зоны должны располагаться на достаточном расстоянии друг от друга. Ширина щели также должна быть минимальной: сигнал при этом

уменьшается, однако результаты анализа улучшаются. В особенности это относится к сканированию ВЭТСХ – пластинок с концентрирующими зонами, на которых пятна располагаются вдоль участка очень плотно.

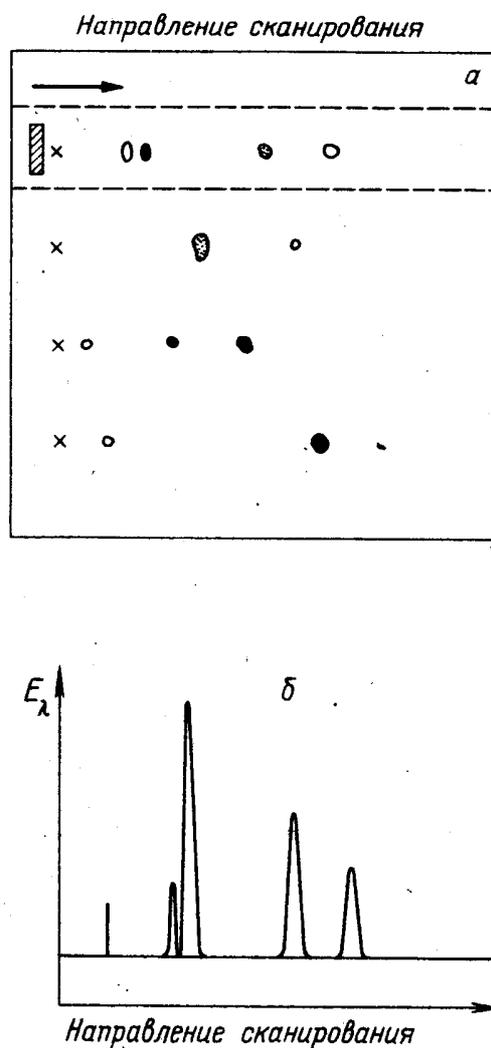


Рис. 3.22. Сканирование пластинок ТСХ:
а – линейное сканирование; б –
хроматограмма на ленте или дисплее сканера

Тонкослойная хроматография удобна тем, что ее можно проводить при помощи простейших приемов (рис. 3.23).

Источники ошибок

Часто уже при беглом осмотре хроматограммы становится ясно, что разделение прошло неудачно: низкое разрешение, зоны перекрываются; пятна

имеют вытянутую форму (и кометообразные хвосты); при обнаружении при помощи химических реагентов неправильная тональность окраски. Затруднений не возникает, если известны возможные источники ошибок.

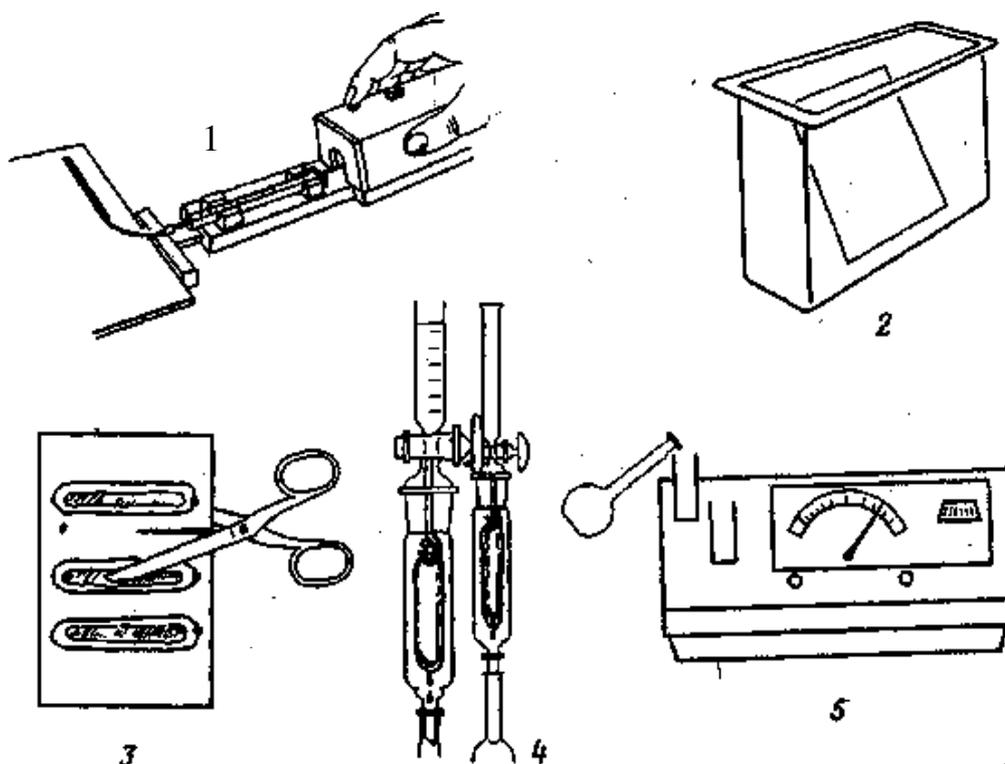


Рис. 3.23. Порядок выполнения операций (Desaga GmbH, Heidelberg): 1 – нанесение пробы; 2 – разделение; 3 – вырезание зон; 4 – элюирование; 5 – анализ

Стадия подготовки пробы

Изменение состава пробы из-за побочных химических реакций (гидролиза, окисления). Рекомендуется: каждый раз заново готовить раствор пробы.

Изменение концентрации вещества в пробе за счет потери летучих компонентов смеси. Рекомендуется: хранить пробу в бюксе (ампуле) с притертой пробкой.

Появление посторонних примесей при хранении (ворсинки, смазка шлифов). Рекомендуется: хранить пробу в бюксе с притертой пробкой.

Воздействие микрофлоры, ферментов на образец (в случае биополимеров). Рекомендуется: хранить пробу при 4°C и даже при -18°C , добавлять консерванты.

В общем путь от отбора пробы до проявления хроматограммы должен быть предельно коротким.

Слишком высокое содержание белка

Белки (например, при анализе биологических жидкостей) осаждают при помощи кислот (пикриновой, трихлоруксусной, сульфосалициловой). После осаждения удаляют избыток кислоты, так как ее наличие отрицательно влияет на эффективность разделения или приводит к гидролизу целевых веществ (рис. 3.24)

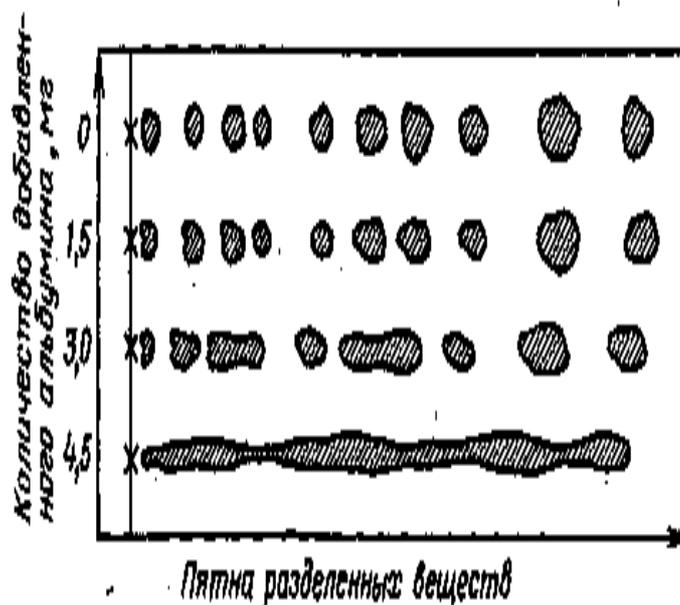


Рис. 3.24. Эффективность разделения моно- и дисахаридов в зависимости от содержания в пробе белка

Белок осаждают при помощи органических растворителей (ацетона, этанола). Следы растворителя обычно не мешают при последующей хроматографии, однако недостатком этого способа является плохая растворимость основных аминокислот. Процесс осаждения примесей всегда сопровождается частичной потерей целевого вещества.

Мембранная фильтрация (см. следующие разделы): эффективный метод, не требует времени. Преимущественно применяется при работе с большими объемами. Фильтрат, представляющий собой разбавленный раствор низкомолекулярных компонентов, концентрируют.

Гель-хроматография, о которой мы говорили ранее, также быстрый и довольно простой метод.

Высокое содержание солей в пробе

Обессоливание путем электродиализа: особенно эффективно при работе с нейтральными веществами (например, углеводами). Ионообмен: нейтральные вещества обессоливают на смешанных ионообменниках.

Гель-хроматография: например, на сефадексе G-10 обессоливание образца проводят за 10 – 20 мин.

При количественной оценке результатов ТСХ следует использовать внутренний стандарт.

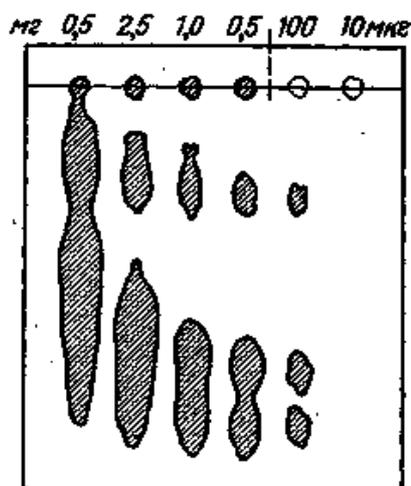


Рис. 3.25. Эффективность разделения при перегрузке пятна (стартовые пятна имеют одинаковые размеры)

Неудачное нанесение пробы

Слишком большое пятно. Рекомендуется: наносить образец по частям с промежуточным высушиванием феном.

Пластика перегружена (рис. 3.25) или имеет место локальная перегрузка стартового пятна (рис. 3.26). Рекомендуется: уменьшить нагрузку; уменьшать размеры пятен целесообразно с одновременным снижением нагрузки.

Вещество не выявляется при обнаружении (нагрузка мала) или плохое разрешение веществ с небольшими R_f . Рекомендуется: наносить образец в виде вытянутой зоны или тонкой линии (рис. 3.27).

Колоночная хроматография

Методом колоночной хроматографии (впервые предложенным М.С.Цветом в 1906 г.) можно разделять смеси веществ, как на микро-уровне, так и в препаративном масштабе. Неподвижную фазу помещают в колонку, затем вносят в нее анализируемую смесь и элюируют подходящим растворителем.

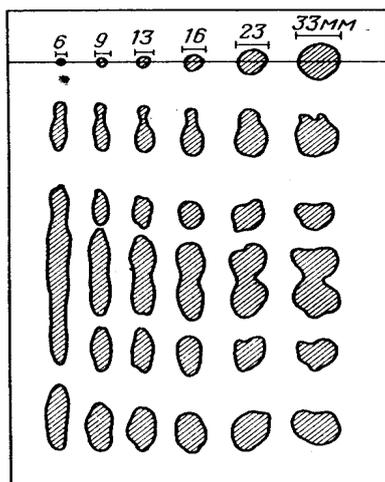


Рис. 3.26. Зависимость эффективности разделения от локальной перегрузки стартового пятна (нагрузка одинаковая, но размеры пятен различны)

При продвижении по колонке компоненты смеси удерживаются сорбентом в соответствии с их физико-химическими свойствами и, следовательно, мигрируют с разной скоростью. На выходе колонки разделяемые вещества появляются в определенной последовательности и могут быть собраны в виде отдельных фракций.

Жидкостная хроматография низкого давления

В жидкостной хроматографии низкого давления компоненты смеси разделяют на хроматографической колонке при нормальном (гидростатическом) или несколько повышенном давлении.

Особенности метода

Хроматографию на мягких сорбентах, таких как сефадексы, био-гели, агарозы и многие полистирольные гели, проводят при атмосферном давлении. Этот вид хроматографии применяют для переработки больших объемов жидкости при условии, что не ставится задача достижения высокого разрешения, свойственного ВЭЖХ. Во многих случаях удовлетворительное разрешение обеспечивается вследствие высокой селективности системы сорбент–элюент. Скорость подачи элюента здесь достаточно высока, следовательно, частицы сорбента должны иметь достаточно крупные размеры. В лабораториях хроматографию проводят на сорбентах с диаметром частиц 40 – 60 мкм, на производстве – с диаметром 100 – 200 мкм и более. При использовании частиц диаметром более 40 мкм достаточно высокая скорость подачи элюента обеспечивается гидростатическим давлением, равным высоте вертикального столба жидкости. Для этого типа хроматографии используют более простую аппаратуру, чем для ВЭЖХ, поэтому разрешение здесь несколько ниже, а продолжительность эксперимента несколько больше.

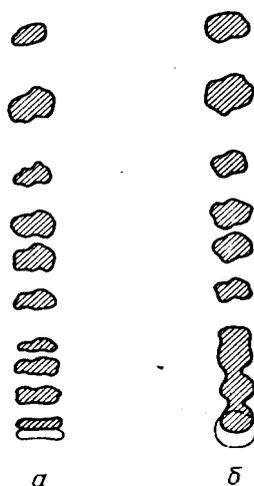


Рис. 3.27. Зависимость эффективности разделения от формы стартового пятна (нагрузка во всех пятнах одинакова): а – нанесение полосой (лучше разделяются вещества с небольшим R_f); б – нанесение пробы в точку (приводит к локальной перегрузке)

Приборы

Хроматографическая система для жидкостной хроматографии низкого давления включает резервуар или градиентный смеситель; насос; устройство ввода пробы; колонку; детектор для обнаружения веществ в элюате; самописец; автоматизированный коллектор для сбора фракций.

Резервуар для элюента и градиентный смеситель

В качестве резервуара используют градуированную колбу Эрленмейера достаточно большого объема, чтобы исключить вероятность высыхания сорбента колонки в процессе хроматографии. Резервуар укрепляют на штативе достаточно высоко, чтобы обеспечить необходимую скорость подачи элюента. В процессе работы уровень растворителя в резервуаре уменьшается, вследствие чего гидростатическое давление, а следовательно, и скорость подачи элюента изменяются (в большинстве случаев этим пренебрегают). Для создания небольшого рабочего давления в условиях, когда перепад уровней (колонки и сосуда с элюентом) незначителен, пользуются склянкой Мариотта (рис. 3.28).

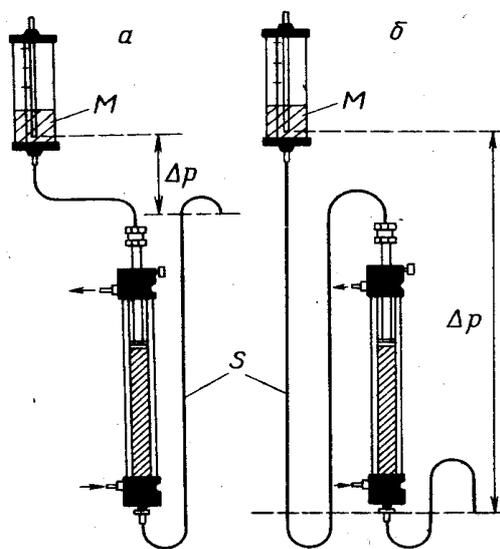


Рис. 3.28. Хроматография при постоянном давлении: *а* – схема обеспечения низкого гидростатического давления; *б* – схема обеспечения высокого гидростатического давления; *М* – склянка Мариотта; *S* – предохранительная петля; Δp – гидростатическое давление

Рабочее гидростатическое давление в этом случае соответствует перепаду давлений между нижним окончанием воздушной трубки в склянке Мариотта и окончанием капилляра на выходе колонки, вне зависимости от направления подачи элюента в колонку, снизу или сверху. Если при элюировании в изократическом режиме (т. е. при постоянном составе элюента) наблюдается заметное перекрывание пиков на хроматограмме, то проводят градиентное элюирование. Обычные градиентные смесители используют для работы с водными системами небольших объемов (рис. 3.29).

Соединительные шланги

В качестве соединительных шлангов между отдельными блоками хроматографической системы используют тефлоновые капилляры внешним диаметром 1,6 мм и внутренним диаметром 0,3–0,5 мм. Если соединительные шланги выбраны не удачно, отдельные фракции вновь перемещаются на выходе из колонки (рис. 3.30). На рис. 3.31 изображены различные способы соединения шлангов. Наиболее простые из них показаны на рис. 3.31, *а*, *б*: тефлоновые капилляры соединяют при помощи короткого отрезка силиконового шланга *а* или просто вставляют один из капилляров в предварительно расширенный при помощи развертки конец второго капилляра *б*. Соединение *а* пригодно для работы с водными растворами и органическими растворителями при нормальном давлении. Соединение *б* пригодно для работы с любыми растворителями при умеренном давлении (до 1 МПа), однако оно ненадежно при подаче элюента в направлении, противоположном стрелке. Высокой надежностью отличается соединение *в*. Если шайба *А* изготовлена из полипропилена или тефлона, узел будет устойчив при работе с органическими растворителями. Толстостенный тефлоновый капилляр (соединение *г*) не развальцовывают. На нем плотно фиксируют коническую муфту *Г*. Соединения, изображенные на рис. 3.31, *в*, *г* устойчивы при давлении до 4 МПа.

Насосы

В хроматографии насосы используют при упаковке колонок и подаче в колонку элюента (в том числе при регенерации).

Перистальтические насосы (рис. 3.32) широко применяются при биохимических исследованиях, так как в насосах этого типа исключается контакт элюента с металлом. В устаревших и дешевых моделях насосов подача жидкости производится путем прокатывания роликов по мягкому шлангу. Вследствие вальцевания шланг быстро изнашивается. При первых

признаках износа шланг должен быть заменен. Определенным достоинством обладают насосы с планетарным механизмом, где ролики воздействуют на шланг, прижатый к покрытому тефлоном желобу. Эластичный шланг 1 прижимается роликом 2 к желобу 3. Жидкость в шланге перемещается в направлении движения ролика (см. рис. 3.32). Здесь исключается принудительное растяжение и последующее сокращение шланга, в результате чего механический износ существенно меньше. Шланговые насосы имеют определенные недостатки: шланги требуют частой замены. Кроме того, работа насосов ограничена давлением 200 кПа.

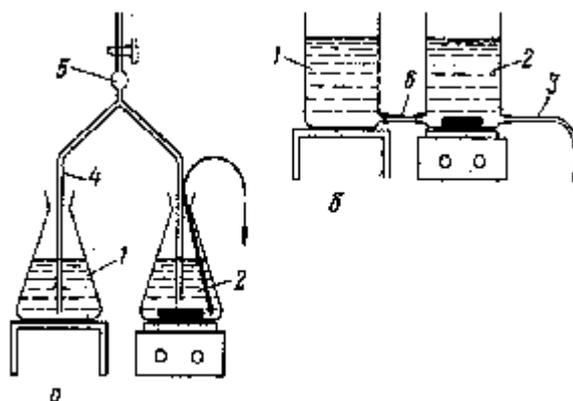


Рис. 3.29. Градиентные смесители (а и б): 1 – резервуар; 2 – смеситель; 3 – капилляр с внутренним диаметром 2 мм; 4 – соединительный сифон; 5 – ловушка для пузырьков воздуха; 6 – соединительный шланг, тонкостенный тефлоновый капилляр

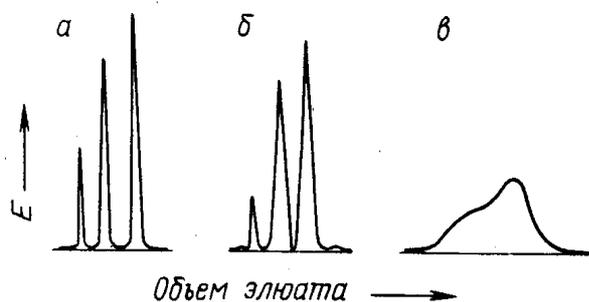


Рис. 3.30. Зависимость разрешения от диаметра и длины соединительных шлангов: а – колонка непосредственно соединена с детектором; б и в – колонка и детектор соединены шлангом длиной 2 м и диаметром 0,3 и 0,8 мм соответственно

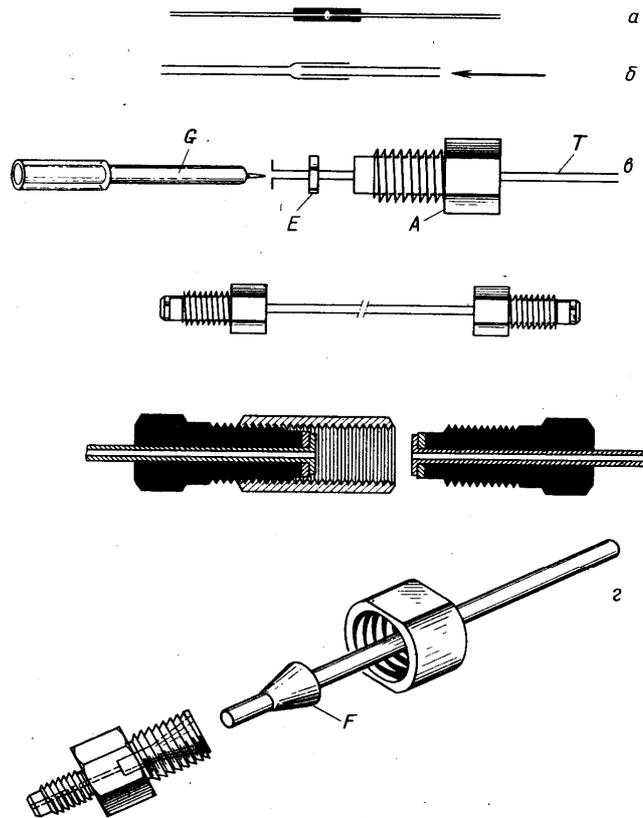


Рис. 3.31. Различные способы соединения шлангов: *a* – два тефлоновых капилляра соединены отрезком силиконового шланга; *б* – два тефлоновых капилляра соединены непосредственно (направление указано стрелкой); *в* – тефлоновый капилляр *T* развальцован при помощи нагретой развертки *G* (*E* – стальное кольцо, *A* – шайба); *г* – соединение толстостенных капилляров при помощи конической муфты *F*

Мембранные насосы обладают достаточной мощностью, они безинерционны, сравнительно дешевы. Корпус насоса выполнен из нержавеющей стали, поэтому в целом насос долговечен и пригоден для работы с разнообразными растворителями. Если присутствие ионов металлов в растворе нежелательно, корпус насоса изготавливают из инертных материалов (керамики или тефлона). В насосах этого типа ход поршня и частота перемещения регулируются отдельно. Следует отметить, что плавность потока (пульсация минимальна) достигается небольшим ходом поршня и высокой частотой перемещения. В зависимости от особенностей конструкции насосы этого типа создают давление до 3,5 МПа. Пульсацию потока также компенсируют при помощи демпфирующего устройства. Изображенный на рис. 3.33 насос включает демпфирующее

устройство и может создавать давление до 600 кПа. При каждом электрическом импульсе стальной стержень 1 притягивается магнитом (на рисунке не приведен). Связанная со стержнем мембрана вытесняет жидкость из дозирующей головки 2 в камеру демпфирующего устройства 3 (направление указано стрелкой). В камере гидравлический импульс сглаживается за счет подвижной диафрагмы, соединенной с пружиной, расположенной за диафрагмой. Затем жидкость поступает через шаровой клапан в змеевик 5 и далее в камеру 6 манометра 7. Отсюда жидкость подается в тефлоновый капилляр, связывающий насос с хроматографической колонкой. Клапан 4 предназначен для удаления воздуха из дозирующей головки и быстрой смены растворителя.

Во всех узлах насоса жидкость перемещается в направлении снизу вверх, вследствие чего исключается образование в сигме воздушных карманов и застойных зон. При работе с водными системами при давлениях несколько выше 100 кПа используют небольшие дешевые мембранные насосы без демпфирующего устройства. Подводящие шланги в них стыкуют в соответствии со схемой, приведенной на рис. 3.34. На выходе насоса на стальном капилляре 2 фиксируется толстостенный шланг из силиконовой резины 3, который для увеличения прочности крепления снаружи обжимается коротким отрезком толстостенного полиэтиленового шланга 4. На противоположном конце силиконовый шланг стыкуется с толстостенным тефлоновым капилляром 5, а место стыковки (длиной 5 см) также обжимается отрезком полиэтиленового шланга 4.

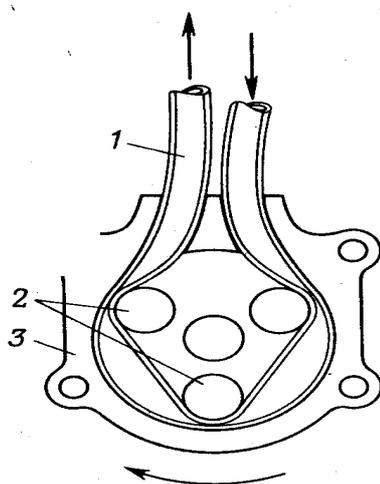


Рис. 3.32. Шланговый (перистальтический) насос: 1 – эластичный шланг; 2 – ролик; 3 – желоб

Данное устройство позволяет погашать гидравлические импульсы, вызванные ходом поршня. При этом обеспечивается вполне достаточное

рабочее давление. Недостатком мембранных насосов является падение производительности при увеличении давления.

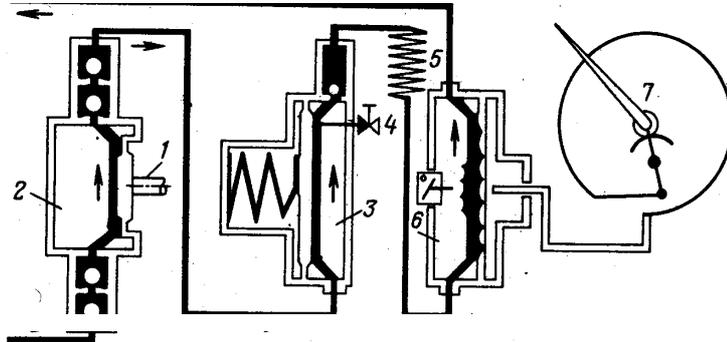


Рис. 3.33. Схема мембранного насоса: 1 – стальной стержень; 2 – дозирующая головка; 3 – камера демпфирующего устройства; 4 – клапан; 5 – змеевик; 6 – камера; 7 – манометр

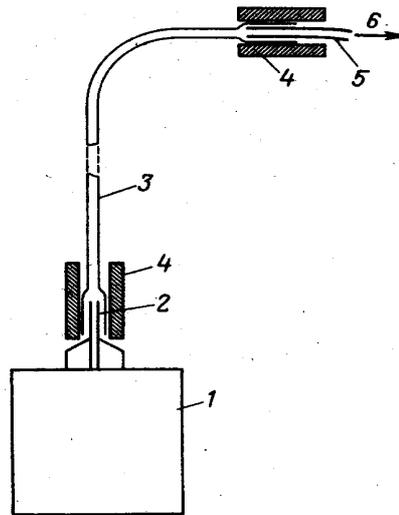


Рис. 3.34. Простое демпфирующее устройство для работы с водными системами: 1 – насос; 2 – стальной капилляр; 3 – толстостенный шланг из силиконовой резины (внешний диаметр 1,5 мм; внутренний диаметр 0,3 мм, длина 1 м); 4 – толстостенный полиэтиленовый шланг; 5 – тефлоновый капилляр (внешний диаметр 1,5 мм, внутренний диаметр 0,3 мм); 6 – к системе ввода пробы

Устройства ввода пробы

Непосредственное нанесение пробы осуществляют при помощи *пипетки* или *тефлонового капилляра*, окончание которого (длиной примерно 3 мм) изогнуто под углом 90° . Однако использование этого простого устройства (рис. 3.35) требует определенного навыка и больших затрат времени.

Пробу с высоким удельным весом помещают под слой растворителя на столбик сорбента при помощи *адаптера* – поршня, который ограничивает высоту слоя сорбента в колонке. Это требует определенного опыта, однако затраты времени не столь значительны. Существенно, что в этом случае исключается возможность пересыхания колонки.

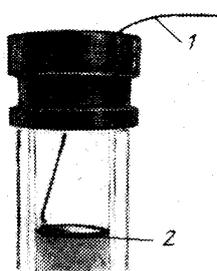


Рис. 3.35. Нанесение пробы при помощи изогнутого капилляра 1, пружинное кольцо 2 фиксирует сетку, препятствующую взмучиванию геля

Схема нанесения пробы изображена на рис. 3.36. После того как адаптер 1 плотно прижимается к слою геля 2, его положение фиксируют вращением шайбы 3. Фиксация достаточно плотная, но некоторая подвижность адаптера все же сохраняется. Содержимое шприца 4 через кран 5 подается в колонку (при закрытом выходе). При этом уровень жидкости повышается, и адаптер выдавливается из колонки. Слой пробы 6 теперь располагается между адаптером и слоем геля. Переключением крана 5 соединяют колонку с резервуаром. Более легкий элюент вдавливает раствор пробы в слой геля (при открытом выходе колонки). По завершении нанесения образца адаптер вновь устанавливается вплотную к слою геля. При слишком быстром введении пробы поверхностный слой геля может сжиматься. Если сопротивление колонки возросло (сорбент уплотнился), используют шприц меньшего диаметра. При высоком сопротивлении диаметр

шприца не должен превышать 5 мм. Такая система ввода образца наиболее удобна, если не требуется высокая воспроизводимость.

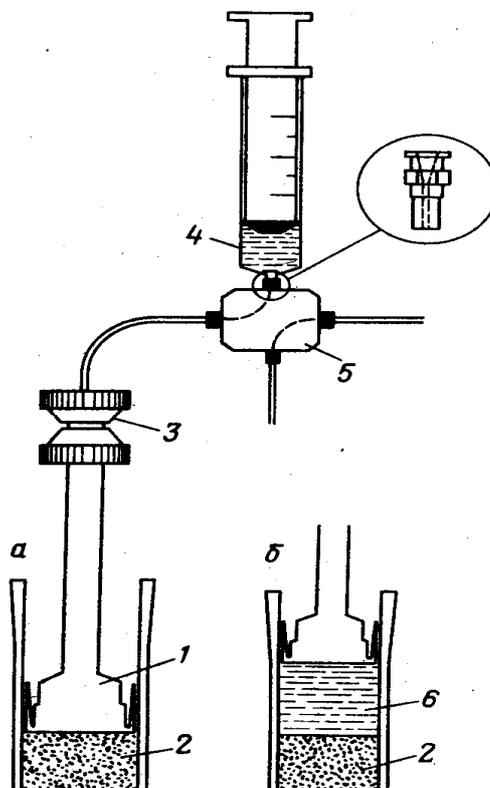


Рис. 3.36. Нанесение больших объемов пробы при помощи адаптера 1: а – начальное положение адаптера; б – положение адаптера при вводе пробы и элюента; адаптер; 2 – слой геля; 3 – регулирующая шайба; 4 – шприц; 5 – кран; 6 – проба

Большие объемы жидкости подают на колонку из специальных резервуаров следующим образом: к крану (рис. 3.35, а) присоединяют шприц большого объема без поршня и пробу подают в колонку. Затем простым переключением крана в колонку подают элюент. Этот способ применяется при работе с мягкими гелями. Переключение крана надо делать своевременно, не допуская пересыхания колонки.

При работе с более жесткими гелями образец также наносят при помощи подвижного адаптера.

Схема устройства подвижного адаптера изображена на рис. 3.37. Герметичность системы обеспечивается следующим образом: кольцо 1 плотно прижимает тефлоновый ободок 2 к стенкам колонки. Вращением регулирующей шайбы может устанавливаться жесткая фиксация адаптера

(адаптер неподвижен) или подвижная фиксация (адаптер может передвигаться). Однако герметичность обеспечивается в обоих случаях.

Пробу наносят следующим образом: адаптер слегка вытягивают вверх, при этом проба за счет разрежения втягивается в колонку (рис. 3.36, б). При подаче растворителя более легкого удельного веса проба вымывается в слой сорбента. Вследствие высокого качества адаптеров и колонок эта система герметична при давлении до 500 кПа. Подвижные адаптеры удобны при работе в препаративных масштабах, например при обессоливании белков и нуклеиновых кислот.

Иногда пробу наносят при помощи *дозировочной петли* (рис. 3.38). Дозировочную петлю при нормальном давлении заполняют раствором пробы, после чего переключатель устанавливают в положение «ввод пробы в колонку» и переносят пробу в колонку.

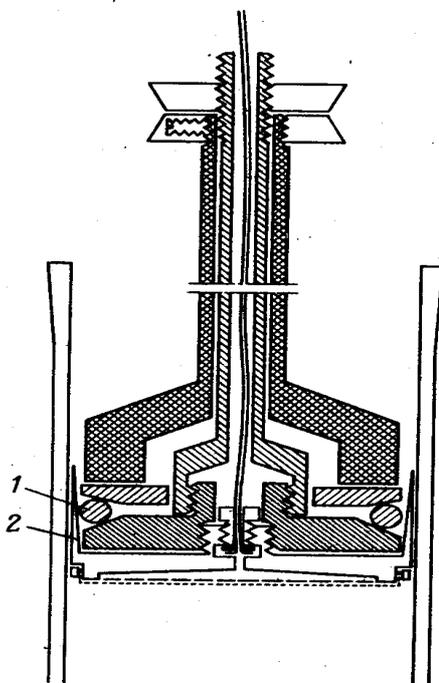


Рис. 3.37. Схема устройства подвижного адаптера: 1 – кольцо; 2 – тефлоновый ободок

Этот способ применяют в хроматографии при высоком давлении (до 3,5 МПа), а также при нанесении небольших объемов пробы. Воспроизводимость нанесения достаточно высока, поэтому краны с дозирующей петлей применяют при выполнении точных аналитических экспериментов, а также при работе в режиме ВЭЖХ.

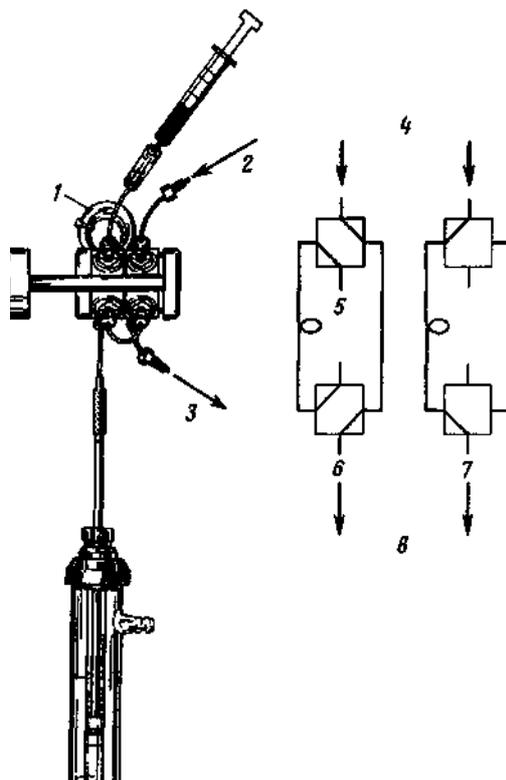


Рис. 3.38. Нанесение пробы при помощи дозирующей петли: 1 – дозирующая петля; 2 – подача элюента; 3 – сброс; 4 – насос; 5 – проба; 6 – положение переключателя «ввод пробы в дозирующую петлю»; 7 – положение переключателя «ввод пробы в колонку»; 8 – колонка

Колонки

Конструкция колонки имеет первостепенное значение для эффективности разделения. Колонки, снабженные адаптером и краном для ввода пробы, являются более современными по сравнению со стеклянными колонками, имеющими стеклянную пористую перегородку и тефлоновый шланг на выходе. Для изготовления деталей, контактирующих с органическими растворителями, используют инертные материалы, такие как стекло, тефлон и нержавеющая сталь.

На рис. 3.39 изображены *стеклянные колонки* для разделения в аналитическом и препаративном масштабах.

Колонка, изображенная на рис. 3.40, предназначена для работы в *производственном масштабе*. Колонка закреплена в штативе на шарнире, что существенно упрощает извлечение сорбента.

Большинство ионообменников набухают или сжимаются при смене буфера. В этом случае адаптеры не применяются, и гель беспрепятственно увеличивается в объеме.

Для проведения адсорбционной хроматографии выпускаются готовые колонки. Они чрезвычайно удобны для тех исследователей, которые не располагают специальными системами для упаковки колонки. На рис. 3.41 схематически изображена колонка Lobar (Merck, Darmstadt) для препаративной хроматографии при нормальном давлении. Анализируемый образец предварительно фильтруют или центрифугируют для того, чтобы отделить коллоидные частицы и механические примеси (поскольку фильтр на входе в колонку может забиваться уже при вводе образца). В случае увеличения сопротивления колонки (из-за уплотнения слоя сорбента) ее промывают в режиме противотока. Побочным результатом этой операции может быть частичная потеря целевого вещества. Готовые колонки предназначены для проведения аналитического и препаративного разделения при давлении до 600 кПа.

Детекторы

Хроматографический детектор – это прибор, позволяющий регистрировать целевые вещества в потоке элюата по характерным физико-химическим свойствам (окраске, флуоресценции, поглощению в УФ-области спектра и др.).

Фракционный коллектор

При проведении хроматографии на препаративном уровне элюат собирают по фракциям на фракционном коллекторе, причем смена фракций может происходить по истечении заданного промежутка времени, при достижении заданного объема фракции или сбора заданного числа капель. Коллекторы все время совершенствуют и в настоящее время в лабораториях можно встретить образцы трех поколений этого прибора.

К первому поколению относятся довольно громоздкие коллекторы с круглым штативом. Смена фракций осуществляется по кругу или зигзагообразно (по меандру) и происходит «по времени» или «по объему».

Коллекторы второго поколения более компактны, они имеют прямоугольный штатив, составленный из отдельных блоков на 10 пробирок каждый. По мере заполнения пробирок штативы с пробирками могут заменяться

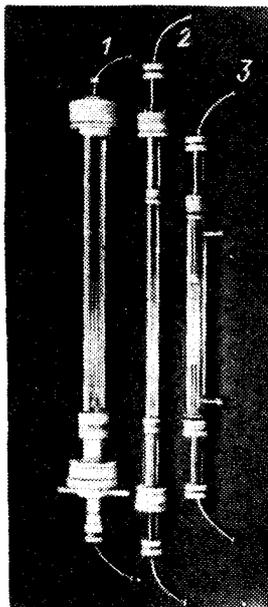


Рис. 3.39. Стекланные колонки: 1 – с адаптером из тефлона; 2 – с адаптером из нержавеющей стали; 3 – с адаптером из нержавеющей стали и термостатирующим кожухом

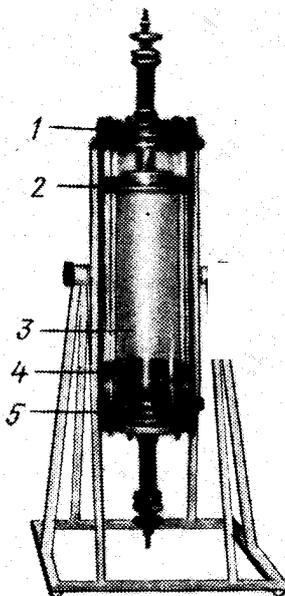


Рис. 3.40. Колонка для разделения в производственном масштабе: 1 – верхняя насадка, закрепленная на фланце колонки; 2 – верхний адаптер; 3 – колонка; 4 – нижний адаптер; 5 – нижняя насадка, закрепленная на фланце колонки

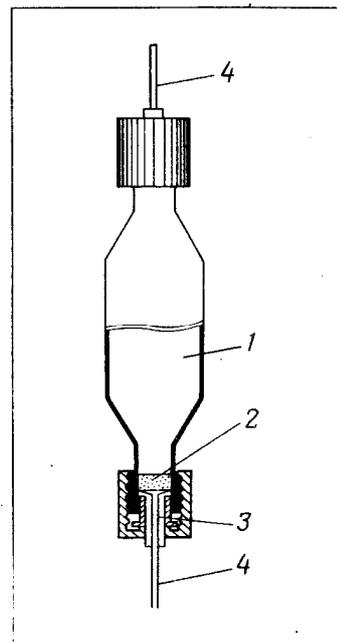


Рис. 3.41. Колонка Lobar (Merck, Darmstadt):

1 – стеклянная колонка, плавно сужающаяся с обоих концов; 2 – фильтрующий распределитель из керамики; 3 – капилляр из тефлона; 4 – капилляр из нержавеющей стали (внешний диаметр 1,5 мм, длина 20 мм)

Смена фракций происходит «по времени», «по объему», «по числу капель». После заполнения заданного количества штативов коллектор отключается автоматически. Многие коллекторы этого поколения имеют блок управления периферийными устройствами: насосами, магнитными переключателями и т. п.

К третьему поколению относятся коллекторы, снабженные микропроцессорами. Такие коллекторы можно запрограммировать на сбор фракций разного объема и в разные приемники.

Такие коллекторы приспособлены для работы, с веществами, несущими радиоактивные метки, поскольку они снабжены сигнальными устройствами. Кроме того, при переполнении пробирок избыток элюата направляется в поддон и не загрязняет управляющее устройство. Система имеет также магнитный переключатель – прерыватель (между выходом

колонки и ячейкой детектора), который при каждой смене фракции прерывает поток элюата.

Благодаря такому устройству практически исключаются потери вещества. В современных коллекторах сборники (пробирки или советы) снабжены счетчиками радиоактивных импульсов. Если вещества, несущие радиоактивную метку, собирают в кювету со счетчиком, то смену фракций задают по уровню сигнала детектора. В этом случае элюат, не содержащий целевых веществ, собирают в общий сборник, и число фракций, подлежащих анализу, минимально.

Автоматизация процесса управления

Даже ограниченная автоматизация процесса хроматографического разделения существенно облегчает работу исследователя.

Автоматическое отключение колонки с помощью магнитного клапана, управляемого сигналом от фракционного коллектора; перекрытие потока на выходе, что предохраняет колонку от высыхания. Таким же надежным «сторожем» колонки является более простое устройство – предохранительная петля – на входе или на выходе колонки (см. рис. 3.28).

Автоматическое переключение чувствительности детектора, осуществляемое путем расширения шкалы. При достижении пером самописца предела полной шкалы чувствительность детектора автоматически уменьшается (например, на порядок). Этот прием полезен при работе с образцами неизвестного состава или при определении компонентов, содержание которых в смеси минимально по сравнению с содержанием других веществ.

Автоматическое управление периферийными устройствами, связанными с подачей элюента (насос, магнитная мешалка, кран и др.).

Управление режимом работы фракционного коллектора:

1. Смена приемника при достижении заданного уровня сигнала детектора, т. е. отбор фракций небольшого объема начинается лишь при появлении очередного пика на хроматограмме (рис. 3.42, *а*). Таким способом удастся увеличить долю фракций, содержащих чистые компоненты, в случае неполного разделения веществ. В промежутках между сбором целевых веществ элюат собирают в пробирки большего объема.

2. Смена приемника при прохождении точки перегиба на хроматограмме. Этот прием позволяет отдельно собирать плохо разделяющиеся вещества, при регистрации которых сигнал не достигает до порогового значения (например, пики 2 и 3, или 5, 6 и 7 или 8 и 9; рис. 3.42, *б*).

3. Сочетание двух принципов отбора – по крутизне кривой и заданному времени – позволяет собирать по фракциям только целевые вещества, а промежуточный элюат направлять в общий сборник или на слив.

4. Оба приема полезны при многократном повторении стандартной операции, например обессоливания белков или нуклеиновых кислот или хроматографическом разделении одной и той же смеси.

5. Регистрация при двух длинах волн с последующей идентификацией компонентов смеси по соотношению E_{280}/E_{284} . Полностью автоматизированы сложные и дорогостоящие приборы, предназначенные для ВЭЖХ. Естественно, отдельные узлы этих приборов могут применяться и в хроматографии низкого давления.

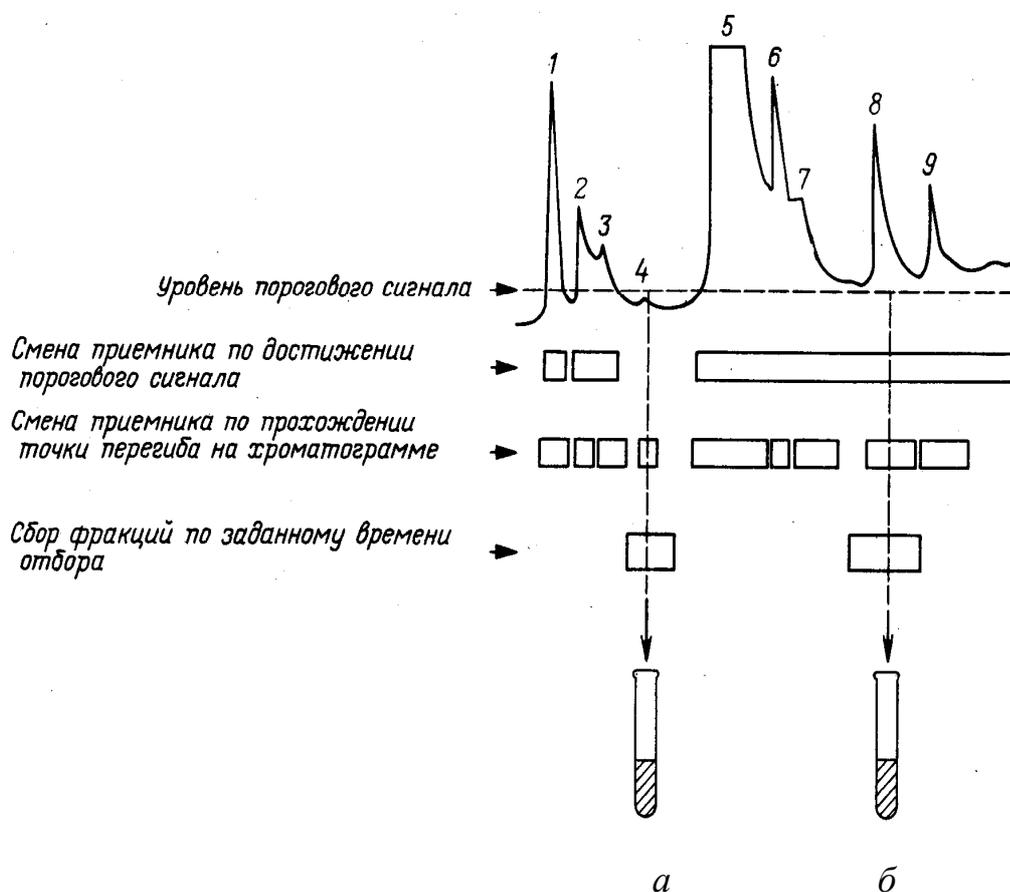


Рис. 3.42. Различные способы избирательного отбора фракций

Порядок выполнения операции

Упаковка колонки

Способ упаковки колонки зависит от размеров частиц сорбента и его предварительной подготовки. Целью любого из способов упаковки

является сведение к минимуму продолжительности седиментации частиц сорбента и быстрое формирование плотного и однородного слоя.

Заполнение колонки гелем (в гель-хроматографии):

– рассчитанное количество сухого сорбента помещают в колбу для вакуумирования (или колбу Бунзена);

– добавляют такое количество растворителя, чтобы после набухания геля его вязкость была умеренной, т. е. гель свободно пропускал пузырьки воздуха при деаэрации; как правило, набухание ведется в растворителе, в котором предполагается проводить элюирование; силикагель и оксид алюминия перемешивают с растворителем в течение 15 мин, продолжительность набухания ионообменников и мягких гелей указана в рекомендациях фирм-изготовителей;

– колбу с набухшим гелем закрывают резиновой пробкой и вакуумируют; при длительном вакуумировании гель несколько охлаждается, поэтому перед внесением в колонку его выдерживают при комнатной температуре-колонку промывают детергентом, высушивают, присоединяют насадку или резервуар с гелем (рис. 3.43), закрепляют в строго вертикальном положении на длинном штативе и устанавливают в месте, защищенном от солнечного света и сквозняка;

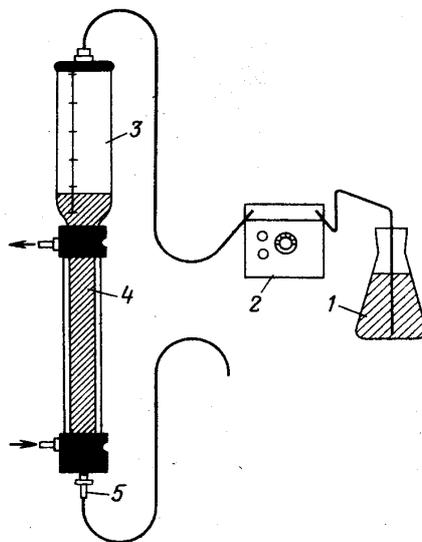


Рис. 3.43. Схема заполнения колонки гелем:
1 – сосуд с элюентом; 2 – перистальтический насос; 3 – резервуар с гелем; 4 – слой геля; 5 – капилляр на выходе колонки

– снизу в колонку при помощи шприца вводят небольшое количество растворителя, который вытесняет воздух из опорной сетки или стеклянной пористой перегородки, после чего выход колонки перекрывают;

– гель тщательно перемешивают и переносят в колонку, стараясь не допустить захвата пузырьков воздуха; в резервуар или колонку гель переносят в один прием; упаковка колонки получается неоднородной, если гель слишком разбавлен или его вносят по частям;

– по завершении заполнения колонки открывают выход, необходимое количество элюента подают в резервуар при помощи перистальтического насоса; легким постукиванием резиновым молотком (или вакуумным шлангом) по колонке удаляют из нее пузырьки воздуха;

– перекрывают выход колонки, отсоединяют резервуар, осторожно заполняют верхнюю часть колонки растворителем, формируя выпуклый мениск (рис. 3.44, *а*);

– адаптер в наклонном положении вставляют в колонку, исключая тем самым захват пузырьков воздуха (рис. 3.44, *б*), и вдвигают в колонку на 1 см;

– соединяют адаптер с насосом или резервуаром, вдвигают адаптер глубже до соприкосновения с гелем, вытесняя тем самым остатки воздуха из соединительных шлангов;

– надежно фиксируют адаптер (рис. 3.44, *в*), открывают выход колонки и включают насос; при изменении высоты столба геля ослабляют фиксацию и слегка смещают адаптер вдоль колонки.

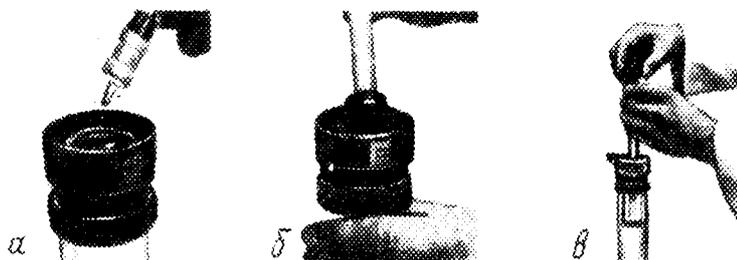


Рис. 3.44. Установка адаптера: *а* – заполнение колонки элюентом (формирование выпуклого мениска элюента); *б* – введение адаптера в наклонном положении; *в* – фиксация адаптера при вращении верхней шайбы

Сухая упаковка методом «вибрации и постукивания» (для жестких сорбентов, например, силикагеля, оксида алюминия, с диаметром частиц 20–40 мкм):

– колонку промывают горячим детергентом, ополаскивают водой, ацетоном, высушивают; выход колонки перекрывают;

- колонку устанавливают вертикально и вносят небольшое количество сорбента, формируя слой толщиной 1 см;
- слой уплотняют путем постукивания по стенкам колонки в зоне формирования слоя, при этом колонку медленно вращают; иногда используют прокладку с отверстием, чтобы не повредить капилляр на выходе;
- продолжают легкое постукивание колонкой по поверхности стола, уплотняя слой сорбента;
- вносят очередную порцию сорбента и повторяют операции, формируя столбик сорбента подходящей высоты;
- в заключение легким постукиванием уплотняют уже сформированный слой;
- устанавливают адаптер, чтобы он соприкасался со слоем сорбента, адаптер фиксируют;
- подают в колонку деаэрированный элюент.

Вибраторы, используемые для упаковки ГХ-колонок, применять не рекомендуется, так как боковая вибрация приводит к расслоению сорбента по размерам частиц (боковая вибрация необходима при упаковке узких колонок, так как в заполненной колонке сорбент уплотняется с трудом).

Проверка качества упаковки

Качество упаковки проверяют с помощью окрашенных и несорбирующихся веществ – маркеров. Существуют маркеры для адсорбционной хроматографии, гель-хроматографии (2%-ный раствор синего декстрана 2000, Pharmacia). Качество ионообменных колонок таким способом не контролируют, поскольку окрашенные вещества почти всегда необратимо сорбируются на ионитах.

Нанесение пробы

Известны два способа нанесения пробы.

Нанесение пробы на поверхность геля:

- избыток растворителя над слоем геля отбирают пипеткой, выжидают некоторое время, чтобы остаток растворителя впитался в гель, и перекрывают выход колонки;
- при помощи пипетки или изогнутого капилляра осторожно наслаивают пробу на слой геля, стараясь не допустить взмучивания (следует потренироваться заранее);
- открывают выход колонки; после впитывания пробы его вновь перекрывают;

– небольшим количеством растворителя смывают остатки пробы со стенок колонки, выжидают, пока растворитель впитается; повторяют операцию несколько раз;

– осторожно наносят слой растворителя (высотой 5 см) и подсоединяют колонку к резервуару.

При всех операциях стараются не допускать пересыхания и взмучивания слоя геля. Сверху на слой геля иногда помещают сетку, препятствующую взмучиванию (см. рис. 3.35).

Нанесение пробы под слой растворителя:

– пробу растворяют в небольшом объеме растворителя;

– в раствор пробы добавляют 1–2%-ный раствор сахарозы, NaCl или несколько капель CCl_4 (если элюирование проводится органическим растворителем);

– на поверхности сорбента создают слой растворителя высотой около 5 см;

– пробу при помощи шприца медленно наносят на слой сорбента (с расстояния 5 мм); при этом формируется четкая зона пробы (так как проба имеет более высокую удельную плотность);

– открывают выход колонки, после впитывания пробы колонку соединяют с резервуаром.

Нанесение пробы с помощью шприца применяется как в сочетании с устройством ввода пробы, так и в сочетании с адаптером.

Элюирование

После того как проба внесена в колонку, необходимо убедиться в том, что целевое вещество сорбируется обратимо. Для этого пробу элюируют подходящим элюентом и анализируют состав элюата. Состав элюента изменяют до тех пор, пока не будет достигнуто удовлетворительное разделение целевого вещества и сопутствующих примесей. Если при работе в изократическом режиме хроматограмма получается растянутой (пики слишком удалены друг от друга), то элюирование ведут в градиенте состава растворителя.

Скорость элюента устанавливают в зависимости от типа сорбента и свойств разделяемых веществ. В ионообменной хроматографии удовлетворительное разделение получают при высокой скорости элюирования, в гель-хроматографии скорость элюирования не должна превышать 10 см ч^{-1} (фронт элюента перемещается по колонке на расстояние 10 см за 1 ч).

Эта так называемая линейная скорость подачи элюента не зависит от размеров колонки. Для колонки с внутренним диаметром 1 см она соответствует скорости 30 мл ч^{-1} . При анализе высокомолекулярных

веществ скорость подачи элюента на порядок меньше. В хроматографии при нормальном давлении действует правило: чем меньше скорость элюирования, тем выше качество разделения.

Оформление результатов

Примеры оформления результатов были приведены ранее.

Область применения

Применяется для препаративного разделения неорганических (ионообменная хроматография), органических (адсорбционная и распределительная хроматография) веществ и биополимеров (ионообменная, гель-хроматография).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ – метод разделения веществ на мелкозернистых сорбентах (с размерами частиц менее 15 мкм) при повышенном давлении. Метод характеризуется высокой эффективностью разделения в сочетании с высокой скоростью процесса.

Физические основы метода

ВЭЖХ в принципе мало чем отличается от хроматографии низкого давления. Однако вследствие небольших размеров частиц сорбента и их однородности разделяющая способность ВЭЖХ-колонок существенно выше. Из-за высокого рабочего давления (до $4 \cdot 10^7$ Па) приборы для ВЭЖХ отличаются от приборов для классической колоночной хроматографии.

Уравнение Ван-Деемтера отражает зависимость ВЭТТ от размеров частиц и скорости потока элюента. Наиболее важный вывод из этого уравнения заключается в следующем: чем меньше размеры частиц, тем меньше ВЭТТ и тем выше разрешение. Сорбент с частицами диаметром 5 ± 1 мкм обладает более высокой разделяющей способностью, чем сорбент с более крупными и менее однородными частицами. Минимальный размер частиц равен приблизительно 3 мкм, поскольку более мелкие частицы

образуют довольно стойкие конгломераты. Приготовление стабильных суспензий из частиц диаметром менее 20 мкм удается только при обработке ультразвуком, работа с более мелкими частицами является еще более сложной.

Все же применение мелких и однородных фракций оказывается полезным во многих отношениях. Чем меньше размер частиц, тем слабее зависимость ВЭТТ от скорости потока элюента (рис. 3.45). Поэтому, в отличие от классической колоночной хроматографии, скорость элюирования в ВЭЖХ существенно выше. На рис. 3.45 изображены кривые, каждая из которых представляет собой правую часть кривой Ван-Деемтера. Левая часть на данном рисунке не изображается, так как практически совпадает с осью ординат. Кривые на рис. 3.45 иллюстрируют зависимость H от скорости потока U при элюировании на сорбентах с частицами различных диаметров. В случае применения сорбентов, у которых размер частиц минимален (3 и 4 на рис. 3.45), увеличение скорости потока несущественно влияет на изменение значения H . Чем частицы крупнее, тем изменение значений ВЭТТ становится все более заметным.

Высокое разрешение, а следовательно, возможность использования коротких колонок позволяют сократить продолжительность процесса и уменьшить расход растворителей.

Высокой эффективности разделения достигают при применении высококачественной аппаратуры. Обязательными являются высокое качество устройства ввода пробы, минимальный «мертвый» объем в капиллярах и минимальный объем измерительной ячейки детектора.

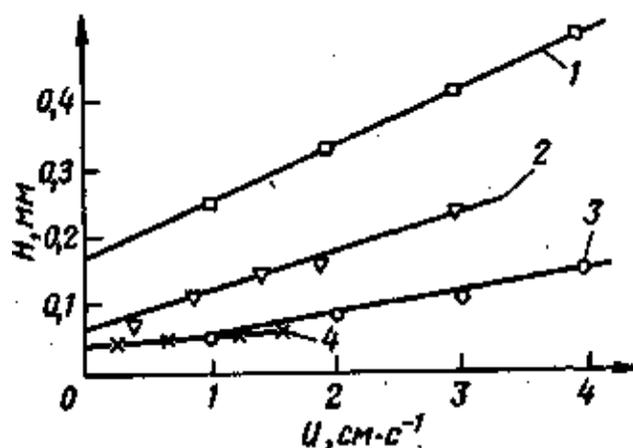


Рис. 3.45. Зависимость ВЭТТ (H) от скорости элюирования (U) при элюировании на сорбентах с различными размерами частиц (d): 1 – зипакс (Zirax), $d = 37$ мкм; 2 – силикагель, $d = 10$ мкм; 3 – зорбакс (Zorbax), $d = 5$ мкм; 4 – микросорб, $d = 5$ мкм

Приборы и материалы

Хроматографы для ВЭЖХ состоят из следующих составных частей (рис. 3.46):

насоса, обеспечивающего рабочее давление до $200 \cdot 10^5$ Па;
манометра, рассчитанного на $400 \cdot 10^5$ Па;
капилляров, изготовленных из нержавеющей стали (внешний диаметр 1,5 мм, внутренний диаметр 0,3 мм);

высококачественных устройства ввода пробы в колонки;
детектора (УФ-детектор или рефрактометр с ячейкой небольшого объема (не более 8 мкл), имеющего высокую чувствительность;

безинерционного самописца с переменной скоростью протяжки ленты ($11\text{--}200$ см·ч⁻¹; задержка ответа не более 0,5 с) или подключение к компьютеру.

«Мертвый» объем во всех элементах системы должен быть минимальным.

Градиентный смеситель

Наиболее простой моделью градиентного смесителя является система из двух сообщающихся сосудов, применяемая в хроматографии низкого давления (см. рис. 3.28).

Более современные модели градиентных смесителей снабжены клапанами, управляемыми при помощи микропроцессоров.

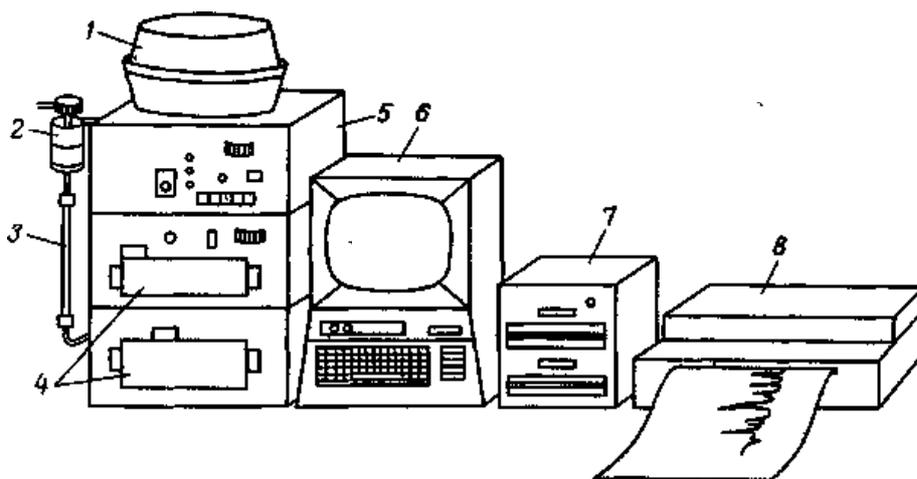


Рис. 3.46. Схема хроматографа для ВЭЖХ: 1 – блок хранения пробы; 2 – блок ввода пробы; 3 – колонка; 4 – насос; 5 – детектор; 6 – микропроцессор; 7 – дисковод; 8 – принтер

Преимущество таких моделей заключается в том, что для создания градиента концентрации достаточно одного насоса. Иногда используют модель с двумя насосами в едином блоке с микропроцессором. В этом случае градиент формируют в области высоких давлений, т. е. на входе в колонку, причем изменение градиента получается гораздо точнее. В большинстве случаев вполне достаточно однократной деаэрации растворителей путем выдерживания их в вакууме.

Устройства ввода пробы

Ввод пробы можно осуществлять при помощи *шприца* (рис. 3.47). Шприцем, изображенным на рис. 3.46, *а*, можно вводить пробу любого объема с хорошей воспроизводимостью в колонку, находящуюся под давлением до 1,5 МПа.

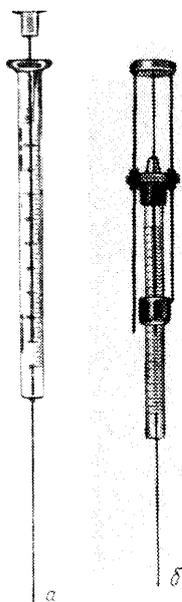


Рис. 3.47. Шприцы для ВЭЖХ (Latek Labortechnik-Gerate, Heidelberg):
а – микрошприц с тефлоновым поршнем;
б – микрошприц с адаптером

Однако в настоящее время редко пользуются шприцами для ввода образца, так как к ним предъявляются высокие требования по герметичности. Чаще всего используют *петлевые дозаторы* (рис. 3.48), которые позволяют вводить пробу при рабочем давлении. Применяют

дозаторы фирмы Rheodyne (длина канала петли 5 см, диаметр 0,56 мм, отмеряемый объем пробы от 1 до 2000 мкл).

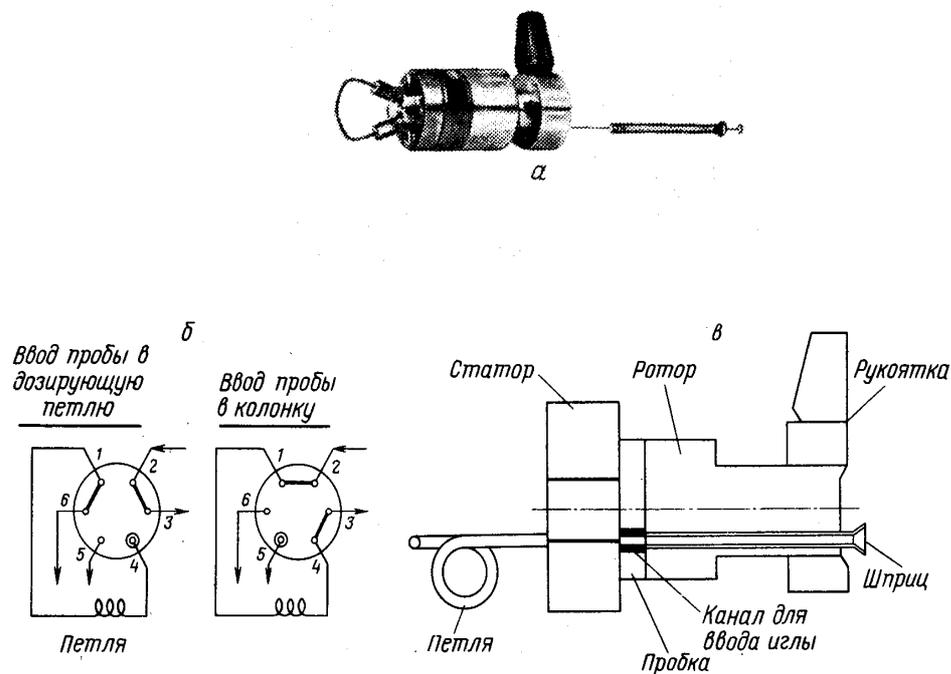


Рис. 3.48. Петлевой дозатор (Latek Labortechnic-Gerate GmbH, Heidelberg): а – общий вид блока с дозирующей петлей и шприцем; б – положения крана-переключателя; в – схема крана-переключателя; 1 – дозирующая петля; 2 – насос; 3 – колонка; 4 – шприц; 5, 6 – на выход

Колонки

Колонки представляют собой трубки из нержавеющей стали с хорошо отполированной внутренней поверхностью. Наиболее распространенными являются колонки следующих типов:

колонки для аналитического разделения (рис. 3.49) размером 4x250 или 4x125 мм; применение коротких колонок и новых сорбентов (с диаметром частиц 5 мкм и менее) позволяет достигнуть очень высокого разрешения при небольших затратах;

колонки для препаративного разделения с внутренним диаметром 8, 10, 16 мм и длиной 250 и 500 мм.

Сорбенты

Для всех вариантов ВЭЖХ, за исключением аффинной хроматографии, выпускаются специальные сорбенты. Нерегулярные и сферические сорбенты с диаметром частиц 5–10 мкм упаковывают с достаточно высокой воспроизводимостью. Трудности появляются при работе с мелкими фракциями, в частности сложной проблемой является приготовление стабильных суспензий.

Высокой воспроизводимости упаковки достигают также при использовании поверхностно-пористых сорбентов (непористое ядро и пористый поверхностный слой) с частицами диаметром 20–30 мкм, особенно при сухом способе набивки. Эти сорбенты обладают небольшой емкостью и используются главным образом для аналитических целей.

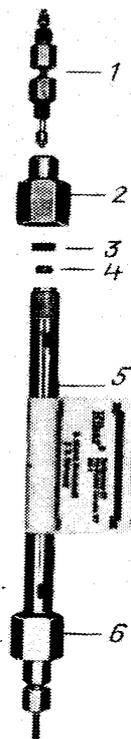


Рис. 3.49. Колонка для ВЭЖХ (Merk, Darmstadt): 1 – капилляр на входе (нержавеющая сталь 1/16); 2 – переходник (нержавеющая сталь); уплотнительное кольцо; пористый фильтр; 5 – трубка (нержавеющая сталь, внутренний диаметр 4 мм) с внешней резьбой; 6 – выход колонки (детали 1 – 5 в сборе)

Приборы для упаковки колонок

Стабилизацию суспензий осуществляют методами «равновесной плотности» и «вязкой среды» (см. ниже). В первом случае используют цилиндрический сосуд – резервуар 4 (рис. 3.50), объем которого превышает объем колонки (это необходимо, чтобы поместить в него рассчитанное количество суспензии сорбента). Колонка 6 заполнена растворителем высокой плотности, резервуар 4 – суспензией сорбента низкой плотности (гептан). Насос 8 подает суспензию в колонку. Окончание процесса характеризуется падением давления в системе, которое регистрируется манометром 7.

При работе с сорбентами, чувствительными к кислороду воздуха или деформирующимися под давлением, используют прибор, изображенный на рис. 3.51. Прибор состоит из емкости типа автоклава. При упаковке суспензию перемешивают при помощи магнитной мешалки и постепенно передавливают в колонку, где сорбент уплотняется, формируя рабочий слой. Перемешивание исключает нежелательный процесс седиментации, при этом плотность и вязкость растворителя уже не имеют решающего значения.

Подготовка пробы

Образец растворяют в рабочем растворителе и перед вводом, в колонку фильтруют на фильтре с диаметром пор менее 4 мкм или центрифугируют для удаления механических примесей. Если этой операцией пренебречь, колонка быстро забивается и выходит из строя.

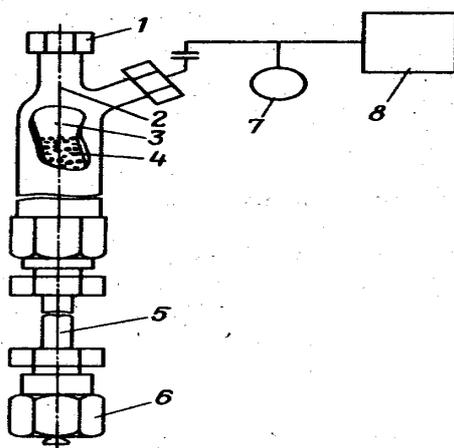


Рис. 3.50. Устройство для упаковки колонки по методу «равновесной плотности» (Siemens, Munchen): 1 – накидная гайка; 2 – патрубок для подачи суспензии; 3 – слой гептана; 4 – суспензия сорбента; 5 – колонка; 6 – выход колонки; 7 – манометр; 8 – насос

Порядок выполнения операций

Упаковка колонки

При упаковке колонки главная задача заключается в том, чтобы свести к минимуму нежелательный процесс седиментации. Этого достигают правильным выбором смеси растворителей для приготовления суспензий: смесь либо имеет плотность, близкую к плотности сорбента, либо достаточно высокую вязкость. Стабилизации суспензии достигают перемешиванием (см. рис. 3.51)

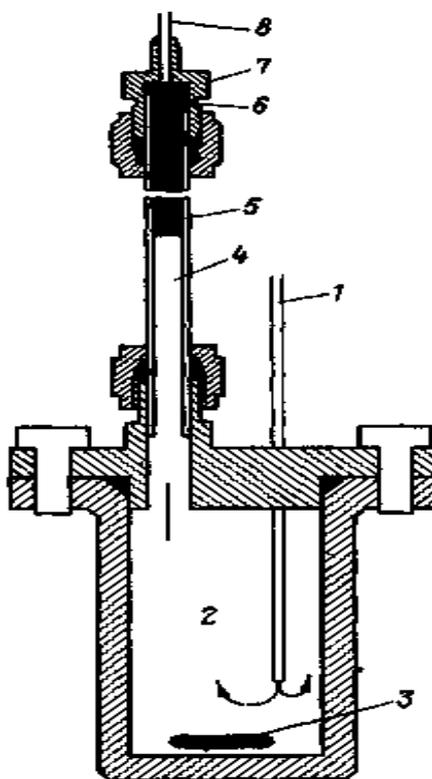


Рис. 3.51. Схема прибора для упаковки колонки сорбентами, чувствительными к кислороду воздуха и деформирующимися под давлением (Micrometncs, Norcross GA 30093, USA): 1 – от насоса; 2 – суспензия сорбента; 3 – магнит; 4 – колонка; 5 – слой сорбента; 6 – фильтр; 7 – блок на выходе; 8 – капилляр на выходе

Метод равновесной плотности применяют при работе с сорбентами, нечувствительными к действию кислот (кислота, например HBr, может появиться вследствие разложения тетрабромэтана). Например, силикагель

суспендируют в системе тетрабромэтан – диоксан – четыреххлористый углерод 20:15:15.

Метод вязких растворителей основан на уменьшении седиментации за счет высокой вязкости растворителя (изопропанол, диоксан).

Упаковку колонки производят следующим образом:

- колонку промывают дихлорметаном (хлористым метиленом), ополаскивают водой, горячим 5%-м раствором детергента и одновременно протирают ершом, стараясь не повредить внутреннюю поверхность; в заключение колонку промывают водой, метанолом и высушивают, исключая возможность попадания внутрь частиц пыли и капелек масла;

- пористую пластинку или фильтр, делитель потока, уплотнительные кольца монтируют на выходе в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя; после упаковки колонки на выходе подсоединяют капиллярный наконечник;

- на входе в колонку монтируют прибор для упаковки;

- сорбент суспендируют в системе растворителей, диспергируют в течение 10 мин при помощи ультразвука, проводят деаэрацию;

- суспензию переносят в прибор для упаковки и плотно его закрывают, не допуская попадания пузырьков воздуха; прибор подсоединяют к насосу;

- запасной сосуд заполняют гептаном (в случае метода равновесной плотности) или вязким растворителем (в случае метода вязких растворителей) (применение гептана сопряжено с резким падением рабочего давления по окончании упаковки);

- суспензию при максимальном давлении перекачивают в колонку;

- по завершении процесса упаковки отключают насос и демонтируют устройство для упаковки;

- избыток сорбента извлекают шпателем, на входе помещают пористый фильтр, делитель потока, уплотнительные кольца, капилляр;

- перед началом работы колонку выводят на рабочий режим, причем предварительно элюент подвергают деаэрации, чтобы исключить возможность попадания пузырьков воздуха в ячейку детектора.

Источники ошибок

Плохая упаковка: седиментация сорбента при упаковке ведет к несимметричности пиков. Рекомендуется: ускорить процесс упаковки (производительность насоса установить $1000 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1}$, рабочее давление $5 \cdot 10^7 \text{ Па}$); при недостаточной механической прочности частиц сорбента упаковывать при перемешивании (см. рис. 3.51).

Плохое качество сорбента или растворителя ведет к плохой воспроизводимости результатов. Рекомендуется: между насосом и блоком ввода пробы поместить предколонку большого объема с крупнозернистым сорбентом.

Засорение фильтра на входе в колонку увеличивает сопротивление колонки. Рекомендуется: сменить фильтр или промыть колонку в режиме противотока; тщательнее фильтровать раствор пробы и растворителя.

При градиентном элюировании присутствие в растворителях незначительных примесей ведет к появлению на графике фантомных пиков: примеси сорбируются на входе в колонку, а затем десорбируются по мере изменения состава элюента; получаемые пики могут быть ошибочно приняты за компоненты анализируемой смеси. Рекомендуется: использовать только тщательно очищенные растворители.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограмму (рис. 3.52). Измеряемые параметры элюата (экстинкция при поглощении в УФ-свете в делениях шкалы самописца в зависимости от чувствительности детектора) откладывают на оси ординат. Например, если чувствительность детектора установлена на 0,02 единицы экстинкции, то это значение соответствует максимальной высоте шкалы самописца.

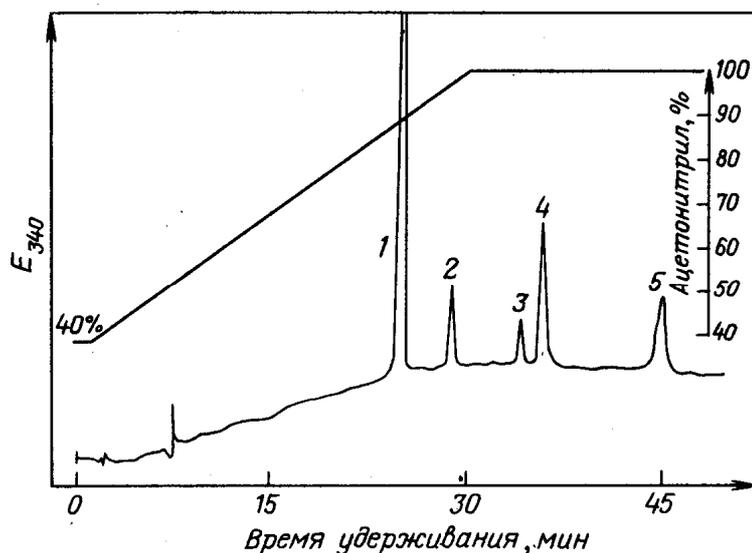


Рис. 3.52. Хроматограмма разделения методом ВЭЖХ полициклических ароматических соединений на нуклеосиле C_{18} (5 мкм): 1 – коронен; 2 – бензо[а]коронен; 3 – неидентифицированный компонент; 4 – антраценол[2,3-а]коронен; 5 – неидентифицированный компонент

Далее в рабочем журнале приводят следующие данные: колонка – 4x200 мм, подвижная фаза – изменение концентрации от 40%-ного водного раствора ацетонитрила до 100%-ного ацетонитрила за 30 мин; скорость подачи элюента – 1 мл \cdot мин⁻¹; давление – 11,6 МПа; способ регистрации – поглощение при 340 нм; температура – 50°C; объем пробы – 10 мкл.

Область применения

Ускоренный анализ разнообразных смесей при высоком разрешении, высокой чувствительности и хорошей воспроизводимости.

Препаративное разделение веществ в количестве от нескольких миллиграмм до нескольких грамм.

Детекторы

Хроматографические детекторы представляют собой приборы, позволяющие выявлять целевые вещества в потоке элюента по характерным свойствам (окраске, флуоресценции, поглощению в УФ-области спектра и др.).

Основы процесса

В жидкостной хроматографии применение детекторов позволяет решать следующие задачи: обнаружение и идентификацию анализируемых веществ по объему элюата или времени удерживания; количественную оценку анализируемых веществ (по площади пиков на хроматограмме).

Детекторы для жидкостной хроматографии должны обладать ячейками небольшого объема (в ВЭЖХ не более 8 мкл), а работа их должна характеризоваться высокой чувствительностью при незначительном шуме, широким диапазоном измерения при сохранении по возможности линейного ответа, нечувствительностью к колебаниям давления, скорости потока, температуры в измерительной ячейке, стабильностью во времени.

В жидкостной хроматографии низкого давления к детектору предъявляются не столь высокие требования. Он может быть проще в конструктивном отношении и дешевле в изготовлении. В препаративной хроматографии высокая чувствительность детектора также не обязательна.

Для анализа многих классов веществ наиболее всего подходят два типа детекторов:

спектрофотометрический – регистрирует поглощение в УФ- и видимой области спектра;

рефрактометрический (дифференциальный рефрактометр) – измеряет разность показателей преломления в сравнительной (подвижная фаза) и рабочей (подвижная фаза с анализируемым веществом) кюветах.

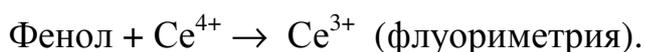
Гораздо реже применяются другие типы детекторов.

Флуориметр – регистрирует флуоресценцию веществ. В целом этот детектор характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению со спектрофотометрическим детектором.

Разнообразные *электрохимические* детекторы, например: проточные рН-детекторы; ион-селективные электроды для обнаружения некоторых видов ионов; проточные детекторы по электропроводности; вольтамперометрические детекторы, амперометрические детекторы, иногда их называют электрохимическими. В последнее время эти недорогие детекторы находят все более широкое применение.

Радиоактивационные детекторы – регистрируют интенсивность β - и γ -излучения радиоактивных изотопов.

Разнообразные детекторы (обычно *фотометры*) для обнаружения продуктов реакции анализируемых веществ со специфическими реагентами. В этом случае элюат смешивают с раствором реагента и затем подают в реактор – свернутый в спираль тефлоновый капилляр определенной длины. Окрашенный или флуоресцирующий продукт реакции регистрируется количественно в расположенном вслед за реактором УФ-детекторе или фотометре. В качестве примера реакций, используемых для обнаружения веществ в потоке, можно указать следующие:



Аминокислоты + Нингидрин \rightarrow Окрашенные (фиолетовые) продукты реакции (фотометрия при 570, 440 нм для обнаружения пролина).

Аминокислоты + Флуорескамин \rightarrow Флуоресцирующие продукты реакции (флуориметрия).

Аминокислоты + *o*-Фталевый альдегид \rightarrow Флуоресцирующие продукты реакции (флуориметрия).



N-Нитрозоамид + Сульфаниловая кислота + 2 [(Нафтил-1) амино]-этиламин \rightarrow Окрашенные продукты реакции (фотометрия при 550 нм).

Приборы

УФ-детекторы

В настоящее время наиболее широкое применение получили УФ-спектрофотометры. Они бывают одно- и двухлучевые.

УФ-фотометры с оптическими фильтрами или с дифракционной решеткой позволяют вести регистрацию при 254 или 280 нм. При подборе соответствующих фильтров можно вести измерения и при других длинах волн. Детекторы, работающие при длинах волн 200 – 220 нм, предназначены для обнаружения веществ, не поглощающих при 254 и 280 нм (например, аминокислот, сахаров). Однако в этом случае пригодны лишь немногие растворители (вода, ацетонитрил), не поглощающие при 210 нм.

Рис. 3.53. Оптическая схема двухлучевого УФ-детектора (ISCO, Lincoln, NE/USA): 1 – регулирующая фотокамера; 2 – ртутная лампа низкого давления; 3 – отражатель; 4 – фильтр-отсекатель (входит в состав сменного фильтра); 5 – фосфоресцирующий или люминесцирующий экран-усилитель (входит в состав сменного фильтра); 6 – алюминиевая фольга (входит в состав сменного фильтра); 7 – рабочее положение сменного фильтра; 8 – фильтр с флуоресцирующим слоем; 9 – фотоумножитель; 10 – измерительная кювета; 11 – сравнительная кювета; 12 – калибровочный стандарт; 13 – диафрагма; 14 – рукоятка

Спектрофотометр с переменной длиной волны (200 – 600 нм) используют для количественного анализа. Регистрация ведется при длине волны, соответствующей максимуму поглощения анализируемых веществ, или же при длине волны, при которой не поглощают сопутствующие примеси.

Детекторы с автоматически регулируемой чувствительностью применяют в препаративной жидкостной хроматографии низкого давления.

Сканирующий спектрофотометр применяют для снятия полного спектра поглощения веществ в потоке элюата и проведения количественного анализа даже при весьма условном разделении анализируемой смеси. Для обработки получаемого при этом огромного объема информации требуется применение вычислительной техники.

На рис. 3.53 изображена оптическая схема УФ-детектора. Большинство приборов позволяют проводить детектирование при двух длинах волн. В этом случае анализируемые вещества (например, нуклеотиды) идентифицируют по соотношению коэффициентов экстинкции. Для препаративного выделения вполне достаточно однолучевого УФ-детектора, работающего при одной длине волны.

Рефрактометрические детекторы

Принцип действия дифференциального рефрактометра основан на том, что при прохождении луча света через две кюветы, заполненные жидкостями с различными показателями преломления (обыкновенно измерительная кювета заполнена элюатом из колонки, а сравнительная кювета – чистым растворителем), луч отклоняется на угол, пропорциональный разности показателей преломления. Отраженный луч фокусируется на фотосопротивлении, которое вырабатывает электрический сигнал, регистрируемый самописцем.

Эти детекторы применяют для обнаружения веществ, не поглощающих свет в видимой и УФ-области спектра.

Затруднения возникают при градиентном элюировании, так как растворители для хроматографии, как правило, имеют различные показатели преломления.

В этом случае стараются использовать растворители с близкими показателями преломления. Существенным недостатком рефрактометрических детекторов является недостаточно высокая чувствительность по сравнению с УФ-детекторами.

Источники ошибок

Ошибки со стороны оператора при использовании жидкостной хроматографии возможны буквально на всех этапах работы. Необходимо знать наиболее типичные ошибки, их причины и способы устранения.

Уширение пиков. Причины: плохая упаковка колонки, слишком высокая скорость элюирования.

Широкие, сильно асимметричные пики. Причины: колонка перегружена из-за высокой концентрации вещества в пробе, высокое сопротивление в соединительных шлангах или в кювете детектора, большой мертвый объем в верхней части колонки из-за уплотнившегося слоя геля (в качестве временной меры рекомендуется заполнить пространство над гелем стеклянными шариками), неправильный выбор элюента – наличие в элюенте кислот, неправильный выбор значения pH.

Фантомные пики или неожиданно высокий уровень базовой линии. Причины: выброс пузырьков газа в кювете детектора (рекомендуется установить капилляры после детектора или провести деаэрацию элюента); примеси в элюенте при градиентном элюировании, которые вначале сорбируются на колонке, а при определенной полярности или ионной силе элюируются (рекомендуется использовать очищенные растворители).

Дрейф базовой линии. Причины: медленное вымывание из детектора пузырьков воздуха; при высокой чувствительности детектора и смене элюента – остатки предыдущего растворителя, удерживаемого колонкой, температурные колебания в детекторе или нестабильность работы лампы детектора вследствие недостаточного времени отжига лампы.

Плохая воспроизводимость. Причины: неудовлетворительное качество сорбента или элюента (рекомендуется тщательно приготовить достаточный запас элюента).

Низкая чувствительность детектора. Причины: элюент поглощает в УФ-области спектра, окошко кюветы загрязнено отложениями мелких частиц сорбента в случае свежеприготовленной колонки.

Насос не подает элюент в колонку. Причины: наличие воздуха в клапанах насоса (рекомендуется выдавить пузырьки воздуха при помощи гидравлического импульса, подаваемого поршнем насоса, воздух из линии высокого давления удалить шприцем), блокировка крана-переключателя, например из-за наличия кристаллического осадка (рекомендуется растворить кристаллические отложения в кране), блокировка капиллярных соединений (рекомендуется проверить линию подачи элюента).

Нет потока элюента через колонку или слишком высокое сопротивление. Причины: пористый фильтр колонки засорен механическими

примесями из элюента или раствора пробы (рекомендуется работать только при наличии фильтрующего элемента на насосе, обязательно фильтровать или центрифугировать пробу, в необходимых случаях встраивать в систему небольшую предколонку и своевременно ее заменять), кристаллические отложения в колонке из-за высокой концентрации материала в пробе или неправильного порядка смены элюентов, например последовательность солевой буфер – органический растворитель вместо последовательности солевой буфер – вода – метанол – органический растворитель.

Газовая хроматография

Газовая хроматография (ГХ) – метод разделения летучих веществ: газов (при нормальной температуре) или паров (при повышенной температуре). В качестве неподвижной фазы в ГХ используют твердые материалы (насадочные или набивные колонки), твердые материалы, покрытые слоем жидкости, или же капилляры с нанесенным на внутреннюю поверхность слоем жидкости (капиллярные колонки). В качестве подвижной фазы используют газ-носитель, переносящий разделяемые вещества через колонку. Разделение анализируемой смеси осуществляется за счет различного времени удерживания веществ в неподвижной фазе.

Особенности метода

Между жидкостной и газовой хроматографией не существует принципиальной разницы. ГХ отличается лишь свойствами подвижной фазы: высокой скоростью диффузии газа-носителя и его свойством сжиматься. На рис. 3.54 приведено упрощенное уравнение Ван-Деемтера для описания высоты теоретической тарелки, сохраняющее свое значение и в газовой хроматографии

$$H=A+B/U + CU,$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке; U – линейная скорость газа-носителя в колонке; A – член, учитывающий турбулентную диффузию; B – член, учитывающий продольную диффузию; C – член, учитывающий массопередачу.

Слагаемое A учитывает турбулентную диффузию, возникающую за счет многообразия путей, по которым молекулы разделяемых веществ проходят между частицами сорбента. При расчете капиллярных колонок, где удерживание происходит только в пленке жидкости на стенке колонки, этим слагаемым пренебрегают. Слагаемое B/U в ГХ приобретает

существенно больший вес по сравнению с ЖХ. Положение минимума на графике Ван-Деемтера, а следовательно, максимальная разделяющая способность колонки в ГХ зависят от следующих параметров: количества неподвижной фазы (качество упаковки, толщина слоя); размера частиц или диапазона размеров частиц материала-носителя; размеров колонки; вязкости газа-носителя (а следовательно, и температуры колонки).

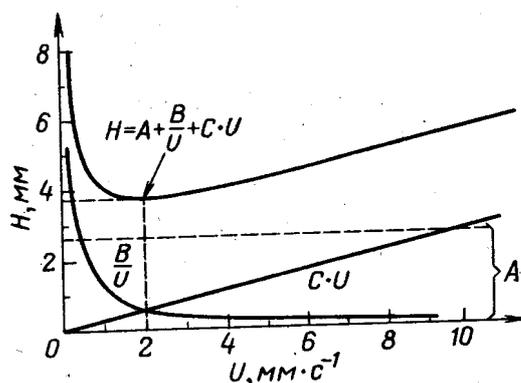


Рис. 3.54. Кривая Ван-Димтера: H – ВЭТТ; A – член, учитывающий вихревую диффузию; C – член, учитывающий массоперенос; стрелка на суммарном графике указывает минимальное значение ВЭТТ (число теоретических тарелок при этом максимально)

В зависимости от состояния фаз различают ГАХ (газотвердофазную или газоадсорбционную хроматографию) и ГЖХ (газожидкостную или распределительную хроматографию). Тип неподвижной фазы, механизм разделения и возможности обоих методов сопоставлены в табл. 3.9. При количественной оценке результатов разделения методом ГХ большое значение имеет форма пика. Симметричность пика зависит от растворимости анализируемых веществ в жидкой (неподвижной) фазе. В свою очередь растворимость определяется зависимостью давления паров растворенного вещества от его концентрации в жидкой фазе. При постоянной температуре эта зависимость представлена в виде изотермы (рис. 3.55). Если давление пара вещества, растворенного в жидкой фазе, растет с повышением температуры линейно, имеем линейную изотерму (рис. 3.55, а). В этом случае на графике элюирования получают симметричный пик. Пик обычно симметричен, если разделяемые вещества и жидкости, применяемые в качестве неподвижной фазы, принадлежат к одному классу (пример идеальной смешиваемости).

Отклонения от случая идеальной смешиваемости приводят к искривлению изотермы и образованию несимметричных пиков (рис. 3.55, б, в) с размытой восходящей («фронт») или нисходящей («хвост») ветвью.

Этот эффект становится особенно заметным при увеличении нагрузки на колонку.

Т а б л и ц а 3.9

Варианты газовой хроматографии

Название метода	Неподвижная фаза	Принцип разделения	Область применения метода
Газоадсорбционная хроматография (ГАХ) Газожидкостная (распределительная) хроматография (ГЖХ)	Адсорбент Жидкая фаза, нанесенная на инертный материал - носитель	Адсорбция Распределение	Анализ газов и паров жидкостей Анализ газов и паров жидкостей; методические возможности выше, чем для ГАХ

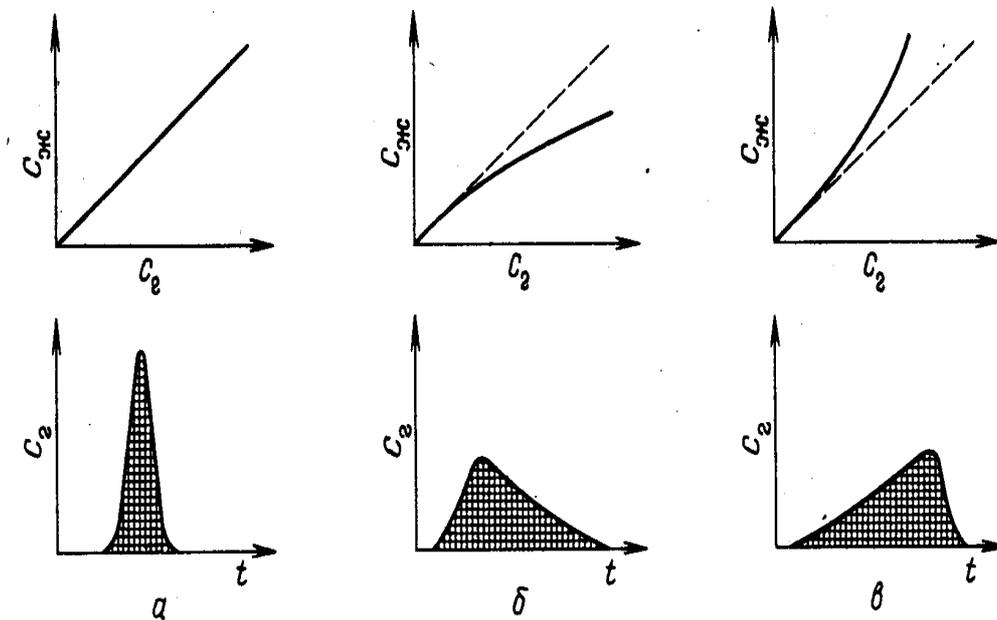


Рис. 3.55. Влияние формы изотермы распределения на форму пика: *a* – изотерма линейная, пик симметричен; *б* – изотерма выпуклая, пик имеет «хвост»; *в* – изотерма вогнутая, пик имеет «фронт»

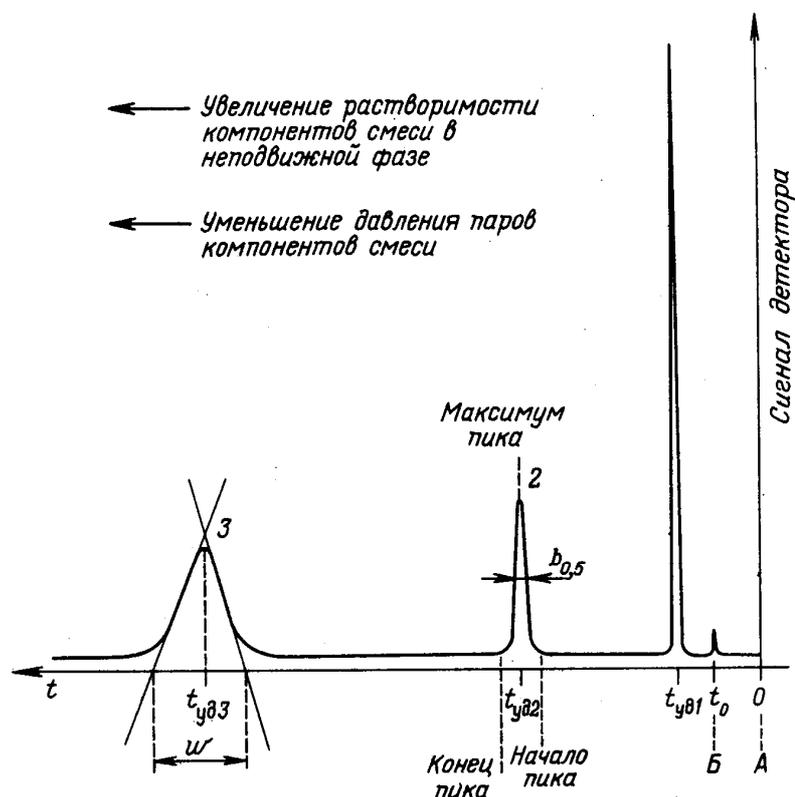


Рис. 3.56. Хроматограмма, полученная в изотермических условиях: А – момент ввода пробы; Б – пик несорбируемого компонента; t_0 – время удерживания несорбируемого компонента; $t_{уд.1}$, $t_{уд.2}$, $t_{уд.3}$ – времена удерживания компонентов 1, 2 и 3; w – ширина пика (расстояние между точками пересечения двух касательных линий с нулевой линией)

Время удерживания зависит от вероятности попадания молекул вещества в подвижную фазу. При этом компоненты с высоким давлением паров и соответственно низкой растворимостью в неподвижной фазе удерживаются слабее. Напротив, вещества с низким давлением пара и высокой растворимостью элюируются позднее.

На рис. 3.56 приведена хроматограмма, полученная при постоянной температуре, на примере которой демонстрируются основные понятия газовой хроматографии. Если в процессе разделения температуру повышают, то говорят о газовой хроматографии при программируемой температуре.

Аналитическая газовая хроматография

Приборы и материалы

В конструктивном отношении приборы для ГХ проще по сравнению с приборами для ВЭЖХ хотя бы потому, что вместо дорогостоящего насоса

высокого давления в ГХ применяют обычный баллон с газом-носителем. Схема прибора для ГХ приведена на рис. 3.57.

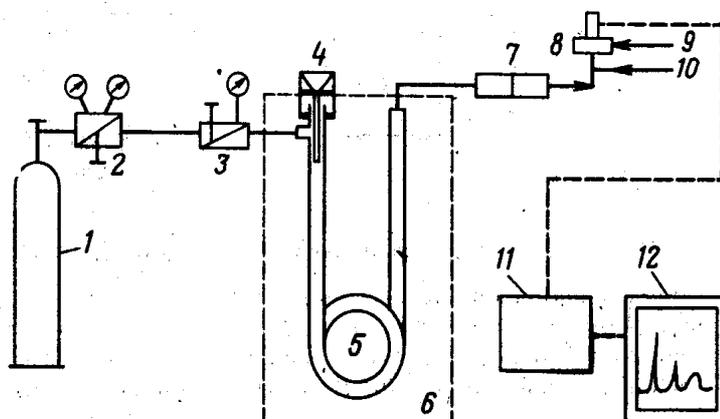


Рис. 3.57. Схема газового хроматографа: 1 – баллон с газом-носителем; 2 – игольчатый вентиль баллона; 3 – регулятор потока газа – носителя (дрессель); 4 – дозирующее устройство (блок ввода пробы); 5 – колонка; 6 – термостат; 7 – ротаметр; 8 – детектор (пламенно – ионизационный – ПИД); 9 и 10 – система для подачи газов в детектор (водород и воздух в случае ПИД); 11 – электронный блок обработки сигнала (интегратор); 12 – самописец

Колонки

В ГХ применяют три типа колонок (рис. 3.58).

Насадочные колонки (рис. 3.58, а). Изготовлены из стеклянных или металлических трубок (нержавеющая сталь) U-образной формы или спиралевидных.

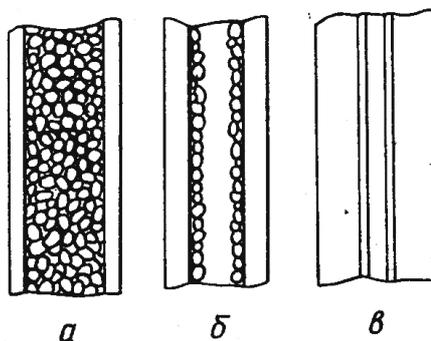


Рис. 3.58. Типы колонок: а – насадочная колонка; б – тонкослойная капиллярная колонка (SCOT-колонка); в – классическая капиллярная колонка

Металлические колонки более устойчивы к механическим воздействиям, однако на поверхности металла возможно протекание каталитических реакций. Стекланные колонки обладают нежелательными адсорбционными эффектами, однако их можно уменьшить при помощи специальной обработки колонок (силанизирование). Насадочные колонки характеризуются большой поверхностью и высокой разделяющей способностью. Однако эти колонки обладают большим сопротивлением, что ведет к формированию неравномерного потока газа (вследствие того, что газ хорошо сжимаем). Согласно уравнению Ван-Деемтера, существует оптимальное значение потока газа-носителя, при котором значение ВЭТТ минимально. Чем длиннее колонка, тем дальше от оптимального значение скорости потока газа-носителя. Хотя теоретически число тарелок растет линейно с увеличением длины колонки, на практике преимущество длинных колонок сводится «на нет» из-за увеличения сопротивления. Наиболее распространены насадочные колонки длиной 0,5–10 м при внутреннем диаметре 1 – 5 мм.

Тонкослойные капиллярные колонки (рис. 3.58, б). Сокращенно их называют SCOT-колонки (support coated open tubular column). Они занимают промежуточное место между насадочными и капиллярными колонками. Внутренняя поверхность колонок покрыта тонким слоем мелкодисперсного сорбента, пропитанного жидкой фазой. Возможная нагрузка на этих колонках выше, чем на капиллярных, однако число теоретических тарелок в расчете на 1 м длины колонки невелико.

По числу тарелок колонки этого типа превосходят насадочные колонки, так как обладают меньшим сопротивлением. Колонки имеют длину до 200 м, внутренний диаметр составляет 0,3 – 0,5 мм.

Капиллярные колонки из стекла или нержавеющей стали (рис. 3.58, в). При равной с насадочными колонками длине обладают существенно меньшим сопротивлением. Колонки имеют длину до 200 м при внутреннем диаметре 0,3 – 0,5 мм. Колонки вследствие достаточной длины имеют большое число теоретических тарелок, однако для них характерна низкая нагрузка. Ввод пробы небольшого объема осуществляют при помощи устройства ввода пробы с делителем потока. Детектирование осуществляют при помощи чувствительного детектора с небольшим «мертвым» объемом (пламенно-ионизационный детектор).

Устройства ввода пробы

Способ ввода пробы зависит от вида пробы (жидкая или газообразная) и типа колонки (насадочная или капиллярная).

Пробу вводят *шприцем* при разделении жидкостей в насадочных колонках (рис. 3.59). Иглой шприца прокалывают мембрану (пробку из

силиконовой резины) и вводят пробу. Поток газа-носителя проба уносится непосредственно в колонку.

Пробу вводят при помощи *делителя потока* (рис. 3.60) при работе на капиллярных колонках. Шприцем через мембрану пробу вводят в канал испарения пробы. После испарения проба разбавляется газом-носителем. Большая часть газовой смеси через игольчатый клапан направляется на сброс, меньшая часть – в колонку.

Пробу вводят при помощи *дозировочной петли* при автоматизированном анализе газовых смесей. В зависимости от вида дозирующего устройства петлю вначале вакуумируют, а затем заполняют пробой газа в процессе промывки или после нее.

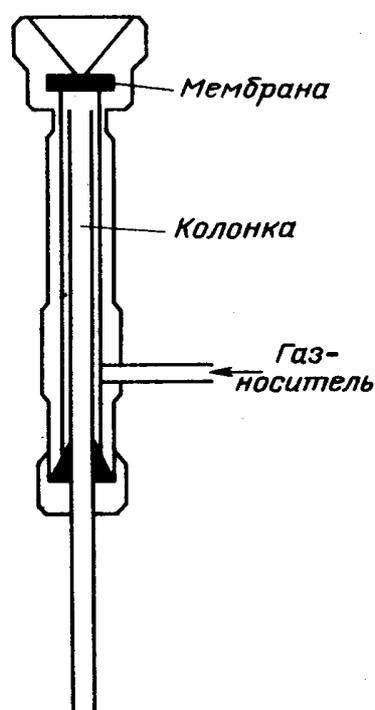


Рис. 3.59. Колонка с устройством ввода пробы

Детекторы

На практике наиболее широкое применение получили детекторы двух типов.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД). Схема детектора представлена на рис. 3.61. На выходе колонки поток газа-носителя

смешивается с водородом и воздухом, после чего смесь сжигается в пламени горелки детектора.

Появление в пламени заряженных частиц ведет к возникновению ионного тока, величина которого регистрируется. Если в пламени сгорает только газ – носитель, ток детектора незначителен и равен фоновому. При появлении в пламени углеродсодержащих веществ величина тока возрастает. Преимуществами ПИД являются: высокая чувствительность; безинерционность; широкая область линейного отклика (на 6 – 7 порядков); небольшой мертвый объем. Кроме того, детектор не требует термостатирования.

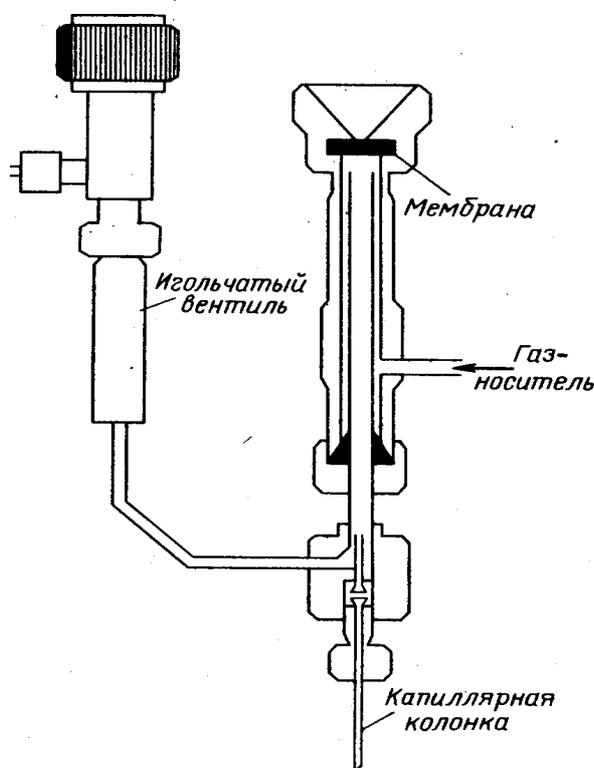


Рис. 3.60. Капиллярная колонка с делителем потока

Детектор по теплопроводности (ДТП). Схема детектора приведена на рис. 3. 62. При омывании нагретой металлической спирали потоком газа – носителя ее сопротивление меняется в зависимости от теплопроводности окружающей среды. Изменение сопротивления измеряется с помощью моста Уитстона и регистрируется на самописце.

Если в качестве газа – носителя используется водород или гелий, обладающие высокой теплопроводностью, то все вещества, захваченные потоком газа – носителя, снижают уровень теплопроводности в потоке, что регистрируется, и таким путем вещества обнаруживаются в элюате на выходе из колонки.

Преимуществом ДТП является его универсальность. Недостатками ДТП являются: низкая чувствительность по сравнению с ПИД; высокая инерционность и большой мертвый объем (вследствие чего детектор невозможно использовать при работе на капиллярных колонках); необходимость тщательного термостатирования.

Сигналы обоих детекторов пропорциональны массе введенного органического соединения, и поэтому эти детекторы могут применяться при количественном анализе.

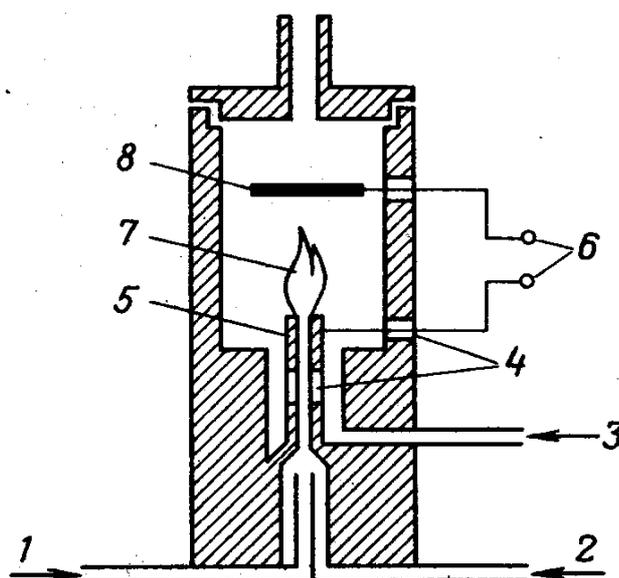


Рис. 3.61. Схема пламенно-ионизационного детектора (ПИД): 1 – газ-носитель; 2 – водород; 3 – воздух; 4 – изоляторы; 5 – горелка; 6 – подача питания на электроды; 7 – пламя горелки; 8 – электрод-коллектор

Кроме ПИД и ДТП существует ряд *селективных детекторов*:

- пламенно-ионизационные детекторы для определения галогенсодержащих соединений, азот- и фосфорсодержащих веществ;
- пламенно-фотометрический детектор для определения соединений фосфора и серы;
- электронозахватные детекторы для обнаружения веществ с электроноакцепторными группами;

– масс-спектрометрический детектор, позволяющий по характеристическим величинам m/e в масс-спектре идентифицировать анализируемые вещества.

Детекторы, предназначенные для количественного анализа, должны обеспечивать:

– воспроизводимость результатов, что возможно лишь при высокой стабильности основных рабочих параметров (величины тока в мостике Уитстона, температуры в случае ДТП, потоков водорода и газа-носителя, величины фонового тока в случае ПИД);

– достоверность показаний прибора, что достигается за счет жесткой зависимости сигнала детектора от «отклика» измерительной ячейки.

Под понятием «отклик» понимают зависимость показаний детектора от структуры анализируемых веществ. Так, например, с помощью ПИД регистрируют содержание углерода в пробе органических соединений.

С увеличением в молекуле числа гетероатомов процентное содержание углерода уменьшается, соответственно уменьшается сигнал детектора. Эту зависимость учитывают с помощью коэффициента коррекции.

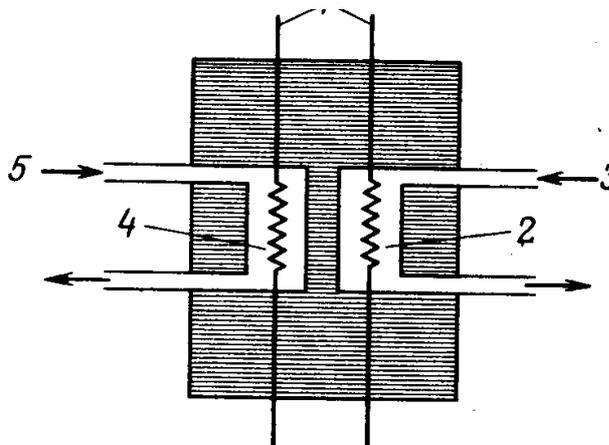


Рис. 3.62. Схема ячейки детектора по теплопроводности (ДТП): 1 – спиральные нити; 2 – измерительная камера; 3 – поток газа из хроматографической колонки (элюат); 4 – сравнительная камера; 5 – чистый газ-носитель

Материалы-носители

ГАХ применяют с целью разделения газов или низкокипящих веществ и обнаружения газообразных примесей в воздухе. В качестве адсорбентов в ГАХ применяют: активированные угли или графитированные сажи

(карбопак С, Carborpack C), пористые синтетические полимеры (тенакс, Тенах; порапак, Porapak; хромосорб, Chromosorb), пористые неорганические материалы (молекулярные сита). Нанесенная жидкая фаза в колонках не применяется.

В ГЖХ сорбенты выполняют функцию носителей неподвижной жидкой фазы и не оказывают влияния на процесс разделения. Наиболее важные из этих материалов приведены в табл. 3.10.

Жидкая фаза

В литературе описаны около 1000 наименований материалов, используемых в качестве жидкой фазы. Подавляющее большинство возникающих на практике проблем по разделению сложных смесей решают при помощи небольшого набора стандартных колонок. При подборе подходящей жидкой фазы руководствуются единственным правилом: неполярные вещества фракционируют на неполярной фазе, полярные вещества – на полярной фазе.

Подготовка пробы

Неправильная методика отбора пробы и ошибки при подготовке пробы могут сильно повлиять на результаты анализа.

Сжиженный газ отбирают из редуктора баллона испаряют в подходящей емкости и анализируют. Надежнее отбирать пробу в процессе испарения жидкости, поскольку по составу газ в баллоне может отличаться от жидкой фазы.

Для анализа паров над жидкой или твердой фазой (например, при определении спирта в пробе крови) разработана специальная методика Head-Space-Analyse («из объема над жидкостью»). Необходимое количество пробы газа отбирают с помощью пробоотборника непосредственно из емкости для хранения (например, из консервной банки). По другой методике пробу потоком воздуха направляют в охлаждаемую ловушку и замораживают. Третий вариант заключается в том, что газ при пониженной температуре адсорбируют на короткой колонке, затем при повышении температуры десорбируют и направляют в хроматографическую колонку.

При анализе влажных проб не допускают конденсации воды в колонке; для этого пробу осушают.

Твердые частицы в аэрозолях отделяют с помощью бумажных салфеток или фильтрующих патронов.

При анализе жидких проб, содержащих компоненты с различной температурой кипения, исключают возможность конденсации компонентов

в дозирующем шприце, для этого шприц нагревают, не допуская разложения образца.

Т а б л и ц а 3.10

Носители для ГЖХ

Носители	Физические свойства	Степень пропитки жидкой фазой	Область применения
На основе силикагеля хромосорб G	Механически прочный, устойчив к истиранию, небольшая поверхность светло-желтого цвета	Низкая	Анализ
хромосорб P	Механически прочный, большая поверхность белого цвета	До 30%	Анализ и препаративное разделение полярных веществ
хромосорб W	Механически прочный, белого цвета	До 15%	Анализ веществ средней полярности
хромосорб A	Большая поверхность	Высокая	Препаративное разделение
газ-хром Q (Gas-Chrom Q)	Сильно инактивированный	Нулевая	Анализ лабильных веществ (стероиды, алкалоиды)
На основе тефлона хромосорб T	Тонкие тефлоновые волокна, устойчивы до 220°C	До 20%	Разделение высокополярных и реакционноспособных веществ (гидразин, SO ₂ , галогены)
На основе углерода карбопак C	Графитированная сажа	До 1%	Разделение полярных веществ (H ₂ S, SO ₂ , спирты, фенолы)

Порядок выполнения операций

Подготовка колонки

Колонку промывают хлористым метиленом и ацетоном (стеклянную колонку дополнительно промывают хлороводородной кислотой). Затем колонку высушивают в потоке воздуха, очищенного от пыли и капель масла. Внутреннюю поверхность стеклянных колонок инактивируют (силанизированием).

Нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель

Приготовление колонок требует определенного опыта, однако грубых ошибок удастся избежать, если придерживаться следующих правил:

- распределять неподвижную фазу на твердом носителе равномерно;
- избегать повреждения (истирания) частиц носителя при нанесении неподвижной фазы;
- избегать окисления, гидролиза или испарения жидкой фазы в процессе нанесения.

Материал-носитель взмучивают в растворе жидкой фазы в легкокипящем растворителе (например, ацетоне) так, чтобы твердый носитель был полностью покрыт слоем жидкости. После тщательного перемешивания растворитель выпаривают на роторном испарителе (по возможности без доступа кислорода воздуха). В заключение материал досушивают в термостате и отсеивают от комков.

Заполнение колонки

Нижний конец колонки закрывают тампоном из стекловаты и через склянку Вульфа присоединяют к водоструйному насосу.

Насадку вносят небольшими порциями через воронку, постукивая при этом по колонке деревянным бруском. Применение вибраторов не всегда бывает эффективным.

После заполнения колонки ее верхний конец закрывают тампоном из стекловаты (силанизированной).

Колонку устанавливают в термостате, не соединяя с детектором, и продувают при нагревании газом-носителем (аргон, гелий, азот), не превышая температуры, допустимой для данной неподвижной фазы.

Колонку соединяют с детектором, не извлекая ее из термостата хроматографа (из-за опасности окисления насадки).

Ввод пробы

Жидкую пробу вводят в колонку непосредственно, твердую пробу перед вводом переводят в раствор. Газообразную пробу вводят в колонку при помощи пробоотборной петли. Объем пробы зависит от типа колонки (насадочная или капиллярная), свойств насадки и ряда других факторов: количества неподвижной фазы; растворимости анализируемых веществ в неподвижной фазе; температуры термостата.

При перегрузке колонки наблюдается появление несимметричных пиков (см. рис. 3.55, б). Для насадочных колонок оптимальной является нагрузка 0,1 – 1 мкл каждого компонента в пробе, т. е. при пяти компонентах нагрузка составляет 0,5 – 5 мкл. При нанесении микрошприцем ошибка составляет менее 10%. Для капиллярных колонок оптимальной является нагрузка в 20 – 1000 раз меньше, чем для насадочных колонок. Соответственно делитель потока в системе ввода сконструирован таким образом, что только небольшая часть пробы попадает в колонку.

Перед вводом пробы стабилизируют нулевую линию. Затем, при вводе пробы шприцем выполняют следующие операции:

промывают микрошприц ацетоном и высушивают;

отбирают пробу;

через мембрану полностью вводят иглу шприца в устройство ввода пробы;

вводят пробу и одновременно на ленте самописца делают пометку;

спустя несколько секунд иглу извлекают из мембраны.

Пробку из силиконовой резины заменяют после 30–40 вводов, при температуре устройства ввода более 150°C пробку меняют чаще.

Специальные варианты газовой хроматографии

Пиролиз. Разлагающиеся при испарении вещества идентифицируют на газовом хроматографе в виде продуктов пиролиза. Пиролиз проводят в пиролитической приставке на нагретой платиновой проволоке, или в керамической лодочке. При этом исходят из того, что большинство структурных группировок дает стандартные и воспроизводимые пиروграммы.

Сочетание газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Сочетание двух методов используют при анализе сложных смесей. Пробу вначале фракционируют на газовом хроматографе. Отдельные фракции в режиме «on-line», т. е. без промежуточного выделения компонентов, направляют в масс-спектрометр, где вещества идентифицируют по масс-спектрам. Масс-спектрометр можно настраивать на определенную массу и

использовать его как чрезвычайно селективный детектор (масс-фрагментография).

Оценка результатов анализа

Площадь пика рассчитывают вручную при условии, что сигнал детектора пропорционален концентрации вещества, а пик симметричен. При оценке асимметричных пиков возникают большие ошибки. При электронном интегрировании форма пика не столь важна. Во всех случаях необходимо ввести коэффициенты коррекции, специфические для каждой группы веществ. Коэффициенты коррекции приводятся в таблицах.

Расчет площади пика по произведению его высоты на полуширину. При идеальной форме пика (гауссова кривая) таким путем учитывается 94% фактической площади. При идеальной форме всех пиков хроматограммы ошибкой можно пренебречь. Данным способом нельзя определять площадь низких пиков с большим основанием.

Планиметрия. Преимущество данного способа заключается в том, что он позволяет определять площади несимметричных пиков.

Метод вырезания и взвешивания пиков. С хроматограммы снимают копию, из нее вырезают пики, а затем взвешивают их на аналитических весах. Относительная ошибка определения зависит от абсолютной площади пика. Абсолютную площадь пика уменьшают за счет скорости подачи ленты самописца и интенсивности отклонения пера самописца.

Электронное интегрирование. Способ имеет ряд преимуществ: удобен при анализе сложного профиля элюирования (серийные анализы); исключает субъективную оценку; позволяет не проводить коррекцию базовой линии. При помощи электронного интегрирования пиков автоматизируют следующие операции: определение начала пика, окончания пика, положения максимума, площади пика; коррекцию базовой линии (дрейф); получение сведений о положении пика на профиле элюирования.

К недостаткам приведенных способов относится неудовлетворительное определение площадей частично перекрывающихся или небольших пиков на нисходящей ветви основного пика – случай, часто встречающийся на практике при определении следов примесей. Эта проблема решается при помощи компьютерного обеспечения: пики регистрируются в виде пунктирной линии (точки или штрихи), а затем обчисляются числовым интегратором. При этом ЭВМ определяет положение и площади пиков, в том числе и несимметричных, производит коррекцию базовой линии, вводит факторы коррекции, сохраняет в памяти результаты анализов.

Источники ошибок

Появление ложных пиков – за счет работы колонки в градиентном температурном режиме. Причиной является появление в образце высококипящих примесей из силиконовой пробки: вначале они осаждаются на холодной колонке, а затем при рабочей температуре элюируются как компоненты анализируемой смеси. Рекомендуется: вымочить пробку в гексане при частой смене растворителя, просушить ее при 100°C и затем в течение 2 ч при 200°C; очистить систему ввода.

Колебания базовой линии – за счет нестабильности тока и температуры детектора в ДТП, нестабильности работы усилителя в ПИД, вследствие элюирования компонентов или продуктов разложения предшествующего образца (рекомендуется перед началом работы прогреть колонку), вследствие наличия примесей в газе-носителе при программировании температуры.

Возникновение фоновых или очень острых пиков – за счет неудовлетворительной работы электроники или наличия примесей в газе-носителе.

Асимметрия пиков (см. рис. 3.55, б, в) – за счет:

адсорбции (рекомендуется использовать более полярную неподвижную фазу, инактивированный материал-носитель, использовать стеклянную колонку);

погрешностей в работе – недостаточного нагрева системы ввода и адсорбции вещества на мембране, слишком высокой нагрузки при определении примесей, плохой техники ввода и загрязнения пробы, слишком большого мертвого объема или плотной набивки колонки, особенно в случае капиллярных колонок;

высокой нагрузки (рекомендуется уменьшить нагрузку, использовать колонку с большим количеством неподвижной фазы или более плотно упакованную, повысить температуру колонки);

термической или каталитической трансформации анализируемых веществ со скоростью, сопоставимой с продолжительностью хроматографического цикла, но не быстрого разложения в блоке ввода (рекомендуется установить минимальную рабочую температуру и использовать предельно короткие колонки).

Образование отдельных широких пиков на хроматограмме за счет перекрывания пиков различных компонентов из-за неудовлетворительной разделяющей способности колонки (рекомендуется заменить неподвижную фазу, изменить параметры колонки) или за счет элюирования веществ предшествующего эксперимента (при повторении опыта такая хроматограмма не воспроизводится).

Образование низких пиков (разрешение неудовлетворительное) за счет:

недостаточного количества неподвижной фазы или неправильно выбранной неподвижной фазы;

слишком короткой колонки;

слишком высокой температуры или слишком большой скорости потока газа-носителя;

слишком крутого градиента температуры.

Образование слишком широких пиков за счет:

низкой скорости потока газа-носителя, возможно за счет неплотностей в соединениях при правильно заданном давлении;

неоднородности пробы.

Плохая воспроизводимость – за счет:

непостоянства температуры или скорости потока;

изменения неподвижной фазы вследствие испарения (рекомендуется снизить рабочую температуру), разложения неподвижной фазы, адсорбции продуктов разложения пробы в неподвижной фазе;

слишком высокого содержания отдельных компонентов.

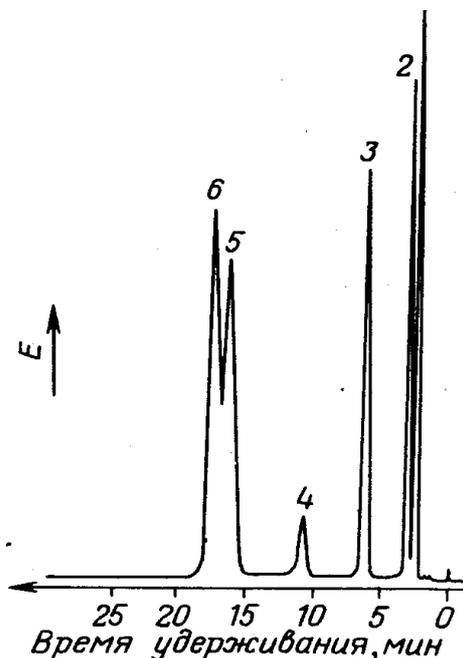


Рис. 3.63. Хроматограмма, полученная методом ГЖХ: 1 – транс-декалин; 2 – цис-декалин; 3 – тетралин; 4 – неидентифицированный компонент; 5 – 1-метилнафталин; 6 – 2-метилнафталин

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограмму (рис. 3.63), снабженную исчерпывающей информацией об условиях опыта: колонка размером 3 ммх2 м; неподвижная фаза – 2,5% силикона ХЕ 60 (Silicon ХЕ 60) на хромосорбе G, АW-DCMS, 0,15–0,18 мм; газ-носитель – азот, скорость подачи – 25 мл·мин⁻¹; температура в режиме программирования, от 130 до 140°С со скоростью 3°С в 1 мин; скорость движения диаграммной ленты – 10 мм·мин⁻¹; детектор – ПИД.

Область применения

Анализ всех классов веществ, термически стабильных и способных испаряться, не разлагаясь (в большинстве случаев нелетучие вещества могут быть получены в виде летучих производных).

Разделение и идентификация неорганических и органических веществ.

Исследование продуктов пиролиза высокомолекулярных веществ.

Анализ энантиомеров:

– на оптически активных фазах (присутствующие в смеси энантиомеры образуют с оптически активной фазой, нанесенной на капиллярную колонку, комплексы различной прочности и вследствие этого могут быть выделены в виде отдельных фракций);

– путем дериватизации (смесь энантиомеров обрабатывают оптически активными реагентами, образующиеся диастереомеры различаются по физико-химическим свойствам, что позволяет разделить их обычным способом).

Электрофоретические методы разделения

Электрофорез – метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных микрочастиц в жидкой среде под действием внешнего электрического поля.

Физические основы метода

Существуют три различных электрофоретических метода (рис. 3.64). Под собственно электрофорезом обычно понимают зональный электрофорез (ЗЭ), два других метода носят название изоэлектрофокусирования (ИЭФ) и изотахофореза (ИТФ). Мы остановимся на описании наиболее широко используемого ЗЭ.

Электрофорез применяют главным образом для разделения веществ, молекулы которых в соответствующих условиях заряжены и различаются по электрофоретической подвижности. Путем изменения внешних условий (например, pH среды, температуры, силы тока, состава и концентрации буферного раствора или носителя) подбирают подходящие условия для разделения. Вследствие того что при разделении на молекулы действуют только электростатические силы, электрофорез считают мягким методом и поэтому часто применяют для работы с лабильными веществами.

Электрофорез можно проводить в растворе, но из-за неизбежного выделения тепла и возникающей в связи с этим тепловой конвекции процесс, как правило, проводят на носителе, что препятствует перемешиванию.

Вследствие ряда сопутствующих явлений (адсорбция, несоизмеримость размеров высокомолекулярных соединений и пор носителя) введение носителя ограничивает область применения метода. С другой стороны, свойства носителя иногда используют для повышения эффективности разделения: например, при электрофорезе в градиенте полиакриламидного геля фракционирование осуществляется не столько за счет различной электрофоретической подвижности веществ, сколько за счет различия в их молекулярных массах.

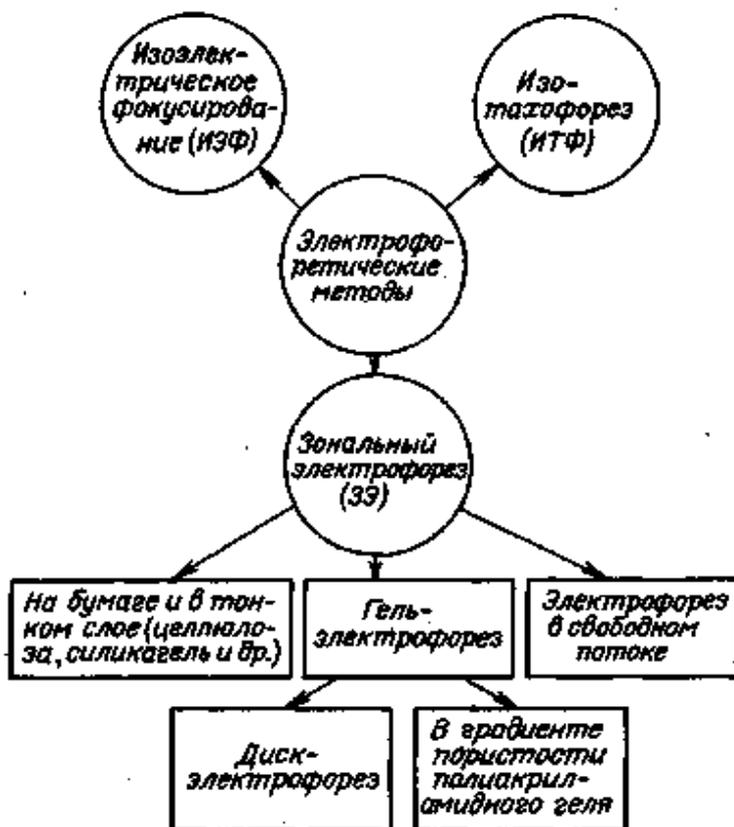


Рис. 3.64. Электрофоретические методы

Зональный электрофорез (ЗЭ)

Зональный электрофорез – это метод разделения заряженных частиц в электрическом поле, основанный на том, что частицы с различными соотношениями заряд/масса мигрируют с различными скоростями в виде отдельных зон.

Физические основы метода

В зависимости от знака заряда молекулы вещества мигрируют в электрическом поле по направлению к аноду или к катоду (рис. 3.65). Результатом регистрации этого процесса является электрофореграмма (по аналогии с хроматографией).

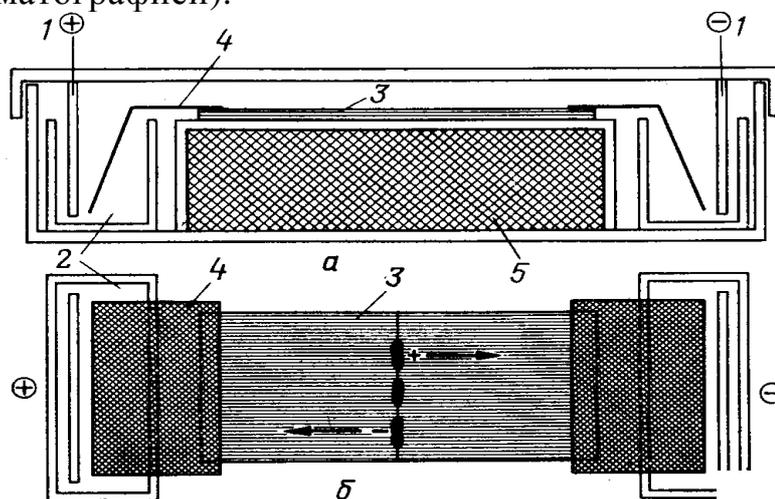


Рис. 3.65. Камера для зонального электрофореза: *a* – вид сбоку; *б* – вид сверху; 1 – электроды (анод и катод); 2 – буферный раствор в кювете; 3 – слой геля на пластинке (в центре пластинки показаны стартовые зоны анализируемой смеси); 4 – мостики из фильтровальной бумаги; 5 – охлаждаемая проточной водой металлическая пластина для отвода избыточного тепла

Ранее использовали один и тот же буфер в слое носителя и в электродных камерах, т. е. разделение вели в непрерывной буферной системе. В настоящее время этот прием все еще применяют при электрофорезе на бумаге и пластинках. Однако было показано, что при электрофорезе в прерывистой буферной системе (различные буферы в слое

носителя и в электродных камерах) быстро мигрирующие вещества образуют более узкие зоны.

Электрофорез в прерывистой буферной системе используют главным образом в гель-электрофорезе. ЗЭ обычно проводят на бумаге, пластинках и гелях в водных буферных растворах.

При электрофорезе в электродных камерах происходит электролиз раствора и вследствие этого – изменение состава буфера. Поэтому электроды располагают так, чтобы они не касались носителя, а контакт между ними осуществляется при помощи полосок фильтровальной бумаги (см. рис. 3.65). Электродная камера разделена на два отсека, которые соединяются дополнительным мостиком из фильтровальной бумаги. Подбирая соответствующий объем электродных камер или перекачивая буфер насосом от анода к катоду, поддерживают постоянными концентрацию и значение рН буфера в двухкамерной системе. Рекомендуются также проводить деполяризацию электродов после каждого электрофоретического разделения.

Материалы-носители

Материалы-носители подразделяются на две группы:

- бумага, целлюлоза, ацетилованная целлюлоза, агароза и материалы для ТСХ (например, силикагель);
- крахмал и полиакриламид.

Эффективность разделения зависит не только от суммарного заряда молекул анализируемых веществ, но и от размеров молекул. Так, вполне возможно, что крупные молекулы с высоким суммарным зарядом могут мигрировать на то же расстояние, что и небольшие молекулы с низким суммарным зарядом. Определяющим параметром является соотношение заряд/масса.

Носители первой группы относительно инертны и слабо влияют на эффективность разделения. Материалы второй группы обладают пористой структурой, что существенно влияет на качество разделения. Поскольку размеры пор соизмеримы с размером макромолекул, то возможно разделение веществ с одинаковыми суммарными зарядами, но различными молекулярными массами (как, например, при ионообменной хроматографии).

Величина рН

Наибольший интерес вызывает разделение амфотерных веществ (например, аминокислот, белков). Амфотерные вещества в кислой среде присоединяют протон и ведут себя как катионы. В щелочной среде они

депротонируются и приобретают свойства анионов. В изоэлектрической точке (рI) они становятся цвиттер-ионами с нулевым суммарным зарядом, т. е. нейтральными молекулами, в которых противоположные заряды пространственно разделены (величина рI является характеристической константой для определенного вида молекул). Суммарный заряд таких веществ зависит от рН среды в широком диапазоне. При электрофорезе они могут менять направление и скорость миграции. Ниже изображен цвиттер-ион с нулевым суммарным зарядом, скорость миграции которого в электрическом поле равна нулю.



На рис. 3.66 представлен график изменения концентрации ионов глицина (0,1 М раствор) в широком диапазоне рН. При рН 2,34 и 9,60 концентрации $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH}$ и $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ или же $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ и $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ соответственно равны. Эти значения рН обозначают как pK_a и соответственно pK_a^1 .

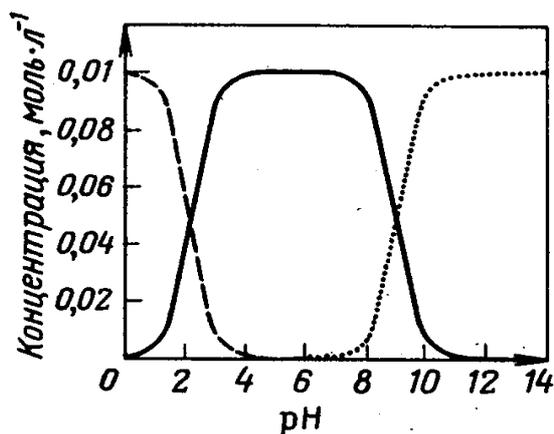


Рис. 3.66. Изменение концентраций в 0,1 М растворе глицина в зависимости от рН среды: $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$ – штриховая линия; $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ – сплошная линия; $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ – точечная линия

Суммарный заряд аминокислот и пептидов ориентировочно оценивают следующим образом:

$pH = 9,5$ – пептид заряжен отрицательно и мигрирует к аноду;

$pH = 3$ – пептид заряжен положительно и мигрирует к катоду;

$3 < pH < 9,5$ – в соответствии со значением pI пептид мигрирует к катоду или аноду. При pH , равном pI , суммарный заряд равен нулю и пептид остается на стартовой линии.

Буферные растворы

Чем выше концентрация буферного электролита, тем меньше электрофоретическая подвижность разделяемых веществ. Это объясняется тем, что электрический ток переносится всеми присутствующими в растворе ионами. Чем выше концентрация буферного электролита, тем большая доля электрического тока переносится его ионами, тем медленнее мигрируют молекулы образца. К тому же следует учесть, что ионы разделяемых веществ окружены противоионами буферного электролита, при увеличении концентрации буфера ионы образца экранируются слоем противоионов и их электрофоретическая подвижность падает.

Электроосмос

Если два материала-носителя, в данном случае целлюлоза и вода, с различными диэлектрическими свойствами вступают в контакт, то относительно друг друга они приобретают заряд. В данном случае молекулы воды заряжены положительно относительно целлюлозы. В электрическом поле молекулы воды медленно мигрируют к катоду, а вместе с ними увлекаются все растворенные вещества. С некоторыми допущениями считают, что все отрицательно заряженные ионы также смещаются к катоду, т. е. движутся в «неправильном» направлении.

При определении абсолютной электрофоретической подвижности вещества вместе с образцом вносят нейтральные соединения, например, мочевины или глюкозу. По завершении электрофореза зону нейтрального соединения принимают за «истинную» стартовую линию. Явление переноса нейтральных веществ в электрическом поле называется электроосмосом.

Приборы

Требования, предъявляемые к источникам питания, зависят от типа электрофореза. Иногда используют источник с регулируемым напряжением до 500 В, но чаще – до 1200 В.

Для достижения оптимального разделения необходимо обеспечить равномерное распределение тепла в носителе (особенно в слое геля при гель-электрофорезе). Это обеспечивается либо эффективным отводом тепла с помощью внешнего теплоносителя, либо применением источника, стабилизируемого по току или по напряжению. В процессе электрофореза меняется сопротивление носителей за счет испарения воды, и сила тока увеличивается. Это влечет за собой еще более интенсивное испарение воды и в случае электрофореза на бумаге приводит к ее пересыханию и обугливанию. При электрофорезе на бумаге или пластинках при напряжении до 300 В перегрева не наблюдается. При высоком напряжении или электрофорезе в геле рекомендуется поддерживать постоянной силу тока и тем самым стабилизировать выделение тепла.

Оформление результатов

В рабочем журнале фиксируют относительную скорость миграции, а также приводят срисованную или сфотографированную пластину, как при тонкослойной хроматографии (см. предыдущие разделы).

Область применения – см. предыдущие разделы.

Гель-электрофорез

Основы метода

Вместо целлюлозы и силикагеля можно использовать мягкие гели. Ниже приведены основные рабочие стадии проведения электрофореза в слое геля (рис. 3.67).

Из множества гелей на практике используют только два – гели агарозы и полиакриламида. Использование агарозы существенно расширяет область применения метода: становится возможным анализ сложных биополимеров, например, ферментных комплексов, липопротеидов, ДНК и РНК. Несмотря на небольшую концентрацию агарозы (не более 0,2%), необходимую для получения крупнопористого

геля, гели агарозы характеризуются» достаточно высокой механической прочностью.

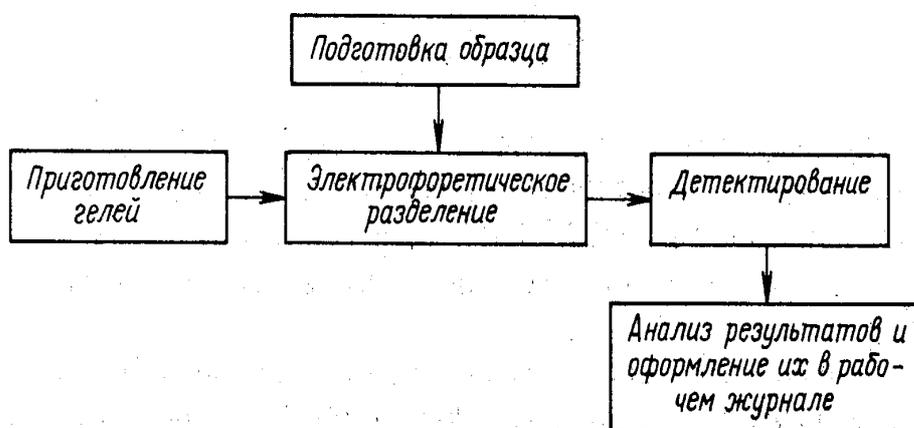


Рис. 3.67. Рабочие стадии проведения электрофореза в геле

Рис. 3.68. Камера для электрофореза в вертикальном блоке геля: 1 – камера; 2 – электроды; 3 – перистальтический насос; 4 – змеевик для подачи теплоносителя (хладоагента); 5 – слой геля между двумя стеклянными пластинками; 6 – изолирующая прокладка; 7 – верхняя электродная камера

В зависимости от способа приготовления геля и типа буферной системы различают несколько вариантов метода:

электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ);
 диск-электрофорез (диск-ПААГ) в прерывистой буферной системе;
 электрофорез в геле полиакриламида в присутствии додецил-
 сульфата натрия (ДСН-ПААГ);
 электрофорез в градиенте пористого полиакриламидного геля.

Электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ)

Этот вариант электрофореза используют для эффективного разделения и идентификации биополимеров (полипептидов, белков, нуклеиновых кислот). Гель формируют в виде блоков или столбиков, которые располагают в электрофоретической камере вертикально (рис. 3.68). В последнее время все большее применение получает электрофорез в блоке, так как в блоке можно проводить непосредственное сопоставление множества образцов.

Диск – электрофорез в ПААГ (диск – ПААГ)

В этом случае гель также формируют в виде блока(пластинки) или столбиков, однако составляют из двух слоев различной пористости – крупнопористого (концентрирующего) и мелкопористого (разделяющего) геля. Формирование геля проводят в две стадии. Вначале деаэрируют и полимеризуют разделяющий гель, затем наслаивают разбавленный раствор мономеров (слой высотой 1 см) с большим значением рН и еще раз полимеризуют. Буфер в электродных камерах по значению рН примерно соответствует рабочему гелю, но содержит более слабую по сравнению с НС1 кислоту (например, глицин).

После нанесения пробы на электроды подают напряжение. При этом все анионы (Cl^-) начинают двигаться к аноду. Ионы глицина мигрируют в слой концентрирующего геля, и раствор в этой области приобретает рН, близкое по значению к его изоэлектрической точке, т. е. ионы глицина практически теряют заряд. Зона, где находится образец, становится почти нейтральной, электропроводность резко падает, возникает высокий градиент напряженности поля, что в свою очередь вызывает ускорение миграции молекул белка.

Скорость миграции ионов хлора намного превышает скорость миграции белков. Вследствие этого дополнительно увеличивается градиент напряженности поля, еще более возрастает скорость миграции молекул белка. Через некоторое время молекулы белка попадают в область высокой концентрации ионов хлора, т. е. в область с небольшим градиентом напряженности поля, и их подвижность резко падает. В итоге белки концентрируются на границе между двумя зонами — иона хлора и иона глицина. Поскольку в рабочем (разделяющем) геле среда более

кислая, равновесие глицин – глицин H^+ сильно сдвинуто вправо, что компенсирует нехватку ионов слабой кислоты. Дальнейшее разделение идет в обычных условиях.

Электрофорез ДСН-ПААГ

Критерием степени очистки белков является наличие одной зоны при электрофорезе в ДСН-ПААГ. При этом белки разделяются строго по молекулярной массе. Предварительно белки в образце денатурируют (растворяют в детергенте). В ходе денатурации молекулы белков приобретают одинаковую вторичную структуру. Наиболее удобным детергентом является додецилсульфат натрия – ДСН. При взаимодействии ДСН с полипептидными цепями образуется комплекс ДСН-белок, характеризующийся постоянным зарядом на единицу молекулярной массы. Этот метод позволяет с достаточной точностью и небольшими затратами определять молекулярную массу белков.

Для облегчения задачи выпускаются разнообразные наборы белков-маркеров с известными молекулярными массами. Стандартную смесь вносят по обе стороны от точки нанесения исследуемого белка. После проведения электрофоретического разделения, по электрофоретической подвижности комплекса путем экстраполяции определяют молекулярную массу исследуемого белка.

Электрофорез в градиенте пористости ПААГ

В первом приближении величина пор в ПААГ зависит от абсолютной концентрации мономеров в рабочем растворе. Градиент пористости геля формируют путем подачи в рабочую камеру раствора мономеров, концентрация которых плавно уменьшается. При этом пористость геля возрастает в направлении снизу вверх (в случае белков – от анода к катоду).

В градиенте ПААГ разделяют вещества по молекулярным массам в области $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^6$ г·моль⁻¹. Электрофоретическая подвижность разделяемых веществ при этом имеет второстепенное значение. Особенно узкие зоны формируются при высоком напряжении, так как в этом случае заряженные вещества под действием высокого поля буквально вдавливаются в мелкопористую сетку геля. Этим самым исключается возможность расширения зон вследствие броуновского движения.

Этот метод применяют для разделения нативных и денатурированных биополимеров. Единственным условием его применения является одноименный заряд разделяемых веществ.

Приборы

Для приготовления геля кроме штатива для фиксации электрофоретической камеры необходимы пластинки или трубочки. Для получения градиентных гелей необходимы также перистальтический насос и градиентный смеситель. Получать гели самостоятельно необязательно, можно пользоваться готовыми пластинками.

Камера для электрофореза

Для проведения электрофореза чаще всего используют вертикальную камеру (рис. 3.68).

Вертикальная камера для электрофореза состоит из следующих деталей:

- нижней электродной камеры (выравнивание температуры в камере проводится за счет принудительной циркуляции жидкости);
- теплообменника из инертного материала;
- верхней камеры (в ней обычно фиксируют верхнюю часть пластинки с рабочим гелем).

Источник питания

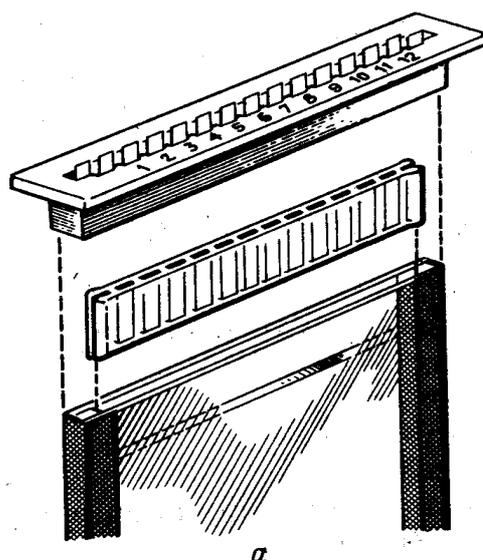
Чаще всего используют источник питания, обеспечивающий напряжение до 500 В и силу тока до 400 мА.

Кювета для окрашивания и обесцвечивания гелей

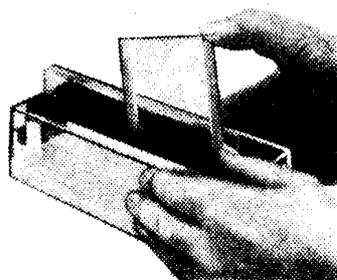
Для обнаружения веществ гель окрашивают соответствующим красителем. Так как молекулы красителя заряжены, гель можно обесцвечивать электрофоретически при 50 В. Вещества выявляются в виде окрашенных пятен в прозрачном геле. Количественную оценку проводят спектрофотометрически при помощи сканирующего денситометра.

Устройство для высушивания гелей

После усадки гелей в водном этаноле или ацетоне их высушивают между двумя листами целлофана в вакууме при слабом нагреве.



а



б

Рис. 3.69. Подготовка камеры для проведения электрофореза в геле: *а* – введение аппликатора в кассету; *б* – закрепление кассеты (слой геля между стеклянными пластинками) в изолирующей прокладке

Подготовка образца

Наилучшие результаты получают в том случае, если образец растворен в рабочем буфере. Для того, чтобы увеличить плотность раствора в образец добавляют 40%-ную сахарозу или глицерин.

Порядок выполнения операций

Нанесение образца

На слой геля в кассете помещают аппликатор и кассету устанавливают в кювету (рис. 3.69).

Как готовый, так и приготовленный самостоятельно гель перед началом работы уравнивают рабочим буфером. С этой целью проводят кратковременный электрофорез (20 мин, 70 В). Образец вносят с помощью пипетки в лунки аппликатора (рис. 3.70).

Проведение электрофореза

Сначала проводят предварительный электрофорез при 70 В в течение 15 – 20 мин до тех пор, пока проба не впитается в гель.

Устанавливают рабочее напряжение. При электрофорезе в градиентном геле продолжительность опыта составляет 15 ч при 150 В.

При проведении ускоренного электрофореза (4 – 5 ч при напряжении до 500 В) буфер охлаждают до 4°C и во время опыта поддерживают температуру 10 °С.

Обнаружение

Извлекают пластинку геля (рис. 3.71), выдерживают 30 мин в 10%-ной сульфосалициловой кислоте и затем в растворе красителя (рис. 3.71, в).

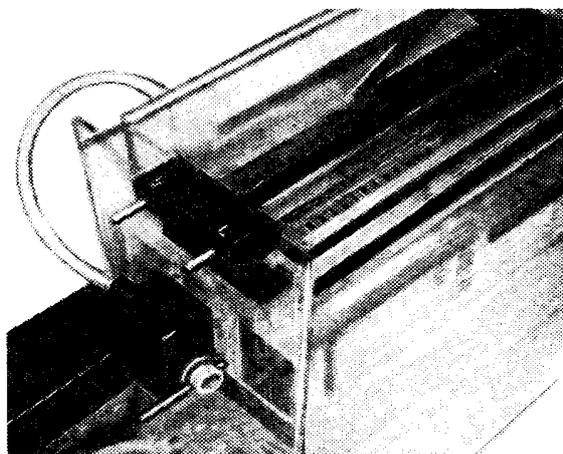


Рис. 3.70. Внесение пробы в лунки аппликатора

Способ окрашивания зависит от природы разделяемых веществ. В большинстве случаев применяют неспецифические реагенты, такие как кумасси голубой, амидовый черный или бромфеноловый синий (0,1 – 0,5%-ный раствор красителя в 7%-ной уксусной кислоте), продолжительность обработки составляет 1 – 2 ч. Белки и нуклеиновые

кислоты проявляют реагентом, содержащим соли серебра. Этот метод в 10 – 20 раз чувствительнее по сравнению с проявлением при помощи кумасси.

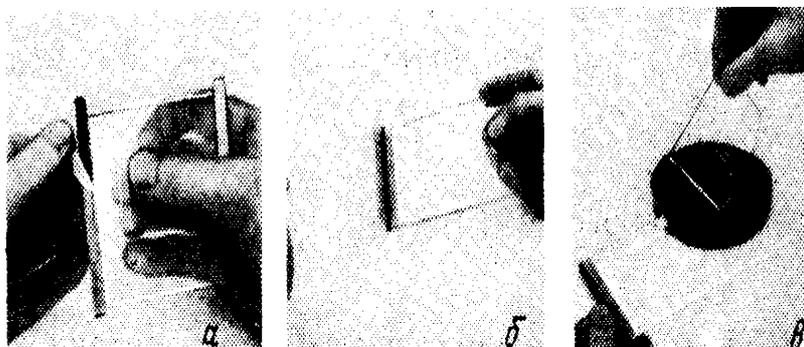


Рис. 3.71. Извлечение слоя геля после завершения электрофореза: *а* – липкую ленту с одной стороны кассеты снимают; *б* – кассету раскрывают и гель отделяют; *в* – блок геля помещают в фиксирующий раствор красителя

Обесцвечивание геля (рис. 3.72). Избыток красителя отмывают растворителем. Обесцвечивание проводят также методом электрофореза в специальной камере (рис. 3.72, б).



Рис. 3.72. Обесцвечивание геля: *а* – пластинку помещают в держатель; *б* – пластинку в держателе помещают в сосуд с обесцвечивающим раствором; *в* – после обесцвечивания фона гель высушивают и хранят в конверте из прозрачной пленки

Консервация

Пластинку геля выдерживают в водном ацетоне или метаноле, а затем высушивают (в вакууме при слабом нагреве) в специальной установке.

Анализ результатов

Количественную оценку пятен проводят с помощью денситометра.

Область применения

Разделение всех классов заряженных веществ, например белков, ферментных комплексов, вирусов, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Определение молекулярных масс биополимеров.

Анализ белков на микроуровне (антигенов при количественном иммуноэлектрофорезе).

Определение молекулярной массы

Молекулярной массой химического соединения называют отношение массы его молекулы к 1/12 части массы изотопа углерода ^{12}C .

Следует различать молекулярную массу M низкомолекулярных соединений и среднечисленную молекулярную массу высокомолекулярных соединений. Полимеры характеризуются среднечисленной M_n и среднемассовой M_m .

Среднечисленная молекулярная масса

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} n_i}$$

где n_i – количество молекул с молекулярной массой M_i . M_i – молекулярная масса молекул i -го типа.

Среднемассовая молекулярная масса

$$M_m = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} m_i M_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} m_i}$$

где

$$m_i = n_i M_i$$

M_n представляет собой среднеарифметическое значение молекулярной массы и равно отношению массы образца к числу всех молекул в нем. M_m является функцией распределения массы образца по составляющим его фракциям макромолекул данного размера. Значения M_n и M_m равны только в том случае, когда полимер состоит из молекул одной молекулярной массы. Если полимер состоит из молекул различных молекулярных масс, то чем шире распределение по молекулярной массе, тем больше разница между M_n и M_m .

Молекулярную массу можно определить достаточно точно (молярную массу до 10^6 г/моль) при помощи различных методов и приборов. При использовании абсолютных методов (в отличие от относительных) не требуется проводить градуировку вследствие наличия прямой зависимости между размерами молекулы и измеряемыми параметрами. Для измерения молекулярной массы веществ в разбавленных растворах используют четыре свойства, которые изменяются с изменением концентрации растворенного вещества: осмотическое давление; давление пара; точка замерзания; точка кипения.

Измерение одной из этих величин позволяет определить концентрацию или при известной концентрации установить количество частиц с одновременным определением молекулярной массы. Указанные величины в основном не зависят от структуры частиц, а являются коллигативными свойствами раствора, т. е. зависят только от числа частиц.

Определение молекулярной массы по плотности пара

Метод определения молекулярной массы по плотности пара при помощи измерения объема применяют не только по отношению к газообразным веществам, но и по отношению к соединениям, переходящим при нагревании в парообразное состояние.

Физические основы метода

Зависимость молекулярной массы M вещества в газообразном состоянии от плотности газа представлена следующим уравнением, полученным из уравнения состояния идеального газа $PV = nRT$

$$M = RTm/(VP),$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – температура; m – масса образца (навеска); V – измеренный объем газа; P – давление.

Среди различных методов определения плотности пара наиболее широко применяют метод В. Мейера. Он основан на том, что молекулярная масса пропорциональна плотности пара. При этом предполагается, что температура и давление газа не изменяются в процессе анализа. В настоящее время для определения молекулярных масс жидких веществ применяют также криоскопический и эбулиоскопический методы.

Приборы

На рис. 3.73 изображена схема прибора, который часто применяют для определения плотности пара. Прибор состоит из сосуда, в котором образуется пар, и колбы с теплоносителем. Температура кипения последнего должна быть значительно выше, чем температура кипения анализируемого образца. Навеску пробы помещают в устройство для ввода пробы, находящееся в расширенной части внутренней трубки холодильника, которое соединено при помощи шлангов с газовой бюреткой и уравнивающим сосудом. Средняя ошибка измерения при работе на этом приборе составляет $\pm 0,3\%$.

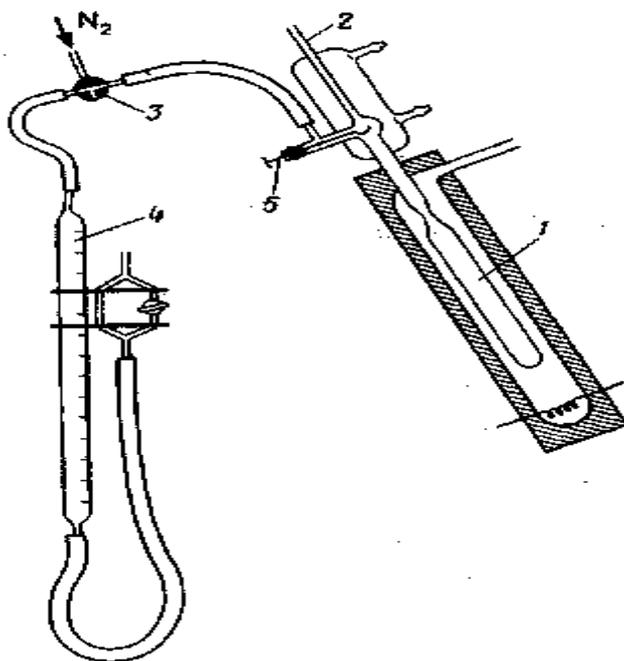


Рис. 3.73. Определение молекулярной массы по плотности пара соединений, находящихся в жидком состоянии при нормальных условиях: 1 – сосуд для образования пара; 2 – охлаждаемая водой трубка для ввода навески образца; 3 – трехдюймовый кран; 4 – газовая бюретка; 5 – устройство для ввода пробы в сосуд

Порядок выполнения операций

Вещество взвешивают в тонкостенной микроампуле с оттянутым капиллярным концом (навеска – около 100 мг).

Прибор нагревают до установления постоянного объема воздуха в системе (после этого сосуд с затворной жидкостью нельзя опускать).

Уравнивают уровни в бюретке и уравнительном сосуде.

Вскрывают острый конец микроампулы, быстро помещают ее во внутреннюю трубку холодильника и быстро закрывают трубку. Более точные результаты получают, применяя более сложный способ ввода ампулы с навеской образца: ампулу заранее вводят в прибор и вскрывают с помощью специального устройства.

После установления постоянного уровня в газовой бюретке и выравнивания уровней в бюретке и уравнительном сосуде производят отсчет результата измерения.

Следует избегать возникновения разности температуры между паром и теплоносителем в колбе, так как это обычно приводит к уменьшению скорости испарения (опасность конденсации).

Область применения

Определение молекулярной массы газообразных веществ и устойчивых в парообразном состоянии жидкостей (точка кипения до 200°C).

Эбулиоскопия и криоскопия

Методы эбулиоскопии и криоскопии основаны на измерении повышения точки кипения и соответственно понижения точки замерзания раствора анализируемого вещества по сравнению с чистым растворителем. Оба явления объясняются понижением давления пара раствора относительно чистого растворителя.

Физические основы метода

Повышение температуры кипения и понижение температуры замерзания растворов зависят от концентрации (так называемые коллигативные эффекты). Для очень разбавленных растворов справедливо следующее уравнение:

$$M_n = KC10^3 / \Delta T,$$

где $K = RT^2 / (10^3 H_p)$; M_n – среднечисленная молекулярная масса; C – концентрация; ΔT – соответственно повышение температуры кипения или понижение температуры замерзания; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура кипения и замерзания растворителя; H_p – удельная теплота испарения растворителя; K – эбулиоскопическая (или криоскопическая) постоянная.

Молярная эбулиоскопическая постоянная K_e (и соответственно криоскопическая постоянная K_k) равна повышению точки кипения и соответственно понижению точки замерзания раствора, содержащего 1 моль вещества ($6,02 \cdot 10^{23}$ недиссоциированных частиц) в 1 кг растворителя. Точки кипения и замерзания наиболее часто применяемых растворителей, а также молярные постоянные приведены в табл. 3.11.

На рис. 3.74 изображены графики изменения температуры при охлаждении раствора и чистого растворителя. Криоскопию чаще применяют для определения молекулярной массы, чем эбулиоскопию, вследствие более высоких значений криоскопических постоянных по сравнению с эбулиоскопическими, а также более простых конструкций приборов для криоскопии.

Т а б л и ц а 3.11

Криоскопические и эбулиоскопические молярные постоянные некоторых растворителей

Растворитель	Температура плавления, °С	Температура кипения, °С	K_k	K_e
			°С (моль·кг) ⁻¹	
Вода	0	100	1,86	0,52
Ледяная уксусная кислота	17	118	3,90	3,07
Диоксан	12	102	4,80	3,45
Хлороформ	–	61	4,98	3,80
Бензол	5	80	5,49	2,64
Фенол	41	181	7,30	3,60
Камфора	179	204	40	6

Концентрацию растворов макромолекул, например растворов биологически активных веществ, характеризуют осмоляльностью или осмолярностью, т. е. отношением количества растворенных частиц к 1 кг воды ($\text{моль} \cdot \text{кг}^{-1}$) или к 1 л раствора ($\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$) соответственно. Несмотря на незначительное различие между обеими величинами, чаще используют осмоляльность, так как в этом случае учитывается уменьшение объема раствора за счет макромолекул.

Приборы

Большинство криоскопических приборов работает следующим образом: образец (около 0,2 мл) помещают в охлаждающую смесь и охлаждают до определенной заранее температуры (на $5 - 7^\circ\text{C}$ ниже точки замерзания). Затем вызывают мгновенную кристаллизацию при помощи быстрого и эффективного перемешивания. На графике зависимости температуры от времени моменту кристаллизации растворителя соответствует плато, а моменту кристаллизации раствора – точка перегиба. Температура, соответствующая точке перегиба, используется при расчетах.

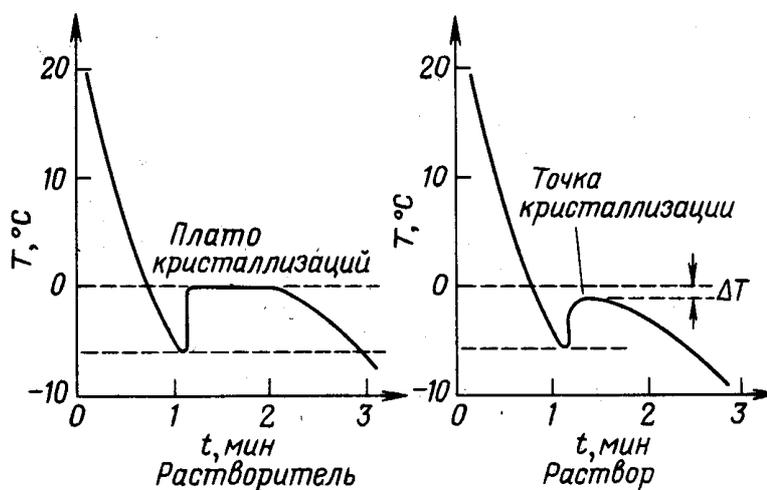


Рис. 3.74. Изменение температуры в зависимости от времени: (для чистых растворителей – характерное плато, для растворов – точка перегиба)

Одним из самых простых криоскопических приборов является аппарат Бекмана и его модификации (рис. 3.75). Прибор состоит из трубки с боковым отводом для введения образца и термометра Бекмана. Термометр с делением $0,01^\circ\text{C}$ позволяет производить отсчет температур с точностью $\pm 0,002^\circ\text{C}$. В настоящее время применяют более чувствительные термометры. Для эбулиоскопических измерений используют аналогичные приборы, но оборудованные обратным холодильником (рис. 3.76).

В последнее время наибольшее распространение получили полностью автоматизированные приборы, позволяющие получить результат измерения в виде цифрового значения или данных на диаграммной ленте в течение 2 мин после начала анализа. Кроме приборов для анализа одной пробы разработаны приборы, обеспечивающие серийный анализ до 50 проб. Такие приборы оборудованы термоэлектрическими холодильными агрегатами с термисторами (температурными зондами). Разрешающая способность таких приборов составляет 0,001 К.

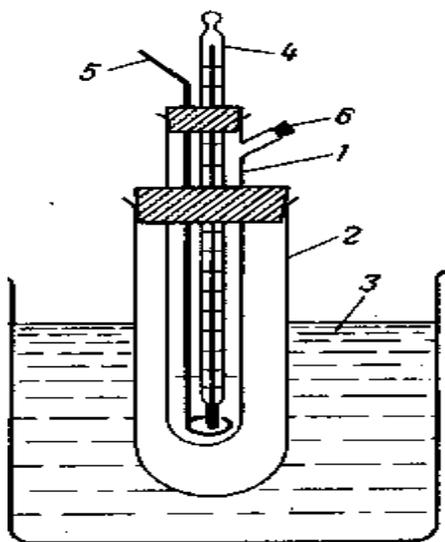


Рис. 3.75. Прибор Бекмана для определения молекулярной массы криоскопическим методом: 1 – пробирка с пробой; 2 – воздушная рубашка; 3 – ледяная баня; 4 – термометр Бекмана; 5 – мешалка; 6 – отвод для пробы

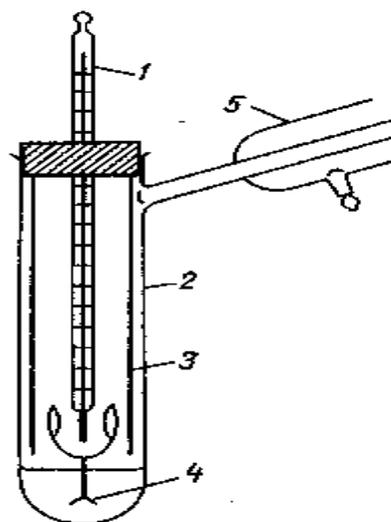


Рис. 3.76. Прибор для определения молекулярной массы эбуллиоскопическим методом: 1 – термометр; 2 – пробирка с пробой; 3 – внутренняя трубка; 4 – насадка для перемешивания; 5 – холодильник

Порядок выполнения операций

Перед проведением анализа прибор калибруют при помощи растворов с известной ступенчато возрастающей концентрацией (калибровочная кривая). Средний объем пробы составляет 0,15–0,3 мл.

Готовят охлаждающую смесь и определяют точку замерзания чистого растворителя с известной криоскопической постоянной.

Расплавляют замерзший растворитель и добавляют взвешенное количество образца.

Определяют точку замерзания раствора и разность обеих точек замерзания.

Микрометод Раста

Метод представляет собой простую модификацию метода, описанного в предыдущем разделе. В качестве растворителя используют камфору (10%-ный раствор образца в камфоре). В связи с высоким значением криоскопической постоянной этого растворителя метод Раста более прост и эффективен по сравнению с другими методами. Для проведения анализа требуется не более 10 мг образца, два капилляра для определения точки плавления и термометр (или аппарат для определения точки плавления). Точность метода составляет $\pm 5\%$. При использовании других растворителей, например дициклопентадиеноксида, достаточно 0,5 мг образца.

Анализ результатов

Среднечисленную молекулярную массу образца рассчитывают, используя измеренные значения концентрации, криоскопической или эбулиоскопической постоянной и разности температур. Для получения более точных результатов анализируют образцы нескольких концентраций, а затем полученные данные экстраполируют к бесконечному разведению ($C = 0$).

Источники ошибок

Наличие летучих веществ и других примесей в образце.

Наличие ассоциации молекул. Рекомендуется: замена растворителя; в эбулиоскопии вероятность ассоциации меньше вследствие более высоких температур.

Необходимость введения поправки на изменение атмосферного давления при эбулиоскопических измерениях.

Оформление результатов

Рассчитанную молекулярную массу обозначают M_n (криоскопическая или эбулиоскопическая, г·моль⁻¹). При определении

концентрации этим методом полученные значения измеряют в тех же самых единицах.

Применение эбулиоскопии и криоскопии позволяет быстро определить молекулярную массу образца (в течение 2 мин) в пределах до 10^4 г·моль⁻¹.

Метод применяют также при анализе легколетучих веществ, молекулярную массу которых нельзя измерить методом паровой осмометрии. Криоскопический анализ проводят в диапазоне температур от -10 °С до 20 °С, эбулиоскопический – в зависимости от возможностей применяемой аппаратуры. В качестве растворителей используют воду и органические растворители (в большинстве случаев – бензол или толуол). Точность определения в зависимости от модификации метода составляет от $\pm 0,5$ до 3%.

Определение концентрации раствора (прежде всего биологически активных соединений).

Определение общей осмоляльности биологически активных соединений (от 0 до 2000 моль/кг).

Определение констант диссоциации и коэффициентов активности.

Определение степени чистоты реагентов.

Осмометрия

Мембранная осмометрия

Если два раствора различных концентраций отделены друг от друга полупроницаемой мембраной, то в результате постепенного перехода растворителя через мембрану в направлении более концентрированного раствора во всей системе через некоторое время концентрация выравнивается. Возникающее при этом давление называют осмотическим, а само явление – мембранной осмометрией.

Физические основы метода

На рис. 3.77 представлена принципиальная схема мембранного осмометра. Движущей силой процесса является различие химических потенциалов растворителя и раствора. Растворитель проникает в раствор до установления равновесной разности уровней Δh . Равновесное гидростатическое давление называют осмотическим.

Зависимость осмотического давления от среднечисленной молекулярной массы M_n описывается уравнением Вант-Гоффа

$$M_n = R T C / \pi,$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; C – концентрация.

Растворы полимеров, даже очень разбавленные, неидеальны. К ним применяют видоизмененное уравнение Вант-Гоффа, учитывающее взаимодействие между молекулами полимера и растворителя

$$\pi / C = R T / M_n + A C + B C^2 + \dots,$$

Третьим и следующим членами уравнения можно пренебречь ввиду их малой величины. Для определения величины $R T / M_n$ и коэффициента A строят кривую зависимости величины π / C от C (рис. 3.78).

Приборы

В настоящее время существуют полностью *автоматизированные приборы*, позволяющие проводить анализ в течение 2 мин и получать данные измерения в виде цифрового значения. *Стандартный прибор* изображен на рис. 3.79. Он состоит из измерительной ячейки с усилителем и термостатом и с блоком электронного управления, что позволяет плавно регулировать температуру от 5 до 130°C. За счет применения емкостной системы измерения давления достигается высокая чувствительность прибора при измерении разности объемов до 1 нл.

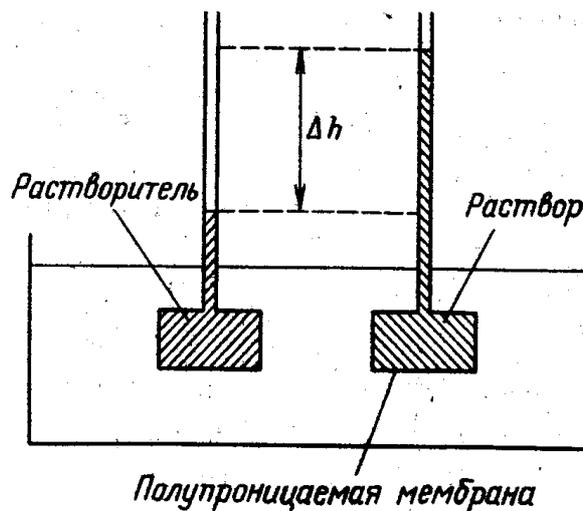


Рис. 3.77. Принципиальная схема мембранного осмометра

Как показано на рис. 3.77, измерительная ячейка разделена полупроницаемой мембраной на две части. При анализе разность давлений регистрируют при помощи металлической мембраны и электронной записывающей системы. Время, необходимое для установления равновесия, составляет от 2 до 15 мин. В качестве мембран используют пленки из целлюлозы и ее производных.

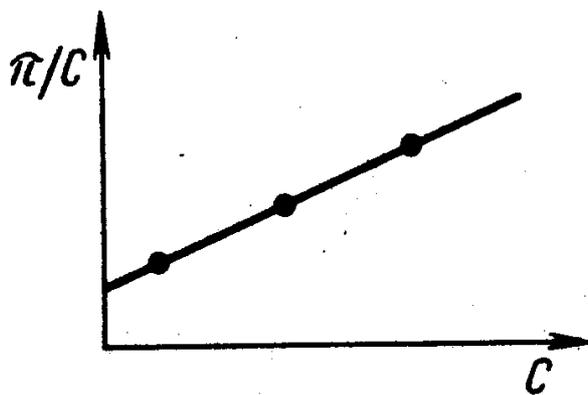


Рис. 3.78. График зависимости π/C

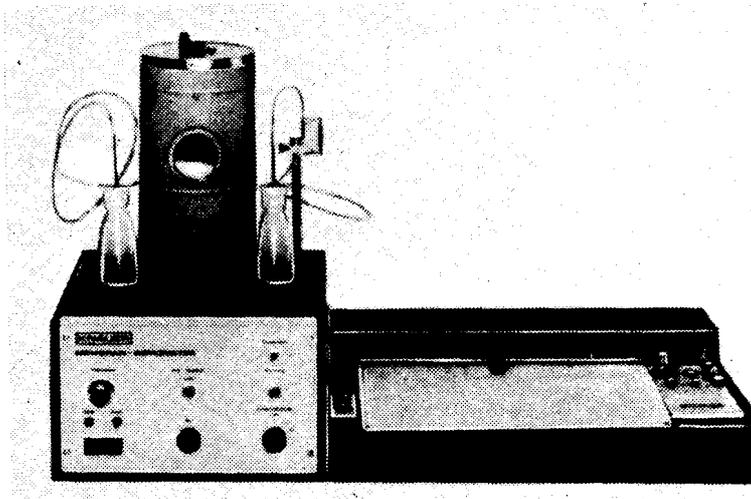


Рис. 3.79. Мембранный осмометр (Fa. Knauer, Bad Homburg v. d. H)

Порядок выполнения операций

Концентрация анализируемого вещества составляет от 0,2 до 2 г/мл. Для заполнения измерительной ячейки достаточно 400 мкл

раствора, однако для получения воспроизводимых данных необходимо около 1,2 мл раствора. Применение специальных вставок позволяет уменьшить объем пробы до 25 – 50 мкл.

Раствор образца при помощи шприца с длинной иглой вносят в специальное отверстие измерительной ячейки. Калибровку проводят с помощью устройства, находящегося в приборе.

При анализе проводят не менее трех измерений при возрастающей концентрации анализируемого вещества (в качестве растворителя используют воду и совместимые с мембраной органические растворители).

Значение давления регистрируется на диаграммной ленте самописца.

Анализ результатов

Полученные значения давления делят на соответствующие значения концентрации раствора и строят график зависимости π/C от C ; полученную прямую экстраполируют к бесконечному разведению ($C = 0$), т. е. прямую продолжают до пересечения с осью ординат. Значение ординаты при $C = 0$ подставляют в уравнение (см. рис. 3.78)

$$M_n = RT/[(\pi/C)d],$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; π/C – значение точки пересечения прямой с осью ординат ($C = 0$) (высота столба растворителя – в см); d – плотность растворителя.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят значения среднечисленной молекулярной массы M_n и указывают метод измерения. Например: $M_n = 45000 \text{ г·моль}^{-1}$ (мембранная осмометрия).

Область применения

Определение молекулярной массы полимеров в области от 10^4 до 10^6 г·моль^{-1} (быстрый и простой метод).

Определение молекулярной массы веществ, растворимых при температуре выше $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Определение осмотического давления в коллоидных растворах (биологических жидкостях).

Вискозиметрия

Вязкость характеризует текучесть веществ и рассматривается как параметр, определяемый формой и размерами молекул. Совокупность методов измерения вязкости жидкостей и газов называется вискозиметрией.

Физические основы метода

Способ определения молекулярной массы методом вискозиметрии основан на измерении увеличения вязкости раствора образца по сравнению с чистым растворителем. Так как вязкость раствора зависит от формы молекул и косвенно от молекулярной массы, то оба параметра можно оценить или определить. Сферические макромолекулы (статистический клубок) характеризуют отношением мольного объема к молекулярной массе, а линейные жесткие молекулы – отношением большой и малой осей молекулы (длина и ширина эллипсоида).

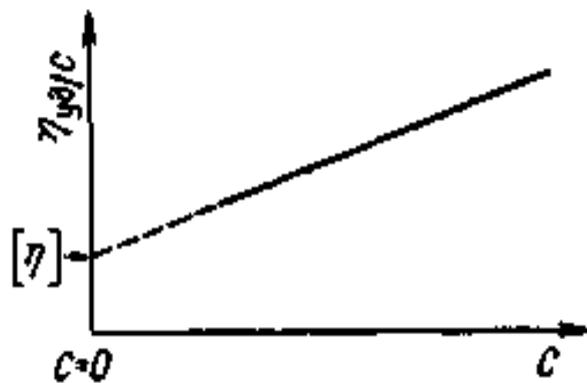


Рис. 3.80. Экспериментальная прямая для определения характеристической вязкости $[\eta]$

Относительная вязкость $\eta_{отн}$ равна отношению вязкостей раствора η и чистого растворителя η_0

$$\eta_{отн.} = \eta / \eta_0$$

Удельная вязкость $\eta_{уд.}$ определяется следующим образом:

$$\eta_{уд.} = (\eta - \eta_0) / \eta_0$$

При возрастании концентрации раствора увеличивается возможность межмолекулярных взаимодействий, что существенно сказывается на величинах $\eta_{уд}$ и $\eta_{отн}$ и приводит к усложнению уравнения, связывающего вязкость с молекулярными параметрами. В связи с этим рекомендуется проводить измерения только сильно разбавленных растворов. Характеристической вязкостью (показатель Штаудингера) $[\eta]$ называют предельное значение $\eta_{уд} / C$ при концентрации раствора, стремящейся к нулю:

Характеристическую вязкость определяют путем графической экстраполяции экспериментальной кривой, построенной на основании данных для нескольких концентраций, к бесконечному разведению (рис. 3.80).

Для расчета вязкости жидкости методом капиллярной вискозиметрии используют закон Гагена – Пуазейля

$$\eta = \pi r^4 P t / (8 l V),$$

где η – вязкость раствора; r – радиус капилляра; P – давление; t – время; l – длина капилляра; V – объем жидкости.

Т а б л и ц а 3.12

Вязкость некоторых веществ при 20°C

Вещества	Диапазон вязкости, мПа·с	Вещества	Диапазон вязкости, мПа·с
Эмульсии	$1 \cdot 10^{13}$	Мыла	$10^8 - 10^{13}$
Жиры	$10 - 10^8$	Термопласты (при 160 °C)	$10^3 - 10^{10}$
Газы	$10^{-2} - 10^{-1}$	Воски	$10^{10} - 10^{13}$
Лаки	$10 - 10^4$	Вода	$10^{-1} - 10$

Следует обращать внимание на конструктивные недостатки приборов, которые могут привести к отклонению от закона Гагена – Пуазейля. При их устранении точность определения вязкости этим

методом достаточно высока. Динамическую вязкость измеряют в единицах Па·с, в большинстве случаев – в мПа·с. Например, вязкость воды при 20°C равна 1,002 мПа·с. Однако часто используют устаревшую единицу – пуаз (1 пуаз = 1 мПа·с). Кинематическую вязкость определяют как отношение динамической вязкости к плотности. Кинематическую вязкость измеряют в устаревших единицах – стоксах (1 стокс = $10^{-5} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$)

Согласно своему вязкостному поведению, жидкости делятся на ньютоновские (вода, растворители, растворы) и не ньютоновские (растворы полимеров, дисперсии, воски, гели). Обе группы могут быть далее подразделены. Значения вязкостей различных веществ представлены в табл. 3.12.

Приборы

В связи с тем, что значение вязкости зависит от температуры, измерение вязкости проводят в условиях термостатирования.

Т а б л и ц а 3.13

Диапазоны значений вязкости и температуры для различных типов вискозиметров

Тип вискозиметра	Диапазон температур, °С	Диапазон вязкости, мПа·с
Капиллярный	-60 – +300	$10^4 - 10^{12}$
С падающим шариком	-20 – +120	$1 - 10^5$
Ротационный	-30 – +300	$10^{-1} - 10^8$

При обычных измерениях поддерживают постоянную температуру с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$. При увеличении температуры на 1°C в области 20°C значение вязкости уменьшается приблизительно на 2%.

В зависимости от принципа измерения различают три типа вискозиметров: капиллярный вискозиметр (течение жидкости через капилляр); вискозиметр, основанный на измерении скорости падающего шарика (движение твердого тела в исследуемой среде); ротационный вискозиметр (вращение тела).

В настоящее время метод падающего шарика практически не применяется. Главным образом используют различные типы капиллярных

и ротационных вискозиметров. Диапазоны измерения вязкости с помощью некоторых приборов приведены в табл. 3.13.

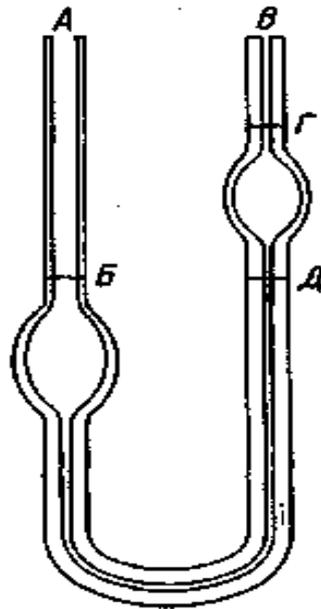


Рис. 3.81. Капиллярный вискозиметр Оствальда

При измерении вязкости с помощью *капиллярных вискозиметров* определяют время истечения равных объемов раствора и растворителя. Наиболее широкое распространение нашел *вискозиметр Оствальда* (рис. 3.81).

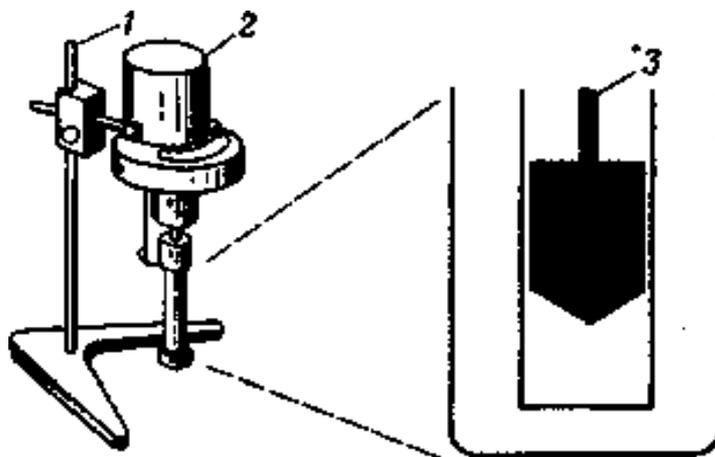


Рис. 3.82. Схема ротационного вискозиметра
1 – штатив; 2 – мотор с регулируемым числом оборотов и унифицированный измерительный узел; 3 – вращающийся цилиндр

Этот простой прибор состоит из вертикального капилляра (длиной 10–20 см, диаметром 0,3 – 0,4 мм) и градуированного шарообразного измерительного сосуда (объемом 1 мл).

Ротационные вискозиметры характеризуются самой сложной конструкцией по сравнению с другими приборами, но при их использовании достигается высокая точность измерения. Исследуемую жидкость помещают между двумя цилиндрами, после чего внутренний цилиндр приводят во вращение (рис. 3.82). В этом случае мерой вязкости является число оборотов или соответственно крутящий момент (касательное напряжение).

Порядок выполнения операций

Измерение вязкости методом капиллярной вискозиметрии при помощи вискозиметра Оствальда проводят следующим образом (концентрация образца составляет 0,1 – 2 г/л):

- анализируемый раствор и растворитель фильтруют или центрифугируют с целью удаления частичек пыли;

- устанавливают требуемую температуру в термостате (например, $35,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$);

- измерения проводят для ряда растворов (от 3 до 5) с различными концентрациями исследуемого вещества (например, 0,25; 0,5; 1,0 и 2,0%-ные растворы);

- левую часть прибора *A* заполняют раствором образца с помощью пипетки и после термостатирования точно устанавливают мениск на уровне *B* (см. рис. 3.81); затем заполняют правую часть прибора через отверстие *B* до установления мениска выше метки *Г*;

- измеряют время истечения жидкости под действием ее собственного веса при прохождении мениска через метки *Д* и *Г* ($\eta \sim t$ и t_0 ; t – время протекания раствора; t_0 – время протекания растворителя).

При необходимости измерения повторяют несколько раз.

Анализ результатов

В связи с тем, что отсутствует прямая зависимость между молекулярной массой и вязкостью, вискозиметры калибруют по соединениям с известной молекулярной массой, определенной при помощи абсолютных методов в одном и том же растворителе. Рассчитывают значения удельной вязкости и строят график в координатах η/C — C . Для полученного в результате экстраполяции предельного значения вязкости справедливо следующее отношение:

$$[\eta] = KM^{\alpha},$$

где K и α – постоянные для данной системы полимер – растворитель при данной температуре (их значения сведены в таблицы, $\alpha = 0,5 - 1,0$).

Источники ошибок

Присутствие пыли в анализируемом образце (засорение капилляра).
 Отклонение от вертикали при закреплении вискозиметра.
 Испарение легколетучего растворителя.
 Свойства полиэлектролитов отличаются от стандартных жидкостей.
 Изменение структуры молекул (ассоциация, дезагрегация).

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят данные о средневязкостной молекулярной массе M_v , в скобках указывают метод определения (капиллярная или ротационная вискозиметрия). Например: $M_v = 8000 \text{ г·моль}^{-1}$ (капиллярная вискозиметрия). В большинстве случаев указывают также температуру измерения.

Область применения

Определение молекулярной массы (M_v).
 Получение предварительных данных о форме и гибкости молекул.
 Контроль процесса полимеризации.
 Оценка степени разветвленности полимеров.
 Контроль качества промышленной продукции (технический показатель).

Другие методы определения молекулярной массы

Большое количество методов определения молекулярной массы связано с тем, что для расчета этой величины можно использовать целый ряд свойств, зависящих от размера молекулы. Однако привести в этой книге подробное описание теории, аппаратуры и оформления результатов всех этих методов не представляется возможным. Поэтому в этом разделе приводится обзор только областей применения и литературных данных наиболее распространенных методов (кроме одного

косвенного метода – молекулярно-ситовой хроматографии, остальные методы являются абсолютными), см. табл. 3.14.

Т а б л и ц а 3.14
Распространенные методы определения молекулярной массы

Методы	Область применения
Ультрацентрифугирование	<p>Определение Z – средних молекулярных масс M_Z и распределение макромолекул по молекулярным массам</p> <p>Определение размеров частиц</p> <p>Тактичность гомополимеров и отдельные структурные параметры сополимеров</p> <p>Сравнение величин $M_n \leq M_Y \leq M_m \leq M_Z$</p>
Светорассеяние	<p>Определение молекулярных масс линейных молекул в области от 10^3 до 10^7 г·моль⁻¹</p> <p>Определение молекулярных масс привитых сополимеров</p> <p>Определение размеров частиц и структуры твердого тела</p> <p>Определение характеристической вязкости</p>
Малоугловое рентгеновское рассеяние	<p>Определение молекулярных масс до 10^5 г·моль⁻¹</p> <p>Преимущественно для определения M_m – до 10^2 г·моль⁻¹</p> <p>Конформационный анализ веществ в области молекулярных масс от 10^2 до 10^4 г·моль</p>
Масс – спектрометрия	<p>Точное определение молекулярных масс</p> <p>Для анализа требуется небольшое количества вещества</p>
Гель – хроматография	<p>Определение молекулярных масс и распределение молекулярных масс полимеров, белков и др. соединений</p>

Глава 4

МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Растительный и животный мир, а также мир микроорганизмов, которые нас окружают, включает огромное разнообразие веществ, многие из которых используются человеком. Наиболее важными являются белки, липиды, сахараиды и нуклеотиды. Практические приемы работы с этими и родственными соединениями являются существенным элементом подготовки технических специалистов.

Связанный азот, аминокислоты и белки

Работа 1. Макро- и микроопределение азота

Опыт 1. Метод Кьельдаля

Вещество, содержащее азот, нагревают с концентрированной серной кислотой в присутствии катализаторов разложения. При этом оно окисляется и разлагается, а азот превращается в аммиак. Раствор после разложения разбавляют водой и после прибавления избытка едкого натра выделившийся аммиак отгоняют в титрованный раствор серной кислоты, избыток которой затем определяют титрованием.

Предложено много модификаций этого метода; ниже приведено описание хорошо зарекомендовавшего себя варианта.

Реактивы (вариант 1). Едкий натр, 40%-ный и 0.2 н. растворы. Метиловый красный, раствор. Оксид ртути. Селен, порошкообразный. Серная кислота, концентрированная и 0,2 н. раствор. Сульфат меди. Сульфат натрия, безводный. Тиосульфат натрия.

Выполнение анализа (вариант 1). Навеску вещества 0,5 – 2 г, в зависимости от содержания азота, переносят в длинногорлую, круглодонную колбу Кьельдаля из иенского стекла емкостью 250 мл и приливают 30 – 50 мл концентрированной серной кислоты. Затем прибавляют 8 г смеси, приготовленной из 50 г порошкообразного селена, 15 г сульфата меди, 70 г окиси ртути и 900 г безводного сульфата натрия. Наклонно поставленную колбу слабо нагревают при частом взбалтывании до тех пор, пока не прекратится первая бурная стадия реакции. Затем нагревание постепенно усиливают до энергичного кипения и кипятят 2 – 3 ч. Так как разложение не всегда можно считать совершенно законченным, даже если содержимое колбы стало прозрачным и бесцветным, то после обесцвечивания продолжают нагревание еще в течение 1 – 2 ч. После охлаждения смывают

серноокислый раствор водой (около 500 мл) в колбу прибора для перегонки емкостью 1 л.

К охлажденному раствору осторожно приливают, не перемешивая, под уровень жидкости, 170 мл 40%-ного раствора едкого натра, в котором растворены 7 г тиосульфата натрия, и тотчас же присоединяют колбу к прибору для отгонки.

Можно также приливать щелочь через капельную воронку в полностью собранный прибор. В приемник наливают, в зависимости от ожидаемого содержания азота, 30 – 50 мл 0,2 н. раствора серной кислоты и прибавляют несколько капель раствора метилового красного. Отгоняют приблизительно 300 – 400 мл дистиллята и прекращают перегонку, когда начинаются сильные толчки. Избыток серной кислоты титруют 0,2 н. раствором едкого натра.

При расчете результатов анализа исходят из того, что 1 мл 0,2 н. раствора серной кислоты соответствует 2,802 мг азота.

Предложено много вариантов этого метода, отличающихся главным образом разными катализаторами (ртуть, оксид ртути, сульфат меди, селен, двуокись селена, хлорокись селена). При отгонке аммиака некоторые исследователи вместо тиосульфата натрия применяют цинк или сульфид калия.

Перегонка в токе воздуха или, лучше, с водяным паром значительно сокращает продолжительность отгонки; поэтому целесообразно применять прибор для перегонки с паром Парнаса и Вагнера (см. рис. 1.37 – 1.38).

Способ Кьельдаля очень удобен и может применяться во всех случаях, когда, при относительно низком содержании азота и высоком содержании углерода необходимо разложить большое количество органического вещества; поэтому он весьма пригоден для определения азота в веществах растительного и животного происхождения.

Необходимо, однако, отметить, что для анализа многих органических соединений этот способ неприменим в любых его вариантах. Не было недостатка в попытках расширить пределы применимости метода введением различных добавок. Но все эти попытки имели лишь частичный успех, так как причины часто получающихся неправильных результатов не ясны.

Слишком низкие результаты определения азота могут быть объяснены тремя приведенными ниже причинами:

Образованием газообразного азота. Это явление наблюдается при разложении соединений, содержащих группы $-\text{NO}_2$ (нитросоединения и органические нитраты), и веществ, содержащих группы $-\text{N}=\text{N}-$ и $>\text{N}-\text{N}<$ (азо-, диазосоединения, гидразины и гетероциклические соединения с расположенными рядом атомами азота). Наблюдалась потеря азота при разложении веществ реакционной смесью, содержащей селен.

Неполным разложением. Некоторые гетероциклические соединения, например пиридин и производные хинолина, особенно устойчивы при

разложении по способу Кьельдаля. Даже образование светлого и прозрачного раствора не является доказательством полноты разложения, и лишь довольно длительное нагревание приводит к цели.

Полное разложение можно считать достигнутым только в том случае, если для двух проб одного и того же вещества, нагревавшихся в течение различных периодов времени, получают одинаковый результат по содержанию азота.

Улетучиванием исследуемого вещества или продуктов разложения, содержащих азот, в процессе разложения. Для устранения ошибки, связанной с образованием азота, было предложено много добавок, большей частью восстановителей, но они улучшили результаты анализа лишь нитро- и азосоединений. Такими добавками являются хлорид олова (II), цинковая пыль, сера, а также фенол, салициловая кислота, сахар и т. п. Для очень трудно разлагающихся веществ применяют окисляющие добавки, например, перманганат калия, дихромат калия, пероксид водорода, диоксид марганца или ванадиевую кислоту.

Наиболее энергичное восстановление происходит при предварительной обработке исследуемого вещества йодистоводородной кислотой, как это было впервые предложено для микроанализа. Ниже описан вариант способа восстановления йодистоводородной кислотой, пригодный для макроанализа.

Реактивы (вариант II). Едкий натр, раствор. Йодистоводородная кислота, плотностью 1,7 г/мл. Селено-ртутно-медный катализатор. Серная кислота, плотностью 1,84 г/мл. Фосфор, красный.

Выполнение анализа (вариант II). Смешивают в колбе Кьельдаля 0,2–0,3 г исследуемого вещества с 0,2 г красного фосфора и 7 мл йодистоводородной кислоты. Колбу нагревают, не вынимая из нее воронки, до кипения йодистоводородной кислоты и поддерживают кипение маленьким пламенем в течение 30 мин.

Прибавляют 30 мл воды и 20 мл серной кислоты и нагревают смесь в открытой колбе, пока не отгоняется йодистоводородная кислота и вода. Прибавляют селено-ртутно-медный катализатор и разлагают вещество полностью при кипячении в течение 2 – 5 ч. Образовавшийся аммиак отгоняют после прибавления избытка раствора едкого натра и определяют, как описано выше.

Некоторые гетероциклические соединения (например, антипирин) и летучие вещества должны быть подвергнуты предварительной обработке йодистоводородной кислотой в запаянной трубке.

Полумикрометод (вариант III). Применяется для определения азота в пробах, содержащих 0,1 – 1,5 мг азота на 1 г или 1 мл пробы.

Реактивы (вариант III). *Смесь для сжигания:* 2 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 г SeO_2 растворяют в смеси 100 мл концентрированной H_2SO_4 и 100 мл дистиллированной воды. *Раствор борной кислоты.* 2,5 г

перекристаллизованной борной кислоты растворяют в 100 мл воды. *Гидроксид натрия, 50% - ный раствор.* 50 г NaOH растворяют в 50 мл воды. *Индикатор для определения конечной точки титрования.* 0,1% растворы метилового красного и метиленового голубого в абсолютном этаноле смешивают в соотношении 10:3; 1 мл смешанного индикатора прибавляют к 100 мл борной кислоты. *Стандартный раствор соляной кислоты.* 0,01 н.

Выполнение анализа. Отбирают аликвотную часть исследуемого раствора (в том случае, если образец жидкий, то его рекомендуется предварительно выпарить до сухого или пастообразного состояния) или взвешенный на аналитических весах исследуемый небольшой образец и переносят эти образцы в колбу Кьельдаля емкостью 30 – 100 мл куда добавляют 3 – 10 мл смеси для сжигания. Колбу с образцами нагревают до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. Содержимое колбы переносят в прибор для микроперегонки по методу Кьельдаля (аналогичный прибору, представленному на рис. 1.36, но только в уменьшенном варианте), используя 5 – 10 мл воды для ополаскивания колбы Кьельдаля. Затем к раствору прибавляют 10 – 15 мл 50%-ного гидроксида натрия и отгоняют аммиак в колбу Эрленмейера емкостью 50 мл, в которую предварительно помещают 15 мл раствора борной кислоты с индикатором.

Дистиллат титруют 0,01 н. соляной кислотой до появления серого окрашивания. Параллельно проводят холостой опыт.

Расчет. а) Содержание азота (а), мг: $a = v \cdot C \cdot 14,0$, где v – объем кислоты, пошедшей на титрование образца (с поправкой на холостой опыт), мл; C – концентрация кислоты.

б) Содержание азота (N); %: $N = (a / b) \cdot 100$, где b – масса образца, мг.

Необходимо отметить, что даже при употреблении йодистоводородной кислоты метод Кьельдаля в отличие от метода Дюма не является универсальным. Он совершенно неприменим для анализа diaзосоединений, которые выделяют элементарный азот в присутствии йодистоводородной кислоты уже на холоду. В таких случаях приводит к цели лишь способ, по которому одновременно улавливают и измеряют также выделяющийся азот. Этот способ приведен при описании полумикрометодов.

Опыт 2. Метод Дюма

Органическое вещество, содержащее азот, сжигают в присутствии окиси меди в атмосфере двуокиси углерода в отсутствие воздуха. Выделившийся азот определяют в азотомере над раствором едкого кали. Окислы азота, образовавшиеся при сожжении, восстанавливают при помощи спирали из медной сетки, помещенной в конце трубки для сожжения. Галогеноводороды, галогены, двуокись серы и пары воды поглощаются раствором едкого кали.

Реактивы и приборы. Диоксид углерода. Гидроксид калия (реактив – едкое кали). Оксид меди (II). Медная проволока. Метанол.

Прибор состоит (рис. 4.1) из аппарата для получения CO_2 , трубки для сожжения и азотометра. Все части прибора соединены при помощи пробок и стеклянных трубок. Для нагревания в основном пользуются электрическими трубчатыми печами. Диоксид углерода получают в аппарате Киппа, а азот собирают в азотомере емкостью 100 мл с делениями 0,1 мл. В азотомер наливают чистую ртуть так, чтобы ее уровень был на 1 см выше места поступления газов, и наполняют его раствором едкого кали (1:1). Этот раствор предварительно фильтруют горячим через фильтр с пористой пластинкой № 4.

Трубка для сожжения изготовлена из тугоплавкого стекла или кварца длиной 100 – 120 см и внутренним диаметром 10—12 мм. Для наполнения трубки применяют зерненный оксид меди. Он представляет собой кусочки окисленной медной проволоки. Применяют два сорта оксида меди: в виде кусочков длиной 5 – 6 мм и более мелких кусочков длиной около 2 мм. Толщина кусочков около 0,6 мм. Оксид меди сохраняют в склянке, закрытой трубкой с натронной известью. Перед употреблением его прокаливают в медном тигле.

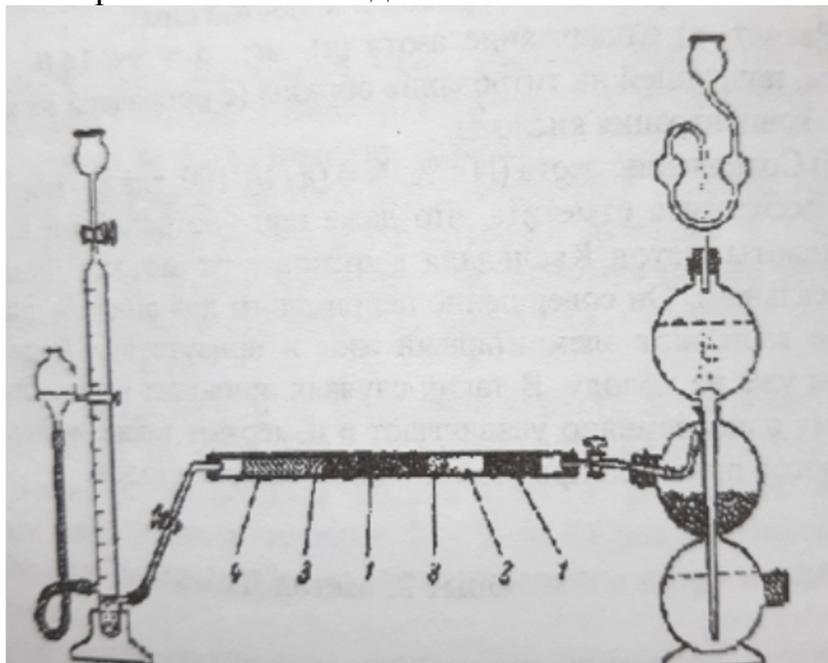


Рис. 4.1 Прибор для макроопределения по методу Дюма:
1 – крупинки оксида меди; 2 – мелкие частицы оксида меди;
3 – спираль из оксида меди; 4 – медная спираль

Спираль из медной сетки длиной 20 см с совершенно блестящей поверхностью готовят, внося накалившую спираль непосредственно из пламени в пробирку, в которой находится 1 мл чистого метилового спирта. Спираль мгновенно восстанавливается парами спирта. Про-

бирку тотчас же закрывают пробкой и после полного охлаждения хранят в эвакуированном эксикаторе над хлоридом кальция.

Окисленные спирали из медной сетки длиной 2 – 5 см, служащие для закрепления контактного слоя, готовят из проволочной сетки (~100 отверстий на 1 см²). Для этого полоску сетки обертывают вокруг медной проволоки толщиной 1,5 мм, согнутой в петельки на обоих концах. Толщину спирали подбирают такую, чтобы восстановленная спираль легко входила в трубку. Спираль окисляют, прокаливая ее в пламени горелки Бунзена.

Наполнение трубки для сожжения начинается с левого конца (см. рис. 4.1) блестящей медной спиралью длиной 20 см, которую по мере надобности вновь восстанавливают; затем следует окисленная медная спираль длиной 2 – 3 см и слой длиной около 30 см крупной окиси меди (для анализа трудно сгорающих и содержащих много серы веществ в этом месте помещают хромат свинца), который также закрепляют отрезком окисленной медной спирали. Перечисленные вещества составляют постоянное наполнение трубки. Сменяемое наполнение, возобновляемое при каждом анализе, состоит из слоя (10 см) мелкой окиси меди, смешанной с веществом, и из слоя крупной окиси меди длиной 15 см.

Целесообразно нагревать трубку двумя отдельными электрическими печами. Постоянное наполнение нагревают при 700°С до равномерного темно-красного каления. При этом в печи находится до 4/5 30-сантиметрового слоя окиси меди и 10 см блестящей медной спирали, часть которой не нагревается, чтобы создавался перепад температуры. Между этой неподвижной печью для накаливания и слоем окиси меди, с которой смешано вещество, остается расстояние в 10 – 12 см. В начале анализа печь для сожжения, нагревающая сменяемое наполнение, должна быть настолько сдвинута вправо, чтобы в ней находилась лишь часть 15-сантиметрового слоя крупного окисла меди. Этим самым предотвращают преждевременное сожжение исследуемого вещества.

Выполнение анализа. Навеску вещества 0,1 – 0,5 г вносят в толстостенную пробирку, смешивают с мелким окислом меди, закрывают гладкой, хорошо подогнанной пробкой и сильно встряхивают. Эту смесь посредством воронки переносят в трубку для сожжения, в которой уже находится постоянное наполнение, и «ополаскивают» пробирку еще 2 – 3 раза мелким окислом меди так, чтобы длина слоя в трубке для сожжения достигала приблизительно 10 см. Затем насыпают слой крупного окисла меди, кладут трубку для сожжения на подставку и соединяют с аппаратом Киппа и азотометром. Открывают краны аппарата Киппа и азотометра и вытесняют из трубки для сожжения воздух СО₂ со скоростью 2 – 3 пузырька в секунду, опустив уровень щелочи в азотометре, и нагревают печь для накаливания. После 15-ми-

нутного вытеснения воздуха азотомер наполняют раствором едкого кали так, чтобы часть его проникла в воронку, после чего кран воронки закрывают и снова пропускают диоксид углерода при опущенном уравнительном баллоне. Если поднимающиеся пузырьки полностью поглощаются и в течение 10 мин в азотомере не собирается измеримого количества газа, то можно начинать сожжение.

Для этого прекращают поступление диоксида углерода, закрывая кран от аппарата Киппа, а кран у азотомера полностью открывают. Когда содержимое трубки нагреется до темно-красного каления, подвижную печь для сожжения помещают в самом начале слоя крупного окисла меди, где не может быть частичек вещества.

В этот первый период нагревания в азотомере вновь появляются пузырьки, которые также не должны составлять измеримого объема газа в приборе. Тем не менее, находящееся под краном азотомера незначительное количество газа вытесняют через воронку, закрывают кран воронки, опускают уравнительный баллон вниз и постепенно надвигают нагретую до темно-красного каления печь для сожжения на смесь вещества с окисью меди. При этом вновь наблюдается появление пузырьков газа в азотомере; скорость сожжения регулируют так, чтобы появлялось не больше 1 – 2 пузырьков в секунду. Конец сожжения можно установить по постепенному прекращению выделения азота.

После окончания сожжения вытесняют находящийся в трубке для сожжения азот умеренным током двуокиси углерода (1 – 2 пузырька в секунду). После того как объем азота не будет увеличиваться в течение нескольких минут, азотомер отключают, а трубку для сожжения охлаждают в токе двуокиси углерода. Уравнительный баллон азотомера укрепляют как можно выше и оставляют в этом положении в течение 30 мин. Затем мениски раствора едкого кали в баллоне и в азотомере приводят к одному уровню и отсчитывают объем азота в азотомере.

Кроме того, отмечают температуру в непосредственной близости от азотомера и показание барометра. Из отсчитанного объема азота вычитают 1%. Содержание азота вычисляют так же, как при микроопределении.

Опыт 3. Определение суммарного азота по методу Слоан – Стенли (микрометод)

Реактивы и материалы. Все растворы для этих определений готовят на бидистилляте или деионизованной дистиллированной воде, которые хранят в бутылках из боросиликатного стекла. *Стандартный раствор сульфата аммония, 0,5 мМ.* 33,04 мг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ растворяют в 500 мл воды; 1 мл этого раствора содержит 14 мкг N. *Хлорная кислота, 72%-ная.* *Фенол (0,6 М) – нитропрурид натрия (1 мМ).* 28,2 г фенола и 130 мг $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5]$ растворяют в 500 мл воды. *Раствор*

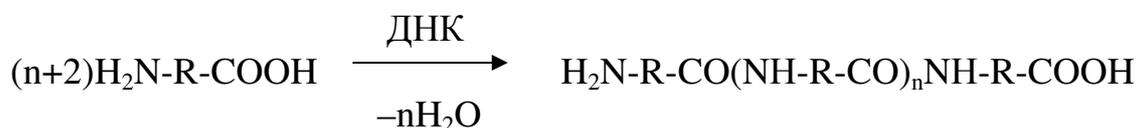
тринатрийфосфата, 0,6 М. 107,5 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 12,0 г NaOH растворяют в 500 мл воды. Раствор хранят в полиэтиленовых бутылках. Гидроксид натрия (0,75 н.) – гипохлорид натрия (0,03М). 15,0 г NaOH и 1,1 г NaOCl растворяют в 500 мл воды. Раствор хранят в полиэтиленовых бутылках.

Выполнение анализа. Аликвотную часть стандартного или исследуемого растворов, содержащую 1 – 14 мкг N, переносят в пробирку размером 13x130 мм (толщина стенок 1,5 мм). Растворитель выпаривают досуха, добавляют 0,05 мл хлорной кислоты и кусочек (3x3 мм) пористого тефлона и нагревают пробирку на электрической плитке в течение 35 – 40 мин так, чтобы кислота слабо кипела и конденсировалась на высоте 5 см от дна. Содержимое пробирки охлаждают до комнатной температуры и при интенсивном перемешивании прибавляют 0,25 мл смеси фенола и нитропрусида натрия, 2,5 мл раствора тринатрийфосфата и 0,3 мл раствора гидроксида натрия и гипохлорита. Пробирку выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин и измеряют поглощение голубого раствора при 635 нм в кюветах с $l = 1$ см. Одновременно определяют поглощение раствора холостого опыта. Калибровочную кривую строят по аликвотным частям стандартного раствора, содержащего 2,8; 7,0 и 14 мкг азота.

Работа 2. Свойства аминокислот, пептидов и белков

Белки являются важнейшими составными частями всех живых организмов. Типичная клетка микроорганизма или млекопитающего содержит около 75 % воды и 10 – 15 % белков различного вида.

Синтез белков в организме происходит из аминокислот, которые имеют общую формулу $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$, где R – алифатический остаток аминокислоты. Сокращенные наименования аминокислот обозначают первыми тремя буквами, например, глицин – Гли или Gly, валин – Вал или Val, треонин – Тре или Thr. Общая схема получения белков, являющихся биополимерами, может быть представлена в виде реакции:



или



Второй вариант записи реакции указывает последовательность соединения аминокислот в белке (первичная структура белка). Индекс n показывает количество аминокислотных остатков в молекуле белка, например в молекуле проинсулина $n = 86$. Молекулы с $n = 2$ называют

дипептидами, $n = 3$ трипептидами, $n < 100$ полипептидами. Среди множества аминокислот существует 20 важнейших аминокислот, из которых построено подавляющее большинство белков. Некоторые аминокислоты, являются незаменимыми, то есть они не образуются в организме, а должны поступать с пищей. К ним относятся валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан, аргинин, тирозин и гистидин.

Наличие среди аминокислот цистеина (Cys), содержащего в R-остатке лабильную $-SH$ группу, приводит к образованию в свернутых молекулах белка (вторичная структура) так называемых дисульфидных $-S-S-$ межмолекулярных и внутримолекулярных связей (фиксация третичной структуры белка). Наличие дисульфидных мостиков играет важнейшую роль в окислительной устойчивости белков и проявлении его биологической активности. Так, в молекуле инсулина содержатся три дисульфидные связи.

Белки и полипептиды выполняют разные функции. Среди них имеются биорегуляторы (гормоны и ферменты), а также белки, используемые в качестве "конструкционного материала" – источника аминокислот для биосинтеза, протекающего в клетке.

Опыт 1. Определение рН растворов аминокислот

Реактивы и материалы: 1%-ные растворы глицина, лизина, аспарагиновой кислоты, рН-метр.

Наливают в стаканчики растворы аминокислот по 10 мл, погружают в раствор электроды рН-метра и проводят измерения значений рН с точностью до сотых долей. После каждого погружения электроды тщательно промывают дистиллированной водой.

Записать в журнал наименования аминокислот и значения рН их растворов, а также привести уравнения диссоциации взятых аминокислот.

Опыт 2. Действие азотистой кислоты на аминокислоты

Реактивы и материалы: свежеприготовленный 7%-ный, раствор нитрита натрия $NaNO_2$, 2%-ный раствор глицина, 7%-ный раствор соляной кислоты.

В пробирку помещают по 0,5 мл раствора глицина и раствора нитрита натрия и добавляют еще 0,5 мл соляной кислоты. После встряхивания пробирки наблюдают выделение газа.

Схема реакции выражается уравнениями





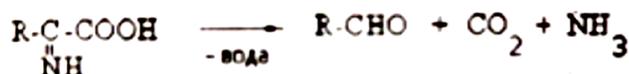
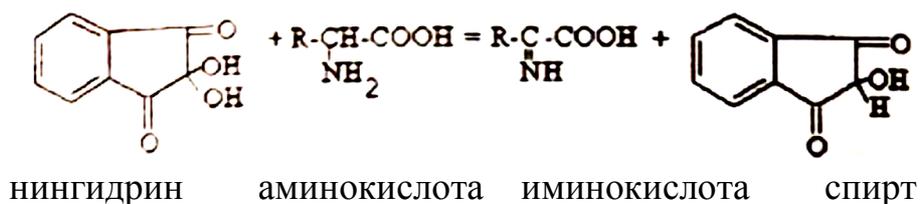
На этой реакции основано количественное определение аминогрупп в аминокислотах, белках и продуктах их распада или гидролиза.

Опыт 3. Нингидриновая реакция аминокислот

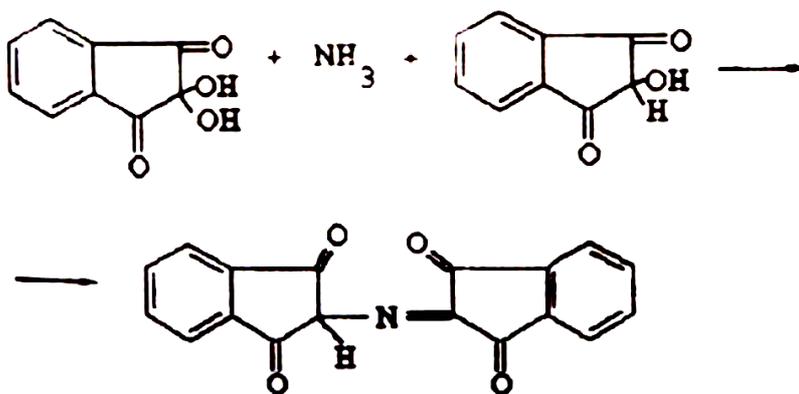
Реактивы и материалы: полоски фильтровальной бумаги, 1 %-ные растворы аминокислот, 0,1%-ный раствор нингидрина в ацетоне (раствор хранить в холодильнике), электрическая плитка.

На полоску фильтровальной бумаги наносят по 1 капле растворов разных альфа-аминокислот и высушивают полоски над электроплиткой. На высохшие места нанесения аминокислот капают по 1 капле раствора нингидрина. Повторное прогревание пятен над плиткой приводит к появлению характерного окрашивания (синее, фиолетовое, желтое и др.).

Реакция протекает по стадиям



Аммиак вступает в реакцию с избытком нингидрина и спирта с образованием окрашенного продукта



Опыт 4. Отношение белков к кислотам и щелочам

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, концентрированная уксусная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

В пробирке к 2 мл раствора яичного белка прибавить по каплям концентрированной CH_3COOH до появления мутного осадка. К полученному мутному раствору добавить по каплям раствор NaOH . При постепенной нейтрализации избытка кислоты наблюдают вновь появление осадка белка и его растворение в избытке щелочи.

Проявляется двойственная природа белка



или



В щелочной
среде

В изоэлектрической
точке

В кислой
среде

Белки являются коллоидными амфотерными электролитами, диссоциирующими в водных растворах по основному или кислотному типу.

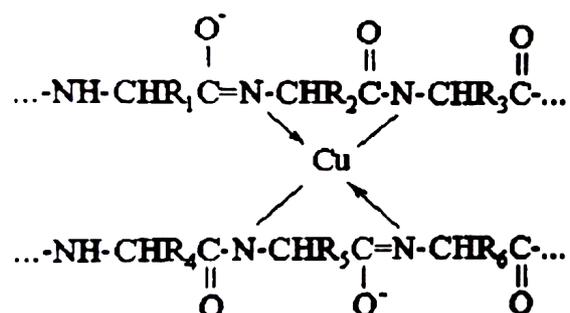
При подкислении раствора кислотная диссоциация белка прекращается. При потере коллоидными частицами заряда они коагулируют и выпадают в осадок. Каждый белок коагулирует при определенной концентрации ионов водорода в растворе, отвечающей его изоэлектрической точке.

Избыток кислоты усиливает диссоциацию белка как основания. Гранулы белка приобретают положительный заряд и коллоидный раствор становится снова устойчивым, то есть наблюдается растворение осадка. Избыток щелочи повышает устойчивость отрицательно заряженных коллоидных частиц белка.

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 1%-ный раствор сульфата меди (II), 30 %-ный раствор NaOH.

В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют равный объем концентрированного 30 %-ного раствора щелочи и 2 капли раствора CuSO_4 . Пробирку встряхивают и наблюдают появление ярко-фиолетовой окраски.

Биуретовая реакция связана с наличием в белках пептидных группировок $-\text{CO}-\text{NH}-$, которые дают окрашенные комплексы с ионами Cu^{2+}



Цвет образующихся медных комплексов определяется числом остатков аминокислот, связанных пептидной связью. Дипептиды дают синюю окраску, трипептиды фиолетовую, а тетрапептиды и более сложные пептиды – красную.

Опыт 6. Высаливание белков из растворов

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, насыщенный раствор сульфата аммония, сульфат аммония кристаллический, воронка с бумажным фильтром.

В пробирку к 3 мл раствора белка добавляют равный объем раствора сульфата аммония. Наблюдают помутнение раствора вследствие коагуляции глобулинов. Отливают 1 мл мутного раствора в другую пробирку и разбавляют большим количеством воды. Что происходит? Можно ли говорить об обратимости процесса высаливания?

Мутный раствор фильтруют через бумажный фильтр. К прозрачному фильтрату добавляют твердый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до прекращения его растворения. Наблюдают помутнение раствора и образование осадка глобулинов.

Высаливание – процесс осаждения белков солями металлов I и II группы. Метод основан на выраженной способности сульфата аммония нейтрализовывать заряд молекул белка и вызывать их дегидратацию (потерю связанной воды). Это обуславливает осаждение белка. Процесс

является обратимым. Разбавление приводит к восстановлению нативной структуры молекулы белка.

Опыт 7. Осаждение и денатурация белка из раствора при добавлении этанола

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 30%-ный раствор NaOH, концентрированный раствор HCl, спирт этиловый ректификат.

В пробирке смешивают 1 мл раствора белка с 1 мл этанола. Наблюдают процесс денатурации белка.

Для проверки, является ли денатурация яичного белка под воздействием этанола обратимым процессом, попробуйте растворить осадок белка в кислоте или щелочи.

Опыт 8. Осаждение и денатурация белка при добавлении солей тяжелых металлов

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 5%-ный раствор сульфата меди (II), 5%-ный раствор ацетата свинца (II).

В пробирках смешивают по 1 мл раствора белка с раствором сульфата меди (II) и ацетата свинца (II). Добавление растворов $\text{Cu}(\text{SO})_4$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ осуществляют по каплям, так как образующиеся осадки комплексов белка с ионами свинца и меди растворимы в избытке добавляемого раствора соли тяжелого металла. Наблюдают процесс денатурации белка.

Подумайте и объясните, почему белки применяют в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

Опыт 9. Денатурация и осаждение белка при нагревании

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 1 %-ный раствор уксусной кислоты, газовая горелка.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора белка. В одну добавляют 2 капли раствора уксусной кислоты. Содержимое пробирок нагревают до кипения.

В одной из пробирок происходит более быстрое помутнение. Разбавить содержимое пробирок водой. Происходит ли растворение осадка? Является ли денатурация белка обратимым процессом?

Контрольные вопросы

1. Что называют белками и какое значение в природе выполняют эти вещества?

2. Чем отличаются различные белки, полученные из разных источников? Назовите основные виды связей в белковой молекуле.

3. Что называют первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурой белков?

4. Объяснить механизм осаждения белков при нагревании, при добавлении кислот, щелочей или органических растворителей.

Работа 3. Определение изоэлектрической точки белка

Белок представляет собой последовательность связанных аминокислотных остатков, то есть полимерную цепь, у которой имеются концевые карбоксильные $-\text{COOH}$ и аминогруппы $-\text{NH}_2$, а также боковые группы дикарбоновых и диаминокислот.

Т а б л и ц а 4.1

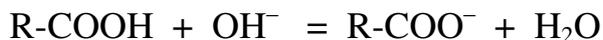
Значения изоэлектрических точек некоторых белков

Название белка	Изоэлектрическая точка (pI)
Пепсин	1,5
Ферритин	4,4
Альбумин яичный	4,6
Тироглобулин	4,7
Сывороточный альбумин из крови	4,8 – 4,9
Уреаза	5,0 – 5,1
Лактоглобулин	5,2 – 5,3
Фибриноген	5,5
Каталаза	5,6
Карбоксипептидаза В	6,0
Гамма-глобулин сыворотки	6,4 – 7,2
Гемоглобин	6,7 – 6,9
Миоглобин лошади	7,0 – 7,3
Миоглобин быка	8,3
Рибонуклеаза	7,8 – 9,6
Химотрипсиноген	9,5
Цитохром С	10,6
Лизоцим	11,0

Молекулы белков обладают положительным или отрицательным зарядом. В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд



в щелочной среде – отрицательный



При определенном значении рН среды сумма положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой, суммарный заряд белка оказывается равным нулю (изоэлектрическое состояние белка). Значение рН, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка (ИЭТ).

Перевод белка в ИЭТ приводит к выпадению белкового осадка из-за неустойчивости молекулы в ИЭТ. Процесс протекает интенсивно в присутствии водоотнимающих органических растворителей (этанола, ацетона и др.) или неорганических веществ (серной кислоты, CaCl_2 , CaSO_4).

Знание значения изоэлектрической точки позволяет в лабораторных и промышленных условиях оптимально осуществлять процесс очистки белков осаждением с минимальными потерями продукта.

Оборудование и реактивы. Химические стаканы и пробирки. Универсальная индикаторная бумага рН 1–14. 0,1%-ный раствор казеина. 0,2 М раствор ацетата натрия. 0,2 М раствор уксусной кислоты.

Ход определения. В шести пробирках готовят буферные смеси с разным значением рН, смешивая указанные в табл. 4.2 количества 0,2 М растворов ацетата натрия и уксусной кислоты.

Т а б л и ц а 4.2

Составы смесей

Номер пробирки	Состав буферной смеси		рН	Степень мутности раствора казеина	
	0,2 М р-р CH_3COOH	0,2 М р-р CH_3COONa		до добавления спирта	после добавления спирта
1	1,9	0,1	3,4		
2	1,8	0,2	3,8		
3	1,4	0,6	4,4		
4	1,0	1,0	4,7		
5	0,6	1,4	5,1		
6	0,2	1,8	5,7		

В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного раствора казеина и встряхивают содержимое. Отмечают помутнение раствора. В каждую пробирку добавляют по 2 мл этилового спирта, отмечая мутность в пробирке до и после добавления спирта. Степень мутности оценивают

приблизительно по пятибальной шкале: 1 – отсутствие помутнения, 2 – слабое, 3 – умеренное, 4 – сильное, 5 – очень сильное или по шкале стандартов.

Построить график зависимости мутности от величины рН раствора. Отметить, при каком значении рН наблюдается минимальная растворимость казеина и сравнить полученное значение с ИЭТ других белков.

Контрольные вопросы

1. Что называют изоэлектрической точкой белка?
2. Почему у разных белков наблюдается разное значение изоэлектрической точки?
3. Назвать ионизирующиеся группы, характерные для белков.

Работа 4. Полный гидролиз простых белков

Гидролизом белков называют процесс распада белковых молекул на составные части, то есть на пептиды и аминокислоты. Различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. Ферментативный гидролиз осуществляют в присутствии ферментов. Этот процесс приводит, как правило, к незначительному разрушению молекулы белка: происходит разрыв полипептидной связи по определенному положению с высвобождением нескольких полипептидов, либо происходит одновременный распад молекулы белка на пептиды и аминокислоты.

При полном кислотном гидролизе конечными продуктами являются аминокислоты. Часть получаемых аминокислот при этом разрушается: триптофан полностью, а серин, треонин, цистин и фенилаланин – частично.

Щелочной гидролиз приводит к разрушению большинства аминокислот, а триптофан сохраняется.

Процессы гидролиза белков постоянно протекают в живом организме и являются составной частью метаболизма. В лабораторных условиях гидролиз используют для изучения состава и структуры белка. В промышленности белковые гидролизаты выпускаются для пищевых и медицинских целей.

Опыт 1. Полный кислотный гидролиз белка

Реактивы и материалы: запаиваемые ампулы или пробирки с пробками для гидролиза, шкаф-термостат с постоянной температурой 110° или 150°, баллон с инертным газом (азот, аргон), кон-

центрированный раствор HCl, 11,2 М, х.ч. или о.с.ч., 2 мг сухого белка или раствор белка с концентрацией 4 мг/мл.

В пробирку (не более чем на 1/3 объема) заливают раствор белка или засыпают сухую навеску белка, взятую на аналитических весах. Добавляют концентрированный раствор HCl, исходя из оптимального соотношения между количеством кислоты и белка, равного 100:1. Для трудно гидролизуемых белков избыток кислоты может составлять 1000:1.

Например, если берут сухую навеску белка, то добавляют 0,5 мл дистиллированной воды (или специального буфера для растворения белка) и 0,5 мл концентрированного раствора HCl, то есть получают 5,6 М раствор HCl, в котором содержится 194,5 г HCl/л. При соотношении 100:1 концентрация белка, взятого на гидролиз, должна составлять 2 мг/мл.

Через полученный раствор пропускают при небольшом токе пузырьков инертный газ для удаления следов кислорода. Остаточный кислород может приводить к окислению аминокислот в ходе гидролиза. Дегазирование можно провести, замораживая ампулу в жидком азоте или смеси сухого льда с ацетоном и последующим вакуумированием в атмосфере аргона.

Замороженную ампулу запаивают на газовой горелке. При маленьком коэффициенте заполнения ампулу можно осторожно запаять без замораживания.

Ампулу помещают в термостат и проводят гидролиз при температуре 110° в течение 24 ч (стандартные условия гидролиза) или при температуре 150° в течение 6 ч (ускоренный гидролиз).

По окончании гидролиза ампулу вскрывают, кислоту нейтрализуют и проводят анализ состава гидролизата методом тонкослойной хроматографии, анализом на аминокислотном анализаторе или формальным титрованием.

Опыт 2. Аминокислотный анализ гидролизата белка с использованием автоматического аминокислотного анализатора

Оборудование и реактивы. Анализатор аминокислот типа LC3000 с компьютером фирмы «Eppendorf-Biotronic» (Германия) или другой прибор подобного класса с автоматическим термостатируемым устройством ввода пробы и баллоном со сжатым He или N₂ квалификации «ОСЧ для хроматографии». Пластиковые пробирки для проб вместимостью 0,5 мл. Устройство в виде фильтра «in line», надеваемого на шприц, или воронка с колбой для вакуумного фильтрования растворов через фторопластовый фильтр с номинальным размером пор 0,22 мкм производства Millipore (США). Автоматические пипетки на 10–1000 мкл для разбавления проб. рН-метр с точностью определения ±0,001 единицы рН при рН 1–14. Установка для кислотного гидролиза белков, представляющая собой

термостат на 120°C, в который помещают запаиваемые на газовой горелке стеклянные ампулы или толстостенные пробирки «Pirax» (США) с плотно завинчивающимися тефлоновыми пробками, удерживающими давление паров HCl. Аналитические весы типа «Sartorius» (Германия) с точностью взвешивания $\pm 0,00001$ г. Устройство для заполнения ампул инертным газом, представляющее собой баллон с Ar с редуктором и барбатажной трубкой или то же с устройством для вакуумирования и заполнения Ar замороженных при -70°C ампул. Роторный испаритель типа Rotavapor R-144, «Buchі» (Швейцария) с вакуумным насосом для отгонки водных растворов HCl. Центрифуга 8000 G. Измельчитель белковых проб, ступка, стаканы, колбы, пробирки.

Этиловый спирт, хлороформ, соляная кислота 6 M раствор и концентрированная, о-фосфорная кислота, вода бидистиллированная (безаминокислотная для хроматографии), цитрат натрия, тиодигликоль, каприловая кислота, трихлоруксусная кислота, ацетат натрия, метанол, муравьиная кислота, уксусная кислота, борная кислота, этилендиаминтетраацетата динатриевая соль, гидроксид натрия, вода для ВЭЖХ, нингидрин, гидридантингидрат, метилцеллозольв. Все реактивы только квалификации «х.ч.», «осч» или «для хроматографии». Стандартный раствор аминокислот, содержащий по 2,5 мкМоль/мл ASP, THR, GLU, PRO, GLY, ALA, CYS, VAL, MET, ILEU, LEU, TYR, PHE, HIS, LYS и ARG.

Выполнение работы. Анализ содержания аминокислот выполняют на аминокислотном анализаторе типа LC 3000 фирмы "Eppendorf-Biotronic" (Германия). Для разделения аминокислот используют буферную систему в соответствии с нормативной документацией, приложенной к анализатору. pH буферных растворов устанавливают с помощью ортофосфорной кислоты и гидроокиси натрия, растворы перед введением в анализатор подвергают фильтрованию через фторопластовый фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Принцип определения аминокислот заключается в следующем. 20 мкл анализируемой пробы помещают в пластиковый сосуд, который устанавливают в поворачивающийся штатив автоматического термостатированного инжектора. Закол пробы осуществляется в соответствии с программой после промывки и регенерации хроматографической колонки, имеющей температуру 47°C и заполненной ионообменником, катионитом марки ВТХ-С с карбоксильными ионогенными группами в Na^+ -форме. Подача элюента осуществляется по капиллярным шлангам высокого давления с внутренним диаметром 0,2 мм. Разделение аминокислот осуществляется автоматически в соответствии с заданной программой. После разделительной колонки раствор поступает в термостатированный реактор для проведения цветной реакции. Подача в реактор нингидринового раствора, содержащего: 15 г/л

нингидрина, 0,55 г/л гидридантингидрата, 1 % метилцеллозоля, 10 % метанола в 0,1М ацетатном буфере рН 4,8 , позволяет при температуре реактора 125°C осуществлять цветную реакцию анализируемых и прошедших аминокислот с нингидрином. Далее окрашенный раствор с комплексом аминокислот с нингидрином подается насосом в УФ детектор. Запись хроматограмм, после введения в хроматограф автосамплером или микрошприцем 20 мкл пробы осуществляют автоматически в соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора. Регистрацию аминокислот, связанных в комплексе с нингидрином, осуществляют автоматически при 570 нм, пролин и оксипролин анализируют соответственно при 440 нм.

Работа анализатора выполняется по программе, предусматривающей ступенчатое изменение вида буфера и температуры хроматографической колонки на каждой стадии. Стандартное время анализа от момента ввода пробы до завершения выхода последнего пика, соответствующего аргинину, составляет 50 минут при скорости подачи элюента 0,22 мл/мин. Основные параметры программы анализа аминокислот задаются автоматически в соответствии с инструкцией к анализатору.

Используемый метод позволяет определять с точностью $\pm (5-10) \%$ наличие до 17 аминокислот с минимальным уровнем их содержания в растворе ($0,500 \pm 0,006$) мкмоль/мл. Минимальный интервал надежного определения сигнала аминокислот, составляющий > 200 мВ, получают для концентрации $> 0,3$ мкг/мл взятого на анализ белка в пробе.

Полный аминокислотный состав белков определяют в гидролизате, полученном по стандартной методике обработкой 6 М раствором HCl при температуре 120 °С в течение 24 ч в токе Ar с последующей троекратной отгонкой летучих компонентов досуха и окончательным растворением пробы в буфере с рН 2,2, содержащем: цитрата натрия 9,8 г, концентрированной HCl 8,3 мл, тиодигликоля 1 мл и каприловой кислоты 50 мкл на литр.

Свободные аминокислоты определяют в продукте после его обработки добавлением 10 % об. трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, нейтрализацией до рН 2, фильтрацией через мембранный фильтр типа Миллипор с номинальным диаметром пор 0,22 мкм с последующим разбавлением фильтрата в буфере для растворения проб рН 2,2.

Количественную оценку содержания отдельных аминокислот проводят путем сравнения площадей пиков на аминокислотной хроматограмме, рассчитанных с помощью интегрирующих систем, например Winpeak фирмы "Eppendorf-Biotronic" (Германия) или другой аналогичного уровня, с площадями пиков, полученных при анализе стандартной смеси аминокислот, содержащей например 2,5 мкмоль каждой аминокислоты в 1 мл раствора (рис. 4.2).

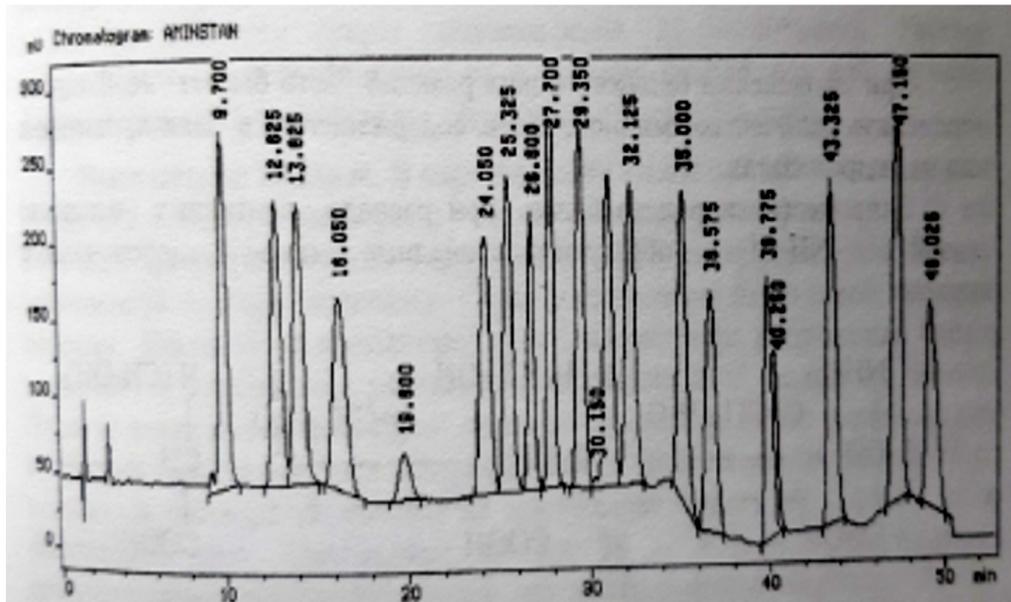


Рис. 4.2. Хроматограмма смеси стандартов аминокислот

Содержание аминокислоты (X) в мкМ/мл (или в мг/мл, %, условных машинных единицах или мм по высоте пиков в соответствии с заданной автоматической программой компьютерного обсчета хроматограмм) осуществляют автоматически по формуле

$$X = S_1/S_2 \cdot C,$$

где S_1 – площадь пика определяемой аминокислоты на аミノграмме; S_2 – площадь пика той же аминокислоты в стандартной смеси; C – концентрация аминокислоты в стандартной смеси, мкМ/мл.

Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

Контрольные вопросы

1. Что называют аминокислотным составом белка?
2. Какое значение имеют данные по аминокислотному составу?
3. Что такое "химический скор" белка?
4. Почему в ряде случаев мы говорим о неполноценном питании, в частности о несбалансированном по аминокислотному составу продуктах?

Работа 5. Определение содержания азота свободных аминогрупп (аминного азота)

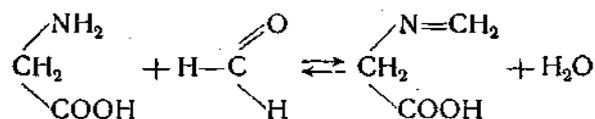
При проведении биохимических реакций часто бывает необходимо определить количество аминного азота, содержащегося в белках, пептидах или их гидролизатах.

В процессе гидролиза белка при распаде пептидных (амидных) связей $-\text{NH}-\text{CO}-$ образуются свободные амино- и карбоксильные группы.



Опыт 1. Формольное титрование по методу Зеренсена

Метод титрования по Зеренсену основан на том, что при прибавлении нейтрального формальдегида к раствору аминокислоты аминогруппа связывается и образует с формальдегидом метиленовое соединение, после чего карбоксильная группа титруется так же, как в молекуле обычной карбоновой кислоты



Реакция обратима, равновесие устанавливается в зависимости от концентрации исходных веществ.

Зеренсену удалось провести реакцию количественно путем создания соответствующей концентрации ионов гидроксила, обеспечивающей полный сдвиг равновесия вправо. Это имеет место при рН 9,0 – 9,5.

При этих значениях рН наиболее подходящими индикаторами являются фенолфталеин, в присутствии которого титруют до появления красной окраски, или тимоловый синий.

Реактивы. *Гидроксид бария*, насыщенный раствор и 0,2 н. раствор. *Едкий натр*, 0,2 н. раствор. *Лакмусовая бумага*. *Соляная кислота*, 0,2 н. раствор. *Фенолфталеин или тимоловый синий*. Растворяют 0,5 г индикатора в 100 мл 95%-ного спирта. *Формальдегид*, 30 – 40%-ный. Раствор нейтрализуют по фенолфталеину до появления слабой розовой окраски. *Хлорид бария*, 20%-ный раствор. *Этиловый спирт*, 95%-ный.

Выполнение анализа. В мерную колбу емкостью 100 мл помещают 50 мл исследуемого раствора, 1 – 2 мл раствора фенолфталеина, 10 мл 20%-ного раствора хлорида бария, после чего осторожно прибавляют насыщенный раствор гидроксида бария до появления отчетливой красной окраски. После этого прибавляют еще 5 мл раствора гидроксида бария (избыток) и разбавляют раствор дистиллированной водой до метки. Через 15 мин раствор фильтруют через сухой фильтр. 50 мл окрашенного в красный цвет фильтрата возможно точно нейтрализуют до тех пор, пока капля раствора, нанесенная на лакмусовую бумагу, не окрасит ее в фиолетовый цвет. Прибавляют 20 мл 30 – 40%-ного формалина, предварительно нейтрализованного до слабо-розовой окраски. Затем титруют раствор 0,2 н. раствором едкого натра, не содержащим карбонатов, до появления окраски, соответствующей окраске раствора-свидетеля. По достижении этой окраски прибавляют еще несколько миллилитров раствора щелочи и столько же 0,2 н. раствора соляной кислоты, чтобы окраска раствора стала немного более слабой, чем окраска раствора-свидетеля. Наконец, опять прибавляют 0,2 н. раствор щелочи до повторного увеличения интенсивности окраски до интенсивности окраски раствора-свидетеля.

Для приготовления *раствора-свидетеля* смешивают в колбе для титрования 50 мл свежепрокипяченной воды и 20 мл раствора формальдегида. Приливают 5 мл 0,2 н. раствора едкого натра, 1 – 2 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,2 н. раствором соляной кислоты до слабо-розовой окраски. Затем прибавляют еще 3 капли раствора едкого натра до появления интенсивной красной окраски.

Разность между общим расходом щелочи и общим расходом кислоты в миллилитрах соответствует содержанию карбоксильных групп (1 мл = 0,0090 г карбоксильных групп) или связанного формальдегидом азота (1 мл = 0,0023 г азота).

Если исследуемое вещество содержит аммиак, его надо предварительно определить обычным способом, например перегонкой в присутствии оксида магния, и вычесть количество азота, соответствующее его содержанию, из найденного количества азота, связанного с формальдегидом.

Формольным титрованием можно определить также аминокислоты, содержащие аминогруппы не только в α -положении, а также метиламинокислоты. Пониженные результаты получаются, если метиленаминосое-

динения, образующиеся после прибавления формальдегида, имеют очень, слабо выраженные кислотные свойства и диссоциируют при концентрации ионов водорода, меньшей, чем концентрация ионов водорода, соответствующая изменению окраски индикатора. Результаты анализа оказываются завышенными, если аминокислоты содержат также другие кислотные группы. Мочевина и гуанидин после прибавления формальдегида имеют нейтральную реакцию. Аргинин титруется, как одноосновная кислота.

Формольное титрование может быть также проведено и электрометрическим методом с помощью рН-метра или иономера (опыт б).

Опыт 2. Титрование в среде спирта

Титрование аминокислот в среде спирта обладает тем преимуществом по сравнению с формольным титрованием, что оно осуществляется быстрее, проще и дает более точные результаты. При этом переходы окрасок индикаторов (фенолфталеина и тимолфталеина) более отчетливы. Пользуясь растворами-свидетелями, можно анализировать также слабоокрашенные растворы.

Этот способ позволяет определять титрованием пептиды в присутствии аминокислот при исследованиях процесса энзиматического расщепления, так как влияние аминокислот в разных веществах может подавляться при разных концентрациях спирта. Пептиды титруются в присутствии фенолфталеина уже в 50%-ном спирте, а в присутствии тимолфталеина – при еще меньшей концентрации спирта, тогда как аминокислоты алифатического ряда и аммонийные соли титруются только при значительно более высоких концентрациях спирта. При применении фенолфталеина конечная концентрация этилового спирта должна быть приблизительно равна 97%, а при титровании в присутствии тимолфталеина – приблизительно 90%. Этиловый спирт можно заменить пропиловым, но не метиловым. В среде 50%-ного этилового спирта и в присутствии фенолфталеина в большинстве биологически важных аминокислот удастся оттитровать всего около 28% карбоксильной группы.

При титровании фенилаланина и тирозина в этих условиях удастся определить от 60 до 70% карбоксильной группы. Для определения содержания пептидов и аминокислот в их смеси сначала титруют в среде 97%-ного спирта в присутствии фенолфталеина или в среде 90%-ного спирта в присутствии тимолфталеина (б). Затем в другой пробе в среде 50%-ного спирта в присутствии фенолфталеина титруют пептиды и часть аминокислот (а).

Относительное содержание аминокислот (x) вычисляют по следующей формуле

$$x = 100(b - a) / 100 - 28 .$$

Реактивы: *Гидроксид калия*, 1 н. или 0,2 н. спиртовой раствор. *Тимолфталейн*, 1%-ный спиртовой раствор. *Этиловый спирт*, абсолютный.

Выполнение анализа. Для определения аминокислот, выделенных из продуктов гидролиза белков, или синтетических аминокислот 0,1 – 0,2 г исследуемого вещества растворяют в 1 мл воды, прибавляют 9-кратный объем абсолютного спирта, 10 капель 1%-ного спиртового раствора тимолфталейна и титруют 0,2 н. или 1 н. спиртовым раствором гидроксида калия до появления слабой, но отчетливой синей окраски. Для получения точных результатов надо учитывать расход щелочи на титрование такой же смеси спирта и воды (контрольный опыт).

Опыт 3. Определение карбоксильных групп при помощи нингидрина

Реакция протекает количественно. Ее используют для определения карбоксильной группы в α -аминокислотах. При взаимодействии с нингидрином все аминокислоты выделяют 1 молекулу диоксида углерода, кроме аспарагиновой кислоты, при взаимодействии с которой сначала образуется полуальдегид малоновой кислоты и затем выделяется 2 молекулы CO_2 . Количество диоксида углерода, образующейся в слабокислой среде, можно определить манометрическим способом или титрованием.

Реактивы. *Гидроксид бария*, 0,25 н. или 0,125 н. раствор, содержащий 2% хлорида бария. *Нингидрин*. *Октиловый спирт*. *Соляная кислота*, 0,02 н. раствор. *Цитратный буферный раствор*, рН 2,5 или 4,7.

Выполнение анализа. Реакцию проводят в приборе, изображенном на рис. 4.3, состоящем из двух конических колб емкостью 25 мл, соединенных U-образной трубкой, патрубком которой присоединяют к вакуум-насосу. В колбу вносят 2 – 5 мл исследуемого раствора, прибавляют цитратный буферный раствор, имеющий рН 2,5 или 4,7, и несколько капель вещества, разрушающего пену (например, октилового спирта).

Смесь кипятят для удаления CO_2 из колбы 1. Затем колбу 2 продувают воздухом, не содержащим CO_2 , прибавляют в нее 1 – 3 мл 0,25 н. или 0,125 н. раствора гидроксида бария, содержащего 2% хлорида бария. В колбу 1 прибавляют нингидрин, тотчас же соединяют ее с колбой 2, прибор эвакуируют и погружают на 10 мин в кипящую водяную баню.

Затем колбу 2 охлаждают холодной водой и в течение 2 мин встряхивают прибор для полного поглощения двуокиси углерода, после чего охлаждают весь прибор, выравнивают давление, впуская в него воздух, не содержащий двуокиси углерода, и титруют не вошедшую в реакцию гидроокись бария 0,02 н. раствором соляной кислоты.

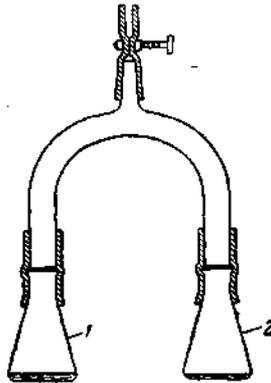


Рис. 4.3 Прибор для определения карбоксильных групп: 1 – реакционная колба; 2 – приемник.

Опыт 4. Определение α -аминокислот в виде комплексных соединений меди и нингидрина

Свежеосажденный гидроксид меди образует с аминокислотами растворимые медные комплексные соединения, которые после фильтрования можно количественно определить колориметрически с дитизоном или иодометрическим титрованием. Для улучшения растворения прибавляют 10%-ный раствор бикарбоната. Из гистидина получается комплексное соединение, состоящее из трех молекул гистидина и двух атомов меди. Все остальные аминокислоты переходят в раствор, образуя комплексные соединения, содержащие 0,5 атома меди на 1 молекулу аминокислоты. Позднее гидроксид меди был заменен нерастворимым фосфатом меди, который добавляли к исследуемой пробе в среде слабощелочного боратного буферного раствора.

Этот способ может быть использован для хроматографического определения ультрамикрочисел аминокислот на фильтровальной бумаге методом, разработанным Виландом.

Определение аминного азота при помощи нингидрина

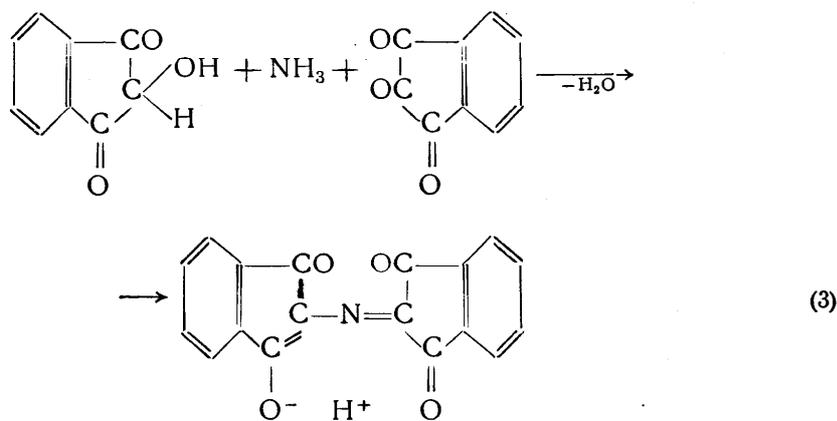
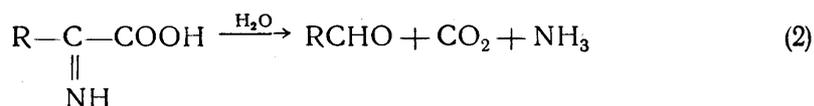
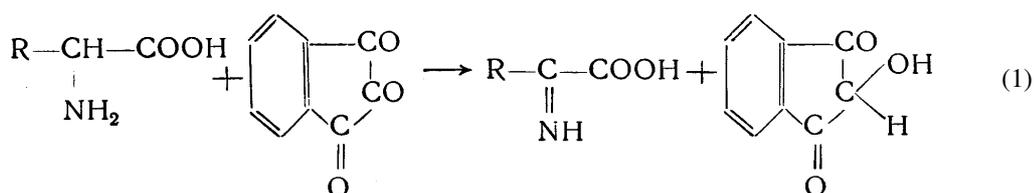
Реакция аминокислот с нингидрином, вероятно, протекает по следующему механизму. Нингидрин дегидрирует аминокислоту, превращая ее в иминокислоту (1), а сам превращается при этом в соответствующий спирт. Иминокислота разлагается, образуя альдегид (содержащий на один атом углерода меньше, чем кислота), двуокись углерода и аммиак (2), который конденсируется с не вошедшим в реакцию нингидрином, причем образуется сине-фиолетовый краситель (3). Эта реакция очень чувствительна и может быть использована для определения концевых групп аминокислот, образующихся в процессе гидролиза белков.

Реагенты: *Раствор метилцеллозолява, 90%-ный.* Перегнаный над хлористым оловом метилцеллозольв (монометиловый эфир этиленгликоля) разбавляют водой в соотношении 9:1 (по объему). *Нингидриновый реагент.* 2,0 г нингидрина и 3,0 г гидриндантина растворяют в 75 мл перегнанного метилцеллозолява, к полученному раствору прибавляют 25 мл 4 н. буферного раствора ацетата натрия (рН 5,5), смесь переливают в склянку из темного стекла и хранят в атмосфере азота. *Буферный раствор ацетата натрия 4 н., рН 5,5.* 54,4 г. $\text{NaOOCCH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. растворяют в 40 мл воды, прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты и разбавляют водой до 100 мл.

Выполнение реакции. Аликвотную часть раствора суммарных липидов или хроматографически однородных липидных фракций (содержащую 1–5 мкг или 0,07–0,4 мкмоль аминного азота) переносят в пробирку емкостью 15 мл с пришлифованной стеклянной пробкой. Растворитель удаляют в токе азота, остаток растворяют в 1,0 мл перегнанного метилцеллозолява, прибавляют 1,0 мл нингидринового реагента и нагревают смесь 20 мин на кипящей водяной бане. После этого охлаждают, прибавляют 5,0 мл 90%-ного метилцеллозолява, содержимое пробирки перемешивают и измеряют поглощение полученного раствора и раствора холостого опыта при 575 нм в кюветах с $l = 1$ см. В качестве стандартов используют растворы глицина, содержащие от 0,05 до 0,4 мкмоль вещества (молярный коэффициент экстинкции приблизительно равен 19 000).

Реакция аминокислот с нингидрином, вероятно, протекает по следующему механизму. Нингидрин дегидрирует аминокислоту, превращая ее в иминокислоту (1), а сам превращается при этом в соответствующий спирт. Иминокислота разлагается, образуя альдегид (содержащий на один атом углерода меньше, чем кислота), двуокись углерода и аммиак (2), который конденсируется с не вошедшим в реакцию нингидрином, причем образуется сине-фиолетовый краситель (3): Эта реакция очень чувствительна и может быть использована для

определения концевых групп аминокислот, образующихся в процессе гидролиза белков.



Опыт 5. Формольное титрование с рН-метром

Оборудование и реактивы. Лабораторный рН-метр с бюреткой вместимостью 50 мл. Химические стаканы и пипетки. 37 %-ный раствор формалина. Растворы NaOH: 0,2 М, 0,1 М, 0,05 М. Растворы H₂SO₄: 0,2 н., 0,1 н., 0,05 н. Гидролизат белка или питательная среда.

Ход работы

1. В химический стакан вносят точно 1 мл препарата (питательной среды или гидролизата), затем приливают 10 мл воды. Доводят рН раствора до значения рН = 7 потенциметрически (по рН-метру), используя для этого 0,05 М, 0,1 М, 0,2 М растворы гидроксида натрия и серной кислоты (концентрация растворов определяется наличием карбоксильных групп).

2. В отдельной емкости нейтрализуют примерно 20 мл 37%-ного формалина потенциметрически до значения рН = 7. Для нейтрализации используют те же растворы едкого натра и серной кислоты.

3. В химический стакан с препаратом опускают электроды рН-метра, приливают 6 мл свеженейтрализованного формалина. Значение рН при этом сдвигается в кислую сторону из-за освобождения

карбоксильных -COOH групп после взаимодействия формалина с аминогруппами.

4. Не вынимая электроды из стакана, пробу титруют 0,1 М раствором NaOH при помешивании до значения pH = 9,1. Записывают в качестве результата А количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл.

5. Параллельно проводят контрольный опыт, где вместо препарата берут 1 мл воды (холостая проба). Титрование проводится потенциометрически. В качестве результата В записывают количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование холостой пробы, мл.

Расчет. Содержание аминного азота X (в граммах аминного азота на 100 мл препарата) рассчитывают: $X = (A - B) \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100 / Y$, где А – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл; В – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля (холостой пробы), мл; К – поправка к титру 0,1 М NaOH (К = 1 при использовании точно титрованного 0,1 М раствора NaOH); 1,4 – количество азота (в мг), эквивалентное 1 мл пробы; Y – объем пробы, взятой на определение, мл; 100 – пересчет на 100 мл пробы.

Контрольные вопросы

1. Какой азот называют аминным?
2. Что называется потенциометрическими методами определения?
3. На чем основан метод формольного титрования для определения количества аминного азота? Опишите химизм процесса.
4. С чем связан сдвиг pH в кислую сторону при приливании в гидролизат формалина?
5. Какие соединения называют аминокислотами, пептидами, белками? Описать их химическое строение.
6. В каких реакциях белки подвергаются гидролизу?

Работа 6. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии на бумаге

Индивидуальные аминокислоты в растворе или в смесях могут быть разделены методом тонкослойной хроматографии. Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой – водонасыщенный органический растворитель, например смесь бутанола с уксусной кислотой. Водная фаза является неподвижной, так как вода в данном случае оказывается сорбированной на инертном носителе – бумажной целлюлозе, которая в закрытой хроматографической камере в

насыщенной влажной атмосфере удерживает до 20% воды. Подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель.

В зависимости от растворимости аминокислоты в воде или органическом растворителе наблюдается разная скорость движения аминокислот при смачивании бумаги с нанесенным на нее для анализа образцом. Для усиления видимости пятен, соответствующих аминокислотам, хроматограмму "проявляют", то есть обрабатывают веществом, окрашивающим пятна. Наиболее часто для этих целей применяют нингидрин.

Т а б л и ц а 4.3

Значения R_f аминокислот в системе растворителей
бутанол : уксусная кислота: вода 4:1:5 (при температуре 20°C)

Аминокислота	Обозначение аминокислотного остатка	R_f
Цистин	Cys	0,04
Цистеин		0,05
Лизин	Lys	0,14
Гистидин	His	0,16
Аргинин	Arg	0,18
Серин	Ser	0,22
Аспарагиновая кислота	Asp	0,24
Глицин	Gln	0,25
Глутаминовая кислота	Glu	0,28
Треонин	Thr	0,29
Аланин	Ala	0,36
Тирозин	Tyr	0,45
Валин	Val	0,50
Метионин	Met	0,50
Фенилаланин	Phe	0,66
Изолейцин	Ile	0,68
Лейцин	Leu	0,69

Типичная хроматограмма после окрашивания представляет собой полоску бумаги, на которой слабо просматривается стартовое пятно и хорошо видны пятна индивидуальных аминокислот, которые располагаются выше старта. Местоположение вещества на хроматограмме зависит от коэффициента распределения α

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

Для характеристики положения пятна с веществом применяют величину R_f – коэффициент скорости движения (retention factor – фактор удерживания)

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное аминокислотой от старта, мм}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя от старта, мм}} .$$

R_f является характерной постоянной для данного вещества и зависит от качества применяемого растворителя, его состава, pH, температуры, плотности бумаги и других факторов. Если указаны условия определения и значение R_f , то можно точно указать, о каком веществе идет речь (табл. 4.3).

Метод является простым и широко используется для определения аминокислот и других органических веществ в количествах от десятых до сотых долей миллиграмма. Чувствительность метода 2 – 5 мкг индивидуального вещества в одном пятне.

Оборудование. Пинцет, хроматографическая камера, бумага для хроматографии или хроматографические пластинки типа Silufol, стеклянный капилляр, ножницы, сушильный шкаф на 70°C, пульверизатор.

Реактивы. Бутиловый спирт х.ч. или ч.д.а., уксусная кислота ледяная х.ч., вода дистиллированная (готовят заранее смесь для хроматографирования), 0,5 %-ный раствор в ацетоне, смесь аминокислот: например, глютаминовая кислота – 60 мг, аланин – 40 мг, глицин – 40 мг, растворенные в 10 мл дистиллированной воды (можно использовать раствор смеси по 50 мг других аминокислот в 10 мл воды).

Ход работы. Вырезают полоску хроматографической бумаги длиной в 15 см и шириной в 1,5 см. Можно использовать специальные пластинки Silufol или Merck для тонкослойной хроматографии. Размеры вырезаемой полоски должны соответствовать размерам хроматографической камеры.

Приготавливают хроматографическую камеру, которая представляет собой большую пробирку с пробкой, цилиндр с притертой крышкой или специальную прямоугольную стеклянную камеру, герметично закрываемую сверху притертым стеклом. На дно камеры заливают 2 мл смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5 и закрывают крышкой.

На полоске бумаги карандашом ставят черточку примерно в 2 см от

нижнего края и капилляром наносят касанием 1 каплю испытуемой смеси. Пластинке дают подсохнуть над горячей поверхностью плитки или сушильного шкафа и повторяют процедуру касания капилляром 3 раза. Место нанесения пробы не должно соприкасаться с растворителем при помещении полоски бумаги в хроматографическую камеру (карандашная полоска должна быть на 0,5 см выше слоя растворителя).

Пинцетом опускают вертикально в камеру полоску бумаги нижним краем в растворитель и закрывают камеру. Процесс хроматографирования проводят в течение 1 – 2 ч. При этом происходит продвижение вверх фронта растворителей и разделение аминокислот. Хроматограмму извлекают из камеры, отмечают границу продвижения фронта растворителя (карандашом или надрезанием края бумаги) и высушивают под тягой.

На высушенную хроматограмму наносят пульверизатором или осторожным смачиванием путем погружения 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне и подсушивают на воздухе. При смачивании не допускать подтеков.

Проявление хроматограммы проводят, нагревая полоску бумаги в сушильном шкафу при температуре 70°C в течение 15 мин.

Идентификацию аминокислот осуществляют по найденным значениям R_f . Для этого линейкой измеряют расстояния пробега фронта растворителя и каждого отдельного пятна соответствующей аминокислоты от места нанесения пробы, выраженные в мм. Определяют коэффициент пробега и фактор разделения R_f , значения которых сравнивают с табличными данными.

По значениям R_f проводят точную идентификацию наличия конкретных аминокислот в анализируемой смеси.

Контрольные вопросы

1. Какие свойства аминокислот положены в основу их хроматографического определения?
2. Какие факторы влияют на точность определения аминокислот хроматографией на бумаге?
3. Каковы минимальные количества аминокислот, которые могут быть определены данным методом?

Работа 7. Количественные методы определения содержания белка

Количественное определение содержания белка в конкретном образце или растворе является важной прикладной задачей. Поскольку в виде примесей в растворе или в твердом образце могут содержаться

химические вещества различной природы, приходится использовать разные методы количественного анализа белка.

Опыт 1. Спектрофотометрическое определение содержания белка в растворе. Сравнение поглощения при 215 и 225 нм

Реактивы и материалы: раствор белка с концентрацией от 10 до 100 мкг/мл, спектрофотометр с кюветами, пробирки.

Количественное определение белка в ультрафиолетовой области основано на способности пептидной связи поглощать при длинах волн меньше 230 нм. Концентрация белка в пределах 10 – 100 мкг/мл может быть определена по разности поглощений при 215 – 225 нм. Определению белка данным методом может мешать высокое содержание примесных солей в буферах с концентрацией больше 0,5 мМ. Для получения достоверных результатов раствор белка следует подвергать значительному разбавлению.

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр. В кювету заливают раствор белка и проводят измерение поглощения раствора при 215 и 225 нм. Концентрацию белка рассчитывают по формуле

$$C, \text{ мкг/мл} = 144 (A_{215} - A_{225}),$$

где A_{215} и A_{225} – поглощение раствора при 215 и 225 нм.

Опыт 2. Определение белка методом Лоури

Метод используют для определения содержания общего белка в образце при наличии уверенности в том, что весь определяемый белок удаётся растворить.

Реактивы и материалы.

1. 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH .
2. 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе тартрата натрия (калия) или тринатрийцитрате.
3. Смесь 1 мл раствора 2 с 50 мл раствора 1, приготовленная перед началом определения.
4. Реактив Фолина-Чокальтеу. Растворяют 50 г вольфрамата натрия Na_2WO_4 и 12,5 г молибдата натрия Na_2MoO_4 в 350 мл воды, к полученному раствору приливают 25 мл 85 %-ного раствора фосфорной кислоты, 50 мл концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. Затем добавляют 75 г лития сульфата, 25 мл воды, 3 – 5 капель брома и кипятят без холодильника в течение 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Раствор охлаждают до комнатной (20°C) температуры и доводят водой до объема 500 мл,

перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 мл, разводят в 10 раз водой, титруют 0,1 М раствором NaOH до нейтральной реакции по фенолфталеину. После чего к раствору добавляют такое количество воды, чтобы получить конечную концентрацию кислоты в растворе, равную 1 н. Реактив 4 хранить в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике. Перед употреблением реактив Фолина развести водой 1:1.

5. Испытуемый раствор белка с концентрацией от 25 до 500 мкг/мл. Спектрофотометр с кюветами, пробирки, пипетки.

Метод основан на сочетании биуретовой реакции на пептидные связи и реакции Фолина на ароматические аминокислоты. Метод является достаточно надежным и позволяет определять плохо растворимые белки после их кипячения в 0,1 М растворе NaOH и получения раствора с концентрацией 25 – 500 мкг белка в 1 мл. Разные белки дают заметно различающиеся величины поглощения в методе Лоури-Фолина, отчасти это зависит от содержания тирозина и триптофана.

Ход работы

1. Для построения калибровочной кривой в 6 пробирок вносят 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора белка с известной концентрацией, содержащего 0,25 мг/мл вещества (то есть 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг) и доводят водой объем проб до 1 мл. В 7-ю пробирку вносят 1 мл воды (контрольная проба). Во все пробирки прибавляют по 5 мл смеси растворов 1 и 2 и оставляют при температуре 18–25 °С в течение 10 мин. Затем добавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного 1:1, и оставляют на 30 мин, после чего измеряют интенсивность окрашенных в синий цвет растворов при 750 нм на спектрофотометре или на фотоэлектроколориметре с красным фильтром против контрольной пробы.

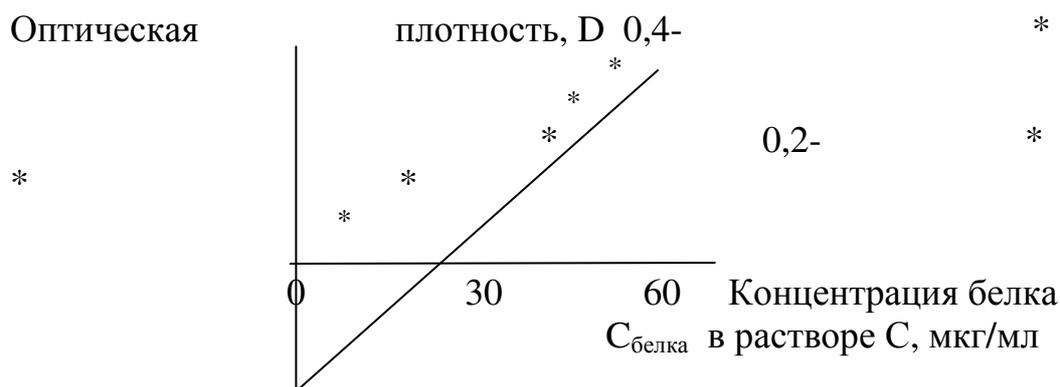


Рис. 4.4. Калибровочный график, построенный по стандартным растворам белка с известной концентрацией

2. Величины оптической плотности (D) для 6 растворов откладывают на оси ординат, а значения концентрации белка (C, мкг/мл) – на оси абсцисс и получают калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации белка (рис. 4.4).

Опыт 3. Определение содержания общего белка по данным элементного анализа определения азота. Метод Йенике-Кьельдаля

Метод удобен для определения белка в нерастворимых биологических объектах, например в клеточной биомассе или мясопродуктах. Принимается, что в белках содержится в среднем 16% азота. Найденное по Кьельдалю количество азота умножают на 6,25, чтобы определить количество белка в растворе с последующим пересчетом на массу взятого образца.

Реактивы и материалы. Стандартный раствор аммония сульфата, содержащий 6 мкг азота в 1 мл. Фенольный реактив. Для получения комплекса 1 мл 85 %-ного раствора фенола смешивают с 2,5 мл 0,2 %-ного раствора нитропрусида натрия и 36,5 мл воды. Щелочной раствор гипохлорита: 0,02 М NaClO в 2,5 М растворе NaOH. 57%-ный раствор HClO₄. Термошкаф (210°C), спектрофотометр с кюветами, пробирки, бюретки с реактивами.

Ход определения

1. Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора аммония сульфата с известной концентрацией азота, равной 6 мкгN/мл и доводят общий объем раствора в каждой пробирке водой до 1 мл. В 6-ю пробирку вносят 1 мл воды (холостая проба). Во все пробирки добавляют по 0,1 мл 57%-ного раствора HClO₄, 1 мл фенольного реактива и 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита. Выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре и измеряют поглощение при 580 нм или при зеленом (оранжевом) светофильтре на фотоэлектроколориметре.

2. Величины оптической плотности (D) для 5 растворов откладывают на оси ординат, а значения концентрации азота (C, мкг/мл) – по оси абсцисс и получают калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания азота.

3. К 0,1 мл раствора белка, содержащего примерно 0,5 мг/мл, прибавляют 0,1 мл 57%-ного HClO₄, пробирку прикрывают неплотно стеклянной пробкой и ставят на минерализацию, выдерживая пробу в течение 20 мин при температуре 210°C в термошкафу, затем пробу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 1 мл воды, 1 мл фенольного реактива, 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита, смесь выдерживают в течение 20 мин и измеряют поглощение при 580 нм. По калибровочному графику находят количество азота в исследуемом растворе. Найденное количество азота умножают на 6,25 чтобы определить количество белка в растворе в мкг/мл. Зная общую массовую концентрацию растворенного вещества, рассчитывают массовое содержание белка в образце в процентах.

Контрольные вопросы

1. Как определить концентрацию белка по градуировочному графику?
2. Почему для анализа содержания белка существует несколько методов определения? Какие факторы влияют на точность определения белка?
3. Устройство и принцип работы спектрофотометра и фотоэлектроколориметра.

Работа 8. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия

Белки и полипептиды имеют разную молекулярную массу. Полипептиды соответствуют по классификации олигомерам с молекулярной массой $(1-10) \cdot 10^3$, белки имеют, как правило, большую молекулярную массу. Такому условному разделению придерживаются не всегда, особенно для веществ с молекулярной массой в несколько тысяч и пользуются общим наименованием "белки". Для белков часто пользуются единицей измерения молекулярной массой в 1 Дальтон (Да). Например, для основного белка крови альбумина молекулярная масса равна 69103 или 69 кДа, а для инсулина – 6000 или 6 кДа.

Получить белок в индивидуальном состоянии, соответствующем его химической формуле, очень сложно. Любой товарный образец белка содержит, как правило, 5 – 10 % воды и примеси других белков с разными молекулярными массами. Технические белки могут содержать в виде примесей соли (хлорид натрия, сульфат аммония) и другие вещества, например липидной или полисахаридной структуры. Состав примесей определяется условиями получения и очистки белка.

Для изучения молекулярно-массового распределения часто используют электрофоретический метод. Химическая структура любого белка представляет собой полимерную цепь (R) с боковыми функциональными группами, в качестве которых чаще всего выступают карбоксильные $-\text{COOH}$ и amino $-\text{NH}_2$ группы (белки являются полиамфолитами). В растворе эти ионогенные группы диссоциируют и, в зависимости от pH, молекула белка имеет отрицательный заряд ($\text{R-COOH} \rightarrow \text{R-COO}^-$) или положительный заряд ($\text{R-NH}_2 \rightarrow \text{R-N}^+\text{H}_3$).

При наложении электрического поля под действием постоянного тока молекулы белка будут двигаться к катоду (–), если они заряжены

положительно, и к аноду (+), если они заряжены отрицательно. Разные по молекулярной массе (и заряду) белки будут двигаться с разной скоростью. Движение больших белков будет происходить медленнее, чем маленьких, которые за одинаковое время "пройдут" большее расстояние к электроду. Если осуществлять такое движение в вязком растворе полимера (геле), то после определенного времени молекулы белка оказываются разделенными по молекулярной массе или по заряду и могут быть зафиксированы в таком состоянии после высушивания геля. Если гель прокрасить красителем, который не окрашивает гелеобразующий полимер, а прокрашивает полосы белков, то можно получить картинку молекулярно-массового распределения данного белка. Эта картинка называется электрофореграммой. При использовании специальных фотоэлектрических денситометров можно провести процесс сканирования геля – количественно, в процентах, измерить какова доля каждой белковой фракции в данном образце белка. Считается, что хорошо очищенные белки содержат до 98 – 99 % монофракции белка.

Опыт 1. Изучение молекулярно-массового распределения водорастворимых белков методом гель-электрофореза в 18%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Предел обнаружения составляет 0,5 – 2 мкг в зависимости от условий обработки и природы анализируемого белка. Наилучшим образом в 18%-ном полиакриламидном геле разделяются белки с ММ от 5 до 200 кДа .

Оборудование. Лабораторный прибор для проведения вертикального электрофореза, включающий источник постоянного тока на 600 В и электрофоретическую стеклянную или пластмассовую камеру. Денситометр для сканирования гелей или хроматограмм. Микрошприц на 100 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов.

Реактивы. 1. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), х.ч. 2. Акриламид (АА), х.ч. 3. N,N'-метиленабисакриламид (МБА), х.ч. или о.с.ч. 4. 2-амино-2(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (ТРИС), х.ч. 5. Натрия додецилсульфат (СДС), х.ч. или ч.д.а. 6. Аммония персульфат (АПС), х.ч. 7. Краситель кумасси R-250, Serva (ФРГ). 8. Кислота соляная, х.ч. 9. Кислота уксусная ледяная, х.ч. 10. Глицин, х.ч. 11. 2-Меркаптоэтанол. 12. Спирт этиловый. 13. Краситель бромфенолблау, Serva (ФРГ). 14. Глицерин. 15. Стандартные маркерные белки с молекулярной массой от 6 до 80 кДа.

Ход работы

1. До начала проведения работы необходимо ознакомиться с инструкцией (паспортом) по работе с лабораторным прибором для

электрофореза.

2. Готовят растворы:

А – раствор 30 г акриламида (АА), 0,15 г N,N'-метиленбисакриламида (МБА) и воды до 100 мл,

В – раствор 18,2 г 2-амино-2(гидроксиэтил)-1,3-пропандиола, 0,4 г додецилсульфата натрия (СДС), конц. HCl до pH 8,8, воды до 100 мл,

С – раствор 9,1 триса, 0,4 СДС, конц. HCl до pH 6,8, воды до 100 мл,

D – 10%-ный водный раствор аммония персульфата (АПС),

E – раствор 30 г АА, 0,8 МБА и воды до 100 мл.

Электродный буфер – разбавленный водой 1:4 концентрат состава: 24 г трис, 115 г глицина, 40 мл 20%-ного раствора СДС, воды до 2000 мл.

Окрашивающий раствор для геля – 11 г красителя кумасси R-250, 2 л этанола, 0,5 л уксусной кислоты, воды 2 л.

Обесцвечивающий раствор – 0,5 л этанола, 0,35 л уксусной кислоты и 2 л воды.

Буфер для растворения белковых проб – 0,4 мл 2-меркаптоэтанола, 0,8 мл 20%-ного водного раствора СДС, 0,4 мл 1 М трис буфера pH 6,8, 0,8 мл 0,05%-ного раствора бромфенолблау, 5 мл воды и 5 мл глицерина.

Растворы хранят в холодильнике при температуре +4°C в течение 1 месяца.

3. В соответствии с инструкцией собирают камеру для плоского электрофореза. Для этого две стеклянные пластинки крепят вертикально в пластмассовую рамку с трубчатыми прокладками, образуя пространство для заливки геля 115×115×1 мм.

4. Готовят растворы для получения полимерного геля:

Состав для нижнего сепарирующего геля (мл): 18,0 А + 7,5 В + 4,3 воды + 0,01 ТЕМЕД + 0,2 D,

Состав для верхнего формирующего геля: 1,3 E + 2,5 C + 6,2 воды + 0,01 ТЕМЕД + 0,1 D,

Растворы используют немедленно после приготовления.

Заливают в камеру (в количестве примерно 3/4 объема камеры) состав для нижнего сепарирующего геля и выдерживают камеру вертикально в течение двух часов при комнатной температуре для завершения процесса полимеризации. В полученном полимерном слое геля будет происходить основное разделение белков.

Заливают в камеру на поверхность полученного геля до верхних краев стеклянных пластинок состав для верхнего формирующего геля, вставляют в раствор специальную гребенку для формирования в геле углублений, в которые будут наноситься анализируемые образцы, и проводят повторно полимеризацию в аналогичных условиях.

5. Собирают в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибор

для проведения электрофореза.

Для этого камеру с гелем освобождают от нижнего шнура (для сообщения геля с электродным раствором), зажимают ее винтами в ванне прибора, помещают электроды и заливают во все отсеки электродный буфер так, чтобы буферный раствор покрывал верхний край камеры с гелем.

6. Для подготовки проб белка к нанесению, навески белка растворяют в буфере для растворения проб, нагревая при необходимости 5–100 мкг белка в 1 мл буфера при температуре 90 – 100°C в течение 5 мин.

7. На дно углублений верхнего геля микрошприцем осторожно вносят по 5 – 30 мкл анализируемой пробы (1 – 50 мкг белка). Введение проб осуществляют медленно, так, чтобы вводимый раствор белка не всплывал со дна углублений. Для этого в состав буфера для растворения проб входит глицерин, утяжеляющий вводимый раствор.

8. Включают электрический ток и проводят процесс при плотности постоянного тока 2,5 мА/см² геля в течение 1 – 2 ч.

Время процесса зависит от состояния геля (насколько свежими были использованные растворы), а также от расстояния, на которое необходимо продвинуть белки.

В ходе электрофореза окрашенные в фиолетовый цвет полосы белков сначала собираются на дне углублений верхнего геля, затем быстро продвигаются в верхнем геле вниз. Происходит формирование молекул белка под воздействием тока (движение) и распрямление белковых глобул в присутствии СДС – вещества, способствующего разворачиванию молекул белка (добавление 1,5 г СДС на 1 г белка вызывает его полную денатурацию).

В зависимости от рН раствора окраска полос может меняться на желтую из-за влияния красителя бромфенолблау.

После прохождения белков через верхний гель полосы собираются на границе двух гелей, входят в нижний сепарирующий гель и происходит разделение белка на его составные части (фракции).

Путь, который проходит каждая полоса R_f , прямо пропорционален молекулярной массе белковой фракции.

9. После завершения процесса, то есть когда нижние низкомолекулярные белковые фракции оказываются примерно в 1 см от нижнего края геля, прибор выключают, электродный буфер сливают, камеру разбирают и извлекают гель на поверхность стекла. Отделенный гель переносят в окрашивающий раствор и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Обесцвечивание геля проводят в обесцвечивающем растворе в течение 1 – 24 ч.

В результате получают полиакриламидный гель, в котором видны окрашенные в синий цвет полосы фракций белка. Соотнесение этих полос

с полосами маркерных белков позволяет сделать заключение о составе исходного белка и молекулярной массе каждой фракции.

Денситометрирование белковых полос позволяет провести количественную оценку состава белка в процентах. Анализ полос можно выполнить без денситометра, приблизительно оценивая ширину и толщину данной полосы по отношению к размерам стандартных полос. Принимается, что при одинаковом содержании белка, окрашенные полосы стандарта и анализируемой пробы одинаковы. При различии в содержании белка в два раза полосы имеют толщину, различающуюся примерно в два раза.

В качестве стандартных маркерных белков, позволяющих анализировать фракционный состав растворенных белков с молекулярной массой от 6 до 80 кДа используют чистые белки с известными молекулярными массами: инсулин 6 кДа, проинсулин 8,6 кДа, цитохром 12,5 кДа, овальбумин 45 кДа, альбумин 69 кДа, трансферин 80 кДа.

Опыт 2. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле с градиентом концентрации акриламида от 4 до 10% в присутствии додецилсульфата натрия

Визуальный предел обнаружения составляет 1 мкг белка, окрашенного кумасси G-250 и 0,1 мкг белка, определяемого денситометрически. В градиентном 4 – 10%-ном акриламидном геле разделяются белки с ММ до 400 кДа.

Оборудование. Лабораторный прибор для проведения вертикального электрофореза, включающий источник постоянного тока на 600 В и электрофоретическую стеклянную или пластмассовую камеру. Денситометр для сканирования гелей или хроматограмм. Микрошприц на 100 мкл. Двухканальный дозирующий насос для формирования градиентного заполнения камеры. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов.

Реактивы. 1. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). 2. Акриламид (АА), х.ч. 3. N,N'-метиленбисакриламид (МБА), х.ч. 4. 2-амино-2(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (ТРИС), х.ч. 5. Натрия додецилсульфат (СДС), х.ч. 6. Аммония персульфат (АПС), х.ч. 7. Краситель кумасси G-250, Serva (ФРГ). 8. Кислота соляная, х.ч. 9. Кислота уксусная ледяная, х.ч. 10. Глицин, х.ч. 11. 2-меркаптоэтанол. 12. Спирт этиловый. 13. Краситель бромфенолблау, Serva (ФРГ). 14. Глицерин. 15. Стандартные маркерные белки: цитохром С 12,4 кДа; миоглобин 17,8 кДа; яичный альбумин 45 кДа; альбумин BSA 67 кДа; альдолаза 160 кДа; каталаза 240 кДа; ферритин 450 кДа.

Проведение испытаний

1. До начала проведения работы необходимо ознакомиться с инструкцией (паспортом) по работе с лабораторным прибором для электрофореза.

2. Готовят растворы:

Растворы для получения градиентного 4 – 10%-ного геля.

	4 %-ный раствор по акриламиду	10 %-ный раствор по акриламиду
Акриламид, 40%-ный раствор	1,0 мл	2,5 мл
N,N'-метиленабисакриламид, 2,5%-ный раствор	1,6 мл	0,2 мл
Трис, 1,5 М раствор	5,0 мл	5,0 мл
Глицерин	0,8 мл	0,8 мл
СДС, 10%-ный раствор	0,1 мл	0,1 мл
ТЕМЕД	7,0 мкл	7,0 мкл
АПС, 28 мг/мл раствор	50,0 мкл	0,1 мл
Вода дистиллированная	<u>1,65 мл</u>	<u>1,5 мл</u>
	11 мл	11 мл

Раствор для получения верхнего концентрирующего 2,5% -ного геля.

Акриламид, 40%-ный раствор	0,2 мл
N,N'-метиленабисакриламид, 2,5%-ный раствор	0,54 мл
Трис, 0,15М раствор	2,0 мл
Глицерин	0,3 мл
СДС, 10%-ный раствор	0,03 мл
ТЕМЕД	15 мкл
АПС, 28 мг/мл раствор	0,02 мл
Вода дистиллированная	<u>0,3 мл</u>
	3,4 мл

Электродный буфер – 0,05 М трис/0,384 М Gly / 0,1% СДС, рН 8,8. Готовят растворением в 1 л раствора 6,057 г триса, 28,9 г Gly, 1 г СДС и устанавливают рН 8,8, добавляя 1 М раствор HCl, воды дистиллированной до 1 л.

Окрашивающий раствор для геля – 1 г кумасси G-250, 250 мл этанола, 50 л уксусной кислоты, воды 200 мл.

Обесцвечивающий раствор – 300 мл этанола, 100 мл уксусной кислоты и 600 мл воды.

Фиксирующий раствор – 15%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Буфер для растворения белков – 25 мМ трис/HCl – 75 мМ ди-тиотрейтол (ДТТ) – 3 % СДС, рН 6,8.

Готовят растворением 0,303 г триса, 1,16 г ДТТ и 3 г СДС в воде, устанавливают рН 6,8 добавлением 1 М HCl, добавляют 8 мл 0,05%-ного раствора бромфенолблау и доводят объем раствора до 100 мл.

Растворы хранят в холодильнике при температуре +4°C в течение 1 месяца.

3. В соответствии с инструкцией собирают камеру для плоского электрофореза. Для этого две стеклянные пластинки крепят вертикально в пластмассовую рамку с трубчатыми прокладками, образуя пространство для заливки геля 115×115×1 мм.

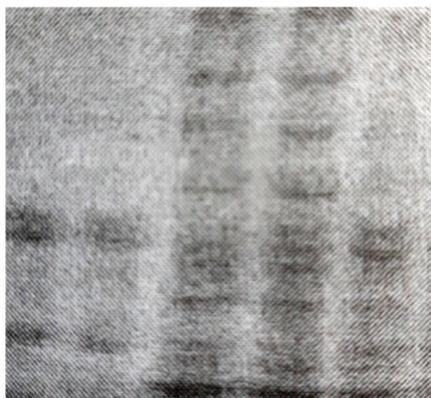


Рис. 4.5. Электрофореграмма белков крови (три последние дорожки). На первых двух дорожках нанесены стандарты маркерных белков (снизу –вверх: 13, 43 и 58 кДа)

4. Готовят растворы для получения 4 и 10%-ного полимерного геля и закачивают их между стеклами подготовленной «сэндвичевой» камеры со скоростью 1 мл/мин, градиент 4%-ного раствора 100 – 0% за 11 мин, градиент 10%-ного раствора 0 – 100 % за 11 мин. После фотоотверждения геля в течение двух часов при комнатной температуре, на верх него заливают раствор для получения верхнего концентрирующего 2,5%-ного геля с вставленной гребенкой для формирования карманов и отверждают в аналогичных условиях.

Электрофорез и обработку геля осуществляют аналогично пп. 5–9 предыдущей методики. Перед окрашиванием гель помещают на 10–15 мин

в раствор ТХУ и промывают водой (рис. 4.5).

Количественную оценку распределения белковых полос проводят денситометрически.

Контрольные вопросы

1. Что называют электрофоретическим разделением белков?
2. Назвать вещества, закисляющие и защелачивающие буферные растворы.
3. Что представляет собой молекула белка в твердом состоянии и в растворе? Как влияют примеси на поведение в растворе белковых молекул? Что такое надмолекулярная структура?
4. Что называют изоэлектрической точкой белка?
5. Что такое электролитическая диссоциация? Каковы особенности этого процесса для высокомолекулярных веществ вообще и для белков в частности?
6. Как влияет химическое строение белков на их поведение в растворе под воздействием электрического тока?
7. При электрофорезе в акриламидном геле получено 5 окрашенных белковых полос. Можно ли утверждать, что в исходном образце было только 5 белков?

Работа 9. Ионообменная хроматография

Метод очистки веществ с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ) основан на реакции ионного обмена между движущимся веществом и неподвижным ионообменником, в качестве которого используют специально синтезированные полимерные материалы в виде гранул, волокна или порошка. В качестве ионообменников используют также природные материалы, например целлюлозу, силикагель, содержащие активные, так называемые ионогенные группы (см. главу 3).

Процесс ИОХ включает в себя пропускание раствора вещества через ионообменную колонку различной формы заполненную ионообменником. В результате прохождения раствора через слой ионита часть компонентов из раствора поглощается на ионообменнике (процесс сорбции), а часть примесей и других составляющих компонентов раствора свободно проходит через колонку. При пропускании через слой сорбента с поглощенным веществом другого раствора (элюента), например 2 н. раствора соли с большой ионной силой, происходит смывание поглощенного вещества (процесс десорбции или элюции). Очищенное методом ИОХ вещество собирают в составе элюата.

Метод ИОХ используют для очистки белков. Возможность использования метода в данном случае объясняется тем, что белки

содержат ионизирующиеся группы, связывающиеся с ионитом. Значения pK_a основных функциональных групп белков приведены в табл. 4.4.

В водно-солевых растворах суммарная величина заряда белка зависит от аминокислотного состава и pH среды: при значениях pH меньше значения изоэлектрической точки pI , молекулы белка заряжены положительно, а при значениях pH больше pI белки несут отрицательный заряд.

Хорошие результаты хроматографирования зависят от типа выбранного ионита.

Т а б л и ц а 4.4

Значения pK_a диссоциации ионогенных групп, входящих в состав аминокислотных остатков белков

Название функциональной группы	Интервал pK_a
Карбоксильная $-\text{CH}_2\text{COOH}$	1,8 – 3,6
Карбоксильная $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	3,0 – 4,7
Карбоксильная $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	4,4
Фенольный гидроксил $-\text{OH}$	9,8 – 10,4
Сульфгидрильная $-\text{SH}$	8,3 – 8,6
Имидазольная	5,6 – 7,0
Аминогруппа $-(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	7,9 – 10,6
Гуанидиновая	11,6 – 12,6

Наиболее часто для хроматографии белков используют ионообменники на основе полисахаридов (целлюлоза, декстраны и т. п.). Полисахаридные сорбенты благодаря своей гидрофильности не вызывают денатурацию молекул белка. Ионизирующиеся (ионогенные) группы в этих сорбентах расположены достаточно далеко друг от друга, что позволяет поливалентным белковым молекулам связываться с ионообменником небольшим числом имеющихся в белке функциональных групп, что обуславливает сравнительную легкость десорбции белка с ионита. Ориентация полисахаридных молекул в сорбенте такова, что благодаря большим размерам отверстий в сетчатой структуре полисахаридов ионогенные группы ионообменника легко доступны для белков, что определяет высокую ионообменную емкость таких сорбентов по отношению к белкам.

Емкость сорбента по веществу – величина, показывающая, сколько вещества может связаться единицей массы ионита. Например, значение емкости 10 мг/г означает, что 1 г сорбента может связать 10 мг белка.

В качестве наиболее распространенных сорбентов для белков применяют анионообменник – диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭЦ) с функциональными группами $-\text{OC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ и катионообменник –

карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) с функциональными группами $-\text{CH}_2\text{COOH}$ или соответствующие производные декстрана с теми же функциональными группами.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или проточной спектрофотометр с потенциометром. Хроматографическая колонка с запорными фланцами, соединенная пластиковым шлангом с дозирующим насосом. Микрошприц или пипетка на 500 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. Коллектор фракций или штатив с 50 пробирками.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор белка в обессоленной воде. 2. Анионообменник ДЭАЭ-сефароза FF фирмы Фармация (Швеция) или другой сорбент ДЭАЭЦ в ОН⁻ или СГ форме. 3. Катионообменник КМЦ в Н⁺-форме. 4. 0,2 М раствор NaOH. 5. Дистиллированная вода. 6. 0,1 М ацетатный буфер. 7. 50 мМ раствор NH₄HCO₃. 8. Фенол. 9. 0,1 М трис-HCl буфер pH 7,8. 10. 1 М раствор NaCl на 0,1 М ацетатном буфере pH 5,0. 11. 1 М раствор NaCl на 0,1 М трис-HCl-буфере pH 7,8.

Ход работы

ВЫБОР ИОНООБМЕННИКА. При выборе ионита для работы с белками принимают во внимание: заряд функциональной группы ионита, заряд белка и область pH, в которой белок сохраняет активность, что особенно важно для гормонов и ферментов.

Пример выбора ионообменника для произвольно взятых ферментов пепсина, химотрипсина и карбоксипептидазы представлен в табл. 4.5.

Т а б л и ц а 4.5

Выбор ионообменника для очистки ферментов

Тип ионита и фермента	Значения зарядов при разных величинах pH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ДЭАЭЦ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	-
КМЦ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	-
Пепсин	+	+	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Химотрипсин	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	-	-
Карбоксипептидаза	+	+	+	+	+	+	0	-	-	-	-	-

Из данных табл. 4.5 видно, что для очистки карбоксипептидазы можно использовать оба ионита в области pH 6 – 8, в этом интервале pH фермент сохраняет активность. Для пепсина следует использовать ДЭАЭЦ в области pH 4 – 5, для химотрипсина – КМЦ в области pH 7 – 8.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕМКОСТИ ИОНИТА. Различают статическую (СОЕ) и динамическую или полную емкость (ПОЕ). СОЕ определяют как величину сорбированного вещества в случае простого контакта ионита с раствором вещества при данных условиях, например к 10 мл раствора

добавляют 1 г сорбента, встряхивают смесь в течение 24 ч и по разнице содержания вещества в растворе до и после сорбции вычисляют значение СОЕ в мг/г. Для определения ПОЕ необходимо полностью реализовать поглощающие свойства сорбента. Как правило ПОЕ определяют длительным пропусканием концентрированного раствора через колонку с сорбентом и последующей элюцией и анализом количества связанного вещества. Значение ПОЕ может превышать значение СОЕ в 2 – 10 раз.

Для определения СОЕ по белку 50 г ионита промывают 3 раза по 50 мл 0,1 М трис-НСl буфера рН 7,8, гранулам сорбента дают отстояться и 10 мл влажного осадка сорбента смешивают с 1 мл раствора белка с известной концентрацией. Осадок отделяют центрифугированием и анализируют остаточное содержание белка в растворе, например, по поглощению при 280 нм. Рассчитывают в мг/мл сорбента количество связанного белка. Зная влажность сорбента, проводят пересчет значения СОЕ в мг/г. Если белок связывается не полностью, то берут большее количество сорбента и повторяют определение. Для заполнения колонки берут 10-кратный избыток сорбента. При проведении технологических операций допускается применять 2–3 кратный избыток сорбента.

ПОДГОТОВКА СОРБЕНТА И ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНКИ. Сорбенты ведущих зарубежных производителей, например, ДЭАЭ-sepharose FF, готовы к употреблению.

Для использования других сорбентов требуется предварительная подготовка. Сорбент промывают избытком воды, позволяя основной массе частиц осесть на дно стакана. Надосадочную жидкость с мельчайшими частицами сливают, операцию повторяют несколько раз для получения равномерного гранулометрического состава и удаления мелких частиц, оказывающих большое гидравлическое сопротивление при пропускании растворов через колонку.

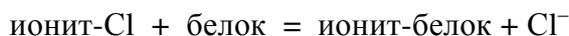
Сорбент в виде суспензии с водой переносят в вертикально расположенную колонку. Количество суспензии должно быть таким, чтобы заполнить весь объем колонки.

Колонку закрепляют вертикально. В момент заполнения колонки обеспечивают проток жидкости самотеком или работающим насосом. Происходит оседание частиц сорбента и их одновременное уплотнение в слое. Формирование слоя сорбента необходимо производить в непрерывном режиме. В шлангах и сорбенте не должно быть пузырей воздуха, наличие которых искажает результаты разделения.

ПРОМЫВКА КОЛОНКИ. Колонку промывают 3 объемами (по отношению к объему ионита) элюента, в качестве которого используют последовательно дистиллированную воду, 0,1 М ацетатный или 0,1 М трис-НСl буфер рН 7,8; 1 М раствор NaCl на 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0 или 1 М раствор NaCl на 0,1 М трис-НСl-буфере рН 7,8. Скорость промывки колонки должна быть равной скорости последующего

хроматографирования, осуществляемого при помощи насоса или самотеком.

Подготовка ионита отличается от подготовки нейтрального сорбента тем, что требуется перевести ионит в соответствующую H^+ или OH^- (Cl^-) форму. Процесс подготовки колонки с ионитом называют "уравновешиванием" колонки, подчеркивая, что в результате все свободные группы будут переведены в необходимую форму. Ионит типа ДЭАЭЦ с функциональными группами $-OC_2H_4N(C_2H_5)_2$ промывают растворами HCl , осуществляя тем самым перевод ионогенных групп в $-[OC_2H_4N^+(C_2H_5)_2]Cl^-$ форму. Процесс последующего ионообменного связывания (сорбции) можно представить в виде реакции



Добавление в колонку раствора $NaCl$ с высокой ионной силой вызывает обратное протекание этой реакции. Происходит высвобождение связанного белка. Процесс десорбции проводят, сразу добавляя раствор высокой ионной силы, или осуществляя постепенное добавление соли в градиенте. Градиентная элюция позволяет собирать отдельные фракции примесей и получать достаточно чистые вещества.

ПОДГОТОВКА И ВВОД ОБРАЗЦА БЕЛКА. 1%-ный раствор белка в обессоленной воде пропускают через уравновешенную 0,1 М трис- HCl буфером рН 7,8 колонку с ДЭАЭЦ со скоростью 10 – 20 мл/ч (или 1 капля за 8 с). После проведения процесса сорбции, колонку промывают буферным раствором до прекращения появления белковых примесей на выходе колонки (капельная проба на белок или регистрация в проточном спектрофотометре).

ЭЛЮЦИЯ И СБОР ФРАКЦИЙ. После промывки, в колонку с ДЭАЭЦ подают 1 М раствор $NaCl$ на 0,1 М трис- HCl -буфере рН 7,8. Подачу раствора осуществляют через автоматический градиентный смеситель (градиент от 0 до 100 % за 1 ч), собирая по 1 – 5 мл фракции в отдельные пробирки или сразу включая подачу раствора, если в качестве белка используют достаточно чистые образцы. В полученных фракциях спектрофотометрически определяют содержание белка и строят зависимость концентрации белка (оптической плотности) от объема элюента. Полученная зависимость представляет собой хроматограмму элюции.

По окончании работы колонку подвергают регенерации промывкой рабочим буфером и через 5 – 10 циклов сорбции промывают 0,2 М раствором $NaOH$ или этанолом. Для длительной консервации колонку заполняют 0,5 %-ным раствором фенола или этанолом.

Расчет. Зная концентрацию белка в собранных фракциях, а также количество самих фракций рассчитывают количество собранного в

результате ИОХ белка. Сравнить полученное значение с количеством белка, взятого на очистку.

Практический выход белка после очистки определяют по формуле: выход, % = $G_1 / G_2 \cdot 100$, где G_1 и G_2 – количества белка до и после очистки.

Контрольные вопросы

1. Что называют ионообменной хроматографией?
2. Назвать вещества, применяемые в хроматографии. Каковы требования к их чистоте и свойствам?
3. Что представляет собой молекула белка в твердом состоянии и в растворе? Как влияют примеси на поведение в растворе белковых молекул в присутствии и отсутствии хроматографического сорбента?
4. Что можно очистить с помощью ионообменной хроматографии?

Работа 10. Очистка белков методом гель-проникающей хроматографии

Для разделения и очистки белков применяют метод гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Если раствор белка пропускать через колонку, заполненную специальным сорбентом, например, набухшим в соответствующем буферном растворе сефадексом, то крупные молекулы белка (и некоторые примеси), размер которых превышает размеры пор набухшего сефадекса, будут двигаться вдоль колонки относительно быстро, так как они не будут проникать внутрь гранул сорбента. Мелкие молекулы, например, соли, будут двигаться медленнее из-за проникновения внутрь гранул. За счет разной скорости движения происходит отделение соли от белковых молекул – обессоливание в ходе гель-фильтрации (см. главу 3).

Сефадексы являются сшитыми полисахаридами, нерастворимыми в воде и солевых растворах. В слабых растворах кислот и щелочей сефадексы обладают устойчивостью. Высокое содержание в структуре сефадекса гидроксильных –ОН групп придает сорбентам гидрофильные свойства, что делает их непригодными для работы с лабильными веществами. В настоящее время разработано большое количество сорбентов для ГПХ. Свойства наиболее часто применяемых декстрановых сефадексов фирмы Pharmacia (Швеция) представлены в главе 3 (табл. 3.5).

Сефадекс в рабочем состоянии представляет собой набухший полимерный гель. При заполнении колонки различают ее общий объем (V_0), объем растворителя внутри гранул или внутренний объем (V_B) и объем растворителя вне гранул или наружный объем (V_H). Коэффициент распределения (K_p) растворенного вещества между внутренним объемом

сорбента и его наружным объемом находят из соотношения: $K_p = (V_a - V_n) / V_b$.

Наружный или свободный объем находят экспериментально, пропуская через колонку высокомолекулярное вещество, например краситель – голубой декстран с молекулярной массой 2 млн. Дальтон. Вещество с такой большой молекулярной массой не задерживается гранулами. Объем элюата, в котором выходит голубой декстран, равен наружному (свободному) объему. Объем элюата, собранного с колонки за время от ввода в колонку образца до появления на выходе колонки максимальной концентрации белка (пик на хроматограмме), называют объемом элюции ($V_э$). Принимая $V_b = V_o - V_n$, уравнение для K_p приобретает вид: $K_p = (V_э - V_n) : (V_o - V_n)$.

Для очень высокомолекулярных веществ $K_p = 0$, $V_э = V_n$ и вещество не проникает внутрь гранул. Для низкомолекулярных веществ $K_p = 1$, $V_э = V_n$ и вещество равномерно распределено между внутренним и наружным объемами растворителя.

Наиболее удобен метод ГПХ применять для обессоливания белков.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или проточной спектрофотометр с потенциометром. Хроматографическая колонка с запорными фланцами, соединенная пластиковым шлангом с дозирующим насосом. Микрошприц или пипетка на 500 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. Коллектор фракций или штатив с 50 пробирками.

Реактивы. 1. 1 %-ный раствор белка в 1 %-ном растворе хлорида или сульфата натрия. 2. 1 %-ный раствор красителя голубого декстрана Dextran Blue. 3. 2 М раствор хлорида натрия с белком. 4. 0,2 М раствор NaOH. 5. Дистиллированная вода. 6. Сефадекс G - 25. 7. 50 mM раствор NH_4HCO_3 . 8. Фенол.

Ход работы

ПОДГОТОВКА СЕФАДЕКСА К РАБОТЕ. В стакан помещают сефадекс и заливают его 50-кратным количеством дистиллированной воды и выдерживают смесь в течение времени, обеспечивающим полное набухание (указано в табл. 3.5 свойств сефадексов). Если сорбент не стандартизован по гранулометрическому составу, то проводят операцию отмывки от мелких частиц. Для этого набухший сорбент взбалтывают с небольшим избытком воды, позволяют осесть основному количеству частиц в течение нескольких мин и сливают мутную надосадочную жидкость. Операцию повторяют 3 – 5 раз до тех пор, пока надосадочная жидкость не окажется прозрачной. Обработанный таким образом сорбент не содержит мельчайших частиц, оказывающих сильное гидравлическое сопротивление потоку жидкости в колонке.

ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНКИ. Колонку закрепляют вертикально. В верх колонки помещают воронку и выливают в колонку суспензию

сорбента. При этом обеспечивают проток жидкости самотеком, если подача элюента будет осуществляться без дозирующего насоса или отсасывают жидкость примерно с предполагаемой скоростью подачи элюента насосом. Происходит оседание частиц сорбента и их одновременное уплотнение в слое. Формирование слоя сорбента необходимо производить непрерывно, то есть заливать весь сорбент сразу, поскольку добавление суспензии частями может привести к образованию в заполненном слое уплотненных зон мелких частиц, что приведет к размыванию получаемых при хроматографии пиков. Количество влажного сорбента должно быть таким, чтобы после оседания частиц верхняя граница слоя сорбента находилась на минимальном расстоянии от верхнего запирающего фланца колонки. В шлангах и слое сорбента не должно быть пузырей воздуха, наличие которых также искажает результаты разделения.

Правильность заполнения колонки проверяют нанесением на колонку окрашенного вещества, например, 1%-ного раствора голубого декстрана. Если при хроматографировании вещество движется по колонке узкой ровной полосой, значит заполнение колонки, а также ввод пробы осуществлены оптимально.

ПРОМЫВКА КОЛОНКИ. Колонку промывают 3 объемами (от объема колонки) элюента, в качестве которого используют дистиллированную воду или 50 мМ раствор аммония бикарбоната. Скорость промывки колонки должна быть равной скорости последующего хроматографирования (при помощи насоса или самотеком).

ПОДГОТОВКА И ВВОД ОБРАЗЦА БЕЛКА. За один цикл хроматографирования вводят в колонку объем раствора с белком в количестве не превышающем 1/4 объема колонки. Чем меньше объем вводимой пробы, тем лучше произойдет разделение. Оптимальное соотношение объема вводимой пробы и объема колонки составляет от 1:10 до 1:100.

Для колонки, содержащий верхний дозирующий фланец, ввод пробы осуществляют насосом, например, закачивая 1 мл пробы в 100 мл колонку с последующим переключением на подачу элюирующего раствора.

При элюции самотеком ввод пробы осуществляют следующим образом. Сливают жидкость из колонки через нижний выход до тех пор, пока надсадочный слой жидкости не дойдет до верхнего края слоя сорбента (не допускать пересыхания геля), шприцем или пипеткой осторожно по капле выливают на верхний слой сорбента без его взбалтывания пробу, сливают жидкость с колонки почти до полного исчезновения верхнего слоя жидкости (позволяют пробе впитаться в слой сорбента), далее осуществляют элюцию самотеком, подливая элюент в колонку. При нанесении пробы таким способом для сохранения слоя

сорбента лучше положить на его верхнюю часть кружок фильтровальной бумаги.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО ОБЪЕМА КОЛОНКИ. После заполнения колонки определяют свободный объем. Осуществляют ввод образца (0,1 мл 1%-ного раствора голубого декстрана) в колонку одним из указанных способов. Начинают процесс элюирования (подачи растворителя или элюента). Объем жидкости, собранный на выходе за время от начала элюирования до появления на выходе красителя принимают равным свободному объему колонки.

ЭЛЮЦИЯ. После нанесения образца на колонку (ввода пробы) включают дозирующий насос или самотеком из резервуара, расположенного выше колонки, подают в колонку с постоянной скоростью элюент.

Оптимальная скорость элюции составляет 1 мл/мин. Точнее скорость элюции выражают количеством мл жидкости, приходящимся на единицу сечения слоя сорбента (приблизительно диаметра колонки), мл/см². При больших скоростях элюирования происходит плохое разделение фракций. В качестве элюирующего раствора (элюента) используют воду или буферные растворы с ионной силой 0,05–0,2.

Использование в качестве элюента 50 мМ раствора NH₄НСО₃ позволяет получать обессоленный от хлорида натрия белок, который в дальнейшем может быть высушен, например, в лиофильной сушилке. Аммония бикарбонат в ходе сушки улетучивается.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ. При использовании проточного спектрофотометра и коллектора фракций регистрируют наличие в собираемой фракции белка при 280 нм. На самописце происходит автоматически запись хроматограммы – зависимости поглощения белка от времени (количества прошедшего элюента).

Сбор фракций можно проводить в ручном режиме. Для этого собирают в пробирки по 3 мл элюата и замеряют в каждой пробирке поглощение белка при 280 нм (определяют содержание белка). Каждая пробирка соответствует одной собранной фракции (части) белка. В первых пробирках белок обнаруживаться не будет, так как в них собираются первые порции элюата. Получают результат распределения белка по фракциям в ходе гель-фильтрации в виде хроматограммы.

ПРОМЫВКА И РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЛОНКИ ПОСЛЕ ГПХ. После выхода белка с колонки продолжают сбор еще несколько фракций и проверяют в них наличие соли. Автоматическая регистрация хроматограммы позволяет наблюдать второй пик, соответствующий наличию соли.

При сборе фракций вручную в пробирках делают пробы на наличие соли. Например, если исходный раствор белка содержит в качестве

примеси сульфат натрия, то смешение 1 капли раствора из пробирки с 1 – 2 каплями 2%-ного раствора хлорида бария (проба на сульфаты) вызовет образование осадка.

Продолжают промывку колонки элюентом, пропуская его в количестве 3 объемов колонки.

Сильно загрязненную колонку промывают последовательно 0,2 М раствором NaOH, дистиллированной водой и элюентом. Количество промывочных растворов составляет 2-5 объемов колонки.

Удаление с колонки остатков декстрана можно производить пропусканием раствора альбумина или другого водорастворимого белка.

Колонку с гелем для длительного хранения заполняют раствором, содержащим несколько капель антисептика – фенола, хлороформа или азиды натрия.

Расчет. На полученной хроматограмме отмечают наружный или свободный объем колонки (V_H) и элюионный объем (V_E), равный суммарному объему элюента, собранного от нанесения белка до выхода максимальной концентрации белка и определяют K_p .

Контрольные вопросы

1. Что называют гель-хроматографическим разделением белков?
2. Объяснить основные принципы проведения гель-проникающей хроматографии.
3. Назвать вещества, применяемые в процессе гель-хроматографии. Каковы требования к их чистоте?
4. Что представляет собой молекула белка в твердом состоянии и в растворе? Как влияют примеси на поведение в растворе белковых молекул в присутствии и отсутствии хроматографического сорбента?
5. Что такое сефадексы?
6. Каковы оптимальные условия элюции?
7. Почему плохо подготовленная система для хроматографии влияет на качество разделения и конечные результаты работы?
8. Почему требуется регенерация колонки? Как правильно хранить хроматографические колонки?

Работа 11. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-проникающей хроматографии

Белки не являются гомогенными веществами. Любой образец белка, даже самый высокоочищенный, может содержать от 0,01 до 10% и более примесей белков аналогичной или совершенно другой химической структуры.

Изучение фракционного состава вещества является важной прикладной задачей. Например, лекарство должно содержать определенные белковые фракции, которые обладают терапевтическим эффектом, химический реагент должен обладать максимальной чистотой для получения чистого продукта и так далее.

Сами белки также отличаются друг от друга не только по строению, но и по молекулярной массе. В табл. 4.6 указаны некоторые белки с характерными молекулярными массами.

Метод гель-проникающей хроматографии позволяет изучать молекулярно-массовое распределение белков (см. главу 3)

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или проточный спектрофотометр с регистрирующим потенциометром. Хроматографическая колонка с запорными фланцами, соединенная пластиковым шлангом с дозирующим насосом. Микрошприц или пипетка на 500 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. Коллектор фракций или штатив с 50 пробирками.

Реактивы . 1. 1%-ный раствор белков в 1%-ном растворе хлорида или сульфата натрия. 2. 1%-ный раствор голубого декстрана. 3. 2 М раствор хлорида натрия. 4. 0,2 М раствор NaOH. 5. Дистиллированная вода. 6. Сефадекс G - 25. 7. 50 мМ раствор NH_4HCO_3 . 8. Фенол. 9. Стандарты белков (инсулин, альбумин, цитохром или трипсин).

Ход определения

1. Подготовку сефадекса к работе, заполнение хроматографической колонки и подготовку хроматографической системы осуществляют как указано в лабораторной работе "Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-проникающей хроматографии", а также в главе 3.

2. На колонку наносят 0,1 мл раствора стандартной смеси белков, которую готовят растворением трех известных белков с установленными молекулярными массами. Концентрация каждого стандартного белка должна быть достаточной, чтобы на хроматограмме в выбранном масштабе получить три отдельно стоящих друг от друга пика. Считается, что хорошее разделение наблюдают тогда, когда расстояние от конца одного пика до начала следующего в два раза превышает полуширину пика, т.е. основания пиков должны четко отделяться друг от друга. В условиях опыта можно воспользоваться раствором 10 мг/мл смеси инсулина, цитохрома и альбумина в 50 мМ растворе NH_4HCO_3 для колонки 1 x 40 см.

Записывают хроматограмму, по которой определяют элюционный объем (V_e) для каждого белка.

3. На колонку наносят 0,1 мл раствора 10 мг/мл смеси двух-трех белков с разной молекулярной массой или анализируют неизвестный образец, содержащий разные фракции. Получают хроматограмму, по

которой определяют элюционный объем ($V_э$) для каждого неизвестного белка (для каждой фракции белка).

По окончании опыта проводят регенерацию колонки, как указано в лабораторной работе "Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-проникающей хроматографии".

Т а б л и ц а 4.6

Молекулярные массы некоторых известных белков

Наименование белка	Молекулярная масса
Гемоцианин	2.800.000
Тироглобулин	660.000
Миозин	525.000
Фибриноген человека	330.000
Миозин (Н-цепь)	200.000
Гамма-глобулин сыворотки крови	160.000
Альбумин сыворотки крови человека	68.500
Гемоглобин лошади	68.000
Каталаза (печени человека)	58.000
Гамма-глобулин (Н-цепь)	50.000
Овальбумин	43.000
Альдолаза мышечная	40.000
Бета-лактоглобулин молока	37.000
Пепсин	35.500
Карбоксипептидаза А	34.000
Химотрипсин	23.240
Трипсин	22.300
Миоглобин лошади	16.900
Гемоглобин крови человека	15.500
Лизоцим (яичного белка)	14.300
Рибонуклеаза	14.000
Цитохром С (бычий)	13.350
Инсулин человека	5.807

Расчет. На полученной хроматограмме отмечают наружный или свободный объем колонки ($V_н$) и элюционный объем ($V_э$), равный суммарному объему элюента, собранного за время от нанесения белка до выхода максимальной концентрации белка и определяют K_p .

Строят градуировочный график в координатах: $\log M - V_э$, где: M – молекулярная масса стандартного белка, $V_э$ – объем элюции, определяемый экспериментально по хроматограмме для каждого стандартного белка, как это показано на рис. 4.6.

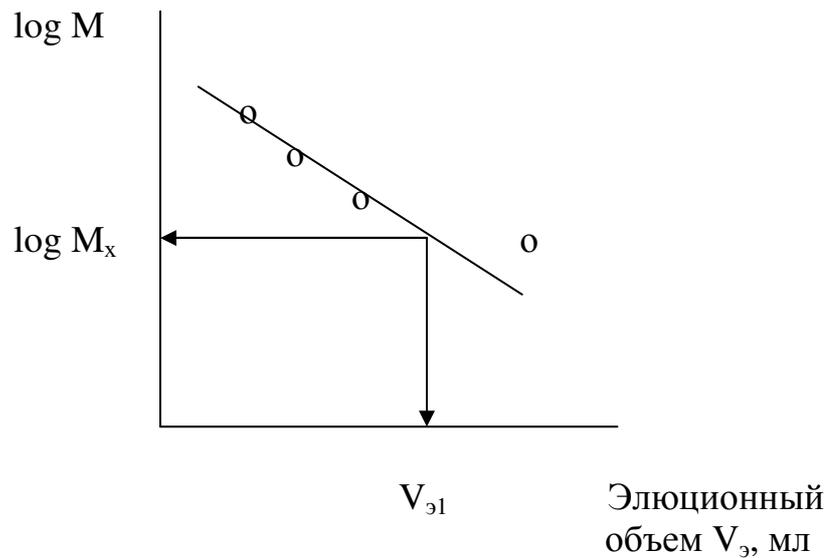


Рис. 4.6. Определение молекулярной массы по данным гель-хроматографии; V_{э1} – элюционный объем для неизвестного белка

По градуировочному графику, зная объем элюции V_{э1} для неизвестного белка, находят определяемую молекулярную массу M_x. Проводят определение для всех полученных фракций и, зная содержание белка в этих фракциях в %, записывают итоговый фракционный состав анализируемого образца: номер фракции – количество белка в данной фракции – молекулярная масса.

Контрольные вопросы

1. Объяснить основные принципы гель-проникающей хроматографии.
2. Назвать вещества, применяемые в процессе гель-хроматографии. Каковы требования к их чистоте?
3. Что представляет собой молекула белка в твердом состоянии и в растворе? Как влияют примеси на поведение в растворе белковых молекул в присутствии и отсутствии хроматографического сорбента?
4. Назвать условия проведения опыта по определению молекулярной массы белка (около 70000) методом гель-хроматографии.
5. Каковы оптимальные условия элюции низкомолекулярных белков?
6. Почему плохо подготовленная система для хроматографии влияет на качество разделения и конечные результаты работы?
7. Почему требуется регенерация колонки? Как правильно хранить хроматографические колонки?

Ферменты

Работа 12. Определение активности пенициллинацилазы

Ферментами называют химические вещества белковой природы, которые содержатся в живых организмах и ускоряют протекание биохимических процессов в клетке. Выделенные в чистом виде ферменты сохраняют каталитическую активность и используются в промышленных процессах получения сложных химических веществ.

Для расчета технологических параметров процессов с участием ферментов необходимо знать их удельную активность – величину, характеризующую способность фермента превращать одно вещество (субстрат) в другое (продукт).

Выбор метода определения активности фермента зависит от физико-химических свойств самого фермента и субстрата, на который он воздействует.

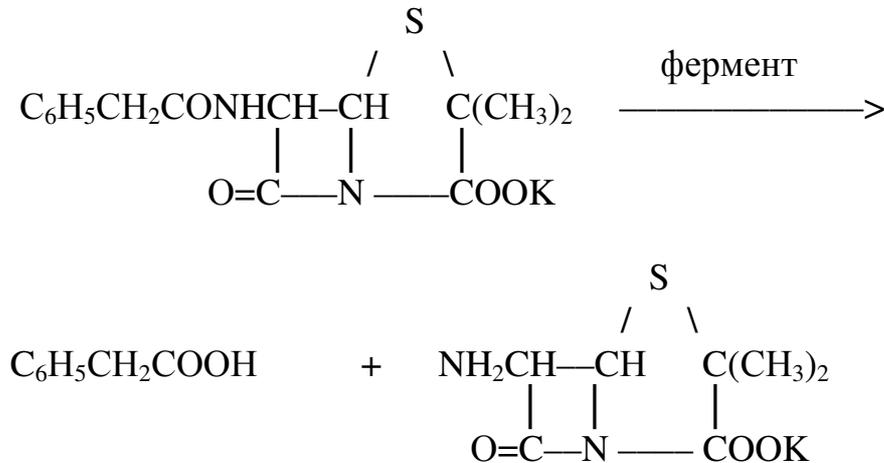
Пенициллинацилаза является ферментом, который расщепляет антибиотик пенициллин, то есть после приема внутрь пенициллина или его производных (ампициллина, феноксиметилпенициллина) в организме происходит биодegradация лекарства, ускоряемая наличием пенициллинацилазы. Очищенная пенициллинацилаза используется в производстве аминокислот. Активность пенициллинацилазы и других ферментов выражают в единицах биологического (или биохимического) действия, отнесенных к единице массы фермента, или к единице объема его раствора, Е/г (Е/мл).

Оборудование. Термостатируемая ячейка с рубашкой и мешалкой (магнитной или механической), вместимостью (25 – 100) мл. рН-метр. Бюретка на 25 мл. Термометр, предел измерения 0 – 100°C. Термостат. Секундомер.

Реактивы. 1. Раствор бензилпенициллина натриевая или калиевая соль известной концентрации (рН 7,5). 2. Раствор NaOH 0,1 М. 3. Ферментный препарат (нативный или иммобилизованный).

Ход работы. В термостатируемый реактор, снабженный механической или магнитной мешалкой, помещают раствор субстрата (бензилпенициллина калиевой соли) известной концентрации с рН 7,5. Когда раствор субстрата нагреется до температуры $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ в раствор субстрата вносят нативный или иммобилизованный ферментный препарат. Затем в раствор начинают прикапывать из бюретки 0,1 М раствор NaOH, предварительно опустив в раствор рН-электрод. Добавлением NaOH нейтрализуют образующуюся в результате протекающей реакции $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOH}$ (фенилуксусную кислоту), поддерживая значение рН равным 7,5 и отмечая расход NaOH в мл в единицу времени, а также

контролируя значение рН по показаниям рН-метра. Схема реакции может быть записана:



Расчет. Активность фермента (А) рассчитывают по следующей формуле:

$$A = \frac{M_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot 60 \cdot 1000 \cdot V_0}{\Delta t \cdot C_x \cdot G}, \text{ мкМоль/Г}\cdot\text{час, (Е/г)},$$

где М – молярность раствора NaOH, моль/л; V_0 – изменение объема раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл; t – время между измерениями объема V раствора NaOH, пошедшего на титрование, мин; С – концентрация раствора бензилпенициллина калиевой соли, % ; G(V) – количество иммобилизованного или нативного ферментного препарата, взятого на анализ, г (мл). Если подставляют значения объема раствора V, то активность фермента будет выражена в мкМоль/мл·час (Е/мл·час). V_0 – объем реакционного раствора в ячейке, мл.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под удельной активностью фермента?
2. Что такое температурный оптимум ферментативной активности?
3. Что такое рН-оптимум ферментативной активности?
4. Для чего важно знать активность ферментного препарата?

Работа 13. Анализ ферментов. Определение ферментной активности препаратов

Существенную роль в различных областях играют ферменты, которые представляют собой специфические белки определенной молекулярной массы, как правило, от 10 до 300 кДа, способствующие протеканию различных биохимических реакций в живом организме, а также при получении различных веществ биотехнологическим способом.

Специальные свойства белков, проявляющих энзиматическую активность, оценивают по удельной каталитической активности данного фермента, выраженной в ЕД/г массы вещества или в ЕД/мл раствора (ед/г или ед/мл, u/g, u/mg, u/ml). Наибольший интерес представляет оценка специфической (пептидазной – расщепления белков, липазной – расщепления жиров и амилолитической – расщепления углеводов) активности белковых ферментов.

Опыт 1. Определение амилазной активности панкреатина

Панкреатин представляет собой полиферментный препарат, применяемый в качестве лекарственного вещества в медицинской практике и получаемый из поджелудочной железы убойного скота. В панкреатине в качестве основных компонентов содержится комплекс протеиназ и амилаз, поэтому панкреатин проявляет протеолитическую (протеазную) и амилолитическую (амилазную) активности. Протеазная активность панкреатина обуславливает способность расщеплять белки и пептиды, а амилазная активность проявляется в способности гидролизовать крахмал.

За единицу амилолитической активности принимается такое количество фермента, которое в данных условиях эксперимента гидролизует крахмал со скоростью образования одного микроэквивалента декстринов в одну минуту.

Реактивы и материалы. 1. 1%-ный раствор крахмала. Раствор готовят суспензированием 1 г растворимого крахмала в 25 мл дистиллированной воды при температуре 30 – 40°C с последующим добавлением 75 мл кипящей воды. Раствор кипятят, перемешивая, в течение трех минут. Срок хранения раствора не более двух суток.

2. Фосфатный буфер pH 6,8. Готовят раствор 1 растворением 27,2 г монофосфата калия KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды. Раствор 2 получают растворением 71,5 натрия фосфорнокислого двузамещенного $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды. Смешивают 1:1 растворы 1 и 2. 3. 0,2 М раствор хлорида натрия. Раствор готовят растворением 0,58 г NaCl в 50 мл воды. 4. Раствор препарата, свежеприготовленный. Навеску 0,06 г фермента (панкреатина) растворяют в мерной колбе в 50 мл фосфатного буфера pH 6,8 и доводят объем раствора до 100 мл добавлением фосфатного буфера pH 6,8. 5. 2 М раствор HCl . 6. 0,1 М

раствор йода. Раствор готовят растворением 13 г йода кристаллического J_2 и 36 г калия йодида KJ в 50 мл воды с последующим доведением объема раствора водой до объема 1 л. 7. Раствор серной кислоты (3,5 М). Разбавленный раствор готовят смешением четырех объемов воды и одного объема концентрированной H_2SO_4 . 8. 0,1 М раствор тиосульфата натрия. Раствор готовят растворением 24,8 г $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в 1 л дистиллированной воды. Перед использованием проводят контрольное титрование 0,1 М раствором йода (готовят из фиксаля) с крахмалом для определения поправочного коэффициента (К). 9. Вода дистиллированная. 10. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 30 – 40°C. Секундомер. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл.

Ход определения

1. В две конические колбы Эрленмейера со шлифами вместимостью 250 мл вносят по 25 мл 1%-ного раствора крахмала, 10 мл фосфатного буфера рН 6,8, 1 мл 0,2 М раствора хлорида натрия, закрывают пробками, помещают в термостат с температурой $(37,0 \pm 0,5)^\circ C$ и выдерживают в течение 10 мин.

2. Затем в колбу № 1 (опытная проба) прибавляют 1 мл раствора препарата, быстро перемешивают, возвращают колбу в термостат и включают секундомер. В колбу № 2 (контроль) прибавляют по 1 мл 2 М раствора HCl и раствора препарата, перемешивают и возвращают в баню.

Через 10 мин после прибавления раствора препарата в колбу № 1 вносят 1 мл 2 М раствора HCl (останавливают процесс работы фермента), колбы вынимают и охлаждают до комнатной температуры (можно под струей холодной воды).

3. В каждую колбу вносят по 20 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,1 М раствора йода и сразу же 45 мл 0,1 М раствора $NaOH$. Колбы помещают в шкаф, в темное место и выдерживают в течение 15 мин.

4. После выдержки в колбы, содержащие избыток непрореагировавшего йода, прибавляют по 4 мл раствора серной кислоты, 2 капли раствора крахмала и титруют 0,1 М раствором тиосульфата натрия.

Расчет. Активность (А) препарата в амиллитических единицах на грамм определяют по формуле $A, \text{ЕД/г} = \frac{100}{[1/5(b - a) - 0,006] \cdot m}$,

где b – количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы; a – количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование опытной пробы; m – навеска препарата, г.

Активность 1 г качественного фермента не должна быть меньше 10000 ЕД.

Опыт 2. Определение нуклеазной активности препаратов, содержащих РНКазу

Высокое содержание нуклеиновых компонентов в живых клетках и тканях, например до 6 – 12 % масс. в дрожжах, до 16 % масс. в бактериях, регулируется наличием белковых ферментов, обладающих нуклеазной активностью. Ферменты с такой активностью применяются в научных исследованиях и в различных биотехнологических процессах.

Реактивы и материалы.

1. 0,2 М ацетатный буфер pH 5,0. Раствор готовят смешением 70 мл 0,2 М раствора ацетата натрия, содержащего 27,22 г/л $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, и 30 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты, содержащего 11,5 мл ледяной CH_3COOH в 1 л раствора.

2. 0,75 %-ный раствор уранилацетата в 25%-ном растворе HClO_4 . Раствор готовят растворением 0,75 г $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 99,75 г (85,6 мл) 25 %-ного раствора HClO_4 , приготовленного смешением 50 мл концентрированного, 68 %-ного раствора HClO_4 с 86 мл дистиллированной воды.

3. Ферментный препарат, содержащий РНКазу (5 – 10%-ная суспензия пивных дрожжей).

4. 0,8 %-ный раствор РНК.

5. Вода дистиллированная.

6. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед. Воронки с фильтровальной бумагой. Центрифуга на 5000 об/мин. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20 – 30°C.

Ход определения

1. В пробирки вносят по 0,4 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 5,0 и 0,5 мл 0,8%-ного раствора РНК. В первую колбу вносят 0,5 мл 0,75%-ного раствора уранилацетата в 25%-ном растворе HClO_4 (контрольная проба) для подавления активности фермента. В обе пробирки вносят по 0,4 мл исследуемого раствора фермента и выдерживают в течение 25 мин при температуре 25°C. После выдержки во вторую пробирку прибавляют 0,5 мл 0,75 %-ного раствора уранилацетата в 25%-ном растворе HClO_4 .

2. В обе пробирки приливают по 1,2 мл воды и оставляют в холодильнике при температуре +4°C на 30 мин. Образующийся осадок отделяют фильтрацией через слой фильтровальной бумаги или центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин.

3. 0,1 мл фильтрата смешивают с 3 мл дистиллированной воды и измеряют поглощение при 260 нм.

Расчет. Активность (А) препарата в нуклеазных единицах на миллилитр раствора определяют по формуле

$$A, \text{ЕД/мл} = \frac{1}{0,4} (D_1 - D_2) \cdot P,$$

где $D_1 - D_2$ – разность оптических плотностей опытной и контрольной проб; P – разведение исходного ферментного раствора; 0,4 – объем ферментного раствора, взятого на анализ.

Опыт 3. Определение протеиназной активности ферментных препаратов

Ряд микробных ферментов, например сериновая протеаза из *Staphylococcus aureus*, имеет молекулярную массу 27000, $E_{280} = 11,5$, оптимум рН 4,0–7,8 по гемоглобину и обладает способностью к специфическому расщеплению полипептидной цепи по –COOH-концам аминокислотных остатков Asp или Glu. Ингибиторами протеазы являются диизопротилфторфосфат и некоторые анионы: Cl^- , F^- , CH_3COO^- , NO_3^- , Br^- . Многие другие ферментные препараты также обладают пептидазной активностью.

За единицу пептидазной активности (ЕД) принимается количество фермента, которое высвобождает растворимые аминокислоты эквивалентно изменению скорости поглощения раствора $0,001D_{280}$ в минуту при температуре 37°C и рН 7,8.

Реактивы и материалы.

1. 1%-ный раствор казеина в 0,05 М трис- PO_4 буфере рН 7. Готовят растворением 1 г не содержащего витаминов казеина в 50 мл 0,01 М (0,4 г/л) NaOH. К раствору добавляют 40 мл дистиллированной воды и 5 мл 1 М раствора триса, который получен растворением 121,14 г трис(гидроксиметил)аминометана $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ в 1 л воды, устанавливают рН раствора равным 7, добавляя концентрированный раствор H_3PO_4 , и доводят общий объем раствора до 100 мл.

2. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворяют 10 г CCl_3COOH в 90 мл воды.

3. 1 мг/мл раствор ферментного препарата. Готовят растворением чистой протеазы или используют клеточные биопрепараты.

4. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед, термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале $30\text{--}40^\circ\text{C}$. Воронки с фильтровальной бумагой.

Ход определения

1. В две пробирки вносят по 5 мл 1%-ного раствора казеина, термостатируют при температуре 37°C в течение 5 мин, добавляют в 1-ю

пробирку 10 мл дистиллированной воды (контроль), во 2-ю – 1 мл раствора ферментного препарата (проба). Добавляемый объем раствора может быть уменьшен до 20 мкл в зависимости от активности фермента. Пробу перемешивают и выдерживают при температуре 37°C в течение 10 мин.

2. В обе пробирки добавляют по 5 мл раствора ТХУ, выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре и фильтруют через бумажные фильтры.

3. Замеряют на спектрофотометре значение оптической плотности против контроля.

Расчет. Рассчитывают значение протеазной активности (А) по формуле

$$A, \text{ ЕД/мг} = \frac{(D_{280\text{пробы}} - D_{280\text{контроль}})}{10 \text{ g}},$$

где $D_{280\text{пробы}} - D_{280\text{контроль}}$ – разность значений оптических плотностей растворов пробы и контроля; 10 – время, мин; g – содержание фермента (навеска) во взятом на определение объеме раствора (в 10 мл). При анализе неизвестного ферментного раствора допускается вместо значения g использовать значение объема раствора, тогда найденная активность будет выражаться в ЕД/мл.

Опыт 4. Определение липолитической (липазной) активности фермента

Реактивы и материалы. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Колбы со шлифом вместимостью 50 – 1000 мл. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. стакан или колба вместимостью 1 дм³ с мешалкой и баней для подогрева. рН-метр. Мерная колба вместимостью 1 дм³. Устройство для фильтрования растворов через бумажный фильтр. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20 – 100°C. Колба Эрленмейера вместимостью 200 мл. Бюретка на 50 – 100 мл. Соляная кислота, х.ч., 0,1 М раствор. Поливиниловый спирт. Натрия гидроксид, чда, 0,05 М и 0,1 М раствор. (Трисгидроксиметил)аминометан. Натрия хлорид х.ч. Фенолфталеин ч.д.а., 1%-ный спиртовой раствор. Масло оливковое. Этанол 95%-ный.

Подготовка к работе

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА.

20 г поливинилового спирта смешивают с 800 мл воды в течение 30 мин, добавляют 0,5 мл 0,1 М раствора HCl, термостатируют смесь при перемешивании в течение 1 ч при 90°C, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН раствора 7,0 добавлением 0,1 М раствора NaOH. Раствор количественно переносят в мерную колбу, доводят объем до 1 дм³ и фильтруют через бумажный фильтр. Срок хранения раствора 1 месяц.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА СУБСТРАТА. Смесь из 16 мл оливкового масла и 24 мл раствора поливинилового спирта перемешивают в стакане размельчителя тканей при 5000 об/мин в течение 15 мин. Субстрат готовят непосредственно перед использованием и не хранят.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТРИС-HCl БУФЕРНОГО РАСТВОРА (рН 9,0). 0,6060 г трис(гидроксиметил)аминометана и 2,34 г натрия хлорида растворяют в 800 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 9,0 добавлением 0,1 М раствора HCl и доводят объем раствора до 1 л.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 0,01% РАСТВОРА ЛИПАЗЫ. 0,01 г ферментного препарата растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят объем раствора до 100 мл добавлением буферного раствора и фильтруют через бумажный фильтр. Используют свежеприготовленный раствор.

Ход определения. В исследуемую колбу вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 10 мин, прибавляют 1 мл раствора испытуемого фермента, перемешивают и термостатируют при температуре 37°C в течение 1 ч.

К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно переносят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

В отдельную колбу вместимостью 50 мл (контроль) вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч. К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно переносят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл раствора ферментного препарата, 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

Расчет. Липолитическую активность (X, ЕД/мг) рассчитывают по формуле

$$X = (\Delta V \cdot 50 \cdot 100) / g \cdot 60 \cdot 1,$$

где ΔV – разность объемов раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной и контрольной пробы, мл; 50 – количество микромолей NaOH, содержащихся в 1 мл 0,05 М раствора NaOH; 100 – объем испытуемого раствора ферментного препарата первого разведения, мл; 1 – объем испытуемого раствора ферментного препарата взятого из первого разведения, мл; g – навеска ферментного препарата, мг; 60 – время гидролиза 40%-ной эмульсии оливкового масла, мин.

Липолитическая активность 1 мг ферментного препарата липазы, получаемого из поджелудочной железы свиней составляет не менее 4000 ЕД/мг.

Опыт 5. Определение удельной активности очищенного кристаллического трипсина

Трипсин, выделенный из панкреатического сырья хроматографическими методами, является протеолитическим ферментом, имеет молекулярную массу 23800, оптимум рН 8, изоэлектрическую точку 10,5; E_{280} – 1,3 и обеспечивает гидролиз (расщепление) полипептидной цепи белка по С-концам аминокислотных остатков лизина Lys и аргинина Arg. В этом проявляется специфическое действие трипсина. Фермент активируется в присутствии ионов Ca^{2+} и ингибируется диизопропилфторфосфатом и ионами Ag^+ .

Реактивы и материалы

1. 0,46 М Трис-НСl/0,0115 М $CaCl_2$ буфер рН 8,1. Готовят растворением 55,7 г трис(гидроксиметил)аминометана $NH_2C(CH_2OH)_3$ и 2,5 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ в 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8,1, добавляя конц. раствор HCl, и доводят общий объем раствора до 1 л.

2. 0,01 М раствор *p*-толуолсульфонил-L-аргинина метилового эфира (ТАМЕ). Готовят растворением 3,789 г ТАМЕ $C_{14}H_{22}N_4O_4S \cdot HCl$ в 1 л дистиллированной воды.

3. 0,001 М раствор HCl.

4. Раствор трипсина. Готовят растворением 10 мкг фермента в 1 мл 0,001 М раствора HCl.

5. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед. Воронки с фильтровальной бумагой. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20 – 30°C.

Ход определения. Вносят в 2 кюветы по 2,6 мл 0,46 М Трис-НСl/0,0115 М $CaCl_2$ буфера и 0,3 мл 0,01 М раствора ТАМЕ, инкубируют в термостате при температуре 25°C в течение 3 мин. Во 2-ю кювету добавляют 0,1 мл 0,001 М раствора HCl (контрольная проба), в 1-ю кювету вносят 0,1 мл раствора фермента и замеряют при 247 нм изменение

значение оптической плотности D против контрольной пробы в течение первых 3 мин после внесения раствора фермента.

Расчет. Вычисляют значение удельной активности трипсина A (ЕД/мг) по формуле

$$A, \text{ ЕД/мг} = \frac{\Delta D_{247}/\text{мин} \cdot 1000 \cdot 3}{540 \cdot g},$$

где $\Delta D_{247}/\text{мин}$ – изменение значения оптической плотности в единицу времени; g – количество трипсина в мг, содержащееся в 0,1 мл пробы взятой в кювету на анализ.

Коммерческие препараты высокоочищенного трипсина имеют, как правило, удельную активность более 170 ЕД/мг по субстрату ТАМЕ.

Опыт 6. Количественное определение коллагенолитической активности

За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при взаимодействии с N_{α} -бензоил-D,L-аргинина-п-нитроанилидом (ВАРНА) в течение 30 мин при рН 7,5 и температуре 37°C увеличивает оптическую плотность раствора на 1,0 при длине волны 410 нм.

Оборудование и материалы. Спектрофотометр на 410 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с пришлифованными пробками. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20 – 40°C

Реактивы. Стандартный раствор коллагеназы (ГСО). N_{α} -бензоил-D,L-аргинина-п-нитроанилид (ВАРНА), 1 мг/мл раствор ВАРНА в 0,05 М трис-НСl буферном растворе рН 7,5. Уксусная кислота, 30%-ный раствор. Соляная кислота х.ч, 0,1 М раствор из фиксанала. Кальция хлорид, х.ч. Диметилформамид х.ч. Вода дистиллированная.

Подготовка к работе. 0,05 М трис-НСl буферный раствор рН 7,5 готовят в мерной колбе на 100 мл растворением 2,43 г трис(гидроксиметил)аминометана (трис) в 90 мл воды и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 5 мл полученного раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 45 мл 0,1 М раствора НСl и доводят объем раствора до 100 мл. В полученном растворе устанавливают рН 7,5 добавлением 0,1 М раствора НСl или раствором А и прибавляют 11,1 г кальция хлорида до растворения. Срок хранения раствора при 7°C 10 суток.

0,1%-ный раствор ферментного препарата готовят в мерной колбе на

25 мл раствором навески 0,025 г фермента в 20 мл 0,05 М трис-НСl буферного раствора рН 7,5 и доводят объем буфером до 25 мл. Срок хранения раствора при 7°С 8 ч.

Раствор N_α-бензоил-D,L-аргинина-п-нитроанилида (BAPNA) готовят в мерной колбе на 25 мл раствором навески 0,025 г BAPNA в 1 мл диметилформамида и доводят объем раствора субстрата 0,05 М трис-НСl буферным раствором рН 7,5 до 25 мл. Срок хранения раствора BAPNA при 7°С 48 ч.

Ход определения. В четыре пробирки вместимостью 10 мл вносят пипеткой по 0,5 мл 1 мг/мл раствора BAPNA в 0,05 М трис-НСl буферном растворе рН 7,5 и помещают в термостат с температурой 37°С на 10 мин в пробирки 1 и 2 пипеткой добавляют 0,1 мл 0,1%-ного раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы.

Все пробирки перемешивают и выдерживают в термостате при 37°С в течение 3 мин. Через 30 мин во все четыре пробирки пипеткой прибавляют по 1 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты, а в пробирки 3 и 4 пипеткой вносят 0,1 мл 0,1%-ного раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы ГСО соответственно.

В пробах определяют значение оптической плотности при длине волны 410 нм в слое 1 см. В качестве сравнения используют раствор пробирок 3 и 4.

Расчет. Коллагенолитическую активность коллагеназы X (ЕД/мг) вычисляют по формуле

$$X = A_{СТ} \cdot (D_1 / D_2) \cdot (P_2 / P_1) ,$$

где D₁ и D₂ – значения оптических плотностей растворов пробирок 1 и 2 соответственно; P₁ и P₂ – разведения 0,1 % растворов препарата и коллагеназы соответственно; A_{СТ} – коллагенолитическая активность ГСО коллагеназы, ЕД/мг.

Удельная коллагенолитическая активность препарата на мг белка (А, ЕД/мг белка) определяют по формуле

$$A = X / B,$$

где B – содержание белка в мг протеина на мг ферментного препарата.

Удельная коллагенолитическая активность ферментного препарата по нормативным требованиям должна быть не менее 20 ЕД/мг белка.

Опыт 7. Количественное определение коллагенолитической активности коллагеназы по оксипролину

За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при воздействии на субстрат (коллаген) в

условиях опыта в течение 1 мин при температуре 37°C выделяет 1 мкм оксипролина при 540 нм.

Оборудование и материалы. Спектрофотометр на 540 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с шлифованными пробками. Термостаты, обеспечивающие поддержание температуры в интервале 0–100°C и 100–150°C. Ампулы из термостойкого стекла вместимостью 10–20 мл или пробирка с герметично закручивающейся тефлоновой пробкой «Пирекс». Стаканчики вместимостью 25 мл. Устройство для фильтрования через бумажный фильтр.

Реактивы. Кислота уксусная ледяная, х.ч. Натрия ацетат х.ч. Вода дистиллированная. Тимол крист., ч.д.а. Кальция ацетат 0,3 М раствор. Кислота соляная х.ч., 0,01; 0,1; 6 М раствор. Натрия гидроксид х.ч., 0,01; 0,1; 6 М раствор. Хлорамин Б. Эфир диэтиловый ч.д.а. Пропиловый спирт х.ч. Этанол, х.ч. Лимонная кислота х.ч. п-Диметиламинобензальдегид ч.д.а., перекристаллизованный из спирта этилового. Хлорная кислота х.ч., 42%-ный раствор. Коллаген животный ММ 80 кДа или полученный по методике. Оксипролин х.ч.

Подготовка к работе. 0,1 М ацетатный буфер рН 5,6. Готовят растворением 0,58 мл уксусной кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 1,36 г ацетата натрия растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор Б). Смешивают растворы А и Б в соотношении 1:8. Срок хранения раствора при 7°C – 5 сут.

0,3 М раствор кальция ацетата готовят растворением навески 5,28 г ацетата кальция в мерной колбе вместимостью 100 мл в воде и доводят объем раствора до 100 мл. Срок хранения раствора при 7°C – 5 суток.

Реактив для окисления готовят растворением в мерной колбе вместимостью 25 мл 0,3525 г хлорамина Б в 2,5 мл воды, добавляют 2,5 мл пропилового спирта и доводят объем раствора до 25 мл прибавлением буферной смеси. Буферную смесь готовят растворением в 20 мл воды 5 г лимонной кислоты, 1,2 мл ледяной уксусной кислоты, 12 г натрия ацетата, 3,4 г NaOH, и доводят объем раствора А до метки – 100 мл (рН 6,0). Отдельно смешивают 30 мл пропилового спирта с 20 мл воды, получая раствор Б. Смешивают растворы А и Б в соотношении 2:1. Реактив для окисления готовят перед использованием.

Реактив для проведения цветной реакции готовят суспензированием в мерной колбе вместимостью 25 мл 2,5 г п-диметиламинобензальдегида в 15 мл пропанола, прибавляют 6,5 мл 42%-ного раствора HClO_4 , доводят

объем раствора до 25 мл прибавлением пропанола. Реактив для проведения цветной реакции готовят перед использованием.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНА. Парные или свежезамороженные ахилловы сухожилия крупного рогатого скота, очищенные от посторонних тканей, гомогенизируют с 4 объемами воды при 5°C в течение 2 мин. Выделение коллагена проводят при указанной температуре. Полученную массу экстрагируют (3 x 2 ч) 10 объемами 1%-ного раствора NaCl до отрицательной пробы на растворимые белки в экстрагенте.

Пробу на белок проводят, добавляя к 1 мл раствора 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 2 капли 1%-ного раствора CuSO₄, при взбалтывании не должно быть фиолетового окрашивания.

Экстрагированную ткань отделяют, промывают водой на сите до отрицательной реакции на хлориды. Пробу на Cl⁻ проводят, добавляя к 2 мл раствора 10 капель 1%-ного раствора AgNO₃, не должно образовываться осадка хлорида серебра.

Отделенную и промытую массу гомогенизируют с 15 объемами 0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Массу вновь гомогенизируют с 15 объемами 0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Надосадочные слои сливают. Осадок суспензируют в 50 объемах воды, pH смеси устанавливают 7,0 добавлением 0,1 М раствора HCl. Образовавшийся осадок отделяют от раствора на сите, промывают водой и гомогенизируют в 100 объемах 0,01 М раствора HCl в течение 3 мин. Гомогенат центрифугируют 5 мин при 3000 G, всплывшую пленку отбрасывают, надосадочную жидкость сливают в охлажденную емкость и медленно по каплям нейтрализуют 0,1 М раствором NaOH до pH 7,0.

Волокнистый осадок коллагена отделяют на сите, промывают 3 раза водой, обезвоживают, перемешивая в этаноле в течение 20 мин, в эфире в течение 10 мин и высушивают на воздухе. Срок хранения коллагена при -10°C составляет 6 мес.

Содержание оксипролина в коллагене проводят следующим образом. В две ампулы из термостойкого стекла или пробирки Пирекс помещают навески по 10 мг коллагена и прибавляют по 6 мл 6 М раствора HCl. Ампулы запаивают и проводят гидролиз при 100°C в течение 18 ч. Содержимое ампул количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, нейтрализуют 6 М раствором NaOH до pH 6, доводят объем раствора до 25 мл и фильтруют через бумажный фильтр. Далее содержание оксипролина в коллагене X (% масс.) определяют так, как это описано далее при определении коллагенолитической активности. Расчет проводят по формуле: $X = g \cdot 10^{-9} \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 / 0,5 \cdot 0,01(100-B)$, где $g \cdot 10^{-9}$ – количество оксипролина, найденное по калибровочному графику, моль; 0,5 – объем раствора, взятого для цветной реакции, мл; 0,01 –

навеска коллагена, г; В – содержание влаги в коллагене, %. Количество оксипролина в коллагене должно быть $> 0,1 \%$.

Построение градуировочного графика. Навеску 6,25 мг оксипролина растворяют в мерной колбе в 250 мл воды и получают раствор с содержанием оксипролина $190 \cdot 10^{-3}$ микромоль/мл. Готовят разведения (табл. 4.7).

К содержимому каждой пробирки прибавляют 1 мл реактива для окисления, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин, затем во все пробирки вносят по 1 мл реактива для проведения цветной реакции, пробирки закрывают пришлифованными пробками, выдерживают при 60°C в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры проточной водой и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм против контрольного раствора. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс общее количество оксипролина в микромолях, а по оси ординат – соответствующие оптические плотности.

Т а б л и ц а 4.7

Разведение растворов для определения оксипролина

Номер п/п	Раствор оксипролина, мл	Вода, мл	Содержание оксипролина, $\text{мкм} \cdot 10^{-3}$
1	0,2	1,8	38
2	0,4	1,6	76
3	0,6	1,4	114
4	0,8	1,2	152
5	1,0	1,0	190
6	1,2	0,8	228
7	1,4	0,6	266
9	1,6	0,4	304
Контроль	0	2,0	0

Ход определения. Навеску фермента в количестве 10 мг растворяют в 10 мл ацетатного буфера. В две пробирки на 10 мл помещают по 60 мг коллагена, 4 мл раствора ферментного препарата, 1,2 мл раствора ацетата кальция, 0,8 мл ацетатного буфера и несколько кристалликов тимола. Пробирки закрывают пробками и выдерживают при $(37,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч.

Остатки коллагена отделяют фильтрованием через бумажные фильтры в пробирки вместимостью 10 мл. По 2 мл фильтрата переносят в ампулы из термостойкого стекла, прибавляют 2 мл концентрированной

соляной кислоты, ампулы запаивают на газовой горелке и проводят гидролиз при температуре 110°C в течение 6 ч или при температуре 130°C в течение 3 ч.

После охлаждения содержимое ампул количественно переносят в стаканчики вместимостью 25 мл, нейтрализуют содержимое 6 М раствором NaOH, до pH 6,0, количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки, растворы фильтруют через бумажный фильтр.

В две опытные пробирки с притертыми пробками вносят по 2 мл нейтрализованного раствора, а в две контрольные пробирки – по 2 мл воды. Затем во все пробирки прибавляют по 1 мл реактива для окисления, встряхивают смесь при комнатной температуре в течение 20 мин, вносят по 1 мл раствора для проведения цветной реакции, перемешивают и закрывают пробирки стеклянными пробками.

Пробирки выдерживают при температуре $(60,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и не позднее, чем в течение 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм в толщине слоя 5 см против контрольного раствора.

Расчет. Коллагенолитическую активность коллагеназы в миллиединиц действия X (мЕД/мг) вычисляют по формуле

$$X = A \cdot 10^{-6} \cdot P / 1000g ,$$

где $A \cdot 10^{-6}$ – количество оксипролина, найденное по градуировочному графику в миллимолях (среднее из 2 определений); P – разведение (в условиях опыта $P = 93,75$); g – навеска ферментного препарата, мг. Разведение оценивают по формуле

$$X = V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 / V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 ,$$

где V_1 – объем раствора ферментного препарата, мл; V_2 – объем раствора ферментного препарата, взятый для анализа, мл; V_3 – объем раствора препарата взятый для инкубирования с коллагеном, мл; V_4 – объем раствора ферментного препарата, взятый для кислотного гидролиза, мл; V_5 – объем раствора после нейтрализации, мл; V_6 – объем раствора взятый для цветной реакции, мл.

Активность медицинского препарата с коллагенолитической активностью по ВФС 42–2483–96 составляет не менее 0,8 миллиЕД/мг.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под удельной активностью фермента?
2. Что такое температурный оптимум ферментативной активности?
3. Что такое рН-оптимум ферментативной активности?
4. Почему в работе при определении амилазной активности панкреатина в ходе опыта дважды используют раствор крахмала?
5. Порядок проведения титрования в аналитической химии.

Работа 14. Получение иммобилизованных ферментов. Аминоацилаза,
включенная в полиакриламидный гель

Роль ферментов – биологических катализаторов в жизни человека очень важна. Эти биологически активные вещества участвуют как в обмене веществ человеческого организма, так и в качестве основной субстанции в различных биотехнологических производствах с целью получения важных продуктов для медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Выделенные в чистом виде ферменты очень нестойки из-за разрушения имеющихся надмолекулярных структур. Кроме того фермент, в силу его высокой стоимости, целесообразно использовать многократно, а это возможно только в случае, если существует простой способ разделения фермента и продуктов реакции.

Для стабилизации ферментов с целью более длительного сохранения их активности и возможности многократного использования применяют различные способы химической или физико-химической фиксации молекул фермента в твердом носителе, например в полимерном геле. Такой процесс называют иммобилизацией и используют для получения полимерных гранул, содержащих включенный в них фермент.

Оборудование. Лабораторный рН-метр или универсальная индикаторная бумага. Магнитная мешалка. Стаканы вместимостью 25, 50, 100 мл. Сито металлическое с ячейками размером 0,5 – 0,7 мм.

Реактивы. 1. Пенициллинацилаза (ПА), активностью 50 – 100 Е/мг.
 2. Акриламид (АА) $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NH}_2$. 3. N,N'-метиленабисакриламид (бис-АА) $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$. 4. Глутаровый альдегид (ГА), 25%-ный раствор. 5. Аммония персульфат (ПСА) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. 6. Натрия фосфат двузамещенный $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 7. Калия фосфат однозамещенный KH_2PO_4 . 8. Раствор натрия гидроксида, 30%-ный. Все реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а.

Ход определения

1. Приготовление буферного раствора. Растворяют 11,876 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл дистиллированной воды (раствор 1). Растворяют

9,078 г K_2HPO_4 в 1000 мл дистиллированной воды (раствор 2). Смешивают 84 мл раствора 1 и 16 мл раствора 2.

2. Приготовление раствора пенициллинацилазы. 1 г порошка ПА смешивают с 5 мл буферного раствора и выдерживают в течение суток в холодильнике при температуре 4°C . Затем суспензию перемешивают в течение 30 мин на магнитной мешалке и используют для иммобилизации.

3. Приготовление раствора мономеров. 3,2 г АА 0,2 г бис-АА помещают в стакан и добавляют 3,4 мл фосфатного буфера рН 7,5. Вещества перемешивают на магнитной мешалке до получения прозрачного раствора и доводят значение рН раствора до величины 7,5 добавлением 30 %-ного раствора NaOH.

4. Приготовление 25 %-ного раствора ПСА. В стакане растворяют 1,2 г ПСА в 3,6 мл фосфатного буфера и устанавливают, если необходимо, значение рН, равное 7,5 добавлением 30 %-ного раствора NaOH.

5. Проведение иммобилизации. Иммобилизацию фермента проводят в стеклянном стакане с механической мешалкой. Стакан помещают в баню со льдом. Максимальная температура процесса иммобилизации не должна превышать $4 - 6^\circ\text{C}$.

В стакан вносят раствор фермента, приготовленный по описанной методике, добавляют полученный раствор мономеров и 1,2 мл 25%-ного раствора ГА, в котором, в случае необходимости, доводят значение рН до величины 7,5 добавлением 30%-ного раствора NaOH. Реагенты перемешивают в течение 30 мин, корректируя значение рН 7,5 добавлением раствора щелочи, добавляют 4,8 г раствора ПСА, перемешивают еще в течение 30 , останавливают мешалку и выдерживают смесь примерно в течение 5 мин при температуре $4 - 6^\circ\text{C}$ до образования геля.

Полученный гель протирают через сито с размером отверстий 0,5 – 0,7 мм и получают гранулы иммобилизованного фермента, которые промывают в 100 мл дистиллированной воды при температуре $4 - 6^\circ\text{C}$. Гранулы отжимают на фильтровальной бумаге и сохраняют в холодильнике во влажном состоянии.

Выход иммобилизованного фермента составляет около 35% от активности, взятой на иммобилизацию.

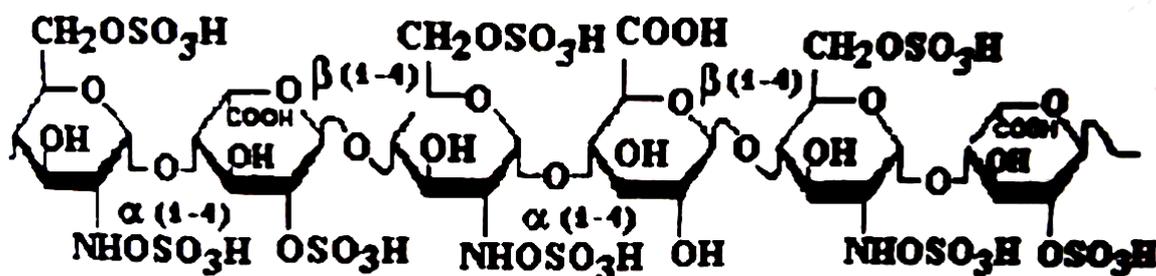
Контрольные вопросы

1. Для чего проводят иммобилизацию ферментов?
2. Какие способы иммобилизации ферментов известны и в чем их различие?
3. Что такое выход по активности иммобилизованного фермента?
4. Почему при иммобилизации используют буферные растворы?

Сахариды

Работа 15. Выделение растворимого гетерополисахарида – гепарина из животного сырья методом ионообменной хроматографии

Гепарин является природным биополимером – мукополисахаридом. Гепарин в значительных количествах содержится в легких крупного рогатого скота (к.р.с.), кишечнике (мукозе) свиней и используется в качестве медицинского вещества, предотвращающего свертывание крови (играет роль антикоагулянта). Химическое строение гепарина можно условно представить в виде четырех основных повторяющихся звеньев (отмечены повторяющиеся α - и β -1–4 гликозидные связи:



Индекс полимеризации n для фармакологически активного гепарина равен 15 – 30, что соответствует молекулярной массе 17000 – 25000.

Для выделения гепарина из сырья в промышленности и лаборатории применяют метод селективной экстракции с последующей ионообменной очисткой.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или проточной спектрофотометр с самописцем. Хроматографическая колонка с рубашкой для подогрева до температуры 60°C с запорными фланцами, соединенная пластиковым шлангом с дозирующим насосом. Термостат на 60°C . Микрошприц или пипетки на 500, 1000 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. Коллектор фракций или штатив с пробирками. Весы лабораторные технические 0–0,5 кг. Колба химическая, вместимостью 1,5 л. Центрифуга лабораторная, 5000 об/мин, ротор 4x250 мл или колба Бунзена с воронкой Бюхнера для отделения жмыха через марлю.

Реактивы. 1. Легкие крупного рогатого скота (к.р.с.) или высушенная мукоза свиней. 2. Раствор протамин-сульфата в ампулах. 3. 2,5 М раствор хлорида натрия, в котором добавлением 2 М растворов NaOH и HCl установлено значение pH 8,0. 4. 1 М раствор хлорида натрия, в котором добавлением 2 М растворов NaOH и HCl установлено

значение рН 8,0. 5. Дистиллированная вода. 6. Макропористый анионит АМ-п или АВ 171 40/100. 7. Спирт этиловый (для пищевых и медицинских целей). 8. Хлорид натрия х.ч. или ч.д.а. 9. 2 М раствор щелочи NaOH. 10. 2 М раствор HCl.

Ход работы

ЭКСТРАКЦИЯ ГЕПАРИНА. Легкие к.р.с. измельчают на мясорубке. К 90 г сырья добавляют в колбе 1 л дистиллированной воды, прибавляют 60 г хлорида натрия, устанавливают при перемешивании рН смеси 8,5 добавлением 2 М растворов NaOH или HCl и перемешивают смесь при температуре 60°C в течение 2 часов.

Смесь подогревают до температуры 95 – 100°C для коагуляции, выдерживают в течение 5 мин, охлаждают до температуры 60°C и фильтруют через двойной слой марли или отделяют остаточный жмых на центрифуге.

ПОДГОТОВКА ИОНООБМЕННОЙ КОЛОНКИ. Колонку, содержащую анионит в количестве 30 мл, промывают дистиллированной водой.

СОРБЦИЯ ГЕПАРИНА. Раствор, отделенный от остатков животной ткани (жмыха) при температуре 60°C подают насосом через колонку со скоростью 1 л/час. После пропускания экстракта через колонку продолжают пропускать в тех же условиях воду.

ПРОМЫВКА АНИОНИТА С СОРБИРОВАННЫМ ГЕПАРИНОМ. Через колонку с сорбированным гепарином пропускают последовательно по 5 объемов (250 мл) дистиллированной воды и 1 М раствора хлорида натрия для удаления с колонки примесей низкомолекулярных веществ.

ДЕСОРБЦИЯ ГЕПАРИНА. На промытую колонку с сорбированным гепарином насосом или самотеком подают 70 мл 2,5 М раствора хлорида натрия со скоростью 25 мл/час. Появление на выходе колонки в элюате гепарина регистрируют при помощи проточного УФ-спектрофотометра или анализом проб, в которые добавляют раствор протамин-сульфата. (В присутствии протамин-сульфата гепарин образует осадок). Собирают общую фракцию объемом около 40 мл, содержащую основное количество гепарина.

ОСАЖДЕНИЕ ГЕПАРИНА В ВИДЕ СЫРЦА. К собранному элюату в количестве 40 мл добавляют при перемешивании 1,5 объема (60 мл) спирта этилового и оставляют для осаждения образовавшегося осадка на ночь. Для ускорения процесса осаждения смесь элюата со спиртом можно поместить в холодильник с температурой +4 – +10°C.

ВЫДЕЛЕНИЕ И СУШКА ГЕПАРИНА. Осадок гепарина отделяют, осторожно сливая надосадочную жидкость и переносят его на воронку Бюхнера с влажной фильтровальной бумагой. Влажный гепарин промывают порциями три раза по 10 мл спирта этилового и помещают в вакуумный сушильный шкаф.

Сушку гепарина проводят при температуре 60°C в течение 24 ч. Получают продукт гепарина-сырца в количестве 20 мг. Его биологическая активность составляет 100 ЕД/мг.

ЕД – обозначает условную единицу биологического действия вещества, определяемую для антикоагулянта крови прямого действия – гепарина по свертыванию плазмы в присутствии стандартных высокоочищенных образцов гепарина. Методика определения биологической активности описана в Фармакопейной статье ФС 42-1327-87 "Гепарин" и выполняется в специализированной лаборатории.

Расчет. Определяют выход гепарина из сырья.

Получено 0,02 г гепарина активностью 100 ЕД/мг. Всего (20 мг x 100 ЕД/мг) 2000 ЕД.

Теоретическое содержание гепарина в 1 кг легких составляет 25000 ЕД.

Расчет выхода гепарина по активности осуществляют по формуле

$$\text{ВЫХОД} = \frac{\text{теоретическое содержание гепарина в сырье}}{\text{полученное количество гепарина}} \times 100, \%$$

Для упрощения считать, что удельная биологическая активность выделенного из легких гепарина составляет 100 ЕД/мг.

Выход гепарина из легких в промышленности составляет около 20000 ЕД/кг.

Контрольные вопросы

1. Что называют ионообменным выделением полисахаридов? Каковы отличия процессов ионообменного выделения полисахаридов и белков?
2. Какова роль гепарина в организме и каково его фармакологическое значение?
3. Назвать вещества, применяемые в процессе ионообменной хроматографии. Каковы требования к их чистоте?
4. Что представляет собой молекула гепарина в твердом состоянии и в растворе? Как влияют примеси на поведение в растворе полисахаридных молекул в присутствии и отсутствии хроматографического сорбента?

Работа 16. Количественное определение сорбционной емкости ионов по биологически активному веществу (гепарину)

Метод основан на способности гепарина образовывать с органическими реагентами окрашенные комплексы, поглощающие в видимой части спектра при заданной длине волны.

Оборудование. 1. Спектрофотометр с кюветами. 2. Термостат на 25°C. 3. Колбы, микропипетки на 1000 и 5 мкл. 4. Весы.

Реактивы. 1. Раствор гепарина, содержащий 1 мг/мл основного вещества. 2. Вода дистиллированная. 3. Стандартные растворы гепарина в воде, содержащие в 1 мл 200, 400, 600, 800, 1000 и 1500 мкг вещества. 4. Раствор акридинового желтого. Готовят в виде насыщенного раствора, который получают перемешиванием 1 г красителя в 100 мл дистиллированной воды с последующим фильтрованием раствора через бумажный фильтр. 5. Анионит марки АМ-п или АВ 171-40/100. 6. 2,5 М раствор хлорида натрия.

Ход работы

1. В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр.

2. В колбу вместимостью 200 мл вносят 1 г влажного анионита АМ-п в СГ-форме, заливают 150 мл раствора гепарина и выдерживают смесь в течение суток при температуре 25°C.

3. Определяют остаточное содержание гепарина в растворе спектрофотометрическим методом. Для этого в 2 кюветы заливают по 1 мл раствора акридинового желтого, в 1-ю кювету добавляют 5 мкл раствора гепарина, взятого из колбы над осадком ионита, в другую кювету добавляют 5 мкл воды (контроль) и проводят измерение поглощения при 442 нм против контроля.

4. Построение калибровочной кривой.

Предварительно проводят определение содержания гепарина в растворах с известной концентрацией, содержащих в 1 мл 200, 400, 600, 800, 1000 и 1500 мкг вещества. Стандартные растворы можно готовить соответствующим разбавлением (1,5 г/мл) раствора гепарина.

Расчет. Определение содержания гепарина в анализируемой пробе раствора в мкг/мл осуществляют по калибровочному графику.

Статическую обменную емкость анионита по гепарину (COE_T) вычисляют по формуле

$$COE_T, \text{ мг гепарина/г ионита} = \frac{C_1 - C_2}{g} V,$$

где C_1 – содержание гепарина в исходном растворе, мг/мл; C_2 – равновесное содержание гепарина в растворе над ионитом, мг/мл; g – навеска анионита, г; V – объем пробы, мл.

Для определения полной обменной емкости (ПОЕ_г) навеску 1 г анионита помещают в микроколонку, пропускают через нее 500 мл раствора гепарина (1 мг/мл), промывают анионит 500 мл дистиллированной воды, пропускают через колонку 100 мл 2,5 М раствора NaCl и в полученном элюате аналогично определяют концентрацию гепарина в мг/мл, добавляя в контрольную кювету 5 мкл 2,5 М раствора хлорида натрия.

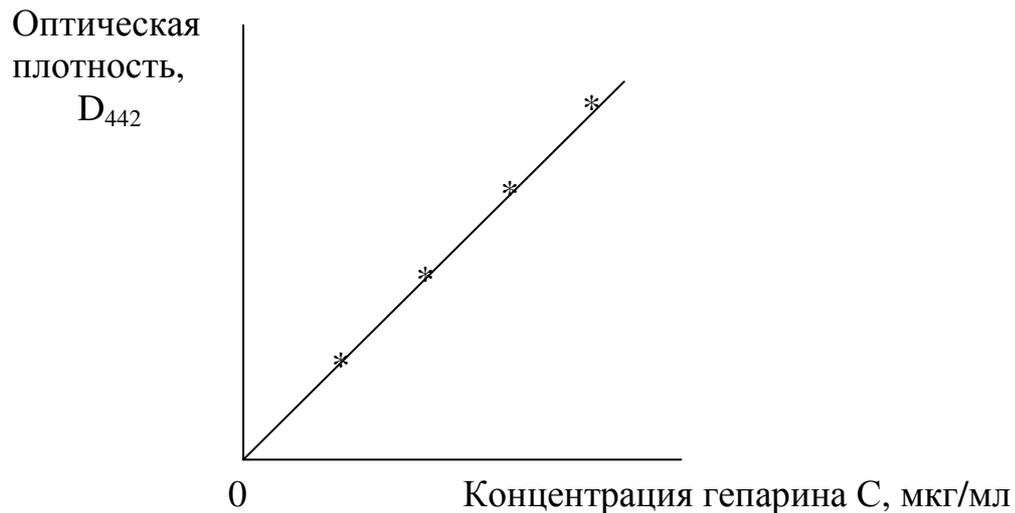


Рис. 4.7. Градуировочный график определения содержания гепарина с акридиновым желтым при 442 нм

Полную обменную емкость анионита по гепарину вычисляют по формуле

$$\text{ПОЕ}_g, \text{ мг гепарина/г ионита} = \frac{C \cdot V}{g},$$

где C – содержание гепарина в элюате, мг/мл; g – навеска анионита, г; V – объем элюата, мл.

Значения ПОЕ_г всегда больше значения СОЕ_г за счет обеспечения динамики процесса.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах мукополисахарида гепарина основан метод спектрофотометрического определения?
2. Какую роль играет гепарин в жизнедеятельности организма?
3. Опишите устройство и принцип работы спектрофотометра.

4. Какие химические элементы входят в состав гепарина и других природных сахаридов?

5. Чем отличаются статическая и динамическая емкости сорбента? Какие факторы влияют на величину получаемых значений СОЕ и ПОЕ?

Работа 17. Количественное определение содержания углеводов

Углеводы вместе с белками и жирами образуют основную группу веществ клеток, являясь главным источником энергии для живого организма. Эта энергия высвобождается за счет биохимического окисления углеводов. Разделяют моносахариды, ди- и олигосахариды и полисахариды, состоящие из циклических гликозидных звеньев общей формулы $C_x(H_2O)_x$. Углеводы составляют более 75% органических веществ в мире и до 80 % калорийности пищевого рациона человека.

Углеводы входят в состав пищевых продуктов в связанном состоянии с другими биополимерами, образуя химические комплексы различной прочности, поэтому количественное определение сахаров связано с разрушением этих комплексов в условиях, когда возможно разрушение и самих сахаридов, что приводит к неоднозначности результатов количественного анализа.

Опыт 1. Количественное определение содержания углеводов

Метод основан на способности углеводов образовывать с органическими реагентами окрашенные комплексы, поглощающие в видимой части спектра при заданной длине волны.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или фотоэлектрокolorиметр. Термостат или водяная баня на 100°C. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 250 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20 –100°C. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100 – 250 мл.

Реактивы. Раствор углевода, содержащий 50 – 100 мг/мл основного вещества. Вода дистиллированная. Стандартные растворы глюкозы в воде, содержащие в 1 мл: 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Антроновый реактив. Готовят непосредственно перед определением путем растворения 0,25 г антрона в 25 мл дистиллированной воды, с последующим прибавлением к раствору 100 мл концентрированной серной кислоты. Спирт этиловый ректификованный, 80 % раствор в воде. Соляная кислота х.ч., разбавленный (1:1) водный раствор. Гидроксид натрия хч, 1 М раствор. Ацетат свинца ч.д.а., 30%-ный раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия х.ч., 1 М раствор. Дистиллированная вода.

Ход работы

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ. 10 г измельченного образца заливают 50 мл 80% этанола, нагревают смесь при 80°C в течение 15 мин, спиртовую вытяжку отфильтровывают, остаток подвергают экстрагированию 80% спиртом еще 2 раза. Объединенный экстракт упаривают до объема 30 мл при температуре 40°C для отделения этанола. Упаренный экстракт количественно переносят в круглодонную колбу, добавляют 2 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты, греют смесь при температуре 70°C в течение 3 мин и получают гидролизат, содержащий экстрагированные моносахариды и моносахариды, образованные при легком гидролизе из сахарозы, который количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл дистиллированной воды.

К гидролизату добавляют по капле 1 М раствор гидроксида натрия до нейтральной реакции, прибавляют 2 мл 30%-ного раствора ацетата свинца, перемешивают и отстаивают смесь в течение 1 ч, добавляют по капле раствор сульфата натрия до прекращения выпадения осадка для связывания избытка ацетата свинца и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор отстаивают и фильтруют.

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр.

В колбу заливают 4 мл раствора препарата, содержащего около 0,3 г сухого определяемого вещества или экстракта из измельченного пищевого продукта и доводят объем раствора до 100 мл.

В 2 пробирки заливают по 5 мл антронового реактива и осторожно по стенке приливают: в 1-ю – 1 мл раствора углевода (проба), во 2-ю – 1 мл воды (контроль).

Пробирки помещают в кипящую водяную баню и выдерживают при температуре 100°C в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры и проводят измерение поглощения при 540 нм против контроля.

Построение калибровочной кривой. Предварительно проводят определение содержания углеводов в растворах глюкозы с известной концентрацией, содержащих в 1 мл 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Стандартные растворы можно готовить соответствующим разбавлением (1 г на 100 мл) раствора глюкозы.

Расчет. Определение содержания углеводов в анализируемой пробе раствора в мкг/мл осуществляют по калибровочному графику (рис. 4.8).

Процентное содержание углеводов в пробе, в пересчете на глюкозу, вычисляют по формуле $X = a / 100 b$, где X – содержание углеводов в препарате, в г на 100 мл препарата; a – количество микрограммов глюкозы в 1 мл исследуемого раствора, найденное по калибровочной кривой; b – количество мл препарата, взятое для приготовления 100 мл раствора (или навеска).



Рис. 4.8. Градуировочный график определения содержания углеводов с антроновым реактивом при 540 нм

Опыт 2. Определение содержания гликогена и редуцирующего сахара

Метод основан на разрушении животных белков щелочью, осаждении гликогена этанолом, кислотном гидролизе гликогена и количественном определении глюкозы в присутствии периодата.

Оборудование. Термостат или водяная баня на 100°C. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 50 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20 – 100°C. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100 – 500 мл. Центрифуга 7000 G. Микробюретка вместимостью 10 мл. Колбы конические Эрленмейера вместимостью 10 – 250 мл.

Реактивы. Гидроксид натрия х.ч., 60%-ный водный раствор. Дистиллированная вода. Спирт этиловый ректификованный, 60, 70, 80, 90 и 96%-ный водный раствор. Эфир диэтиловый ч.д.а. Соляная кислота х.ч., концентрированная и 2%-ный раствор. Серная кислота х.ч., концентрированная, 4 н. раствор, 10%-ный раствор. Гидроксид натрия х.ч., 60%-ный раствор. Ацетат свинца ч.д.а., 30%-ный раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия х.ч., 1 М раствор. Периодат 0,01 н. раствор, готовят растворением 0,17 г периодата натрия $\text{Na}_2\text{H}_3\text{IO}_6$ (ММ 272) в мерной колбе вместимостью 500 мл, приливают 200 мл дистиллированной воды и 5 мл 4 н. серной кислоты, встряхивают до полного растворения, фильтруют. Калия йодид х.ч., 5%-ный раствор. Натрия тиосульфат $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

х.ч., 0,01 н. раствор. Крахмал ч.д.а., готовят смешением 0,5 г крахмала с 10 мл воды и, при перемешивании, с 90 мл кипящей воды.

Ход определения. 3 г измельченного образца мяса смешивают в колбе с 5 мл 60%-ного раствора NaOH и нагревают при 100°C в течение 45 мин, добавляют 5 мл воды и при перемешивании осаждают гликоген добавлением 40 мл этилового спирта. Для ускорения осаждения в смесь добавляют несколько капель серной кислоты, образующийся сульфат натрия способствует осаждению гликогена. Смесь выстаивают в течение 24 ч, центрифугируют, отделяют надосадочную жидкость с помощью пипетки. Осадок последовательно промывают по 15 мл 60, 70, 80, 90 и 96%-ным этанолом и эфиром, отделяя жидкость центрифугированием. Остатки эфира удаляют испарением на водяной бане.

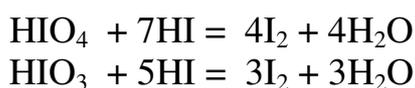
К осадку гликогена, добавляют 5 мл горячей дистиллированной воды, нейтрализуют смесь добавлением концентрированной и 2%-ной соляной кислоты, добавляют 30 мл 2%-ной соляной кислоты и гидролизуют гликоген нагреванием смеси при 100°C в течение 3 ч.

Полученный гидролизат количественно переносят в мерную колбу на 250 мл и доводят объем раствора до метки.

Глюкоза окисляется в кислом растворе периодатом по уравнению



Избыток периодата и образовавшийся йодат определяются после добавления йодида калия в виде эквивалентного количества йода титрованием раствором тиосульфата



В колбы вносят 8 мл 0,01 н. раствора периодата, 2 мл исследуемого раствора, содержащего глюкозу и 2 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Параллельно ставят холостой опыт с 2 мл воды. Смеси прогревают в течение 15 мин при 100°C, охлаждают проточной водой, добавляют в каждую колбу по 3 мл 5%-ного раствора KI, титруют выделившийся йод 0,01 н. раствором тиосульфата натрия, добавляя к концу титрования 5 капель 0,5%-ного раствора крахмала в качестве индикатора.

Расчет. Содержание редуцирующего сахара (глюкозы) X (мг/100 г мяса, мг%) рассчитывают по формуле

$$X = 0,927 \cdot 0,18 \cdot (V_1 - V_2) \cdot 250 \cdot 100 / g \cdot V,$$

где 0,927 – коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; 0,18 – количество мг глюкозы, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата;

0,927 – коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; $(V_1 - V_2)$ – разность количества 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшего на титрование испытуемой и контрольной пробы, мл; g – навеска образца; V – количество раствора глюкозы, взятое для определения, мл.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах углеводов основан метод спектрофотометрического определения?
2. Какую роль играют углеводы в жизнедеятельности клеток?
3. Опишите устройство и принцип работы фотометра.
4. Какие химические элементы входят в состав углеводов?
5. В чем заключается особенность работы с белками и ДНК, по сравнению с углеводами?

Опыт 3. Определение содержания лигнина

Сернокислотный метод основан на гидролизе древесных полисахаридов серной кислотой в две стадии. Сначала действуют концентрированной (65 – 80%-ной) серной кислотой при нормальной температуре, а затем смесь лигнина с кислотой разбавляют и кипятят для доведения гидролиза до конца, то есть для превращения образовавшихся на первой стадии олигосахаридов в моносахариды. Значительное количество лигнина, особенно в случае лиственной древесины, растворяется в концентрированной серной кислоте, но осаждается при разбавлении и кипячении.

На результаты анализа влияют концентрация кислоты, температура и продолжительность обработки. При концентрации кислоты ниже 65% целлюлоза гидролизуеться не полностью, а при концентрации выше 80% наблюдается осмоление сахаров с образованием гуминов. Наиболее точные результаты получатся при использовании 72%-ной серной кислоты как для хвойных, так и для лиственных пород.

Реактивы и материалы. Серная кислота 72%-ная. Индикатор метиловый оранжевый, раствор. Устройство для кипячения реакционной смеси.

Ход работы. Навеску воздушно-сухих опилок (около 1 г), предварительно обработанных смесью спирта и бензола для удаления смол, помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой. К навеске добавляют 15 мл 72%-ной H_2SO_4 плотностью $1,64 \text{ г/см}^3$) в выдерживают в термостате при $24 - 25^\circ C$ в течение 2,5 ч при осторожном периодическом перемешивании для избежания образования комков. Затем смесь лигнина с кислотой переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл, смывая лигнин 200 мл

дистиллированной водой. Разбавленную смесь кипятят с обратным холодильником на электрической плитке (слабое кипение) в течение 1 ч. Частицам лигнина дают укрупниться и осесть. Затем лигнин отфильтровывают на стеклянном пористом фильтре, предварительно высушенном до постоянной массы. Фильтрация рекомендуется проводить на следующий день с последующей промывкой дистиллированной водой. Для установления конца промывания лигнина на фильтре каплю жидкости, стекающей с фильтра, наносят на фильтровальную бумагу и добавляют каплю индикатора (метилового оранжевого). Если последний не меняет цвета, промывку считают законченной.

Фильтр с лигнином сушат в сушильном шкафу при температуре 103°C до постоянной массы и взвешивают.

Расчет. Массовую долю лигнина в процентах рассчитывают по отношению к абсолютно сухой исходной древесине (в которой предварительно определена влажность по стандартной методике) по формуле: $L = (m_1 - m) / m_2 \cdot K_Э \cdot 100$, где m_1 – масса фильтра с лигнином, г; m – масса пустого фильтра, г; m_2 – абсолютно сухая навеска обессмоленной древесины, г; $K_Э$ – коэффициент экстрагирования органическим растворителем.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах полисахаридов основан метод их определения в древесных образцах?
2. В чем отличие работы с древесными сахарами по сравнению с растворимыми гетерополисахаридами животной ткани?
3. Что разрушается в образцах при их обработке серной кислотой?

ДНК и нуклеотиды

Работа 18. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) в количестве до 1% входит в состав всех живых клеток и обеспечивает передачу наследственности (генетический код), осуществляя синтез клеточных белков. ДНК обладает структурой двухцепочечного биополимера, состоящего из связанных нуклеотидов и имеет молекулярную массу около 1 млн. Кольцевые ДНК клеток, называемые плазмидами, используются в качестве "векторов" – трансформируемых биохимических веществ, применяемых в генной инженерии.

Оборудование. Аналитические весы. Конические колбы с пробками на 50 мл. Центрифуга. Термометры 0 – 100°C. Ультратермостат 0 – 100°C. Холодильник со льдом.

Реактивы

1. Лизирующий раствор 1: 25 mM Трис-НСl, рН 8/50 mM глюкозы/20 mM ЭДТА/2 мг/мл лизоцима. Готовят растворением 3 г трис(гидроксиметил)аминометана $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, 9 г глюкозы и 7,45 г комплексона этилендиаминтетраацетата динатриевой соли (ЭДТА) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8, добавляя конц. раствор НСl, растворяют 2 г лизоцима и доводят общий объем раствора до 1 л. Хранить в холодильнике не более 7 суток.

2. Лизирующий раствор 2. Растворяют 1 г натрия додецилсульфата $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (SDS) в 99 мл 0,2 М (8 г/л) раствора NaOH.

3. 3 М раствор натрия ацетата. Растворяют 408 г/л соли $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде и устанавливают рН раствора 4,5 – 5,0, добавлением ледяной CH_3COOH .

4. Этанол 96 %-ный.

5. Трис-ацетатный буфер. 0,04 М Трис-ацетат/0,002 М ЭДТА рН 8,0. Готовят растворением 242 г/л Триса, 57,1 мл/л ледяной CH_3COOH до рН 8.

6. 5 М (246 г/л) раствор хлорида лития LiCl, содержащий 0,75 г/л ЭДТА.

Ход работы

1. 15 мл суспензии клеток с оптической плотностью (ОП_{546}) 10 – 20 центрифугируют при 5000 об/мин, надосадочную жидкость сливают и получают осадок сырых клеток.

2. К осадку клеток добавляют 1 мл лизирующего раствора 1, перемешивают, сразу добавляют 2 мл раствора 2. Суспензия светлеет и становится более вязкой.

3. К лизированной биомассе добавляют 1,5 мл 3 М раствора натрия ацетата, перемешивают до формирования творожистого осадка, который отделяют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают.

4. К осадку добавляют 1 мл этанола, перемешивают в течение 10 мин, повторно центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают.

5. Осадок растворяют в 2 мл Трис-ацетатного буфера.

6. К раствору добавляют 2 мл 5 М раствора хлорида лития, перемешивают и выдерживают при температуре льда в течение 15 мин. Осадок отделяют центрифугированием.

7. П.п. 4–6 повторяют, к осадку ДНК добавляют 1–2 мл трис-ацетатного буфера и используют для количественного определения содержания ДНК в растворе.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах ДНК основан метод ее выделения?
2. В каких областях науки применяют ДНК? Что Вам известно о достижениях и методах генетической инженерии?
3. Опишите устройство и принцип работы центрифуги.
4. Опишите методы приготовления лабильных биопрепаратов.
5. В чем заключается особенность работы с белками и ДНК?

Работа 19. Количественное определение ДНК, РНК и их компонентов в гидролизатах спектрофотометрическим методом по Спирину

Метод основан на способности ДНК, РНК и продуктов их расщепления (нуклеотидов) поглощать в ультрафиолетовой части спектра при 200 – 300 нм.

При кислотном гидролизе ДНК и РНК отщепляются фосфаты. Неорганическое содержание фосфора можно рассчитать по разнице поглощения при 270 и 290 нм.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами, пробирки.

Реактивы. Раствор ДНК. Раствор, содержащий 1 мг чистой ДНК в 1 мл, характеризуется поглощением $A_{260} = 20,0$. 0,5 М раствор HClO_4 .

Ход работы. В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр. В кювету заливают раствор ДНК и проводят измерение поглощения раствора при 270 и 290 нм против контроля, в качестве которого (2-я кювета сравнения) используют кислый раствор, в котором гидролизовали материал, например 0,5 М раствор HClO_4 .

Расчет. Содержание нуклеинового фосфора (С) ДНК рассчитывают по формуле $S, \text{ мг/мл} = (A_{270} - A_{290}) / 0,19$, где A_{270} и A_{290} – поглощение раствора при 270 и 290 нм.

Для того, чтобы перейти от количества фосфора к количеству ДНК, полученное значение содержания фосфора С умножают на 10,1, а для расчета содержания РНК значение С умножают на 10,5, поскольку содержание фосфатов в РНК, в среднем, 9,5 %, а в ДНК – 9,9%.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах ДНК и РНК основан метод спектрофотометрического определения?
2. Какую роль играют ДНК и РНК в жизнедеятельности клеток?
3. Опишите устройство и принцип работы спектрофотометра.
4. Какие химические элементы входят в состав ДНК?
5. В чем заключается особенность работы с белками и ДНК?

Работа 20. Свойства дрожжей. Дезинтегрирование дрожжевой биомассы

Дрожжи являются источником ценных химических соединений, таких как белки, пептиды, нуклеиновые и аминокислоты. Существуют различные способы извлечения этих соединений из дрожжевых клеток. Один из них заключается в дезинтегрировании (разрушении) дрожжевых культур и перевода содержащихся веществ в суспензию или раствор.

Существующие методы разрушения клеточной биомассы ультразвуком, давлением, лизирующими ферментами (лизоцимом), замораживанием не приводят к полной дезинтеграции дрожжевой биомассы вследствие высокой прочности дрожжевых клеток.

Основная часть водорастворимых химических соединений, содержащихся в дрожжевой биомассе, находится внутри клеток. Между внутренней частью клетки и внешней водной средой, разделенных клеточной оболочкой, существует определенный баланс химических соединений, поэтому простой экстракцией возможно извлекать из дрожжей очень незначительное количество аминокислот и других низкомолекулярных соединений. Для более высокомолекулярных соединений, таких как пептиды и белки, стенки дрожжевой клетки являются малопроницаемыми. Разрушение клетки способствует выходу водорастворимых продуктов, в том числе и высокомолекулярных, в раствор.

Увеличение содержания аминокислот в дезинтегрированной биомассе по сравнению с исходным содержанием свободных аминокислот в остаточных пивных дрожжах приведены в табл. 4.8.

Целью настоящей лабораторной работы является наблюдение увеличения выхода аминокислот, пептидов, белков из дрожжевой клетки при дезинтегрировании клеточной суспензии.

Оборудование. Лабораторная дезинтеграторная установка. Лабораторная качалка (или две магнитные мешалки). Вакуумный насос. Воронка Бюхнера с колбой Бунзена. Сушильный шкаф 0 – 150°C. Аналитические весы. Электрофотокolorиметр. Газометрический прибор. Конические колбы с пробками на 250 мл (15 штук). Центрифуга.

Секундомер. Термометры 0 – 100°C. Поляриметр. Ультратермостат с диапазоном нагревания 0 – 100°C.

Реактивы. 1. Прессованные дрожжи или остаточные пивные дрожжи. 2. Нингидрин, 2%-ный раствор в этиловом спирте. 3. Азотная кислота, концентрированная. 4. Сульфат меди. 5. Едкий натр 20%-ный раствор. 6. Глюкоза 20%-ный раствор. 7. Сахароза 25%-ный раствор.

Т а б л и ц а 4.8

Выход свободных аминокислот после дезинтеграции дрожжей

Номер	Название аминокислоты	Обозначение аминокислотного остатка	Увеличение содержания свободных аминокислот в дезинтегрированной дрожжевой биомассе, (раз.)
1	Аспаргиновая к-та	Asp	23
2	Треонин	Thr	20
3	Серин	Ser	21
4	Глутаминовая к-та	Glu	10
5	Пролин	Pro	4
6	Цистин	Cys	7
7	Валин	Val	39
8	Метионин	Met	18
9	Изолейцин	Ile	27
10	Лейцин	Leu	25

Ход работы

ДЕЗИНТЕГРИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ. В две колбы вместимостью 250 мл взвесить по 15 г прессованных дрожжей. В каждую колбу добавить по 120 мл дистиллированной воды. Закрыть колбы пробками, установить их на лабораторную качалку и осуществить встряхивание в течение 30 минут. После окончания встряхивания одну из колб оставить в качестве контрольной пробы дрожжей, а другую подвергнуть, в соответствии с инструкцией по эксплуатации установки, дезинтегрированию на лабораторном дезинтеграторе с ротором 8П при скорости вращения не менее 160 сек⁻¹.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ БИОМАССЫ. Контрольную и дезинтегрированную суспензию дрожжевых клеток подвергают центрифугированию в течение 10 мин при 8000 мин⁻¹ (6000 G).

При заполнении стаканов центрифуги обратить особое внимание на обязательность одинакового заполнения суспензией пробирок. Для этого во все пробирки заливать равный объем жидкости.

По окончании центрифугирования слить супернатант в стаканчики. Сравнить прозрачность двух растворов. Дать объяснения наблюдаемому.

ОСВЕТЛЕНИЕ СУПЕРНАТАНТА. Взять по 50 мл каждого супернатанта и добавить при перемешивании по 50 мл воды. Произвести фильтрование каждого из полученных растворов на воронке Бюхнера через двойной бумажный или мембранный фильтр. Фильтрацию проводить до тех пор пока раствор не станет прозрачным. Собранный фильтрат использовать для проведения испытаний.

АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РАЗРУШЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ БИОМАССЫ.

1. Установить наличие соединений в растворах, содержащих аминный азот. Содержание аминного азота указывает на наличие веществ со свободной аминогруппой. При дезинтегрировании и под действием внутренних клеточных ферментов происходит дополнительный разрыв пептидных связей белков, что приводит к возрастанию значений аминного азота. Определение аминного азота проводят в соответствии с методикой, описанной в данной главе в работе 6.

2. Провести по указанию преподавателя качественные цветные реакции на белковые продукты. Нингидриновую, ксантопротеиновую, биуретовую реакции проводить с пробами приготовленных фильтратов, взятых в количестве 5 мл раствора (фильтрата). Параллельно использовать необработанный фильтрат в качестве холостой пробы. Для этого использовать сразу две пробирки с 5 мл рабочего и необработанного фильтрата. Реактивы добавлять в обе пробирки в строго одинаковых количествах.

3. Провести фотометрирование растворов с использованием набора светофильтров или записать на спектрофотометре спектры поглощения. Построить графики зависимости оптической плотности "D" от длины волны падающего света для каждого раствора. Отметить в спектрах наличие максимумов поглощения, характерных для ДНК, ароматических аминокислот и других веществ. Сделать выводы и дать заключение о результатах эксперимента.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ.

Спиртовое брожение под воздействием дрожжей является давно известным и широко используемым процессом.

В общем случае процесс можно представить следующим образом





Данная реакция протекает почти количественно. О ходе брожения можно судить по количеству выделяющегося CO_2 , что позволяет оценить ферментативную (бродильную) активность дрожжей.

1. 50 мл 20%-ного раствора глюкозы влить в специально приготовленную колбу с газоотводной трубкой. Получить около 25 мл фильтрата дрожжей. (Подготовку выполнить как для контрольного фильтрата, так и для фильтрата из дезинтегрированных дрожжей).

2. Собрать прибор для газометрии, проверить его герметичность.

3. Вылить 25 мл фильтрата в раствор глюкозы, быстро соединить колбу газоотводной трубкой с газометрической установкой. Убедившись в герметичности сборки, включить секундомер и взболтать раствор в колбе.

4. Слегка взбалтывая раствор в колбе, наблюдать в течение 1 ч за газовыделением, измеряя объем выделившегося CO_2 каждые 10 мин. При каждом измерении объема выделившегося CO_2 уровни жидкости в газоизмерителе должны быть одинаковы.

5. По результатам измерения построить график зависимости количества выделившегося CO_2 от времени брожения.

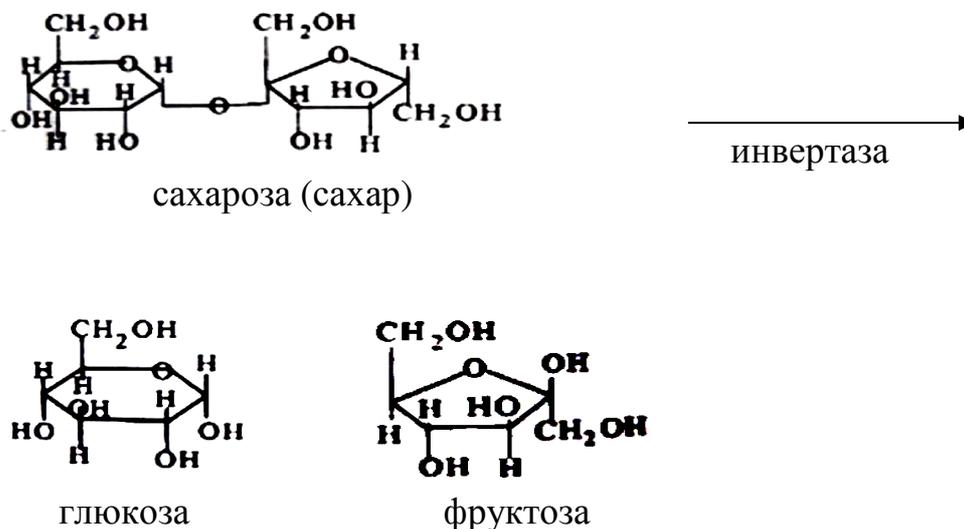
По указанию преподавателя проделать аналогичный эксперимент с разными количествами фильтратов дезинтегрированных и недезинтегрированных дрожжей: 25, 12, 6, 3, 1 мл. Сделать вывод: при каком количестве добавленных фильтратов от контрольной и дезинтегрированной проб наблюдается максимальная скорость брожения.

ПРИМЕНЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНВЕРТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ.

Дрожжи обладают инвертазной активностью за счет наличия фермента инвертазы, осуществляющей инверсию сахарозы – ферментативный гидролиз углевода по связи 1–1.

Фермент инвертаза находится под внешней оболочкой клетки, и разрушение клетки приводит к активному выходу инвертазы в раствор. Инверсию сахарозы можно легко наблюдать по изменению величины угла оптического вращения – $[\alpha]_D^{20}$. Так сахароза имеет удельный угол

оптического вращения равный $[\alpha]_D^{20} = +66,5^\circ$, D-глюкоза $+52,5^\circ$, D-фруктоза -92° . Полностью инверсированная сахароза, т.е. система, состоящая из эквивалентных количеств глюкозы и фруктозы, имеют $[\alpha]_D^{20} = -39,5^\circ$. Реакция инверсии сахарозы протекает по схеме



1. Заполнить 20 см кювету поляриметра 25%-ным раствором сахарозы. Заполнение осуществить без воздушных пузырьков. В соответствии с инструкцией по эксплуатации поляриметра произвести измерение угла оптического вращения раствора.

2. Термостатировать раствор сахарозы при 40°C . Термостатировать фильтраты контрольной и дезинтегрированных проб, оставшихся от предшествующих опытов, при той же температуре.

3. После термостатирования смешать 25 мл 25%-ного раствора сахарозы с 10 мл фильтрата. Операцию повторить для контрольного и дезинтегрированного растворов.

4. Непосредственно после смешения растворов сахарозы и фильтрата произвести измерение угла оптического вращения. Повторять измерения при температуре 40°C каждые 30 мин в течение 4 ч.

! Внимание: после каждого измерения кювету поляриметра следует развинчивать и раствор сливать обратно в термостатируемую колбу. Невыполнение этого условия может привести к разрыву кюветы!

5. По результатам измерения построить график зависимости угла оптического вращения от времени.

По результатам кинетических зависимостей сделать выводы о влиянии дезинтегрирования на выход инвертазы из дрожжей.

Изучение кинетики инверсии сахарозы рекомендуется проводить с различными количествами фильтрата дрожжей: 10, 5, 1, 0,5 мл.

Контрольные вопросы

1. Что представляет из себя дрожжевая культура?
2. Какие виды дрожжей Вам известны?
3. Какова форма и размеры дрожжевых клеток?
4. Каков химический состав дрожжевых клеток?
5. Какие реактивы используются для проведения качественных реакций на аминный азот?
6. Какие ферменты содержатся в дрожжевой клетке?
7. Какие ферментативные процессы изучались в данной работе?
8. Почему дезинтегрирование дрожжей приводит к усилению ферментативной активности дрожжей?
9. Почему ферментативные реакции не проводят при температурах выше 60°C?

ЛИПИДЫ

Работа 21. Свойства липидов

Липиды – биологически активные вещества, являющиеся производными высших жирных кислот, спиртов и альдегидов и вместе с белками и углеводами составляют основную массу органических веществ живой клетки.

Липиды являются составной частью многих видов пищевого сырья и готовых продуктов. Широко применяются в виде жировых композиций для получения высококалорийных продуктов питания. Липиды содержатся в мясе сельскохозяйственных животных в количестве от 3% (молодняк) до 33% (свинина), молоке от 3 – 4% (молоко коровье) до 18% (молоко оленя), рыбе от 10% до 25% (осетровые), в растительных объектах от 3 – 5% (пшеница, кукуруза) до 30 – 70% (семена подсолнечника – кокосовая пальма), в микроорганизмах – до 60% биомассы.

Ценность пищевых жиров зависит от их усвояемости. Считается, что говяжий жир усваивается на 80 – 94%, бараний на 80 – 90%, свиной 96 – 98%, сливочное масло на 93 – 99%, степень усвоения растительных жиров как правило превосходит указанный уровень. Наилучшей усвояемостью обладают жиры, состоящие из смешаннокислотных триглицеридов, которые обладают лучшей растворимостью, эмульгируемостью и способностью расщепляться. Высокое содержание триглицеридов с двойными связями снижает их эмульгируемость и биодegradацию в живом организме. Жиры с содержанием

высоконепредельных кислот в количестве более 15% не усваиваются, оптимальное содержание таких кислот в жире составляет около 4%.

Используя термин «сырой жир», обычно имеют ввиду извлекаемую из сырья смесь, в состав которой, входят жирорастворимые пигменты (каротиноиды, хлорофиллы, госсипол), жирорастворимые компоненты (витамины и кофакторы), стерины (холестерин, содержание которого составляет от 0,56% в яйце, 0,06 – 0,1% в мясе до 0,2 – 1,6% в сливочном масле и сырах), воски и собственно липиды, которые обычно подразделяют на ацилированные глицерины формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR$ (жиры, масла; R, R₁, R₂ – остатки жирных кислот) и фосфолипиды (фосфатиды) формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OP(O)O-OX$, где X = H, $CH_2CH_2N+(CH_3)_3$, $CH_2CH_2N+H_3$, $CH_2CH(COOH)NH_2$.

Различают триглицериды, у которых все гидроксилы глицерина замещены остатками жирных кислот, диглицериды, у которых вместо R₁CO содержится OH и моноглицериды, у которых вместо R₁CO и OCOR₂ имеются OH. Аналогично моно-, ди- и трифосфатиды для производных глицерина, этерифицированных остатками фосфорной кислоты (вместо OH в формуле содержится звено OPO(OH)(OB), где B = азотсодержащий радикал или остаток аминокислоты).

Биохимическая роль жиров заключается в том, что они являются источником энергетического и пластического материала для живых клеток, т. е. являются незаменимыми факторами питания.

Опыт 1. Определение общего содержания жира

Метод основан на экстрагировании жира из образца органическим растворителем с последующим гравиметрическим определением его содержания по отношению к исходному образцу.

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. Термостат на 50 – 120°C. Устройство для непрерывной экстракции Сокслета, состоящее из круглодонной колбы с кипящим растворителем вместимостью 0,5 л, в шлиф-горловину которой вставлен резервуар с экстрагируемой пробой, содержащий в верхней части присоединенный на шлифе обратный шариковый холодильник Либиха. Пары кипящего растворителя из колбы с кусочками пемзы или пористого фарфора поступают по отводной стеклянной трубке в камеру резервуара и конденсируются в его верхней части в холодильнике, стекая обратно в резервуар. После накопления жидкости в резервуаре с образцом до верхней части сливного капилляра жидкость стекает по сливному капилляру обратно в круглодонную колбу с

кипящим растворителем. Нагреватель круглодонной колбы. Эксикатор с осушителем. Пробирка или стеклянный цилиндр. Роторный испаритель.

Хлороформ ч.д.а. Бумага фильтровальная обезжиренная. Вата обезжиренная. Этанол 95%-ный.

Подготовка материалов. Вату и фильтровальную бумагу помещают в экстрактор Сокслета и подвергают экстрагированию кипящим хлороформом или диэтиловым эфиром в течение 2 ч. Экстрагированные материалы извлекают, высушивают при температуре выше температуры кипения использованных растворителей (50 – 60°C) и сохраняют в герметичной упаковке (эксикатор с осушителем).

Перед определением из обезжиренной бумаги сворачивают, наматывая на пробирку стеклянный цилиндр или плотный цилиндр из бумаги (диаметр цилиндрика и его длина должны быть меньше размеров резервуара камеры аппарата Сокслета), нижний край бумажного цилиндрика плотно заворачивают. Вниз цилиндрика во избежание разворачивания при экстракции помещают кусочек обезжиренной ваты.

Ход определения. В бумажный цилиндр берут навеску образца около 5 г, сверху помещают кусочек обезжиренной ваты, бумажный цилиндр плотно заворачивают и помещают в аппарат Сокслета. Определяют массу пустой колбы – g_k . Собранный аппарат нагревают в течение 3 – 6 ч с использованием соответствующего нагревательного устройства (баня, плитка, колбонагреватель), обеспечивая равномерное кипение растворителя, залитого в колбу. Конец кипячения определяют визуально, отбирая каплю экстракта из охлажденной камеры аппарата и помещая ее на чистое часовое стекло. Экстракцию считают законченной, если после испарения органического растворителя на стекле не остается жировых пятен.

По окончании аппарат разбирают, из колбы отгоняют летучие компоненты (органический растворитель и воду), присоединяя колбу к роторному испарителю или установке для перегонки жидкостей. Завершают отгонку летучих растворителей при температуре 100 – 105°C (> T_k воды) до постоянной массы. Колбу взвешивают после ее охлаждения в эксикаторе через каждые 15 мин сушки, масса считается постоянной, если отличается от предыдущей не более, чем на 0,0004 г.

Расчет. Массовую долю жира в образце X (в %) вычисляют по формуле $X = 100 \cdot (G_{\text{жир}} - g_k) / g$, где $G_{\text{жир}}$ – масса колбы с высушенным жиром, г; g_k – масса пустой колбы, г; g – навеска анализируемого образца.

Конечным результатом принимают среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до второго десятичного знака.

Допустимое расхождение двух параллельных определений не должно быть более 0,4% абсолютного содержания жира.

Допустимое расхождение результатов независимых определений не

должно превышать 0,8% абсолютного содержания жира.

Поскольку экстрагирование горячим хлороформом, дающим при кипении азеотроп, позволяет одновременно удалить из анализируемого образца и влагу и жир, можно оценить влагосодержание образца. Для этого первоначально определяют взвешиванием исходную массу бумажного цилиндрика – g_1 , массу исходной навески образца – g_0 , проводят как указано экстракцию в аппарате, экстрагированный образец в бумажном цилиндрике извлекают, высушивают до постоянной массы при 105°C – g_2 . ($g_2 = g_1 + g_{\text{с.о.}}$; $g_{\text{с.о.}}$ – масса сухого остатка обезжиренного и обезвоженного экстракцией образца; $g_{\text{с.о.}} = g_2 - g_1$). Количество выделенного жира определяют отгонкой летучих, как указано выше – $g_{\text{жир}} = (G_{\text{жир}} - g_{\text{к}})$.

Оценку массовой доли воды в образце Y (в %) проводят по формуле

$$Y = 100 \cdot [g_0 - (g_{\text{с.о.}}) - (g_{\text{жир}})] / g_0 = 100 \cdot [g_0 - (g_2 - g_1) - (G_{\text{жир}} - g_{\text{к}})] / g_0,$$

где $G_{\text{жир}}$ – масса колбы с высушенным жиром, г; $g_{\text{к}}$ – масса пустой колбы, г; $g_{\text{жир}}$ – масса выделенного и высушенного жира, г; g_1 – масса бумажного цилиндрика, г; g_2 – масса сухого остатка и масса бумажного цилиндрика (g_1), г; $g_{\text{с.о.}}$ – масса сухого остатка обезжиренного и обезвоженного экстракцией образца; g_0 – навеска анализируемого образца, г.

Допустимое расхождение результатов независимых определений $\pm 1\%$ от абсолютного содержания воды.

Опыт. 2. Определение массовой доли свободно извлекаемого жира

Метод основан на растворении липидов в бинарной смеси органических растворителей, их отделении и гравиметрическом определении массовой доли извлекаемого жира.

Аппаратура, материалы и реактивы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Шкаф сушильный лабораторный на $25 - 250^\circ\text{C}$. Баня водяная. Стаканчики или бюксы стеклянные. Бюксы металлические диаметром 50 мм, высотой 25 – 35 мм. Эксикатор с осушителем (CaCl_2 безводный). Воронка делительная фильтрующая со шлифом и с впаянным стеклянным фильтром № 2 или № 3. Приемник стеклянный с краном и со шлифом диаметром, соответствующим диаметру делительной воронки. Насос водоструйный лабораторный стеклянный. Колба мерная вместимостью 50 мл. Воронка стеклянная диаметром от 25 до 30 мм. Пипетка на 1 – 25 мл.

Спирт этиловый 95%-ный. Хлороформ х.ч.

Ход определения Навеску образца массой около 2 г взвешивают с допустимой погрешностью не более 0,0002 г в стеклянном стаканчике или бюксе. Навеску количественно переносят в фильтрующую делительную

воронку, приливают 20 мл экстрагирующей смеси, состоящей из хлороформа и этилового спирта в соотношении 2:1, и проводят экстракцию, встряхивая воронку в течение 2 мин.

Полученный экстракт с помощью водоструйного насоса отсасывают в присоединенный к воронке приемник, а из него переливают в мерную колбу вместимостью 50 мл.

Экстракцию проводят дополнительно экстрагирующей смесью по 10 мл еще два раза аналогично первой. По окончании третьей экстракции воронку и приемник ополаскивают 5 мл экстрагирующей смеси. Все три экстракта и промывную жидкость, собранные в мерной колбе, доводят до метки добавлением экстрагирующей смеси. Смесь тщательно перемешивают. Затем отбирают пипеткой 20 мл экстракта и переносят в предварительно высушенную и взвешенную бюксу. Для удаления растворителей бюксу нагревают на кипящей водяной бане до исчезновения запаха растворителей.

Бюксу с жиром сушат в течение 10 мин при температуре $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием до комнатной температуры и взвешивают на весах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЛИПИДНЫХ ПРИМЕСЕЙ. В бюксу с подсушенной навеской жира приливают 10 мл хлороформа и через 5 мин хлороформный раствор сливают. Такое отделение липидов растворением повторяют аналогично еще два раза. После этого бюксу помещают в сушильный шкаф и подсушивают в течение 5 мин при температуре $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Массовую долю жира (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{50 \cdot (g_1 - g_2)}{20 \cdot g} \cdot 100,$$

где g_1 – масса бюксы с жиром, г; g_2 – масса бюксы с нелипидной фракцией, г; 50 – общий объем экстракта, мл; g – масса навески, г; 20 – объем экстракта, взятый для высушивания, мл.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Допустимое расхождение двух параллельных определений не должно быть более 0,5% от абсолютного содержания жира.

Допустимое расхождение результатов независимых определений в разных лабораториях не должно превышать 1% от абсолютного содержания жира.

Опыт. 3. Определение жирно-кислотного состава

жиров и масел методом газовой хроматографии

Метод основан на получении метиловых эфиров жирных кислот, содержащихся в анализируемых жирах, и их количественном определении с помощью газожидкостной хроматографии на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором.

Метод предназначен для определения «жирнокислотного спектра» пищевых продуктов животного и другого происхождения.

Оборудование. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостатируемая баня с регулируемым нагреванием 20 – 100°C.

Колбы перегонные К-1-250-29/32. Колбы Гр-25-14/23. Колбы мерные 2-50-2; 2-100-2; 2-500-2. Воронка В-56-80 ХС. Колба коническая Кн-1-250-29/32. Цилиндры мерные 1-50, 1-100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 мл. Стеклянные банки с притертыми крышками. Воронки делительные ВД-100-29/32, ВД-250-29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1 – 10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Обратный холодильник Либиха на шлифах.

Газовый хроматограф Газохром 1109, Цвет 104 или аналогичный, например типа Varian, с пламенно-ионизационным детектором.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–20 мкл пробы закомом через мембрану инжектора хроматографа.

Колонки хроматографические стеклянные для газового хроматографа длиной 2,0 м и диаметром 3 мм или капиллярная колонка длиной 30 – 50 м и внутренним диаметром 0,3 – 0,5 мм.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004 % или гелий. Водород газообразный (99,9 % чистоты) без органических примесей или генератор водорода. Сжатый воздух без органических примесей или компрессор.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 3 – 5 % OV-275 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16 – 0,20 мм) или другие, дающие необходимое хроматографическое разделение, или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

Реактивы. Калия гидроксид, х.ч., экстрагированный очищенным гексаном. Дистиллированная вода. Индикаторная бумага рН. Хлороформ, х.ч. Метанол, х.ч., абсолютный. Гексан, ч., очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором, или

х.ч. Кислота серная, х.ч., плотностью 1,84 г/см³. Кислота соляная, х.ч., концентрированная. Натрий металлический или метилат натрия, ч.д.а.

Эталоны метиловых эфиров определяемых жирных C₄₋₂₂ жирных кислот гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%, рабочий раствор 1 мкг/мл.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

Подготовка к анализу

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА ДЛЯ МЕТАНОЛИЗА. 2 М раствор метилата натрия в метаноле получают растворением 10,8 г метилата натрия или 4,6 г металлического натрия в 100 мл абсолютного метанола или растворяют 11,2 г КОН в 100 мл абсолютного метанола.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА, ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ.

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100°C; 2 ч при 150°C; 4 ч при 200°C; 4 ч при 250°C. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. 50 мг липидов (жиры или масла) растворяют в 1 мл хлороформа или гексана при комнатной температуре. Добавляют 10 мл метанола и 3 гранулы твердого КОН. Гидролиз проводят при комнатной температуре в течение суток, затем корректируют рН смеси до 4,0 добавлением концентрированной HCl. Смесь перемешивают, отстаивают в течение 5 мин, добавляют 6 мл воды.

Полученный гексановый раствор метиловых эфиров жирных кислот анализируют на приборе методом ГЖХ или подвергают дополнительной очистке.

Смесь подвергают отмыванию водой 2 – 3 раза, каждый раз оставляя органический слой, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, жидкость декантируют с осадка, переливают в чистую делительную воронку, добавляют 10 мл гексана, перемешивают, нижний слой удаляют, а гексановый слой упаривают на ротаторном испарителе досуха,

перерастворяют в 1 мл гексана и используют для газохроматографического анализа.

Раствор метиловых эфиров жирных кислот в гексане хранят в холодильнике не более суток.

ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ АНАЛИЗЕ СВЯЗАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (метаноллиз нейтральных жиров с кислотным числом <2).

Смешивают 50 мг образца с 1 мл гексана, 0,5 мл 2 М раствора метилата натрия или гидрата окиси калия и встряхивают в течение 1 мин. Смесь отстаивают для отделения метанольно-глицеринового слоя, верхний гексановый слой используют для ГЖХ.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ. 0,2 мкл гексанового экстракта, содержащего экстрагированные из пробы по методике метиловые эфиры жирных кислот, вводят в испаритель газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором и анализируют при программируемом изменении температуры колонки с 120 до 240°C (6°C в мин), температуре испарителя 250°C, температуре детектора 300°C, расход инертного газа на набивную колонку 75 мл/мин.

При тех же условиях анализируют гексановый раствор 1 мкг/мл эталонов метиловых эфиров жирных C₄₋₂₂ кислот. Времена удержания для 30 м x 0,3 мм капиллярной колонки с химически сшитой неподвижной фазой Carbowax составляет от 2,5 до 48 мин для C(4:0) и C(22:1) соответственно.

Для проведения количественного анализа строят калибровочные графики зависимости логарифмов времени удержания от числа углеродных атомов в цепи. Идентифицируют полученные пики по градуировочному графику или временам удержания соответствующих стандартов с использованием автоматической компьютерной программы обработки хроматографических данных.

Расчет. Содержание метиловых эфиров жирных C₄₋₂₂ кислот X (мг/кг) в анализируемом сырье вычисляют автоматически или в соответствии с градуировочными графиками по формуле

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где m_1 – масса метиловых эфиров жирных C₄₋₂₂ кислот, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 – общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 – масса анализируемой пробы, г; V_2 – объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно пре-

вышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Опыт 4. Определение глубины гидролиза жиров

Метод основан на титровании пробы гидролизованного жира раствором щелочи.

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Термостат на 20 – 120°C. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл. Бюретка на штативе.

Нейтрализованная смесь диэтилового эфира и 96%-ного этанола (2:1). 0,5 М или 1 М спиртовой раствор NaOH. Фенолфталеин, 10%-ный спиртовой раствор.

Ход определения. Навеску жира в количестве 2 г подсушивают в течение 5 мин при температуре 105°C, растворяют ее в 50 мл нейтральной смеси диэтилового эфира и 96%-ного этанола (2:1). К раствору добавляют 3 – 4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 М раствором NaOH до исчезающей в течение 1 мин слабо-розовой окраски раствора.

Расчет. Глубину расщепления X (% свободных жирных кислот) в пересчете на олеиновую кислоту рассчитывают по формулам при титровании 0,5 М раствором NaOH: $X = 14,1 \cdot V \cdot K / g$, при титровании 1 М раствором NaOH: $X = 28,2 \cdot V \cdot K / g$, где V – количество раствора NaOH, пошедшее на титрование навески, мл; K – поправка к титру растворов; g – навеска жира, г.

Коэффициент 14,1 уточняют экспериментально для конкретного образца жира в зависимости от реального содержания в нем олеиновой кислоты.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $P = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Опыт 5. Определение кислотного числа жиров и масел

КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО (КЧ, к.ч.) – это количество миллиграммов гидроксида калия KOH, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира или масла.

Метод основан на титровании содержащихся в жире и маслах свободных жирных кислот в присутствии индикатора .

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл. Бюретка на штативе.

Нейтрализованная смесь диэтилового эфира и 96%-ного этанола (2:1). 0,1 М спиртовой раствор КОН. Фенолфталеин, 1%-ный раствор.

Ход определения. Навеску жира или масла в количестве 4 г, взятую в коническую колбу, смешивают с 50 мл нейтральной смеси диэтилового эфира и 96%-ного этанола (2:1). К раствору добавляют 4 капли спиртового раствора фенолфталеина, перемешивают в течение времени, достаточном для максимальной гомогенизации смеси и титруют из бюретки 0,1 М раствором КОН до исчезающей в течение 30 с слабо-розовой окраски раствора.

Расчет. Кислотное число КЧ (мгКОН/г) рассчитывают по формуле $KЧ = 5,611 \cdot V \cdot K / g$, где 5,611 – титр 0,1 М раствора КОН; V – количество раствора КОН, пошедшее на титрование, мл; K – поправка к титру; g – навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $P = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Опыт 6. Определение кислотного числа в сильно окрашенных смесях, содержащих липиды

Метод основан на титровании в солевой среде содержащихся в жире и маслах свободных жирных кислот в присутствии индикатора без применения органических растворителей. После нейтрализации всех жирных кислот избыток щелочи переходит в раствор соли и окрашивает его в присутствии фенолфталеина в светло-розовый цвет.

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл с пришлифованной пробкой. Бюретка на штативе.

Нейтрализованный насыщенный раствор NaCl. 0,1 М водный раствор КОН. Фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор.

Ход определения. Навеску жира или масла в количестве 10 г, взятую в коническую колбу, смешивают с 50 мл нейтрального насыщенного раствора NaCl и 0,5 мл раствора фенолфталеина, перемешивают в течение

времени, достаточном для максимальной гомогенизации смеси и титруют из бюретки 0,1 М раствором КОН.

При титровании встряхивание повторяют после прибавления каждой 5 капель раствора щелочи, до тех пор, пока не исчезнет окраска нижнего слоя жидкости. Замедление исчезновения окраски после очередного встряхивания должно сопровождаться более частым встряхиванием колбы, после добавления 1–2 капель раствора щелочи.

Расчет. Кислотное число КЧ (мг КОН/г) рассчитывают по формуле: $KЧ = 5,611 \cdot V \cdot K / g$, где 5,611 – титр 0,1 М раствора КОН; V – количество раствора КОН, пошедшее на титрование, мл; K – поправка к титру; g – навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $P = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Опыт 7. Определение перекисного числа жиров

ПЕРЕКИСНОЕ ЧИСЛО (ПЧ, п.ч.) – это количество граммов йода, выделенного из йодистого калия перекисями, содержащимися в 100 г жира или масла.

Метод основан на титровании йода, выделяемого из йодистого калия перекисными соединениями жиров, тиосульфатом натрия в присутствии крахмала.

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл с притертой пробкой. Бюретка на штативе. Секундомер. Водяная баня на 100°C. Цилиндр мерный вместимостью 100 мл.

Хлороформ х.ч. Уксусная кислота х.ч., 100%-ная, ледяная. Калий йодид KI, свежеприготовленный насыщенный раствор ($S_{H_2O} > 145$ г/100г воды при 20°C). Тиосульфат натрия чда, 0,01 н. раствор, готовят растворением $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в дистиллированной воде или из фиксаля. Крахмал картофельный ч., 1%-ный раствор, готовят смешением 1 г крахмала с 20 мл холодной воды и добавлением при перемешивании 80 мл кипящей воды. Вода дистиллированная.

Ход определения. Навеску жира или масла в количестве 1 г, взятую в коническую колбу, расплавляют на водяной бане и по стенке колбы, смывая капли жира, добавляют 10 мл хлороформа, перемешивают смесь, затем добавляют 10 мл ледяной CH_3COOH и быстро вливают 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора KI. Колбу закрывают

пробкой, перемешивая содержимое вращательным движением, и включают секундомер. Через 3 мин в колбу вливают 1 мл 1%-ного раствора крахмала, 100 мл дистиллированной воды и титруют 0,01 н. раствором тиосульфата натрия до исчезновения синей окраски. В конце титрования раствор тиосульфата добавляют по капле, перемешивая содержимое после каждого добавления раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Параллельно проводят холостой опыт, взяв вместо жира 1 мл воды. Качество используемых для анализа реактивов считается приемлемым, если на контрольное определение в холостом опыте израсходовано не более 0,07 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия.

Расчет. Перекисное число ПЧ (г $\text{I}_2/100$ г или %) рассчитывают по формуле $\text{ПЧ} = (V_1 - V_2) \cdot 0,00127 \cdot K \cdot 100 / g$, где V_1 – количество 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование пробы с навеской жира, мл; V_2 – количество 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование контрольной пробы без навески жира, мл; K – поправочный коэффициент 0,01 н. раствора тиосульфата, равный 1 при приготовлении 0,01 н. раствора тиосульфата из фиксанала; 0,00127 – количество г йода, эквивалентное титру 0,01 н. раствора тиосульфата натрия; g – навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при вероятности $P = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Степень порчи жира оценивается по величине перекисного числа. При величине ПЧ $< 0,03$ пищевой жир считается свежим, при значении ПЧ от 0,03 до 0,06 жир свежий, но не подлежащий хранению, при значении ПЧ от 0,06 до 0,1 жир оценивают как сомнительной свежести и для значения ПЧ $> 0,1$ жир является испорченным.

Опыт 8. Определение йодного числа жиров

ЙОДНОЕ ЧИСЛО (ИЧ, и.ч.) – это количество граммов йода, вступающего в реакцию с 100 г жира или масла.

Метод основан на титровании избытка йода, не вступившего в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав анализируемых жиров, тиосульфатом натрия в присутствии крахмала по методу Гюбеля.

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 500 мл с притертой пробкой. Бюретка на штативе. Часы. Водяная баня на 100°C . Цилиндр

мерный вместимостью 100 и 500 мл. Устройство для фильтрования через бумажный фильтр.

Хлороформ х.ч. Спирт этиловый 95%-ный. Раствор Гюбеля, готовят смешением равных объемов (1:1) раствора А (25 г йода I_2 в 500 мл спирта этилового) и профильтрованного раствора Б (30 г хлорида ртути (II) – сулемы $HgCl_2$ в 500 мл спирта этилового); растворы А и Б хранят в темноте отдельно, смесь (1:1) хранят в темноте не более 2 суток. Калий йодид KI ч.д.а., 20%-ный раствор. Тиосульфат натрия ч.д.а., 0,1 н. раствор, готовят растворением $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в дистиллированной воде или из фиксанала. Крахмал картофельный, 1%-ный раствор, готовят смешением 1 г крахмала с 20 мл холодной воды и добавлением при перемешивании 80 мл кипящей воды. Вода дистиллированная.

Ход определения. Навеску жира или масла в количестве 0,6 г, взятую в коническую колбу, расплавляют на водяной бане и по стенке колбы, смывая капли жира, добавляют 15 мл хлороформа, перемешивают смесь, затем добавляют 25 мл раствора Гюбеля быстро закрывают пробкой смоченный раствором йодида калия, перемешивая содержимое вращательным движением, и ставят пробы в темное место на 18 ч при температуре $20^\circ C$. Через 18 ч в колбу вливают 15 мл 20%-ного раствора KI , 100 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до появления светло-желтой окраски. В конце титрования в смесь добавляют 5 капель 1%-ного раствора крахмала, раствор $Na_2S_2O_3$ добавляют по капле, перемешивая содержимое после каждого добавления титранта, до исчезновения голубовато-фиолетового окрашивания. Параллельно проводят холостой опыт, взяв вместо жира 0,6 мл воды.

Расчет. Йодное число $ИЧ$ ($гI_2/100$ г жира или %) рассчитывают по формуле $ИЧ = (V_1 - V_2) \cdot 0,01269 \cdot K \cdot 100 / g$, где V_1 – количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование контрольной пробы без навески жира, мл; V_2 – количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование опытной пробы с навеской жира, мл; K – поправочный коэффициент 0,1 н. раствора тиосульфата, равный 1 при приготовлении 0,1 н. раствора тиосульфата из фиксанала; 0,01269 – количество г йода, эквивалентное титру 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; g – навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при вероятности $P = 0,95$ превышать $\pm 0,6$ % от определяемой величины.

Опыт 9. Жировые эмульсии. Оценка эмульгирующей способности эмульгатора

Метод основан на измерении объема слоя образованного в результате диспергирования липидной эмульсии по отношению к общему объему дисперсионной среды.

Метод предназначен для оценки эмульгирующей способности растворов белков и др. ПАВ по отношению к жидким жирам (или расплавам жиров).

Оборудование, реактивы и материалы. Диспергатор жидкостей. Центрифуга. Мерные цилиндры. Масло растительное рафинированное.

Ход определения. К 10 мл испытуемого водного раствора эмульгатора, например 7%-ного раствора белка, добавляют 10 мл рафинированного подсолнечного масла, эмульгируют смесь на диспергаторе или миксере со скоростью 8000 об/мин в течение 5 минут. После этого эмульсию центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 2000 об/мин.

Расчет. Жиро-эмульгирующую способность (ЭМ, %) оценивают по формуле $ЭМ = V_1 / V_2 \cdot 100$, где V_1 – объем эмульгированного слоя; V_2 – общий объем, мл.

Опыт 10. Оценка стабильности эмульсии

Метод основан на измерении объема слоя образованного в результате нагревающего разрушения липидной эмульсии по отношению к общему объему дисперсионной среды.

Оборудование, реактивы и материалы. Диспергатор жидкостей. Центрифуга. Мерные цилиндры. Термостат с регулируемым нагревом 20 – 100°C. Масло растительное рафинированное.

Ход определения. К 10 мл водного раствора эмульгатора, например, 7%-ного раствора белка, добавляют 10 мл рафинированного подсолнечного масла, эмульгируют смесь на диспергаторе или миксере со скоростью 8000 об/мин в течение 5 минут.

Полученную эмульсию нагревают в течение 0,5 ч при температуре 80°C, затем смесь охлаждают холодной водой в течение 10 мин.

После этого эмульсию центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 2000 об/мин.

Расчет. Стабильность эмульсии оценивают по формуле $Стабильность\ эмульсии,\ \% = V_1 / V_2 \cdot 100$, где V_1 – объем эмульгированного слоя, мл; V_2 – общий объем, мл.

Контрольные вопросы

1. Что называют липидами. Почему они так важны для человека?
2. Какие составные части липидов придают им гидрофобность и гидрофильность?
3. Как отличаются липиды от других веществ по растворимости ?

Работа 22. Методы разделения веществ.
Основы центрифугирования

При проведении исследований в области биологии, биохимии, медицины и биотехнологии необходимо проводить разделение жидких неоднородных смесей. Одним из наиболее используемых методов разделения является центрифугирование.

При центрифугировании происходит разделение жидких систем под действием центробежных сил. Центрифугирование проводят в специальных прочных пробирках, которые помещают в ротор, установленный на валу быстро вращающегося электродвигателя. Чем больше скорость вращения, тем больше центробежная сила. Действие центробежной силы на частицы разделяемой системы происходит различно: крупные частицы оседают быстрее, мелкие – медленнее. По истечении определенного времени, например при центрифугировании в течение 30 мин при 5000 об/мин 1%-ной суспензии мела, образуется два слоя: слой надосадочной жидкости (супернатант) и нижний слой осадка твердых частиц.

При описании условий центрифугирования принято указывать время центрифугирования и число оборотов. Поскольку роторы могут быть разного диаметра, то и сила тяжести, действующая на вещество пробирки при одинаковом числе оборотов будет отличаться. Поэтому, вместо скорости вращения в об/мин принято указывать значение относительного центробежного ускорения или так называемый фактор разделения – число G (g).

G определяют по специальным номограммам или по формуле

$$G = 1,11 \cdot 10^{-5} \cdot R \cdot W_2,$$

где R – расстояние от оси вращения до середины центрифужной пробирки, см; W – скорость вращения ротора, об/мин.

Целью данной работы является освоение процесса центрифугирования с помощью лабораторной центрифуги. В качестве смеси для разделения используется биомасса пивных дрожжей

Saccharomyces Carlsbergensis, применяемая в процессе пивного производства.

Оборудование. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. Весы лабораторные технические 0 – 0,5 кг. Центрифуга лабораторная, 8000 об/мин, ротор 4x250 мл или другой конфигурации.

Реактивы. Водная суспензия пивных дрожжей *Saccharomyces Carlsbergensis*. Дистиллированная вода.

Описание центрифуги и принцип ее работы. Центрифуга лабораторная малогабаритная настольная ЦЛН-2 предназначена для разделения неоднородных жидких систем с помощью центробежных сил.

Центрифуга работает с ротором углового типа РУ 6x10 с частотой вращения от 3000 до 8000 об/мин (через каждые 1000 об/мин).

Плотность жидкости, разделяемой в пробирках из полимерных материалов, не должен быть более 2 г/см³, в стеклянных пробирках – не более 1,5 г/см³. Максимальный объем центрифугата – 60 см³.

На основании центрифуги монтируется корпус и привод с электродвигателем. Ротор устанавливается на вал электродвигателя. Рабочая камера центрифуги закрывается крышкой с самозакрывающимся устройством.

На корпусе центрифуги имеется переключатель оборотов (от 3000 до 8000 об/мин). Напряжение из сети поступает на автотрансформатор, затем на электродвигатель привода центрифуги. В зависимости от положения переключателя оборотов напряжение, подводимое к электродвигателю, будет иметь различные величины, поэтому каждому положению переключателя соответствует определенная частота вращения ротора.

Ход работы

1. Открыть крышку центрифуги, оттянув пружину. Проверить плотно ли насажен ротор на вал электродвигателя.

Если разделение ведется в стеклянных пробирках – проверить наличие амортизаторов в каждом гнезде ротора.

2. Наполнить пробирки (стеклянные или из полимерных материалов) разделяемой смесью – культурой пивных дрожжей (*Saccharomyces Carlsbergensis*), затем разместить пробирки в роторе.

Внимание! Каждую пару наполненных пробирок необходимо размещать в радиально противоположных гнездах ротора, при этом различие в массе диаметрально противоположных пробирок, заполненных центрифугируемым материалом, не должен превышать величину 0,5 г.

Для этого центрифужные пробирки перед установкой в ротор уравнивают (по суммарной массе) на весах. Пробирки заполняют не более чем на 2/3 объема из-за возможности выплескивания содержимого.

3. Навинтить крышку ротора на выступающий резьбовой конец вала электродвигателя против часовой стрелки, закрыть крышку центрифуги.

Внимание! Запрещается включать центрифугу с неустановленной крышкой ротора и с открытой крышкой центрифуги.

4. Подключить центрифугу к источнику питания (переменный ток 220 В, 50 Гц) и повернуть ручку переключателя оборотов в положение "3". Перед каждым последующим переключением в сторону увеличения числа оборотов ротора ручку переключателя необходимо выдержать на каждой ступени не менее 30 сек.

Внимание! При разделении в стеклянных пробирках запрещается работать на частоте вращения ротора свыше 4000 об/мин; при работе с пробирками из полимерных материалов запрещается превышать максимальную частоту вращения ротора – 8000 ± 800 об/мин.

5. По окончании центрифугирования поставить ручку переключателя частоты вращения ротора в положение "0". После остановки ротора открыть крышку центрифуги, отвинтить крышку ротора и вынуть пробирки.

Внимание! Запрещается открывать крышку центрифуги до полной остановки ротора.

6. Внимательно рассмотреть полученную разделенную смесь. Описать каждую фракцию разделенной системы.

Расчет. Записать в протоколе условия центрифугирования (время, число оборотов, число G).

Оценить и указать в % примерный объем отдельных фракций по сравнению с общим исходным объемом жидкой неоднородной системы (записать фракционный состав).

Контрольные вопросы

1. Что такое центрифугирование и какова цель его проведения?
2. В каких областях науки и техники применяется центрифугирование?
3. Назвать основные части центрифуги и описать принцип ее работы.
4. На чем основан процесс разделения в центрифуге?
5. Какие смеси разделяются центрифугированием?
6. Перечислить основные правила предосторожности при работе с центрифугой.

Работа 23. Изучение объектов под микроскопом. Основы микроскопирования

При проведении работ в области биологии и биотехнологии достаточно простым и распространенным методом исследований является визуальное наблюдение прозрачных и полупрозрачных препаратов в проходящем свете. Подобные наблюдения проводятся с помощью оптического микроскопа и называются микроскопированием.

Цель работы заключается в освоении микроскопирования с помощью биологического оптического микроскопа. В качестве препаратов для исследования могут быть использованы срезы растений, культуры микроорганизмов, водных простейших и другие микрообъекты.

Оборудование. Лабораторный микроскоп "Биолам Р-12" с комплектом принадлежностей. Микробиологическая петля.

Реактивы. 1. Иммерсионное масло. 2. Вода дистиллированная. 3. Спирт этиловый. 4. Образцы микрообъектов для наблюдений.

Устройство и работа микроскопа. Биологический оптический микроскоп "Биолам Р-12" предназначается для исследований прозрачных препаратов в проходящем свете. Микроскоп базируется на одном штативе, укомплектованном предметным столиком, визуальными насадками, осветительными устройствами, набором объективов и окуляров.

Оптическая схема микроскопа делится на две системы:

- осветительную, включающую в себя зеркало (или искусственный осветитель), и конденсор прямого или косого освещения;
- наблюдательную, состоящую из объектива, призмы и окуляра монокулярной насадки.

Пучек лучей света от источника падает на зеркало, которое отражает свет к диафрагме, проходит через конденсор, исследуемый препарат и попадает в объектив.

Если естественного света недостаточно, то вместо зеркала используют искусственный осветитель. Объектив дает изображение препарата в плоскости диафрагмы окуляра, который служит для рассматривания увеличенного изображения объекта. Устойчивое положение микроскопа на рабочем столе обеспечивается четырьмя опорными винтами внизу основания. К основанию крепится также коробка с механизмом микрометрической системы фокусировки. При вращении диска, связанного с микрометрическим винтом, происходит перемещение тубусодержателя. Один оборот диска соответствует перемещению тубуса на 0,5 мм.

Предметный столик крепится на кронштейне, который смонтирован на коробке механизма микрометрического фокусирования. При помощи двух винтов столик можно перемещать для центрирования, что позволяет привести в поле зрения нужный участок препарата.

На поверхности столика имеются пружинные клеммы, прижимающие препарат. В нижней части тубуса на головке укреплен револьвер, в котором имеется четыре отверстия с резьбой для ввинчивания четырех объективов: 8x0,2, 20x0,40, 40x0,75, 90x1,25. В верхней части тубуса имеется отверстие для одного из двух окуляров: 7x и 15x. С каждым из объективов можно применять любой из окуляров. В начале наблюдений, однако, рекомендуется пользоваться самым слабым окуляром (7x).

Ход работы

1. Ввернуть в револьвер объективы и вставить в трубку визуальной насадки один из двух окуляров.

2. Настроить освещение естественным или искусственным светом. При ответственных работах или фотографировании препарата следует пользоваться искусственным освещением, для чего рекомендуется применять специальные осветители.

При работе с естественным светом микроскоп надо поставить так, чтобы зеркало было обращено к окну и направляло свет в микроскоп от яркого участка неба или от светлого облака. Следует избегать положений зеркала, при которых солнечные лучи создают ослепляющее освещение. На пути лучей света не должны быть расположены посторонние предметы.

Яркое и равномерное освещение поля зрения достигается наклоном зеркала, которое должно быть повернуто к свету плоской стороной. Вогнутой стороной зеркала пользуются в редких случаях при работе со слабыми объективами.

3. Подготовить по указанию преподавателя образцы препаратов клеток.

Существует два способа подготовки подобных препаратов: метод раздавленной капли и метод висячей капли.

3.1. Для приготовления препарата методом раздавленной капли необходимо предметное стекло без лунки и покровное стекло. В каплю воды на предметном стекле с помощью предварительно прокаленной микробиологической петли помещают исследуемую культуру. Затем каплю закрывают покровным стеклом, "раздавливая".

3.2. Для приготовления препарата методом висячей капли необходимо предметное стекло с лункой и покровное стекло. В каплю воды на предметном стекле с помощью предварительно прокаленной микробиологической петли помещают исследуемую культуру и закрывают каплю покровным стеклом так, чтобы капля "повисла".

4. После приготовления препарата можно приступить к его исследованию под микроскопом. Для этого препарат фокусируют пружинными клеммами на предметном столике, а затем рассматривают с помощью нужного объектива (в зависимости от степени увеличения).

Револьвер обеспечивает центрирование любого из объективов над предметным столиком с помощью фиксатора, расположенного внутри револьвера.

5. В микроскопе имеются четыре объектива. Рекомендуется исследовать препарат с возрастанием увеличения.

5.1. Работа с объективом 8x0,20.

Этот объектив имеет наибольшее поле зрения, он применяется, главным образом, в качестве искателя для предварительного осмотра препарата и выбора участков для более подробного исследования.

После проверки удовлетворительности освещения и фиксирования препарата в клеммах на предметном столике установить, аккуратно вращая микрометрический винт, достаточную для наблюдения четкость изображения. Передвигая с помощью винтов предметный столик, провести наблюдения и записать в журнал наблюдения.

5.2. Работа с объективом 20x0,40.

После того, как выбран участок препарата, намеченный для изучения, необходимо возможно точнее привести его изображение в центр поля микроскопа, повернуть револьвер до щелчка и ввести в ход лучей объектив 20x0,40. При необходимости микроскоп фокусируют на резкость изображения поворотом микрометрического винта. Рассмотреть препарат и записать наблюдения. Объектив 20x0,40 дает контрастное и резкое изображение только с покровным стеклом толщиной 0,17 мм. При отклонении толщины от указанной на $\pm 0,02$ мм качество изображения ухудшается.

5.3. Работа с объективом 40x0,75 (объектив водной иммерсии). При работе с данным объективом необходимо применять водную иммерсию. Для этого, при включении объектива 40x0,75 в ход лучей (после выбора участка препарата и приведения его изображения в центр поля микроскопа со слабым объективом 8x0,20) предварительно наносят на фронтальную линзу иммерсионного объектива и на препарат (на покровное стекло) по капле дистиллированной воды.

После включения объектива необходимо снова подфокусировать микроскоп, затем провести наблюдения и записать результаты. Следует помнить, что данный объектив очень чувствителен к изменению толщины покровного стекла. Недопустимо соприкосновение объектива с препаратом, так как это ведет к поломке микроскопа. По окончании работы воду с объектива необходимо удалить протиранием поверхности ватой, намотанной на деревянную палочку.

5.4. Работа с объективом 90x1,25 (иммерсионный объектив).

До начала работы с объективом 90x1,25 необходимо, пользуясь объективами 20x0,40 или 40x0,75 и окуляром 7x, возможно точнее установить интересующий участок объекта в центр поля зрения микроскопа.

Перед введением в ход лучей иммерсионного объектива необходимо нанести на его фронтальную линзу и на препарат по капле специального иммерсионного масла. Работа с объективом ведется аналогично работе с объективом 40x0,75. После коррекции и фокусировки изображения провести наблюдения объекта и записать результаты. После завершения работы, иммерсионное масло снять с объектива с помощью ваты, слегка смоченной этиловым спиртом.

6. После завершения наблюдений все предметные и покровные стекла промыть и протереть от влаги и загрязнений.

Контрольные вопросы

1. Что такое микроскопирование?
2. В каких областях науки применяют микроскопирование и почему?
3. Опишите устройство и принцип работы микроскопа.
4. Опишите методы приготовления препаратов живых клеток.
5. В чем заключается особенность работы с обычным и иммерсионным объективом?

Работа 24. Изучение препаратов и образцов методом световой микроскопии

Оборудование. Лабораторный микроскоп "Биолам Р-12" с комплектом принадлежностей. Микробиологическая петля.

Реактивы . 1. Иммерсионное масло. 2. Вода дистиллированная. 3. Спирт этиловый ректификат 96%-ный. 4. Водный раствор формальдегида 37%-ный (формалин). 5. Агар-агар. 6. Малахитовый зеленый или другой краситель, 1 – 2%-ный раствор. 7. OsO₄.

Препараты живых культур. Препараты живых клеток сохраняют форму, структуру, размеры и подвижность изучаемых микроорганизмов, однако простое микроскопирование не позволяет изучать более тонкое строение клетки.

1. Метод раздавленной капли

Метод применяется наиболее часто при исследовании морфологии и подвижности микроорганизмов.

Каплю микробной суспензии помещают на поверхность чистого обезжиренного предметного стекла. При работе с культурой, выросшей на твердой питательной среде, на предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды, затем стерильной петлей берут небольшое количество культуры и перемешивают ее в капле. Покровное стекло

помещают ребром на предметное стекло и осторожно опускают его на суспензию, следя за тем, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха. Избыток жидкости удаляют полоской фильтровальной бумаги.

2. Метод висячей капли

Препараты, подготовленные методом висячей капли, используются при изучении подвижности микроорганизмов, а также для исследования особенностей размножения бактерий, когда необходимо длительное наблюдение за развивающейся культурой.

Для подготовки препарата удобно использовать специальное предметное стекло с лункой. На середину покровного стекла наносят каплю исследуемой суспензии так, чтобы она не растекалась. Покровное стекло переворачивают и помещают на предметное стекло с лункой так, чтобы капля свободно висела не касаясь дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. В результате получается герметичная камера. Такую же камеру можно приготовить, если использовать вместо стекол с лунками кольца из стекла или полиэтилена.

При соблюдении стерильных условий (стерильные стекла, стерильная питательная среда) возможно достаточно длительное наблюдение за особенностями деления клеток и развитием культуры.

3. Агаровая пластинка

Агар используется для изучения морфологии микроорганизмов в тех случаях, когда необходимо наблюдать агрегации клеток в ненарушенном состоянии, например псевдоколонии дрожжей, подвижность скользящих бактерий и др.

Для приготовления агаровых пластинок чистые стерильные предметные стекла погружают в расплавленную агаровую питательную среду в чашке Петри. С нижней стороны стекол агар вытирают увлажненной тканью. С помощью пастеровской пипетки или петли наносят на верхнюю сторону стекла суспензию микроорганизма. Скальпелем или лезвием бритвы обрезают агар вокруг засеянной области и кладут сверху стерильное покровное стекло. Препарат инкубируют во влажной камере в течение нескольких суток и микроскопируют. Чтобы препарат дольше не высыхал можно по краям покровного стекла залить воск или прозрачный лак.

В некоторых случаях, когда микроорганизмы чувствительны к недостатку кислорода, можно не накрывать заселенную область покровным стеклом, или накрывать лишь часть нанесенного штриха на поверхности пластинки, чтобы иметь возможность сравнить морфологию клеток в аэробных и полуаэробных условиях.

4. Отпечаток

Метод используют для изучения естественного расположения клеток микроорганизмов, чаще всего для исследования спорных форм и мицелиальных грибов.

Вырезают кусочек агара вместе с культурой и помещают его на предметное стекло колониями вверх. Затем к агаровой пленке прикладывают чистое покровное стекло и тотчас снимают, избегая смещений в сторону. Покровное стекло (с отпечатком вниз) накладывают на каплю воды на предметном стекле и микроскопируют.

Фиксированные препараты. Тонкую морфологию бактерий удобнее изучать на фиксированных окрашенных препаратах. Такие препараты применяют для количественных определений микроорганизмов. Приготовление фиксированных препаратов включает стадии: приготовление мазка, высушивание, фиксирование и окрашивание.

Приготовление мазка

На обезжиренное предметное стекло наносят исследуемый материал и равномерно распределяют его петлей или краем покровного стекла по площади 1 – 2 см² возможно более тонким слоем.

Высушивание

Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре. В отдельных случаях допускается осторожное подогревание препарата в струе теплого воздуха. Работу выполняют осторожно во избежание деформации клеток микроорганизмов.

Фиксация

Высушенный мазок необходимо зафиксировать, то есть умертвить клетки микроорганизмов. Фиксацию применяют, поскольку мертвые клетки лучше окрашиваются и закрепляются на поверхности стекла, а также при фиксации погибают патогенные микроорганизмы.

Применяют разные способы фиксации:

1. *Обработка фиксирующим раствором.* Для этих целей используют формалин, метанол, этанол, специальные растворы. Фиксирующий раствор наносят на поверхность мазка пипеткой или стекло с мазком погружают в кювету с фиксирующим раствором. Продолжительность фиксации составляет 3 – 5 мин.

2. Фиксация парами

Удобный метод фиксации препаратов в парах летучих веществ, в качестве которых применяют оксид осмия (VIII), формальдегид и глутаровый альдегид. Наиболее широко распространен метод фиксации препаратов в парах OsO₄. OsO₄ является достаточно токсичным веществом, поэтому работу с ним осуществляют под тягой в защитных очках.

Раствор OsO₄ наливают на дно чашки Петри. В нее помещают обрезки стеклянных палочек, на которые кладут препарат. Время

фиксации составляет до 2 мин. Метод позволяет фиксировать агаровые пластинки.

3. Термическая фиксация

Наиболее простой метод, который, однако, требует осторожного проведения. Прогрев стекла с культурой осуществляют осторожно в верхней части пламени без резкого перегрева.

4. Окраска

Высушенные и фиксированные мазки окрашивают различными красителями. Окраска препаратов позволяет сделать микроскопическую картинку более четкой, а также выявить более тонкие детали строения клетки и некоторые функциональные свойства (кислотоустойчивость).

Различают простые и сложные способы окрашивания. При простом окрашивании используют только один краситель. Способ применяют при изучении общей морфологии микроорганизмов или их количественного определения. Сложные способы окрашивания осуществляют несколькими красителями одновременно с целью выявления тонких клеточных структур.

Для прокрашивания препаратов микроорганизмов применяют разные красители:

красные: сафранин, фуксин, эритрозин,
фиолетовые: кристаллический фиолетовый,
синие: метиленовый синий,
зеленые: метиленовый зеленый, малахитовый зеленый,
желтые: конго, пикриновая кислота,
черные: индулин, нигрозин.

Простую окраску осуществляют тремя способами:

1. Препарат помещают на специальную подставку над кюветой и пипеткой наносят на мазок краситель. Длительность окраски зависит от применяемого красителя. После этого препарат промывают водой, удаляют влагу фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе.

2. На мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, на которую наносят краситель. При этом способе уменьшается расход красителя и слабее прокрашивается пространство между клетками. После окончания окраски бумагу удаляют, препарат промывают и высушивают.

3. Наиболее простой способ – препарат целиком опускают в кювету с красителем и выдерживают в нем необходимое время.

Сложную окраску можно проводить по методу Шефера-Фултона.

1. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют нагреванием.

2. Покрывают препарат полоской фильтровальной бумаги и наносят на нее раствор малахитового зеленого до насыщения красителем.

Препарат подогревают над пламенем горелки до появления паров и держат в таком состоянии в течение 5 мин, поддерживая влажное состояние добавлением красителя по мере испарения.

3. Промывают препарат дистиллированной водой до прекращения смыва красителя.

4. Прокрашивают препарат раствором сафранина в течение 30 с.

5. Препарат промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе. Эндоспоры окрашиваются в ярко-зеленый цвет, а вегетативные клетки – в красно-коричневые тона.

Применение нескольких красителей позволяет осуществлять более тонированное прокрашивание, поскольку разные части клеток прокрашиваются красителями разной химической природы по-разному.

Количественная оценка данных микроскопирования. Для определения количества клеток в 1 мл суспензии готовят препарат из известного объема суспензии клеток (с учетом, если необходимо, разведения) и подсчитывают количество клеток микроорганизмов в поле зрения микроскопа. Зная площадь поля зрения и объем суспензии, взятой для приготовления препарата, можно сделать пересчет на исходный объем суспензии и получить значение титра клеток.

Ход работы

1. Приготовить препарат методом раздавленной капли из дрожжевой культуры, изучить его под микроскопом и зарисовать.

2. Ознакомиться с методиками приготовления препаратов методом "висячей капли" и агаровой пластинки.

3. Приготовить окрашенный фиксированный препарат бактериальной культуры, рассмотреть под микроскопом и зарисовать.

4. Приготовить препарат для количественного учета численности микроорганизмов.

Для этого пипеткой отбирают точно 0,02 мл исследуемой суспензии, наносят ее на хорошо обезжиренное сухое предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу с очерченной площадью в 4 см². К капле суспензии добавляют каплю стерильного 0,1%-ного раствора агара, быстро перемешивают и распределяют равномерно при помощи микробиологической петли на отмеченной площади. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют в течение 20 мин 96%-ным этанолом и окрашивают красителем. Препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

Подсчет клеток микроорганизмов проводят с помощью иммерсионного объектива х90. Передвигая препарат по диагонали, просчитывают количество клеток не менее, чем в 50 полях зрения.

Измерение площади поля зрения микроскопа проводят с помощью микрометра, который представляет собой металлическую пластинку с отверстием в центре, в которое вставлено стекло. На стекло нанесена

линейка длиной 1 мм с ценой деления 0,01 мм. Сфокусировав изображение линейки с тем объективом, с которым выполняют работу, измеряют диаметр поля зрения (d) и рассчитывают площадь поля зрения (S).

5. Подсчитать количество клеток дрожжей в суспензии при разбавлении исходной 3%-ной суспензии в тысячу раз. Произвести расчет числа частиц в дезинтегрированной дрожжевой суспензии.

Расчет. Площадь поля зрения равна $S = (1/4)\pi d^2$, где $\pi = 3,14$. Расчет численности клеток (N) в 1 г (1 мл) образца проводят по формуле

$$N = \frac{S_c \cdot n}{V \cdot S} \cdot P,$$

где N – количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата, n – среднее количество клеток в поле зрения, S_c – площадь предметного стекла, на которой распределяли суспензию, мм^2 , S – площадь поля зрения микроскопа, мм^2 , V – объем суспензии, взятой для приготовления препарата, P – разведение.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы подготовки микроскопических препаратов?
2. Что включает способ приготовления фиксированного препарата?
3. Какие способы окраски препаратов существуют? Почему для окрашивания применяют разные красители?

Глава 5

МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВ И МОНИТОРИНГА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Работа 1. Почва как составная часть биосферы. Почвенные ферменты

Почвой называется самый поверхностный слой суши земного шара, возникающий, в результате изменения горных пород под воздействием живых и мертвых организмов (растительных, животных и микроорганизмов), солнечного тепла и атмосферных осадков. Почва

представляет собой совершенно особое природное образование, обладающее только ей присущим строением, составом и свойствами. Важнейшим свойством почвы является ее плодородие, т. е. способность обеспечивать рост и развитие растений. Именно растения, поглощая солнечный свет, создают органические вещества, являющиеся концентратом энергии, обеспечивающим развитие всего живого на Земле.

Почва представляет собой сложную и динамичную среду, развивающуюся под влиянием внешних факторов (гидросферы, атмосферы и биосферы). Ее свойства формируются постепенно при комбинированном воздействии последних: материнская порода выветривается под действием климата и растительности, органическое вещество смешивается с почвой, минералы пород выветриваются, органическое вещество медленно трансформируется сначала в свежий гумус, а затем в углекислоту, воду, аммиак и нитраты. Наконец, минеральные и органические компоненты перемещаются просачивающейся в почву дождевой водой, в результате чего почва разделяется на последовательные слои различной структуры, окраски и гранулометрического состава, называемые горизонтами.

Особенно важны такие функции почвы, как ее роль хранителя воды и питательных веществ. Именно эти функции определяют в значительной степени плодородие почв.

Особо следует отметить роль почвы как депо ферментов. Как правило, своим происхождением эти ферменты связаны с микроорганизмами. Они выделены микроорганизмами в почву, в которой находятся практически все ферменты, известные в живых организмах. Особое значение среди этих ферментов имеют пероксидазы, нитрогеназы, нитратредуктазы, каталазы и др. Указанные ферменты участвуют в превращении соединений азота, разрушении перекисей и других органических веществ. Установлена связь ряда ферментов с уровнем плодородия почв, хотя сама природа этой связи еще не раскрыта.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

Ферменты – биологические катализаторы, ускоряющие в сотни и тысячи раз химические реакции в живых организмах, обычно размещаются в органоминеральном геле (ОМГ) почв. Разнообразные ферменты накапливаются в ОМГ почв в результате жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, мезофауны и корневой системы растений. Они участвуют в основных звеньях тех процессов, с которыми связано возникновение и эволюция почвы и создание ее эффективного плодородия. Такими процессами являются: синтез и распад гумуса, гидролиз органических соединений, остатков высших растений и микроорганизмов, переводе их в состояние, доступное для усвоения растениями, а также

участие в многочисленных окислительно-восстановительных реакциях, происходящих в почве.

После 50-х годов в результате достижений молекулярной биологии и фундаментальных исследований оформилось самостоятельное научное направление в биологии почвы – почвенная энзимология (см. главу 3).

Почвенная энзимология изучает широкий круг сложных и важных научно-практических вопросов: природу биокаталитической способности почвы; происхождение, локализацию, состояние, состав и активность ферментов в почве; участие ферментов в разложении органического вещества, образовании гумуса, значение их в питании растений, т. е. выявление взаимоотношения компонентов системы почва – фермент – растение (корни); роль ферментов в происхождении и жизни почвы, формировании почвенного плодородия. Методы энзимологии и показатели ферментативной активности почв широко применяются при оценке плодородия почв, характеристике почвенных типов, при оценке эффективности тех или иных удобрений, агрономических приемов и т. д.

В то же время методы почвенной энзимологии не заменяют классических микробиологических методов исследования биологии почв. Если микробиология в основном рассматривает количественную и качественную характеристику присутствующих в почве микроорганизмов, то почвенная энзимология оценивает их биохимическую активность в условиях почвенной среды и их воздействие на почвенные компоненты с помощью своих биохимически активных катализаторов-ферментов. Использование методов почвенной энзимологии и микробиологии в комплексе с другими методами позволяет глубже понять биологию почвы.

К настоящему времени разработаны методы по определению активности большого количества ферментов, участвующих в разнообразных почвенных биохимических процессах.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ

Почвенно-энзимологические методы позволяют определять не количественное содержание ферментов в почве, а активность ферментов, находящихся преимущественно в адсорбированном состоянии на поверхности почвенных коллоидов и частично в почвенном растворе, что сводится к установлению каталитического действия почвенной пробы на процессы превращения соответствующих органических и минеральных соединений (субстраты), вносимых в почву.

Определение активности ферментов основано на учете количества переработанного в процессе реакции субстрата или образующегося продукта реакции в оптимальных условиях температуры, рН среды,

концентрации субстратов и навески почвы. Для количественного определения конечных продуктов реакции применяют различные химические, фотометрические, колориметрические, поляриметрические и другие способы. Для качественной характеристики ферментов широко используют хроматографические методы, которые дают хорошие результаты при гидролизе.

Сущность методов определения активности ферментов почвы заключается в следующем: навеску почвы насыщают антисептиком (толуолом), добавляют буферный раствор с рН, оптимальным для действия данного фермента, и определенное количество субстрата. Реакционную смесь при температуре 30 – 37°C выдерживают в термостате в течение определенного времени и проводят количественный учет или качественную идентификацию продуктов реакции. Активность фермента выражают в количествах переработанного субстрата или образующегося продукта реакции в течение определенного промежутка времени и рассчитывают на единицу веса почвы или гумуса.

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ

Инактивация деятельности микроорганизмов в почвенных пробах. Ферментативную активность почвы определяют в присутствии почвенных микроорганизмов в реакционной среде. В настоящее время еще нет достаточно точных методов, которые позволили бы количественно выделить ферменты из почвы без нарушения их структуры и изменения активности или определить активность ферментов в почве *in situ*, полностью исключая влияние микроорганизмов (их ферментов), и отделить ферменты почвенные от ферментов, поступивших из микроорганизмов в процессе эксперимента. Современные методы почвенной энзимологии дают общую характеристику активности ферментов, присутствующих в почве вне клеток живых организмов (свободные внеклеточные ферменты и внутриклеточные ферменты, связанные с фрагментами разрушающихся мертвых клеток микроорганизмов и тканей растений, – это так называемые почвенные ферменты), и отчасти ферментов, выделяемых живыми микроорганизмами в процессе определения ферментативной активности почвы. Отсюда вытекает главная методологическая проблема почвенной энзимологии – произвести эффективную инактивацию роста и физиологических процессов у микроорганизмов в почвенной пробе и в то же время оставить почвенные ферменты неизменными, не нарушая при этом химические и физические свойства почвы.

Основное требование к инактиваторам: они не должны разрушать клетки микроорганизмов (плазмолиз) и изменять проницаемость клеточных оболочек. Эффективная инактивация жизнедеятельности микроорганизмов

предотвращает поступление в почву дополнительных количеств ферментов и утилизацию субстрата и продуктов реакции микроорганизмами, которые могут исказить значение показателей ферментативной активности исследуемой почвы. Определение ферментативной активности может дать надежный результат только в том случае, если концентрация субстрата не снижается в результате обстоятельств, не связанных с ферментативным превращением его, если концентрация продуктов, образующихся из субстрата под воздействием ферментов, не изменяется вследствие процессов, не связанных с исследуемой ферментативной реакцией.

Для инактивирования деятельности микроорганизмов широко практикуют обработку почвенных проб толуолом за 10 – 15 мин. до внесения субстрата. Однако толуол подавляет некоторые оксидоредуктазы, поэтому активность этих ферментов в почве измеряют обычно без использования толуола. Применяют также ртутные препараты: мертиолят, сулему и т. д.

Для общей инактивации деятельности микроорганизмов в почве также используют высокоэнергетическое ионизирующее излучение (5 – 10 Мэв). При обработке почвы достаточно большими дозами гамма-лучей достигают почти полной стерилизации почвенной пробы при незначительном изменении активности ферментов, а также химических и физических свойств почвы. Для этого требуются специальные установки и мощные источники гамма-излучений.

На скорость ферментативных реакций влияет множество факторов. К ним относятся температура инкубации, концентрация водородных ионов, состав буферных растворов, концентрация субстрата, навеска почвы, активаторы и ингибиторы и т. д. При разработке почвенно-энзимологических методов определяют оптимальные значения этих констант, которые для всех групп и даже отдельных ферментов различны.

Навеска почвы и концентрация субстрата. Измерение активности ферментов в почве производят в определенных количествах почвенной пробы. С увеличением навески почвы скорость ферментативной реакции линейно возрастает. Концентрацию субстрата выбирают с расчетом, чтобы скорость ферментативной реакции была постоянной в течение всего периода экспозиции. Количество молекул субстрата должно хватить для насыщения всех молекул ферментов, содержащихся в данной навеске почвы, до конца реакции. Для этого требуется некоторый избыток субстрата, однако большой избыток снижает скорость реакции.

Оптимальную концентрацию субстрата устанавливают опытным путем для определенных величин навески почвы. Иногда произвольно берут разные навески почвы и концентрации субстратов. Однако для получения сопоставимых данных условия должны быть стандартизированы. В первую очередь необходимо установить минимальную величину навески почвы, в которой с достаточной точно-

стью можно обнаружить активность изучаемого фермента и соответственно этой навеске определить оптимальную величину концентрации субстрата.

Существенным требованием к субстратам в почвенно-энзимологических исследованиях является хорошая их растворимость. Нерастворимые или слаборастворимые субстраты трудно вступают во взаимодействие с ферментами (например, целлюлозы).

pH среды и буферные растворы. Скорость ферментативных реакций зависит от pH среды. Максимальная активность ферментов проявляется лишь в узком интервале значений pH, который называют оптимумом pH действия данного фермента. Как уменьшение, так и увеличение pH от оптимального значения приводит к снижению активности ферментов. Поддержание оптимального значения pH в реакционной среде при определении ферментативной активности является одним из важных условий. Опытным путем устанавливают значение оптимума pH ферментов. При этом следует учесть, что почвы с различными pH неодинаково влияют на сдвиг pH буферного раствора. При определении оптимумов pH почвенных ферментов после прибавления к почве реакционной смеси значение pH суспензии доводят до соответствующей величины потенциометрическим титрованием.

При определении ферментативной активности почв для обеспечения заданной pH используют буферные растворы с pH, соответствующим оптимуму действия данного фермента. Важное значение имеет катионно-анионный состав буферного раствора: различные катионы и анионы оказывают неодинаковое влияние на отдельные ферменты. Поэтому экспериментально подбирают необходимый состав буферного раствора для каждого вида ферментов.

Температура инкубации. Скорость ферментативных реакций зависит от температуры. По мере повышения температуры до определенного значения скорость реакции возрастает, при высоких температурах ферменты денатурируют и теряют свою активность. Низкие температуры снижают ферментативную активность. Максимальную активность почвенных ферментов обнаруживают в пределах температур от 45 до 60°C. Однако активность почвенных ферментов не определяют при оптимальных значениях температуры, так как они сильно отличаются от естественной температуры почвы за вегетационный период. Кроме того, в результате относительной длительности сроков инкубации (от нескольких часов до нескольких суток) при таких температурных условиях может произойти некоторая термическая инактивация ферментов. Определение активности почвенных ферментов обычно производят при температуре 30-50°C. Согласно рекомендации Международного союза по номенклатуре и классификации ферментов, необходимо придерживаться стандартной температуры 30°C.

Время инкубации. Ферментативную активность почвы необходимо определять при начальной скорости реакции и сохранять ее постоянной в течение всего времени экспозиции. Это связано с тем, что скорость ферментативной реакции может падать в результате следующих причин: 1) уменьшения концентрации субстрата ниже насыщающей, поскольку он расходуется в процессе реакции и может адсорбироваться почвой; 2) частичного разрушения самих ферментов во время реакции; 3) влияния образующихся продуктов реакции. Здесь возможны два типа влияния: специфическое торможение активности ферментов продуктами реакции и обратимость ферментативных реакций, так как по закону действующих масс скорость обратимых реакций пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ. В сложной почвенной среде могут действовать и другие ингибирующие факторы.

В результате относительно низкой активности почвенных ферментов время компостирования почв с субстратом продолжительное – от нескольких часов до нескольких суток. Необходимо время инкубации сократить до минимума, чтобы исключить отрицательный эффект вышеуказанных факторов и возможность роста колоний некоторых видов микроорганизмов.

Перемешивание реакционной смеси в процессе инкубации. Почвенные ферменты находятся в адсорбированном состоянии на поверхности почвенных коллоидов. Постоянный приток субстрата к ферментам и удаление продуктов реакции из зоны действия достигаются периодическим взбалтыванием реакционной смеси в процессе инкубации. Имеет значение частота встряхивания, которую устанавливают опытным путем при определении активности каждого фермента.

Количественная экстракция продуктов реакции. Одним из важных требований к методам почвенной энзимологии является полная экстракция из почвы продуктов ферментативной реакции, по количеству которых измеряют активность фермента. В качестве экстрагентов используют соответствующие буферные растворы и различные растворители. Измеряют количество экстрагированного компонента продуктов ферментативной реакции, который не адсорбируется или минимально адсорбируется почвой. Например, при определении фосфатазной активности лучше измерять количество органической части продуктов гидролиза фенилфосфата или фенолфталеинфосфата – фенола и фенолфталеина, так как ортофосфат активно связывается почвой и в результате можно получить заниженные показатели активности.

Контрольные пробы. В почве всегда присутствуют вещества, аналогичные продуктам распада большинства органических соединений, применяемых в качестве субстратов при почвенно-энзимологических исследованиях (глюкоза, аминокислоты, фосфор, аммоний и др.). Поэтому

для корректировки результатов определения активности ферментов ставят следующие контрольные опыты.

1) Контроль на неферментативное превращение субстрата (контроль без фермента). Строго обязателен особенно при определении активности окислительно-восстановительных ферментов, потому что в почве всегда присутствуют переменновалентные катионы (Cu, Mn, Mo и др.), способные переносить электроны. Обычно неферментативный гидролитический распад субстратов в почве незначителен или отсутствует. Параллельные навески почв в реакционных сосудах стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение двух-трех часов или автоклавируют при 0,2 МПа в течение 1 ч несколько раз. Однако такие контроли нецелесообразны в тех случаях, когда продукты ферментативных реакций определяют фотометрическим способом или титрованием. Нагревание почвы при высокой температуре сильно изменяет органическое вещество, которое растворяется и окрашивает фильтраты. Вместо жесткой термической инактивации ферментов часто используют специфические химические ингибиторы – соли тяжелых металлов, цианиды и др. В стерилизованную сухим жаром или обработанную ингибитором почву вносят антисептик, буферный раствор, субстрат и дальше проводятся те же операции, что и с опытными пробами. В опытные сосуды сразу после прекращения инкубации добавляют такое же количество ингибитора.

2) Контроль на почвенные вещества, учитываемые вместе с продуктами ферментативной реакции (контроль без субстрата). Нестерильную почву обрабатывают толуолом, вносят буфер и соответствующий объем воды вместо субстрата. Дальнейшие операции аналогичны с опытными.

3) Контроль на чистоту реактивов и субстрата и на спонтанный распад субстрата (контроль без почвы). В реакционные сосуды наливают указанное в соответствующей методике количество субстрата, буфера и антисептика и контрольную смесь обрабатывают как опытную. Достаточно поставить один контроль для данной серии реактивов и субстрата.

При определении активности гидролитических ферментов можно ограничиться постановкой контроля без субстрата и контроля без почвы. Однако предварительно следует убедиться в том, что неферментативный гидролиз субстрата в почве не происходит, для чего ставят несколько контролей без фермента. При определении активности окислительно-восстановительных ферментов достаточен контроль без фермента, так как он включает в себя контроль без субстрата и контроль без почвы. При расчете ферментативной активности сумму показателей контрольных проб вычитают из показателя опытных вариантов, и разница соответствует количеству продукта, образовавшегося в результате ферментативного превращения субстрата; при пересчете на единицу веса почвы продукт

ферментативной реакции характеризует ферментативную активность почвы.

Единицы измерения активности ферментов в почве. В почвенной энзимологии еще не разработаны стандартные рекомендации по определению активности ферментов. Как условия и методы определения активности ферментов, так и выражение результатов измерений весьма разнообразны. Для отдельных ферментов предложены различные и произвольные единицы. Например, ферментативную активность выражают в физических изменениях субстрата (изменении вязкости, поляризации, оптической плотности), в количествах продуктов реакции, в количествах превращенной или остаточной части субстрата, в ферментных или энергетических единицах и т. д. Отсутствие стандартных единиц измерения активности ферментов не дает возможности сопоставить результаты даже при применении единых методов.

Наряду с разработкой стандартных условий определения активности ферментов в почве, необходимо унифицировать единицы измерения скорости ферментативных реакций. По-видимому, в настоящее время целесообразно сохранить наиболее широко используемую единицу измерения – количество продуктов ферментативного превращения субстрата (мкг, мг, мл, см³, мкМ и др.) на единицу веса почвы за единицу времени при 30°C. В то же время, в соответствии с рекомендацией Международного биохимического союза по ферментам (1962), за единицу измерения принята стандартная ферментная единица (Е). Одна стандартная единица соответствует такому количеству фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение 1 мкМ субстрата в 1 мин. В условиях почвенных ферментов это количество рассчитывают на единицу веса почвы (например, на 1 г почвы).

Отбор почвенных образцов и подготовка к ферментативному анализу. Почвенные образцы нужно отбирать тщательно, так как все последующие результаты будут определяться тем, насколько правильно они были отобраны.

Предварительно делают подробные записи в дневнике с указанием района исследований, описанием выбранного места закладки разреза, участка или опытного поля (рельеф, растительность, предшествующие культуры, агротехника, внесение удобрений) и подробной характеристикой почвы. Обязательно записывают время взятия образца.

Методика отбора почвенных образцов определяется поставленными перед исследователем задачами. При изучении ферментативной активности под различной растительностью образцы почвы берут из зоны ризосферы и вне ризосферы по фазам развития растений. Следует учесть, что в целинных почвах и под многолетними травами максимальную ферментативную активность обнаруживают в слое 0–5–7 см, причем она

сильно уменьшается в более глубоких слоях. Поэтому этот слой целесообразно брать отдельно.

При изучении пахотных почв образцы берут на всю глубину пахотного слоя, предварительно удалив возможно загрязненный самый верхний слой почвы. Пахотный горизонт можно расчленить на 2 – 3 слоя. В летние месяцы слой 0 – 5 см может сильно иссушаться, и активность в нем снижается. В условиях нормального увлажнения и тепла этот слой характеризуется максимальной активностью. При исследовании влияния удобрений и агротехнических приемов на биохимические процессы пробы отбирают несколько раз в течение вегетационного периода, сроки лучше приурочивать к фазам развития опытных сельскохозяйственных культур. Во всех случаях берут смешанные пробы. Для микробиологической характеристики опытных участков и определения ферментативной активности на каждую сотметровую делянку рекомендуют брать пять образцов в соответствии с методами изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Каждый образец составляют из трех смешанных проб. Если делянка меньше 100 м², то достаточно брать три образца по диагонали, составленные из трех смешанных проб. Каждый образец анализируют отдельно.

Необходимое число повторностей проб для учета активности с точностью до 10 – 15% при уровне значимости не менее 0,95 можно рассчитать исходя из коэффициента варьирования активности ферментов на анализируемой площади.

После каждой делянки инструменты (лопатка, бур, нож) тщательно очищают многократным втыканием в почву, из которой взяты образцы.

При изучении распределения ферментов по почвенному профилю образцы берут по генетическим горизонтам из свежевырытого почвенного разреза и из той части горизонта, в которой морфологические признаки, присущие данному горизонту, выражены наиболее сильно. Иногда берут смешанные пробы из трех стенок разреза. Отбор образцов производят последовательно, начиная от нижнего горизонта (материнская порода) к верхнему, предварительно очистив и освежив места взятия образца.

Для сравнительной характеристики различных типов почв по ферментативной активности можно ограничиваться одноразовым определением, но образцы должны быть отобраны в одни и те же сроки, желательно до начала вегетации (весной) или в конце вегетации (осенью), в целях исключения влияния на ферментативную активность живых корней растений. Образцы почв, собранные для исследований эколого-географического характера, практически невозможно анализировать в свежем состоянии, поэтому их сразу же высушивают (обязательно в тени и как можно быстрее). Почву следует часто перемешивать. Условия высушивания и хранения почвенных образцов должны быть одинаковыми.

Высушенные или свежие образцы до исследования хранят на холоде, при этом их активность снижается незначительно.

Вопрос о том, в каких пробах анализировать ферментативную активность почвы, решают в зависимости от поставленной задачи. При изучении ферментативной активности в динамике в полевых или вегетационных опытах лучше использовать свежие почвенные пробы в их естественно-влажном состоянии. Естественно-влажные пробы на время анализов помещают в банки с притертыми пробками, обрабатывают толуолом для подавления жизнедеятельности микроорганизмов и выдерживают на холоде. В других случаях образцы почвы высушивают до воздушно-сухого состояния в тени, лучше на холоде, и до анализов хранят в холодном месте в закрытых сосудах.

Для анализов почву тщательно очищают от корней и других растительных остатков, камней и прочих включений. Высушенные пробы растирают и просеивают через сито с диаметром отверстий 1 – 2 мм. Во всех случаях показатели ферментативной активности переводят на вес воздушно-сухой или абсолютно-сухой почвы и обязательно указывают в каких образцах почвы (в сухих или естественно-влажных) выполнены анализы.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ

По типу катализируемых реакций все известные ферменты разделены на шесть классов.

1. Оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.

2. Гидролазы, катализирующие реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных связей в различных соединениях.

3. Трансферазы, катализирующие реакции межмолекулярного или внутримолекулярного переноса химической группы и остатков с одновременным переносом энергии, заключенной в химических связях.

4. Лигазы (синтетазы), катализирующие реакции соединения двух молекул, сопряженные с расщеплением пирофосфатных связей в АТФ или другого аналогичного трифосфата.

5. Лиазы, катализирующие реакции негидролитического отщепления или присоединения различных химических групп органических соединений по двойным связям.

6. Изомеразы, катализирующие реакции превращения органических соединений в их изомеры.

Довольно подробно изучены широко распространенные в почве оксидоредуктазы и гидролазы, имеющие очень важное значение в

почвенной биодинамике. Исследованы также некоторые представители классов трансфераз, лиаз и лигаз.

Опыт 1. Оксидоредуктазы. Каталаза

В обмене веществ и энергии в почве важное место принадлежит окислительно-восстановительным ферментам. В основе синтеза гумусовых компонентов почвы лежат окислительно-восстановительные процессы, в которых участвуют соответствующие ферменты. Различные фенольные соединения растительных остатков после их окисления при участии оксидаз переходят в биохимически активную хиноидную форму и впоследствии, в результате реакции поликонденсации, полимеризации и связывания с азот-органическими соединениями, образуют молекулы гуминовых кислот. Система оксидоредуктаз играет также большую роль в образовании солонцов в условиях засоленных почв и во многих других почвенных процессах. В связи с этим изучение оксидоредуктаз является важным для познания вопросов генезиса и плодородия почв.

Из оксидоредуктаз наиболее широко распространены в почве дегидрогеназы, фенолоксидазы, пероксидазы, каталазы, выполняющие определенную функцию в почвенной биодинамике.

Фермент каталаза катализирует реакцию разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Пероксид водорода образуется в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органических веществ. Роль каталазы в живом организме и, по-видимому, в почве заключается в том, что она разрушает ядовитую для организмов H_2O_2 . Каталаза широко представлена в клетках живых организмов, в том числе микроорганизмов и растений. Высокую каталазную активность проявляют также почвы.

Методы определения каталазной активности почвы основаны на измерении скорости распада перекиси водорода при взаимодействии ее с почвой по объему выделяющегося кислорода (газометрические методы) или по количеству неразложившейся перекиси, которое определяют перманганатометрическим титрованием или колориметрическим способом с образованием окрашенных комплексов.

Реактивы: 1. Карбонат кальция. 2. 3%-ный раствор пероксида водорода.

Ход работы. Навеску почвы в количестве 1 г вносят в колбу емкостью 100 мл, добавляют 0,5 г карбоната кальция. На дно колбы осторожно с помощью пинцета ставят маленький стаканчик с 5 мл 3%-ного раствора пероксида водорода. Колбу плотно закрывают каучуковой пробкой со стеклянной трубкой, которая соединена с измерительной

бюреткой с помощью толстостенного резинового шланга через тройник. Две бюретки с помощью резинового шланга соединяют через тройник с уравнительной грушевидной воронкой. Бюретки и грушу заполняют водой. Уровень воды в бюретках и груше уравнивают, опуская или поднимая грушу, последнюю закрепляют на определенной высоте. Затем закрывают тройник таким образом, чтобы устранить сообщение прибора с внешней средой. Необходимо уровень воды в бюретках поддерживать на определенном уровне, что свидетельствует о достижении температурного равновесия в приборе. Опыт проводят при температуре 18 – 20°C.

Начало опыта отмечают по секундомеру в тот момент, когда сосуд с перекисью опрокидывают и содержимое колбы встряхивают. Взбалтывание смеси проводят в течение всего опыта, не касаясь колбы руками. Выделяющийся кислород вытесняет из бюреток воду, уровень которой отмечают через 0, 5, 1 и 2 мин.

Контролем служит стерилизованная сухим жаром (180°C) почва. Активность каталазы выражают в миллилитрах кислорода, выделившегося за 1 минуту на 1 г почвы.

Опыт 2. Пероксидаза

Пероксидазы осуществляют окисление органических веществ почв (фенолов, аминов, некоторых гетероциклических соединений) за счет кислорода в перексиде водорода и других органических перекисей, образующихся в почве в результате жизнедеятельности микроорганизмов и действия некоторых оксидаз (например, уратоксидаза). Эти ферменты играют важную роль в процессе образования гумуса.

При определении пероксидазной активности почвы в качестве акцепторов кислорода используют полифенолы – пирогаллол, пирокатехин и др. Под действием кислорода перекиси при участии пероксидазы полифенолы окисляются и переходят в хиноны.

Методы определения пероксидазной активности почвы основаны на учете количества продуктов окисления полифенолов, используемых в качестве субстратов фермента путем фотометрических измерений интенсивности их окраски в случае образования окрашенных соединений (например, пурпургаллина) или методом титрования.

В качестве субстрата пероксидазы используют пирокатехин. Продукт окисления определяют йодометрическим титрованием.

Реактивы. 1. 0,02 М раствор пирокатехина (о-диоксибензол). 2. 0,4%-ный раствор пероксида водорода. 3. 0,1%-ный раствор аскорбиновой кислоты. 4. Ацетатный буфер (рН 4,7). 5. 0,01 н. титрованный раствор кристаллического йода. 6. 10%-ный раствор орто-фосфорной кислоты.

Ход работы. 5 г почвы заливают 26 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и после тщательного перемешивания оставляют на 2 ч, затем суспензию фильтруют через бумажный фильтр.

К 1 мл прозрачного фильтрата в пробирках добавляю 1 мл 0,4%-ного раствора пероксида водорода, 2 мл 0,1%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 0,02 М раствора пирокатехина. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 20°C 2 мин., после чего инактивируют добавлением 1 мл 10%-ной ортофосфорной кислоты. Затем весь объем смеси титруют 0,01 н. раствором йода до появления желтой окраски, устойчивой в течение 10 – 15 сек. Контрольное определение проводят с прокипяченной почвенной вытяжкой.

Активность пероксидазы выражают в миллилитрах раствора 0,01 н. йода, израсходованного на титрование фильтрата, соответствующего 1 г почвы, т. е. экспериментальные результаты умножают на 5.

Опыт 3. Полифенолоксидаза

Полифенолоксидазы участвуют в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Они катализируют окисление фенолов (моно-, ди-, три-) до хинонов в присутствии кислорода воздуха. Хиноны в соответствующих условиях при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовой кислоты.

Методы определения полифенолоксидазной активности почвы основаны на измерении скорости окисления внесенных в почву полифенолов. Наиболее активно окисляется пирогаллол.

Один из наиболее распространенных методов основан на йодометрическом титровании реакционной смеси, содержащей в качестве субстрата пирокатехин, после взаимодействия с почвенной суспензией.

Реактивы. 1. 0,1%-ная аскорбиновая кислота. 2. 0,02 М пирокатехин. 3. 10%-ная H_3PO_4 . 4. 1%-ный раствор крахмала. 5. 0,01 н. титрованный раствор кристаллического йода (готовят из фиксанала).

Ход работы. К 5 г воздушно-сухой почвы добавляют 3 мл воды, затем 2 мл 0,1%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 0,02 М раствора пирокатехина. Смесь взбалтывают и инкубируют при 30°C в водяной бане в течение 2 мин. точно по секундомеру, затем добавляют 1 мл 10%-ной фосфорной кислоты для инактивирования ферментов. После фильтрования (или центрифугирования) к 1 мл фильтрата добавляют 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют 0,01 н. раствором йода до появления синей окраски. В качестве контроля используют кипяченую почвенную вытяжку, с которой проводят те же операции.

Опыт 4. Нитратредуктаза

Процессы восстановления нитратного азота в почве до аммиака катализируют ферменты – нитратредуктаза и нитритредуктаза. Нитратредуктаза действует на восстановленный НАД в качестве донора водорода и переносит водород к кислороду нитратов. В результате действия нитратредуктазы нитраты превращаются в нитриты.

Дальнейшее восстановление нитритов до аммиака катализируют нитритредуктазы и гидроксиламинредуктазы.

Метод определения активности нитратредуктазы в почве основан на учете уменьшения количества нитратного азота при анаэробной инкубации в почве.

Реактивы. 1. 1%-ный KNO_3 . 2. 1%-ная глюкоза. 3. Насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов. 4. Дисульфобензойная кислота. 5. 10%-ный раствор NaOH . 6. CaCO_3 . 7. Стандартный раствор нитратов. Готовят растворением 16,3052 г перекристаллизованного KNO_3 в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Полученный раствор содержит 10 мг NO_3^- в 1 мл. Рабочие растворы готовят разбавлением стандартного раствора перед употреблением.

Ход работы. Навеску 1 г воздушно-сухой почвы, просеянную через сито с диаметром ячеек 1 мм, помещают в круглодонную колбу емкостью 100 мл с притертой стеклянной пробкой, добавляют 20 мг карбоната кальция, 1 мл 1%-ного нитрата калия, после тщательного смешивания прибавляют 1 мл 1%-ной глюкозы в качестве донора водорода. Воздух из колбы откачивают при разряжении 1333 Па (10 – 12 мм рт. ст.). Колбу осторожно встряхивают и помещают в термостат на 24 ч при 30°C. В качестве контроля ставят стерилизованную при 180°C в течение 3 ч почву и почву с водой без субстрата (контроль на почвенные нитраты).

После инкубации в колбу добавляют 50 мл дистиллированной воды, суспензию тщательно перемешивают и фильтруют через плотный фильтр в мерную колбу емкостью 50 мл. В случае мутной вытяжки прибавляют 1 мл насыщенного раствора алюмокалиевых квасцов. Нитраты в фильтрате определяют по Грандвальд-Ляжу, для чего 20 мл фильтрата переносят в фарфоровую чашку и досуха выпаривают на водяной бане. Затем прибавляют 1 мл дисульфобензойной кислоты и тщательно растирают закругленным кончиком стеклянной палочки. Через 10 мин в чашку добавляют 15 мл дистиллированной воды, перемешивают и полученный раствор нейтрализуют 10%-ным NaOH до щелочной реакции. Окрашенный раствор переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем до метки водой и колориметрируют на ФЭК, применяя синий светофильтр с 400 – 500 нм.

Количество нитратного азота в растворе находят по стандартной кривой, составленной на перекристаллизованный азотнокислый калий.

Активность нитратредуктазы выражают в миллиграммах восстановленного NO_3^- на 10 г почвы за сутки. Разница между количеством NO_3^- , внесенного в почву в составе субстрата (в 1 мл 1%-ного KNO_3 содержится 6,13 мг NO_3^-) и определенного в реакционной смеси, равняется количеству восстановленного нитратного азота.

Опыт 5. Нитритредуктаза

Нитритредуктазы осуществляют превращение нитритов через гидроксиламины в гидрат окиси аммония. Нитриты образуются в начальной стадии восстановления нитратов в почве.

Метод определения активности нитритредуктазы в почве основан на учете остаточного количества невосстановленных нитритов.

Реактивы. 1. 0,5%-ный NaNO_2 . 2. 1%-ная глюкоза. 3. Насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов. 4. 0,5%-ный раствор сульфаниловой кислоты в CH_3COOH ($d = 1,04 \text{ г/см}^3$). 5. 0,1%-ный раствор α -нафтиламина в уксусной кислоте ($d = 1,04 \text{ г/см}^3$). Для приготовления реактива Грисса смешивают равные объемы растворов 4 и 5. 6. Стандартный раствор нитрита – 1,5 г NaNO_2 1 л раствора (в 1 мл 1 мг NO_2^-). Путем серии разбавлений готовят рабочие растворы. 7. CaCO_3 .

Ход работы. Навеску (1 г) воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек 1 мм, помещают в колбу емкостью 100 мл с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 20 мг карбоната кальция и тщательно перемешивают. Затем вносят 1 мл 0,5%-ного раствора NaNO_2 и 1 мл 1%-ного раствора глюкозы в качестве донора водорода. Воздух из колбы откачивают при разрежении 1333 Па (10 – 12 мм рт. ст.). Колбу осторожно встряхивают и помещают в термостат на 24 ч при 30°C. В качестве контроля ставят стерилизованную почву (при 180°C в течение 3 ч) и почву с реактивами и водой вместо субстрата. После инкубации в опытную и контрольную колбу добавляют по 50 мл дистиллированной воды и по 1 мл насыщенного раствора алюмокалиевых квасцов. Суспензию тщательно взбалтывают и фильтруют через плотный фильтр. Для определения нитрита 1 мл фильтрата переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, добавляют 5 мл дистиллированной воды и 4 мл смеси из равных объемов сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина (реактив Грисса). Затем объем раствора водой доводят до метки. Колбы хорошо взбалтывают и полученный окрашенный красно-розовый раствор через 15 мин фотокolorиметрируют на ФЭКе, используя кюветы на 5 мм и светофильтр с длиной волны 500 – 600 нм. Количественный учет нитритов производят с помощью калибровочной кривой, составленной на нитрит натрия.

Активность нитритредуктазы выражают в миллиграммах восстановленного NO_2^- на 1 г почвы за сутки, который находят по разнице

между количеством внесенного в инкубационную смесь (3,33 мг) и обнаруженного в фильтрате нитрита.

Опыт 6. Целлюлаза

Целлюлаза катализирует гидролиз β -1,4-глюконовых связей в целлюлозе. Молекула целлюлозы состоит из остатков целлобиозы, связанных между собой гликозидными связями в виде длинной цепочки. При ферментативном гидролизе целлюлоза сначала распадается на молекулы целлобиозы, которая под действием β -гликозидазы (целлобиазы) распадается на две молекулы глюкозы.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). 2. Толуол. 3. Ацетатный буфер (рН 5,5). 4) Алюмокалиевые квасцы. 5) Антроновый реактив. Готовят непосредственно перед определением путем растворения 0,25 г антрона в 25 мл дистиллированной воды, с последующим прибавлением к раствору 100 мл концентрированной серной кислоты.

Ход работы. 10 г тщательно перемешанной сырой почвы помещают в колбу емкостью 50 мл, обрабатывают 1,5 мл толуола, добавляют 5 мл ацетатного буфера (рН 5,5) и 5мл 1%-ного раствора КМЦ. Реакционную смесь перемешивают, колбу закрывают пробкой, инкубируют в термостате в течение 48 – 72 ч при 35°C.

Для каждого варианта опыта ставят контроль – те же компоненты, за исключением субстрата, заменяемого 5 мл воды. Ставят также контроль на чистоту реактивов (без почвы).

После инкубации реакцию прерывают путем подогрева колбы до 100°C. Для лучшей коагуляции и осаждения КМЦ добавляют по 0,3 г алюмокалиевых квасцов. Затем содержимое колбы фильтруют на водяной бане через бумажные фильтры в мерные колбы емкостью 50 мл, и объем фильтрата доводят до метки дистиллированной водой. 2 мл фильтрата переносят в термостойкие пробирки емкостью 40 – 50 мл одинакового диаметра (15 мм) и добавляют 4 мл антронового реактива. Через 20 – 30 мин раствор колориметрируют против первого контроля на ФЭКе в кюветах 10 мм при синем светофильтре (550 нм). Количество глюкозы в опыте находят по составленной на глюкозу калибровочной кривой, предварительно вычитая контроль на чистоту субстрата.

Целлюлазную активность выражают в миллиграммах глюкозы или расщепленной КМЦ на 10 г почвы. В последнем случае оставшийся на фильтре осадок нерасщепленной КМЦ растворяют в 50%-ном растворе этанола и объем доводят этим же раствором спирта до 50 мл. 2 мл раствора переносят в измерительную пробирку и добавляют 4 мл антронового реактива и после развития окраски колориметрируют.

Опыт 7. Пептид- и амидогидролазы. Протеазы

В составе растительных остатков и микробных тел в почву поступает значительное количество белковых веществ, аминокислот и других азотсодержащих органических соединений. В дальнейшем превращении этих соединений большую роль играют присутствующие в почве протеолитические и дезаминирующие ферменты. В результате процессов последовательного протеолитического расщепления до аминокислот и распада под действием амидогидролаз и дезаминаз с выделением аммиака азот белковых веществ превращается в доступную для высших растений форму. Это явление в целом известно как процесс аммонификации. Протеазы, амидогидролазы и дезаминазы, обуславливая динамику азота, играют важную роль в жизни почвы.

Протеолитические ферменты катализируют гидролитическое расщепление белковых веществ до пептидов и гидролиз этих продуктов до аминокислот. Расщепление белков и пептидов происходит по месту пептидных связей.

Протеазы делят на две группы: протеиназы и пептидазы. Первые из них расщепляют настоящие белки, а вторые – катализируют распад полипептидов и дипептидов до аминокислот. Однако такое деление довольно условное.

При определении активности протеаз в почве в качестве субстрата обычно применяют казеин, желатину и некоторые пептиды. Активность протеаз учитывают по количеству аминокислот или других кислоторастворимых продуктов, освобождающихся при распаде белковых субстратов в почве, или по изменению физических свойств субстрата, например по уменьшению вязкости.

Колориметрические методы основаны на учете количества аминокислот, образующихся при протеолизе внесенных в почву белков, путем связывания их в окрашенные комплексы.

Реактивы. 1. 2%-ная желатина (растворяют в воде при слабом нагревании). 2. Толуол. 3) CaCO_3 . 4. Голубой раствор: 10 г моноводного нитрата меди растворяют в 700 мл воды в мерной колбе емкостью 1000 мл, добавляют 250 г трехводного ацетата натрия, энергично перемешивают и доливают до метки. Через 3 дня фильтруют. Раствор устойчив. 5. Стандартный раствор глицина: 267,9 г глицина растворяют в дистиллированной воде и доливают до 1 л (1 мл содержит 50 мг аминного азота). Для составления кривой от 0 до 20 мл этого раствора доводят до 20 мл дистиллированной водой, приливают 2 мл медного раствора и колориметрируют.

Ход работы. В мерной колбе емкостью 100 мл навеску 10 г почвы смешивают с 500 мг карбоната кальция, обрабатывают 1,5 мл толуола и

через 15 мин. прибавляют 20 мл 2%-ного раствора желатины. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при 37°C. Через 20 ч колбу заполняют водой, нагретой до 38°C. Содержимое колбы фильтруют через плотный фильтр.

Контрольное определение проводят, используя вместо желатины 20 мл воды.

Для определения количества аминокислот в колбу емкостью 50 мл отбирают 10 мл фильтрата, приливают 10 мл воды и 2 мл медного раствора. Интенсивность нежно-голубой окраски измеряют на колориметре против воды при 650 нм в кювете на 4 см.

Количество отщепленных аминокислот находят по стандартной шкале, составленной на глицин.

Активность протеазы выражают в миллиграммах аминного азота на 100 г почвы за 20 ч.

Опыт 8. Уреаза

Уреаза катализирует гидролиз мочевины. Конечными продуктами гидролиза являются аммиак и углекислый газ.

Мочевина в почву попадает в составе растительных остатков, навоза и как азотное удобрение, она образуется также в самой почве в качестве промежуточного продукта в процессе превращения азотистых органических соединений – белков и нуклеиновых кислот. Продукт гидролиза мочевины – аммиак служит непосредственным источником азотного питания для высших растений.

Методы определения активности уреазы в почве основаны на учете количества аммиака или углекислого газа, образующихся при гидролизе мочевины, или количества негидролизованной части субстрата.

Реактивы. 1. 2%-ный раствор мочевины. 2. Фосфатный буфер (рН 6,7). 3. HgJ_2 в порошке. 4. Реактив Несслера. 5. Раствор сегнетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). 50 г соли растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Ход работы. Навеску 5 г почвы помещают в колбу емкостью 100 мл, подливают по 20 мл фосфатного буфера (рН 6,7) и 2%-ного раствора мочевины. Для приостановки ферментативных процессов в контрольную пробу добавляют йодид ртути. Колбу тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37°C. Через 3 ч в опытную колбу тоже добавляют йодид ртути в таком же количестве. Затем раствор фильтруют через бумажный фильтр и определяют содержание аммиака с реактивом Несслера фотоэлектроколориметрически, как описано в стандартных руководствах по определению азота. По калибровочному графику находят концентрацию аммиака в анализируемых растворах, и после вычета значений, количества

аммиака в контрольных пробах содержание аммиачного азота рассчитывают в миллиграммах на 100 г почвы.

Активность уреазы выражают в миллиграммах NH_4^+ на 100 г почвы за 3 ч.

Опыт 9. Липаза

Липолитический гидролиз жиров происходит по сложноэфирным связям с образованием глицерина и жирных кислот.

Существующие методы определения липазной активности почвы основаны на измерении количества образующихся жирных кислот путем щелочного титрования или на изучении интенсивности флуоресценции при использовании субстратов, содержащих флуорогенный компонент.

Реактивы. 1. Раствор трибутирина или подсолнечное масло. 2. Ацетатный буфер (рН 7,0). 3. Этанол 96%-ный. 4. 0,1 н. спиртовой раствор КОН. 5. Фенолфталеин – 0,1%-ный спиртовой раствор.

Ход работы. 5 г почвы помещают в колбу, обрабатывают 2 мл толуола и оставляют на 15 мин. Затем добавляют 5 мл дистиллированной воды, 5 мл ацетатного буфера (рН 7,0) и 2,5 мл подсолнечного масла или трибутирина. Смесь помещают в термостат для инкубации на 72 ч при 30°C. После инкубации к суспензии добавляют 10 мл 96%-ного этанола, фильтруют и 10 мл фильтрата титруют 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида калия в присутствии индикатора – фенолфталеина (5 капель). Параллельно с этим проводят контрольные опыты с почвой без субстрата и с субстратом без почвы. Контроли титруют до инкубации.

Активность липазы выражают в миллилитрах 0,1 н. КОН на 1 г почвы.

Контрольные вопросы

1. Что такое почва?
2. Какова основная функция почвы в биосфере?
3. Какие еще функции почвы в биосфере вы знаете?
4. Из каких компонентов состоит почва?
5. Как образуется почва?
6. Какие фазы включает в себя почва?
7. Что такое биокосные тела?
8. Что из себя представляют коллоиды почв и как они образуются?
9. Какова структура почвенного органно-минерального геля?
10. Что такое ферменты?
12. Откуда берутся ферменты в почве и где размещаются?
13. Какие группы ферментов накапливаются в почвах?
14. К какой группе ферментов относится каталаза?

15. Какую реакцию в почве катализирует каталаза?
16. Какую реакцию в почве катализирует уреазы?
17. Откуда поступает в почву пероксид водорода?
18. Чем отличается активность ферментов от их концентрации?
19. Зачем проводят сравнительные опыты с прокаленной почвой?
20. Чем отличаются друг от друга активность ферментов в почвах, ферментативная активность почв и активность почвенных ферментов?

Анализ воздуха

Работа 2. Анализ воздуха. Определение содержания пыли в воздухе

Атмосферный воздух содержит более двух третей азота и более 20% кислорода. Остальные газы можно рассматривать как примеси, количество которых меняется в зависимости от климатических факторов, а также от местности, на которой находятся различные источники загрязнения атмосферы. Типичный состав атмосферного воздуха (об. %): N_2 – 78,1; O_2 – 20,94; Ar – 0,93; CO_2 – 0,033; Ne – $1,8 \cdot 10^{-3}$; He – $5,2 \cdot 10^{-4}$; Kr – $1 \cdot 10^{-4}$; Xe – $8 \cdot 10^{-6}$; NO – $2,5 \cdot 10^{-4}$; H_2 – $5 \cdot 10^{-5}$; CH_4 – $1,5 \cdot 10^{-4}$; NO_2 – $1 \cdot 10^{-7}$; O_3 – $2 \cdot 10^{-6}$; SO_2 – $2 \cdot 10^{-8}$; CO – $1 \cdot 10^{-5}$; NH_3 – $1 \cdot 10^{-6}$. Попадание в атмосферу избыточных количеств аммиака, диоксида серы, углекислого газа, других неорганических и органических веществ приводит к нарушению экологического баланса и образованию "удушающего смога". То есть превышение нормального содержания, а также попадание в воздух вредных ядовитых веществ представляет серьезную опасность.

Постоянный контроль за состоянием атмосферы в городах, в промышленных зонах и специальных местах осуществляют путем анализа газовой смеси. Для этого через специальный поглотитель прокачивают от 100 мл до 2 м³ воздуха для того, чтобы анализируемая примесь перешла в поглотитель, например, раствор кислоты для примеси, обладающей щелочными свойствами. Далее выполняется любой доступный химический или физико-химический анализ.

Особенностями анализа воздуха является то, что определяют весьма малые количества примесных веществ (0,00001 – 1 мг/л), а также переменный состав воздушной среды, меняющийся даже в момент отбора пробы.

Кроме газовых примесей в атмосфере постоянно присутствуют твердые частицы почвенной пыли и микроорганизмы. Значительная запыленность препятствует нормальному дыханию и загрязняет вентиляционные и другие технические устройства, нарушая их нормальную работу.

Для изучения содержания пыли применяют разные методы, простейшим из которых является просасывание запыленного воздуха через предварительно взвешенный фильтр. Количество пыли выражают в $\text{мг}/\text{м}^3$ воздуха.

Минимальный уровень определения пыли обусловлен минимальной навеской, которую можно взять на аналитических весах (0,0001 г), максимальный – зависит от забивания фильтра.

Приборы и реактивы. Насос. Аналитические весы.

Ход определения. Через взвешенный на аналитических весах бумажный фильтр АФА или ткань ФПП, закрепленные в устройство для просасывания воздуха, прокачивают 2 л воздуха. Для этого фильтр вкладывают в специальный патрон, имеющий вид воронки с опорным кольцом у раструба воронки, на которое накладывается фильтр и укрепляется навинчивающейся кольцеобразной крышкой. Патрон с фильтром соединяют шлангом с отсасывающим прибором (электроаспиратор, насос, пылесос и др.). Установленный фильтр задерживает пыль. В зависимости от запыленности количество просасываемого воздуха может отличаться в большую или меньшую стороны. По окончании фильтр извлекают и взвешивают. Разница в массах запыленного и исходного фильтров равна количеству пыли, поглощенной из прокачиваемого объема воздуха. Запыленность выражается в $\text{мг}/\text{м}^3$ воздуха.

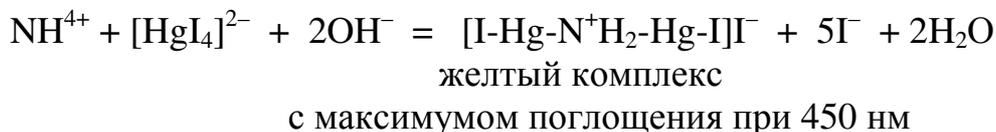
Контрольные вопросы

1. Какие методы используют на практике для анализа количества пыли в воздухе?
2. Как отбирают пробу для анализа пыли весовым методом и как установить концентрацию пыли?
3. В каких единицах выражают запыленность воздуха?
4. Какие условия для определения запыленности могут влиять на результат определения?
5. Как сказывается запыленность воздуха на организме человека и животных?

Работа 3. Фотометрическое определение аммиака в воздухе

Аммиак содержится в атмосферном воздухе. Применение аммиака в технике (в качестве хладоагента холодильных установок, как химическое сырье, например, при производстве удобрений), а также возможность образования значительных количеств при гниении органических остатков, например, рыбных отходов, требует осуществления контроля за содержанием NH_3 в воздухе промзон.

Анализ основан на фотометрическом определении образующегося желто-бурого комплекса аммиака с реактивом Несслера по реакции



Определению мешают аммонийные соли, сероводород H_2S , альдегиды, некоторые амины алифатического ряда.

Предел обнаружения в анализируемом объеме раствора 1 мкг.

Предел обнаружения в воздухе 5 мг/м³ (расчетная величина).

Предельно допустимая концентрация аммиака в воздухе (ПДК) равна 20 мг/м³.

Оборудование. Аспирационное устройство. Прибор для поглощения газов (рис. 5.1). Колбы мерные, вместимостью 100 и 250 мл. Штатив с пробирками. Пипетки или пробирки мерные, вместимостью 1, 2, 5, 10 мл с делениями 0,01 и 0,1 мл. Фотоколориметр или спектрофотометр с кварцевыми кюветами, имеющими толщину измеряемого слоя раствора 1 см

Реактивы. 1. Аммония хлорид х.ч. 2. Реактив Несслера ч.д.а. 3. Серная кислота х.ч., 0,01 н. раствор. 4. Концентрат стандартного раствора N 1, содержащий 100 мкг/мл аммиака. Готовят растворением 0,0314 г NH_4Cl в 100 мл дистиллированной воды, не содержащей аммиака. Срок хранения раствора 2 мес. 5. Стандартный раствор N 2, содержащий 10 мкг/мл аммиака. Готовят соответствующим разбавлением концентрата стандартного раствора 0,01 н. раствором серной кислоты в день анализа.

Отбор пробы воздуха. Воздух со скоростью 0,5 л/мин аспирируют (прокачивают) через два последовательно соединенных поглотительных прибора, заполненных по 10 мл 0,01 н раствора серной кислоты в каждом. Для определения воздуха в концентрации на уровне ½ ПДК достаточно прокачать 2 л воздуха. По согласованию с преподавателем отбор пробы выполняет лаборант.

Анализ. Пробы в количестве 1 и 5 мл из первого поглотительного прибора и 5 мл из второго заливают в три отдельные пробирки. Параллельно в четвертую пробирку заливают 5 мл 0,01 н. раствора серной кислоты (холостой опыт). В первую пробирку с 1 мл раствора добавляют 4 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Во все четыре пробирки, содержащие по 5 мл раствора, добавляют по 0,5 мл (13 капель) реактива Несслера и взбалтывают. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 450 нм (светофильтр 480) против холостой пробы. Для

этого кювету с холостой пробой помещают в луч прибора и выставляют отклонившуюся стрелку на нуль. Затем помещают в луч такую же кювету с анализируемой пробой и отмечают оптическую плотность.

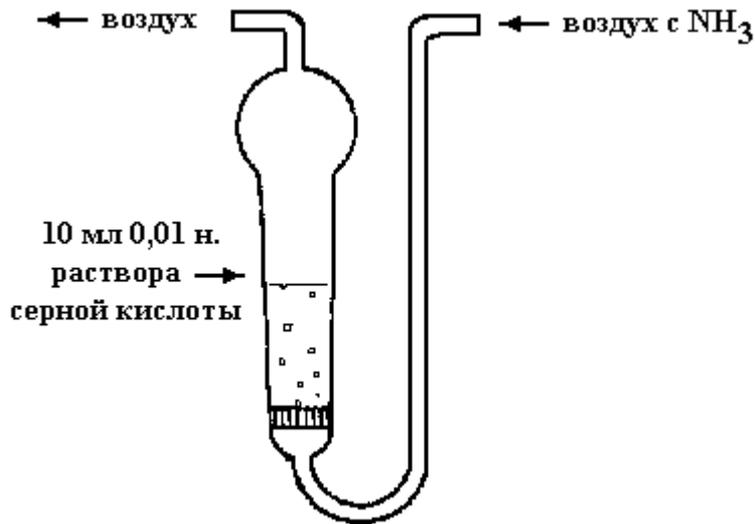


Рис. 5.1. Стекланный поглотительный прибор с пористой пластинкой

Содержание аммиака определяют по калибровочному графику. Построение калибровочного графика (по согласованию с преподавателем выполняет лаборант). Готовят шкалу стандартов в соответствии с табл. 5. 1.

Т а б л и ц а 5.1

Шкала стандартов

Номер стандарта	Стандартный раствор N 2, мл	Серная кислота 0,01 н. раствор, мл	Содержание аммиака, мкг
1	0	5,0	0
2	0,1	4,9	1,0
3	0,2	4,8	2,0
4	0,4	4,6	4,0
5	0,6	4,4	6,0
6	0,8	4,2	8,0
7	1,0	4,0	10,0

Все пробирки шкалы N 1 – 7 обрабатывают аналогично пробам и измеряют оптическую плотность. Строят график в координатах: оптическая плотность D , концентрация C (рис. 5.2).

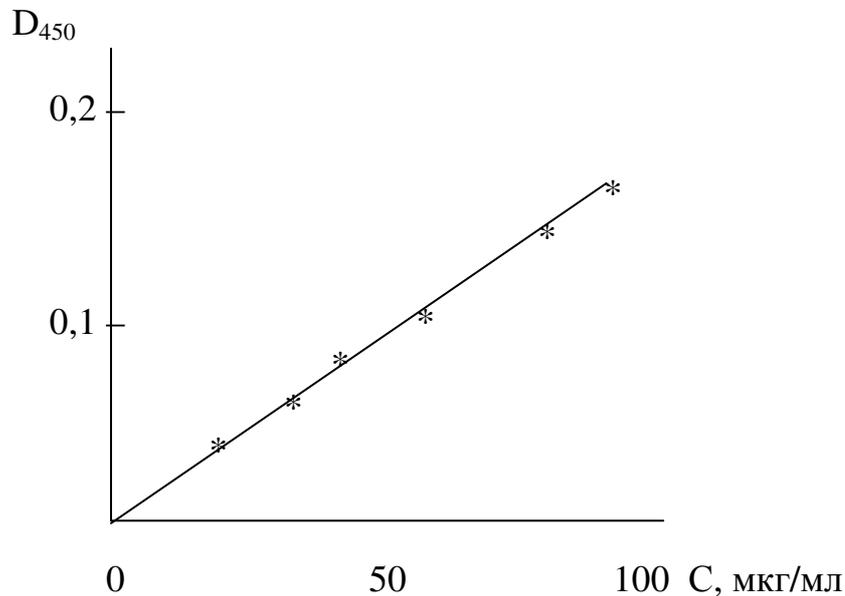


Рис. 5.2. Градуировочный график определения аммиака

Расчет. Концентрацию аммиака X в мг/м^3 воздуха вычисляют по формуле: $X = G \cdot V_1 / V \cdot V_{20}$, где: G - количество аммиака, найденное в анализируемом объеме раствора, мкг; V_1 – объем пробы, взятой для анализа, мл; V – общий объем пробы, мл; V_{20} – объем воздуха, отобранный для анализа, приведенный к стандартным условиям, л.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные источники образования аммиака.
2. Как получают аммиак в промышленности?
3. Как влияет аммиак на содержание оксидов и азота в воздухе?
4. Каково физиологическое воздействие NH_3 на человека и животных?
5. Как устранить вредное воздействие аммиака?
6. Напишите схему химической реакции аммиака с реактивом Несслера.
7. Как приводить объем воздуха, отобранный для анализа, к стандартным (нормальным) условиям?

Работа 4. Фотометрическое определение содержания формальдегида в воздухе

Альдегиды являются достаточно распространенными органическими веществами, которые используются как химические реагенты, а также образуются в виде полупродуктов в окислительно-восстановительных процессах превращения: кислота \leftrightarrow альдегид \leftrightarrow спирт.

Простейший альдегид, формальдегид $\text{CH}_2=\text{O}$, применяют в производстве фенолформальдегидных пластиков, а также в качестве консерванта, прекращающего рост микроорганизмов. Добавление формальдегида в виде раствора формалина в среды, содержащие микроорганизмы, а также испарение формальдегида в помещении в достаточной концентрации приводит к гибели микроорганизмов и вирусов. Этот процесс применяется при очистке помещений в микробиологической и фармацевтической промышленности.

Определение формальдегида основано на реакции взаимодействия формальдегида с солянокислым фенилгидразином в присутствии окислителя в щелочной среде с образованием окрашенного в красноватый цвет соединения, определяемого спектрофотометрически.

Определению мешают метанол, фурфурол, аммиак, 1000-кратное количество фенола, окислы азота, фосфористый водород и цианистый водород в концентрациях превышающих ПДК.

Предел обнаружения в анализируемом объеме раствора 0,5 мкг.

Предел обнаружения в воздухе 0,16 мг/м³ (расчетная величина).

Предельно допустимая концентрация формальдегида в воздухе (ПДК) равна 0,5 мг/м³.

Оборудование. Аспирационное устройство. Прибор для поглощения газов. Колбы мерные, вместимостью 25, 50 и 250 мл. Штатив с пробирками. Пипетки или пробирки мерные, вместимостью 1, 2, 5, 10 мл с делениями 0,01 и 0,1 мл. Фотоколориметр или спектрофотометр с кварцевыми кюветами, имеющими толщину измеряемого слоя раствора 1 см.

Реактивы. 1. Изопропиловый спирт, 50%-ный водный раствор. 2. Фенилгидразина гидрохлорид, 5%-ный свежеприготовленный раствор. Готовят растворением навески соли в горячей воде с последующим фильтрованием. 3. Калий железосинеродистый, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 5%-ный раствор. 4. Гидроксид натрия NaOH , 10%-ный раствор. 5. Формалин, 1%-ный раствор. Стандартный раствор N 1, содержащий 2 мкг/мл формальдегида, готовят из 1%-ного, в котором титрованием определяют содержание формальдегида. Для этого в колбу вместимостью 200 мл вносят точно 1 мл 1%-ного раствора альдегида, добавляют 10 мл воды, 10 мл 0,1 н. раствора йода и 2 капли 10%-ного раствора NaOH , закрывают колбу пробкой, выдерживают 10 мин, подкисляют 5 мл

10%-ного раствора HCl , выдерживают в темноте в течение 10 мин и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия с крахмалом. Параллельно обрабатывают холостую пробу, взяв вместо 1 мл 1%-ного раствора альдегида 1 мл дистиллированной воды. При расчете считают, что 1 мл 0,1 н. раствора J_2 соответствует 1,5 мг формальдегида. Окончательно готовят стандартный раствор N 1 соответствующим разбавлением водой 1%-ного раствора формальдегида. 6. Стандартный раствор N 2, содержащий 10 мкг/мл формальдегида готовят, разбавлением стандартного раствора N 1 дистиллированной водой в день анализа.

Отбор пробы воздуха. Воздух со скоростью 0,5 л/мин аспирируют (прокачивают) через поглотительный прибор с 6 мл 50%-ного изопропилового спирта (рис. 5.1). Для определения воздуха в концентрации на уровне $\frac{1}{2}$ ПДК достаточно прокачать 3 л воздуха. По согласованию с преподавателем отбор пробы выполняет лаборант.

Ход определения. 3 пробы в количестве по 5 мл заливают в три пробирки. Параллельно в отдельную пробирку заливают 5 мл поглотительного раствора 50%-ного изопропилового спирта без альдегида (холостой опыт).

Во все четыре пробирки, содержащие по 5 мл раствора, добавляют по 0,2 мл (6 капель) 5%-ного раствора солянокислого фенилгидразина, перемешивают и оставляют на 15 мин.

Затем вносят 0,1 мл 5%-ного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, взбалтывают, выдерживают 10 мин, добавляют 1 мл 10%-ного раствора NaOH , взбалтывают и выдерживают 0,5 ч.

Т а б л и ц а 5.2

Шкала стандартов

Номер стандарта	Стандартный раствор N 2, мл	Изопропиловый спирт 50%-ный, мл	Содержание формальдегида, мкг
0	0	5,0	0
1	0,05	4,95	0,5
2	0,1	4,9	1,0
3	0,2	4,8	2,0
4	0,4	4,6	4,0
5	0,6	4,4	6,0
6	0,8	4,2	8,0
7	1,0	4,0	10,0

Через указанные 30 мин измеряют оптическую плотность раствора в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 520 нм (вставить в колориметр светофильтр N 590) против холостой пробы. Для этого кювету с холостой пробой помещают в луч прибора и выставляют

отклонившуюся стрелку на нуль. Затем помещают в луч такую же кювету с анализируемой пробой и отмечают оптическую плотность.

Содержание формальдегида определяют по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика (по согласованию с преподавателем выполняет лаборант). Для построения графика готовят шкалу стандартов (растворы устойчивы в течение 2 ч) в соответствии с табл. 5.2.

Все пробирки шкалы N 1–7 обрабатывают аналогично пробам и измеряют оптическую плотность. Строят график в координатах: оптическая плотность D , концентрация C (рис. 5.3).

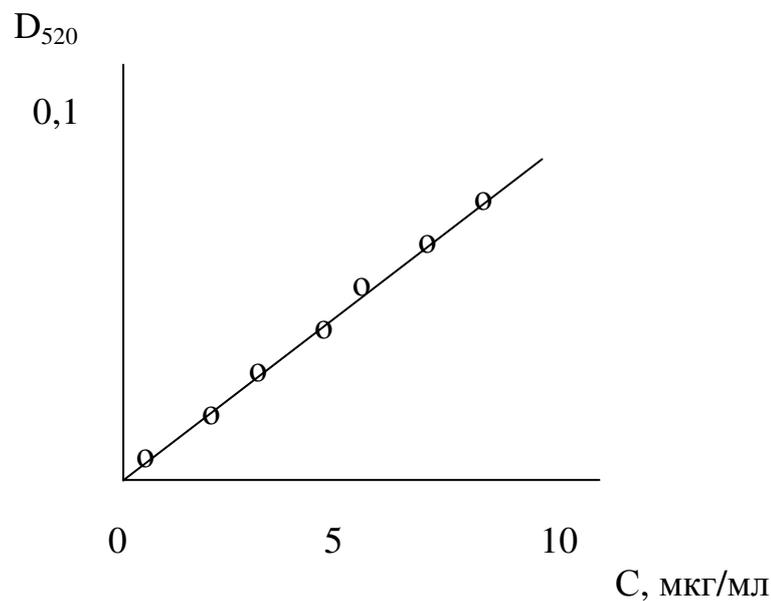


Рис. 5.3. Градуировочный график определения содержания формальдегида

Расчет. Концентрацию формальдегида X в мг/м³ воздуха вычисляют по формуле: $X = G \cdot V_1 / V \cdot V_{20}$, где G – количество формальдегида, найденное в анализируемом объеме раствора, мкг; V_1 – объем пробы, взятой для анализа, мл; V – общий объем пробы, мл; V_{20} – объем воздуха, отобранный для анализа, приведенный к стандартным условиям, л.

Контрольные вопросы

1. Почему при сбраживании фруктов наряду со спиртом образуются альдегиды и кислоты, в частности уксусная? Можно ли

описанный метод применить для анализа содержания альдегидов в продуктах брожения?

2. Как получают альдегиды в промышленности?

3. Как защитить организм человека от воздействия формальдегида в бытовых условиях, на производстве?

4. Каково физиологическое воздействие $\text{CH}_2=\text{O}$ на человека и животных?

Анализ качества воды

Вода является основой жизни и важнейшим сырьем в промышленности. В зависимости от назначения к ней предъявляются определенные требования, установленные соответствующими стандартами, например, ГОСТ 2874-82. "Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством", СанПин 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Контроль качества».

Качество воды, применяемой в фармацевтике, регламентировано требованиями Государственной Фармакопеи X, ст. 73,74.

В случае, если вода, поступающая из водоисточника, не соответствует нормативным требованиям, проводят водоподготовку (фильтрацию, ионообмен, дистилляция и др.).

Вода для питья должна быть безопасна по бактериальному составу (число бактерий после 24 ч культивирования при 37°C должно быть не более 100 в 1 мл, в том числе кишечной палочки не более 3). Установлено предельное содержание ядовитых веществ: свинца до 0,03 мг/л, мышьяка до 0,05 мг/л, селена до 0,001 мг/л, стронция до 7 мг/л, меди до 1 мг/л, цинка до 5 мг/л, марганца до 0,1 мг/л, фтора 1,2 мг/л, железа 0,3 мг/л.

Вода не должна содержать других ядовитых веществ, ртути, шестивалентного хрома, бария. Жесткость воды не должна превышать 7 мэкв/л. Остаточное содержание хлора, вводимого для уничтожения микроорганизмов, не должно быть выше 0,5 мг/л. Цветность по стандартной шкале до 20 градусов, запах и привкус не более 2 баллов, сухой остаток после выпаривания – не более 1 г/л, рН воды 6,0 – 9,0.

Дистиллированная вода по ГФ X должна быть бесцветной, прозрачной, без запаха и вкуса, с рН 5,0 – 6,8, сухой остаток до 0,001%. Вода не должна давать реакций на хлориды, сульфаты, кальций и тяжелые металлы. Дистиллированная вода не должна содержать восстановителей, нитратов, карбонатов, а также аммиака более 0,00002%.

На производстве, использующим вредные вещества (фенол, формальдегид, др.) применяются специальные методы определения и контроля за содержанием таких веществ в сточных водах.

Работа 5. Определение содержания воды в образце.
Эталонный метод ИСО

Определение влагосодержания осуществляют по уменьшению массы навески в результате нагревания образца при температуре, обеспечивающей полное испарение воды.

Оборудование, реактивы и материалы. Весы лабораторные общего назначения с погрешностью взвешивания $\pm 0,0002$ г. Термостат с регулируемой температурой нагрева 20 – 150°C. Щипцы тигельные. Инертная чаша. Стеклянная палочка. Измельчитель образца. Эксикатор с осушителем силикагелем или прокаленным хлоридом кальция.

Кварцевый песок с частицами диаметром 0,25 – 1,4 мм, промытый водой, прокипяченный с 17%-ной HCl до исчезновения желтой окраски. Кислота соляная х.ч., 17%-ный раствор.

Проведение работы. Анализируемый образец измельчают в условиях, исключающих потерю влаги (при температуре 25°C), например, мясные продукты дважды пропускают через мясорубку.

К навеске испытуемого образца в количестве 5 г добавляют для улучшения влагоиспарения 15 г подготовленного песка.

Перед использованием, фракцию песка с частицами диаметром 0,25–1,4 мм промывают водой, кипятят с 17%-ной HCl до исчезновения желтой окраски, отмывают дистиллированной водой от хлорид-ионов, высушивают при 150°C и хранят в эксикаторе над слоем осушителя (активного силикагеля).

Для получения точных результатов до начала измерения, взятый песок прогревают при температуре 103°C в течение 0,5 ч в инертной чашке со стеклянной палочкой, измеряют массу чашки, палочки и песка, охлажденных до комнатной температуры в эксикаторе, добавляют анализируемый образец, определяют с точностью до 0,001 г его массу, перемешивают образец, подвергают высушиванию до постоянной массы в течение 2 ч при температуре $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают в осушающем эксикаторе до комнатной температуры и определяют массу сухого образца.

Содержание влаги (w, % масс.) рассчитывают по формуле

$$w = (g_1 - g_2) / (g_1 - g_0) \cdot 100,$$

где g_0 – масса чашки с палочкой и песком, г;
 g_1 – масса чашки с навеской влажной пробы, с палочкой и песком, г;
 g_2 – масса чашки с навеской высушенной пробы, с палочкой и песком, г.

Результат содержания влаги представляют округленным до первого десятичного знака. Сходимость определения одной и той же пробы при повторении составляет не более $\pm 0,6$ %. Воспроизводимость отклонений результатов анализа в различных лабораторных условиях составляет величину не более 0,8 %.

Работа 6. Определение рН сточных вод. Эталонный метод

Водородный показатель (рН) указывает на кислотность системы и представляет величину отрицательного логарифма концентрации ионов H^+ в водной среде ($-\lg[H^+]$). Шкала рН, определяемая ионным произведением воды, обычно обозначается для реальных растворов от 0 до 14. рН < 7 среда кислая, рН > 7 среда щелочная, для нейтральной среды рН = 7, область рН 6,5 – 7,5 считается близкой к нейтральной (см. глава 2, работа 15).

Оборудование. Лабораторный рН-метр с ценой деления шкалы 0,1 единицы рН или цифровой рН-метр с точностью определения 0,01 единицы рН. Стекланный электрод, сохраняют погруженным в дистиллированную воду. Электрод сравнения, например каломельный или хлорсеребряный, заполненный насыщенным раствором КСl; электрод сохраняют в насыщенном растворе КСl. Допускается использование совмещенного в одном комбинированного электрода, типа “Orion, Ingold или Radiometer”. Измельчитель образца. Химические стаканы вместимостью 100 мл. Фильтровальная бумага. Мерные колбы вместимостью 1000 мл. Сушильный шкаф с регулируемой температурой 20–150°C. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г.

Реактивы. Соляная кислота х.ч., 0,1 М раствор НСl, имеющий рН 1,1 при 20°C; готовят из фиксанала. 1. Буферный раствор рН 4,00 при 20°C, готовят растворением навески 10,211 г предварительно высушенного до постоянной массы при 125°C гидрофталата калия $KHC_6H_4(COO)_2$ в мерной колбе вместимостью 1000 мл в 900 мл воды при 20°C и доводят объем раствора водой до метки. рН раствора составляет 4,00 при 10°C и 4,01 при 30°C. Срок хранения буферного раствора при 4°C – 1 месяц. 2. Буферный раствор рН 5,45 при 20°C, готовят смешиванием 500 мл 0,2 н. раствора лимонной кислоты $HOOCCH_2C(COOH)(OH)CH_2COOH$, ММ 192,13 с 375 мл 0,2 М раствора гидроксида натрия, водные растворы смешивают и получают буферный раствор с рН 5,42 при 10°C и 5,48 при 30°C. Срок хранения буферного раствора при 4°C – 1 месяц. 3. Буферный раствор рН 6,88 при 20°C, готовят растворением навески 4,402 г предварительно высушенного до постоянной массы при 103°C в течение не менее 3 ч дигидрофосфата калия KH_2PO_4 и навески 3,549 г гидрофосфата натрия Na_2HPO_4 , предварительно высушенного до постоянной массы при 103°C (при использовании кристаллогидрата $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ делают перерасчет), в мерной колбе вместимостью 1000 мл в количестве 900 мл воды при 20°C и доводят объем раствора водой до метки. рН раствора составляет 6,92 при 10°C и 6,85 при 30°C. Срок хранения буферного раствора при 4°C – 7 сут. 4. Боратный буферный раствор рН 9,18 при 20°C, готовят из фиксанала. Срок хранения буферного раствора при 4°C – 1 месяц. 5. Вода дистиллированная. 6. Этиловый спирт 95%-ный, ректификат. 7. Диэтиловый эфир ч.д.а., насыщенный водой.

Подготовка к определению. рН-метр подготавливают к работе в соответствии с техническим описанием. Калибровку рН-метра проводят, используя буферный раствор с близким по значению рН к определяемой величине при температуре анализируемого образца (раствора). При использовании достаточно широкого интервала изменений рН проводят калибровку рН-метра в нижней части шкалы при рН 1,1 – 4,0; в верхней части шкалы при рН 6,88 и в средней части шкалы. При необходимости измерений рН в сильно щелочной области проводят калибровку с использованием соответствующих буферных растворов, например боратного буфера с рН 9,18. Если рН-метр не снабжен регулятором температуры, то температура буферного раствора должна быть равна 20°C.

Очистка электродов. После определения электроды протирают ватой, смоченной эфиром, затем спиртом, затем отмывают водой и хранят в свежей дистиллированной воде.

При сильном загрязнении солями электроды выдерживают сутки в 1 М растворе соляной кислоты, затем последовательно промывают их дистиллированной водой, 1М раствором гидроксида натрия, отмывают дистиллированной водой, повторяя промывку 2 – 3 раза, окончательно отмывают дистиллированной водой до характерного для используемой воды значения рН.

Определение. Образец гомогенизируют. Из различных твердых или жидких образцов готовят гомогенизированием однородную смесь. Электроды рН-метра осторожно помещают в испытуемую смесь, имеющую температуру, при которой проводилась калибровка. Если рН-метр не снабжен регулятором температуры, то температура испытуемого образца должна быть равна 20°C.

Проводят измерение значений рН в зависимости от конструкции рН-метра, дожидаясь, пока измеряемая величина не стабилизируется на постоянном значении. После каждого измерения зажиренные электроды протирают ватой, смоченной эфиром, затем спиртом, затем отмывают и промокают фильтровальной бумагой.

За результат измерения принимают среднее арифметическое значение из трех определений. Результат записывают с точностью до 0,1 единицы рН.

Разница между предельными значениями трех результатов измерений не должна превышать 0,15 единиц рН.

Порядок определения

1. Ознакомиться с инструкцией (паспортом) по работе с лабораторным рН-метром.

2. Электроды рН-метра осторожно, последовательно извлечь из стакана с дистиллированной водой (электроды хранить опущенными в

стаканчике с дистиллированной водой) и поместить их в стакан N1 с 0,1 н. раствором HCl, N2 с фосфатным буфером pH 6,86, N3 с боратным буфером pH 9,18 и N4 – образцом сточной воды. В качестве образца N4 можно использовать воду из-под крана. После каждого измерения электроды промыть дистиллированной водой из промывалки и осторожно обтереть фильтровальной бумагой.

Зафиксировать значения pH по стрелке прибора. Параллельно определить значения pH опусканием в растворы универсальной индикаторной бумаги.

3. В стаканчик с 10 мл 0,1 М раствора HCl добавлять из бюретки последовательно по 2 мл (всего: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 и 20 мл) 0,1 М раствора NaOH. После каждого добавления 2 мл раствор перемешивают и измеряют в нем значение pH. Построить на графике в координатах pH - V(объем добавленного раствора щелочи, мл) кривую титрования. При каком значении pH наблюдается нейтральное значение среды?

4. Аналогично (по специальному указанию преподавателя) титруют раствор уксусной кислоты.

Контрольные вопросы

1. Что такое pH, что называют шкалой pH?
2. Назвать вещества, закисляющие и защелачивающие воду и почву. Каковы пути попадания этих веществ в стоки?
3. Методы определения pH. Чем отличается экспресс-метод от инструментального?
4. Что называют изоэлектрической точкой белка?
5. Что такое "оптимум pH" для микроорганизма, вещества?

Работа 7. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов и металлов

Ионы металлов содержатся в окружающей среде в свободном и связанном в прочные химические комплексы состоянии. Поэтому для количественного определения содержания токсичных элементов исследуемые объекты необходимо подвергнуть полной минерализации для высвобождения связанных металлов.

Для минерализации применяют высокотемпературную окислительную обработку, особенно эффективную в присутствии минеральных кислот, с последующим распылением минерализованного раствора в воздушно-ацетиленовом пламени и измерении резонансного поглощения атомов определяемого элемента при помощи атомно-абсорбционного спектрофотометра .

Оборудование. Весы лабораторные общего назначения с погрешностью взвешивания $\pm 0,0002$ г. Электродуховка лабораторная, обеспечивающая поддержание температурного режима от 100 до 500°C. Щипцы тигельные. Электроплитка или газовая горелка. Чашки или тигли фарфоровые или кварцевые с крышками. Пипетки автоматические на 0,1 – 50 мл. Цилиндры мерные вместимостью 5 – 500 мл. Колбы мерные вместимостью 25 – 500 мл. Воронки лабораторные. Фильтры обеззоленные с синей полосой. Штатив химический. Колбы Кьельдаля вместимостью 25 – 100 мл с грушевидными пробками. Стаканы химические вместимостью 50 – 150 мл. Колбы конические с пришлифованными пробками вместимостью 50 – 1000 мл. Шарики стеклянные для равномерности кипения жидкостей.

Атомно-абсорбционный спектрофотометр, укомплектованный ацетиленовой горелкой, источником резонансного излучения железа, цинка, меди, хрома, никеля, свинца, кадмия и компрессором или сжатым воздухом в баллонах. Ацетилен растворенный и газообразный в баллонах.

Реактивы и материалы. Вода бидистиллированная. Кислота азотная о.с.ч., перегнанная, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), 1%-ный раствор. Кислота серная х.ч., перегнанная, раствор в бидистиллированной воде (1:9 об.). Кислота соляная х.ч., раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.). Спирт этиловый х.ч. Водорода перекись (пергидроль) х.ч. Лимонная кислота х.ч., 20%-ный раствор в бидистилляте. Фенолфталеин ч.д.а., 1%-ный раствор. Аммиак водный х.ч., 5%-ный раствор. Натрия N,N'-диэтилдитиокарбамат ч.д.а., 0,5%-ный раствор в бидистилляте, свежеприготовленный. Диэтиловый эфир х.ч. Стандартные растворы сравнения, содержащие (мкг/мл): железа 0,1 – 10, цинка 0,1 – 10, меди 0,05 – 5, хрома 0,1 – 5, никеля 0,1 – 5, свинца 0,1 – 2, кадмия 0,02 – 1. Срок хранения стандартных растворов 1 год. Используют реактивы, в которых проведен контроль на содержание в них определяемых элементов.

Подготовка к работе. На результаты определения элементов может оказывать существенное влияние загрязнение анализируемых проб металлами от используемой лабораторной посуды, воды и химических реактивов что необходимо учитывать при подготовке к анализу.

Лабораторную посуду моют раствором горячей азотной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), ополаскивают дистиллированной водой, моют раствором горячей соляной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), промывают бидистиллированной водой и высушивают.

Навеску продукта в количестве 20 г берут на обеззоленную бумагу, заворачивают и помещают в колбу Кьельдаля. Жидкие продукты в количестве 100 мл (молоко, минеральная или сточная вода) упаривают в колбе на электроплитке до объема 10 мл.

Параллельно проводят холостой опыт, добавляя в качестве пробы 10 – 20 мл бидистиллированной воды.

Минерализация проб мокрым способом (кроме липидов). В колбы с навесками вносят азотную кислоту из расчета 10 мл на каждые 5 г продукта, выдерживают 15 мин, вносят 3 стеклянных шарика, закрывают грушевидными пробками и проводят постепенно усиливающееся нагревание смеси, обеспечивая ее равномерное кипение и упаривание до объема 5 мл. В колбу вносят 10 мл азотной кислоты, упаривают до 5 мл. Процесс повторяют 2 – 4 раза до прекращения выделения бурых паров.

В охлажденную колбу вносят, строго сохраняя последовательность, 10 мл азотной кислоты, 2 мл серной кислоты и 2 мл перекиси водорода на каждые 5 г продукта (молочные продукты минерализуют без серной кислоты), содержимое упаривают до объема 5 мл, не допуская образования коричневой окраски жидкости. При появлении коричневой окраски нагрев прекращают, пробу охлаждают до комнатной температуры.

В колбу добавляют 5 мл азотной кислоты и 2 мл H_2O_2 и нагревают до появления белых паров серного ангидрида. Если при этом раствор не обесцветится, то процедуру повторяют. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров и кипятят в течение 10 мин, охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя испаряющуюся воду. После растворения осадка раствор упаривают до образования влажных солей.

Минерализация зажиренных образцов. Колбу с навеской образца нагревают на электроплитке 8 ч до образования вязкой массы, охлаждают, добавляют 25 мл азотной кислоты и вновь осторожно нагревают, избегая бурного вспенивания. После прекращения вспенивания в охлажденную колбу добавляют 25 мл азотной кислоты, 12 мл перекиси водорода и нагревают до получения бесцветной жидкости. Если жидкость темнеет, то к ней периодически добавляют по 5 мл азотной кислоты, продолжая нагревание до завершения минерализации. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров, кипятят в течение 10 мин и охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя

испаряющуюся воду. После растворения осадка раствор упаривают до образования влажных солей.

Анализ. В емкость с озоленной пробой добавляют разбавленную (1:1) азотную кислоту в количестве 1 – 5 мл в зависимости от зольности продукта и нагревают на электроплитке для растворения золя.

Раствор выпаривают до влажных солей, растворяют в 20 мл 1%-ного раствора азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки той же кислотой.

Если зола растворилась не полностью, раствор с осадком упаривают до влажных солей, растворяют в 20 мл 1%-ной азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Если зола растворилась не полностью, раствор с осадком упаривают до влажных солей, перерастворяют в минимальном объеме разбавленной (1:1) соляной кислоты, упаривают до влажных солей и растворяют в 20 мл 1 %-ной соляной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Если зола не растворилась, раствор доводят до объема 40 мл 1%-ной соляной кислотой, осторожно кипятят на плитке в течение 0,5 ч, отфильтровывают осадок через промытый растворителем обеззоленный фильтр, переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой и используют для определения содержания токсичных элементов.

Разбавление и концентрирование пробы. Содержание определяемых элементов в растворах не должно выходить за пределы концентраций (мкг/мл): для железа и цинка 0,1 – 10, для меди 0,05 – 5, для хрома и никеля 0,1 – 5, для свинца 0,1 – 2, для кадмия 0,02 – 1.

Разбавление растворов проб проводят той же кислотой (1%-ной соляной или азотной) в случае превышения результатов определения для указанного интервала. Коэффициент разбавления $K > 1$, определяется $K = V_2 / V_1$, где V_1 – объем аликвоты, взятой для разбавления, мл; V_2 – объем разбавленного раствора, мл.

Концентрирование проводят для повышения точности анализа и в случае, когда результаты определения лежат ниже указанного оптимального интервала концентраций.

В стаканы вместимостью 150 мл помещают аликвоты 10 – 50 мл испытуемых растворов в зависимости от требуемой степени концентрирования, доводят их объемы до 50 мл 1%-ным раствором кислоты, применявшейся для растворения проб. Параллельно берут в такие же стаканы 50 мл стандартных растворов сравнения.

В стаканы приливают по 10 мл раствора 20%-ного раствора лимонной кислоты, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и титруют

раствором аммиака до появления слабо розового окрашивания.

Растворы переносят в делительные воронки на 100 мл, приливают по 5 мл 0,5%-ного раствора натрия N,N'-диэтилдитиокарбамата ч.д.а. и по 5 мл диэтилового эфира, встряхивая 1 мин. Проводят трехкратную экстракцию. Нижние водные слои отбрасывают, органические слои собирают и объединяют. Коэффициент концентрирования $K < 1$, определяется $K = V_2 / V_1$, где V_1 – объем аликвоты, взятой для концентрирования, мл; V_2 – объем органической фазы, мл.

Проведение измерений. Проводят подготовку атомно-абсорбционного спектрофотометра к работе в соответствии с технической документацией, прогрев прибора проводят в течение 30 мин, прогревают включенную горелку с одновременной промывкой дистиллированной водой в течение 10 мин. Проводят настройку источников резонансного излучения и монохроматора, используя для работы наиболее чувствительные линии поглощения элементов с длинами волн: железа – 248,3 нм, цинка – 213,9 нм, меди – 324,8 нм, хрома – 357,9 или 359,4, никеля – 232,5 нм, свинца – 283,3 или 217,0 нм, кадмия – 228,8 нм.

Выбор резонансной линии при измерениях абсорбции элементов определяется в зависимости от технических характеристик ламп спектрофотометра и проводится по критерию большего отношения сигнал/шум и по меньшей величине дрейфа нуля и чувствительности.

Распыляют в пламени нулевой стандарт (холостая проба без определяемого элемента), затем в порядке возрастания концентрации измеряют абсорбцию стандартных растворов сравнения, в конце вновь определяют нулевое положение распылением в пламени нулевого стандарта. При прямом определении свинца, кадмия, никеля коррекция фонового поглощения обязательна для каждого измерения.

При наличии компьютерной системы обработки данных для получения результата используют рекомендованную программу, либо строят зависимость величины абсорбции от концентрации.

Массовую долю элемента в пробе X (ppm или мг/кг) рассчитывают по формуле $X = (C_1 - C_2) \cdot V \cdot K / g$, где C_1 – концентрация элемента в испытуемом растворе, мкг/мл; C_2 – среднеарифметическая концентрация элемента для параллельных контрольных растворов, мкг/мл; V – исходный объем испытуемого раствора, мл; g – навеска пробы, г; K – коэффициент разбавления, мл. Измерения проводят для серии, не менее 10 стандартных растворов с концентрацией элемента не выше 0,2 мкг/мл и рассчитывают стандартное отклонение S_o по формуле

$$S_o = (\sqrt{ \Sigma (C_i^1 - C_i^2)^2 }) / (2 M),$$

где $(C_i^1 - C_i^2)$ – расхождения параллельных измерений концентраций элемента в i -растворе; M – количество растворов. Величина $3S_0$ считается пределом обнаружения элемента в растворе при $P = 0,99$.

Т а б л и ц а 5.3

Атомно-абсорбционное определение содержания металлов

Элемент	Длина волны, нм	Оптимальный диапазон рабочих концентраций, мкг/мл	Предел определения, мкг/мл
1	2	3	4
Na	330,2	10 – 100	1
Na	589,6	2 – 30	0,1
Na	589,0	0,5 – 5	0,005
K	404,5	50 – 1000	8
K	769,9	5 – 50	0,5
K	766,5	0,5 – 10	0,005
Mg	285,2	0,1 – 10	0,001
Ca	422,7	5 – 30	0,01
Fe	248,3	1 – 10	0,01
Zn	213,9	1 – 10	0,002
Cu	324,8	0,005 – 5	0,003
Mn	279,5	0,1 – 2	0,003
Pb	283,3	0,1 – 2	0,02
Pb	217,0	0,1 – 2	0,01
Cd	228,8	0,02 – 1	0,001
Co	240,7	0,05 – 2	0,01
Ni	232,1	0,1 – 5	0,01
Cr	357,9	0,1 – 5	0,005
Cr	359,4	0,05 – 5	0,005

Вычисления проводят до второго десятичного знака. Окончательный результат округляют до первого десятичного знака. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, относительное стандартное отклонение воспроизводимости определения не должно превышать δ % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. Значение δ составляет: для Pb и Cd при $C = 0,01$ ppm, $\delta = \pm 40$ %, при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 9$ %; для Cr при $C = 0,01$ ppm, $\delta = \pm 65$ %, при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 24$ %; для Ni при $C = 0,02$ ppm, $\delta = \pm 90$ %, при $C = 10,0$ ppm, $\delta = \pm 9$ %; для Cu при $C = 0,5$ ppm, $\delta = \pm 29$ %.

при $C = 30,0$ ppm, $\delta = \pm 8$ %; для Zn при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 26$ %, при $C = 100,0$ ppm, $\delta = \pm 9$ %; для Fe при $C = 10,0$ ppm, $\delta = \pm 55$ %, при $C = 200,0$ ppm, $\delta = \pm 15$ %.

При наличии соответствующей укомплектованности прибора наиболее частые определения проводят для следующих элементов (табл. 5.3).

Работа 8. Определение содержания Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} методом ионной хроматографии

Метод основан на экстракции ионов водой, очистке экстракта или прямом определении концентрации катионов в растворе пробы с использованием кондуктометрического датчика.

Оборудование. Портативный ионный хроматограф типа IC-2001 фирмы "Heraeus-Biotronic" (ФРГ) с кондуктометрическим детектором и колонкой (Cation separation kit с колонкой BT VIII-КА-P) для определения катионов (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), присоединенный к компьютеру с автоматической программой обчета хроматографических данных типа Winpeak фирмы "Heraeus-Biotronic" (ФРГ). Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Автоматические пипетки 1–2–5–10–25 см³. Микрошприц для жидкостной хроматографии на 100 мкл. Бумага фильтровальная лабораторная. Мембранный фильтр 0,45 мкм. Картридж C_{18} . Микрогомогенизатор для измельчения твердых образцов.

Реактивы. Вода бидистиллированная или квалификации для ВЭЖХ. Готовые растворы производства "Heraeus-Biotronic" (ФРГ): концентрат EK-VIII-КА-AL для определения Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ разбавленный 1:100; модификатор I (M-VIII-КА-01) голубой; модификатор II (M-VIII-КА-02), элюентный концентрат (EK-VIII-КА-ER) для определения Mg^{2+} , Ca^{2+} разбавленный 1:100; ГСО стандартных растворов катионов Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} или готовые стандартные растворы, содержащие 10 ppm (мг/л) ионов.

Подготовка к анализу. Все растворы, вводимые в жидкостную линию хроматографа, включая элюент, подвергают мембранной фильтрации через фильтр 0,45 мкм.

Твердые образцы подвергают гомогенизации в воде (1:100) с последующей фильтрацией раствора через бумагу, картридж C_{18} для удаления избытка органических кислот и мембранный фильтр 0,45 мкм. Ионный хроматограф включают и подготавливают к работе в соответствии с технической документацией на хроматограф, устанавливая диапазон измерений по чувствительности – 1, определение катионов, расход

элюента 1,4 мл/мин (давление 22 бар) и записывают в течение 30 мин базовую линию, используя компьютерную программу обработки данных.

Колонки хроматографа промывают в течение 10 мин элюентом. По окончании работы, в случае длительного хранения, колонки промывают бидистиллированной водой и заполняют метанолом.

В инжектор хроматографа вводят Гамильтоновским микрошприцем 100 мкл модификатора 1, через 5 мин закол модификатором 1 повторяют для очистки колонки от бивалентных катионов.

В инжектор хроматографа вводят Гамильтоновским микрошприцем 100 мкл модификатора 2, через 5 мин закол повторяют или не повторяют в зависимости от времен удержания пиков определяемых катионов. Однократное введение модификатора 2 сужает разделение пиков.

Анализ щелочных металлов. Микрошприцем в подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, разбавленный 1:100, ЕК-VIII-КА-АЛ для определения Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего Li^+ – 0,5 ppm, Na^+ – 2,5 ppm, NH_4^+ – 2,5 ppm, K^+ – 5 ppm (мг/л) ионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Пример стандартной хроматограммы приведен на рис. 5.4.

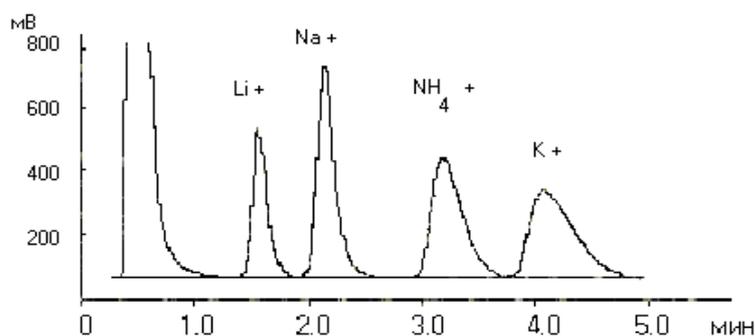


Рис. 5.4. Хроматограмма определения содержания Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ ионов в водном растворе с концентрацией (мг/л): Li^+ – 0,5, Na^+ – 2,5, NH_4^+ – 2,5, K^+ – 5 (разбавленный 1:100 элюент ЕК-VIII-КА-АЛ, разделительная колонка ВТ VIII-КА-Р 50 × 4,6 мм, поток 1,4 мл/мин, давление 22 бар, объем введенной пробы 100 мкл)

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10 – 15 мин и

микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием щелочных катионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать четыре отдельно стоящих пика (соответствующих Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+), высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 10 раз. В результате анализа раствора с неизвестной концентрацией на хроматограмме должны идентифицироваться четкие пики с высотой не менее 10 мВ (< 10 мВ сильно разбавленный раствор пробы) и не более 200 мВ (> 200 мВ растворы, концентрированные по определяемым ионам).

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ ионов в анализируемой пробе в мг/л.

Анализ щелочноземельных металлов. Микрошприцем в хроматограф, подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью разбавленный 1:100 элюент (ЕК-VIII-КА-ЕР) для определения Mg^{2+} и Ca^{2+} , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего Mg^{2+} – 10 ppm, Ca^{2+} – 20 ppm (мг/л) ионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Пример стандартной хроматограммы приведен на рис. 5.5.

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием щелочных катионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать два отдельно стоящих пика (соответствующих

Mg^{2+} , Ca^{2+}), высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 2 – 10 раз.

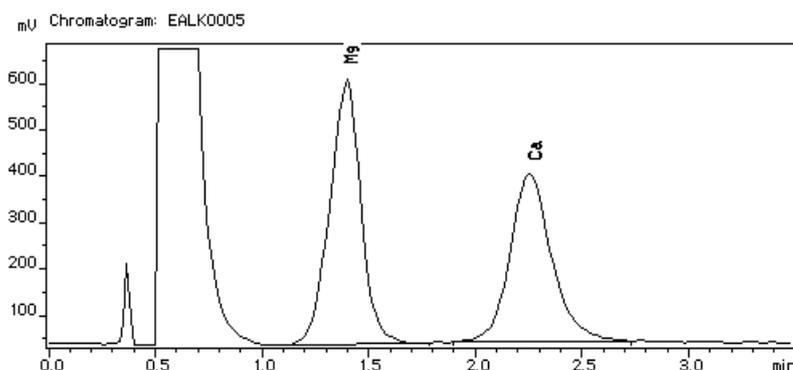


Рис. 5.5. Хроматограмма определения содержания ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в водном растворе с концентрацией (мг/л): Mg^{2+} – 10; Ca^{2+} – 20 (разбавленный 1:100 элюент ЕК–VIII–КА–ЕР, разделительная колонка ВТ VIII–КА–Р 50 x 4,6 мм, поток 1,4 мл/мин, давление 18 бар, объем введенной пробы 100 мкл)

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания ионов щелочно-земельных металлов в анализируемой пробе в мг/л.

Расчет. Определение концентрации в анализируемом растворе осуществляется автоматически по соответствующим временам удержания пиков катионов и их площадям, протокол распечатывается. Вычисления автоматически проводятся до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания катионов в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимальная определяемая концентрация – 1 ppm (мг/л).

Работа 9. Определение содержания неорганических анионов
(Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) в растворе
методом ионной хроматографии

Метод основан на экстракции ионов водой, очистке экстракта или прямом определении концентрации анионов в растворе пробы с использованием кондуктометрического датчика.

Оборудование. Ионный хроматограф типа IC-2001 фирмы "Eppendorf-Biotronic" (ФРГ) с кондуктометрическим детектором и колонкой (Anion separation kit с колонкой BT-X-AN-S) для определения анионов (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), присоединенный к компьютеру с автоматической программой обчета хроматографических данных типа Winpeak фирмы "Eppendorf-Biotronic" (ФРГ). Гелий газообразный в баллоне. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Автоматические пипетки 1–2–5–10–25 см³. Микрошприц для жидкостной хроматографии на 100 мкл. Бумага фильтровальная лабораторная. Мембранный фильтр 0,45 мкм. Картридж C₁₈. Сульфокатионит типа DC-50. Микрогомогенизатор для измельчения твердых образцов.

Реактивы. Вода бидистиллированная или квалификации для ВЭЖХ. Готовые растворы производства "Eppendorf-Biotronic" (ФРГ) : элюентный концентрат EK-X-AN разбавленный 1:10; ГСО стандартных растворов ионов (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) или готовые стандартные растворы, содержащие 10 ppm (мг/л) анионов.

Подготовка к работе. Все растворы, вводимые в жидкостную линию хроматографа, включая элюент, подвергают мембранной фильтрации через фильтр 0,45 мкм и дегазируют, пропуская He из баллона. Твердые образцы подвергают гомогенизации в воде (1:100) с последующей фильтрацией раствора через бумагу, картридж C₁₈ для удаления избытка органических кислот и мембранный фильтр 0,45 мкм.

Ионный хроматограф включают и подготавливают к работе в соответствии с технической документацией на хроматограф, устанавливая диапазон измерений по чувствительности – 1, определение анионов, объем вводимой пробы 100 мкл, расход элюента 1,4 мл/мин (давление 50 бар) и записывают в течение 30 мин базовую линию, используя компьютерную программу обработки данных.

Колонки хроматографа промывают в течение 10 мин разбавленным элюентом. По окончании работы, в случае длительного хранения, колонки промывают бидистиллированной водой и заполняют метанолом.

Анализ анионов. Микрошприцем в подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью разбавленный

1:10 элюент ЕК–Х–АН для определения Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего указанные анионы в количестве 10 ppm (мг/л). Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Пример стандартной хроматограммы приведен на рис. 5.6.

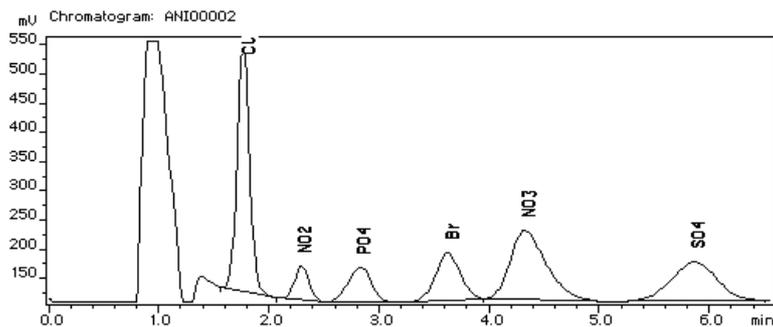


Рис. 5.6. Хроматограмма определения содержания Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} ионов в водном растворе с концентрацией 10 мг/л (разбавленный 1:10 элюент ЕК–Х–АН, разделительная колонка ВТ–Х–АН–S 50 x 4,6 мм, поток 1,4 мл/мин, давление 52 бар, объем введенной пробы 100 мкл)

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем элюент с заданной скоростью, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием анионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать отдельно стоящие пики, соответствующие содержанию Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 2 – 10 раз. В результате анализа раствора с неизвестной концентрацией на хроматограмме должны идентифицироваться четкие пики с высотой не менее 10 мВ (< 10 мВ очень сильно разбавленный раствор пробы) и не

более 200 мВ (>200 мВ очень концентрированные по определяемым ионам растворы).

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} ионов в анализируемой пробе в мг/л.

Расчет. Определение концентрации в анализируемом растворе осуществляется автоматически по соответствующим временам удержания пиков ионов и их площадям, протокол распечатывается.

Вычисления автоматически проводятся до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания нитритов и нитратов в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$. Минимальная определяемая концентрация – 1 ppm (мг/л).

Работа 10. Определение общих органических и неорганических примесей в воде

В зависимости от степени загрязнения вода содержит в себе различные количества веществ органической и неорганической природы. Находясь в воде в растворенном (раствор) или диспергированном (взвесь, эмульсия) состоянии эти вещества под воздействием света, температуры и кислорода подвергаются окислению. Процесс окисления протекает до тех пор, пока имеются в наличии сами загрязняющие вещества, а также пока имеются в доступном состоянии в воде окислители, в первую очередь кислород. Чем больше примесей содержится - тем выше окисляемость и, следовательно, больше расход окислителя на окисление. Наличие высокого содержания примесей в сточных водах приводит к быстрому исчерпанию кислорода в воде, что в свою очередь ухудшает условия жизнедеятельности полезных микроорганизмов, рыбы и т.п.

Окисление веществ в воде происходит также под воздействием других окислителей, например в присутствии перманганатов или дихроматов. Этот процесс используется в качестве аналитического метода определения загрязнений в воде. Следует учитывать, что все методы определения окисляемости условны, а получаемые результаты сравнимы только при точном соблюдении всех условий определения.

Наиболее полное окисление достигается обработкой воды дихроматом калия в присутствии избытка серной кислоты. Дихроматную окисляемость называют также ХИМИЧЕСКИМ

ПОТРЕБЛЕНИЕМ КИСЛОРОДА (ХПК). ХПК – это параметр, показывающий общее количество органических веществ, содержащихся в сточных водах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИХРОМАТНОЙ ОКИСЛЯЕМОСТИ (ХПК) УСКОРЕННЫМ МЕТОДОМ

Метод основан на окислении загрязнений 0,25 н. раствором дихромата калия в среде серной кислоты. Избыток дихромата калия титруют раствором соли Мора. Нагревание не требуется, температура смеси повышается за счет тепла, выделяющегося при смешении пробы с концентрированной серной кислотой.

Определению мешают примесные хлориды, влияние которых можно исключить добавлением сульфата ртути (II).

Результат определения рассчитывают в мг кислорода, затраченного на окисление 1 л пробы, $\text{мгO}_2/\text{л}$.

Оборудование и реактивы. Колба вместимостью 250 мл. Пипетки мерные градуированные на 5 мл и 25 мл. Бюретки на 10 или 25 мл

1. Дихромат калия, 0,25 н. раствор. Растворяют 12,258 г высушенного в течение 2 ч при 105°C $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ч.д.а. в дистиллированной воде и разбавляют при 20°C до 1 л. 5 – 10 л раствора заливают в бутылку, соединенную шлангом с бюреткой для титрования. 2. Серная кислота концентрированная ч.д.а. 3. Соль Мора, 0,25 н. титрованный раствор. Растворяют 98 г $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 20 мл концентрированной H_2SO_4 и после охлаждения разбавляют до 1 л дистиллированной водой. Титр раствора устанавливают для каждой серии анализов следующим способом. Отбирают 25 мл 0,25 н. раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, разбавляют дистиллированной водой до 250 мл, приливают 20 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают, после охлаждения добавляют 2-3 капли раствора индикатора ферроина или 5 капель индикатора N-фенилантраниловой кислоты и титруют раствором соли Мора. 5 л раствора соли Мора заливают в бутылку, соединенную шлангом с бюреткой для титрования. 4. N-фенилантраниловая кислота, индикатор. Растворяют 0,25 г реактива в 12 мл 0,1 н раствора NaOH и разбавляют дистиллированной водой до 250 мл. 20 – 30 мл раствора индикатора помещают в капельницу. В качестве индикатора можно применять ферроин. Растворяют 1,485 г моногидрата 1,10-фенантролина и 0,695 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. в дистиллированной воде и разбавляют до 100 мл. 5. Сточная вода, загрязненная органическими веществами. Растворяют 2 г фенола в 1000 мл дистиллированной воды. Срок хранения 2 недели.

Ход определения. В одну колбу заливают 0,5 мл пробы сточной воды, в другую столько же дистиллированной воды (холостой опыт). В каждую колбу прибавляют по 2,5 мл 0,25 н. раствора $K_2Cr_2O_7$. Если необходимо исключить влияние хлоридов, то в раствор (только по специальному указанию преподавателя) добавляют по 0,2 г сульфата ртути.

Осторожно при плавном перемешивании в каждую колбу добавляют пипеткой по 2,5 мл концентрированного раствора H_2SO_4 . При этом температура смеси поднимается почти до $100^\circ C$. Через 2 мин растворы охлаждают до комнатной температуры, добавляют по 50 мл дистиллированной воды и 5 капель индикатора N-фенилантрапиновой кислоты в каждую колбу и титруют избыток дихромата титрованным раствором соли Мора до изменения окраски индикатора.

Расчет. Дихроматную окисляемость (X) в mgO_2/l вычисляют по формуле $X = (a - b) \cdot K \cdot 0,25 \cdot 8 \cdot 1000 / V = 2000 (a - b) K / V$, где a – объем раствора соли Мора, израсходованный на титрование холостого опыта, мл; b – объем раствора соли Мора, израсходованный на титрование пробы сточной воды, мл; K – поправочный коэффициент, показывающий на сколько точно концентрация раствора соли Мора равна 0,25 н. (значение K уточняется у преподавателя); V – объем пробы сточной воды, взятой на анализ, мл; 8 – эквивалент кислорода, 1000 – коэффициент пересчета мл в л. Полученные значения X необходимо округлить до значений, приведенных в табл. 5.4.

Т а б л и ц а 5.4
Округление результатов по определению ХПК

Диапазон X, мг/л	100 – 200	200 – 500	500 – 1000	1000 – 2000
Округление ХПК, мг/л	5	10	20	50

Описанным способом можно определить окисляемость и менее загрязненных вод (20 – 100 mgO_2/l). Для этого используют растворы с концентрацией 0,025 н. с последующей заменой в расчетной формуле коэффициента 0,25 на 0,025. Точность результатов не превышает 20% и их соответственно округляют.

Объем пробы, берущийся на анализ, определяют в зависимости от величины X. Если окисляемость воды лежит в пределах 500 – 4000 mgO_2/l , то на анализ берут 1 мл пробы, если окисляемость 50 – 500 mgO_2/l , то берут 5 мл пробы, если окисляемость выше 4000 mgO_2/l , то пробу разбавляют, если окисляемость ниже 20 mgO_2/l , то данный метод применять нельзя.

Необходимо учитывать, что использование в работе плохо вымытой посуды со следами загрязнений органическими веществами приводит к очень большим ошибкам.

Контрольные вопросы

1. Какие Вы знаете органические загрязнители воды и каково их содержание в воде (вода питьевая, дистиллированная вода, вода для инъекций, вода обессоленная, морская вода, речная вода)?
2. Что такое окисляемость и ХПК? Что характеризует ХПК?
3. Что происходит с химической точки зрения в водной среде вследствие сброса органических отходов?
4. Какое количество растворенного кислорода должно быть в воде, чтобы поддержать жизнедеятельность водной фауны?
5. Где больше кислорода: в холодной пресной воде или теплой соленой воде (посмотрите в справочниках растворимости газов в воде и солевых растворах)?

Работа 11. Определение содержания формальдегида в воде титрованием

Формальдегид, в силу своей высокой растворимости (37%-ный раствор в воде называется формалином), часто содержится в сбрасываемых водах. Для его определения используют метод титрования.

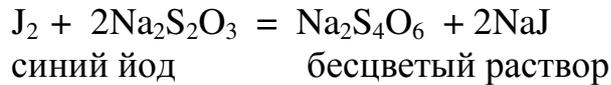
Оборудование. Конические колбы вместимостью 200 мл. Бюретки на 10 мл, соединенные шлангами с бутылками. Мерные пробирки на 1 и 5 мл.

Реактивы. 1. Формалин, 1%-ный раствор. 2. 0,1 н. титрованный раствор йода. 3. 20%-ный раствор NaOH. 4. 10%-ный раствор HCl. 5. 0,1 н. титрованный раствор тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 6. Индикатор, раствор крахмала в капельнице.

Ход работы. В одну колбу заливают 1 мл раствора формальдегида, в другую 1 мл дистиллированной воды (холостой опыт), добавляют в каждую по 10 мл дистиллированной воды, по 10 мл раствора J_2 , по 2 – 3 капли раствора NaOH до получения устойчивой светло-желтой окраски, закрывают колбы пробками и оставляют на столе на 10 мин. Затем подкисляют, добавляя по 5 мл 10%-ного раствора HCl, помещают на 10 мин в темноту и титруют непрореагировавший избыток йода 0,1 н. раствором тиосульфата натрия с крахмалом. Для этого до начала прикапывания из бюретки в колбу раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ прикапать в каждую колбу из капельницы по 3 – 6 капель раствора крахмала до образования заметного посинения. Конец титрования определяют по исчезновению

темной окраски (на белом фоне) от добавления капли раствора тиосульфата натрия.

Расчет. При титровании избытка йода протекает реакция



Содержание формальдегида X в исходном растворе в % определяют по формуле $X = (V_2 - V_1) \cdot 0,0015 \cdot P \cdot 100 / g$, где $(V_2 - V_1)$ – разность объемов растворов тиосульфата натрия, пошедших на титрование холостой и рабочей пробы, мл; P – коэффициент разбавления, равный 10; 100 – коэффициент пересчета в проценты; g – количество формальдегида в пробе, г.

При расчете g необходимо учитывать, что 1 мл 0,1 н. раствора йода соответствует 1,5 мг формальдегида, а объем титруемого раствора формальдегида в условиях опыта составляет 11 мл.

Контрольные вопросы

1. Каковы природные и антропогенные источники образования формальдегида и пути его попадания в гидросферу?
2. Какова вредность альдегидов и каково их воздействие на человека и окружающую среду?
3. Назовите способы отбора проб загрязненной воды из разных источников, методы сохранения и анализа таких проб.

Работа 12. Определение содержания ионов железа в воде

Железо является одним из наиболее используемых металлов в технике. Подавляющее большинство реакторов и трубопроводов изготавливают из сплавов железа, которые подвергаются коррозии. Продукты окисления железа в виде окислов или солей попадают в окружающую гидро и литосферу.

Железо, как биоэлемент, содержится в живых организмах, например, в крови человека в виде гемоглобина, представляющего собой комплекс ионов железа (3+) и белка глобина или в яблоках, желтеющих на срезе за счет процесса окисления: Fe^{2+} (бесцв.) \rightarrow Fe^{3+} (желт.). Недостаток железа у человека приводит к анемии. Избыточное содержание железа вызывает нарушение процесса жизнедеятельности. Ряд соединений железа используется в качестве ядов, например железный купорос.

Оборудование. Конические колбы вместимостью 200 мл. Бюретки на 10 мл, соединенные шлангами с бутылками. Мерные

пробирки или цилиндры на 5 и 50 мл. Фотометр с сине-зеленым светофильтром (500 нм). В опыте используют колориметр без светофильтра. Кварцевые кюветы к колориметру с толщиной заполняемого слоя 1 см. Газовая горелка с асбестированной сеткой для нагрева колб. Колба с воронкой и бумажным фильтром для фильтрования пробы

Реактивы. 1. Серная кислота, разбавленный 1:1 раствор (~ 50%). 2. 0,1 н. раствор перманганата калия. Растворяют 3,2 г KMnO_4 ч.д.а. в 900 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до 1 л. 3. 0,1 н. раствор щавелевой кислоты. Растворяют 0,3 г $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а. в 900 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до 1 л. 4. Соляная кислота, ч.д.а. разбавленный 1:1 раствор (~ 20%). 5. Раствор роданида калия или аммония ч.д.а. Готовят растворением 20 г KSCN в 80 мл дистиллированной воды (20%-ный раствор) 6. Раствор железо-аммонийных квасцов. Растворяют 0,8634 г осушенного в эксикаторе $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 500 мл дистиллированной воды. Затем к раствору добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем раствора до 1 л. 1 мл такого раствора содержит 0,1 мг железа. Рабочий раствор квасцов: разбавляют 50 мл основного раствора до 1 л дистиллированной водой. Этот раствор готовится еженедельно. 1 мл такого раствора содержит 0,005 мг железа.

Построение калибровочной кривой. (По согласованию с преподавателем используют стандартный калибровочный график). В ряд колб для кипячения помещают по 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 мл рабочего раствора и доводят объемы каждого раствора до 50 мл дистиллированной водой. В каждой приготовленной колбе проводят определение содержания железа, вычитая оптическую плотность холостой пробы. Для этого параллельно для каждой колбы проводят холостой опыт с добавлением соответственно 0 – 40 мл дистиллированной воды. Строят график в координатах: оптическая плотность, концентрация железа (рис. 5.7).

Ход определения. В одну широкогорлую колбу для кипячения помещают 50 мл пробы, в которой необходимо определить содержание железа (готовится лаборантом разбавлением 25 мл рабочего раствора 25 мл дистиллированной воды).

В другую колбу заливают 50 мл дистиллированной воды (холостая проба). В колбы добавляют по 2,5 мл разбавленной серной кислоты, по 2,5 мл раствора KMnO_4 и кипятят смесь в течение 5 мин. Горячий раствор обесцвечивают добавлением раствора щавелевой кислоты и вновь добавляют по каплям раствор перманганата калия (до образования слабо розовой окраски). Если окисленные растворы мутные, то после охлаждения их фильтруют через бумажный фильтр, а общий объем фильтрата доводят до 50 мл.

Добавляют в обе колбы по 2,5 мл разбавленной 1:1 соляной

кислоты, перемешивают, добавляют по 5 мл 20%-ного раствора KSCN, перемешивают и сразу измеряют оптическую плотность.

Вводя поправку на холостую пробу, по калибровочному графику определяют содержание железа.

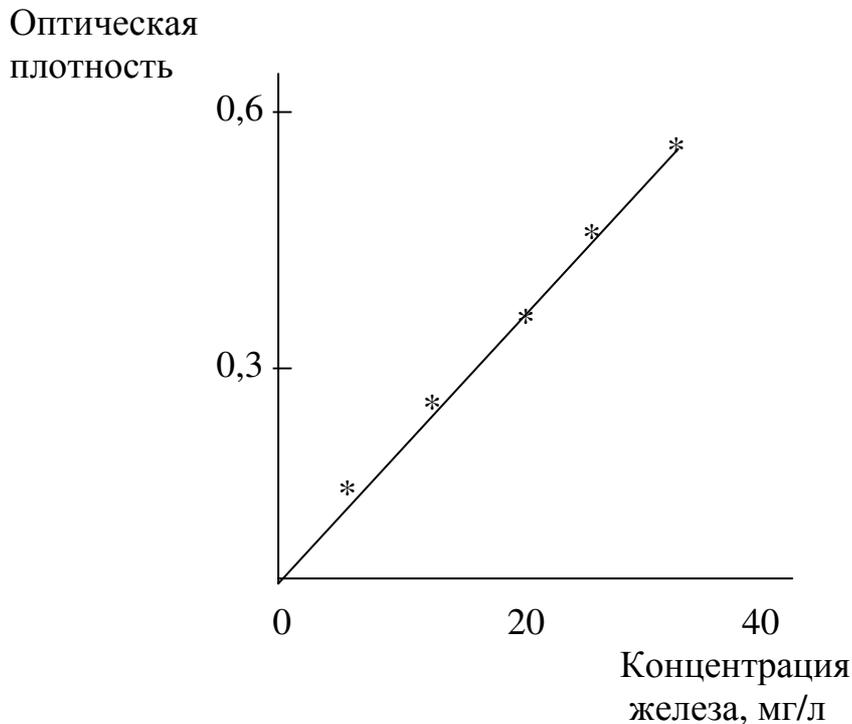


Рис. 5.7. Калибровочный график определения содержания железа

Расчет. Содержание железа (X) в мг/мл вычисляют по формуле $X = 50 \cdot C/V$, где C – концентрация железа, найденная по калибровочному графику, мг/мл, 50 – объем, до которого разбавлена проба, мл; V – объем пробы, взятой на определение (50), мл.

Округление результатов по табл. 5.5.

Т а б л и ц а 5.5

Округление результатов по определению ХПК

Диапазон X , мг/л	0,05 – 1,0	1,0 – 2,0	2,0 – 5,0
Округление ХПК, мг/л	0,05	0,1	0,2

Контрольные вопросы

1. Написать уравнения реакции взаимодействия солей железа с соответствующими реагентами в молекулярной и ионной форме.

2. Почему для определения в растворе солей железа используют сине-зеленые светофильтры с максимумом поглощения 520 нм? Почему в данном опыте можно проводить измерение оптической плотности без светофильтра?

3. Какова вредность железа? Что можно сказать о железодефиците в организме человека?

4. Почему в работе предложено провести округление результатов? Что такое стандартный образец железа? Каково нормируемое содержание ионов железа в воде?

Работа 13. Определение хлорсодержащих пестицидов методом тонкослойной хроматографии

Метод основан на экстракции пестицидов органическим растворителем из продукта, очистке экстракта, упаривании его досуха и хроматографировании в тонком слое. Метод предназначен для анализа содержания остаточных количеств пестицидов ДДТ и его метаболитов, гамма-ГХЦГ, кельтана, альдрина, гептахлора.

Оборудование. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1-250-29/32. Колбы Гр-25-14/23. Колбы мерные 2-50-2; 2-100-2; 2-500-2. Воронка В-56-80 ХС. Колба коническая Кн-1-250-29/32. Цилиндры мерные 1-50, 1-100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100-29/32, ВД-250-29/32. Стакан В-1-50. Пипетки 1-2-2-5, 1-2-2-10. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Пластинки хроматографические «Силуфол» производства Чехии, или «Сорбфил» (Россия), или «Merck» (ФРГ). Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся пришлифованной крышкой, стеклянный. Колонка стеклянная хроматографическая для очистки экстрактов из продуктов, содержащих жир: узкая часть – длина (50 ± 2) см, диаметр (1,7 ± 0,3) см, широкая часть – длина (1,5 ± 2) см, диаметр (2,5 ± 0,2) см.

Реактивы. Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³. Гексан, ч., очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором. Ацетон, х.ч., перегнанный. Аммиак водный, ч.д.а. Спирт этиловый 95%-ный, технический. Хлороформ, х.ч., перегнанный. Этилацетат перегнанный. Ацетонитрил, х.ч. Бензол, х.ч. 2-Феноксиэтанол. Водорода пероксид, 30%-ный раствор. Натрий сульфат безводный, ч. Натрий углекислый кислый, ч.д.а. Серебро азотнокислое, х.ч. Силикагель марки АСК, измельченный и просеянный через сито 0,30 мм. Вода дистиллированная. Уголь активированный любой марки. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Эталоны хлорорганических пестицидов: кельтана, ДДТ, ДДД, ДДЭ, ГХЦГ, альдрина, гептахлора гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%. Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

Очистка силикагеля. В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180°C в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

Очистка ваты. В коническую колбу помещают вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

Подготовка хроматографической колонки. В нижнюю часть колонки помещают кусочек очищенной ваты, насыпают силикагель АСК на высоту (26,0 ± 0,5) см, уплотняют постукиванием по колонке деревянной палочкой. Затем помещают силикагель, пропитанный серной кислотой в отношении 4:1 (по массе), на 3 см, далее насыпают безводный сульфат натрия слоем (1,0 ± 0,5) см. Через колонку пропускают 30 см³ гексана и отжимают резиновой грушей. Эффективность колонки проверяют, внося 5 см³ смеси хлорорганических пестицидов с заданной концентрацией (в пределах 0,1–0,2 мкг). Дают возможность раствору впитаться в колонку, а затем элюируют пестициды 50 см³ гексана со скоростью одна капля в секунду.

Элюат с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют при температуре 40°C. К сухому остатку пипеткой добавляют 10 см³ гексана, колбу закрывают пробкой на шлифе. Стенки колбы ополаскивают растворителем и аликвотную часть раствора (5 мкл) вводят в хроматограф и проводят измерения. При определении не менее 90% от заданного количества пестицидов сорбент можно считать пригодным для

работы, а колонку использовать для анализа. При поступлении новой партии силикагеля проверяют его эффективность, как описано выше.

Приготовление растворов для проявления пятен растворов пестицидов на пластинках ТСХ. Раствор 1. 0,5 г азотнокислого серебра растворяют в 5 см³ дистиллированной воды, прибавляют 10 см³ аммиака и доводят объем до 100 см³ ацетоном. Раствор хранят в течение 3 дней в холодильнике.

Раствор 2. 0,25 г азотнокислого серебра помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, приливают 2,5 см³ дистиллированной воды, 5 см³ 2-феноксэтанола, доводят до метки ацетоном и добавляют 3 капли 30%-ного раствора пероксида водорода.

Подготовка хроматографической камеры. В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь подвижных растворителей для насыщения ее парами. Объем подвижного растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

Приготовление основных растворов пестицидов массовой концентрацией мкг/см³. Для приготовления основного раствора любого пестицида 10 мг эталонного препарата ГСО растворяют гексаном в мерной колбе вместимостью 100 см³ и доводят гексаном до метки. Хранят основные растворы в колбах с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 мес.

Подготовка пластин для хроматографии. Пластины "Силуфол" перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110°С в течение 30 – 60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя.

Анализ. Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50,0 г, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см³ и заливают 100 см³ этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного сернокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют с помощью ротационного испарителя досуха при температуре водяной бани 40 – 45°С.

Очистка экстракта. Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 см³ гексана в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты и содержимое воронки осторожно встряхивают 5 – 10 раз. После разделения слоев

нижний слой сливают и отбрасывают. Очистку экстракта повторяют еще несколько раз. Очищенный экстракт промывают дважды раствором бикарбоната натрия с массовой долей 1% порциями по 5 см³, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Гексановый раствор количественно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 см³ и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40 – 45°C.

Если анализируют объекты, содержащие жир, то полученный экстракт подвергают дополнительной очистке на колонке. Сухой остаток растворяют в 10 см³ гексана, переносят на подготовленную колонку и элюируют пестициды с помощью 110 см³ смеси бензола с гексаном в соотношении 4:7 со скоростью одна капля в секунду. Элюат обезвоживают, пропуская через слой безводного сернокислого натрия и отгоняют растворитель досуха.

Для очистки экстракта от восков или твердых примесей полученный сухой остаток растворяют охлажденной смесью ацетона и воды в соотношении 2:1 и выдерживают 30 мин в холодильнике. Воски отфильтровывают через бумажный фильтр, который промывают охлажденной смесью ацетона и воды 2:1. Пестициды экстрагируют из водно-ацетонового раствора гексаном. Растворитель упаривают.

Сухой очищенный остаток растворяют в колбе, внося пипеткой 1 см³ гексана. 0,1 см³ полученного раствора наносят микропипеткой или шприцем на хроматографическую пластинку на линию старта, находящуюся от края на расстоянии 1,0 см. Для увеличения чувствительности метода сухой остаток растворяют в нескольких каплях гексана и полностью наносят на пластинку. Справа и слева от пробы наносят стандартные растворы пестицидов, содержащие 1, 2, 4, 5, 10 мкг препарата.

После нанесения пробы на пластину типа "Силуфол" ее помещают в хроматографическую камеру с подвижным растворителем (№ 1) – гексан-ацетон (6:1) или (№ 2) – гексан. После того, как фронт растворителя поднимется по пластинке, ее вынимают из камеры, обрабатывают проявляющим реактивом и подвергают УФ-облучению в течение 5 – 10 мин лампой типа ПРК–4. Пластины располагают на расстоянии 20 см от источника света.

При отсутствии пластин "Силуфол" можно использовать пластины "Сорбфил" отечественного производства, с системой подвижных растворителей ацетонитрил-вода (2:1).

При наличии хлорорганических пестицидов при описанных выше условиях на пластинах проявляются пятна серо-черного цвета на светлом фоне. По значениям, соответствующих R_f определяют, какие пестициды присутствуют в продукте (табл. 5.6).

Ориентировочные значения R_f пестицидов
в различных системах растворителей

Наименование пестицидов	Система растворителей		
	№ 1 гексан–ацетон (6:1)	№ 2 гексан	Ацетонитрил–вода (2:1)
	значение R_f на пластинках		значение R_f на пластинках «Сорбфил»
«Силуфол»	«Мерк»		
Кельтан	0,15	0,05	0,21
γ-ГХЦГ	0,23	0,15	0,30
ДДД	0,32	0,37	0,42
Гептахлор	0,57	0,45	0,73
ДДЭ	0,61	0,45	0,70
Альдрин	0,70	0,82	0,80
ДДТ	0,78	0,67	0,85

Обработка результатов. Измерение содержания пестицидов проводят путем сопоставления площади пятна испытуемого экстракта и площади пятна рабочего стандартного раствора, наиболее близкого по интенсивности окраски к пятну экстракта. Площади пятен измеряют с помощью линейки или шаблона из миллиметровой бумаги. Содержание пестицидов X , мг/кг, вычисляют по формуле $X = m \cdot S_1 \cdot V_1 / m_1 \cdot S_2 \cdot V_2$, где m – масса пестицида в 1 см³ стандартного раствора, мкг; m_1 – масса навески исследуемого продукта, г; S_1 – площадь пятна, полученного при нанесении испытуемого экстракта, мм²; S_2 – площадь пятна, полученного при нанесении стандартного раствора, мм²; V_1 – объем экстракта, в котором перерастворен сухой остаток, см³; V_2 – объем исследуемого экстракта, нанесенного на пластинку, см³. При нанесении всей пробы $V_1 = V_2$.

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целого числа. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания пестицидов любой пробы при допускаемых методом изменениях влияющих факторов $\pm 0,15 X$.

Минимально обнаруживаемое содержание пестицидов в хроматографируемой пробе 1 мкг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания пестицидов одной и той

же пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов составляет $\pm 0,2 X$.

При измерении содержания пестицидов определяемая величина варьирует в пределах: для γ -ГХЦГ 75 – 80 %, кельтана 75 – 85 %, альдрин 72 – 80 %, ДДТ 76 – 90 %, ДДД 75 – 85 %, ДДЭ 70 %.

Работа 14. Определение массовой доли золы

Содержание золы в большинстве объектов живого происхождения находится на уровне нескольких процентов (г/100 г массы): древесина – 1,0; говядина, свинина, баранина 0,9 – 1,0; жиры животные 0,02 – 0,07; яйцо 1,1 – 1,2; молоко коровье 0,7 – 0,9; рыба и морепродукты 1,1 – 1,7; злаки 1,7 – 4,6; бобовые 1,2 – 3,6; соя 4,5; овощи 0,5 – 1,0; фрукты 0,5 – 0,7.

Метод основан на высокотемпературном сжигании органической части образца и гравиметрическом определении количества несгораемого остатка (золы).

Аппаратура, материалы и реактивы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Печь муфельная с регулируемой температурой 100–1000°C. Горелка газовая или плитка. Тигли фарфоровые. Щипцы тигельные. Эксикатор с осушающим силикагелем или прокаленным хлоридом кальция.

Ход работы. В предварительно прокаленный до постоянной массы тигель помещают навеску 1,0 г образца и осторожно обугливают в пламени горелки или на плитке, не давая воспламеняться и избегая выброса содержимого из тигля, а затем прокаливают в муфельной печи до постоянной массы при 900 – 1000°C более 6 ч.

Расчет. Содержание массовой доли золы (X , %) вычисляют по формуле $X = G_a \cdot 100 / g$, где g – масса взятого на прокаливание образца, г; G_a – масса золы после прокаливания в г.

Контрольные вопросы

1. Какие химические компоненты остаются в составе золы после сжигания?
2. Почему при определении массовой доли золы температура сжигания достигает 1000°C?
3. Почему содержание золы не соответствует истинному химическому составу исходных объектов?

Литература

1. Губен-Вейль. Методы органической химии. Методы анализа. – М.: Госхимиздат, 1983. – 1023 с.
2. Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
3. Лабораторный практикум по общей химии / Под ред. А.А. Таперовой – М.: Высшая школа, 1976. – 320 с.
4. Геккелер К., Экштайн Х., Аналитические и препаративные лабораторные методы. – М.: Химия, 1994. – 410 с.
5. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. – М.: ВНИИМП, 2002. – 400 с.
6. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Экологические основы биотехнологических производств. – М.: МГУЛ, 2002. – 404 с.
7. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биологически активные соединения из природных объектов. – М.: МГУЛ, 2003. – 480 с.
8. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Экологические основы производств: Взаимосвязь экологии, химии и биотехнологии. – М.: МГУЛ, 2003. – 370 с.
9. CD-ROM. Химия для всех. Вер. 2.1. – М.: МГУПБЭ, 1999. / vsedyakin@glasnet.ru.
10. Тележкин В.В., Иванкин А.Н., Олиференко Г.Л. Общая химия. Задания для индивидуальных работ. – М.: МГУЛ, 2001. – 108 с.
11. Иванкин А.Н. Основные химические реакции.. – М.: МГУЛ, 1995. – 56 с.
12. Жилин Ю.Н. Вопросы и задачи к контрольным работам по общей химии. – М.: МГУЛ, 2003. – 38 с.
13. Жилин Ю.Н. Избранные главы общей химии. – М.: МГУЛ, 2003. – 53 с.
14. Дьяченко Л.А., Лосев В.П., Олиференко Г.Л. Химия: учебное пособие. Для студентов заочного отделения. – М.: МГУЛ, 2002. – 95 с.

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВЕЩЕСТВ.....	4
Кристаллизация.....	4
Перекристаллизация.....	5
Физические основы метода.....	5
Приборы.....	8
Микрокристаллизация.....	10
Отсутствие кристаллизации.....	11
Маслообразование.....	11
Оформление результатов.....	12
Область применения.....	12
Возгонка.....	13
Физические основы метода.....	13
Приборы.....	14
Порядок работы.....	14
Источники ошибок.....	16
Оформление результатов.....	16
Область применения.....	16
Фильтрование и микрофильтрация.....	16
Физические основы метода.....	16
Приборы.....	17
Порядок работы.....	19
Источники ошибок.....	22
Область применения.....	22
Перегонка.....	22
Физические основы метода.....	22
Приборы.....	24
Порядок работы.....	24
Перегонка в роторном испарителе.....	27
Перегонка в двойной U-образной трубке.....	27
Перегонка азеотропа в приборе с ловушкой-сепаратором.....	28
Источники ошибок.....	28
Оформление результатов.....	29
Область применения.....	29
Перегонка при пониженном давлении (вакуумная перегонка).....	29
Физические основы метода.....	29
Приборы.....	30
Порядок выполнения операций.....	37
Источники ошибок.....	38
Перегонка в противотоке (ректификация).....	38
Физические основы метода.....	38
Порядок работы.....	41
Источники ошибок.....	41
Область применения.....	41
Перегонка с водяным паром.....	42

Физические основы метода.....	42
Приборы.....	44
Порядок работы.....	44
Область применения.....	45
Экстракция.....	46
Экстрагирование твердых веществ и жидкостей.....	46
Приборы.....	47
Экстрагирование твердых образцов.....	47
Экстрагирование жидкостей.....	48
Порядок работы.....	49
Источники ошибок.....	51
При экстрагировании.....	51
При барботировании.....	52
Область применения.....	52
Мембранная фильтрация.....	52
Физические основы метода.....	52
Приборы.....	53
Порядок работы.....	58
Источники ошибок.....	58
Оформление результатов.....	58
Область применения.....	59
Диализ и электродиализ.....	59
Физические основы метода.....	59
Приборы.....	60
Порядок работы.....	61
Источники ошибок.....	62
Оформление результатов.....	63
Область применения.....	63
Лиофилизация.....	63
Физические основы метода.....	63
Приборы.....	65
Подготовка образца.....	67
Порядок выполнения операций.....	68
Особые случаи.....	69
Область применения.....	69
Контрольные вопросы к главе 1.....	69
Глава 2. ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА.....	70
Работа 1. Очистка веществ.....	70
Опыт 1. Очистка природной воды.....	70
Опыт 2. Очистка гидрокарбоната натрия перекристаллизацией.....	72
Опыт 3. Получение карбоната натрия прокаливанием гидрокарбоната.....	73
Опыт 4. Очистка йода возгонкой.....	74
Работа 2. Получение свинца из его соли путем последовательных реакций.....	74
Атомно-молекулярная теория.....	75

Работа 3. Определение качественного состава дигидрокарбоната меди (малахита) и процентного содержания в нем оксида меди.....	75
Работа 4. Определение формулы кристаллогидрата сульфата меди.....	77
Работа 5. Определение эквивалента металла методом вытеснения водорода.....	78
Работа 6. Определение эквивалента меди по эквиваленту кислорода и вывод формулы оксида меди.....	83
Работа 7. Определение эквивалента сложного вещества – карбоната кальция.....	85
Работа 8. Определение молярной массы диоксида углерода.....	86
Контрольные вопросы и задачи.....	88
Скорость химических реакций. Химическое равновесие.....	89
Работа 9. Влияние различных факторов на скорость химических реакций	89
Опыт 1. Влияние природы реагирующих веществ на скорость химической реакции.....	90
Опыт 2. Влияние концентрации реагирующих веществ на скорость химической реакции.....	91
Опыт 3. Влияние температуры на скорость химической реакции.....	94
Опыт 4. Влияние величины поверхности раздела реагирующих веществ на скорость химической реакции в гетерогенной системе.....	95
Работа 10. Катализ и его влияние на скорость химических реакций.....	95
Опыт 1. Гомогенный катализ.....	96
Опыт 2. Гетерогенный катализ.....	98
Опыт 3. Сравнение активности различных катализаторов.....	98
Опыт 4. Автокатализ.....	99
Работа 11. Химическое равновесие и его смещение.....	101
Опыт 1. Влияние изменения концентрации на смещение равновесия.....	101
Опыт 2. Влияние изменение температуры на смещение равновесия.....	102
Контрольные вопросы и задачи.....	102
Растворы.....	104
Работа 12. Общие свойства растворов.....	104
Опыт 1. Изменение объема при растворении.....	104
Опыт 3. Определение растворимости соли.....	106
Опыт 4. Приготовление пересыщенных растворов.....	107
Опыт 5. Явление осмоса.....	107
Опыт 6. Зависимость растворимости веществ от температуры.....	108
Опыт 7. Тепловой эффект растворения.....	108
Опыт 8. Определение температуры замерзания раствора.....	109
Работа 13. Электролитическая диссоциация.....	110
Опыт 1. Экспериментальные наблюдения электролитической диссоциации.....	110

Опыт 2. Определение изотонического коэффициента и кажущейся степени диссоциации хлорида натрия криоскопическим методом.....	113
Опыт 3. Смещение равновесия диссоциации слабого электролита.....	114
Опыт 4. Направление обменных ионных процессов в растворах электролитов.....	115
Работа 14. Производство растворимости	117
Опыт 1. Условия выпадения осадка.....	117
Опыт 2. Влияние одноименных ионов на выпадение осадка.....	117
Опыт 3. Зависимость последовательности выпадения осадков малорастворимых веществ от величины их произведения растворимости.....	117
Опыт 4. Условия растворения осадков в результате химического взаимодействия.....	118
Опыт 5. Влияние величины произведения растворимости электролита на его способность к химическому взаимодействию.....	118
Опыт 6. Получение одних малорастворимых соединений из других.....	119
Работа 15. Водородный показатель рН. Индикаторы.....	119
Опыт 1. Окраска кислотно-основных индикаторов в кислой и щелочной средах.....	121
Опыт 2. Определение рН раствора при помощи универсальной индикаторной бумаги.....	122
Опыт 3. Определение рН при помощи рН-метра или иономера ..	122
Приборы.....	125
Порядок выполнения операций.....	125
Калибровка прибора.....	126
Измерение рН.....	126
Хранение стеклянных электродов.....	127
Измерение рН в неводных средах.....	127
Источники ошибок.....	127
Большая инерция при установлении показаний или их полное отсутствие.....	127
Дрейф измеряемого значения рН.....	128
Зашкаливание	128
Работа 16. Гидролиз солей.....	128
Опыт 1. Внешнее проявление гидролиза солей	128
Опыт 2. Образование основных и кислых солей при ступенчатом гидролизе.....	130
Опыт 3. Особые случаи полного гидролиза.....	130
Опыт 4. Исследование факторов, влияющих на степень гидролиза солей.....	130
Контрольный опыт.....	132
Контрольные вопросы и задачи.....	132
Поверхностные явления. Дисперсные системы.....	135

Работа 17. Адсорбция	135
Опыт 1. Адсорбция газов углем.....	135
Опыт 2. Влияние температуры на адсорбцию.....	137
Опыт 3. Адсорбция молекул из растворов углем.....	137
Опыт 4. Адсорбция ионов из раствора.....	138
Опыт 5. Ионообменная адсорбция	138
Опыт 6. Адсорбция ионов свинца (II) осадком сульфата бария.....	139
Работа 18. Коллоидные системы. Эмульсии. Суспензии.....	139
Опыт 1. Получение суспензии мела в воде.....	140
Опыт 2. Приготовление эмульсий бензола и масла в воде.....	140
Опыт 3. Получение золь методом конденсации.....	140
Опыт 4. Получение золь методом диспергирования.....	142
Опыт 5. Определение знака заряда коллоидных частиц.....	142
Опыт 6. Коагуляция гидрозоль	144
Опыт 7. Коагуляция аэрозоля путем электрофореза.....	144
Опыт 8. Защитный коллоид.....	145
Опыт 9. Измерение вязкости лиофильных и лиофобных коллоидных растворов.....	146
Контрольные вопросы и задачи.....	147
Комплексные соединения.....	147
Работа 19. Комплексные соединения.....	147
Опыт 1. Образование соединений с комплексным анионом	148
Опыт 2. Образование соединений с комплексным катионом.....	148
Опыт 3. Образование соединения, содержащего комплексный катион и комплексный анион.....	149
Опыт 4. Комплексные соединения в химических реакциях.....	149
Опыт 5. Прочность комплексных ионов и разрушение комплексов.....	150
Контрольные вопросы и задачи	152
Термохимия.....	154
Работа 20. Термохимия.....	154
Опыт 1. Определение теплового эффекта процесса растворения безводной соли.....	154
Опыт 2. Определение теплоты реакции нейтрализации.....	156
Контрольные вопросы и задачи.....	157
Окислительно – восстановительные процессы.....	158
Работа 21. Окислительно-восстановительные процессы.....	158
Опыт 1. Электростатические и электродинамические химические реакции.....	158
Опыт 2. Зависимость окислительно-восстановительных свойств элементов от их положения в периодической системе элементов Д. И. Менделеева.....	159

Опыт 3. Простые вещества и элементарные ионы в качестве окислителей и восстановителей.....	160
Опыт 4. Сложные ионы и молекулы в качестве окислителей и восстановителей. Влияние рН среды на окислительно-восстановительный процесс	161
Опыт 5. Окислительно-восстановительные свойства элемента в зависимости от его степени окисления.....	162
Опыт 6. Влияние окислительно-восстановительных потенциалов на ход химического процесса.....	163
Контрольные вопросы и задачи.....	164
Электрохимические процессы	166
Работа 22. Гальванические элементы. Электролиз водных растворов.....	166
Опыт 1 Количественное определение различной электрической активности металлов.....	167
Опыт 2. Гальванические элементы.....	168
Опыт 3. Влияние образования микрогальванических элементов на течение химических процессов.....	169
Опыт 4. Электролиз водных растворов с нерастворимым анодом.....	170
Опыт 5. Электролиз водных растворов с растворимым анодом.....	172
Работа 23. Коррозия и защита металлов.....	173
Опыт 1. Химическая и электрохимическая коррозия.....	173
Опыт 2. Химические методы нанесения на металл защитных пленок.....	174
Опыт 3. Электрохимическое оксидирование.....	176
Опыт 4. Нанесение гальванических покрытий.....	177
Опыт 5. Применение ингибиторов.....	180
Контрольные вопросы и задачи	180
Глава 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ.....	182
Основы процесса хроматографии.....	182
Распределительная хроматография.....	183
Материалы – носители.....	184
Силы адгезии.....	184
Адсорбция.....	184
Ковалентные связи.....	185
Порядок выполнения операций.....	186
Область применения.....	186
Ионообменная хроматография	187
Приборы	188
Подготовка образца	189
Оформление результатов	190
Область применения	191
Аминокислотный анализ (АКА)	192
Физические основы метода	192
Приборы	195
Порядок выполнения операций.....	196

Аффинная хроматография.....	197
Физические основы метода	197
Материалы	199
Область применения	203
Гель – хроматография	203
Материалы	205
Гидрофильные гели	205
Органофильные гели	207
Подготовка эксперимента	212
Порядок выполнения операций.....	213
Оформление результатов	214
Тонкослойная хроматография (ТСХ)	215
Физические основы метода	215
Область применения	217
Аналитическая ТСХ	217
Основы метода	217
Выбор элюирующих систем	219
Условия проведения эксперимента	220
Материалы и приборы	221
Порядок выполнения операций.....	222
Оформление результатов	224
Приборы	224
Источники ошибок	225
Стадия подготовки пробы	226
Источники ошибок	227
Слишком высокое содержание белка	227
Высокое содержание солей в пробе	228
Неудачное нанесение пробы	228
Колоночная хроматография	229
Жидкостная хроматография низкого давления	229
Особенности метода	230
Приборы	231
Резервуар для элюента и градиентный смеситель	231
Соединительные шланги	232
Насосы.....	232
Устройства ввода пробы	237
Колонки	240
Детекторы	241
Фракционный коллектор	241
Автоматизация процесса управления	243
Порядок выполнения операции.....	244
Упаковка колонки	244
Проверка качества упаковки	247
Нанесение пробы	247
Элюирование	248
Оформление результатов	249
Область применения	249
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	249

Физические основы метода	249
Приборы и материалы	251
Градиентный смеситель.....	251
Устройства ввода пробы	252
Колонки	253
Сорбенты	254
Приборы для упаковки колонок	255
Подготовка пробы	255
Порядок выполнения операций. Упаковка колонки	256
Источники ошибок	257
Оформление результатов.....	258
Область применения	259
Детекторы.....	259
Основы процесса	259
Приборы. УФ-детекторы.....	261
Рефрактометрические детекторы	262
Источники ошибок	263
Газовая хроматография	264
Особенности метода	264
Аналитическая газовая хроматография.....	267
Приборы и материалы	267
Колонки	268
Устройства ввода пробы	269
Детекторы	270
Материалы-носители	273
Жидкая фаза	274
Подготовка пробы.....	274
Порядок выполнения операций.....	276
Подготовка колонки	276
Нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель	276
Заполнение колонки	276
Ввод пробы	277
Специальные варианты газовой хроматографии	277
Оценка результатов анализа.....	278
Источники ошибок	279
Оформление результатов	281
Область применения	281
Электрофоретические методы разделения	281
Физические основы метода	281
Зональный электрофорез (ЗЭ)	283
Физические основы метода	283
Материалы-носители	284
Величина рН	284
Буферные растворы	286
Электроосмос	286
Приборы	287
Оформление результатов	287
Гель-электрофорез. Основы метода	287

Электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ)	289
Диск – электрофорез в ПААГ (диск – ПААГ)	289
Электрофорез ДСН-ПААГ	290
Электрофорез в градиенте пористости ПААГ	290
Приборы	291
Камера для электрофореза.....	291
Источник питания	291
Кювета для окрашивания и обесцвечивания гелей	291
Устройство для высушивания гелей	291
Подготовка образца	292
Порядок выполнения операций	292
Нанесение образца	292
Проведение электрофореза	293
Обнаружение	293
Консервация	295
Анализ результатов	295
Область применения	295
Определение молекулярной массы	295
Определение молекулярной массы по плотности пара	296
Физические основы метода	296
Приборы	297
Порядок выполнения операций	298
Область применения	298
Эбулиоскопия и криоскопия	298
Физические основы метода	298
Приборы	300
Порядок выполнения операций	301
Микрометод Раста	302
Анализ результатов.....	302
Источники ошибок	302
Оформление результатов	302
Осмометрия.....	303
Мембранная осмометрия	303
Физические основы метода	303
Приборы	304
Порядок выполнения операций	305
Анализ результатов.....	306
Оформление результатов	306
Область применения	306
Вискозиметрия	307
Физические основы метода.....	307
Приборы	309
Порядок выполнения операций.....	311
Анализ результатов	311
Источники ошибок	312
Оформление результатов	312
Область применения	312
Другие методы определения молекулярной массы	312
Глава 4. МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ	314
Связанный азот, аминокислоты и белки.....	314

Работа 1. Макро- и микроопределение азота.....	314
Опыт 1. Метод Кьельдаля	314
Опыт 2. Метод Дюма	317
Опыт 3. Определение суммарного азота по методу Слоан - Стенли (микрометод)	320
Работа 2. Свойства аминокислот, пептидов и белков.....	321
Опыт 1. Определение рН растворов аминокислот.....	322
Опыт 2. Действие азотистой кислоты на аминокислоты	322
<i>Опыт 3. Нингидриновая реакция аминокислот</i>	323
<i>Опыт 4. Отношение белков к кислотам и щелочам.....</i>	324
<i>Опыт 5. Биуретовая реакция белков</i>	325
<i>Опыт 6. Высаливание белков из растворов.....</i>	325
Опыт 7. Осаждение и денатурация белка из раствора при добавлении этанола.....	326
Опыт 8. Осаждение и денатурация белка при добавлении солей тяжелых металлов	326
Опыт 9. Денатурация и осаждение белка при нагревании.....	326
Контрольные вопросы.....	327
Работа 3. Определение изоэлектрической точки белка	327
Контрольные вопросы.....	329
Работа 4. Полный гидролиз простых белков.....	329
Опыт 1. Полный кислотный гидролиз белка.....	329
Опыт 2. Аминокислотный анализ гидролизата белка с использованием автоматического аминокислотного анализатора.....	330
Контрольные вопросы.....	333
Работа 5. Определение содержания азота свободных аминогрупп (аминного азота).....	334
Опыт 1. Формольное титрование по методу Зеренсена	334
Опыт 2. Титрование в среде спирта	336
Опыт 3. Определение карбоксильных групп при помощи нингидрина	337
Опыт 4. Определение α -аминокислот в виде комплексных соединений меди и нингидрина.....	338
Определение аминного азота при помощи нингидрина.....	339
Опыт 5. Формольное титрование с рН-метром	340
Контрольные вопросы.....	341
Работа 6. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии на бумаге.....	341
Контрольные вопросы.....	344

Работа 7. Количественные методы определения содержания белка.....	344
Опыт 1. Спектрофотометрическое определение содержания белка в растворе. Сравнение поглощения при 215 и 225.нм.....	345
Опыт 2. Определение белка методом Лоури.....	345
Опыт 3. Определение содержания общего белка по данным элементного анализа определения азота. Метод Йенике-Кьельдаля.....	347
Контрольные вопросы.....	348
Работа 8. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия	348
Опыт 1. Изучение молекулярно-массового распределения водорастворимых белков методом гель-электрофореза в 18%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия	349
Опыт 2. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле с градиентном концентрации акриламида от 4 до 10% в присутствии додецилсульфата натрия	352
Контрольные вопросы	355
Работа 9. Ионообменная хроматография.....	355
Контрольные вопросы.....	360
Работа 10. Очистка белков методом гель-проникающей хроматографии.....	360
Контрольные вопросы.....	364
Работа 11. Изучение молекулярно-массового распределения белков методом гель-проникающей хроматографии.....	365
Контрольные вопросы.....	367
Ферменты	368
Работа 12. Определение активности пенициллинацилазы.....	368
Контрольные вопросы.....	369
Работа 13. Анализ ферментов. Определение ферментной активности препаратов.....	370
Опыт 1. Определение амилазной активности панкреатина.....	370
Опыт 2. Определение нуклеазной активности препаратов, содержащих РНКазу.....	372
Опыт 3. Определение протеиназной активности ферментных препаратов.....	373
Опыт 4. Определение липолитической (липазной) активности фермента.....	374
Опыт 5. Определение удельной активности очищенного кристаллического трипсина.....	376
Опыт 6. Количественное определение коллагенолитической активности.....	377

Опыт 7. Количественное определение коллагенолитической активности коллагеназы по оксипролину.....	379
Контрольные вопросы.....	383
Работа 14. Получение иммобилизованных ферментов. Аминоацилаза, включенная в полиакриламидный гель	383
Контрольные вопросы.....	384
Сахариды	385
Работа 15. Выделение растворимого гетерополисахарида – гепарина из животного сырья методом ионообменной хроматографии.....	385
Контрольные вопросы	387
Работа 16. Количественное определение сорбционной емкости ионитов по биологически активному веществу (гепарину).....	388
Контрольные вопросы.....	389
Работа 17. Количественное определение содержания углеводов	390
Опыт 1. Количественное определение содержания углеводов.....	390
Опыт 2. Определение содержания гликогена и редуцирующего сахара	392
Контрольные вопросы	394
Опыт 3. Определение содержания лигнина	394
ДНК и нуклеотиды.....	395
Работа 18. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.....	395
Контрольные вопросы.....	397
Работа 19. Количественное определение ДНК, РНК и их компонентов в гидролизатах спектрофотометрическим методом по Спирину	397
Контрольные вопросы	398
Работа 20. Свойства дрожжей. Дезинтегрирование дрожжевой биомассы.....	398
Контрольные вопросы.....	403
Липиды.....	403
Работа 21. Свойства липидов.....	403
Опыт 1. Определение общего содержания жира	404
Опыт. 2. Определение массовой доли свободно извлекаемого жира.....	406
Опыт. 3. Определение жирно-кислотного состава жиров и масел методом газовой хроматографии	408
Опыт 4. Определение глубины гидролиза жиров.....	411
Опыт 5. Определение кислотного числа жиров и масел	412
Опыт 6. Определение кислотного числа в сильно окрашенных смесях, содержащих липиды	412

Опыт 7. Определение перекисного числа жиров.....	413
Опыт 8. Определение йодного числа жиров.....	414
Опыт 9. Жировые эмульсии. Оценка эмульгирующей способности эмульгатора	416
Опыт 10. Оценка стабильности эмульсии	416
Контрольные вопросы	417
Работа 22. Методы разделения веществ. Основы центрифугирования	417
Контрольные вопросы.....	419
Работа 23 Изучение объектов под микроскопом. Основы микроскопирования.....	420
Контрольные вопросы.....	423
Работа 24. Изучение препаратов и образцов методом световой микроскопии.....	423
Контрольные вопросы	428
Глава 5. МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВ И МОНИТОРИНГА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	428
Работа 1. Почва как составная часть биосферы. Почвенные ферменты	428
ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ	429
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ.....	430
ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ.....	431
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОЧВЕ.....	438
Опыт 1. Оксидорудуктазы. Каталаза.....	439
Опыт 2. Пероксидаза.....	440
Опыт 3. Полифенолоксидаза.....	441
Опыт 4. Нитратредуктаза.....	442
Опыт 5. Нитритредуктаза.....	443
Опыт 6. Целлюлаза.....	444
Опыт 7. Пептид- и амидогидролазы. Протеазы.....	445
Опыт 8. Уреаза.....	446
Опыт 9. Липаза.....	447
Контрольные вопросы.....	447
Анализ воздуха.....	448
Работа 2. Анализ воздуха. Определение содержания пыли в воздухе.....	448
Контрольные вопросы.....	449
Работа 3. Фотометрическое определение аммиака в воздухе.....	449
Контрольные вопросы.....	452
Работа 4. Фотометрическое определение содержания формальдегида в воздухе.....	453
Контрольные вопросы.....	455

Анализ качества воды.....	456
Работа 5. Определение содержания воды в образце. Эталонный метод ИСО.....	457
Работа 6. Определение pH сточных вод. Эталонный метод.....	458
Контрольные вопросы.....	460
Работа 7. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов и металлов.....	460
Работа 8. Определение содержания Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} методом ионной хроматографии.....	466
Работа 9. Определение содержания неорганических анионов (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) в растворе методом ионной хроматографии.....	470
Работа 10. Определение общих органических и неорганических примесей в воде	472
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИХРОМАТНОЙ ОКИСЛЯЕМОСТИ (ХПК) УСКОРЕННЫМ МЕТОДОМ.....	473
Контрольные вопросы	475
Работа 11. Определение содержания формальдегида в воде титрованием.....	475
Контрольные вопросы.....	476
Работа 12. Определение содержания ионов железа в воде	476
Контрольные вопросы.....	479
Работа 13. Определение хлорсодержащих пестицидов методом тонкослойной хроматографии.....	479
Работа 14. Определение массовой доли золы	484
Контрольные вопросы.....	484
Литература.....	485
Оглавление	486

Учебное издание

*Андрей Дмитриевич Неклюдов
Андрей Николаевич Иванкин
Геннадий Николаевич Федотов
Галина Львовна Олиференко*

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ХИМИИ

Редактор А.П. Головина

Оригинал-макет подготовил А.Н. Иванкин

Компьютерная верстка А.Н. Иванкина, А.Д. Неклюдова

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2016 год

Лицензия ЛР N 020718 от 02.02.1998 г.

Лицензия ПД N 00326 от 14.02.2000 г.

Подписано к печати

Формат 60x88/16

Бумага 80 г/м² «Снегурочка»

Ризография

Объем 31,25 п. л.

Тираж 200 экз.

Заказ N

Издательство Московского государственного университета леса.
141005. Мытищи 5. Московской обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ.

Телефон: (095) 588-57-62

e-mail: izdat@mgul. ac. ru

Andrey D. Neklyudov
Andrey N. Ivankin
Gennady N. Fedotov
Galina L. Oliferenko

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL METHODS
OF RESEARCH IN CHEMISTRY

MSFU Publ., 2016



Книга написана российскими специалистами в области химии, аналитической химии и физико-химических методов анализа веществ и материалов природного происхождения для решения практических задач в области безопасного использования в условиях окружающей среды.

Данная книга может быть использована для обучения вопросам химической технологии в системе бакалавриата, магистратуры, специалитета и аспирантуры всех форм обучения, реализуемой в технических университетах.

The book was written by Russian experts in the field of chemistry, analytical chemistry and physical and chemical methods for analyzing substances and materials of natural origin to solve practical problems in the field of safe use in environmental conditions.

This book can be used for teaching chemical technology in bachelor's, master's, specialty and postgraduate degrees of all forms of study, implemented at technical universities.

